

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.09.005

文章编号: 1005-8982(2017)09-0025-05

## PPAR $\gamma$ 1 基因转染对缺血再灌注 心肌细胞凋亡的作用和影响

刘永平, 魏来, 陈文雁, 孔高茵

(湖南省人民医院 麻醉医学中心, 湖南 长沙 410005)

**摘要:目的** 探讨心肌细胞过表达过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  1 (PPAR $\gamma$  1) 基因对缺血再灌注损伤导致细胞凋亡的作用和影响。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为 SHAM 组、MIRI 组、PPAR $\gamma$  1 组, 每组 10 只。SHAM 组和 MIRI 组经冠状动脉转染携带绿色荧光蛋白的腺病毒载体 (Ad-EGFP), PPAR $\gamma$  1 组转染携带 PPAR $\gamma$  1 基因的腺病毒载体 Ad-PPAR $\gamma$  1 至心肌组织。稳定 3 d 后, SHAM 组只过线, 不接扎; MIRI 组和 PPAR $\gamma$  1 组行心肌缺血再灌注损伤 (缺血 30 min, 再灌注 120 min)。电镜下观察各组心肌的超微结构变化, Western blot 检测 B 淋巴细胞瘤 - 2 基因 (Bcl2) 和 Bcl2 相关 X 蛋白 (Bax), DNA 断裂的原位末端标记法观察心肌细胞凋亡情况。**结果** 缺血再灌注后, 电镜下 MIRI 组心肌细胞结构损伤最严重, 心肌纤维排列紊乱, 有断裂和溶解现象, 线粒体肿胀, 结构模糊, 部分嵴断裂溶解; PPAR $\gamma$  1 组结构损伤较 MIRI 组减轻。与 SHAM 组比较, MIRI 组 Bcl2/Bax 比值下降 ( $P < 0.05$ ), PPAR $\gamma$  1 组无明显变化 ( $P > 0.05$ ); 与 MIRI 组比较, PPAR $\gamma$  1 组 Bcl2/Bax 比值上升 ( $P < 0.05$ )。MIRI 组和 PPAR $\gamma$  1 组的心肌细胞凋亡数目较 SHAM 组升高 ( $P < 0.05$ ); MIRI 组高于 PPAR $\gamma$  1 组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 过表达 PPAR $\gamma$  1 基因能通过抗氧化应激、减少细胞凋亡来保护缺血再灌注心肌。

**关键词:** 心肌缺血再灌注损伤; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  1; 细胞凋亡

**中图分类号:** R542.2

**文献标识码:** A

## Effects of PPAR gamma 1 gene transfection on apoptosis of cardiomyocytes after ischemia reperfusion

Yong-ping Liu, Lai Wei, Wen-yan Chen, Gao-yin Kong

(Department of Anesthesiology, Hunan Provincial People's Hospital,  
Changsha, Hunan 410005, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect and influence of over-expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1 (PPAR $\gamma$ 1) gene on the apoptosis of myocardial cells after ischemia reperfusion. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups (10 in each group), i.e. group A (sham group), group B (myocardial ischemia-reperfusion group) and group C (PPAR $\gamma$ 1 gene group). Myocardial tissues were transfected with recombinant adenovirus vector mediated enhanced green fluorescent protein (Ad-EGFP) via coronary artery in the groups A and B. Myocardial tissues were transfected with recombinant adenovirus vector mediated PPAR $\gamma$ 1 gene (Ad-PPAR $\gamma$ 1) in the group C. In the group A the coronary artery was crossed through with a line without ligation; while myocardial ischemia-reperfusion injury (ischemia 30 min, reperfusion 120 min) was induced in the groups B and C three days later. Under electron microscope the changes of the myocardial ultrastructures were observed. Bcl-2 and Bax expressions in the heart were detected by Western blot. TUNEL method was used to measure myocyte apoptosis. **Results** After ischemia and reperfusion, the cardiomyocytes in the group B were injured most seriously under electron microscope; the myocardial fibers were arranged irregularly, ruptured and dissolved; the mitochondria were swollen with fuzzy structure and partial

收稿日期: 2016-01-28

[通信作者] 孔高茵, E-mail: konggaoyin@sina.com

crisetae fragmentation and dissolution. The subcellular structure damage in the group C was milder than that of the group B. Compared with the group A, Bcl-2/Bax ratio decreased significantly in the group B ( $P < 0.05$ ), but had no significant change in the group C ( $P > 0.05$ ). Compared with the group B, Bcl-2/Bax ratio in the group C increased significantly ( $P < 0.05$ ). The number of apoptotic cardiomyocytes in the groups B and C was significantly larger than that in the group A ( $P < 0.05$ ). The number of myocardial apoptosis in the group B was significantly larger than that in the group C ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Over-expression of *PPAR $\gamma$ 1* gene can protect myocardial tissues from ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and cell apoptosis.

**Keywords:** myocardial ischemia-reperfusion injury; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1; cell apoptosis

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) 是指缺血心肌在恢复血液灌注后,其细胞结构损伤及细胞功能障碍进一步加重的现象。临床上十分常见,如心肺复苏术、冠状动脉溶栓术、冠状动脉支架植入术、体外循环下心内直视手术等,尽早恢复受损心肌的血液灌注是临床上抢救的首要目标,但其带来的再灌注损伤早就引起学者的重视,大量的研究发现,细胞凋亡参与 MIRI 是 MIRI 重要的病理生理机制之一。随着对 MIRI 机制的深入研究,运用基因治疗的方法防治 MIRI 成为近年来众多学者的研究热点<sup>[1-3]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  1 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  1, PPAR $\gamma$  1) 是由配体激活的转录因子,其激活对调节体内的多种病理生理过程有重要作用。有研究认为,匹格列酮 (PPAR $\gamma$  配体) 通过抗氧化、抑制炎症因子表达等,对缺血再灌注心肌具有保护作用<sup>[4-5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

选取健康成年雄性 SD 大鼠 30 只,月龄 2~3 个月,体重 200 g~250 g,由湖南斯莱克景达公司提供。大鼠随机分为 SHAM 组、MIRI 组、PPAR $\gamma$  1 组,每组 10 只。SHAM 组:转染携带绿色荧光蛋白的腺病毒载体 Ad-EGFP,上海吉凯基因技术有限公司提供) 0.1 ml,滴度  $1 \times 10^9$  PFU/ml,3 d 后开胸,冠状动脉左前降支只过线,不结扎;MIRI 组:转染 Ad-EGFP 3 d 后,结扎左前降支 30 min,再灌注 120 min; PPAR $\gamma$  1 组:转染携带 PPAR $\gamma$  1 的腺病毒载体 (PPAR $\gamma$  1,上海吉凯基因技术有限公司提供) 0.1 ml,滴度  $1 \times 10^9$  PFU/ml,3 d 后结扎左前降支 30 min,再灌注 120 min。

### 1.2 复制动物模型

基因转染过程参照文献[6-7]。大鼠麻醉后固定,气管插管控制呼吸,开放尾静脉输液,接生理记录仪

记录并分析心电图的变化。左胸部消毒、铺巾后,胸骨左缘 3、4 肋间进胸,打开心包,暴露心脏,分离主、肺动脉根部并在其下方过 1 根 10 号线;将线拉紧阻断主、肺动脉,同时心尖部用 27 号针头注入 0.1 ml 各组相应试剂至左心室腔,10 s 后将线松开,通过心脏的跳动,使试剂通过冠状动脉循环进行充分的心肌分布,期间密切观察心脏的变化,如心跳无异常及心脏无明显出血后,充分膨肺并关胸。术毕,呼吸稳定后拔管。MIRI 模型参照文献[8-9]。采用阻断大鼠冠状动脉左前降支复制 MIRI 模型。基因转染建立 3 d 后,用同样的方法麻醉、固定、控制呼吸、监测,原切口开胸,以 6-0 线于左心耳下缘 2 mm 处连同心大静脉一起结扎左前降支,结扎线以下心肌组织变紫,心电图呈现 ST 段弓背抬高为结扎成功的标志,结扎 30 min,再灌注 120 min。

### 1.3 指标检测

实验末立即开胸取心,4℃冷生理盐水中漂洗,取部分缺血区心肌组织,浸入 2.5%戊二醛中,4℃冰箱保存,为电镜提供材料;取部分缺血区心肌组织,10%多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,DNA 断裂的原位末端标记法 [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL] 测凋亡;余心肌缺血组织按 Western blot 检测制成组织匀浆,测 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl2) 和 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 含量。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 电镜结果

2.1.1 SHAM 组 心肌纤维排列整齐,肌小节各带

清晰,线粒体包膜完整、分布均匀,基质均匀致密、嵴清晰完整。见图 1。

**2.1.2 MIRI 组** 心肌明显水肿,心肌纤维排列紊乱,有断裂和溶解现象,明暗带不清,线粒体肿胀,结构模糊,部分嵴断裂溶解。见图 2。

**2.1.3 PPAR $\gamma$  1 组** 心肌轻度水肿,肌丝排列尚整齐,明暗带尚清楚,线粒体轻度肿胀,部分嵴断裂溶解。见图 3。

**2.2 心肌细胞凋亡**

正常细胞核为蓝色,凋亡细胞核为棕黄色。采用

凋亡指数(凋亡指数 = 凋亡阳性细胞核数 / 总细胞核数  $\times$  100%) 来反映和比较各组心肌细胞凋亡整体情况。**SHAM 组**、**MIRI 组**、**PPAR $\gamma$  1 组**大鼠心肌细胞凋亡指数分别为 (  $1.7 \pm 0.4$  ) %、(  $22.5 \pm 2.1$  ) % 和 (  $14.8 \pm 1.6$  ) % ,经单因素方差分析,差异有统计学意义 (  $F=7.331, P=0.003$  ) ,**SHAM 组**大鼠心肌细胞几乎无凋亡;与 **SHAM 组**比较,**MIRI 组**和 **PPAR $\gamma$  1 组**大鼠心肌细胞凋亡增多 (  $t=17.359$  和  $10.946, P=0.000$  ) ;与 **MIRI 组**比较,**PPAR $\gamma$  1 组**大鼠心肌细胞凋亡减少 (  $t=6.412, P=0.000$  ) 。见图 4~6。

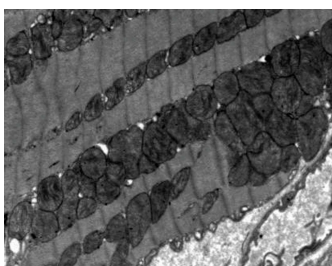


图 1 SHAM 组电镜结果 (  $\times 8000$  )

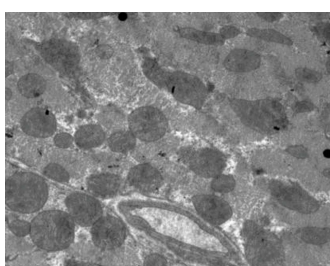


图 2 PPAR $\gamma$ 1 组电镜结果 (  $\times 8000$  )

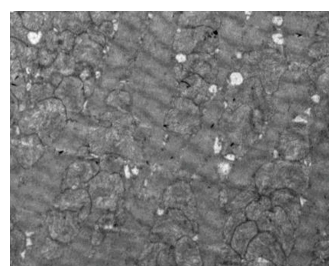


图 3 MIRI 组电镜结果 (  $\times 8000$  )

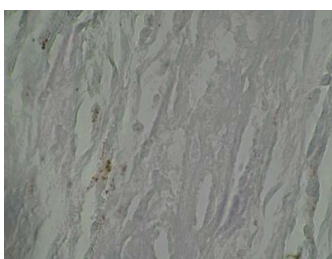


图 4 SHAM 组凋亡细胞 (  $\times 200$  )

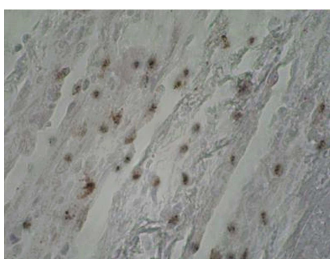


图 5 MIRI 组凋亡细胞 (  $\times 200$  )

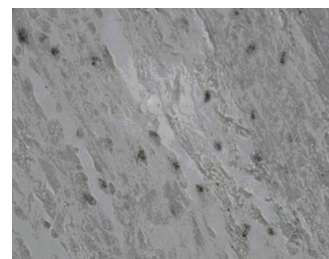


图 6 PPAR $\gamma$ 1 组凋亡细胞 (  $\times 200$  )

**2.3 各组大鼠心肌 Bcl2、Bax 蛋白表达水平变化**

各组大鼠心肌 Bcl2、Bax 蛋白变化,经单因素方差分析,差异有统计学意义 (  $P<0.05$  ) 。**MIRI 组** Bcl2 蛋白表达水平与 **SHAM 组**比较,经 LSD-  $t$  检验,差异无统计学意义 (  $t=1.069, P=0.295$  ) ;**MIRI 组** Bax 蛋白表达水平、Bcl2/Bax 比值与 **SHAM 组**比较,经 LSD-  $t$  检验,差异有统计学意义 (  $t=7.064$  和  $4.339, P=0.000$  ) ,**MIRI 组** Bax 蛋白表达水平上升, Bcl2/Bax 比值下降。

**PPAR $\gamma$  1 组** Bcl2、Bax 蛋白表达水平与 **SHAM 组**比较,经 LSD-  $t$  检验,差异有统计学意义 (  $t=4.189$  和  $3.279, P=0.000$  和  $0.003$  ) ,**PPAR $\gamma$  1 组** Bcl2、Bax 蛋白表达水平上升 ;**PPAR $\gamma$  1 组** Bcl2/Bax 比值与 **SHAM 组**比较,经 LSD-  $t$  检验,差异无统计学意义 (  $t=0.205, P=0.839$  ) 。

**PPAR $\gamma$  1 组** Bcl2、Bax 蛋白表达水平及 Bcl2/Bax 比值与 **MIRI 组**比较,经 LSD-  $t$  检验,差异有统计学意义 (  $t=5.258, 3.785$  和  $4.135, P=0.000, 0.001$  和  $0.000$  ) ,**PPAR $\gamma$  1 组** Bcl2 表达上调, Bax 表达下调, Bcl2/Bax 比值上升。见附表。

附表 各组 Bcl2、Bax 蛋白表达变化 (  $n=10, \bar{x} \pm s$  )

组别	Bcl2	Bax	Bcl2/Bax
SHAM 组	0.58 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.03	1.61 $\pm$ 0.13
MIRI 组	0.50 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.62 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>
PPAR $\gamma$ 1 组	0.89 $\pm$ 0.08 <sup>1)2)</sup>	0.57 $\pm$ 0.05 <sup>1)2)</sup>	1.56 $\pm$ 0.17 <sup>2)</sup>
F 值	6.713	5.297	4.512
P 值	0.004	0.012	0.020

注: 1) 与 SHAM 组比较,  $P<0.05$ ; 2) 与 MIRI 组比较,  $P<0.05$

### 3 讨论

有研究发现,细胞凋亡在 MIRI 的发展过程中扮演着重要角色,可能是 MIRI 发病机制中的重要环节之一<sup>[10]</sup>。细胞凋亡是一种受基因调控的程序性细胞死亡,细胞凋亡的过程非常复杂,Bcl2 家族对细胞凋亡的调控具有很重要的作用。Bcl2 家族蛋白的主要作用靶点位于线粒体膜上,在细胞凋亡过程中起着“主开关”作用<sup>[11]</sup>。Bcl2/Bax 比值对调控细胞凋亡具有重要的意义。HOCHHAUSER 等<sup>[12]</sup>研究发现,与野生型小鼠相比,Bax 基因敲除的小鼠心肌梗死 28 d 后发现其左室舒张末期压和收缩末期内径下降,肌酸激酶与乳酸脱氢酶下降,心肌梗死面积变小,其抗凋亡效应起到心肌保护的作用。DAS 等<sup>[13]</sup>研究发现,心肌细胞在缺血的病理生理过程中,其 Bcl2/Bax 比值决定细胞的生存或死亡。

PPAR 是核受体超家族成员,有多种亚型,其中 PPAR $\gamma$  是近年来最受关注的亚型,依赖配体激活,其活化后在转录水平调控多种细胞增殖、侵袭、分化和凋亡。PPAR $\gamma$  的配体包括天然配体和合成配体两类:①天然配体有 15-脱氧前列腺素 J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) 等;②合成配体包括罗格列酮、吡咯列酮、环格列酮和曲格列酮等。PPAR $\gamma$  配体保护心肌的文献报告很多,然而不同化学结构其发挥保护作用的机制并不一样<sup>[14-16]</sup>。与罗格列酮比较,15d-PGJ<sub>2</sub> 能激活 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ ,上调血红素加氧酶-1 的表达,抑制 NF $\kappa$ B、细胞间黏附分子-1、P 选择素、巨噬细胞趋化蛋白 1、诱导型一氧化氮合酶的表达,从而发挥心肌保护作用。LI 等<sup>[17]</sup>研究发现,PPAR $\gamma$  通过抑制促炎介质基因的转录,从而在各种炎症损伤进程及炎症诱导的细胞凋亡中发挥重要的作用。REN 等<sup>[18]</sup>研究发现,双氧水 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 通过下调心肌细胞 Bcl2 蛋白而诱导凋亡,罗格列酮通过上调 Bcl2 而抵抗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化应激;Bcl2 沉默后过表达 PPAR $\gamma$ ,心肌细胞对氧化应激敏感性增强,从而证明 PPAR $\gamma$  能够通过上调 Bcl2 而对抗氧化应激,减少凋亡。

本研究发现,心肌在经历缺血再灌注后,心肌细胞超微结构发生明显改变,表现为心肌水肿明显,心肌纤维排列紊乱,有断裂和溶解现象,明暗带不清,线粒体肿胀,结构模糊,部分嵴断裂溶解;而 PPAR $\gamma$  1 组损伤明显减轻,表现为心肌轻度水肿,肌纤维排列尚整齐,明暗带尚清楚,线粒体轻度肿胀,部分嵴断裂溶解,说明过表达 PPAR $\gamma$  1 能明显减轻心肌细胞

超微结构的改变。TUNEL 法测凋亡显示,MIRI 组有大量的心肌细胞凋亡,PPAR $\gamma$  1 组则明显减少;而 Bcl2/Bax 的结果表明,与 SHAM 组比较,MIRI 组降低;PPAR $\gamma$  1 组无明显变化;与 MIRI 组比较,PPAR $\gamma$  1 组回升 ( $P < 0.05$ ),这表明心肌在发生 I/R 损伤后,很多心肌细胞发生凋亡,然而过表达 PPAR $\gamma$  1 能明显减少心肌细胞凋亡的发生,对心肌细胞起到保护作用。众所周知,MIRI 机制复杂,冠状动脉转染 PPAR $\gamma$  1 基因抑制细胞凋亡的机制可能是冠状动脉转染 PPAR $\gamma$  1 基因后,导致 PPAR $\gamma$  1 基因在心肌过度表达,激活线粒体 Bcl2/Bax 通路,通过上调 Bcl2/Bax 比值从而实现抑制细胞凋亡的作用。

MIRI 是一个复杂的病理生理过程,涉及到氧自由基、钙超载、能量代谢障碍、中性粒细胞、细胞凋亡等因素,迄今尚无很好的防治手段。基因治疗针对的是异常基因本身,是对疾病根源的治疗,给疾病的预防和治疗带来新的希望,具有重要的医学价值,目前在心血管、癌症、自身免疫性疾病、传染性疾病等领域已是研究热点。本研究发现,过表达 PPAR $\gamma$  1 基因能通过抑制细胞凋亡,减轻心肌细胞结构的改变而起到心肌保护的作用。基因治疗作为一种全新的治疗手段,随着各种安全、高效、特异、可控的病毒和非病毒载体不断被研发,新的目的基因不断被扩展,基因治疗必将发挥着越来越重要的作用。

#### 参 考 文 献:

- [1] BÁÑEZ B, HEUSCH G, OVIZE M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2015, 65(14): 1454-1471.
- [2] ONG SB, SAMANGQUEI P, KALKHORAN SB, et al. The mitochondrial permeability transition pore and its role in myocardial ischemia reperfusion injury[J]. Journal of Molecular Cellular Cardiology, 2015, 78: 23-34.
- [3] SVARAMAN V, YELLON D M. Pharmacologic therapy that simulates conditioning for cardiac ischemic/reperfusion injury [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology Therapeutics, 2014, 19(1): 83-96.
- [4] 申琳,王浩,叶平.吡咯列酮对大鼠缺血/再灌注心肌过氧化物酶体增殖物受体 $\gamma$ 辅激活因子1 $\alpha$ 表达的影响[J].南方医科大学学报,2014(2):197-200.
- [5] 赵德福.吡咯列酮对大鼠脑缺血再灌注的保护作用[J].辽宁医学院学报,2016,37(3):25-32.
- [6] KASPAR B K, ROTH D M, LAI N C, et al. Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus[J]. J Gene Med, 2005, 7(3): 316-324.

- [7] 杨昭云,徐军美,姜金玉,等.人白细胞介素-10和Bcl-2基因重组腺病毒经冠状动脉转染大鼠心肌的可行性[J].中华麻醉学杂志,2006,26(11):1001-1004.
- [8] THIBAUT H, GOMEZ L, DONAL E, et al. Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmural by strain rate imaging[J]. Am J Physiol, 2007, 293(1): H496- H502.
- [9] BHINDI R, WITTING P K, MCMAHON A C, et al. Rat models of myocardial infarction pathofenetic insights and clinical relevance[J]. Throm Haemost, 2006, 96(5): 602-610.
- [10] 赵文峰,高建芝,张金盈.心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡的信号转导通路[J].新乡医学院学报,2015,32(4):18-22.
- [11] QIN F, YAN C, PATEL R, et al. Vitamins C and E attenuate apoptosis, betaadrenergic receptor desensitization, and sarcoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup> ATPase down-regulation after myocardial infarction[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(10): 1827-4293.
- [12] HOCHHAUSER E, CHEPORKO Y, YASOVICH N, et al. Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction[J]. Cell Biochem Biophys, 2007, 47(1): 11-20.
- [13] DAS D K, MAULIK N. Mitochondrial function in cardiomyocytes: target for cardioprotection[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2005, 18(1): 77-82.
- [14] 高夏青,薛凌.罗格列酮对兔心肌缺血再灌注所伤保护机制的研究[J].中国现代应用药学,2014,31(3):265-270.
- [15] ZHANG J, LI X X, BIAN H J, et al. Inhibition of the activity of Rho-kinase reduces cardiomyocyte apoptosis in heart ischemia/reperfusion via suppressing JNK mediated AIF translocation[J]. Clin Chim Acta, 2009, 401(1-2): 76-80.
- [16] 王峰,梁贵友,刘达兴,等.罗格列酮对心肌缺血再灌注损伤大鼠胰岛素抵抗及炎性因子、内皮素-1的影响[J].中国生化药物杂志,2014,34(9):75-77.
- [17] LI Y, WU J, YAN C, et al. Correlation of PPAR $\gamma$  and NF- $\kappa$ B expression with arsenite induced hepatic fibrosis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2010, 18(36): 3848-3856.
- [18] REN Y, SUN C, SUN Y, et al. PPAR gamma protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation[J]. Vascul Pharmacol, 2009, 51(2/3): 169-174.

(童颖丹 编辑)