

- [10] BARNES PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1):16-27.
- [11] MARASHIAN SM, MORTAZ E, JAMAATI HR, et al. Role of innate lymphoid cells in lung disease[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2015, 14(4):346-360.
- [12] 王成阳, 刘向国, 王传博, 等. COPD大鼠T细胞介导转录因子对TH1/TH2细胞调控的实验研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2014, 45(6):941-945.
- [13] FARAHANI R, SHERKAT R, HAKEMI MG, et al. Cytokines (interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and asthma[J]. Adv Biomed Res, 2014 May 28, 3:127.
- [14] DICKINSON JD, ALEVY Y, MALVIN NP, et al. IL13 activates autophagy to regulate secretion in airway epithelial cells[J]. Autophagy, 2016, 12(2):397-409.
- [15] NAKAMURA M, NAKAMURA H, MINEMATSU N, et al. Plasma cytokine profiles related to smoking-sensitivity and phenotypes of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Biomarkers, 2014 Aug, 19(5):368-377.
- [16] GONG Y, SHI GC, WAN HY, et al. Association between the interleukin-13 gene and development of chronic obstructive pulmonary disease in southern Chinese Han population: a case-control study[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(23):4403-4408.
- [17] MAY RD, FUNG M. Strategies targeting the IL-4/IL-13 axes in disease[J]. Cytokine, 2015, 75(1):89-116.
- [18] LE ROUZIC O, PICHAVANT M, FREALLE E, et al. Th17 cytokines: novel potential therapeutic targets for COPD pathogenesis and exacerbations[J]. Eur Respir J, 2017, 50(4):02434-2016. DOI: 10.1183/13993003.02434-2016.
- [19] IMANI S, SALIMIAN J, FU J, et al. Th17/Treg-related cytokine imbalance in sulfur mustard exposed and stable chronic obstructive pulmonary (COPD) patients: correlation with disease activity [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2016, 38(4):270-280.
- [20] MONTALBANO A M, RICCOBONO L, SIENA L, et al. Cigarette smoke affects IL-17A, IL-17F and IL-17 receptor expression in the lung tissue: ex vivo and in vitro studies [J]. Cytokine, 2015, 76(2):391-402.
- [21] SORBELLO V, CIPRANDI G, DI STEFANO A, et al. Nasal IL-17F is related to bronchial IL-17F/neutrophilia and exacerbations in stable atopic severe asthma[J]. Allergy, 2015, 70(2):236-240.
- [22] BOZINOVSKI S, SEOW HJ, CHAN SP, et al. Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette- smoke-induced lung inflammation in mice [J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129(9):785-796.
- [23] SANTOS TMDOS, RIGHETTI RF, CAMARGO LDN, et al. Effect of anti-IL17 antibody treatment alone and in combination with rho-kinase inhibitor in a murine model of asthma[J]. Front Physiol, 2018, 9:1183.
- [24] VAZQUEZ-TELLO A, HALWANI R, HAMID Q, et al. Glucocorticoid receptor-beta up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells[J]. J Clin Immunol, 2013, 33(2):466-478.

(收稿日期:2020-03-09,修回日期:2020-04-28)

引用本文:王理亚,单艳华,刘永萍,等.PPAR- α 的激活对心力衰竭早期心肌功能的机制研究[J].安徽医药,2022,26(4):754-759.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.04.026.

◇临床医学◇



PPAR- α 的激活对心力衰竭早期心肌功能的机制研究

王理亚^a,单艳华^a,刘永萍^a,孙丁^b

作者单位:驻马店市中心医院,^a综合重症医学科,^b心血管重症医学科,河南 驻马店 463000

通信作者:单艳华,男,主任医师,研究方向为心血管内科,Email:wly202202282022@163.com

摘要: **目的** 研究过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α)的激活在心力衰竭早期中的作用,并揭示其作用机制。**方法** 2018年1月至2020年1月,通过横向主动脉缩窄(TAC)手术构建心力衰竭模型,将20只C57BL/6小鼠按随机数字表法随机分为TAC-DTG组、TAC-tTA组、Sham-DTG组、Sham-tTA组,每组5只。TCA术后5周用高效液相色谱法(HPLC)检测ATP并计算磷酸肌酸/ATP水平;TAC术后8周用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测PPAR- α 及其靶基因的mRNA表达;用经胸超声心动图检测左心室舒张末期内径(LVDd)、舒张期LV后壁(LVPWd)及射血分数(EF);检测心脏重量与体重和胫骨长度及肺部重量与胫骨长度的比值(HW/BW、HW/TL、LW/TL);用Masson Trichrome染色检测心肌细胞横截面积、心肌纤维化程度;RT-PCR法检测脑钠肽(BNP)、I型胶原 $\alpha 1$ (Colla1)、III型胶原 $\alpha 1$ (Col3a1) mRNA表达;用离体心脏灌流实验检测棕榈酸氧化速率、葡萄糖氧化速率。**结果** TAC术后5周,TAC-DTG组小鼠ATP浓度[(13.33 $\pm$ 0.83)nmol/mg比(9.56 $\pm$ 1.05)nmol/mg]和磷酸肌酸/ATP水平[(2.21 $\pm$ 0.13)比(1.66 $\pm$ 0.09)]均明显高于TAC-tTA组;TAC术后8周,TAC组小鼠PPAR- α [(0.64 $\pm$ 0.05)比(1.00 $\pm$ 0.04)]、CPT1[(0.56 $\pm$ 0.06)比(1.00 $\pm$ 0.06)]、FATP1[(0.40 $\pm$ 0.05)比(1.00 $\pm$ 0.07)]、CD36[(0.76 $\pm$ 0.15)比(1.00 $\pm$ 0.20)]mRNA表达水平均明显高于Sham组小鼠;TAC组小鼠LVDd[(4.41 $\pm$ 0.07)mm比(4.02 $\pm$ 0.10)mm]、LVPWd[(0.87 $\pm$ 0.02)mm比(0.74 $\pm$ 0.01)mm]、EF[(37.22 $\pm$ 1.90)%比(64.91 $\pm$ 2.34)%]较Sham组小鼠明显减弱;TAC-DTG组小鼠HB/BW[(6.26 $\pm$ 0.18)比(7.21 $\pm$ 0.29)]、HW/TL[(8.80 $\pm$ 0.27)比(10.56 $\pm$ 0.54)]、LW/TL[(13.67 $\pm$ 0.76)比(16.97 $\pm$ 1.25)]较TAC-tTA组小鼠明显减弱;TAC-DTG组小鼠心肌细胞

横截面积 $[(694.64 \pm 23.31) \mu\text{m}^3]$ 比 $[(766.90 \pm 20.98) \mu\text{m}^3]$ 、心肌纤维化程度 $[(4.25 \pm 0.99)\%]$ 比 $[(8.24 \pm 1.08)\%]$ 较TAC-tTA组小鼠明显减小;TAC-DTG组小鼠BNP $[(5.29 \pm 1.02)]$ 比 $[(9.33 \pm 1.42)]$ 、Col1a1 $[(2.76 \pm 0.19)]$ 比 $[(4.40 \pm 0.33)]$ 、Col3a1 $[(3.08 \pm 0.21)]$ 比 $[(7.80 \pm 2.05)]$ mRNA表达水平较TAC-tTA组小鼠明显降低;TAC-DTG组小鼠棕榈酸氧化速率 $[(0.52 \pm 0.06) \mu\text{mol/g}]$ 比 $[(0.28 \pm 0.03) \mu\text{mol/g}]$ 较TAC-tTA组小鼠明显加快,而葡萄糖氧化速率 $[(237.31 \pm 8.96) \text{nmol/g}]$ 比 $[(267.16 \pm 14.93) \text{nmol/g}]$ 较TAC-tTA组小鼠明显减慢。**结论** 心力衰竭早期激活PPAR- α 可通过调节脂肪酸氧化(fatty acid oxidation, FAO)维持其心肌功能和能量,并减轻心肌重塑,提示在心衰早期激活PPAR- α 可作为其早期治疗的有效策略。

关键词: 心力衰竭; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 脂肪酸氧化; 离体心脏灌流; 心肌功能

Mechanism of activation of PPAR- α in myocardial function in the early stage of heart failure

WANG Liya^a, SHAN Yanhua^a, LIU Yongping^a, SUN Ding^b

Author Affiliation:^aGeneral Intensive Care Medicine Department, ^bThe Cardiovascular and Critical Care Medicine Department, Zhumadian City Central Hospital, Zhumadian, Henan 463000, China

Abstract: **Objective** To study the role of activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) in the early stage of heart failure and to reveal its mechanism of action. **Methods** From January 2018 to January 2020, A heart failure model was established by transverse aortic coarctation (TAC) surgery, and 20 C57BL/6 mice were randomly assigned into TAC-DTG group, TAC-tTA group, Sham-DTG group, and Sham-tTA group according to the random number table method, 5 cases in each group. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect ATP and creatine phosphocreatine/ATP levels at 5 weeks after TCA. PPAR- α and its mRNA expression of target genes were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at 8 weeks after TAC. Left ventricular end-diastolic diameter (LVDd), LV posterior wall in diastole (LVPWd) and ejection fraction (EF) were measured by transthoracic echocardiography. The ratio of heart weight with body weight and tibia length, and the ratio of lung weight with tibia length (HW/BW, HW/TL, LW/TL) were measured. The cross-sectional area of cardiomyocytes and the degree of myocardial fibrosis were detected by Masson Trichrome staining. The mRNA expression of brain natriuretic peptide (BNP), type I collagen $\alpha 1$ (Col1a1) and type III collagen $\alpha 1$ (Col3a1) were detected by RT-PCR. The rate of palmitic acid oxidation and glucose oxidation were detected by isolated heart perfusion experiment. **Results** 5 weeks after TAC, the ATP concentration $[(13.33 \pm 0.83) \text{nmol/mg}]$ vs. $[(9.56 \pm 1.05) \text{nmol/mg}]$ and phosphocreatine/ATP levels $[(2.21 \pm 0.13)]$ vs. $[(1.66 \pm 0.09)]$ were significantly higher than those in the TAC-tTA group. 8 weeks after TAC, the PPAR- α $[(0.64 \pm 0.05)]$ vs. $[(1.00 \pm 0.04)]$, CPT1 $[(0.56 \pm 0.06)]$ vs. $[(1.00 \pm 0.06)]$, FATP1 $[(0.40 \pm 0.05)]$ vs. $[(1.00 \pm 0.07)]$, CD36 $[(0.76 \pm 0.15)]$ vs. $[(1.00 \pm 0.20)]$ mRNA expression levels were significantly higher than those in the Sham group. The LVDd $[(4.41 \pm 0.07) \text{mm}]$ vs. $[(4.02 \pm 0.10) \text{mm}]$, LVPWd $[(0.87 \pm 0.02) \text{mm}]$ vs. $[(0.74 \pm 0.01) \text{mm}]$, EF $[(37.22 \pm 1.90)\%]$ vs. $[(64.91 \pm 2.34)\%]$ of mice in the TAC group were significantly weakened than those in the Sham group. The HB/BW $[(6.26 \pm 0.18)]$ vs. $[(7.21 \pm 0.29)]$, HW/TL $[(8.80 \pm 0.27)]$ vs. $[(10.56 \pm 0.54)]$, LW/TL $[(13.67 \pm 0.76)]$ vs. $[(16.97 \pm 1.25)]$ of mice in the TAC-DTG group were significantly attenuated compared with TAC-tTA group. Cross-sectional area of cardiomyocytes $[(694.64 \pm 23.31) \mu\text{m}^3]$ vs. $[(766.90 \pm 20.98) \mu\text{m}^3]$, the degree of myocardial fibrosis $[(4.25 \pm 0.99)\%]$ vs. $[(8.24 \pm 1.08)\%]$ of mice in TAC-DTG group were significantly lower than those in the TAC-tTA group. mRNA expression levels of BNP $[(5.29 \pm 1.02)]$ vs. $[(9.33 \pm 1.42)]$, Col1a1 $[(2.76 \pm 0.19)]$ vs. $[(4.40 \pm 0.33)]$, Col3a1 $[(3.08 \pm 0.21)]$ vs. $[(7.80 \pm 2.05)]$ in the TAC-DTG group were significantly lower than those in TAC-tTA group. The acid oxidation rate $[(0.52 \pm 0.06) \mu\text{mol/g}]$ vs. $[(0.28 \pm 0.03) \mu\text{mol/g}]$ was significantly faster than that in the TAC-tTA group, while the rate of glucose oxidation $[(237.31 \pm 8.96) \text{nmol/g}]$ vs. $[(267.16 \pm 14.93) \text{nmol/g}]$ was significantly slower than that in the TAC-tTA group. **Conclusion** Activation of PPAR- α in the early stage of heart failure can maintain its myocardial energy and reduce myocardial remodeling by regulating fatty acid oxidation (FAO), which indicates that activating PPAR- α can be an effective strategy for the treatment of heart failure.

Key words: Heart failure; Peroxisome proliferator-activated receptors; Fatty acid oxidation; Perfusion of isolated heart; Myocardial function

能量代谢的改变在心力衰竭(heart failure, HF)的进展中起重要作用^[1],在健康人群中,脂肪酸的氧化作用提供了心脏所需ATP的70%,其余的大部分来自丙酮酸的氧化,而丙酮酸的氧化作用与糖酵解和乳酸的氧化作用大致相等^[2-3]。而晚期心力衰竭患者的心脏丧失其代谢灵活性,并且在很大程度上依赖于葡萄糖氧化,而不是依赖于作为优先代谢底

物的脂肪酸氧化(FAO)^[4]。但是,目前尚不清楚这种代谢重塑是导致HF发生和发展的适应性机制还是适应不良的过程。

过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)是配体激活的核受体超家族的成员,并且是控制心肌线粒体FAO能力的关键转录调节因子^[5]。PPAR包含PPAR- α , PPAR- β /和PPAR- γ 的三个成员,其中

PPAR- α 在心肌细胞中高表达,并通过该途径中编码关键蛋白的基因的转录激活来调节脂肪酸摄取、酯化和氧化等关键成分的表达^[6-7]。已有研究表明,PPAR- α 的缺乏会导致对慢性压力超负荷心衰肥大性生长和心脏功能障碍,这表明 PPAR- α 会减轻压力超负荷后的心脏重构^[8]。相反,PPAR- α (MH-PPAR- α) 的过度表达会引起脂质蓄积,尤其是在糖尿病心脏中,进而导致心肌病的发生^[9]。有研究表明,压力过载 HF 后 PPAR 水平下降^[10]。

2018 年 1 月至 2020 年 1 月,我们使用诱导型转基因模型,使用横向主动脉缩窄(TAC)手术造模压力超负荷诱导的心脏肥大和 HF 的小鼠模型,研究 PPAR- α 的表达的对 HF 进展期的影响及初步机制。

1 材料与方法

1.1 小鼠造模 将 C57BL/6 雄性小鼠用作野生型,将血凝素标记的小鼠 PPAR- α cDNA 亚克隆到 pTet-Splice(Invitrogen)的 Hind III 位点,切下 DNA 片段并用于原核注射。通过 PCR 鉴定为阳性后,将其繁殖到 C57BL/6 小鼠以产生稳定的 Tg 系(TRE-PPAR- α),以模拟在心力衰竭早期 PPAR- α 的激活。同时准备 C57BL/6 α -MHC-四环素反式激活因子(tTA)小鼠作为阴性对照。对十周龄的小鼠进行 TAC 手术,使用小型动物呼吸器(SN-480-7)对动物进行气管插管和通气,并添加 1.0% 的异氟烷吸入以维持麻醉状态。于胸部左侧第二肋间处开胸,将一条 7-0 的丝线穿过无名颈动脉和左颈总动脉之间的横向胸主动脉,并用 28 号针头在主动脉周围打结。结扎后,迅速拔出针头并闭合皮肤。假手术组行同样操作,但不结扎。将 20 只 C57BL/6 小鼠按随机数字表法随机分为 TAC-DTG 组(行 TAC 手术的双转基因小鼠)、TAC-tTA 组(行 TAC 手术的 tTA 单转基因阴性对照小鼠)、Sham-DTG 组(假手术的双转基因小鼠)、Sham-tTA 组(假手术的 tTA 单转基因阴性对照小鼠),每组 5 只。研究起止时间为 2018 年 1 月至 2020 年 1 月。

1.2 经胸超声心动图 吸入 1% 异氟烷麻醉后,使用配备 18~38 MHz 探头的 Visual Sonics Vevo 2100 进行超声心动图分析。在胸骨旁短轴视图中评估左心室收缩末期或舒张末期分别定义为左心室面积最小或最大的阶段。从乳头肌以 LVM 型描记法测量左心室舒张末期内径(LVDd)、舒张期 LV 后壁(LVPWd)及射血分数(EF)。

1.3 RT-PCR 使用 TRIzol 从心脏中分离总 RNA。使用 Prime Script RT 试剂盒对总 RNA 进行逆转录,使用 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 和 Thermal Cycler Dice 实时系统进行定量实时逆转录 PCR(RT-PCR)。根据转录起始因子的表达水平将

靶基因的表达水平标准化。RT-PCR 的引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-PCR 中引物序列

小鼠基因	引物
PPAR- α	反向引物 5'-GAAGTCGCTGTGATAAAGCC
	反向引物 5'-GTGTCAGGCTCCAGGTCTC
UCP3	正向引物 5'-AGACAACAGTGAATGCTGAG
	反向引物 5'-AGGAAGTTCACAACCGTTGT
CD36	正向引物 5'-GAATCTGAAGAGACCTTACATTGTACC
	反向引物 5'-CACTCCAATCCCAAGTAAGGCCAT
BNP	正向引物 5'-AGGCGAGACAAGGGAGAACA
	反向引物 5'-GGAGATCCATGCCGCAGA

1.4 Western blotting 检测 使用 RIPA 裂解液获得心肌总蛋白,通过 BCA 蛋白质浓度测定法确定心肌样品的蛋白质浓度。取 40 μ g 蛋白与上样缓冲液混合均匀后与沸水中加热 5 min,在 5 %Tris-甘氨酸 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,150 V 电泳分离 1 h 后,将蛋白转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,清洗数次,于 4 $^{\circ}$ C 下与各一抗溶液(1:1 000)共孵育过夜。以 TBST 清洗三次,每次 5 min,清洗完成后,于室温下同二抗(1:2 000)共孵育两小时,以 TBST 清洗 3 次,每次 10 min,除去二抗残留液后,使用 ECL Western blotting 检测试剂盒检测化学发光并于 Image J 进行检测。使用的抗体有 PPAR- α , GAP-DH 及肌动蛋白抗体。

1.5 心肌高能磷酸盐测定 将心脏组织用冷冻钳于液氮中预冷。将冷冻样品保存在液氮中并冻干过夜。然后将 10 mg 冻干的组织加入 0.6 N 冰冷的高氯酸溶液(适量),匀浆,并在 4 $^{\circ}$ C 下以 500 g 离心 10 min。上清液以氢氧化钾中和至 pH 为 5.0~7.0。10 min 后将提取物离心以除去高氯酸钾,并将上清液用于检测。磷酸肌酸,肌酸,三磷酸腺苷(ATP),二磷酸腺苷(ADP)和单磷酸腺苷(AMP)采用高效液相色谱法测定,分析柱为 STR ODS-M C-18 色谱柱。

1.6 离体心脏灌流 以 1.0% 的异氟烷吸入麻醉小鼠,取下心脏并浸入预冷的 Krebs-Henseleit 缓冲液中,随后进行主动脉插管。离体的小鼠心脏在 Langendorff 模式下于 37 $^{\circ}$ C 在 80 mmHg 的恒定灌注压力下灌注。灌注液为 Krebs-Henseleit 缓冲液,其中含有 1 mmol 乳酸、5 mmol 葡萄糖、1.2 mmol 棕榈酸酯、3% 的牛血清白蛋白和 2.5 mmol 的游离钙离子,以 95% 氧气和 5% 二氧化碳(pH 为 7.4)平衡。用含有 [U- 14 C] 葡萄糖和 [9, 10- 3 H] 棕榈酸酯的灌注液对心脏灌注 20 min。通过分别从 [U- 14 C] 葡萄糖和 [9, 10- 3 H] 棕榈酸中定量收集 14 CO $_2$ 和 3 H $_2$ O 来确定葡萄糖的氧化和棕榈酸的氧化。

1.7 统计学方法 采用SPSS 17.0进行统计分析。观测资料主要是计量数据,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行两组比较。对单时间点的多组比较采用 one-way ANOVA 分析,对多个时间点的多组比较进行重复测量 ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

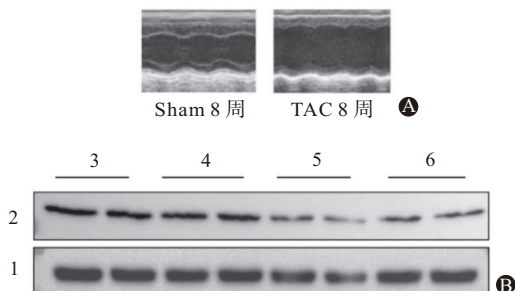
2 结果

2.1 PPAR- α 表达对压力超负荷所致 HF 心脏功能的影响 为了确定 PPAR- α 是否能够减轻压力超负荷 HF 中的心脏功能障碍,在 10 周龄时对 tTA 单转基因小鼠和 PPAR- α DTG 小鼠进行 TAC 手术。在 12 周龄时,多西环素(DOX)不再添加到饮水中。我们评估了 TAC 术后 0、4、6 和 8 周时 TAC 心脏中 PPAR- α 诱导表达的时间过程。蛋白质印迹分析显示,TAC 手术后 PPAR- α 表达的降低在 PPAR- α 双转基因(TG)小鼠中显著减弱[术后 0、4、6、8 周分别为(1.00 $\pm$ 0.03)、(0.90 $\pm$ 0.08)、(0.66 $\pm$ 0.09)、(0.58 $\pm$ 0.05)]。TAC 手术后 8 周,DTG 小鼠中 PPAR- α 及其靶基因的 mRNA 表达显著升高。tTA 和 DTG 小鼠在 TAC 手术后第 8 周的收缩压相似(98.7/2.9 mmHg 比 95.8/3.0 mmHg)。超声心动图分析显示,与 tTA 小鼠相比,TAC 后 8 周,DTG 小鼠的 LV 收缩功能得到了显著保留。左室扩张也通过诱导 PPAR- α 的表达而明显减弱。这些结果表明,在压力超负荷 HF 期间 PPAR- α 的激活可改善心脏收缩力并减少 LV 扩张。表 2、表 3、图 1。

表 2 TAC 术后 8 周时 TAC 组与 Sham 组小鼠 PPAR- α 及其靶基因的 mRNA 表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	PPAR- α	CPT1	FATP1	CD36
Sham 组	10	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.20
TAC 组	10	0.64 $\pm$ 0.05	0.56 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.05	0.76 $\pm$ 0.15
t 值		17.34	16.32	22.33	3.05
P 值		0.007	0.004	0.001	0.007

注:PPAR- α 为过氧化物酶体增殖物激活受体- α ,CPT1 为肉毒碱棕榈酰转移酶 1,FATP1 为脂肪酸转运蛋白 1。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—过氧化物酶体增殖物激活受体- α (PPAR- α);3—横向主动脉缩窄(TAC)术后;4—TAC 术后 4 周;5—TAC 术后 6 周;6—TAC 术后 8 周。

图 1 PPAR- α 的激活改善压力超负荷心力衰竭中的心脏功能障碍: A 为 PPAR- α 的激活;B 为 TAC 手术后 PPAR- α 的表达与时间关系

表 3 TAC 术后 8 周 TAC 组与 Sham 组小鼠 LVDd、LVPWd、EF 水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	LVDd/mm	LVPWd/mm	EF/%
Sham 组	10			
术后 4 周		4.00 $\pm$ 0.08	0.80 $\pm$ 0.03	63.00 $\pm$ 1.76
术后 6 周		4.02 $\pm$ 0.10	0.80 $\pm$ 0.04	62.12 $\pm$ 2.64 ^①
术后 8 周		4.02 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.01 ^{①②}	64.91 $\pm$ 2.34 ^{①②}
TAC 组	10			
术后 4 周		4.06 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.04	50.55 $\pm$ 1.76
术后 6 周		4.28 $\pm$ 0.08 ^①	0.88 $\pm$ 0.03 ^①	43.96 $\pm$ 2.05 ^①
术后 8 周		4.41 $\pm$ 0.07 ^{①②}	0.87 $\pm$ 0.02 ^①	37.22 $\pm$ 1.90 ^{①②}
整体分析(HF 系数)		1.000	1.000	1.000
组间 F, P 值		58.56, <0.001	95.01, <0.001	566.48, <0.001
时间 F, P 值		44.87, <0.001	25.12, <0.001	104.41, <0.001
交互 F, P 值		35.19, <0.001	6.04, 0.005	184.01, <0.001

注:LVDd 为左心室舒张末期内径,LVPWd 为舒张期 LV 后壁,EF 为射血分数。

①与术后 4 周时比较, $P < 0.05$ 。②与术后 6 周时比较, $P < 0.05$ 。

2.2 PPAR- α 的表达对压力超负荷 HF 心脏重塑的影响 TAC 手术后 8 周,与 tTA 心脏相比,DTG 小鼠的心脏质量与体质量之比和心脏质量与胫骨长度之比的增长趋势减弱。在 DTG 心脏中,肺质量与体质量之比的增加也减弱(表 4),表明诱导 PPAR- α 表达可减轻压力超负荷肥大并改善了压力超负荷 HF。通过在 DTG 小鼠中 TAC 诱导的心肌细胞横截面积增加的减少确定组织肥大的减少(表 5、图 2A 和 2B)。为了测试 PPAR- α 表达对心肌纤维化的作用,采用 Masson Trichrome 染色,并通过 LV 切片的组织学分析表明,在 DTG 小鼠中,TAC 诱导的心肌纤维化明显减少(表 5、图 2C),同时分析纤维化相关基因的 mRNA 表达,观察到 PPAR- α 的表达显著减弱了 TAC 诱导的 I 型胶原 $\alpha 1$ (Col1a1)和 Col3a1 mRNA 水平。PPAR- α 的表达也改善了 B 型利钠肽和心钠素的增加(表 6)。总体而言,这些结果表明压力超负荷 HF 期间的 PPAR- α 的表达可明显减弱心脏重塑

表 4 TCA 术后 8 周 tTA 组与 DTG 组小鼠 HB/BW、HW/TL、LW/TL 水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	HB/BW	HW/TL	LW/TL
Sham-tTA 组	5	4.23 $\pm$ 0.07	4.33 $\pm$ 0.54	7.22 $\pm$ 0.22
Sham-DTG 组	5	4.12 $\pm$ 0.09	4.88 $\pm$ 0.17	7.26 $\pm$ 0.22
TAC-tTA 组	5	7.21 $\pm$ 0.29 ^{①②}	10.56 $\pm$ 0.54 ^{①②}	16.97 $\pm$ 1.25 ^{①②}
TAC-DTG 组	5	6.26 $\pm$ 0.18 ^{①②③}	8.80 $\pm$ 0.27 ^{①②③}	13.67 $\pm$ 0.76 ^{①②③}
F 值		360.37	267.87	210.65
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:HB/BW 为心脏质量/体质量,HW/TL 为心脏质量/胫骨长度,LW/TL 为肺部质量/胫骨长度。

①与 Sham-tTA 组比较, $P < 0.05$ 。②与 Sham-DTG 组比较, $P < 0.05$ 。③与 TAC-tTA 组比较, $P < 0.05$ 。

表5 TCA术后8周tTA组与DTG组小鼠心肌细胞横截面积、心肌纤维化程度水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	心肌细胞横截面积/ μm^2	心肌纤维化程度/%
Sham-tTA组	5	377.62±16.32	0.87±0.29
Sham-DTG组	5	400.93±9.32	0.96±0.44
TAC-tTA组	5	766.90±20.98 ^{①②}	8.24±1.08 ^{①②}
TAC-DTG组	5	694.64±23.31 ^{①②③}	4.25±0.99 ^{①②③}
F值		595.96	100.08
P值		<0.001	<0.001

注:①与Sham-tTA组比较, $P<0.05$ 。②与Sham-DTG组比较, $P<0.05$ 。③与TAC-tTA组比较, $P<0.05$ 。

表6 TCA术后8周tTA组与DTG组小鼠BNP、Col1a1、Col3a1 mRNA水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	BNP mRNA	Col1a1 mRNA	Col3a1 mRNA
Sham-tTA组	5	1.02±0.11	0.98±0.04	1.29±0.06
Sham-DTG组	5	1.28±0.09	0.88±0.09	1.29±0.09
TAC-tTA组	5	9.33±1.42 ^{①②}	4.40±0.33 ^{①②}	7.80±2.05 ^{①②}
TAC-DTG组	5	5.29±1.02 ^{①②③}	2.76±0.19 ^{①②③}	3.08±0.21 ^{①②③}
F值		100.00	363.97	44.31
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:BNP为脑钠肽,Col1a1为I型胶原 $\alpha 1$,Col3a1为III型胶原 $\alpha 1$ 。

①与Sham-tTA组比较, $P<0.05$ 。②与Sham-DTG组比较, $P<0.05$ 。③与TAC-tTA组比较, $P<0.05$ 。

并改善了HF的进展。

2.3 PPAR- α 对心脏FAO及心肌能量的影响 进一步考察PPAR- α 表达诱导的底物利用率和心肌能量的变化。TAC手术后5周,对心脏组织进行了HPLC分析,以确定由PPAR- α 表达引起的高能磷酸盐代谢的变化。与tTA单转基因小鼠相比,具有PPAR- α 诱导作用的DTG小鼠在TAC诱导的HF中,其ATP浓度和磷酸肌酸与ATP比率显著提高(表7)。通过离体心脏灌注研究体外TAC心脏中PPAR- α 表达对底物利用率的影响。在基线时,与tTA单转基因小鼠相比,DTG小鼠的FAO表达量显著增加,同时葡萄糖氧化也相应降低。TAC手术后8周,两组的FAO和葡萄糖氧化均有所降低,但与

表7 TCA术后5周tTA组与DTG组小鼠ATP、磷酸肌酸/ATP水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	ATP/(nmol/mg)	磷酸肌酸/ATP
Sham-tTA组	5	19.12±1.14	2.34±0.17
Sham-DTG组	5	20.22±0.88	2.31±0.09
TAC-tTA组	5	9.56±1.05 ^{①②}	1.66±0.09 ^{①②}
TAC-DTG组	5	13.33±0.83 ^{①②③}	2.21±0.13 ^{①②③}
F值		129.33	32.35
P值		<0.001	<0.001

注:ATP为三磷酸腺苷。

①与Sham-tTA组比较, $P<0.05$ 。②与Sham-DTG组比较, $P<0.05$ 。③与TAC-tTA组比较, $P<0.05$ 。

tTA组相比,DTG组的FAO比率显著保留(表8)。综上所述,HF期间的PPAR- α 的激活可调节HF心脏的代谢利用,特别是增强FAO和改善心肌能量。

表8 TCA术后8周tTA组与DTG组小鼠棕榈酸氧化速率、葡萄糖氧化速率水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	例数	棕榈酸氧化速率/ $\mu\text{mol/g}$	葡萄糖氧化速率/(nmol/g)
Sham-tTA组	5	0.55±0.06	674.63±28.36
Sham-DTG组	5	0.76±0.04 ^①	529.85±26.87 ^①
TAC-tTA组	5	0.28±0.03 ^{①②}	267.16±14.93 ^{①②}
TAC-DTG组	5	0.52±0.06 ^{②③}	237.31±8.96 ^{①②③}
F值		79.231	486.248
P值		<0.001	<0.001

注:①与Sham-tTA组比较, $P<0.05$ 。②与Sham-DTG组比较, $P<0.05$ 。③与TAC-tTA组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

在本研究中我们通过诱导型转基因小鼠模型评估了PPAR- α 过表达在HF进展期影响,发现HF期间PPAR- α 的激活减弱了心脏功能障碍和HF进展,导致心脏重塑的减弱,HF期间PPAR- α 的活化维持了FAO和心肌的能量。

除缺血性心脏病外,高血压或主动脉瓣狭窄引起的压力超负荷仍是心衰的最常见原因^[11]。在成年心脏中,FAO是ATP产生中大部分碳底物的来源^[4]。相反,肥大的心脏比FAO更依赖于葡萄糖氧化,因为葡萄糖氧化的效率要比FAO高,对于等量的ATP,所需的氧气要少11%~12%,然而FAO生产的三磷酸腺苷比葡萄糖氧化产生的三磷酸腺苷要多得多,补偿性肥厚性HF向无补偿性肥厚性HF的演变所致对葡萄糖氧化的更大依赖^[12]。本研究表明在肥大心脏中调节FAO可以延迟其发展为无代偿性HF,肥厚性HF期间由PPAR- α 过表达诱导引起的FAO轻度增强可维持心脏功能和心肌能量。

PPAR- α 是控制参与FAO的基因表达的核受体,是心脏底物利用的关键调节剂^[13-14]。研究表明,在压力过载HF期间,PPAR- α 表达水平会降低。同时,用PPAR- α 激动剂非诺贝特治疗可显著改善压力超负荷HF中的左室肥大和心脏功能^[15-16],但对PPAR- α 转基因小鼠的研究表明,增强的FAO对心肌有害^[17]。因此,我们假设在晚期心力衰竭(FAO期减少)中诱导PPAR- α 会对心脏产生积极影响。PPAR- α ,PPAR- β 和PPAR- γ 这三个PPAR亚型具有相似的功能,并且彼此存在相互作用。因此,我们使用了四环素诱导表达系统,而不是使用其他方法来仅激活小鼠心脏中的PPAR- α 。

使用特定的PPAR- α 激动剂WY-14643对大鼠

压力超负荷的心脏进行的研究表明,肥大心脏中的PPAR- α 激活会严重损害心脏功能^[18]。在本研究中,在HF进展阶段,PPAR- α 的激活有利于维持心肌的FAO和高能磷酸盐的代谢,从而降低了葡萄糖的氧化,DTG小鼠中维持的能量能改善心脏收缩力和HF的进展。这些结果表明,在HF的进展阶段(能量饥饿阶段)PPAR- α 的慢性活化可以维持心肌的FAO和能量,从而对肥大HF的进展具有积极作用。

β 受体阻滞剂被证实可以显著改善HF患者的左室功能和预后,并且还可能对心脏产生间接代谢作用^[19]。调节底物利用率可能是治疗HF患者的有前途的策略。在临床试验中,PPAR- α 激动剂贝特类药物对冠状动脉粥样硬化有积极作用^[20],降低了发生重大心血管事件的风险,但对HF的风险没有影响^[21]。我们在小鼠中的研究表明,PPAR- α 的轻度激活,特别是在通过诱导PPAR- α 表达,可能对HF有积极作用。

综上所述,本研究发现在心力衰竭期间激活PPAR- α 可以通过调节FAO维持早期心肌能量,并减轻压力超负荷心力衰竭的心脏重塑,因此在肥厚性HF患者中,使用心肌闪烁显像或超声心动图确定能量饥饿阶段并在此阶段激活PPAR- α ,进而激活FAO可能是治疗HF有效策略。

(本文图2见插图4-2)

参考文献

- [1] NEUBAUER S. The failing heart--an engine out of fuel [J]. *N Engl J Med*, 2007,356(11):1140-1151.
- [2] VENTURA-CLAPIER R, GARNIER A, VEKSLER V. Energy metabolism in heart failure [J]. *J Physiol*, 2004,555(Pt 1):1-13.
- [3] ARDEHALI H, SABBAB HN, BURKE MA, et al. Targeting myocardial substrate metabolism in heart failure: potential for new therapies [J]. *Eur J Heart Fail*, 2012,14(2):120-129.
- [4] LIONETTI V, STANLEY WC, RECCHIA FA. Modulating fatty acid oxidation in heart failure [J]. *Cardiovascular Research*, 2011, 90(2): 202-209.
- [5] KHUCHUA Z, GLUKHOV AI, STRAUSS AW, et al. Elucidating the beneficial role of PPAR agonists in cardiac diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19 (11) : 19113464. DOI: 10.3390/ijms19113464.
- [6] KAIMOTO S, HOSHINO A, ARIYOSHI M, et al. Activation of PPAR- α in the early stage of heart failure maintained myocardial function and energetics in pressure-overload heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017,312(2):H305-H313.
- [7] LEE TW, BAI KJ, LEE TI, et al. PPARs modulate cardiac metabolism and mitochondrial function in diabetes [J]. *J Biomed Sci*, 2017,24(1):5.
- [8] HAN L, SHEN W J, BITTNER S, et al. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α [J]. *Future Cardiology*, 2017, 13(3): 259-278.
- [9] FINCK BN, LEHMAN JJ, LEONE TC, et al. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus [J]. *J Clin Invest*, 2002,109(1):121-130.
- [10] PURUSHOTHAMAN S, SATHIK MM, NAIR RR. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor α in spontaneously hypertensive rat: age-associated paradoxical effect on the heart [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011,58(3):254-262.
- [11] DI PALO K E, BARONE N J. Hypertension and heart failure: prevention, targets, and treatment [J]. *Heart Failure Clinics*, 2020, 16(1): 99-106.
- [12] INGWALL JS. Energy metabolism in heart failure and remodelling [J]. *Cardiovasc Res*, 2009,81(3):412-419.
- [13] AOYAMA T, PETERS J M, IRITANI N, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5678-5684.
- [14] WATANABE K, FUJII H, TAKAHASHI T, et al. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor α associated with age-dependent cardiac toxicity [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 22293-22299.
- [15] PELLIEUX C, MONTESSUIT C, PAPAGEORGIOU I, et al. Inactivation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms α , β/δ , and γ mediate distinct facets of hypertrophic transformation of adult cardiac myocytes [J]. *Pflugers Arch*, 2007, 455(3): 443-454.
- [16] 郭江涛, 何燕, 吴龙飞, 等. 非诺贝特对慢性心力衰竭大鼠心肌能量代谢和心室重构的影响 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2012, 14(12): 1302-1307.
- [17] FINCK B N, LEHMAN J J, LEONE T C, et al. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109(1): 121-130.
- [18] YOUNG M E, LAWS F A, GOODWIN G W, et al. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor α is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 44390-44395.
- [19] BRISTOW MR, GILBERT EM, ABRAHAM WT, et al. Carvedilol produces dose-related improvements in left ventricular function and survival in subjects with chronic heart failure. MOCHA Investigators [J]. *Circulation*, 1996,94(11):2807-2816.
- [20] BROWN J D, PLUTZKY J. Peroxisome proliferator - activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets [J]. *Circulation*, 2007, 115(4): 518-533.
- [21] JUN M, FOOTE C, LV J, et al. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2010, 375(9729): 1875-1884.

(收稿日期:2020-02-10,修回日期:2020-03-12)