

## 吡格列酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤中炎症反应及细胞凋亡的影响

李风云<sup>1</sup>, 杨凤兰<sup>1</sup>, 张秀萍<sup>2</sup>, 刘志明<sup>2</sup>

(1. 秦皇岛市抚宁县人民医院心内科, 河北 秦皇岛 066300;

2. 广西医科大学附属第一医院心内科, 广西 南宁 530000)

**【摘要】** 目的 探讨吡格列酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤中炎症反应和细胞凋亡的影响及其机制。方法 将 80 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、吡格列酮组、GW9662 组及 DMSO 组, 每组各 16 只, 术前 5 d 分别给予相应处理。采取体内结扎左前降支的方法建立心肌缺血再灌注损伤模型, 予 ELISA 法检测大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平, HE 染色观察左心室前壁细胞病理形态学改变, 并采用原位末端标记法检测心肌细胞凋亡数。结果 与假手术组相比, 其余四组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平、心肌细胞凋亡数均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 吡格列酮组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平, 心肌细胞凋亡数明显降低 ( $P < 0.05$ ); 模型组与吡格列酮组中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平均呈显著正相关 ( $P < 0.001$ )。结论 吡格列酮在心肌缺血再灌注损伤中可能通过负性调节 NF- $\kappa$ B p65 含量水平进而减少 IFN- $\gamma$  的释放, 抑制心肌细胞的凋亡, 从而发挥相应的心肌保护作用。

**【关键词】** 吡格列酮; GW9662; 心肌缺血/再灌注; 炎症反应; 细胞凋亡**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)24-3595-04

**Effect of pioglitazone on inflammatory reaction and apoptosis of myocardium cell from ischemia-reperfusion injury in rats.** LI Feng-yun<sup>1</sup>, YANG Feng-lan<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-ping<sup>2</sup>, LIU Zhi-ming<sup>2</sup>. 1. Department of Cardiology, Funing Country Hospital, Qinhuangdao 066300, Hebei, CHINA; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, Guangxi, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of pioglitazone on inflammatory reaction and apoptosis of neurons following myocardium from ischemia-reperfusion injury in rats and its corresponding mechanisms. **Methods** Eighty Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups as sham-operation group, model group, pioglitazone group, GW9662 group and DMSO group, with 16 rats in each group. Relevant treatments were given to rats 5 days before myocardium ischemia operation respectively. A rat model of left anterior descending coronary artery was ligated for 45 min and reperfused for 45 min to establish the model of ischemia-reperfusion. ELISA was respectively used to detect levels of NF- $\kappa$ B p65 and IFN- $\gamma$  in myocardium tissue. H.E staining was employed to observe morphologic changes of myocardium cells in ischemia/reperfusion injury region, and TUNEL staining were used to detect the number of myocardium cell apoptosis. **Results** Compared with sham-operation group, the levels of NF- $\kappa$ B p65 and IFN- $\gamma$ , the number of myocardium cell apoptosis were significantly increased in the other four groups ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the levels of NF- $\kappa$ B p65 and IFN- $\gamma$ , the number of myocardium apoptosis were significantly decreased in pioglitazone group ( $P < 0.05$ ). The levels of IFN- $\gamma$  and NF- $\kappa$ B p65 in model group and pioglitazone group had perfect positive correlation ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** Pioglitazone maybe down-regulates NF- $\kappa$ B p65 level and reduces the release of IFN- $\gamma$ , then prevents cell apoptosis, and hence provides protection from ischemia/reperfusion injury.

**【Key words】** Pioglitazone; GW9662; Myocardium ischemia/reperfusion; Inflammatory response; Cell apoptosis

心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的存在对部分急性心肌梗死(AMI)患者的治疗造成一定的不利影响。近年来, MIRI 与炎症反应的关系已成为缺血再灌注损伤机制研究领域的热点<sup>[1]</sup>。有关研究资料表明, 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )激活后能从转

录水平抑制炎症因子的基因表达而减少细胞凋亡的发生<sup>[2]</sup>, 但其具体机制尚未阐释清楚。本研究采取股静脉注射 PPAR $\gamma$ 激动配体——吡咯列酮, 观察其对大鼠心肌缺血再灌注损伤后炎症反应、细胞病理形态学及细胞凋亡的影响, 进一步探讨吡格列酮心肌保护作

用及其可能机制。

## 1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 80 只 (SPF 级, 河北医科大学实验动物中心提供); NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒 (Sigma); 原位末端标记 (TUNEL) 试剂盒 (Promega); 吡格列酮、GW9662 和 10% 二甲基亚砷 (DMSO) (R&D Systems); 酶标仪 (Heraeus), 电子显微镜 (OLYMPUS), Labo fuge 400R 高速低温离心机 (BioTek)。

## 1.2 研究方法

1.2.1 大鼠分组及处理 将 80 只 SD 大鼠 (体质量 290~500 g), 按随机数字表法分为五组 ( $n=16$ ), 饮水自由, 但术前 12 h 禁食。(1) 假手术组: 术前 5 d, 1 次/d, 每次经股静脉分支注射 2 ml/kg 的生理盐水; (2) 模型组: 缺血前 5 d, 1 次/d, 每次经股静脉分支注射 2 ml/kg 的生理盐水; (3) 吡格列酮组: 缺血前 5 d, 1 次/d, 每次经股静脉分支注射 10 mg/kg 的吡格列酮; (4) GW9662 组: 缺血前 5 d, 1 次/d, 每次先经股静脉分支注射 0.3 mg/kg<sup>[3]</sup> 的 GW9662, 10 min 后再经股静脉分支注射 10 mg/kg 的吡格列酮; (5) DMSO 组: 缺血前 5 d, 1 次/d, 每次经股静脉分支注射 2 ml/kg 的 10% DMSO。

1.2.2 建立大鼠心肌缺血再灌注损伤模型 按陈良万法<sup>[4]</sup>制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型。经腹腔注射 0.3 ml/100 g 的 10% 水合氯醛进行麻醉, 气管切开并插管, 通气频率 65 次/min, 呼吸比为 1:1.15, 心电图监测。剖胸, 带 6~0 线的眼科针在大鼠左冠状动脉根部下 1.5 mm、穿行在左心耳与左肺动脉窦之间, 其间置一塑料管, 以止血钳夹紧, 密切观察左心室前壁心肌颜色改变及心电图变化。左心室前壁心肌组织颜色变暗, 同时心电图示 ST 段下降或抬高则判断为左冠状动脉结扎成功。45 min 后拔出塑料管, 使左冠状动脉恢复血流 45 min, 再灌注时局部心肌组织充血。假手术组大鼠只在左冠状动脉根部下 1.5 mm 处穿线, 但不结扎, 其他步骤同模型组。

## 1.3 指标的检测

1.3.1 测定心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  的含量水平 各组大鼠再灌注结束后, 随机抽取各组 8 只大鼠, 以 4℃ 肝素化生理盐水进行心脏快速灌洗, 双肺变白后快速剪断心脏, 取左心室前壁心肌组织液氮冷冻后将组织匀浆上清液作为检测标本。检测步骤严格按 ELISA 试剂盒要求进行。

1.3.2 心肌组织 HE 染色 将各组其余 8 只大鼠麻醉, 以 4℃ 肝素化生理盐水进行心脏灌洗, 双肺变白后即换用 4℃ 10% 多聚甲醛快速灌洗固定至全身僵

硬, 并在左心室前壁留取心肌组织作为检测标本制成蜡块。从心尖部至心底部连续切片, 厚约 4  $\mu$ m。行常规 HE 染色后在光学显微镜下 ( $\times 400$ ) 观察大鼠心肌细胞病理形态学变化并采图。

1.3.3 心肌组织 TUNEL 染色 染色步骤严格按 TUNEL 试剂盒检测步骤进行。心肌组织 TUNEL 染色后在光学显微镜下 ( $\times 400$ ) 观察心肌细胞凋亡 (以胞核出现棕黄染色颗粒代表), 并计算 TUNEL 阳性率 (TUNEL 阳性细胞数占总细胞数的比值) 并采图。

1.4 统计学方法 应用 SPSS18.0 软件进行统计分析。多组计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD- $t$  检验, 相关分析采用直线相关, 以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 吡格列酮对心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及干扰素- $\gamma$  含量水平的影响 假手术组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平均显著低于其余四组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 与模型组大鼠相比, 吡格列酮组大鼠 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平均明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。五组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 及 IFN- $\gamma$  含量水平比较见表 1。

2.2 模型组与吡格列酮组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 与 IFN- $\gamma$  含量水平的相关性分析 缺血再灌注 45 min 后, 模型组与吡格列酮组大鼠心肌组织中 NF- $\kappa$ B p65 与 IFN- $\gamma$  含量水平均呈显著正相关, 以 NF- $\kappa$ B p65 含量水平为自变量 (Independent variable), 用 X 表示。IFN- $\gamma$  含量水平为应变量 (Dependent variable), 用 Y 表示。求得回归方程为  $1=-0.46+0.28X, r_1=0.917$  ( $P<0.001$ );  $2=-4.13+0.77X, r_2=0.826$  ( $P<0.001$ )。

2.3 吡格列酮对大鼠心肌组织病理形态学改变的影响 假手术组左心室缺血再灌注区心肌组织切片经 HE 染色后可见心肌组织未见明显的出血、充血或炎性细胞的浸润, 心肌纤维排列有序, 肌节长度均匀、排列整齐, 横纹清楚, 染色质较清晰 (图 1)。模型组相应区域呈明显的缺血损伤性改变, 间质充血或出血、水肿明显且有炎症细胞浸润, 大多数心肌纤维变长, 排列紊乱甚至断裂, 肌纤维间距不同程度增宽, 而肌节缩短且排列不整齐 (图 2)。吡格列酮组相应区域缺血性损伤改变较模型组明显减轻, 虽有心肌的损伤但心肌纤维排列较整齐, 肌节排列亦较为规整, 少见红细胞及炎性细胞浸润 (图 3), 而 GW9662 组与 DMSO 组较模型组的心肌缺血改变则无明显减轻。

2.4 吡格列酮对大鼠心肌细胞凋亡的影响 假

手术组大鼠心肌组织中少见凋亡细胞(图4),与其余四组大鼠比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。模型组凋亡细胞阳性率为(63.02±9.07)%,见图5;而吡格列

酮组相应区域凋亡细胞阳性率为(48.09±7.62)%,见图6,两组相比差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。五组大鼠心肌组织中细胞凋亡率的具体比较见表1。

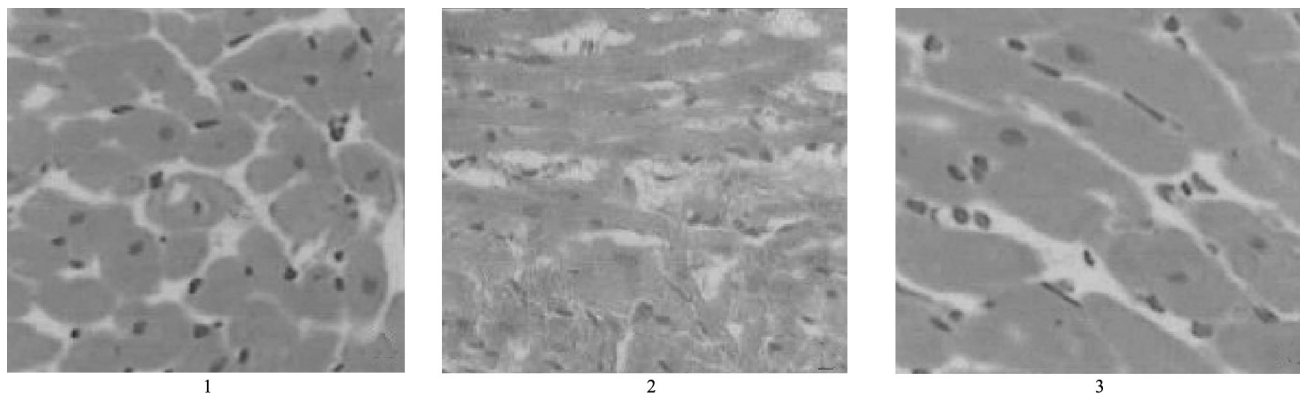


图1 假手术组大鼠心肌缺血组织HE染色(×400);图2 模型组大鼠心肌缺血组织HE染色(×400);图3 吡格列酮组大鼠心肌缺血组织HE染色(×400)

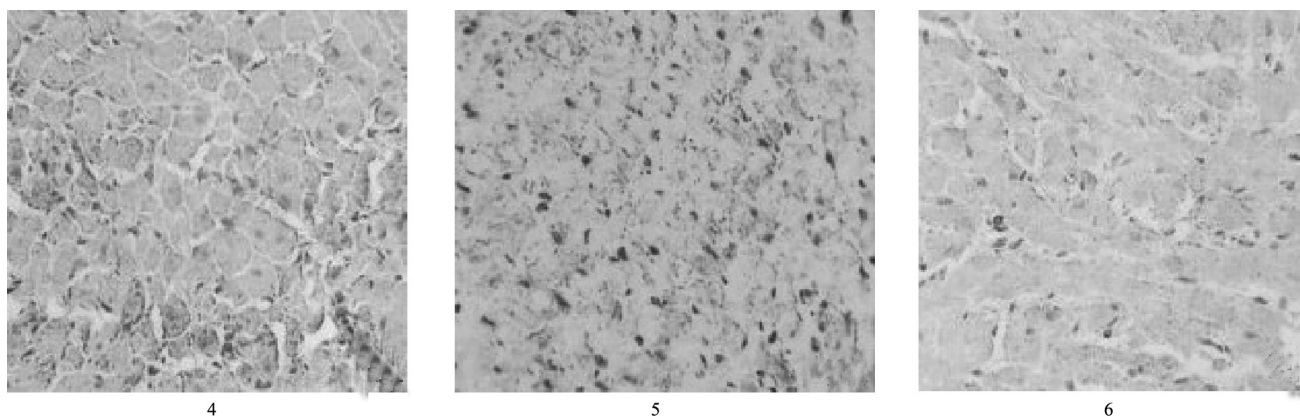


图4 假手术组大鼠心肌缺血组织TUNRL染色(×400);图5 模型组大鼠心肌缺血组织TUNRL染色(×400);图6 吡格列酮组大鼠心肌缺血组织TUNRL染色(×400)

表1 各组大鼠心肌组织中NF-κB p65、IFN-γ含量水平及心肌细胞凋亡率的比较( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	NF-κB p65 (pg/mg)	IFN-γ (pg/mg)	心肌细胞凋亡率(%)
假手术组	8.11±0.83	2.36±0.57	5.09±0.7
模型组	15.52±0.64 <sup>a</sup>	3.71±0.19 <sup>a</sup>	63.01±9.07 <sup>a</sup>
吡格列酮组	9.58±0.85 <sup>ab</sup>	3.05±0.67 <sup>ab</sup>	48.03±7.62 <sup>ab</sup>
GW9662组	14.85±0.77 <sup>ac</sup>	3.51±0.57 <sup>ac</sup>	65.21±8.20 <sup>ac</sup>
DMSO组	15.05±0.96 <sup>ac</sup>	3.73±0.34 <sup>ac</sup>	70.09±8.33 <sup>ac</sup>
F值	146.737	11.105	101.405
P值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与吡格列酮组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

心肌缺血再灌注损伤(MIRI)与心肌炎症反应、细胞凋亡及坏死、心律失常及心功能降低等密切相关,但其机制十分复杂。目前有研究报道,在心肌缺血初始阶段即激活炎症反应,而再灌注时受缺血缺氧及血流变学的改变引起心肌细胞释放大量炎症信号,促进

炎症因子的聚集和释放<sup>[5]</sup>,明显加剧了心肌的炎症反应,从而加速心肌细胞的凋亡。还有研究者认为,干扰素-γ(IFN-γ)活化p38激酶后可诱导Ⅱ类组织相容性复合体(MHC-Ⅱ)及细胞因子的表达,共同参与体内细胞的分化、增殖或凋亡<sup>[6]</sup>。本研究也发现模型组IFN-γ含量水平及细胞凋亡数相比假手术组显著升高,由此我们推测IFN-γ在心肌缺血再灌注损伤后对细胞凋亡的发生具有十分重要的意义。

作为信号传导途径中的重要枢纽之一,由多肽亚单位组成的核转录因子(Nuclear transcription factor kappa B, NF-κB)在参与炎症、肿瘤、免疫的发生和发展、调节细胞凋亡等多种生理及病理过程中具有重要作用。近期有研究表明,NF-κB p65的表达上调与多种与炎症反应过程发挥重要作用的细胞因子,如IFN-γ的表达增强紧密相关<sup>[7]</sup>。本实验研究发现模型组NF-κB p65的含量水平与假手术组相比明显升高,且与IFN-γ含量水平呈显著正相关,这表明NF-κB

p65 在一定程度上是在心肌缺血后被诱导释放进而促进 IFN- $\gamma$  的表达。

过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 与配体结合后,在基因转录水平发挥转录调控作用。其分布较为广泛,主要分布在脂肪组织,但在心肌组织也有一定的表达<sup>[8]</sup>。目前用于临床治疗 II 型糖尿病治疗的噻唑烷二酮类药物(Thiazolidinedione, TZDs)的吡咯列酮被证实是选择性 PPAR $\gamma$  激动剂。研究发现,PPAR $\gamma$  激动剂具有多种生理效应,如具有抑制心肌组织炎性细胞因子的表达及心肌细胞肥大等<sup>[9]</sup>。动物实验也表明<sup>[10]</sup>,PPAR $\gamma$  激动剂对减小心肌缺血再灌注后心肌梗死面积,改善心脏功能具有积极作用且与剂量成正比,但其相关机制尚不完全清楚。本实验中经吡格列酮预处理后的大鼠左心室前壁组织中 NF- $\kappa$ B p65 和 IFN- $\gamma$  的含量水平显著降低、二者含量水平成明显的正相关性,并且心肌细胞凋亡数量明显减少,由此我们认为吡格列酮具有降低诱发 NF- $\kappa$ B p65 的释放能力,进而降低 IFN- $\gamma$  的含量水平,达到减少心肌细胞凋亡的作用;若事先静脉注射 PPAR $\gamma$  抑制剂 GW9662 (2-chloro-5-nitrobenzamide)<sup>[11]</sup>,则能取消吡格列酮的上述作用;另外,DMSO 预处理后的大鼠在相关方面也未得到明显改善。提示吡格列酮激活 PPAR $\gamma$  后通过下调 NF- $\kappa$ B p65 和 IFN- $\gamma$  而发挥抗心肌细胞凋亡作用。

同时,从本实验的病理形态学改变来看,模型组大鼠在心肌缺血再灌注损伤后的心肌细胞发生了明显的细胞空泡变性坏死,符合心肌细胞缺血缺氧性病理变化;而经吡格列酮预处理组的大鼠则以心肌细胞肿胀为主,DMSO 预处理组及预先给予 GW9662 后再行吡格列酮预处理的大鼠在病理形态学方面较模型组均无显著改善。这也表明吡格列酮具有延缓或阻止心肌细胞的坏死,对保护心肌缺血再灌注损伤具有积极意义,而抑制剂 GW9662 则可取消吡格列酮对心肌细胞变性坏死的保护效应。

综上所述,吡格列酮通过激活 PPAR $\gamma$  后下调心

肌缺血再灌注损伤组织中 NF- $\kappa$ B p65 的释放,进一步降低促炎介质(IFN- $\gamma$ )的含量水平,有效缓解了大鼠缺血再灌注后的损伤,从而减少心肌细胞凋亡,为其在缺血性心血管疾病的临床使用提供重要的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Nakka VP, Gusain A, Mehta SL, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities [J]. *Mol Neurobiol*, 2008, 37(1): 37-38.
- [2] Loane DJ, Deighan BF, Clarke RM, et al. Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(6): 920-931.
- [3] Kandilei HB, Gumusel B, Topaloglu E, et al. A role of PPAR $\gamma$  in and rostenediol-mediated salutary effects on cardiac function following trauma-hemorrhage [J]. *Ann Surg*, 2010, 32(7): 287-303.
- [4] 陈良万, 郭加强. 缺血再灌注损伤对心肌表达外源性基因能力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(12): 1254-1255.
- [5] Denes PA, Thornton N, Rothwell J, et al. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(5): 708-723.
- [6] Schindle C, Shuai K, Prezioso VR, et al. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of latent cytoplasmic transcription factors [J]. *Science*, 1992, 257(5071): 809-813.
- [7] 余智, 廖小明, 唐永刚, 等. 吡格列酮对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠核转录因子- $\kappa$ B p65、 $\gamma$ 干扰素和细胞凋亡的影响[J]. *广东医学*, 2012, 33(23): 3541-3544.
- [8] 杨维, 叶平, 周新, 等. 吡格列酮对大鼠肥大大鼠心肌炎性细胞因子表达的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2006, 8(8): 552-555.
- [9] Hasegawa H, Takano H, Zou Y, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activator, ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th 1/Th 2 balance [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(2): 257-265.
- [10] Yue TL, Chen J, Bao WK, et al. *In vivo* myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist rosiglitazone [J]. *Circulation*, 2005, 114(21): 2588-2594.
- [11] Cao ZL, Ye P, Long CL, et al. Effect of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist, on ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Pharmacology*, 2007, 79(2): 184-192.

(收稿日期:2013-07-05)