

NADPH 氧化酶 Nox4 调控非诺贝特的抗高血压心肌肥大效应

曾泗宇¹, 周长华², 兰树敏¹, 卢慧勤¹, 陈燕¹, 严秋江³, 严鹏科³, 刘培庆²

(1.广东省第二人民医院,广东省广州市 510317;2.中山大学,广东省广州市 510000;

3.广州医科大学附属第三医院,广东省广州市 510000)

[关键词] 非诺贝特; 心肌肥大; NADPH 氧化酶 Nox4

[摘要] 目的 拟阐明 NADPH 氧化酶 Nox4 与非诺贝特抗高血压心肌肥大效应的关系。方法 构建腹主动脉缩窄(abdominal aorta coarctation,AAC)诱导的高血压大鼠模型,观察非诺贝特对高血压大鼠左心室肥大的影响。结果 非诺贝特可显著抑制 AAC 高血压大鼠左心室肥大。与假手术组比较,AAC 组左心室中 NADPH 氧化酶 Nox4 蛋白和 mRNA 水平均显著增加;与 AAC 组比较,非诺贝特剂量依赖性降低 AAC 高血压大鼠左心室中 NADPH 氧化酶 Nox4 蛋白和 mRNA 水平。结论 降低 NADPH 氧化酶 Nox4 表达可能是非诺贝特发挥抗高血压心肌肥大效应的重要机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

NADPH Oxidase Nox4 Regulates the Protective Effect of Fenofibrate Against Cardiac Hypertrophy

ZENG Si-Yu¹, ZHOU Chang-Hua², LAN Shu-Min¹, LU Hui-Qin¹, CHEN Yan¹, YAN Qiu-Jiang³, YAN Peng-Ke³, and LIU Pei-Qing²

(1.Guangdong No.2 Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317; 2.Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510000; 3.The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000)

[KEY WORDS] Fenofibrate; Cardiac Hypertrophy; NADPH Oxidase Nox4

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the relation between NADPH oxidase Nox4 and the protective effect of fenofibrate against cardiac hypertrophy. **Methods** Abdominal aorta coarctation (AAC)-induced hypertensive rats were constructed to observe the effect of fenofibrate on left ventricular hypertrophy. **Results** Fenofibrate could inhibit left ventricular hypertrophy in AAC-induced hypertensive rats. Compared with sham group, the mRNA and protein levels of NADPH oxidase Nox4 were significantly elevated in left ventricular tissue of AAC group; compared with AAC group, fenofibrate reduced the mRNA and protein levels of NADPH oxidase Nox4 in left ventricular tissue in a dose-dependent manner. **Conclusion** Reducing NADPH oxidase Nox4 expression could be a crucial mechanism of fenofibrate against hypertension-induced cardiac hypertrophy. It will provide further theoretical and experimental support for fenofibrate curing hypertension-induced myocardial hypertrophy.

高血压作为导致心力衰竭的一种重要的心血管疾病备受重视,病理性心肌肥大是高血压发展为慢性心力衰竭的重要病理基础。NADPH 氧化酶是体内活性氧的主要来源,心肌中分布有 Nox2 和 Nox4 两种亚型。在胸主动脉缩窄模型中,NADPH 氧化酶 Nox2 敲除并不能显著改善压力超负荷诱导

的心肌肥大,而该模型中 Nox4 表达显著增加^[1-2]。基因敲除和过表达模型研究发现,Nox4 可促进压力超负荷介导的心室肥大、间质纤维化以及心室功能紊乱^[3-5]。上述研究说明 NADPH 氧化酶 Nox4 是压力超负荷介导的心肌肥大的重要机制。研究表明过氧化体增殖物激活型受体 α (peroxisome prolifera-

[收稿日期] 2015-11-05

[修回日期] 2015-12-24

[基金项目] 广东省自然科学基金(2015A030310076)

[作者简介] 曾泗宇,博士,主管药师,主要从事心血管重构的机制研究及药物研发,E-mail 为 cosmo81@qq.com。严鹏科,博士,教授,主要从事动脉粥样硬化以及心血管重构的机制研究,E-mail 为 438726802@qq.com。通讯作者刘培庆,博士,教授,主要从事心血管重构的机制研究及药物研发,E-mail 为 liupq@mail.sysu.edu.cn。

tors-activated receptor α , PPAR α) 激动剂非诺贝特可考虑作为单独或联合治疗心肌肥大的治疗药物^[6-7]。然而,目前研究尚未阐明非诺贝特的抗心肌肥大效应是否与 Nox4 有关。因此,本研究以腹主动脉缩窄(abdominal artery constriction, AAC)的高血压模型作为研究对象,拟阐明 NADPH 氧化酶 Nox4 调控非诺贝特抑制压力超负荷介导的心肌肥大。

1 材料与方法

1.1 腹主动脉缩窄介导的高血压大鼠模型的制备

从中山大学动物实验中心购买雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,体重约 180~220 g(实验动物质量合格证号:No. 0096277)。将其随机分为以下四组(每组 12 只):(1)假手术组;(2)AAC 模型组;(3)AAC 模型+非诺贝特低剂量组[60 mg/(kg·d)](非诺贝特低剂量组);(4)AAC 模型+非诺贝特高剂量组[120 mg/(kg·d)](非诺贝特高剂量组)。非诺贝特的临床人用剂量为 5 mg/kg,按体表面积折算后,大鼠临床等效剂量为 30 mg/kg。本研究设非诺贝特的低、高剂量分别为临床等效剂量的 2 倍(60 mg/kg)和 4 倍(120 mg/kg)。

用 3%戊巴比妥钠(45 mg/kg,临用前现配)腹腔注射麻醉大鼠后,固定在手术台上。剃除左侧腹部皮毛后用碘伏消毒,沿腹中线左侧 1 cm 打开腹腔,用止血钳钝性分离腹部肌肉组织。仔细分离出左肾动脉,沿左肾动脉向上分离,找到左肾动脉与腹主动脉的分叉;从分叉处向上分离出一段腹主动脉(约 0.5 cm),然后将 7 号注射针头紧贴腹主动脉平行放置并用 5 号线一起结扎;抽出注射针头造成腹主动脉部分狭窄,滴入几滴庆大霉素注射液预防感染,逐层缝合腹腔肌肉、皮肤。假手术组则接受相同的手术步骤,但只穿线不结扎。大鼠经口灌胃给药(与临床用药途径相一致)。

1.2 心肌肥大相关参数的检测

用 2%异氟烷吸入麻醉大鼠后,剃除胸部毛;然后在心脏乳头肌水平进行二维短轴和 M 型超声心动图成像检测(探头频率为 8.5 MHz),检测左心室前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness, LVAW)、左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPW)等参数。行超声心动图检测后,用 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,将其固定于鼠板上;颈部备皮消毒后,用止血钳钝性分离右侧颈总动脉,结扎远心端,用动脉夹阻断近心端动脉血管。用眼科剪在右颈总动脉远端剪一小口,将

一充满肝素的导管插入,松开动脉夹,逆行插管至左心室,而导管另一端接 BL-420S 生物信号记录仪。待血压曲线平稳后,检测大鼠主动脉收缩压(aortic systolic blood pressure, Aosp)、主动脉舒张压(aortic diastolic blood pressure, Aodp)、左心室收缩期末压(left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左心室舒张期末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左心室内压最大上升和下降速率(maximal rate of left ventricular pressure increase and decrease, dp/dt_{max})、心率(heart rate, HR)。最后处理大鼠,称量左心室重量、心脏重量和体重,分别计算心重/体重比(heart weight/body weight, HW/BW)和左心室重量指数(left ventricular weight/body weight, LVW/BW)。

1.3 蛋白质免疫印迹法

将左心室组织在冰上匀浆后,加入蛋白裂解液和苯甲基磺酰氟(PMSF),冰上放置 30 min,4℃下 12000 r/min 离心 30 min 后取上清。用预冷的 PBS 漂洗细胞后,加入蛋白裂解液及 PMSF 后轻轻刮下细胞,并在冰上放置 30 min(每 5 min 涡漩 1 次);4℃下 12000 r/min 离心,30 min 后取上清。用考马斯亮蓝法对上清进行蛋白定量。取 20 μ g 蛋白样品,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(10%SDS-PAGE),100 V 转移 1 h 至 PVDF 膜,放入封闭液中 37℃封闭 1 h;一抗(Nox4 抗体)4℃过夜。用碱性磷酸酶标记的抗免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)抗体室温孵育 1 h,然后用 Image J 软件定量分析蛋白免疫印迹的条带。

1.4 实时定量聚合酶链反应

剪取 15~20 mg 左心室组织,用手术剪将组织剪成小块,加入 1 mL Trizol 后在组织匀浆机中进行组织匀浆,4℃×12000 g 离心 10 min,转移上清至一新 EP 管中。然后按照试剂盒操作说明提取 RNA、进行逆转录以及实时定量 PCR。Nox4 引物为 5'-AGCTGCCCACTTGCTGAACGC-3' 和 5'-TCAGGCCCGGAACAGTTGTGA-3';脑钠尿肽(brain natriuretic peptide, BNP)引物为 5'-ATGCAGAAGCTGCTGGAGCTGATA-3'和 5'-TTGTAGGGCCTTGCTCCTTTGAGA-3'; β -肌球蛋白重链(myosin heavy chain, β -MHC)引物为 5'-AGTGAAGAGCCTCCAGAGTTTGCT-3'和 5'-TTCTCCTTCAGGTCGTCATTGGCA-3';GAPDH 引物为 5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCA-3'和 5'-AAGGTGGAAGAATGGAGTTG-3'。

1.5 统计学分析

所有数据用 SPSS 软件进行分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$

表示,两样本统计学分析采用 *t* 检验,多样本统计学分析采用单因素方差分析。利用 Sigmaplot 10.0 软件作统计图。*P*<0.05 被认为具有统计学差异。

2 结 果

2.1 腹主动脉缩窄介导的高血压大鼠模型的构建

与假手术组比较,AAC 模型组大鼠主动脉收缩压和左心室收缩期末压均显著增加;与 AAC 模型组比较,非诺贝特低剂量组、高剂量组大鼠主动脉舒张压和左心室收缩期末压无明显变化(表 1)。上述

结果提示我们成功构建了腹主动脉缩窄介导的高血压大鼠模型。

2.2 非诺贝特对腹主动脉缩窄介导的高血压大鼠左心室肥大的影响

与假手术组比较,AAC 模型组大鼠 HW/BW、LVW/BW、LVAW、LVPW 以及左心室中肥大基因 BNP 和 β-MHC 的 mRNA 水平显著增加,低剂量或高剂量的非诺贝特干预均可显著抑制高血压大鼠上述参数的变化(表 2)。因此,非诺贝特可抑制腹主动脉缩窄介导的高血压大鼠左心室肥大。

表 1. 非诺贝特对腹主动脉缩窄大鼠血流动力学参数的影响(*n* = 10)

Table 1. The effect of fenofibrate on hemodynamic data in rats with abdominal artery constriction(*n* = 10)

参 数	假手术组	AAC 模型组	非诺贝特低剂量组	非诺贝特高剂量组
Aosp (mmHg)	124.3±8.6	180.6±13.7 ^a	178.6±14.1	176.1±10.4
Aodp (mmHg)	110.3±13.5	130.5±11.9	128.0±9.9	124.3±10.8
LVESP (mmHg)	134.3± 9.8	184.4±11.4 ^a	180.8±10.9	178.5±10.7
LVEDP (mmHg)	4.1±0.4	8.1±1.0 ^a	6.9±0.7 ^b	6.1±0.6 ^b
心率 (次/分)	348.8±18.2	358.6±16.1	354.0±15.2	350.8±12.8
+dp/dt _{max} (mmHg/s)	5.0±0.3	3.4±0.6 ^a	4.5±0.4 ^b	4.8±0.3 ^b
-dp/dt _{max} (mmHg/s)	4.8±0.3	3.1±0.4 ^a	4.3±0.4 ^b	4.6±0.3 ^b

a 为 *P*<0.05,与假手术组比较;b 为 *P*<0.05,与 AAC 模型组比较。

表 2. 非诺贝特对腹主动脉缩窄大鼠左心室肥大的影响

Table 2. The effect of fenofibrate on left ventricular hypertrophy in rats with abdominal artery constriction

参 数	<i>n</i>	假手术组	AAC 模型组	非诺贝特低剂量组	非诺贝特高剂量组
HW/BW	10	1.91±0.09	2.97±0.17 ^a	2.41±0.19 ^b	2.11±0.18 ^b
LVW/BW	10	1.67±0.07	2.73±0.19 ^a	2.37±0.09 ^b	2.13±0.12 ^b
LVAW (mm)	10	1.95± 0.12	2.51±0.07 ^a	2.28±0.09 ^b	2.05±0.17 ^b
LVPW (mm)	10	1.87±0.04	2.43±0.09 ^a	2.18±0.17 ^b	1.96±0.08 ^b
BNP mRNA	3	1.0±0	2.72±0.21 ^a	1.71±0.13 ^b	1.24±0.08 ^b
β-MHC mRNA	3	1.0±0	2.49±0.23 ^a	1.63±0.09 ^b	1.12±0.03 ^b

a 为 *P*<0.05,与假手术组比较;b 为 *P*<0.05,与 AAC 模型组比较。

2.3 非诺贝特对腹主动脉缩窄介导的高血压大鼠左心室中 Nox4 表达的影响

与假手术组比较,AAC 模型组大鼠左心室中 Nox4 蛋白和 mRNA 水平显著增加;与 AAC 模型组比较,低剂量非诺贝特可降低 AAC 大鼠左心室中 Nox4 的蛋白和 mRNA 水平,但差异无统计学意义;高剂量非诺贝特干预可显著降低 AAC 大鼠左心室中 Nox4 的蛋白和 mRNA 水平(图 1)。上述结果说明非诺贝特可剂量依赖性降低 AAC 高血压大鼠左心室中 Nox4 表达水平。

3 讨 论

本研究可得出以下结论:(1)非诺贝特抑制 ACC 介导的高血压大鼠左心室肥大;(2)非诺贝特剂量依赖性降低 ACC 高血压大鼠左心室中 NADPH 氧化酶 Nox4 表达水平。

活性氧在体内具有重要的生理作用,但是过多的活性氧可导致病理性心肌肥大。过多的活性氧调控心肌肥大的机制涉及转录因子和肥大信号激酶的激活,如小 G 蛋白 Ras、蛋白激酶 C、丝裂原活

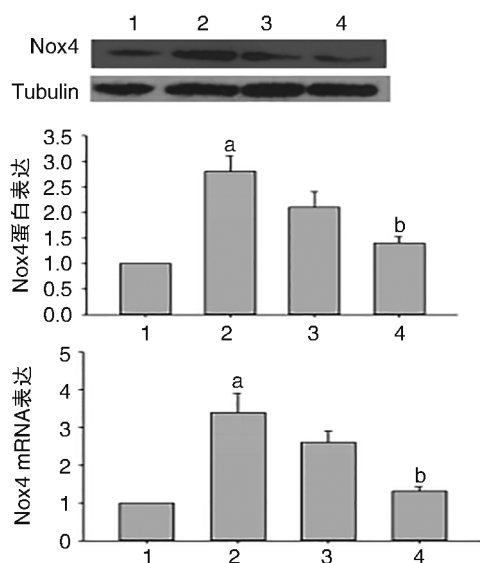


图1. 非诺贝特对腹主动脉缩窄大鼠左室中 Nox4 表达水平的影响 ($n=3$) 1 为假手术组, 2 为 AAC 模型组, 3 为非诺贝特低剂量组, 4 为非诺贝特高剂量组。a 为 $P<0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P<0.05$, 与 AAC 模型组比较。

Figure 1. The effect of fenofibrate on the expression of Nox4 in left ventricular tissue of rats with abdominal artery constriction ($n=3$)

化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路和丝/苏氨酸激酶 (AKT)。另外, 活性氧和 ATP 敏感性钾通道的相互作用是调控心肌细胞损伤的重要机制^[8]。Nox4 是心肌细胞中活性氧的重要来源。我们以前的研究结果显示, Nox4 siRNA 可抑制血管紧张素 II 介导的心肌细胞肥大基因表达水平的增加, 而 Nox4 过表达可增加原代心肌细胞中肥大基因表达水平^[9]。这与其它研究的结果一致: 在胸主动脉缩窄介导的高血压模型中, Nox4 可增加左心室心肌横截面面积等肥大相关参数^[4-5]。因此, Nox4 是高血压心肌肥大发生发展的重要机制。

贝特类降脂药非诺贝特临床适应症为饮食不能控制的成人高脂血症, 尤其对高甘油三酯血症疗效较好。作为 PPAR α 特异性激动剂, 非诺贝特调脂之外的心血管保护效应正受到越来越多的关注。非诺贝特干预可降低胸主动脉缩窄和腹主动脉缩窄诱导的高血压大鼠左心室重量、心脏体重的比值以及左心室室壁厚度^[7,10]。另外, 研究报道非诺贝特降低自发性高血压大鼠左心室重量和心脏体重的比值^[11]。体外研究结果显示, 非诺贝特可显著抑制内皮素诱导的原代心肌细胞蛋白合成增加^[12]。上述研究结果与我们的结果一致: 非诺贝特可降低 ACC 介导的高血压大鼠心脏重量/体重的比值、左心室重量/体重的比值、

心室前壁厚度、心室后壁厚度以及左心室肥大基因 mRNA 水平。上述研究提示非诺贝特可抑制压力超负荷介导的心肌肥大。我们的结果表明, ACC 介导的高血压大鼠左心室中 Nox4 表达水平显著增加, 而非诺贝特干预可抑制压力超负荷介导的 Nox4 表达增加。这提示 Nox4 可能是非诺贝特发挥抗高血压心肌肥大效应的作用靶点。

综上所述, 降低 NADPH 氧化酶 Nox4 表达可能是非诺贝特发挥抗高血压心肌肥大效应的重要机制。这为将非诺贝特作为高血压心肌肥大的治疗药物提供了进一步的理论依据和实验支持。

【参考文献】

- [1] Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, et al. Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2003, 93(9): 802-805.
- [2] Maytin M, Siwik DA, Ito M, et al. Pressure overload-induced myocardial hypertrophy in mice does not require gp91phox[J]. Circulation, 2004, 109(9): 1168-171.
- [3] Zhao QD, Viswanadhapalli S, Williams P, et al. NADPH oxidase 4 induces cardiac fibrosis and hypertrophy through activating Akt/mTOR and NF κ B signaling pathways[J]. Circulation, 2015, 131(7): 643-655.
- [4] Kuroda J, Ago T, Matsushima S, et al. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(35): 15565-570.
- [5] Shouji Matsushima, Junya Kuroda, Tetsuro Ago, et al. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2013, 112(4): 651-663.
- [6] Altharwi HN, Elshenawy OH, El-Kadi AO. Fenofibrate modulates cytochrome P450 and arachidonic acid metabolism in the heart and protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2014, 63(2): 167-177.
- [7] Zou J, Le K, Xu S, et al. Fenofibrate ameliorates cardiac hypertrophy by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α partly via preventing p65-NF κ B binding to NFATc4[J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 370(1-2): 103-112.
- [8] 梁伟杰, 陈景福, 宋明才, 等. 活性氧与 ATP 敏感性钾通道的相互作用参与高糖对 H9c2 心肌细胞的损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(11): 1081-088.
- [9] Zeng SY, Chen X, Chen SR, et al. Upregulation of Nox4 promotes angiotensin II-induced epidermal growth factor receptor activation and subsequent cardiac hypertrophy by increasing ADAM17 expression[J]. Can J Cardiol, 2013, 29(10): 1310-319.
- [10] Jia Z, Xue R, Liu G, et al. hmgb1 is involved in the protective effect of the ppar α agonist fenofibrate against cardiac hypertrophy[J]. PPAR Res, 2014, 2014: 541-394.
- [11] Huang J, Xu L, Huang Q, et al. Changes in short-chain acyl-coA dehydrogenase during rat cardiac development and stress[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(7): 1672-688.
- [12] Huang Y, Zhang H, Shao Z, et al. Suppression of endothelin-1-induced cardiac myocyte hypertrophy by PPAR agonists: role of diacylglycerol kinase zeta[J]. Cardiovasc Res, 2011, 90(2): 267-275.

(此文编辑 许雪梅)