

· 基础研究 ·

非诺贝特对脂多糖诱导的心肌细胞肿瘤坏死因子- α 表达的影响

方红 叶平 周新 贺艳丽 伍仕敏 王琼 高月 刘永学

【摘要】 目的 探讨过氧化体增殖物激活型受体 α (PPAR α) 激活剂对新生大鼠心肌细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 PPAR α 自身表达水平的影响。方法 体外原代培养新生 Wistar 大鼠心肌细胞, 给予不同浓度的非诺贝特(PPAR α 激活剂) 刺激, 并辅加脂多糖诱导 TNF- α 表达。采用半定量逆转录-聚合酶链反应法检测 TNF- α 和 PPAR α mRNA 的表达, 酶联免疫吸附测定法检测 TNF- α 的蛋白水平, Western 印迹法检测 PPAR α 蛋白表达。结果 与对照组相比, 非诺贝特组的 TNF- α mRNA 及蛋白表达水平明显降低, 且呈剂量依赖性。而相应的 PPAR α mRNA 及蛋白水平则无显著变化。结论 PPAR α 激活剂可显著抑制新生大鼠心肌细胞中脂多糖诱导的 TNF- α 表达, PPAR α 活化后发挥抗炎作用, 但 PPAR α 本身的表达水平可能并没有改变。

【关键词】 过氧化体增殖物激活型受体; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞, 心肌

Effects of fenofibrate on tumor necrosis factor- α expression induced by lipopolysaccharide in neonatal rat cardiac myocytes

FANG Hong, YE Ping, ZHOU Xin, HE Yanli, WU Shimin, WANG Qiong, GAO Yue, LIU Yongxue
Department of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To examine the effects of peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) activator on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and PPAR α expressions in neonatal rat cardiac myocytes. Methods Primary cultures of cardiac myocytes were prepared from ventricles of 3-day-old Wistar rats. Cardiac myocytes were pretreated with fenofibrate PPAR α activator at different concentrations and then stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 10 μ g/L). The levels of TNF- α and PPAR α mRNA were measured by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). TNF- α and PPAR α proteins were determined by ELISA and Western blotting, respectively. Results RT-PCR demonstrated that pretreatment of cardiac myocytes with fenofibrate inhibited LPS-induced TNF- α mRNA expression in concentration dependent manner. Fenofibrate also decreased LPS-induced TNF- α protein expression in medium. However, no significant changes were observed on PPAR α mRNA and protein expression. Conclusions These results suggest that PPAR α activator may inhibit cardiac TNF- α expression but not accompanied by changes in PPAR α mRNA and protein levels. PPAR α may mediate the modulation of the inflammatory reaction.

【Key words】 peroxisome proliferator-activated receptor; tumor necrosis factor; cells, myocardial

过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是一组核激素受体, 与其配体结合后可启动核内靶基因的转录^[1]。PPAR 在体内主要有 3 种亚型, 即 α , β/δ 和 γ 型。

PPAR α 多在肝脏、心肌、结肠及肾近曲小管上皮中表达, 主要功能是促进脂肪酸氧化。最近的研究表明, PPAR α 也可能参与炎症调控, 特别是影响细胞因子的产生^[2]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一类促炎症因子, 参与多种疾病的炎症病理过程, 如慢性心力衰竭、动脉粥样硬化等。大量研究表明, 慢性心力衰竭患者的 TNF- α 水平明显增高^[3], 且 TNF- α 对心肌细胞存在负性肌力作用。TNF- α 的改变在进一步认识慢性心力衰竭的发病机制及寻求新的防治措施的研究中倍受关注。本文旨在研究 PPAR α 激活剂(贝特类药物)对心肌

基金项目:军队“十五”面上资助项目(02M012);国家自然科学基金面上资助项目(30270551)

作者单位:430071 武汉, 武汉大学中南医院基因诊断中心(方红, 周新, 贺艳丽, 伍仕敏); 100853 北京, 解放军总医院老年心内科(叶平); 100850 北京, 北京放射医学研究所(王琼, 高月, 刘永学)

作者简介:方红, 女, 在读医学硕士

通讯作者:叶平, 电话:010-66937912

细胞中脂多糖诱导的 TNF- α 及 PPAR α 自身表达水平的影响,以期为深入认识该类药物在慢性心力衰竭等疾病的抗炎作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 新生 Wistar 大鼠(1~3d)。由军事医学科学院动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 M199 培养基粉剂、高糖 DMEM 培养基粉剂、优质胎牛血清、优质马血清(Gibco 公司);脂多糖(Sigma 公司);非诺贝特(fenofibrate)由法国利博福尼公司惠赠;逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒、DNA Marker DL2 000(TaKaRa 公司);总 RNA 提取试剂 TRIZOL(Invitrogen 公司);TNF- α ELISA 试剂盒(R&D System 公司);羊抗 PPAR α 多抗、羊抗 Actin 多抗、ECL 检测试剂盒(Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶标记的马抗羊 IgG(H+L)(Gackson 公司);高分子量蛋白 Marker(Pharmacia Biotech 公司);硝酸纤维滤膜(Roche 公司)。

1.1.3 扩增引物 扩增大鼠 PPAR α 、TNF- α 及内参照 GAPDH 的部分 cDNA 序列,分别设计其扩增引物如表 1 所示(引物由北京赛百盛公司合成)。

表 1 PPAR α 、TNF- α 和 GAPDH 的引物序列

基因	引物序列	扩增片段长度
PPAR α	5'-TGCATGTCGGTGGAGACCGTCAC-3'	523bp
	5'-ACTCGGTCTTCTTGATGACC-3'	
TNF- α	5'-CTTCTGTCTACTGAACTTCG-3'	380bp
	5'-GTGCTTGATCTGTTGTTTCC-3'	
GAPDH	5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'	195bp
	5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	

1.2 方法

1.2.1 心肌细胞原代培养^[4,5] 无菌条件下,从新生 Wistar 大鼠(1~3d)中取出心脏,分离心室,以磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗并剪切成 1~3mm³ 大小的颗粒,加适量 0.1%胰蛋白酶消化数分钟。吸取上清,胎牛血清终止消化。重复上述消化步骤直至组织块被完全消化。收集所有细胞悬液,离心(1 500×g, 5℃, 4min),弃上清,将沉淀用心肌细胞培养液(67% DMEM, 18% M199, 10% 马血清, 5% 胎牛血清)按上述离心条件洗 2 遍。转至 25cm² 培

养瓶,细胞接种密度为 5×10⁸/L,每瓶 6ml 培养液,5% CO₂, 37℃ 培养箱培养 70min 后,吸取未贴壁细胞,转入另一新培养瓶。继续培养 24h 后换液即可获高纯度的贴壁心肌细胞。

1.2.2 RNA 分析 心肌细胞培养 24h 后,用不同浓度的非诺贝特(10, 50, 100 μ mol/L)及溶剂对照(0.1% DMSO)分别作用细胞 23h 后,继续再以脂多糖(10 μ g/L)刺激 1h。采用 TRIZOL 一步法提取细胞总 RNA。严格按照 RT-PCR 试剂盒操作,取 3 μ g 总 RNA 逆转录生成 20 μ L 产物,再各取 5 μ L 逆转录产物加入 20 μ L 的 PCR 体系中,分别扩增如下期待长度的产物:TNF- α (380bp),PPAR α (523bp)和内参照 GAPDH(195bp)。PCR 反应条件如下:95℃ 预变性(5min)后,94℃ 变性(30s),48℃ 退火(30s),72℃ 延伸(1min)共 35 次循环,继续 72℃ 延伸(5min)。取 PCR 产物 5 μ L 以 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, Kodak 凝胶成像分析系统扫描并记录电泳结果。

1.2.3 蛋白分析 心肌细胞培养 24h 后,用不同浓度的非诺贝特(50, 100 μ mol/L)预处理 18h 后施以脂多糖(10 μ g/L)刺激 6h, 0.1% DMSO 为阴性对照。

TNF- α 蛋白分析:细胞处理如上所述。吸取培养细胞上清液,离心(1 500×g, 5min, 4℃)。收集上清,酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测 TNF- α 水平。

PPAR α 蛋白分析:细胞处理如上所述。去掉培养细胞上清液,预冷 PBS 洗 2 遍。加入 100 μ L 预冷的细胞裂解液(含有 1mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1mol/L NaCl, 10% NP-40, 5% 脱氧胆酸钠, 1% 叠氮钠, 10% SDS, 0.5mol/L EDTA, 2mg/L 蛋白酶肽, 2mg/L 亮抑制肽, 1mg/L 胃蛋白酶抑制剂 A, 10mmol/L PMSF),刮下细胞收集于 Eppendorf 管中。离心(13 000×g, 20min, 4℃)。上清液分装,保存于 -70℃ 待测。每一加样孔上样量为 12 μ L,在由 10% 分离胶和 5% 积层胶组成的不连续 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。选用肌动蛋白作为内参照。湿转法过夜转膜后,封闭、加 1:500 的羊抗 PPAR α I 抗及 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的马抗羊 II 抗。Kodak 凝胶成像分析系统分析结果。检测后的膜再置于封闭液 10min 后行清除缓冲液孵育 30min, TBST 洗 2 遍(每遍 10min),于封闭液中封闭过夜,再重复上述步骤进行内参照肌动蛋白(I 抗浓度 1:1 000, II 抗浓度 1:2 000)结合。

1.2.4 统计分析 本实验每组数据为 3 次独立重复实验测定数值的平均值,全部数据以均数 \pm 标准差

表示,不同组间参数比较采用 one-way ANOVA 分析,每组之间的两两比较采用 Dunnett *t* 检验分析, $P < 0.05$,即认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 非诺贝特抑制脂多糖诱导的 TNF- α 表达 表 2 结果表明,心肌细胞 TNF- α 的 mRNA 表达如图 1 所示。与对照组相比,10, 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特组的 TNF- α mRNA 表达水平明显下降,分别下降了 39.39%, 57.25% 和 65.97% (均 $P < 0.01$),且呈一定的量效关系。

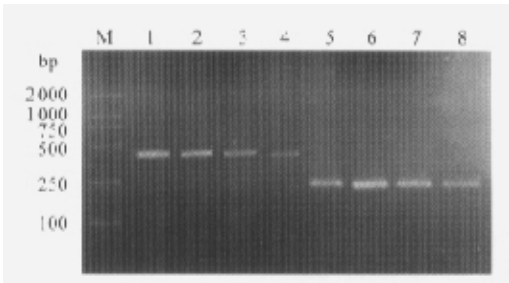


图 1 非诺贝特对心肌细胞 TNF- α mRNA 表达的影响
M:DL 2 000 DNA 标志物;1,2,3,4:TNF- α (380bp)。从左至右,非诺贝特作用浓度依次为 0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$;5,6,7,8:GAPDH(195bp)

正常心肌细胞几乎不表达 TNF- α ,但给予脂多糖刺激后发现其表达量可增加至 82.56ng/L,施加 50 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特预处理后 TNF- α 降至 46.52ng/L,下降了 43.65% ($P < 0.01$)。100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特组则降至 19.74ng/L,下降了 76.09% ($P < 0.01$,表 2)。

2.2 非诺贝特对 PPAR α 受体表达的影响 心肌细胞 PPAR α mRNA 表达如图 2 所示。与对照组相比,10, 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特组的 PPAR α mRNA 表达水平无明显改变(均 $P > 0.05$,表 2)。

心肌细胞 PPAR α 的 Western 印迹结果如图 3 所示,约 50ku。与对照组相比,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特组的 PPAR α 蛋白表达水平无明显改变(均

$P > 0.05$,表 2)。

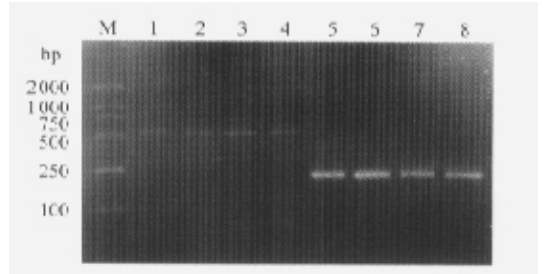


图 2 非诺贝特对心肌细胞 PPAR α mRNA 表达的影响
M:DL 2 000 DNA 标志物;1,2,3,4:PPAR α (523bp);5,6,7,8:GAPDH (195bp),从左至右,非诺贝特作用浓度依次为 0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$

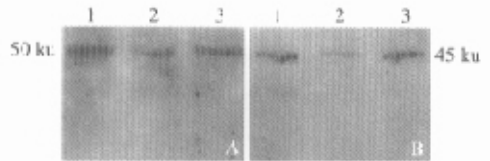


图 3 非诺贝特对 PPAR α 蛋白表达的影响
A:PPAR α (约 50ku);B:内参照肌动蛋白(约 45ku)。1,2,3:非诺贝特作用浓度依次为 0, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

文献报道,PPAR α 激活剂具有抗炎作用。Stael 等^[6]发现 PPAR α 激活剂能抑制颈动脉平滑肌细胞的炎症反应,体内实验显示,PPAR- α 敲除鼠的炎症反应时间延长。PPAR α 激活剂可抑制大量细胞因子诱导的基因表达,如人内皮细胞中的血管粘附分子-1 和人单核细胞中的组织因子^[7,8]等等。这些现象均提示,PPAR α 激活剂很可能通过调控炎症因子来发挥抗炎作用。临床研究也证实,PPAR α 激活剂的抗炎作用,采用非诺贝特治疗 1 个月可使 II b 型高脂血症患者血浆中的干扰素 γ 和 TNF- α 水平明显下降^[9],其他一些 PPAR α 激活剂

表 2 不同浓度非诺贝特对心肌细胞 TNF- α mRNA 和蛋白表达的影响

组 别	TNF- α		PPAR α	
	mRNA	蛋白表达量	mRNA	蛋白表达量
对照组(0.1% DMSO)	0.952 \pm 0.056	82.6 \pm 4.4	0.782 \pm 0.062	1.097 \pm 0.041
非诺贝特(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.577 \pm 0.052**	-	0.763 \pm 0.055	-
(50 $\mu\text{mol/L}$)	0.407 \pm 0.007**	46.5 \pm 4.5**	0.783 \pm 0.062	1.113 \pm 0.076
(100 $\mu\text{mol/L}$)	0.324 \pm 0.031**	19.7 \pm 2.0**	0.777 \pm 0.061	1.102 \pm 0.060

注:与对照组比较,** $P < 0.01$

也可降低动脉粥样硬化患者血浆中的细胞因子水平^[6]。但是,有关 PPAR α 激活剂在心肌细胞中抗炎作用及其临床意义的文献报道较少。本实验结果不仅显示非诺贝特可显著抑制炎症因子 TNF- α 的产生,与文献报道一致,而且对心肌细胞中 TNF- α 的影响可能具有重要的临床意义。

研究证实,慢性心力衰竭患者体内的 TNF- α 水平明显增高,且 TNF- α 对心肌细胞存在负性肌力作用^[3]。因此推断 TNF- α 在慢性心力衰竭的疾病进展中起着重要的作用。本实验是在正常新生大鼠心肌细胞原代培养的基础上,通过外源补充脂多糖诱导心肌细胞高表达 TNF- α ,以模拟慢性心力衰竭过程中 TNF- α 高表达的情形,以进一步探讨 PPAR α 激活剂对心力衰竭的可能的影响。研究结果提示,PPAR α 激活剂非诺贝特可抑制 TNF- α 的过度表达,如果在疾病早期应用非诺贝特,或许可以阻止其向慢性心力衰竭的发展。但是否在衰竭的心肌中具有同样的作用,尚需动物模型以及体内实验进一步研究。

由于 TNF- α 在正常心肌细胞中表达极微,因此作者利用脂多糖来诱导心肌细胞表达 TNF- α 。脂多糖是 TNF- α 的极有效的刺激因子,能使正常新生大鼠心肌细胞的 TNF- α 表达水平显著增加。在实验过程中,发现了一个很有趣的现象:如果同时给予脂多糖和非诺贝特或者给予脂多糖刺激后再施加药物作用,则非诺贝特并不能有效地抑制 TNF- α 的表达(资料未显示)。在其他类似的研究中也观察到此类现象^[10]。由于其他一些炎症因子如 IL-2, IL-6 等也参与慢性心力衰竭的病理过程,而且发现 PPAR α 激活剂可抑制这些因子的表达^[6,11],因此推测 PPAR α 激活剂也可能在心肌细胞中调控这些因子的表达。细胞因子间复杂的相互作用,以及 PPAR α 激活剂与多种细胞因子间的复杂作用均可能影响研究结果。

与此同时,为了探讨 PPAR α 激活剂对 PPAR α 表达的影响,本研究分别以 RT-PCR 和 Western 印迹检测了不同条件下的心肌细胞 PPAR α 的表达。结果表明,无论 mRNA 还是蛋白水平 PPAR α 都无明显改变。这说明非诺贝特可能是通过活化 PPAR α 而非改变 PPAR α 本身的含量而实现其调节作用。PPAR α 被活化后,作用于其下游的靶基因而进一步表现出相应的生理效应和生化改变。有文献报道,PPAR α 激活剂可能是通过 NF- κ B 途径来发挥抗炎作用的,也有文献提到激活蛋白(activator protein, AP)1 和信号转导及转录活化蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)途径^[12]。当然,PPAR α 活化后的作用机制绝非上述几

条途径,尚需大量的研究结果来进一步揭示其复杂的调控过程,这也是我们下一步的研究内容。

参考文献

- 1 Lazennec G, Canaple L, Saugy D, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol*, 2000,14:1962-1975.
- 2 Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*, 2001,169:453-459.
- 3 Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 1990,323:236-241.
- 4 de Vries JE, Vork MM, Roemen TH, et al. Saturated but not mono-unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in neonatal rat ventricular myocytes. *J Lipid Res*, 1997,38:1384-1394.
- 5 van der Lee KA, Vork MM, De Vries JE, et al. Long-chain fatty acid-induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. *J Lipid Res*, 2000,41:41-47.
- 6 Staels B, Koenig W, Habib A, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature*, 1998,393:790-793.
- 7 Marx N, Sukhova GK, Collins T, et al. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation*, 1999,99:3125-3131.
- 8 Neve BP, Corseaux D, Chinetti G, et al. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation*, 2001,103:207-212.
- 9 Madej A, Okopien B, Kowalski J, et al. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia II b. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1998,36(6):345-349.
- 10 Wagner DR, Combes A, McTiernan C, et al. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*, 1998,82:47-56.
- 11 Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem*, 1999,274:32048-32054.
- 12 Pineda Torra I, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Curr Opin Lipidol*, 1999, 10:151-159.

(收稿日期:2003-01-13)

(本文编辑:周宇红)