

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0256-04

阿托伐他汀对老年大鼠心肌凋亡和过氧化物体增殖物激活型受体 α 蛋白表达的影响

韩磊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] 阿托伐他汀; 衰老; 过氧化体增殖物激活型受体 α ; 凋亡; 大鼠; 心肌

[摘要] 目的 通过在体动物实验的方法, 观察老年大鼠心肌凋亡和过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达水平的变化及阿托伐他汀干预对上述因素的影响。方法 30只 20月龄的 wistar大鼠, 随机分为老年对照组、大剂量阿托伐他汀处理组 [10 mg/(kg·d)] 和小剂量阿托伐他汀处理组 [1 mg/(kg·d)]。10只 3月龄的 wistar大鼠作为青年对照组。阿托伐他汀组每天给予相应剂量的药物灌胃处理, 共 4个月。对照组给予相同体积的生理盐水灌胃。采用 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL) 检测心肌细胞凋亡; 用 western blot 方法检测各组大鼠心肌的过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达水平。结果 与青年对照组相比, 老年对照组大鼠的心肌过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀可显著增加过氧化体增殖物激活型受体 α 的表达 ($P < 0.01$); ④老年对照组大鼠的心肌细胞凋亡水平较青年对照组大鼠显著增高 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀干预组的心肌细胞凋亡水平较老年对照组明显降低 ($P < 0.01$)。结论 阿托伐他汀干预可显著抑制老年大鼠心肌细胞凋亡的发生, 其作用可能与其上调过氧化体增殖物激活型受体 α 的表达有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on Myocardial Apoptosis and Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor α Protein in Aging Rats

HAN Lei¹, YE Ping¹, LIU Yong-Xue², HAN Chun-Guang²

(1. Second Department of Geriatric Cardiology of PLA General Hospital, Beijing 100853; 2. Department of Pharmacology and Toxicology, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Aging; Peroxisome Proliferator Activated Receptor α ; Apoptosis; Rat; Myocardium

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of myocardial apoptosis and peroxisome proliferator activated receptor α of aging rats and the effects of atorvastatin on it. **Methods** 30 wistar rats at 20 month old were divided into three groups: aging control group, high dose atorvastatin group [10 mg/(kg·d)], low dose atorvastatin group [1 mg/(kg·d)] and another 10 wistar rats at 3 month old as young control group. Atorvastatin was delivered by intragastric administration for 4 month. Normal sodium was delivered to control group's rats by intragastric administration too. Cardiac apoptosis was evaluated by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labelling (TUNEL) assay.

Peroxisome proliferator activated receptor α protein was detected by western blot. **Results** The expression level of peroxisome proliferator activated receptor α protein in aging control group is significantly lower than that of young control group ($P < 0.01$), atorvastatin upregulate peroxisome proliferator activated receptor α expression obviously ($P < 0.01$); ④The density of TUNEL-positive cells in aging group was significantly higher than that of young control group ($P < 0.01$).

Compared with aging group, the density of TUNEL-positive cells decreased markedly in both atorvastatin group.

Conclusions Atorvastatin inhibits the myocardial apoptosis of aging rats, which may be related with its upregulating the expression level of peroxisome proliferator activated receptor α .

近年来, 细胞凋亡与衰老关系的关系日益受到

广大学者的重视。已有的研究表明^[1,2], 细胞凋亡与衰老过程中组织器官功能的退化及衰老相关疾病的发生、发展密切相关, 但其具体分子机制尚不清楚。过氧化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPAR) 是一类由配体激活的核转录因子。既往研究表明^[3,4], PPAR 信号转导途径的激活可抑制心肌梗死、心肌缺血再灌注及高

[收稿日期] 2009-02-17 [修回日期] 2009-04-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (70872713)

[作者简介] 韩磊, 主治医师, 博士研究生, 现从事脂质代谢紊乱与心血管疾病的研究, Email为 leihan2@sina.com。通讯作者叶平, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为脂质代谢紊乱与心血管疾病, 联系电话 010-66876369, Email为 yeping@sina.com。刘永学, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为受体药理学, 联系电话 010-66932252, Email为 liuyx@nic.bmi.ac.cn。

血压等原因导致的心肌肥厚和心肌细胞凋亡。本研究通过观察老年大鼠心肌凋亡和 PPAR α 蛋白表达的变化及阿托伐他汀干预的影响,初步探讨 PPAR 途径在心脏衰老发生发展过程中的作用,以及他汀保护作用与 PPAR 信号转导途径的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

wistar大鼠(北京维通利华公司),阿托伐他汀(大连辉瑞制药公司),TUNEL试剂盒(美国 Roche 公司),羊抗鼠 PPAR α 一抗(美国 Santa cruz 公司),HRP 兔抗羊二抗(美国 Santa cruz 公司),超敏发光液(北京普利来公司),核酸分析仪(美国 Beckman 公司的 DU-640 型),台式冷冻高速离心机(美国 Beckman 公司),垂直电泳仪(bio-rad 公司)。

1.2 实验分组及处理

40 只 wistar 大鼠,其中 10 只为 3 月龄的青年大鼠设为青年对照组;30 只 20 月龄的 wistar 大鼠按 10 只一组随机分为 3 组,即老年对照组、大剂量阿托伐他汀处理组 [10 mg/(kg·d)]、小剂量阿托伐他汀处理组 [1 mg/(kg·d)]。大鼠先饲养一周使其适应环境,然后进行称重、标记,根据分组给予相应剂量的阿托伐他汀灌胃处理,共灌胃 4 个月至 24 月龄。对照组大鼠给予等体积的生理盐水灌胃处理。处理完毕后以 2% 的戊巴比妥钠麻醉大鼠,迅速开胸取出心脏,取部分心肌组织置于 10% 的甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋后备用;另取部分心肌置于液氮中冻存备用。

1.3 Western blot 方法检测心肌过氧化体增殖物激活型受体蛋白水平

按照 100 mg 心肌组织加入 400 μ L 的比例加入蛋白提取液,置于匀浆器中于冰上充分研磨,冰上静置 30 min, 12 kr/min 离心 15 min。取上清液,按 1:4 的比例加入上样缓冲液 (5 \times loading buffer) 后煮 5 min, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。另取一部分上清液用核酸分析仪测定各样品在 595 nm 处的分光光度值,计算各样品中的蛋白质浓度,按照上样时各样品中蛋白质的量相等的原理,算出各样品的上样量。

各组样品按照 20 μ g 的上样量加入样品,以 60 V 的电压进行聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳。电泳完成后以 60 V 的电压转移样品至硝酸纤维素膜上。用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h。将膜置于一抗中 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 TBST 洗膜 4 次,每次 15 min。膜入二抗中室温下孵育 2 h。TBST 洗膜 4 次,每次 15 min。于

暗室中,在膜上加入发光液后,压上胶片进行曝光反应。用 Image J 图象分析软件分析结果,将各目的条带与内参照的灰度值和面积的乘积之比,作为各样品的 PPAR α 蛋白表达量。

1.4 心肌细胞凋亡的检测

取各组动物心肌石蜡块,每块连续切取两张 5 μ m 厚切片以制备石蜡切片。采用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT 酶) 介导荧光的 dUTP 缺口末端标记法 (TdT mediated dUTP end labeling, TUNEL) 标记凋亡细胞核的 DNA 3'-OH 末端。操作按细胞凋亡检测试剂盒说明书进行。显微镜下观察到细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞,核蓝染者为 TUNEL (-),代表正常细胞;核黄染者为 TUNEL (+),代表凋亡细胞。每张切片于光镜下随机选 5 个无重叠视野半定量测定阳性凋亡细胞,每视野计数 1 000 个心肌细胞中阳性细胞核数,以平均计数作为凋亡心肌细胞数。

1.5 统计学处理

数据均用 SPSS 统计软件包处理,统计学方法采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达

与青年对照组相比,老年对照组大鼠的心肌 PPAR α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$);阿托伐他汀处理组的 PPAR α 蛋白表达显著高于老年对照组 ($P < 0.01$);大剂量组的 PPAR α 蛋白表达水平显著高于小剂量组 ($P < 0.01$; 表 1, 图 1)。

2.2 大鼠心肌细胞凋亡 TUNEL 染色结果

TUNEL 阳性细胞计数结果与青年对照组比较,老年对照组大鼠的心肌细胞凋亡数显著增加 ($P < 0.01$);阿托伐他汀处理组的心肌细胞凋亡数显著低于老年对照组 ($P < 0.01$);大剂量组的心肌细胞凋亡数低于小剂量组 ($P < 0.05$; 表 2, 图 2)。

表 1 各组大鼠心肌过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白的表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	目的蛋白与 GAPDH 的 OD 比值
青年对照组	0.60 \pm 0.16 ^a
老年对照组	0.30 \pm 0.13 ^b
小剂量阿托伐他汀组	0.54 \pm 0.20 ^a
大剂量阿托伐他汀组	0.79 \pm 0.18 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与老年对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与小剂量阿托伐他汀组比较。

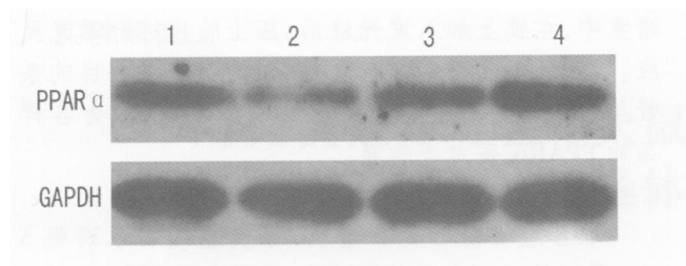


图 1 各组大鼠心肌过氧化体增殖物激活型受体 α 蛋白表达情况 1 为青年对照组, 2 为老年对照组, 3 为小剂量阿托伐他汀组, 4 为大剂量阿托伐他汀组。

表 2 衰老对大鼠心肌凋亡的影响及阿托伐他汀的干预作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	凋亡心肌细胞计数
青年对照组	8.6 ± 5.1^a
老年对照组	69.7 ± 25.8^c
小剂量阿托伐他汀组	38.4 ± 19.2^a
大剂量阿托伐他汀组	21.7 ± 13.6^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与老年对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与小剂量阿托伐他汀组比较。

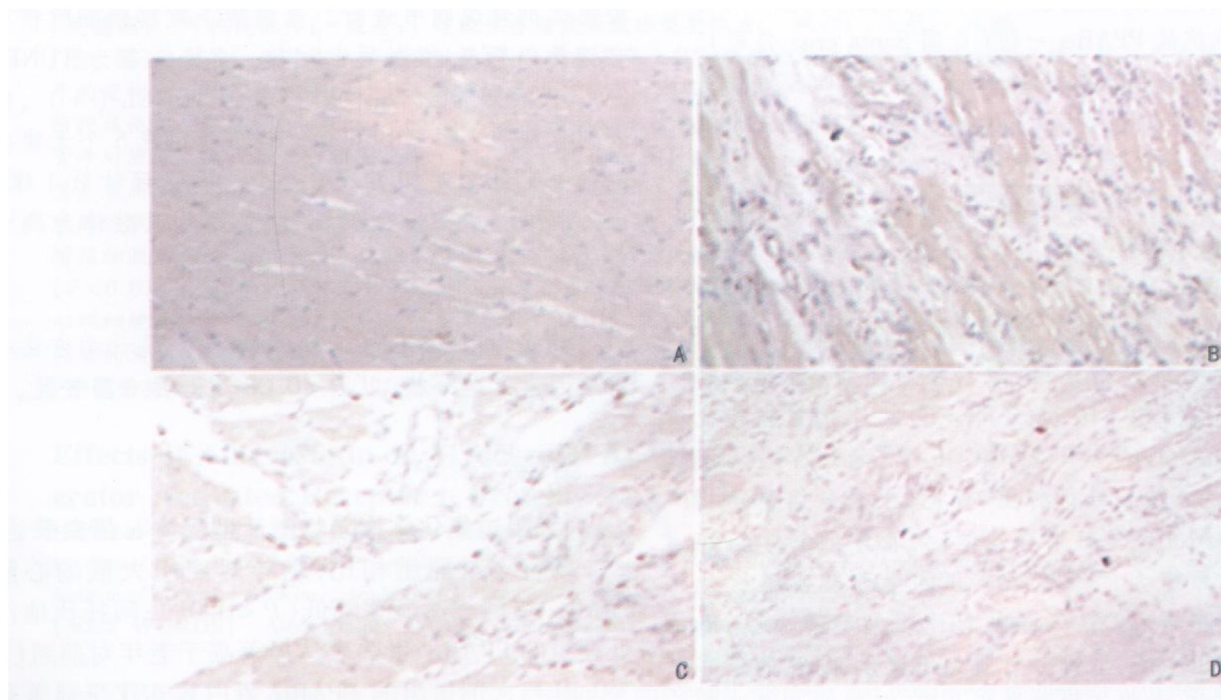


图 2 大鼠心肌细胞凋亡 TUNEL 染色结果 ($\times 200$) A 为青年对照组, B 为老年对照组, C 为小剂量阿托伐他汀组, D 为大剂量阿托伐他汀组。

3 讨论

近年来对衰老机制的研究表明^[5,6], 细胞凋亡与衰老过程中组织器官功能的退化, 衰老相关疾病的发生发展密切相关, 细胞凋亡是衰老发生、发展病理生理机制中的的重要原因之一。细胞凋亡后, 一方面可清除受损和功能障碍的细胞, 机体通过一系列的调节, 刺激成纤维细胞增殖, 通过间质纤维化和胶原增加来维持组织结构; 另一方面可清除不能再生的细胞 (如心肌细胞), 进而导致病理改变。其结果使组织细胞特别是具有重要功能的细胞数量减少, 造成其所组成的重要器官发生老年性、进行性病理过程。本研究以自然衰老的大鼠为模型, 探讨衰老大鼠心肌细胞凋亡水平的变化情况。结果显示与青年对照组比较, 老年对照组心肌组织中发生凋亡

的心肌细胞数量显著增加。结合以往的研究和本实验的结果, 提示细胞凋亡可能参与了心脏衰老的发生、发展过程, 并在这一进程中起着重要作用。

近年深入研究发现^[7,8], 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂 (他汀类药物) 作为可以改善心血管病患者预后的调脂药, 除降脂作用外, 还参与调节细胞增殖、凋亡、细胞因子和细胞内信号转导等多种功能。本研究中两种剂量的阿托伐他汀处理组心肌中的凋亡细胞数量均显著低于老年对照组, 表明阿托伐他汀干预可抑制衰老大鼠心肌凋亡的发生, 这与较早的研究结果一致。同时本实验发现, 老年大鼠心肌的 PPAR α 表达水平较青年组明显降低, 给予阿托伐他汀处理可逆转这一现象。表明阿托伐他汀可显著增强大鼠心肌 PPAR α 的表达水平, 这与既往的研究是一致的。关于他汀类药

物上调 PPAR α 表达的具体机制方面, 尽管已有报道^[9], 他汀类药物可通过抑制 HMG - CoA 还原酶的活性, 减少异戊二烯类化合物的生成, 抑制小 G 蛋白 Rho 的信号转导, 进而上调 PPAR α 的表达, 但目前他汀类药物激活 PPARs 信号转导途径的具体分子机制仍尚不明确。

实验结果显示, PPAR α 表达水平较高的样本中, 凋亡的心肌细胞数量就明显减少, 反之亦然。这一现象提示, PPAR α 表达水平的增高, 可能有助于抑制心肌细胞凋亡的发生。阿托伐他汀抑制心肌细胞凋亡的作用可能与其上调 PPAR α 的表达水平有关。既往的研究表明^[3-10], PPAR α 信号途径的激活, 可显著抑制细胞凋亡的发生, 其作用可能与以下几方面有关: PPAR α 增强可凋亡抑制基因 bcl2 的表达, 并降低 fas, Bax, 细胞凋亡蛋白酶等的表达水平; 抑制炎症反应和炎症因子 (如肿瘤坏死因子- α) 的表达及其下游信号途径的激活 (如核因子- κ B); 改善细胞的能量代谢过程, 减少游离脂肪酸的堆积; 以及阻断 MAPK 信号转导通路等。

心肌细胞凋亡心脏衰老发生、发展过程中的重要因素之一, 对心肌细胞凋亡的抑制可能是 HMG-CoA 还原酶抑制剂阿托伐他汀对抗衰老、改善心脏功能的的重要机制之一, 而阿托伐他汀的这一作用

可能与 PPAR α 途径的激活有着密切的关系。

[参考文献]

- [1] 单海燕, 白小涓, 刘强, 等. 血管紧张素 II 诱导血管内皮细胞衰老的形态学研究 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (3): 161-164
- [2] Bree RT, Stenson C, Greal M, et al. Cellular longevity: role of apoptosis and replicative senescence [J]. *Biogerontology*, 2002, 3 (4): 195-206
- [3] 杨永曜, 李隆贵, 吴强, 等. 过氧化物酶体增殖物激活型受体 α 配体对压力超负荷大鼠心肌细胞凋亡变化的调控 [J]. 中华高血压杂志, 2006, 14 (9): 719-723
- [4] 曹泽玲, 叶平, 龙超良, 等. 吡格列酮对缺血再灌注心肌细胞凋亡影响的实验研究 [J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33 (7): 648-652
- [5] Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging [J]. *Exp Biol Med*, 2007, 232 (5): 592-606
- [6] 李坚, 王艾琳, 孟繁军. 细胞凋亡与衰老关系的研究 [J]. 华北京大学学报 (自然科学版), 2005, 6 (1): 43-46
- [7] 盛莉, 叶平, 刘永学, 等. 过氧化物酶体增殖物激活型受体 β/δ 激活剂抑制体外血管紧张素 II 诱导的心肌肥大 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (12): 885-888
- [8] 夏勇, 刘军, 李东野, 等. 不同剂量阿托伐他汀干预对兔急性心肌梗死心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (12): 1016-1019
- [9] Martin G, Duez H, Blanquart C, et al. Statin-induced inhibition of the Rho - signaling pathway activates PPAR α and induces HDL apoA - II [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107 (11): 1423-1432
- [10] 吴强, 杨永曜, 李隆贵, 等. 非诺贝特对压力超负荷大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关基因 Fas, Fas-L 表达的影响 [J]. 心脏杂志, 2007, 19 (5): 502-505

(此文编辑 李玲玲)

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用!

《中国动脉硬化杂志》

中文核心期刊

作为专业性极强的高级学术期刊,《中国动脉硬化杂志》主要刊载国内外防治动脉硬化性疾病 (如高脂蛋白血症、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、高血压、缺血性脑血管病和其它动脉硬化性疾病) 中的研究论文 (含流行病学研究、实验研究、临床研究和药理学研究)。长期以来, 以办刊严谨、内容丰富、编排新颖、对稿件处理快速及时、文章发表周期短、可读性强而深受广大作者和读者厚爱。现为中文核心期刊、科技部《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊和《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊, 被美国《化学文摘 (CA)》、俄罗斯《文摘杂志 (AJ)》和国内全部数据库收录。现为月刊, 每月 26 日出版, A4 开本, 高档双胶纸印刷。定价 11 元, 全年 132 元。由湖南省报刊发行局发行, 医药卫生类, 邮发代号 42-165。《中国动脉硬化杂志》热忱欢迎海内外同仁和社会各界朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿, 到当地邮局订阅。若错过邮局征订日期, 可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。为感谢广大作者和读者对本刊的支持, 自 2009 年 1 月 1 日起, 凡在《中国动脉硬化杂志》上发表的论文被 SCI 和 EI 源刊引用, 论文第一作者和引用者凭当期封面、目次页和文章的复印件可获南华大学期刊社一定金额的现金奖励。

主编杨永宗教授和编辑部主任李玲玲副教授率全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢! 祝愿您健康长寿, 万事如意!