

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-12-0938-05

吉非罗齐对高脂血症兔心肌缺血再灌注损伤的影响及机制

韦 兵, 王元星, 贺大璞

(南华大学附属第一医院胸心外科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 外科学; 心肌梗死; 再灌注; 吉非罗齐; 过氧化体增殖物激活型受体 α ; 脂肪酰转位酶

[摘要] 目的 探讨吉非罗齐对高脂血症兔心肌缺血再灌注损伤的影响。方法 24只新西兰大白兔随机分成缺血再灌注组、吉非罗齐+缺血再灌注组(简称吉非罗齐组)和假手术组,所有动物给以高脂饮食9周以建立高脂血症兔模型,吉非罗齐组在喂养8周后同时给予吉非罗齐 200 mg/(kg·d)口服1周。冠状动脉左前降支结扎法复制心肌缺血再灌注损伤模型。9周后观察各组血脂水平的变化及心肌细胞超微结构改变,并测定心肌梗死面积。逆转录聚合酶链反应测定心肌过氧化体增殖物激活型受体 α 和脂肪酰转位酶 CD36 mRNA 的表达。结果 喂饲高脂饮食后,兔血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平明显升高 ($P < 0.01$),吉非罗齐干预1周末对血脂水平产生影响。吉非罗齐组心肌梗死面积较缺血再灌注组明显减少 ($P < 0.05$);且心肌细胞超微结构损伤明显低于缺血再灌注组。缺血再灌注组心肌过氧化体增殖物激活型受体 α 和 CD36 mRNA 的表达低于假手术组 ($P < 0.05$),而吉非罗齐组与假手术组过氧化体增殖物激活型受体 α 和 CD36 mRNA 的表达无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 吉非罗齐短期干预可减少高脂血症兔缺血再灌注后心肌梗死面积,并上调心肌过氧化体增殖物激活型受体 α 和 CD36 mRNA 的表达。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

Effect of Gemfibrozil On Myocardium Ischemia/Reperfusion Injury and Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha in Hypercholesterolemia Rabbits

WEI Bing, WANG Yuan-Xin, and HE Da-Pu

(Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Reperfusion; Gemfibrozil; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha; Fatty Acid Translocase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of gemfibrozil on myocardium ischemia/reperfusion injury in hypercholesterolemia rabbits. **Methods** Twenty-four New Zealand white rabbits were divided into ischemia reperfusion (I/R) group, gemfibrozil treatment and ischemia reperfusion group, and sham operation group, which were fed with high cholesterol diet for 9 weeks to establish hypercholesterolemia rabbits model. And 200 mg/(kg·d) gemfibrozil was given for a week in gemfibrozil group on the ninth week. A cute myocardial ischemia reperfusion injury model was built through ligating the left anterior descending of coronary artery in rabbits. The serum lipid levels were measured in the different experiment stages. The ultrastructure of the myocardial cells by transmission electron microscope was observed and the sizes of infarct myocardium were detected in each group. The expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) and fatty acid translocase (CD36) mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Rabbits fed with cholesterol-rich diet showed higher serum levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) ($P < 0.05$). Gemfibrozil did not change serum lipids levels during the feeding period. The ultrastructure of myocardium cell was slightly destroyed and the myocardial infarct size was significantly smaller in gemfibrozil treatment group than I/R group. The mRNA levels of PPAR α and CD36 were decreased in I/R group compared with sham operation group, and there were no difference between gemfibrozil treatment group and sham operation group. **Conclusion** The short-term gemfibrozil treatment reduced the myocardial infarct size and up-regulated expression of PPAR α and CD36 mRNA in myocardial after ischemia/reperfusion.

贝特类药物是人工合成的过氧化体增殖物激活型受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor

[收稿日期] 2008-10-21 [修回日期] 2008-12-06

[基金项目] 湖南省卫生厅基金项目资助 (C2006-028)

[作者简介] 韦兵, 副主任医师, 副教授, 主要从事心脏外科手术和围手术期的心肌保护研究, E-mail为 weibing7022@yahoo.cn 王元星, 主任医师, 主要从事心脏外科和胸部肿瘤的手术治疗。贺大璞, 副主任医师, 副教授, 主要从事心脏外科和胸部肿瘤的手术治疗。

α PPAR α) 激活剂。PPAR α 在心肌高水平表达, 调控与脂肪酸代谢有关的基因表达, 参与心肌能量代谢的调节。近年动物研究发现贝特类药物通过活化 PPAR α 能改善心肌缺血再灌注损伤, 但这些研究多以血脂正常的动物为观察对象^[1,2]。血脂异常动物缺血再灌注时心肌 PPAR α 表达有何变化, 短期使用贝特类药物能否保护急性缺血再灌注心肌, 国内外对此研究甚少。本研究拟建立血脂异常心肌缺血再灌注损伤兔模型, 观察贝特类药物吉非罗齐短期治疗对急性心肌缺血再灌注损伤的影响, 并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

新西兰纯种雄性大白兔 (南华大学实验动物中心提供), 胆固醇 (湖南省祁东县同信生物化学厂), 微粒化吉非罗齐 (湖南千金湘江药业有限公司, 商品名乐衡, 批号 070701), TRIzol RNA 抽提试剂 (Gibco BRL)、各种半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂 (Promega)。

1.2 动物分组

24只新西兰大白兔 (体重 2.01~2.50 kg) 随机分成三组, 每组 8只。缺血再灌注组和假手术组予高脂饲料 (1% 胆固醇、7.5% 蛋黄粉和 8% 猪油) 喂养 9周; 吉非罗齐组予高脂饲料饲养 9周, 并于第 9周开始给予吉非罗齐 200 mg/(kg·d) 口服 1周。

1.3 心肌缺血再灌注模型制备

喂养 9周后, 复制缺血再灌注模型。将兔以 2% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 静脉注射麻醉后, 沿胸骨左缘剪断第 3、4、5肋骨, 将肺牵向一侧, 剪开心包, 暴露心脏。在左前降支发出分支上方用无创伤圆针在其下方心肌表层穿 4~0 号线, 于穿线处左前降支表面置小硬质胶管结扎左前降支, 观察 2~3 min 确定左前降支完全关闭后 (心电图 ST 段抬高为结扎成功, 结扎线以下心肌组织颜色变暗) 钳夹夹胸, 缺血 30 min, 剪开硅胶管, 恢复左前降支血液灌注, 灌注时间为 60 min。缺血再灌注组和吉非罗齐组制作缺血再灌注模型, 假手术组仅在左前降支下穿线, 并不结扎。

1.4 血脂的测定

分别于实验 0周、9周末, 经兔耳中央动脉取空腹血 2 mL, 离心取血清, 在日立 7600-020 全自动生物化学仪上采用酶法测定血清总胆固醇 (total cholesterol TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density

lipoprotein cholesterol LDLC)、甘油三酯 (triglyceride TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol HDLC) 的浓度。

1.5 心肌梗死范围测定

再灌注结束, 迅速取下心脏, 以 1% 的伊文思蓝 5 mL 经主动脉注入心脏, 以区分缺血区及非缺血区, 剪去心房与右心室, -20℃ 冷藏 30 min, 将心肌沿长轴切成 2 mm 的薄片, 置 1% TTC 磷酸缓冲液 37℃ 孵育 30 min。冷生理盐水洗去残余染料, 肉眼观察, 梗死区呈灰白色, 未梗死区呈紫蓝色。分离梗死区与非梗死区, 将梗死与未梗死心肌以滤纸吸干分别称重, 以梗死心肌占左心室重量的百分比表示梗死范围。

1.6 心肌组织 HE 染色

切取左心室固定于 10% 甲醛中固定, 流水冲洗, 经各级乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜观察。

1.7 心肌细胞超微结构

在左前降支阻塞范围的心肌中点处切取一小块心肌, 洗去血迹, 切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块, 迅速置于 3% 戊二醛磷酸固定液 (pH 7.4) 固定后, 经各级丙酮脱水, 环氧丙烷浸透, Epon812 包埋, 65℃ 聚合, 切片, 电镜观察其超微结构。

1.8 心肌基因表达的测定

抽提心肌总的 RNA, 取 2 μ g 总 RNA 进行逆转录反应, 再取逆转录产物 4 μ L 进行 PCR 反应。PPAR α 引物为上游 5'-AGAAGTTCACATGAACAAGGTCA-3', 下游 5'-GCCAGGACGATCTCCACAGCAAAT-3', 扩增片长 524 bp。CD36 引物为上游 5'-AACCTTCCCTGTCTGTTGGA-3', 下游 5'-TGGC-CATAGGAGAGATTCC-3', 扩增片长 353 bp。内对照 Cyclophilin 引物为上游 5'-ATGGTCAACCCACCGT GTTCTTCG-3', 下游 5'-CGTGTGAAGTCACCACCCTGACACA-3', 扩增片长 206 bp。扩增条件为 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 60 s, 55℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 80 s, 共 35 个循环, 72℃ 总延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μ L 凝胶电泳, 经凝胶密度扫描系统处理, 测定各电泳带灰度值。以待测 mRNA 灰度值与 Cyclophilin mRNA 灰度值的比值, 作为待测 mRNA 的表达值。

1.9 统计学处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 one-way ANOVA 分析来进行组间及组内比较, 两组均数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血脂的变化

三组兔 0 周时血浆 TC、LDLC、HDLc 和 TG 水平差异无显著性 ($P > 0.05$); 高脂饮食 9 周后, 三组兔血浆 TC、LDLC 浓度均显著增高 ($P < 0.01$), 而 HDLC 和 TG 仅轻度升高 ($P > 0.05$), 但组间比较差异均无显著性 ($P > 0.05$), 表明吉非罗齐干预 1 周后对血浆 TC、LDLC、HDLc 和 TG 未产生明显影响 (表 1)。

2.2 心肌梗死范围

假手术组心肌未见明显梗死区; 缺血再灌注组

心肌梗死区占左心室重量的百分比为 $28.51\% \pm 1.25\%$, 吉非罗齐组心肌梗死区占左心室重量的百分比为 $17.15\% \pm 1.34\%$, 明显小于缺血再灌注组 ($P < 0.05$)。

2.3 心肌形态学变化

假手术组心肌排列正常, 未见炎症细胞浸润。缺血再灌注组心肌局灶性出血, 部分心肌细胞变性、坏死, 胞浆凝集呈细颗粒状, 嗜伊红染色, 伴含铁血黄素沉着, 有少量中性粒细胞浸润。吉非罗齐组部分心肌间质出血、水肿, 部分心肌纤维断裂, 但病理改变较缺血再灌注组减轻 (图 1)。

表 1 各组兔血脂的变化 ($\bar{x} \pm s$)

血 脂	假手术组		缺血再灌注组		吉非罗齐组	
	0 周	9 周末	0 周	9 周末	0 周	9 周末
TC (mmol/L)	1.15 \pm 0.33	24.62 \pm 0.31 ^a	1.13 \pm 0.42	24.69 \pm 0.25 ^a	1.12 \pm 0.52	24.53 \pm 0.22 ^a
LDLC (mmol/L)	0.39 \pm 0.24	15.61 \pm 0.25 ^a	0.43 \pm 0.18	15.66 \pm 0.29 ^a	0.42 \pm 0.25	15.13 \pm 0.45 ^a
TG (mmol/L)	1.31 \pm 0.44	2.19 \pm 0.48	1.28 \pm 0.30	2.16 \pm 0.35	1.29 \pm 0.16	2.01 \pm 0.37
HDLc (mmol/L)	0.58 \pm 0.07	0.65 \pm 0.06	0.71 \pm 0.08	0.86 \pm 0.25	0.68 \pm 0.03	0.87 \pm 0.14

a 为 $P < 0.01$, 与 0 周比较。

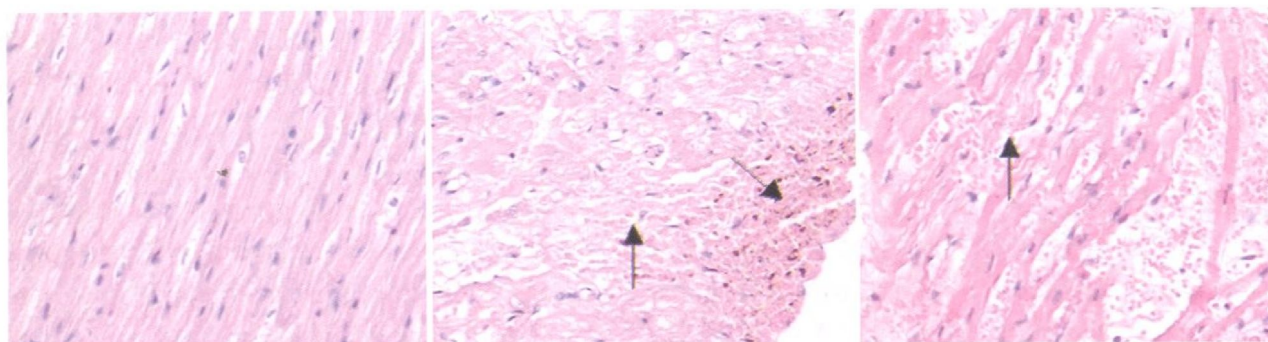


图 1 光镜下观察兔心肌形态学变化 (HE 染色, $\times 200$) 左为假手术组, 中为缺血再灌注组, 右为吉非罗齐组。

2.4 心肌细胞超微结构变化

电镜下, 假手术组肌丝排列整齐, 肌节结构清晰可见, 线粒体呈圆形或椭圆形, 嵴清晰, 呈板层状排列, 核膜完整, 核仁清晰。缺血再灌注组肌丝排列分散、断裂、溶解; 线粒体数目明显减少, 线粒体肿胀严重, 嵴消失, 空泡样变性明显, 核膜降解, 核内异染色质呈块状, 边聚。吉非罗齐组肌丝排列较整齐, 局部肌丝仍有断裂溶解改变, 但较缺血再灌注组轻微, 线粒体数目尚多, 部分线粒体嵴模糊, 部分空泡变性 (图 2)。

2.5 心肌过氧化物增殖物激活型受体 α 和 CD36 mRNA 的表达

与假手术组比, 缺血再灌注组 PPAR α 和 CD36

mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.05$); 而吉非罗齐组 PPAR α 和 CD36 mRNA 的表达比缺血再灌注组明显升高 ($P < 0.05$), 且与假手术组比差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2 和图 3)。

表 2 心肌过氧化物增殖物激活型受体 α 和 CD36 mRNA 的表达

分 组	PPAR α mRNA	CD36 mRNA
假手术组	0.86 \pm 0.13	0.73 \pm 0.15
缺血再灌注组	0.29 \pm 0.05 ^a	0.23 \pm 0.02 ^a
吉非罗齐组	0.78 \pm 0.12 ^b	0.67 \pm 0.11 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比; b 为 $P < 0.05$ 与缺血再灌注组比。

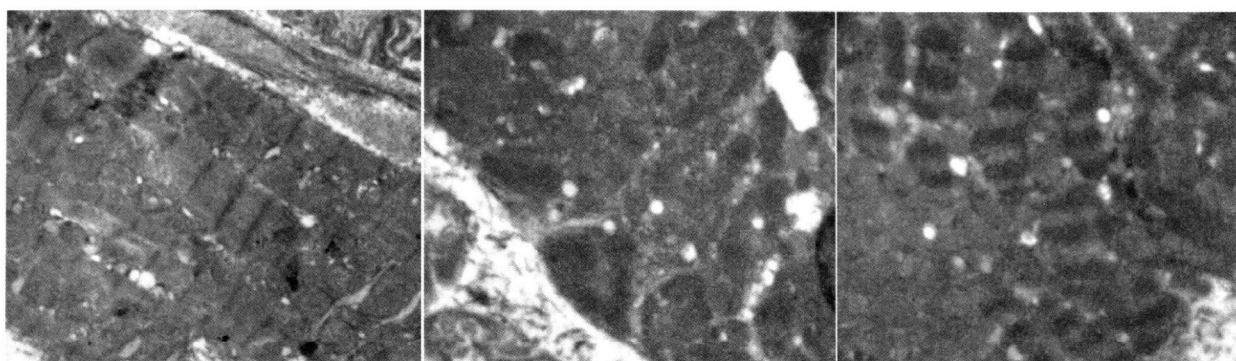


图 2 电镜下观察兔心肌细胞超微结构 (×12 000) 左为假手术组, 中为缺血再灌注组, 右为吉非罗齐组。

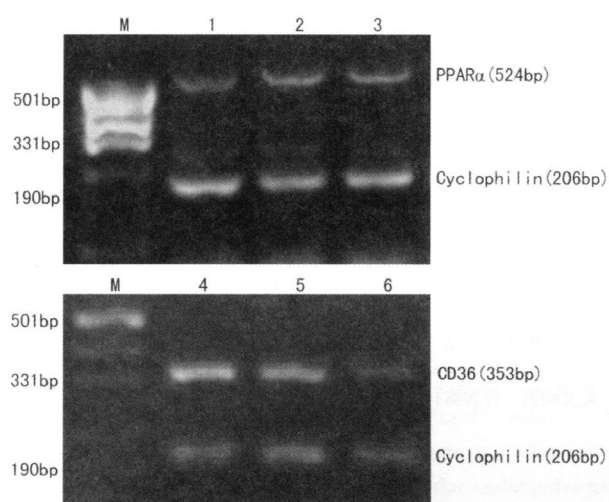


图 3 逆转录聚合酶链反应检测兔心肌过氧化物增殖激活受体 α 和脂肪酸转位酶 CD36 mRNA 表达 M 为相对分子质量, 1、6 为缺血再灌注组, 2、4 为假手术组, 3、5 为吉非罗齐组。

3 讨论

冠心病患者往往伴有血脂代谢的紊乱, 本研究通过给兔喂饲高脂饮食, 建立高脂血症模型, 并采用结扎冠状动脉左前降支的方法, 制备成急性缺血再灌注损伤模型, 此动物模型的心电图演变、心肌酶学改变及组织病理学变化均与人类和大鼠发生急性心肌梗死接近^[3], 能较好的模拟人类心肌缺血性损伤。我们研究发现吉非罗齐短期治疗未能降低高脂血症兔的血脂水平, 但能降低兔急性心肌梗死面积, 明显改善缺血再灌注损伤心肌的超微结构, 提示吉非罗齐对心肌缺血再灌注损伤有保护作用并独立于其降血脂作用。

吉非罗齐是临床常用的贝特类降脂药, 是 PPAR α 特异性较高的激动剂, PPAR α 活化后能诱导多种与脂肪酸摄取、活化及 β 氧化有关的基因表达, 参与对脂肪酸代谢的调节^[4]。在心脏, PPAR α

的激活能够增加细胞内脂肪酸 β 氧化 (fatty acid oxidation, FAO) 循环中 3 个主要步骤的基因表达:

脂肪酸的转运和酯化; ④脂肪酸进入线粒体; ④脂肪酸在线粒体和过氧化体内的 β 氧化。其中心肌细胞表面的 CD36 将长链脂肪酸 (long chain fatty acids, LCFA) 转运进入细胞质是 FAO 循环中的第一步。CD36 广泛存在于心肌细胞, 介导 LCFA 的转运, CD36 的缺失可使心肌脂肪酸的摄取降低 60% ~ 80%^[5]。最近, Campbell 等^[6] 研究发现, 线粒体外膜也存在 CD36 其表达量与各组织的氧化能力密切相关 (心肌 > 红肌 > 白肌), 提示 CD36 不但参与 LCFA 的跨膜转运, 而且可能与 LCFA 的氧化代谢密切相关。各种 PPAR 激动剂对 CD36 的基因表达有一定影响, 并具有组织特异性, 如 PPAR α 可促进心肌组织 CD36 基因的转录^[7]。本研究发现高脂血症兔心肌缺血再灌注后, 心肌的 PPAR α 表达是下调的, 与李俊明等^[8] 的研究结果一致, 同时 CD36 的表达也下调, 提示在急性心肌缺血再灌注损伤时, 心肌利用脂肪酸供能减少。

正常生理情况下, 心肌供能主要来源于脂肪酸的 β 氧化, 但消耗大量的氧。心肌缺血缺氧时, 脂肪酸的氧化减少, 葡萄糖的氧化增加, 这种能量代谢转换可能具有一定的心肌保护作用, 能够减少心肌氧耗, 增加心肌对缺血和缺氧的耐受性^[9]。心肌缺血缺氧期间 PPAR α 表达降低以及 FAO 的减少为代偿性改变, 其作用在于增加心肌氧储备, 防止 FAO 中间代谢产物在心肌的聚积, 避免产生过多的活性氧对心肌功能的直接影响^[10]。但是, 一旦心肌灌注恢复, 氧供应充足, 而 PPAR α 表达未及时恢复, 未能充分利用脂肪酸氧化供能, 导致血浆脂肪酸水平的升高, 对缺血再灌注的心肌恢复是不利的^[9]。与心肌 CD36 过表达大鼠比较, CD36 裸鼠心肌利用脂肪酸供能不足因而对缺血损伤更敏感, 表现为心输出

量下降,舒张期末压力升高^[5]。本研究发现,吉非罗齐能上调缺血再灌注心肌 PPAR α 的表达,并通过活化 PPAR α 而上调心肌 CD36的表达,其作用可能有利于提高缺血再灌注心肌利用脂肪酸氧化供能,维持心肌对能量的需求,降低血浆脂肪酸水平,减轻再灌注损伤。

高脂血症是动脉粥样硬化最主要的危险因素,并通过促进炎症因子产生和氧化应激等机制参与心肌缺血再灌注损伤的发生。晚近的研究显示,贝特类药物还通过抗氧化、抗炎等非调脂途径来发挥心肌保护作用^[11]。我们前期的研究也发现吉非罗齐有独立于降血脂作用外的抗炎并减轻心肌缺血再灌注损伤作用^[12],这一作用是否通过活化 PPAR α 而介导,尚需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Tabernero A, Schoonjans K, Jesel L, et al. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor α protects against myocardial ischemic injury and improves endothelial vasodilatation [J]. *BMC Pharmacol* 2002; **2**: 10
- [2] Yue TL, Bao W, Jucker BM, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α protects the heart from ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation* 2003; **108** (19): 2393-399
- [3] Lin HR, Tao L, Gao E, et al. Antirapoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesterolemic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Cardiovasc Res* 2004; **62** (1): 135-144
- [4] Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in mediating effects of fibrates and fatty acids on gene expression [J]. *J Lipid Res* 1996; **37** (5): 907-925
- [5] Irie H, Kuikenkamp IB, Brinkmann JF, et al. Myocardial recovery from ischemia is impaired in CD36-null mice and restored by myocyte CD36 expression or medium-chain fatty acids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100** (22): 6819-824
- [6] Campbell SE, Tandon NN, Wolleggeris G, et al. A novel function for fatty acid translocase (FAT) / CD36 involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria [J]. *J Biol Chem* 2004; **279** (35): 36235-241
- [7] Pellicieux C, Montessuit C, Papageorgiou I, et al. Inactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms α , β , δ and γ mediate distinct facets of hypertrophic transformation of adult cardiac myocytes [J]. *Pflügers Arch* 2007; **455** (3): 443-454
- [8] 李俊明, 马业新, 黄俊. 大鼠缺血再灌注心肌过氧化物酶体增殖物激活 α 受体的表达及血清游离脂肪酸含量的变化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006; **22** (1): 195-196
- [9] Razeghi P, Young ME, Abbasi S. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor- α -regulated gene expression in rat heart [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **287** (1): 5-10
- [10] Huss JM, Levy FH, Kelly DP. Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor α /retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O₂-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation [J]. *J Biol Chem* 2001; **276** (29): 27605-612
- [11] 吴洁, 赵水平, 邓平, 等. 非诺贝特对高胆固醇喂养兔主动脉斑块面积和肿瘤坏死因子 α 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (4): 313-316
- [12] 韦兵, 吴洁. 吉非罗齐预处理对兔缺血再灌注心肌的保护作用 [J]. *南华大学学报医学版*, 2008; **31** (5): 42-45

(此文编辑 许雪梅)

作者声明

2008年16卷第11期谢秀峰等发表论文《Apelin-APJ系统与心血管疾病》中,通讯作者陈凤英的单位地址应为内蒙古医学院附属医院急救中心。