

· 基础研究 ·

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂对直流电刺激后兔缺血心肌组织中PTEN蛋白表达及左室重构的影响

张 萍, 何国祥*, 刘建平

(第三军医大学西南医院心内科, 重庆 400038)

【摘要】目的 探讨染色体10缺失的磷酸酶与张力蛋白同源物基因 (PTEN) 在兔急性心肌梗死 (MI) 边缘区心肌组织中的表达及其意义以及过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) γ 激动剂 (罗格列酮) 对其表达的影响。**方法** 50只日本大耳白兔, 随机分为假手术组 (SH组, $n=5$)、MI组 $n=15$ 、常规电刺激组 (EFs组, $n=15$) 和罗格列酮干预电刺激组 (R-EFs组, $n=15$)。结扎冠状动脉左前降支建立急性MI或SH组模型后, 在结扎血管两侧心外膜上缝合固定一对铂金电极, 直流电刺激 (电场强度4.0V/cm, 30min/d), 罗格列酮以4mg/(kg·d) 灌胃。实验终点以Western印迹法检测各组1周、2周及4周时心肌组织中PTEN表达并测定左、右心室重量和血流动力学指标。**结果** 正常心肌组织和缺血心肌组织均有一定程度PTEN表达, EFs组心肌组织中PTEN表达较MI组升高 ($P<0.01$), 罗格列酮干预使缺血心肌组织中PTEN表达较EFs组进一步升高 ($P<0.05$), 同时左室收缩功能较EFs组进一步改善。**结论** PPAR γ 激动剂可进一步促进缺血心肌组织在直流电刺激后PTEN的表达, 从而使左心室功能得到改善。

【关键词】 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂; PTEN; 直流电场; 心肌梗死; 左心室功能

【中图分类号】 R363

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00056

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist promotes PTEN expression and left ventricular remodeling in rabbit ischemia myocardium

ZHANG Ping, HE Guoxiang*, LIU Jianping

(Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To determine the expression and significance of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) in the marginal area of myocardial infarction, and the effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist (PPAR- γ), rosiglitazone, on the expression in acute myocardial infarction (MI) rabbit model after the direct current (DC) electric fields (EFs) stimulation. **Methods** Fifty rabbits were randomly divided into sham-operation group (SH group, $n=5$), MI group ($n=15$), DCEFs treatment group (EFs group, $n=15$), and DCEFs+rosiglitazone treatment group (R-EFs group, rosiglitazone 4 mg/kg·d, *i.g.*). After the corresponding model was established by occluding left anterior descending branch in the later 3 groups, DCEFs stimulation (4.0V/cm, 30min/d) was given to the later 2 groups for 1, 2 and 4 weeks respectively ($n=5$ for each time point). The expression of PTEN in the ischemia myocardium was detected by Western blotting. Meanwhile, the ratio of left or right ventricular weight/body mass (LVW/BS or RVW/BS) and the hemodynamic indexes were measured. **Results** There was some expression of PTEN in cardiac tissue of SH group and MI group. The expression of PTEN in EFs group was higher than in MI group ($P<0.01$), and the expression in R-EFs group was higher than EFs group ($P<0.05$). In the meantime, compared to MI group, left ventricular function was improved in EFs group and R-EFs group. **Conclusion** PPAR γ promotes the expression of PTEN and thus further improves the left ventricular systolic function.

【Key words】 peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist; PTEN; direct current electric fields; myocardial infarction; left ventricular systolic function

This work was supported by the National Natural Science Foundation (No.81170142)

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 是一类与甲

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-02-07

基金项目: 国家自然科学基金 (No.81170142)

张萍, 现在贵州省人民医院心内科工作

通讯作者: 何国祥, Tel: 023-68754268, E-mail: yyxnk@yahoo.com.cn

状腺激素和维甲酸受体密切相关的核激素受体, 罗格列酮为PPAR γ 合成配体, 近年来研究发现罗格列酮可激活PPAR γ , 促进人类正常细胞、平滑肌细胞以及癌细胞的染色体10缺失的磷酸酶与张力蛋白同源物基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN) 的表达^[1], 但罗格列酮干预对缺血心肌组织中PTEN蛋白表达的影响目前尚未见报道。本研究目的在于观察低压稳恒直流电场刺激后缺血心肌组织PTEN表达的变化以及罗格列酮干预对其表达的影响及其意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康的日本大耳白兔50只, 三月龄, 雌雄不拘, 体质量2.0~2.6kg, 随机分为假手术组 (SH组)、心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 组、常规电刺激组 (EFs组, 场强4.0V/cm) 以及罗格列酮干预电刺激组 (R-EFs组, 场强4.0V/cm), 分别观察术后1、2和4周, 每组5只兔。EFs组结扎左冠状动脉前降支 (left anterior descending branch, LAD) 建立急性MI模型并安置电极, 术后第二天开始施加4.0V/cm电刺激, 30min/d。MI组仅建立急性MI模型并安置电极, 但无电刺激治疗。SH组安置电极, LAD仅穿线不结扎。R-EFs组建模方式及电刺激方式同电治疗组, 从术后第二天开始, 电治疗同时给予罗格列酮片4mg/kg溶解于生理盐水灌胃, 1次/d^[2]。所有动物购自第三军医大学动物实验中心, 实验依照第三军医大学动物实验委员会颁布的动物实验法进行。

1.2 主要试剂、材料和仪器

鼠抗兔PTEN多克隆抗体 (美国Cell Signaling公司); 罗格列酮片 (4mg/片, 太极集团重庆涪陵制药有限公司); 电极自制的铂金电极, 电极头长15.0mm、宽1.1mm、厚0.5mm, 与经皮冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 导丝焊接, 从焊接处套上橡胶绝缘管, 构成电极绝缘部分共20cm长; RM6280多导生理记录仪 (四川成都仪器厂); WYJ系列高精度直流稳压稳流电源 (上海山杰科技有限公司); Western印记法凝胶成像系统 (美国Bio-Rad公司)。

1.3 动物模型构建及标本收集

3%戊巴比妥钠盐按1ml/kg耳缘静脉缓慢注射麻醉生效后, 剪开心包后在LAD左心耳起源与心尖连线的中点处以0号丝线缝扎血管, 以心电图相应导

联ST段弓背向上抬高, 兔左室前壁与心尖部心肌由红润变青紫, 确定急性MI模型建立。在急性MI模型成功建立后立即在LAD两侧的心外膜上缝合固定一对铂金属电极, 两电极之间相距1cm。不缝合心包关闭胸腔, 然后通过皮下隧道将阴、阳两条电极固定于兔的颈背部。术后青霉素钠盐22000u/(kg·d), 连续3d肌注。术后电刺激治疗过程中以RM6280多导生理记录仪监测心律失常发生情况。

1.4 测定血流动力学指标及留取心肌组织标本

实验终点, 将各组实验兔以3%戊巴比妥钠盐按1ml/kg耳缘静脉缓慢注射麻醉, 右颈动脉插管至左心室, 应用RM6280型8道生理记录仪记录主动脉、左心室压力曲线。测量心率 (heart rate, HR)、平均动脉压 (mean artery pressure, MAP)、左室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压 (left ventricular end diastolic pressure, LVEDP) 及 $\pm dp/dt_{max}$ 。完成压力曲线记录后立即开胸取出心脏, 肝素盐水冲洗, 棉纸吸干水分后分别称量左心室 (包括室间隔) 和右心室湿重。计算左心室湿重 (left ventricular weight, LVW)/体质量 (body mass, BS) 和右心室湿重 (right ventricular weight, RVW)/BS, 分别为左心室心肌肥厚指数和右心室心肌肥厚指数。留取左心室梗死边缘区心肌组织100mg迅速放入液氮冻存。

1.5 Western印记法测定缺血心肌组织中PTEN的表达

提取心肌组织中的总蛋白, 蛋白质定量绘制标准曲线, 测定样品浓度, 灌制10% SDS-PAGE, 上样量为30 μ g, Bio-Rad公司Mini系电泳槽进行电泳, 转至PVDF膜, 加入一抗、二抗后用凝胶扫描成像系统扫描成像, 并用Quantity One 4.4.0图像分析软件进行分析, 蛋白表达量以“目的蛋白的光密度 (A) 值与GAPDH的A值的比值”表示。

1.6 统计学处理

所有计量资料数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS11.5软件进行单因素方差分析, L.S.D-*t*检验及Dunnett-*t*检验作为验后多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 兔一般情况

本实验中的兔50只, 共死亡4只。MI组死亡2只, 其中一只尸检提示大量心包积液, 另一只术后进食

差, 衰竭死亡; EFs组死亡1只, 尸检提示心包粘连; R-EFs组死亡1只, 尸检未发现明显异常, 其余兔均存活至各自的观察终点, 总死亡率8.0%。

2.2 兔心室重构以及血流动力学指标的改变

MI_{4周}组LVW/BS大于SH组, EFs_{4周}及R-EFs_{4周}组LVW/BS均小于MI_{4周}组(均为 $P < 0.05$), R-EFs_{4周}组LVW/BS较EFs_{4周}更小($P > 0.05$)。与SH组比较MI_{4周}组LVEDP明显增高, LVSP和+dp/dtmax显著降低($P < 0.05$)。EFs_{4周}组LVEDP、LVSP、MAP以及±dp/dtmax与MI_{4周}组比较均有改善, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。R-EFs_{4周}组LVEDP较EFs_{4周}组降低, 同时LVSP、MAP以及±dp/dtmax升高($P > 0.05$, 表1)。

2.3 缺血心肌组织中PTEN表达的变化

Western印记法结果显示, 各组的PTEN表达程度不同。MI组梗死边缘区心肌组织中PTEN蛋白表达较EFs组低。外加低压稳恒直流电场干预后, 缺血心肌组织PTEN表达逐渐升高, 至第1周后显著高于MI组($P < 0.01$, 图1)。

给予兔罗格列酮治疗后, R-EFs组MI边缘区心肌组织中PTEN蛋白表达随着治疗时间的延长而较EFs组逐渐增加。治疗后第1周 R-EFs组PTEN表达较

同时点EFs组升高($P < 0.05$), 2周后R-EFs组PTEN表达不再继续明显升高, 但仍较同时点EFs组升高($P > 0.05$)。

3 讨论

研究显示, 组织损伤后, 伤口及其附近上皮存在的损伤电流可形成内源性电场, 这种内源性电场是稳恒直流电场, 具有促进损伤愈合等生物学效应, 外加直流电场可增强内源性电场的这种作用^[3]。本课题组早期研究显示电刺激促进兔损伤心肌修复并改善心室功能, Uemura等^[4]亦发现电刺激迷走神经可使心肌细胞中活化的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)表达降低, 从而减少心室肥厚。因此, 我们对MI后兔进行电刺激, 以了解其对心脏保护的作用及其可能的机制。

PTEN基因是1997年由Li等分离得到的一种抑癌基因。随着胚胎进一步发展, PTEN在不同组织中表达有所不同^[5]。PTEN对其下游的信号传导3、4、5-三磷酸酯酰肌醇/蛋白激酶(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)途径起负调节作用, 可阻断PI3K/Akt信号通路所介导的细胞生长、增殖、迁移、分化和凋亡^[6]。PTEN所具有的抑制肿

表1 兔心室重构及血流动力学参数的改变
Table 1 Ventricular remodeling and hemodynamic parameters of rabbits ($\bar{x} \pm s$)

组别	LVW/BS (g/kg)	RVW/BS (g/kg)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	HR (次/min)	+dp/dtmax (mmHg/s)	-dp/dtmax (mmHg/s)	MAP (mmHg)
SH组	2.34 ± 0.44	0.70 ± 0.10	126.0 ± 9.1	15.4 ± 10.6	268 ± 24	2484 ± 408	2147 ± 268	119.8 ± 11.9
MI _{1周} 组	2.51 ± 0.28	0.62 ± 0.09	101.7 ± 9.4	22.9 ± 4.1	281 ± 8	1779 ± 249	1782 ± 160	100.3 ± 9.9
MI _{2周} 组	2.49 ± 0.40	0.68 ± 0.09	93.4 ± 9.5	24.2 ± 9.2	249 ± 24	1935 ± 569	1381 ± 356	95.5 ± 8.7
MI _{4周} 组	3.29 ± 0.55 [#]	0.83 ± 0.13	91.4 ± 4.4 [#]	32.3 ± 8.4 [#]	285 ± 12	1602 ± 485 [#]	1240 ± 457 [#]	99.7 ± 12.5
EFs _{1周} 组	2.53 ± 0.63	0.64 ± 0.18	107.9 ± 4.8	22.2 ± 7.2	249 ± 86	1873 ± 252	1790 ± 94	103.4 ± 15.4
EFs _{2周} 组	2.54 ± 0.41	0.64 ± 0.17	114.7 ± 3.6 [*]	19.6 ± 3.9	274 ± 22	1901 ± 209	1813 ± 133 [*]	102.0 ± 15.4
EFs _{4周} 组	2.68 ± 0.44 [*]	0.73 ± 0.11	121.9 ± 5.8 [*]	18.5 ± 3.2 [*]	240 ± 21 [*]	2130 ± 99 [*]	1845 ± 197 [*]	105.2 ± 10.9 [*]
R-EFs _{1周} 组	2.47 ± 0.20	0.64 ± 0.05	106.3 ± 2.4	22.3 ± 6.8	254 ± 20	1933 ± 432	1699 ± 101	104.0 ± 11.4
R-EFs _{2周} 组	2.49 ± 0.13	0.65 ± 0.07	117.2 ± 4.5 [*]	20.0 ± 4.6	268 ± 16	1988 ± 353	1830 ± 224	104.4 ± 15.4
R-EFs _{4周} 组	2.63 ± 0.35 [*]	0.71 ± 0.12	122.6 ± 7.8 [*]	17.6 ± 3.3 [#]	254 ± 11	2215 ± 131 [*]	1865 ± 168 [*]	105.8 ± 12.1

注: SH: 假手术组; MI: 心肌梗死组; EFs: 常规电刺激组; R-EFs: 罗格列酮干预电刺激组; LVW/BS: 左心室湿重/体质量; RVW/BS: 右心室湿重/体质量; LVSP: 左室收缩压; LVEDP: 做事舒张末压; HR: 心率; MAP: 平均动脉压。与同时相点MI组比较, * $P < 0.05$; 与SH组比较, # $P < 0.05$

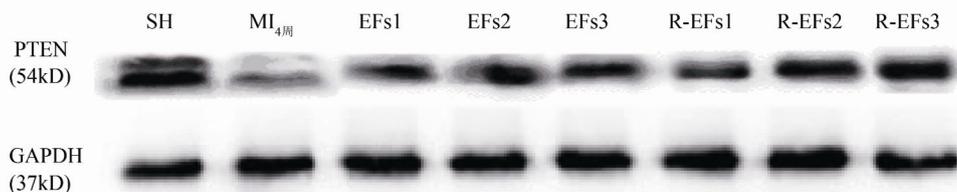


图1 Western印记法检测各治疗组PTEN蛋白的表达

Figure 1 Expressions of PTEN protein in different groups with Western-blot

SH: 假手术组; MI_{4周}: 心肌梗死4周组; EFs: 常规电刺激组; R-EFs: 罗格列酮干预电刺激组(从1~3依次为外加低压稳恒直流电刺激治疗后第1, 2和4周)

瘤血管生成的作用,使其在肿瘤的治疗中备受关注,已成为研究的热点。但对于缺血心肌组织中PTEN表达的情况目前未见相关报道。

本研究发现,正常和缺血心肌组织中均有一定程度的PTEN的表达。在MI边缘区心肌组织中,EFs组、R-EFs组以及MI组的PTEN表达程度不同。MI组梗死边缘区心肌组织中PTEN蛋白表达较EFs组低。外加低压稳恒直流电场干预后PTEN表达逐渐升高,至第1周后显著高于MI组($P < 0.01$),但术后2周后EFs组PTEN表达未再继续显著增加。

PTEN与心脏病有着密切的关系,特异性PTEN基因敲除的小鼠出现心脏收缩功能的下降^[7]。本课题组早期实验提示直流电刺激后缺血心肌组织中I型及III型胶原纤维生成较MI组减少,进一步实验证实直流电刺激抑制平滑肌细胞增生从而抑制球囊损伤后兔腹主动脉内膜的增生,这一作用通过PTEN/PI3K/Akt/P27^{kip1}通路实现^[8]。由于PTEN抑制成纤维细胞、胶原纤维以及平滑肌细胞增殖,因此PTEN表达增加可抑制心肌肥大及纤维化,从而改善心脏功能。在本实验中,EFs_{4周}组的左室功能较MI_{4周}组提高,同时左心室壁厚指数降低,证实外加低压稳恒直流电场通过使PTEN表达增加,从而减轻MI后的左心室重构,改善左心功能。

PTEN启动子上游10kb处有两个PPAR γ 的结合位点^[2],作为PPAR γ 激动剂,罗格列酮可激活PPAR γ 并通过与这两个结合位点结合,促进人类正常细胞、平滑肌细胞以及癌细胞PTEN的表达^[1]。然而,对于罗格列酮是否能影响缺血心肌组织中PTEN的表达目前尚未见报道。我们研究了罗格列酮对PTEN表达的影响及其意义。结果显示,给予罗格列酮干预后,直流电刺激组MI边缘区心肌组织中PTEN的表达较罗格列酮干预前显著增加,说明罗格列酮能进一步促进缺血心肌组织中PTEN的表达。同时,罗格列酮干预后兔左室功能较未用罗格列酮的常规电刺激组进一步改善,虽未达到统计学差异,但仍证明罗格列酮进一步抑制心室重构、改善心功能的作用。

本研究结果显示直流电刺激后缺血心肌组织PTEN的表达增加,MI后心室重构改善。罗格列酮能进一步促进电刺激后的PTEN表达,更有利于MI后左室功能的恢复。但PTEN信号通路在改善心室重构中是否发挥主要作用,两者之间的相关性如何,尚有待我们进一步实验验证。

【参考文献】

- [1] 董少红,李鹏,曾春苗,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂对球囊损伤血管平滑肌细胞PTEN蛋白表达的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(22): 4218-4222.
- [2] Wu W, Celestino J, Milam MR, *et al.* Primary chemoprevention of endometrial hyperplasia with the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone in the PTEN heterozygote murine model [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18(2): 329-338.
- [3] Saunders RD, McCaig CD. Developmental effects of physiologically weak electric fields and heat: an overview[J]. *Bioelectromagnetics*, 2005, Suppl 7: S127-132.
- [4] Uemura K, Li M, Tsutsumi T, *et al.* Efferent vagal nerve stimulation induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbit[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(4): H2254-2261.
- [5] Gimm O, Attie-Bitach T, Lees JA, *et al.* Expression of the PTEN tumour suppressor protein during human development[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(11): 1633-1639.
- [6] Oudit GY, Penninger JM. Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 82(2): 250-260.
- [7] Schwartzbauer G, Robbins J. The tumor suppressor gene PTEN can regulate cardiac hypertrophy and survival[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(38): 35786-35793.
- [8] Zhang P, Liu Z, He G, *et al.* Electrical stimulation inhibits neointimal hyperplasia after abdominal aorta balloon injury through the PTEN/p27Kip1 pathway[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(11): 807-815.

(编辑: 胡晓晖)