

[文章编号] 1007-3949(2007)15-12-0885-04

• 实验研究 •

过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 激活剂抑制 体外血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的心肌细胞肥大

盛莉¹, 叶平¹, 刘永学², 韩春光²

(1. 中国人民解放军总医院老年心血管二科, 北京市 100853;

2. 中国人民解放军军事医学科学院放射医学研究所药理毒理室, 北京市 100850)

[关键词] 内科学; 过氧化体增殖物激活型受体; β/δ 亚型; 激活剂; 心肌肥厚; 心房钠尿肽; 脑钠尿肽

[摘要] 目的 探讨过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 激活剂 GW0742 在体外对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的肥大心肌细胞的作用, 分析过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 在其中的可能作用。方法 体外培养新生大鼠的心室肌细胞, 用血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导建立心肌肥厚模型, 在模型中加入 GW0742, 用软件分析心肌细胞表面积观察心肌细胞面积, ^3H -亮氨酸的掺入检测心肌细胞蛋白合成速率及使用逆转录聚合酶链反应半定量测定心房钠尿肽、脑钠尿肽和过氧化体增殖物激活型受体 β/δ mRNA 的表达变化, 用免疫荧光方法测定过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 的蛋白表达水平。结果 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 可使体外培养的心肌细胞面积和 ^3H -亮氨酸的掺入增加, 升高心房钠尿肽和脑钠尿肽的表达, 过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 表达下降; GW0742 可逆转上述变化。结论 GW0742 具有抑制血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的体外心肌细胞肥大的作用, 很可能通过活化过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 途径。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Agonist of Peroxisome Proliferators Activated Receptor Beta/Delta Inhibits the Hypertrophy of Cardiac Myocytes by Ang II Induced in Vitro

SHENG Li¹, YE Ping¹, LIU Yong-Xue², and HAN Churr-Guang²

(1. Department of Geriatric Cardiology, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853; 2. Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[KEY WORDS] Peroxisome Proliferators Activated Receptor; Beta/Delta Subtype; Agonist; Cardiac Hypertrophy; Atrial Natriuretic Polypeptide; Brain Natriuretic Peptide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of agonist of peroxisome proliferators activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) on angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ -induced hypertrophy myocytes and the changes of expressions of PPAR β/δ in vitro. **Methods**

Hypertrophy in neonatal rat cardiac myocytes (MC) was established with Ang II and treated with GW0742. The surface area of MC was analyzed by the aid of NIH Image J software, and the synthetic rate of protein in MC was detected by ^3H -leucine incorporation. mRNA expression of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), and PPAR β/δ was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Protein expression of PPAR β/δ was detected by immunofluorescence staining. **Results** Changes induced by Ang II of MC were detected, including increases of surface area, mRNA expression of ANP, BNP, and ^3H -leucine incorporation; and decreases of mRNA and protein expressions of PPAR β/δ . Treatment with GW0742 inhibited the changes above. **Conclusions** The results demonstrate that GW0742, an agonist of PPAR β/δ , inhibits cardiac hypertrophy in vitro and suggest that GW0742 has a potential role in the prevention and treatment of cardiac diseases such as cardiac hypertrophy by activation of PPAR β/δ pathway.

过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR) 是一类由配体活化的核转录因子, 1990 年由 Issemann 等^[1] 首先发现, 到目前已确定分为 α 、 β/δ 和 γ 三个亚型, 它是调节脂质

代谢、胰岛素敏感性、炎症反应、细胞生长和分化的重要因子。既往研究业已证明, PPAR α ^[2,3] 和 PPAR γ ^[4,5] 活化均可抑制心肌肥厚, 而 PPAR β/δ 分布广泛, 其作用尚不明确。近期, 随着 PPAR β/δ 特异性合成配体(激动剂) 的出现, 给此方面的研究带来可能性。Gilde 等^[6] 应用乳鼠心肌细胞和胎鼠心脏起源的 H9c2 细胞明确证实 PPAR β/δ 是在心脏中占优势的亚型, 并与 PPAR α 相似, 在调节心脏脂质代谢中起重要作用, 由此推测其在心脏疾病的发生发展中起到重要的作用。本研究应用 PPAR β/δ 的激动

[收稿日期] 2007-04-12 [修回日期] 2007-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金(30270551)

[作者简介] 盛莉, 博士研究生, 研究方向为脂质代谢紊乱与心血管疾病, E-mail 为 shengli301@163.com。叶平, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂代谢与动脉粥样硬化的基础与临床研究, E-mail 为 yeping@sina.com。刘永学, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事受体药理学和新药研究, E-mail 为 liuyx@nic.bmi.ac.cn。

剂 GW0742 作用于心肌细胞肥大模型, 探讨 PPAR β/δ 活化在 Ang Ⅱ 诱导的心肌细胞肥大中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 动物、主要试剂及仪器

Wistar 大鼠, 日龄 1~2 d, 由军事医学科学院实验动物中心提供。GW0742 (G3295, Sigma 公司); 高糖 DMEM 干粉培养基、新生小牛血清、胰蛋白酶 (Gibco 公司); 血管紧张素 Ⅱ (angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) (Sigma 公司); 逆转录酶聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、DNA Marker DL2000 (TaKaRa 公司); 总 RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen 公司); ^3H -亮氨酸 (北京原子高科技术应用股份有限公司); 5'-溴脱氧尿苷 (5'-bromodeoxyuridine, 5'-BrdU) (ALDRICH 公司); 羊抗鼠 PPAR β/δ 抗体 (K-20: sc-1987) 购自美国 Santa Cruz 公司; 异硫氰酸荧光素标记的兔抗羊 IgG 抗体 (北京中山生物技术有限公司)。高速冷冻离心机 (Heraeus Labofuge 400); PCR 扩增仪 (Gene Amp PCR-2400); DU -640 核酸蛋白分析仪、LS-6500 液体闪烁计数器 (Beckman 公司); Randiance 2100 型激光扫描共聚焦显微镜 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 引物

引物由北京赛百胜生物工程公司合成。引物序列如下: 心房钠尿肽上游引物为 5'-GGC TCC TTC TCC ATC ACC AA-3', 下游为 5'-TGT TAT CTT CGG TAC CG-3', 扩增片长 458 bp; 脑钠尿肽上游为 5'-TTT TCC TTA ATC TGT CGC CG-3', 下游为 5'-AGA GCT GGG GAA AGA AGA GC-3', 扩增片长 387 bp; PPAR β/δ 上游为 5'-AGC ACA TCT ACA ATG CCT ACC T-3', 下游为 5'-TCT TGG CGA ACT CGG TGA-3', 扩增片长 258 bp; 内参 GAPDH 上游为 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GGG-3', 下游为 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3', 扩增片长 196 bp。

1.3 心脏细胞原代培养及模型建立

根据本实验室既往的方法^[7], 选取 1~3 天新生大鼠 10~20 只 (体重 12 ± 3 g), 在无菌条件下开胸取出心脏, 置入 PBS 冲洗残血, 剪碎至 1~3 mm³ 大小, 以 0.08% 的胰蛋白酶消化 5 min 左右, 10% 牛血清培养基终止消化, 反复数次, 直至碎片完全消化。将收集的细胞悬液用 200 目筛网过滤后, 收集细胞于离心管, 1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清液, 将细胞沉淀以培养液悬浮, 用差速贴壁法去除非心肌细胞, 将心肌细胞以 1×10^9 个/m² 接种于培养瓶中。心肌

细胞培养的前 48 h 培养基中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 5'-BrdU 以抑制残余非心肌细胞的增殖。细胞在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。将上述原代心肌细胞培养 48 h, 换成无血清再培养 24 h 后, 加入 Ang Ⅱ (1 $\mu\text{mol/L}$) 作用 48 h 即可诱导心肌肥大。

1.4 实验分组及处理

实验设立三组。正常组: 未给予任何处理的细胞; ④模型组: 将原代心肌细胞培养 48 h, 换成无血清再培养 24 h 后, 用 1 $\mu\text{mol/L}$ Ang Ⅱ 作用 48 h 诱导心肌细胞肥大; ④GW0742 处理组: 心肌细胞培养 48 h 后, 更换无血清培养基, 24 h 后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 GW0742 处理细胞, 经过 60 min 后, 再加入 Ang Ⅱ (终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$), 作用 48 h 后收获细胞。

1.5 心肌细胞表面积的测定

心肌细胞经各种处理后, 通过数码相机摄影扫描, 以测量软件 NIH Image J 测定分析表面积结果。每处理组随机选择 2~3 瓶细胞, 测量 100 个细胞的表面积, 取其均值。

1.6 心肌细胞 ^3H -亮氨酸的掺入测定

以台盼兰染色计数活细胞, 用 10% 牛血清培养基调整心肌细胞至 5×10^8 个/L, 接种于 12 孔板, 1.5 mL/孔。以下处理同前, 在加入 Ang Ⅱ 之后, 每孔加入 37 kBq ^3H -亮氨酸。48 h 后用预冷的 PBS 洗涤两遍, 加入 10% 三氯醋酸 1 mL, 4 °C 放置 60 min 以沉淀蛋白。收集沉淀物, 95% 乙醇洗涤三遍, 加入 0.15 mol/L NaOH 20 μL 重悬后收集到玻璃纤维滤膜上。烘干滤膜, 放入闪烁瓶中, 加入闪烁液 3 mL, 用 LS-6500 液体闪烁计数器行掺入量的测定。结果以 cpm 值表示, 掺入量反映心肌细胞的蛋白合成速率。

1.7 逆转录聚合酶链反应扩增目的基因

以 Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA。经 DU-640 核酸分析仪检测纯度及浓度后, 严格按照 RT-PCR 试剂盒说明书操作, 分别以各自的引物扩增心房钠尿肽、脑钠尿肽、PPAR β/δ 和内参照 GAPDH。心房钠尿肽、脑钠尿肽和 GAPDH 的 PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s \rightarrow 48 °C 退火 1 min \rightarrow 72 °C 延伸 1 min, 28 次循环; 72 °C 再延伸 8 min。PPAR β/δ 的 PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 45 s \rightarrow 55 °C 退火 1 min \rightarrow 72 °C 延伸 1 min, 33 次循环; 72 °C 再延伸 8 min。取 RT-PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 (含溴化乙锭 0.5 mg/L), 紫外凝胶成像系统分析光密度值, 以待测基因与相应内参照光密度比值作为 mRNA 相对表达量。

1.8 激光共聚焦方法

根据文献方法略加改变后^[8], 原代培养的乳鼠

心肌细胞经差速贴壁法去除非心肌细胞后,以台盼兰染色计数活细胞,用 10% 牛血清培养基调整心肌细胞至 5×10^8 个/L,接种于 12 孔板(每孔内置有细胞爬片),1.5 mL/孔。各组分别于处理后 48 h, PBS 冲洗 3 次,将长有细胞的玻片取出,用 4% 多聚甲醛固定 30 min; 经 PBS 洗 3 次,用含 0.1% TritonX-100 的 4% 甲醇孵育 20 min; 用 10% 正常山羊血清室温封闭 30 min; 分别加入第一抗体,即羊抗鼠 PPAR β/δ (1:100, Santa Cruz, 美国) 多克隆抗体,4 °C 过夜; PBS 清洗 3 次后,加入 1:50 FITC (fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素) 标记的兔抗羊 IgG (北京中山生物技术有限公司) 室温作用 1 h; PBS 冲洗 3 次后,90% 甘油封片。将待测样品置激光扫描共聚焦显微镜下,分别选用 10 倍和 100 倍物镜(目镜为 10 倍),HQ590/70 发射滤片确定 HeNe 激光器激发光波长为 543 nm,进入 LaserSharp 2000 程序 (Bio-Rad CA USA),预扫描后选定最佳细胞扫描参数,固定参数下扫描细胞照片并保存,采用软件 Laser sharp 2000 测量数据。

1.9 统计学处理

各实验数据为实验重复 3 次的平均值,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 GW0742 对肥大心肌细胞表面积和³H-亮氨酸掺入的影响

与正常心肌细胞相比,Ang Ⅱ诱导的肥大心肌细胞的表面积、³H-亮氨酸掺入显著增加($P < 0.01$);

表 1. GW0742 对肥大心肌细胞特征性改变的影响

参数	正常组	模型组	GW0742 处理组
表面积增加倍数	1.00 ± 0.53	1.50 ± 0.60 ^a	1.25 ± 0.73 ^d
³ H-亮氨酸掺入(cpm/孔)	320.7 ± 53.6	718.3 ± 139.5 ^b	323.5 ± 82.1 ^c
心房钠尿肽 mRNA	0.74 ± 0.21	1.69 ± 0.28 ^b	1.05 ± 0.26 ^c
脑钠尿肽 mRNA	0.49 ± 0.30	1.54 ± 0.25 ^b	0.63 ± 0.33 ^c
PPAR β/δ mRNA	2.50 ± 0.45	0.76 ± 0.30	1.47 ± 0.25

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常组比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比。

2.3 GW0742 对肥大心肌细胞中过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 蛋白表达的影响

心肌细胞肥大时 PPAR β/δ 在蛋白表达水平上明显下降($P < 0.05$)。对心肌细胞肥大模型应用 GW0742, PPAR β/δ 蛋白表达增加($P < 0.05$), 并且心肌细胞核内的 PPAR β/δ 表达明显增加, 显示其活化

GW0742 在终浓度为 10 μ mol/L 时可明显逆转上述改变(表 1)。

2.2 GW0742 对肥大心肌细胞心房钠尿肽、脑钠尿肽和过氧化体增殖物激活型受体 β/δ 的 mRNA 表达的影响

与正常心肌细胞相比,肥大心肌细胞的特征性分子心房钠尿肽和脑钠尿肽的 mRNA 表达明显增加, PPAR β/δ 的 mRNA 表达明显下降($P < 0.01$), GW0742 减少心房钠尿肽和脑钠尿肽的 mRNA 表达, 增加 PPAR β/δ 的 mRNA 的表达($P < 0.05$, 表 1 和图 1)。

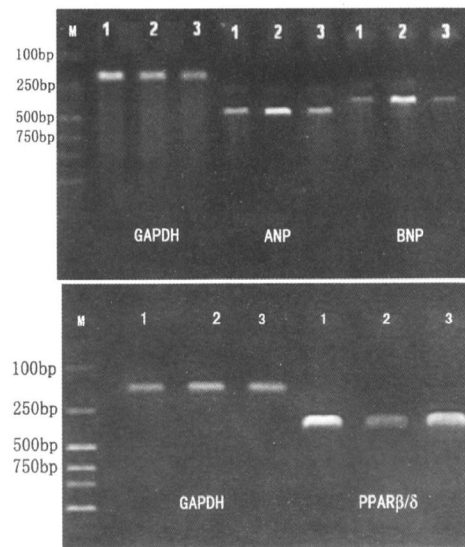


图 1. 逆转录聚合酶链反应扩增目的基因结果图 M 为相对分子质量, 1 为正常组, 2 为模型组, 3 为 GW0742 处理组。

的数量增加(图 2)。

3 讨论

本研究利用体外 Ang Ⅱ诱导的心肌细胞肥大模型, 加入 PPAR β/δ 特异性激动剂 GW0742(浓度为 10 μ mol/L), 发现可明显减少模型组的心肌细胞表面

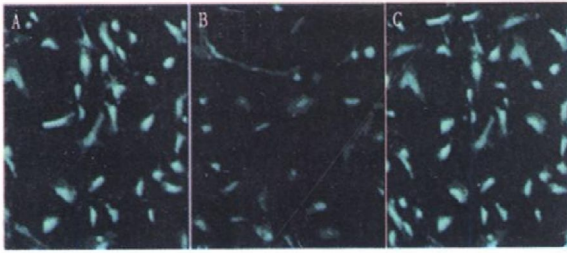


图2. GW0742 活化肥大心肌细胞中的过氧化体增殖物激活型受体 β/δ ($\times 100$) A 为正常组, B 为模型组, C 为 GW0742 处理组。

积,抑制心肌细胞蛋白合成(^3H -亮氨酸掺入)和心肌肥厚特征性基因心房钠利尿肽及脑钠利尿肽的 mRNA 表达,表明 GW0742 可抑制体外 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

在 PPAR 的三个亚型中,PPAR β/δ 分布广泛,除脂肪组织外的几乎所有组织中的表达数量都高于 PPAR α 和 PPAR γ ^[9]。在 PPAR 与心血管疾病关系的研究中,除较早发现该受体与高血压、动脉粥样硬化、心肌缺血-再灌注和心肌梗死等关系密切外,PPAR 的 α 及 γ 亚型与心肌肥厚之间关系的研究引人注目,但是,另一重要亚型 PPAR β/δ 的研究则明显滞后。PPAR β/δ 于 1995 年在丘脑核中被发现,最初,研究证明特异性的 PPAR β/δ 激动剂和少部分 PPAR γ 激动剂均刺激少突神经胶质细胞分化^[10],继而发现其参与调节骨骼肌的脂质代谢^[11],同时,在子宫内,环氧合酶 2 起源的前列环素通过途径促进胚胎的植入^[12]。2003 年通过高效筛选、组合化学与结构导引的最佳化合物设计方法,首次确认 PPAR β/δ 的特异性激动剂 GW501516 和 GW0742,为深入研究 PPAR β/δ 的作用提供了有利的“工具”。2004 年 Cheng 等^[13]首次证明 PPAR δ 在心肌细胞中有大量表达。目前已发现,PPAR β/δ 与 PPAR α 相似,在调节心脏脂质代谢中起到重要的作用^[14],并且 PPAR β/δ 在肥大心肌细胞的表达明显下降^[7]。资料表明 PPAR β/δ 是维持心肌正常心脏能量平衡和功能的必要因子,很可能也充当心肌肥厚负性调控因子的角色。

本实验中 GW0742 不但在 mRNA 和蛋白水平升高 PPAR β/δ 表达,而且活化 PPAR β/δ ,表现为 PPAR β/δ 活化后由细胞质向细胞核内移位。此结果表明 GW0742 可在肥大心肌细胞中活化 PPAR β/δ 。

由于各种原因导致的心肌肥厚明显增加患者住院率和病死率,已成为临床医生和科研工作者多年来关注的焦点。在心肌肥厚分子机制的研究中,

Tsoporis 等^[15]在 1997 年首先证实钙结合蛋白 S100 β 参与心肌肥厚的负性调节过程,并在随后研究中得以肯定,标志着心肌肥厚负性调控机制研究的开始。近年来,随着 PPAR 研究的深入,已证明 PPAR 有望成为新的负性调控心肌肥厚的靶点,PPAR 激动剂可能成为改善心肌肥厚最有希望的新药。

[参考文献]

- [1] Issemann I, Green S. Activation of a number of steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. *Nature*, 1990, **347**: 645-650.
- [2] Liang F, Wang F, Zhang S, Gardner DG. Peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) alpha agonists inhibit hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes [J]. *Endocrinology*, 2003, **144** (9): 4 187-194.
- [3] Irukayama-Tomobe Y, Miyauchi T, Sakai S, Kasuya Y, Ogata T, Takanashi M, et al. Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha partly via blockade of c-Jun NH2-terminal kinase pathway [J]. *Circulation*, 2004, **109** (7): 904-910.
- [4] Yamamoto K, Ohki R, Lee RT, Ikeda U, Shimada K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit cardiac hypertrophy in cardiac myocytes [J]. *Circulation*, 2001, **104** (14): 1 670-675.
- [5] Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kubota N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo [J]. *Circulation*, 2002, **105** (10): 1 240-246.
- [6] Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPAR beta/delta, but not PPAR gamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism [J]. *Circ Res*, 2003, **92** (5): 518-524.
- [7] 盛莉,叶平,刘永学. 阿托伐他汀抑制心肌细胞肥大并增强 PPAR β/δ 的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 681-684.
- [8] Reddy RC, Keshamouni VG, Jaigirdar SH, Zeng X, Leff T, Thammickal VJ, et al. Deactivation of murine alveolar macrophages by peroxisome proliferator-activated receptor ligands [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **286** (3): L613-L619.
- [9] Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferators-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10** (6): 564-570.
- [10] Saluja I, Granneman J, Skoff R. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture [J]. *Glia*, 2001, **33** (3): 191-204.
- [11] Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, et al. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice: evidence for compensatory regulation by PPAR delta [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (29): 26 089-097.
- [12] Gupta RA, Tan J, Krause WF, Geraci MW, Willson TM, Dey SK, et al. Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (24): 13 275-280.
- [13] Cheng L, Ding G, Qin Q, Xiao Y, Woods D, Chen YE, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ activates fatty acid oxidation in cultured neonatal and adult cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313** (2): 277-286.
- [14] Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, et al. Activation of PPAR δ alters lipid metabolism in db/db mice [J]. *FEBS Letters*, 2000, **473** (3): 333-336.
- [15] Tsoporis JN, Marks A, Kahn HJ, Butany JW, Liu PP, O'Hanlon D, et al. S100 β inhibits α 1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (50): 31 915-921.

(此文编辑 许雪梅)