

PPAR 激动剂罗格列酮对大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的影响

马跃东, 廖新学, 唐安丽, 张学娇, 吴敬国, 冯冲
(中山大学附属第一医院心血管内科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨 PPAR 激动剂对大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的影响及相关机制。【方法】将雄性 SD 大鼠 60 只随机分成假手术(Sham)组、缺血再灌注(I/R)组、缺血再灌注+罗格列酮(I/R+Ros)组、缺血再灌注+罗格列酮+缓激肽 B2 受体拮抗剂 HOE140(I/R+Ros+HOE140)组, 每组 15 只。麻醉大鼠后, 结扎大鼠冠状动脉前降支根部 30 min, 再灌注 40 min, 观察缺血再灌注前后心律失常发生情况, 检测心肌组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总一氧化氮合酶(tNOS)、还原型一氧化氮合酶(eNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和一氧化氮(NO)水平。【结果】罗格列酮预处理组的大鼠恶性室性心律失常的发生时间(13 min), 持续时间(14.37 s), 室性早搏的发生次数(47 次)和心律失常评分等指标均得到改善($P < 0.05$); 提前应用 HOE140 可部分或全部阻断缺血-再灌注时罗格列酮的抗心律失常作用($P < 0.05$); I/R+Ros 组与 I/R 组相比心肌组织 eNOS、NO 和 SOD 活性水平明显提高, 而 iNOS 活性和 MDA 水平显著下降($P < 0.05$); HOE140 可阻断此作用($P < 0.05$)。【结论】PPAR 激动剂罗格列酮有抗大鼠心肌缺血再灌注心律失常作用, 这可能是通过缓激肽-一氧化氮途径实现的。

关键词: 过氧化物酶体增殖物激活受体; 罗格列酮; 缺血再灌注心律失常; 缓激肽

中图分类号: R541.4 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2007)04-0413-05

Effects of Peroxisome Proliferators-activated Receptor Activator Rosiglitazone on Myocardial Ischemia-reperfusion Induced Arrhythmia in Rats

MA Yue-dong, LIAO Xin-xue, TANG An-li, ZHANG Xue-jiao, WU Jing-guo, FENG Chong
(Division of Cardiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To determine the effects and possible mechanism of peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR) activator rosiglitazone on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmia in rats. 【Method】 Sixty adult male Sprague Dawley rats were randomly subjected to Sham operation ($n = 10$), ischemia-reperfusion (I/R, $n = 10$), I/R plus rosiglitazone ($n = 13$) or I/R plus rosiglitazone and a selective bradykinin B2 receptor antagonist HOE140 ($n = 11$). Myocardial injury was produced by the occlusion of the left anterior descending coronary artery for 30 min followed by 40 min reperfusion. Then the measurements of arrhythmia were assessed, as well as the malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide synthase (NOS), and nitric oxide (NO) levels in homogenate of rat heart tissue. 【Result】 Compared with I/R group, the measurements of arrhythmia in I/R plus rosiglitazone group were improved significantly ($P < 0.05$), which can be, at least partially, abolished by pretreatment with HOE140 ($P < 0.05$). The eNOS, NO, and SOD levels of the heart tissue were clearly up regulated in I/R plus rosiglitazone group ($P < 0.05$), while the iNOS and MDA levels were reduced markedly ($P < 0.05$) in the same group, these effects can also be prevented by HOE140. 【Conclusion】 PPAR activator rosiglitazone exerts its myocardial protection against ischemia-reperfusion induced arrhythmia in rats at least partially through the bradykinin-NO mechanism.

Key words: peroxisome proliferators-activated receptor; rosiglitazone; ischemia-reperfusion arrhythmia; bradykinin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(4):413-417]

收稿日期: 2007-02-07

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B30601016); 广东省自然科学基金项目(5001676)

作者简介: 马跃东(1981-), 男, 安徽肥东人, 硕士, E-mail: doctormayuedong@yahoo.com.cn; 唐安丽, 通讯作者, 主任医师, 硕士生导师

近年来,随着冠心病治疗的进展,溶栓和冠状动脉成形术等措施可使阻塞的冠状动脉实现再通,从而挽救濒临死亡的心肌组织。但随后人们却发现在心肌组织血流恢复后反而出现了组织细胞损伤加重的病理状态,即再灌注损伤(schemia-reperfusion,I/R),引起心肌功能障碍及心律失常的发生。研究心肌再灌注损伤的发生机制,寻找防治方法是当前亟待解决的难题。研究表明过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor,PPAR)激动剂噻唑烷二酮类药物(thiazolidinedione,TZDs)能够缩小心肌缺血再灌注后心肌梗死面积,改善心脏功能^[1]。但其机制尚未完全清楚,有人认为与肾素-血管紧张素-醛固酮(rennin-angiotensin-aldosterone,RAS)系统有关^[2]。而RAS系统与缓激肽关系密切,血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor,ACEI)的很多作用就是通过缓激肽途径实现^[3]。缓激肽,特别是心肌局部缓激肽,与心肌缺血再灌注损伤又有着密切的关系^[4]。有关PPAR激动剂TZDs对缺血再灌注心肌心律失常的影响,以及该影响与心肌局部缓激肽系统的关系,尚未见报道。本研究旨在观察PPAR激动剂罗格列酮对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响。

1 材料和方法

1.1 实验分组及处理

选择体质量220~250g的雄性SD大鼠60只(中山大学实验动物中心提供),按质量编号后随机分为假手术(Sham)组、缺血再灌注(I/R)组、缺血再灌注+罗格列酮(I/R+Ros)组、缺血再灌注+罗格列酮+缓激肽B2受体拮抗剂HOE140(I/R+Ros+HOE140)组,每组15只,各组最终进入统计的大鼠数分别为10、10、13、11只。根据文献^[2]I/R+Ros组和I/R+Ros+HOE140组,罗格列酮3mg/(kg·d),溶于2mL生理盐水中,术前灌胃2周;Sham组和I/R组,用等量生理盐水灌胃。HOE-140(购自美国sigma公司)按10μg/kg于缺血再灌注前30min静脉注射。罗格列酮(商品名:文迪雅,每片4mg)由葛兰素史克公司提供。

1.2 动物模型制作

以3%戊巴比妥(0.015mL/g)腹腔麻醉,气管插管,小动物呼吸机辅助呼吸,开胸暴露心脏,I/R组、I/R+Ros组和I/R+Ros+HOE-140组以7-0线

在左冠状动脉前降支根部穿线,在前降支上垫一棉线一同结扎,缺血30min后,剪断结扎线再灌注40min。Sham组仅在左前降支下穿线不结扎,旷置70min。

1.3 心律失常相关指标记录

大鼠麻醉后,制作动物模型,同时应用BL-410多道生理记录仪描记导联心电图,记录心率、室性早搏(PVC)次数、室速(VF)、室颤(VT)发生时间和持续时间等指标。心律失常分析遵守Lambeth规则^[5]。心律失常评分标准参考Curtis等^[6]标准。

1.4 心肌组织匀浆制备和相关指标的测定

再灌注40min后,各组大鼠立即取出心脏,用冰盐水冲洗、吸干、称重后以生理盐水为介质,用匀浆器制成10%心肌组织匀浆测定心肌组织中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase,NOS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活力单位及一氧化氮(nitric oxide,NO)、丙二醛(maleic dialdehyde,MDA)含量(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。

1.5 统计学分析

以SPSS11.0统计软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差表示;计数资料用百分率表示,多组资料的检验用方差分析(方差齐用LSD法,方差不齐时用Tamhane's T2法校正),率的比较用卡方检验,发生时间用生存分析,取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 罗格列酮对再灌注心肌室心律失常相关指标的影响

与Sham组相比,I/R组室性早搏(PVC)的次数明显增多($P<0.01$),而加用罗格列酮后可以显著减少缺血再灌注后室性早搏的次数($P<0.01$);缓激肽受体拮抗剂HOE140可以部分阻断罗格列酮减少缺血再灌注心肌室性早搏次数的作用($P=0.004$,表1)。再灌注后心律失常评分明显高于再灌注前的心律失常评分($t=4.232$, $P<0.01$)。与Sham组相比I/R组心律失常(室速、室颤)发生次数和每次平均持续时间皆明显增加($P=0.012$),I/R组+ROS组与I/R组相比持续时间明显下降($P=0.005$),HOE-140可能有部分阻断罗格列酮的效应,与I/R+ROS组相比I/R+ROS+HOE140组持续时间有增加趋势,但 $P=0.148>0.05$ (表1)。

表 1 罗格列酮对缺血再灌注心肌室性早搏、发作持续时间和心律失常评分的影响

Table 1 Effects of rosiglitazone on PVC, MCT and arrhythmia scoring in the rats with cardiac ischemia- reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PVC	I- Score	I/R- Score	Frequency	Continuous time (s)
Sham	10	8.2 ±2.5	1.0 ±0.0	1.4 ±0.7	2	9.1 ±1.5
I/R	10	141.2 ±11.3 ¹⁾	2.4 ±0.5 ¹⁾	3.8 ±0.8 ¹⁾	35	25.9 ±0.4 ¹⁾
I/R+ROS	13	47.0 ±7.4 ²⁾	2.2 ±0.4 ²⁾	2.5 ±1.0 ²⁾	6	14.4 ±4.4 ²⁾
I/R+ROS+HOE140	11	71.3 ±9.8 ³⁾	2.6 ±0.7 ³⁾	3.3 ±1.3 ³⁾	17	20.6 ±9.8
F		8.63	24.94	11.27		5.134
P		0.001	0.000	0.000		0.03

1)Compared with Sham group , P< 0.01 2)Compared with I/R group ,P< 0.01 3)Compared with I/R group + ROS group ,P< 0.01

2.2 罗格列酮对再灌注心肌恶性室性心律失常(室速,室颤)发生开始时间的影响

Sham 组生存曲线在 20 min 后仅略有下降,而 I/R 组生存曲线从 10 min 左右开始几近垂直下降; I/R+ROS 组生存曲线介于 Sham 组和 I/R 组之间,大约在 13 min 左右开始下降,与 I/R 组相比下降开始时间明显为晚,下降幅度显著减小 (P< 0.01); 预先使用 HOE- 140 的大鼠其恶性心律失常(室速,室颤)发生时间的生存曲线下降的起始时间最早,约在 6 min 左右,与 I/R+ROS 组生存曲线相比,其起始时间显著提前,下降幅度明显增加 (P< 0.01),而与 I/R 组相比起始时间提前 (P< 0.05),但下降幅度较低 (P< 0.05,图 1)。

2.3 心肌组织生化指标的测定

与 Sham 组相比 I/R 组,总一氧化氮合酶 (tNOS), 原生型一氧化氮合酶 (eNOS) 和超氧化物歧化酶(SOD)活性明显下降,一氧化氮 (NO)水平显著降低,而诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)活性和丙二醛 (MDA)水平增加 (P< 0.05); 预先使用罗格列酮后可提高tNOS、eNOS 和 SOD 活性,增加 NO 水平 (P< 0.05), 而降低 iNOS 的活性和 MDA 水平

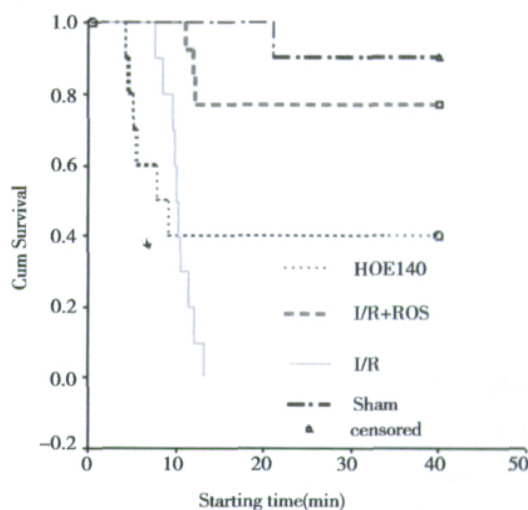


图 1 缺血再灌注心肌恶性室性心律失常发生时间生存曲线 Fig.1 Survival curve of onset of malignant ventricular arrhythmia in the rats with cardiac ischemia- reperfusion injury

(P< 0.05); HOE- 140 可以阻断罗格列酮的作用,表现为与 I/R+ROS 组现比 HOE- 140 组 tNOS、eNOS 和 SOD 活性下降,NO 水平下降,而 iNOS 活性和 MDA 水平提高 (P< 0.05,表 2)。

表 2 罗格列酮对缺血再灌注心肌丙二醛、超氧化物歧化酶、一氧化氮合酶和一氧化氮含量的影响

Table 2 Effects of rosiglitazone on MDA, SOD, NOS, and NO of the rats with ischemia- reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	tNOS(u/g)	eNOS(u/g)	iNOS(u/g)	SOD (u/mg)	MDA(nmol/mg)	NO (μmol/g)
Shame	10	3.440 ±0.044	3.33 ±0.04	0.105 ±0.159	66.1 ±0.8	2.10 ±0.12	1.2 ±0.8
I/R	10	2.780 ±0.045 ¹⁾	2.48 ±0.05 ¹⁾	0.300 ±0.027 ¹⁾	42.4 ±0.8 ¹⁾	3.42 ±0.07 ¹⁾	0.9 ±0.4 ¹⁾
I/R+ROS	13	2.940 ±0.049 ²⁾	2.74 ±0.05 ²⁾	0.198 ±0.008 ²⁾	60.1 ±1.1 ²⁾	2.56 ±0.09 ²⁾	1.1 ±0.3 ²⁾
I/R+ROS+HOE140	11	2.820 ±0.019 ³⁾	2.52 ±0.04 ³⁾	0.297 ±0.037 ³⁾	48.6 ±1.0 ³⁾	3.23 ±0.11 ³⁾	0.9 ±0.5 ³⁾
F		33.55	11.92	19.72	13.32	39.45	12.14
P		0.000	0.032	0.002	0.000	0.000	0.000

1)Compared with Sham group, P< 0.05; 2)Compared with I/R group ,P< 0.05; 3)Compared with I/R +ROS group ,P< 0.05

3 讨 论

3.1 PPAR 配体与室性早搏

PPAR 是一类配体激活型转录因子,属核内受体超家族成员。其主要功能是将各种体内稳态变化、药物、营养、炎性刺激等转变为细胞内信号,在转录水平上调节相应目标基因的表达,从而在调节能量代谢、细胞分化、增殖、凋亡、炎性反应、内源性活性物质合成和分泌中发挥重要信使作用^[7]。噻唑烷二酮类药物(TZDs)是PPAR的特异性配体。研究表明噻唑烷二酮类药物罗格列酮能减轻心肌缺血-再灌注损伤^[1],但其具体机制尚未完全清楚。有人认为,罗格列酮缩小缺血-再灌注损伤后心肌梗死面积,改善心脏舒缩功能,其机制可能与TZDs抑制炎性细胞浸润及MCP-1、细胞间粘附分子-1和可诱导型一氧化氮合酶等表达有关^[1,8]。也有研究认为,PPAR激动剂罗格列酮的心脏保护作用与其改善心肌能量代谢有关^[9]。耿登峰等^[2]研究发现,罗格列酮改善心肌缺血-再灌注损伤与其降低血浆及心肌组织局部血管紧张素水平有关。本研究发现,预先使用罗格列酮可以明显减轻缺血再灌注室性早搏的发生,HOE140可以部分阻断此作用,提示罗格列酮减少室性早搏的作用与缓激肽系统有关,而缓激肽系统的改变可能是继发于RAS系统的变化或者是由PPAR配体在转录水平上调节基因表达实现的。

3.2 PPAR 配体与恶性室性心律失常

本研究观察到,PPAR激动剂罗格列酮能显著减少缺血-再灌注后恶性室性心律失常的发生和持续时间,表明了罗格列酮对缺血-再灌注心肌的保护作用。同时发现,缺血再灌注时心肌局部组织tNOS和eNOS下降,iNOS活性增加,而罗格列酮可以明显提高缺血再灌注心肌局部组织tNOS和eNOS活性,降低iNOS活性,提高心肌组织NO水平,同时增加SOD活性,减少氧化应激,这些作用可被缓激肽B2受体拮抗剂HOE140部分或完全阻断,提示心肌缺血再灌注时,罗格列酮抗心律失常作用可能部分是通过缓激肽-一氧化氮途径实现的。罗格列酮通过缓激肽-一氧化氮系统发挥心肌保护作用具体机制目前尚不完全清楚,推测可能是直接在转录水平或者通过抑制血管紧张素转换酶(ACE)间接提高心肌组织局部缓激肽浓度

实现的。缓激肽是一种心脏保护因子,主要作用于B2受体,可以缩小心肌梗死面积,降低缺血-再灌注心律失常发生率^[10]。缓激肽对缺血再灌注心肌发挥保护作用是通过NO途径实现的^[11]。

心肌缺血再灌注后冠状动脉内皮细胞基础性及其乙酰胆碱刺激的NO释放功能受损,并促进中性粒细胞-内皮细胞的粘附。而iNOS则在缺血再灌注损伤中起着重要作用,它催化分泌的NO可立即与氧反应生成氧自由基,亦可直接作用于心肌细胞,发挥心肌毒性作用。心脏中存在着NOS,大多数为eNOS亚型,但当心肌细胞受炎性细胞因子诱导后可产生大量iNOS^[12],而eNOS活性明显下降,NO产生减少,最终导致心肌缺血再灌注损伤,诱发各型心律失常。

3.3 PPAR 配体与氧化应激

本研究还发现,罗格列酮可增加缺血再灌注心肌组织SOD活性,降低MDA含量,提示罗格列酮的心脏保护效应可能也与其抑制机体脂质过氧化反应,改善抗氧化酶活性从而减少再灌注时氧化应激损伤有关。Inoue等^[13]也认为PPAR配体可增加CuZn-SOD蛋白的表达,提示罗格列酮的抗脂质过氧化反应可能与其激活PPAR进而促进SOD基因表达增多有关。罗格列酮就是通过上述可能机制,从而在缺血再灌注时发挥舒张血管,降低心肌氧耗,抗氧化应激,抗血小板聚,改善代谢等心肌保护作用。

参考文献:

- [1] YUE T L, CHEN J, BAO W, et al. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone[J]. *Circulation*, 2001, 104(21):2588-2594.
- [2] 耿登峰, 伍卫, 雷娟, 等. 罗格列酮对心肌梗死大鼠血流动力学及肾素-血管紧张素系统的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25(2): 114-118.
- [3] SAKAMOTO T, CHEN C, LOKHANDWALA M F. Contribution by bradykinin to the natriuretic response to the angiotensin converting enzyme inhibitor ramiprilat in spontaneously hypertensive rats [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1994, 350(1):84-89.
- [4] VEERAVALLI K K, AKULA A, KOTA M K. Nitric oxide- and prostaglandin-mediated cardioprotection by bradykinin in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Pol J Pharmacol*, 2003, 55(6):1021-1029.
- [5] WALKER M J, CURTIS M J, HEARSE D J, et al. The

- Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(7):447- 455.
- [6] CURTIS M J, WALKER M J. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(9):656- 665.
- [7] HOUSEKNECHT K L, COLE B M, STEELE P J. Peroxisome proliferator -activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review[J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2002, 22(1):1- 23.
- [8] WAYMAN N S, ELLIS B L, THIEMERMANN C. Ligands of the peroxisome proliferator -activated receptor- PPAR- a reduce myocardial infarct size[J]. *Med Sci Monit*, 2002, 8(7):BR243- 247.
- [9] JOOSEN A M, BAKKER A H, GERING M J, et al. The effect of the PPARgamma ligand rosiglitazone on energy balance regulation [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006, 22(3):204- 210.
- [10] BREW E C, MITCHELL M B, REHRING T F, et al. Role of bradykinin in cardiac functional protection after global ischemia - reperfusion in rat heart [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(4 Pt 2):H1370- 1378.
- [11] EBRAHIM Z, YELLON D M, BAXTER G F. Bradykinin elicits "second window" myocardial protection in rat heart through an NO- dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(3):H1458- 1464.
- [12] URSELL P C, MAYES M. Anatomic distribution of nitric oxide synthase in the heart [J]. *Int J Cardiol*, 1995, 50 (3):217- 223.
- [13] INOUE I, GOTO S, MATSUNAGA T. The ligands/ activators for peroxisome proliferators- activated receptor alpha(PPAR alpha)and PPAR gamma increase Cu²⁺,Zn²⁺, superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells [J]. *Metabolism*, 2001, 50(1):3- 11.

(编辑 孙慧兰)

(上接第 412 页 from page 412)

轻哮喘发作时气道水阻塞提供新的治疗途径。

参考文献：

- [1] DENKER B M, SMITH B L, KUHAJDA F P, et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(30):15634- 15642.
- [2] KING L S, YASUI M. Aquaporins and disease: lessons from mice to humans [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(8):355- 360.
- [3] 雷 霏,赵小冬,朱建国,等.实验性变应性鼻炎大鼠鼻黏膜水通道蛋白 5 的表达及意义 [J]. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志*,2005, 40(3):172- 175.
- [4] LIU H, WINTOUR E M. Aquaporins in development- a review[J]. *Reprod Biol Endocrinol*,2005,11(3):18- 25.
- [5] POYNTER M E, IRVIN C G, JANSSEN- HEININGER Y M. Rapid activation of nuclear factor -kappa B in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation[J]. *Am J Pathol*, 2002,160(4):1325- 1334.
- [6] AGRE P, KOZONO D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases [J]. *FEBS Lett*, 2003,555(1):72- 78.
- [7] LEE M D, KING L S, NIELSEN S, et al. Genomic organization and developmental expression of aquaporin- 5 in lung [J]. *Chest*,1997,111 (6 Suppl): 111S- 113S.
- [8] TAKATA K, MATSUZAKI T, TAJIKA Y. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane [J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2004,39(1):81- 83.
- [9] KREDA S M, GYNN M C, FENSTERMACHER D A, et al. Expression and localization of epithelial aquaporins in the adult human lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001,24(3):224- 234.
- [10] MOON C, ROUSSEAU R, SORIA J C, et al. Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells [J] *Am J Hematol*, 2004, 75(3):128- 133.
- [11] VERKMAN A S, YANG B, SONG Y, et al. Role of water channels in fluid transport studied by phenotype analysis of aquaporin knockout mice [J]. *Exp Physiol*, 2000, 85 Spec:233S- 241S.
- [12] KING L S, NIELSEN S, AGRE P, et al. Decreased pulmonary vascular permeability in aquaporin - 1 - null humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99(2): 1059- 1063.
- [13] 姚 利,李学佩,郑世信,等.糖皮质激素对鼻息肉中水通道蛋白 - 1 表达的影响[J].*中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志*,2006, 14 (5) 275- 277.

(编辑 张恩健)