

组中随 FGF21 浓度增加而减弱。因此,笔者推测 FGF21 激活 FGFR4 的表达,而 FGFR4 上调抑制肿瘤作用可能间接影响 TGF- $\beta$  信号通路中的信号分子或受体的表达,如 TGF- $\beta$ 1 上调, TGF- $\beta$  R II 下调, Smad 2,3,4 上调, Smad 7 下调<sup>[9]</sup>。

综上所述, FGF21 可能通过促进 TGF- $\beta$  信号通路中的信号分子或受体的表达,或者通过下调此信号通路的阻断分子而抑制肿瘤发生。

## REFERENCES

- [1] ITOH N, ORNITZ D M. Evolution of the fgfr gene families [J]. Trends Genet, 2004, 20(11): 563-569.
- [2] BEACHY P A, KARHADKAR S S, BERMAN D M. Mending and malignancy [J]. Nature, 2004, 431(7007): 402.
- [3] FENG X H, DERYNCK R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005(21): 659-693

- [4] PARSONS R, MYEROFF L L, LIU B, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type III receptor gene in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 1995, 55(23): 5548-5550
- [5] MARKOWITZ S, WANG J, MYEROFF L, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability [J]. Science, 1995, 268(5215): 1336-1338.
- [6] DUPONT S, MAMIDI A, CORDENONSI M, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF-beta signaling, controls Smad4 monoubiquitination [J]. Cell, 2009, 136(1): 123-135.
- [7] HOOVER L L, KUBALAK S W. Holding their own: the noncanonical roles of Smad proteins [J]. Sci Signal, 2008, 1(46) : pe48.
- [8] KAWATE S, TAKENOSHITA S, OHWADA S, et al. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 1999, 14(1): 127-131.
- [9] JIANG S M, CAI L, ZHU T T, et al. Effect of FGF21 in TGF- $\beta$  signaling pathway of HepG2 cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(8): 675-678.

收稿日期: 2013-05-30

## 罗格列酮对兔心肌缺血再灌注损伤保护机制的研究

高夏青<sup>1</sup>, 薛凌<sup>2\*</sup> (1.辽宁医学院, 辽宁 锦州 121000; 2.辽宁医学院附属第三医院, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:** 目的 通过研究过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )激动剂对心肌缺血-再灌注损伤兔模型梗死面积及组织病理学改变的影响,探讨 PPAR- $\gamma$  介导心脏保护作用的可能机制。方法 新西兰白兔 40 只随机分为 5 组,包括:假手术组、模型组、罗格列酮低剂量组、罗格列酮高剂量组及罗格列酮高剂量+GW9622 组。假手术组只开胸穿线不结扎心脏,其余组兔冠状动脉左前降支结扎 30 min,再灌注 120 min。建立心肌缺血再灌注模型后 1 h 分别检测血清一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(T-SOD)浓度;ELISA 法检测血清炎症因子白介素-6(IL-6)浓度;术后取兔心脏,硝基四氮唑蓝(NBT)染色后评价心肌梗死面积;做 HE 染色切片及电镜片观察组织及超微结构改变。结果 与模型组和罗格列酮高剂量+GW9622 组相比,罗格列酮低剂量组、罗格列酮高剂量组血清 NO 含量降低,IL-6 浓度显著降低,血清 T-SOD 浓度显著升高( $P<0.01$ );心肌梗死面积明显下降,心肌病理结构改变较轻,心肌细胞超微结构损坏破坏程度也明显减轻。结论 罗格列酮通过提高血清 T-SOD 水平减轻氧化应激,抑制炎症因子 IL-6 的生成减轻炎症反应,起到减轻心肌损伤,降低心肌梗死面积的保护作用。

**关键词:** 罗格列酮; PPAR- $\gamma$ ; 心肌缺血再灌注损伤; 炎症反应; 氧化应激; 心肌梗死面积

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)03-0265-06

## Study on the Protective Mechanisms of Rosiglitazone on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury in Rabbits

GAO Xiaqing<sup>1</sup>, XUE Ling<sup>2\*</sup> (1.Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China; 2.The Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the mechanisms and protective effect of peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) agonist on myocardial ischemia reperfusion(I/R) injury rabbits by observation the size of myocardial infarction and the

基金项目: 辽宁省科技厅项目(2011225015)

作者简介: 高夏青,女,硕士生 Tel: 15940629153 E-mail: gaomiaqing@ymail.com \*通信作者: 薛凌,女,博士,教授,硕士 Tel: 13841690961 E-mail: xueling27@sohu.com

histopathological changes. **METHODS** Forty New Zealand white rabbits were randomly divided into five groups( $n=8$ ): sham group, model group, low dose of rosiglitazone group, high dose of rosiglitazone group and high dose of rosiglitazone+GW9622 group. Thoracotomy and threading of the coronary artery without ligation was performed in sham group, whereas the coronary artery was ligated for 30 min, under 120 min reperfusion in other groups. Plasma concentration of NO, T-SOD and serum inflammatory cytokines IL-6 were tested after 1 h of I/R. The heart were harvested after I/R for pathological and ultrastructure analysis, and the areas of myocardial infarction were assessed. **RESULTS** Compared with model group and high dose of rosiglitazone+GW9622 group, in low dose of rosiglitazone group and high dose of rosiglitazone group, the plasma concentration of NO and IL-6 decreased, T-SOD significantly increased; the size of myocardial infarct decreased, and myocardial pathological and ultrastructure changes significantly improved. **CONCLUSION** The results indicate that PPAR- $\gamma$  agonist of rosiglitazone can attenuate myocardial ischemia reperfusion injury, improve myocardial pathological and ultrastructure, reduce infarct size by mitigating oxidative stress and reducing the inflammatory response.

**KEY WORDS:** rosiglitazone; PPAR- $\gamma$ ; ischemia-reperfusion injury; inflammation; oxidative stress; myocardial infarction size

缺血性心脏病仍然是威胁人类健康的头号杀手。目前的干预措施是依靠经皮介入治疗、血栓溶解剂或抗凝剂迅速开通闭塞的冠状动脉。然而, 这些治疗都伴随着缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤的不利后果。这也成为一个公认的重要临床问题。潜在的与心脏代谢、炎症、氧化应激和细胞凋亡相关的治疗方向还未被实施, 因此临床亟需能够减轻心肌 I/R 损伤的治疗策略。过氧化物酶体增殖剂激活受体(peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR)是核受体超家族的成员, 有  $\alpha$ 、 $\beta/\delta$  和  $\gamma$  3 种亚型。PPAR- $\gamma$  是近年来关注最为广泛的亚型<sup>[1]</sup>。依赖配体调节, PPAR- $\gamma$  活化后在转录水平调控多种细胞增殖、侵袭、分化和凋亡。研究表明, 对一些促炎介质基因转录的抑制使 PPAR- $\gamma$  在各种炎症损伤进程及炎症诱导的细胞凋亡中起到重要作用<sup>[2]</sup>。噻唑烷二酮类降糖药罗格列酮是 PPAR- $\gamma$  激动剂, 在临床上被用来治疗 2 型糖尿病, 有研究表明罗格列酮对 I/R 组织(心、脑、肾等)具有保护作用。然而这类药物是否可以应用于心肌缺血或 PCI 术患者仍然备受争议, 一些临床试验及 Meta 分析结果表明, 长期使用罗格列酮会增加糖尿病患者心衰的风险<sup>[3]</sup>。本实验通过研究 PPAR- $\gamma$  激动剂对 I/R 损伤兔血清学指标、心肌梗塞面积及组织病理学改变的影响, 探讨 PPAR- $\gamma$  激动剂对抗 I/R 损伤的可能机制, 为该药物临床应用提供新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

健康清洁级新西兰白兔, (2.0 $\pm$ 0.25)kg, 由辽宁医学院医学实验动物中心提供。实验动物使用许可证号: SYXK(辽)2003-0019。在清洁级动物饲养室喂养。

### 1.2 药物与试剂

盐酸罗格列酮片(上海中西三维药业有限公司, 批号: H20041536, 规格: 40 mg $\cdot$ 片<sup>-1</sup>); GW9622(美国 Sigma Chemical 公司); NO 试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 批号: 20101104); SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20110306); IL-6 ELISA 试剂盒(批号: 20101027)、硝基四氮唑蓝(NBT)染色剂(北京博奥森生物技术有限公司); GW9622(PPAR- $\gamma$ 受体拮抗剂, 美国 Sigma 公司, 批号: 100326477)组织固定液、PBS 缓冲液自行配制。

### 1.3 仪器

721 可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); UV300 型紫外可见分光光度计; K15-C 型低温超速离心机(北京医用离心机厂); SHH.7121.600 型电热恒温三用水箱(北京永光明医疗仪器); OLYMPUS CH20 型光学显微镜、OLYMPUS C-35A 型显微镜照相(杭州图谱光电科技有限公司); 图象分析软件(北京大恒图像视觉有限公司); 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); HX-200 动物呼吸机(友诚生物科技有限公司)。

### 1.4 方法

**1.4.1 建立兔心肌 I/R 损伤模型** 健康新西兰白兔, 称重, 20%乌拉坦 1 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>麻醉, 背位固定, 胸部剪毛, 沿胸骨中线从胸锁关节平线至剑突上方切开皮肤。在胸骨左缘剪断 2, 3, 4 肋骨, 用开胸器撑开切口, 剪开心包, 暴露心脏。用持针器持小园弯针在冠状动脉左旋支根部下约 2 mm 穿 2/0-T 号线, 以备结扎。其中 I/R 组、罗格列酮低剂量组、罗格列酮高剂量组及 GW9622 组在手术当天结扎冠状动脉后, 以心电图 ST 段明显抬高或压低, 再灌注时局部组织充血, 出现 ST 段回落, 判断为结扎成功的标志。

**1.4.2 分组及给药** 40 只兔随机分成 5 组。①假手术组：只绕冠状动脉左旋支穿线，不结扎，术前普通颗粒饲料喂饲 3 d。②模型组：结扎 30 min，再灌注 60 min，术前普通颗粒饲料喂饲 3 d。③罗格列酮低剂量组：结扎 30 min，再灌注 120 min，予罗格列酮  $0.15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃 3 d。④罗格列酮高剂量组：结扎 30 min，再灌注 120 min，予罗格列酮  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃 3 d。⑤罗格列酮高剂量+GW9622 组：结扎 30 min，再灌注 120 min，予罗格列酮  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃 3 d，同时予 GW9622  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  腹腔注射 3 d。

**1.4.3 指标观察** 血清 NO、T-SOD 及 IL-6 浓度测定：抗凝的颈总动脉血以  $2\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心，10 min 后取上清液，测定时分别按照试剂盒说明书严格操作。

**心肌梗死面积测定**：实验结束后，每组随机取 4 只心脏，生理盐水冲洗残余血液，沿冠状沟剪去心房及各大血管，留取心室组织，滤纸吸干置于电子天平上称重，然后平行于冠状沟将心室肌切成 4~5 片，约 1 mm 厚，置于 0.05% 的 NBT 溶液中，37 °C 恒温水浴振荡染色 10~15 min，直至正常心肌染为暗紫色，梗死区心肌不着色为淡红色取出，洗去多余染料，心肌片按顺序排好，微距拍照，3 倍放大洗像，应用图象分析软件 Image Pro- Plus Version 4.5 计算左心室面积及梗死区面积，梗死范围以梗死区心肌面积占全心室面积的百分比表示。

**光镜标本制作**：将离体心脏用固定液冲洗，将左心室前壁心肌组织切成条状，放在固定液中

2 h，接着用  $0.09 \text{ mmol KH}_2\text{PO}_4$  漂洗 15 min，并在此溶液中保存。依次常规酒精逐级脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋，间断均匀切片，做 HE 染色，光镜下观察心肌病理结构改变。

**电镜标本制作**：实验结束后取左心室，将组织切为  $1\sim 2 \text{ mm}^3$  的组织块，标本用 2% 戊二醛和 1% 锇酸固定，丙酮脱水，环氧树脂包埋。先做半薄切片，光镜下定位，后做超薄切片，铀铅双染，透射电镜下观察心肌超微结构改变并拍照。

## 1.5 统计学方法

实验数据均用 SPSS17.0 统计软件分析，所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)，2 组间比较采用 q 检验， $P < 0.05$  差异有统计学意义， $P < 0.01$  差异有显著统计学意义。病理形态学资料采用对比描述分析。

## 2 结果

### 2.1 对兔心肌 I/R 损伤血清 NO、T-OD 及 IL-6 浓度的影响

与假手术组比较，其他组中 NO 和 IL-6 浓度显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组和罗格列酮高剂量+GW9622 组比较，罗格列酮低剂量组和罗格列酮高剂量组中 NO 浓度和 IL-6 浓度显著降低( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )，T-SOD 浓度显著升高( $P < 0.01$ )，结果见表 1。

### 2.2 对兔心肌梗死面积的影响

与模型组和罗格列酮高剂量+GW9622 组比较，罗格列酮低剂量组和罗格列酮高剂量组中的心肌梗死面积明显减小，具有统计学差异( $P < 0.05$ )，结果见表 1。

表 1 对血清 NO、T-SOD 及 IL-6 浓度和心肌梗死面积的影响( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effect on serum concentrations of NO, T-SOD and IL-6 and effect on myocardial infarct size( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	T-SOD/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	IL-6/ $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	梗死面积百分比/%
假手术组	32.51±5.25	442.58±25.43 <sup>2)4)</sup>	27.61±1.88	0
模型组	71.28±4.32 <sup>1)</sup>	390.54±33.86 <sup>1)</sup>	209.56±9.72 <sup>1)</sup>	30.58±4.12
罗格列酮低剂量组	62.84±5.05 <sup>1)3)5)</sup>	489.27±15.62 <sup>2)4)</sup>	124.58±5.07 <sup>1)2)4)</sup>	21.32±2.32 <sup>3)5)</sup>
罗格列酮高剂量组	59.32±6.34 <sup>1)3)5)</sup>	521.38±34.42 <sup>2)4)</sup>	113.41±4.98 <sup>1)2)4)</sup>	19.67±3.75 <sup>3)5)</sup>
罗格列酮高剂量+GW9622 组	73.62±3.15 <sup>1)</sup>	379.41±41.25	219.74±11.62 <sup>1)</sup>	33.24±4.79

注：与假手术组比较，<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ，<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ；与罗格列酮+GW9622 组比较，<sup>4)</sup> $P < 0.01$ ，<sup>5)</sup> $P < 0.05$

Note: Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.01$ , <sup>3)</sup> $P < 0.05$ ; compared with high dose of rosiglitazone + GW9622 group, <sup>4)</sup> $P < 0.01$ , <sup>5)</sup> $P < 0.05$

### 2.3 光镜病理结构观察

光镜下假手术组心肌纤维排列整齐，心肌间质无炎细胞浸润，模型组、罗格列酮高剂量+GW9622 组心肌纤维肿胀，紊乱。心肌间质出现大

量炎细胞浸润，甚至可见局灶性坏死区；罗格列酮低剂量组和罗格列酮高剂量组心肌细胞胞核大小均匀，心肌纤维轻度肿胀，偶见成纤维细胞及炎细胞浸润。结果见图 1。

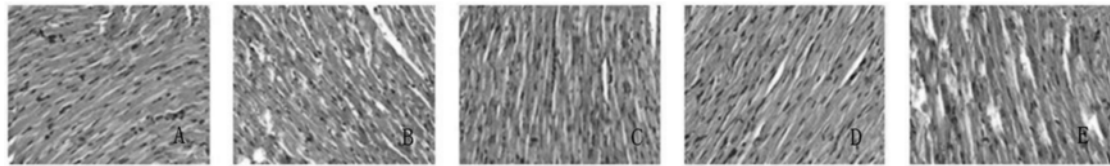


图1 心肌组织 HE 染色

A-假手术组; B-模型组; C-罗格列酮低剂量组; D-罗格列酮高剂量组; E-罗格列酮+GW9622 组

Fig 1 HE staining of myocardial tissue

A-sham group; B-model group; C-low dose of rosiglitazone group; D-high dose of rosiglitazone group; E-high dose of rosiglitazone+GW9622 group

## 2.4 电镜超微结构观察

与假手术组相比,模型组和罗格列酮高剂量+GW9622 组心肌纤维排列紊乱甚至灶性溶解, T管和肌浆网扩张,肌节周期性结构破坏,明暗带不清, Z 线模糊, M 线断裂,肌膜断裂、缺损,细胞间质中可见胶原纤维,部分胞质浓集,细胞核膜褶皱;胞核皱缩、不规则,出现染色质边集现象;线粒体损伤明显,部分线粒体嵴断裂,排

列紊乱部分消失,基质变淡呈空泡变形;闰盘局部扩张。罗格列酮低剂量组和罗格列酮高剂量组线粒体及其他超微结构与缺血再灌注组相比破坏较轻,心肌纤维排列较整齐,大部分细胞核完整、清晰,线粒体外膜基本完整;线粒体嵴排列较规则,部分线粒体嵴有断裂和碎片形成,心肌肌丝排列较为正常且整齐;Z 线及 M 线较清晰且基质致密,闰盘清晰。结果见图 2。

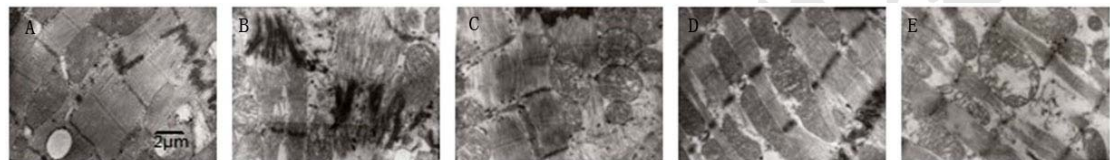


图2 心肌组织电镜片

A-假手术组; B-模型组; C-罗格列酮低剂量组; D-罗格列酮高剂量组; E-罗格列酮+GW9622 组

Fig 2 Electron microscopy pictures of myocardial

A-Sham group; B-model group; C-low dose of rosiglitazone group; D-high dose of rosiglitazone group; E-high dose of rosiglitazone+GW9622 group

## 3 讨论

本研究中,与假手术组相比,其余各组血清 NO 浓度均显著升高,罗格列酮低、高剂量组 NO 水平低于 I/R 组及罗格列酮+GW9622 组。说明罗格列酮抑制 I/R 过程中 NO 的生成,进而在 I/R 损伤中介导了心脏保护作用。

NO 从根本上参与了心肌 I/R 的病理生理过程<sup>[4]</sup>, NO 起保护作用还是损害作用取决于合成 NO 的酶。在这个过程中,诱导的 NO 合成酶(iNOs)产生的 NO 通过直接 DNA 损伤或影响细胞凋亡使炎症细胞浸润,进而介导了细胞损伤<sup>[5]</sup>。另一方面,内皮的 NO 合成酶(eNOs)活性降低,引起血管内皮功能障碍及持续血管痉挛,加重缺血损伤。相对于内皮性 NO 合成酶,诱导的 NO 合成酶在 I/R 过程中起到更为重要的作用,NO 大部分由它合成<sup>[6]</sup>。研究表明,PPAR- $\gamma$ 激动剂可以明显降低 iNOs 的表达,由此减少损伤性 NO 的生成。因此, I/R 损伤中产生大量损伤性 NO, PPAR- $\gamma$  激动剂罗格列酮可能通过抑制 iNOs 表达减少 NO 生成,介导了心

肌保护作用。在本研究中,罗格列酮+GW9622 组 NO 浓度略高于 I/R 组,但差异无统计学意义,可能是由于 I/R 组存在内源性 PPAR- $\gamma$  活化,而罗格列酮+GW9622 组中,PPAR- $\gamma$ GW9622 完全阻断了这一途径。

本研究中,假手术组、罗格列酮低、高剂量组 T-SOD(血清超氧化物歧化酶)水平均高于 I/R 组及罗格列酮+GW9622 组,罗格列酮低、高剂量组 T-SOD 水平高于假手术组。说明 I/R 损伤使 SOD 生成减少,而 PPAR- $\gamma$  激动剂使 SOD 水平升高,介导了心脏保护作用。

线粒体是细胞的能量站也是氧化损伤中易受攻击的目标,在 I/R 损伤中,氧化应激是线粒体损伤的主要原因<sup>[7-8]</sup>, SOD 能消除生物体在 I/R 过程中产生的活性氧类,维持氧化还原平衡状态及细胞能量供应,减轻活性氧类(ROS)和自由基造成的线粒体损伤和细胞损伤。有研究表明 PPAR- $\gamma$  是代谢相关基因、线粒体合成相关基因以及抗氧化防御基因转录调节的关键因子,但它对氧化还原活



性的具体调节机制仍不明了。I/R 损伤中, ROS 可以通过 PI3K/Akt、ERK1/2 途径使 PPAR- $\gamma$  基因活化, PPAR- $\gamma$  表达增加<sup>[9]</sup>。PPAR- $\gamma$  可能通过直接与抗氧化物基因上的 PPAR- $\gamma$  反应原件相结合, 调控抗氧化物如 SOD 等的基因表达。罗格列酮通过激活 PPAR- $\gamma$  介导了 SOD 生成的增加。

本研究中, 与假手术组相比, 其余各组血清 IL-6 浓度均显著升高, 罗格列酮低、高剂量组 IL-6 水平低于 I/R 组及罗格列酮+GW9622 组。说明罗格列酮能够抑制炎症因子的生成, 介导了心脏保护作用。

IL-6 是一种多基因多效应的炎症因子。研究表明, 在动物心肌 I/R 损伤中, IL-6 水平与心肌炎症反应程度有良好的相关性。

I/R 损伤过程中的炎症反应是错综复杂的。近年来国内外各个领域专家对 PPAR- $\gamma$  及炎症反应的研究逐渐增多, 涉及心、脑、肾及胃肠等广泛的器官、组织。然而 PPAR- $\gamma$  与炎症反应的机制仍不明了。

有研究表明, PPAR- $\gamma$  能够在转录水平上调控多种细胞的增殖、侵袭、分化和凋亡, 作用的分子基础是调控多种促炎介质的基因转录, 因此在各种炎症损伤中发挥了重要作用。一些研究结果显示, 在缺血-再灌注过程中, PPAR- $\gamma$  的活化可以激活 PI3K-Akt 信号通路<sup>[10-11]</sup>, 活化的 Akt 能直接磷酸化多种转录因子, 通过调控这些转录因子, 可以抑制凋亡基因的表达和增强抗凋亡基因的表达, 从而促进细胞的存活。I/R 损伤时, NF- $\kappa$ B 介导许多细胞因子和炎症因子的转录与翻译, 活化的 Akt 能从胞膜转移到细胞核内, 使 NF- $\kappa$ B 发生构象改变而活化, 诱导促生存基因的表达。也有研究表明, NF- $\kappa$ B 介导了缺血在灌注损伤中大量炎症因子的表达<sup>[12]</sup>, 而 PPAR- $\gamma$  可以通过多种作用机制抑制 NF- $\kappa$ B 的转录调控。

ERK1/2(细胞外信号调节激酶)信号转导通路和 JNK(c-jun 氨基末端激酶)信号转导通路同属于 MAPK 家族。研究表明在 I/R 过程中, ERK1/2 通路是促生存信号激酶通路, 它可以募集众多抗凋亡活化路径起到保护作用。PPAR- $\gamma$  活化可以使 ERK1/2 及其上游激活因子表达增加<sup>[13]</sup>。JNK 通路在调节细胞的应激反应基因转录和翻译过程中起重要作用, 磷酸化的 JNK 可以提高 I/R 过程中促炎因子、促凋亡因子的基因转录活性。实验表明

PPAR- $\gamma$  激动剂治疗可以显著降低 JNK 磷酸化水平, 减轻 I/R 过程中的炎症反应<sup>[14]</sup>。

本研究结果中, 罗格列酮低、高剂量组梗死面积明显低于 I/R 组及罗格列酮+GW9622 组。与 I/R 组及罗格列酮+GW9622 组相比, 罗格列酮低、高剂量组病理形态学改变及超微结构改变均减轻。说明罗格列酮可能通过抗氧化应激、抗炎等方面降低心梗面积, 减轻心肌损伤, 进而介导了 I/R 损伤中的心脏保护作用。

罗格列酮通过抑制损伤性 NO 的生成、促 SOD 产生、减轻氧化应激反应、减少炎症因子 IL-6 的生成, 从而降低了心梗面积, 减轻心肌纤维及线粒体损伤, 在 I/R 损伤中发挥了心脏保护作用。但涉及到信号水平的确切作用机制仍不明了, 需要更进一步去探究验证。

## REFERENCES

- [1] LIU J L, JIN J W, PEI S J, et al. Flurbiprofen axetil promotes neuroprotection by activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptor gamma after focal cerebral ischemia in rats [J]. Chin Med J(中华医学杂志), 2012, 125(20): 3719-3724.
- [2] LI Y, WU J, YAN C, et al. Correlation of PPAR- $\gamma$  and NF- $\kappa$ B expression with arsenic induced hepatic fibrosis in rats [J]. World J Gastroenterol(世界华人消化杂志), 2010, 18(36): 3848-3856.
- [3] ALEX M, XIAO Y Y, CHAO T, et al. Acute rosiglitazone treatment is cardioprotective against ischemia-reperfusion injury by modulating AMPK, Akt, and JNK signaling in nondiabetic mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(3): H895-H902.
- [4] ZHANG J D, DU H, LIU M C, et al. Influence of *Oxytropis Falcate* Bunge on NO and NOS of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(10): 1054-1058.
- [5] SCHNEIDER R, SAUVANT C, BETZ B, et al. Downregulation of organic anion transporters OAT1 and OAT3 correlates with impaired secretion of para-aminohippurate after ischemic acute renal failure in rats [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(5): F1599-F1605.
- [6] BORIS B, REINHARD S, TOBIAS K, et al. Rosiglitazone affects nitric oxide synthases and improves renal outcome in a rat model of severe ischemia/reperfusion injury [J]. PPAR Res, 2012: 219319. doi: 10.1155/2012/219319.
- [7] TAKIMOTO E, KASS D A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling [J]. Hypertension 2007, 49(2): 241-248.
- [8] ZHANG Y, TOCCHETTI C G, KRIEG T, et al. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(8): 1531-1540.
- [9] TEAYOUN K, QING L Y. Peroxisome-proliferator-activated receptors regulate redox signaling in the cardiovascular system [J]. World J Cardiol, 2013, 5(6): 164-174.
- [10] YASUDA S, KOBAYASHI H, IWASA M, et al. Antidiabetic drug pioglitazone protects the heart via activation of PPAR-receptors, PI3-kinase, Akt, and eNOS pathway in a rabbit

model of myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(5): H1558-H1565.

- [11] ZHANG X J, XIONG Z B, TANG A L, et al. Rosiglitazone-induced myocardial protection against ischaemia-reperfusion injury is mediated via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(2): 156-161.
- [12] ATREYA I, ATREVA R, NEURATH M F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease [J]. J Intern Med, 2008, 263(6):

591-596.

- [13] WANG H, ZHU Q W, YE P, et al. Pioglitazone attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via up-regulation of ERK and COX-2 [J]. BioSci Trends, 2012, 6(6): 325-332.
- [14] YANG D, GUO S, ZHANG T, et al. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling [J]. FEBS Lett, 2009, 583(15): 2500-2506.

收稿日期: 2013-08-06

## 芦荟多糖通过线粒体途径诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡

李小华<sup>1</sup>, 董琳<sup>2</sup>, 侯小燕<sup>1</sup>, 庄英帜<sup>1\*</sup> (1. 南华大学附属第一医院肿瘤防治中心, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学肿瘤研究所, 湖南 衡阳 421001)

**摘要:** 目的 观察芦荟多糖(aloe polysaccharide, AP)对人肺腺癌 A549 细胞的诱导凋亡作用, 并初步探讨其作用机制。方法 AP 作用于 A549 细胞后, 用 MTS 法检测细胞生长情况, 采用 Hoechst 荧光染色和 DNA ladder 检测 A549 细胞的凋亡情况; 用 Western blot 法检测凋亡相关分子 caspase-9, caspase-8, caspase-3 和 Bcl-2 的表达情况; 应用比色法检测 caspase 活性。结果 ①AP 可呈时间和剂量依赖性抑制 A549 细胞生长( $P<0.01$ )。② $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 AP 可呈时间依赖性诱导 A549 细胞出现凋亡形态学改变: 核浓缩、核碎裂和 DNA 梯状条带; ③A549 细胞的 caspase-9, caspase-8 和 caspase-3 均在 AP 处理后 24 h 内被激活, 且 caspase-9 和 caspase-3 早于 caspase-8 活化( $P<0.05$ ), Bcl-2 蛋白呈时间依赖性下调。结论 AP 能够诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡, 其作用机制可能与 AP 激活线粒体凋亡途径有关。

**关键词:** 肺腺癌细胞; 芦荟多糖; 凋亡; 线粒体途径

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)03-0270-05

### Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells Induced by Aloe Polysaccharide Through the Mitochondrial Pathway

LI Xiaohua<sup>1</sup>, DONG Lin<sup>2</sup>, HOU Xiaoyan<sup>1</sup>, ZHUANG Yingzhi<sup>1\*</sup> (1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Institute of Oncology, University of South China, Hengyang 421001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the induction effect of aloe polysaccharide (AP) on lung adenocarcinoma cells line A549 and to explore corresponding mechanism. **METHODS** After treatment of AP on A549 cells, MTS method was used to measure the growth curve of the cells so as to observe the effect of the AP on the proliferation of A549 cells, and the apoptosis of A549 cells were detected by Hoechst staining and DNA ladder electrophoresis. The expression of caspase-9, caspase-8 and caspase-3 was examined by Western blot and the enzyme activity of these caspases was examined by using a colorimetric method. **RESULTS** AP could inhibit proliferative activity of A549 cells in a time-dependent and dose-dependent manner ( $P<0.01$ ). AP could promote DNA non-random cut morphological changes and chromatin condensation and nuclear fragmentation of apoptosis in a time-dependent manner in A549 cells ( $P<0.01$ ). The activation of caspase-9, caspase-8 and caspase-3 of A549 cells induced by AP was observed within 24 h, and the activation of caspase-9 and caspase-3 was earlier than that of caspase-8. Expression of Bcl-2 was down-regulated in a time-dependent manner. **CONCLUSION** AP can inhibit the growth and induce apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells, the mechanism is associated with activation of the mitochondrial apoptotic pathway.

**KEY WORDS:** lung adenocarcinoma cell; aloe polysaccharide; apoptosis; mitochondrial pathway

基金项目: 衡阳市科技局项目(2009ks39)

作者简介: 李小华, 女, 主管护师 Tel: (0734)82821510 E-mail: lixh2001@163.com \*通信作者: 庄英帜, 女, 教授, 硕士 Tel: (0734)8282761 E-mail: zhuangyz2010@163.com