

# siRNA 沉默 PPAR $\gamma$ 基因对大鼠心肌细胞缺血再灌注致胰岛素抵抗现象的影响\*

张 建<sup>1</sup>, 汤 全<sup>1</sup>, 梁贵友<sup>1 $\Delta$</sup> , 刘达兴<sup>1</sup>, 王 峰<sup>1</sup>, 吴 芹<sup>2</sup>, 姚 刚<sup>3</sup>, 张登沈<sup>1</sup>

1. 遵义医学院附属医院 胸心血管外科 (遵义 563003); 2. 遵义医学院 药理实验室 (遵义 563003);  
3. 遵义医学院附属医院 麻醉科 (遵义 563003)

**【摘要】** 目的 观察小干扰 RNA(siRNA)沉默过氧化物酶体增殖物激活受体基因(PPAR $\gamma$ )的表达对成年大鼠缺血再灌注损伤(IRI)心肌细胞胰岛素抵抗的影响。**方法** 培养成年大鼠心肌细胞,构建沉默大鼠心肌细胞 PPAR $\gamma$  基因特异 siRNA,以脂质体介导转染离体培养的大鼠心肌细胞。制备心肌细胞 IRI 模型。采用 RT-PCR 检测 PPAR $\gamma$  和葡萄糖转运蛋白 4(GLUT-4) mRNA 表达,Western blot 检测 PPAR $\gamma$  蛋白表达;同位素示踪法检测细胞葡萄糖(Glu)摄取率变化。**结果** IRI 模型组心肌细胞 PPAR $\gamma$  mRNA 及蛋白表达较空白组不同程度增加( $P$  均 $<0.05$ );siRNA-PPAR $\gamma$  组,PPAR $\gamma$  mRNA 及蛋白表达量较空载体组和 IRI 模型组明显下降( $P<0.01$ ),空载体组 PPAR $\gamma$  mRNA 及蛋白表达接近 IRI 模型组水平;GLUT-4 mRNA 表达量空白组各时间点无明显差别,IRI 模型组 0 min 表达量明显降低,之后随着再灌注时间增加逐渐恢复至空白组水平,空载体组 GLUT-4 mRNA 表达与 IRI 模型组无明显差别;沉默 PPAR $\gamma$  后,细胞 GLUT-4 mRNA 表达较 IRI 模型组和空载体组减低更明显( $P<0.05$ ),恢复较 IRI 模型组更慢。在胰岛素刺激下,与 IRI 模型组比较,siRNA-PPAR $\gamma$  组各时间点 Glu 摄取率均降低( $P<0.05$ ),0 min 下降 49.78%,15 min、1 h、2 h 分别降低 38.94%、18.61%、11.54%,6 h 开始恢复至 IRI 模型组水平。空载体组与模型组比较 Glu 摄取率无明显差异。**结论** 沉默 PPAR $\gamma$  的表达,可加重 IRI 心肌细胞胰岛素抵抗,其可能的机制是 PPAR $\gamma$  基因沉默导致的 GLUT-4 mRNA 表达下降或转位障碍。

**【关键词】** 成年大鼠心肌细胞 缺血再灌注 胰岛素抵抗 过氧化物酶体增殖物激活受体 转染

**Influence of siRNA-mediated PPAR $\gamma$  Gene Knockdown on Insulin Resistance Induced by Myocardial Ischemia-Reperfusion in Rats** ZHANG Jian<sup>1</sup>, TANG Quan<sup>1</sup>, LIANG Gui-you<sup>1 $\Delta$</sup> , LIU Da-xing<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>1</sup>, WU Qin<sup>2</sup>, YAO Gang<sup>3</sup>, ZHANG Deng-shen<sup>1</sup>. 1. Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Laboratory of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 3. Departmen of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

$\Delta$  Corresponding author, E-mail: guiyou515@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the influence of siRNA-mediated PPAR $\gamma$  gene knockdown on insulin resistance induced by myocardial ischemia-reperfusion in adult rats. **Method** The targeting PPAR $\gamma$  siRNA was synthesized. The myocardial cells of adult rats were isolated and cultured. They were divided into four groups: IRI group, siRNA-PPAR $\gamma$  group, empty group and blank control group. Two groups of rat cardiac cells were transfected with PPAR $\gamma$ -targeting siRNA (siRNA-PPAR $\gamma$  group), or empty small interfering RNA (NC group), respectively. Real-time quantitative PCR was performed to detect the mRNA levels of PPAR $\gamma$  and GLUT-4. PPAR $\gamma$  protein expression level was determined with Western blot test. The uptake rate of glucose was determined by the isotope tracer method. **Result** The PPAR $\gamma$  mRNA and protein expression of IRI group were significantly higher than those in blank control group ( $P<0.05$ ). The PPAR $\gamma$  mRNA and protein expression of siRNA-PPAR $\gamma$  group were significantly less than those in blank control and IRI group ( $P<0.01$ ). There was no significant difference in the PPAR $\gamma$  mRNA and protein expression between the blank group and IRI group. The mRNA expression of GLUT-4 in blank control was no significant difference at each time point. The mRNA expression of GLUT-4 in IRI group was significantly less at 0 min, but increased gradually over the following time point. Finally, The mRNA expression of GLUT-4 in IRI group restored the same level as blank control. There was no significant difference in

\* 国家自然科学基金项目(No. 30960382)、贵州省科技攻关项目(No. 2007-1032)和贵州省高层次人才科研特助项目(No. TZJF-2008-61)

$\Delta$  通讯作者, E-mail: guiyou515@163.com

the *GLUT-4* mRNA expression between the empty group and IRI group. The *GLUT-4* mRNA expression in siRNA-*PPAR* $\gamma$  group was significantly less than that in IRI group or NC group ( $P < 0.05$ ), and recovered more slowly than IRI group. After given insulin, The uptake rate of glucose in siRNA-*PPAR* $\gamma$  group was significantly less at each time point compared with those in IRI group ( $P < 0.05$ ), declined by 49.78%, 38.94%, 18.61%, 11.54% at 0 min, 15 min, 1 h, 2 h, respectively. At 6 h time point, the uptake rate of glucose in siRNA-*PPAR* $\gamma$  group reached the same level as IRI group. There was no significant difference was observed in the uptake rate of glucose between the empty group and IRI group. **Conclusion** The siRNA-mediated *PPAR* $\gamma$  gene knockdown may enhance the myocardial insulin resistance. The molecular mechanisms that trigger myocardial cell insulin resistance might because the silence of *PPAR* $\gamma$  expression decreasing the expression of *GLUT-4* and decline its transportation from cytoplasm to membrane.

**[Key words]** Adult rat cardiomyocytes Ischemia reperfusion Insulin resistance Peroxisome proliferator-activated receptor Transfected

过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferators activated receptor gamma, *PPAR* $\gamma$ ) 属于核内激素受体基因转录子, 主要参与葡萄糖、脂肪代谢及增强胰岛素敏感性。研究发现, *PPAR* $\gamma$  是减轻或阻止心肌缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 的一个新的基因治疗靶点, 我们前期的研究<sup>[1-5]</sup>表明, 体外循环 (cardiopulmonary bypass, CPB) 心肌 IRI 过程中存在心肌胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR), 其主要分子机制是心肌细胞葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, *GLUT-4*) 表达下降, 转位障碍, 心肌摄取和利用葡萄糖 (glucose, Glu) 的能力下降。使用人工合成的 *PPAR* $\gamma$  配体噻唑烷二酮是临床上防治缺血再灌注损伤值得选择的有效措施<sup>[4]</sup>。为探讨 *PPAR* $\gamma$  是否通过改善缺血再灌注心肌胰岛素抵抗, 减轻心肌 IRI, 并探讨触发心肌胰岛素抵抗的分子机制, 本研究通过提取培养成年大鼠心肌细胞, 建立 IRI 心肌细胞模型, 同位素示踪技术检测细胞 Glu 摄取率, 并利用小干扰 RNA (siRNA) 技术, 设计以 *PPAR* $\gamma$  基因为靶点的 siRNA, 观察其对成年大鼠心肌细胞 *PPAR* $\gamma$ 、*GLUT-4* mRNA 的表达及在缺血再灌注过程中 Glu 摄取率的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级健康雄性 SD 大鼠, 16~20 周龄, 体重 250~350 g, 由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, II 型胶原酶、乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸 (EGTA)、肉毒碱、肌酸、牛磺酸、牛血清白蛋白 (BSA)、HEPES 缓冲液、层粘连蛋白均购自美国 Sigma 公司, M199 培养基购自美国 Gibco 公司, 兔抗大鼠心肌肌动蛋白抗体、二抗、DAB 试剂盒、预染

的蛋白质 Marker、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司; 二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒、RIPA 细胞膜裂解液 (强)、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、脱脂奶粉、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自碧云天生物技术研究; 2-[1, 2-<sup>3</sup>H]-脱氧葡萄糖 (<sup>3</sup>H-DG) 中国同位素有限公司, 丙烯酰胺、Tween 20、过硫酸胺、甲叉双丙烯酰胺购自美国 Solarbio 公司, Real time PCR 试剂盒、*PPAR* $\gamma$  受体等引物设计及合成由大连宝生物工程合成提供, 其余试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 siRNA 合成

设计并体外合成靶向大鼠 *PPAR* $\gamma$  mRNA 的 siRNA、以及无关序列对照 (空载体对照), 合成、siRNA-荧光染料 (siRNA-Cy3) 均由广州锐博生物科技有限公司完成提供。 *PPAR* $\gamma$ -siRNA 序列正义链: 5'-CGAAGAACCAUCCGAUUGA dTdT-3', 反义链: 5'-dTdT GCUUCUUGGUAGGCUAAC U-3'。

### 1.3 成年大鼠心肌细胞提取、培养与鉴定

采用 Langendorff 装置, EGTA、II 型胶原酶灌注法分离提取成年大鼠心肌细胞, 心肌细胞以  $10^4$ /孔的密度平铺于层粘连蛋白预处理过的 6 孔板中, M199 培养基培养过夜备用。常规免疫组化 SP 法检测大鼠心肌细胞肌动蛋白的表达, 鉴定心肌细胞。采用台盼蓝染色法计数心肌细胞活性。因台盼蓝不能进入正常健康细胞完整的细胞膜而使活细胞拒染, 死亡的细胞细胞膜完整性丧失, 台盼蓝可通过已破坏的细胞膜进入细胞内而被染成蓝色, 从而鉴定心肌细胞活性。计数 200 个细胞, 活性心肌细胞比例 (%) = (200 - 蓝色细胞数) / 200  $\times$  100%。

### 1.4 IRI 模型的制备

参考文献<sup>[6]</sup>制备心肌细胞 IRI 模型。采用不含

葡萄糖的无菌 KH 液,调节 pH 至 6.8,然后在缺氧(1%O<sub>2</sub>)培养箱中平衡 1 h 即为缺氧液。取需要缺氧处理的心肌细胞,小心去除原培养基,加入模拟缺氧溶液(2 mL/孔)后,置入 37 °C 缺氧培养箱(94% N<sub>2</sub>,1%O<sub>2</sub>,5%CO<sub>2</sub>) 1 h。将缺氧 1 h 后心肌细胞自氮气缺氧培养箱中取出,小心去除缺氧液,每孔重加入 2 mL(37 °C)无血清、含生理浓度胰岛素的改良 M199 培养基,放回 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 正常培养箱至预定时间。

### 1.5 脂质体转染及实验分组

转染前 1 d 提取培养心肌细胞贴壁过夜,细胞密度为 10<sup>4</sup>/孔;Opti-MEM<sup>®</sup> I 润洗心肌细胞 1 次,每孔加入 1 500  $\mu$ L Opti-MEM<sup>®</sup> I 培养基和混合好的 500  $\mu$ L siRNA 转染混合物(siRNA:Lipo2000),轻轻摇匀,37 °C,5%CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h。吸去转染混合液后加入正常无血清 M199 培养基继续培养 48 h。

将实验分为 4 组:*PPAR $\gamma$*  siRNA 转染组(转染后按 1.4 制备 IRI),空载体转染组(转染无关序列,转染后按 1.4 制备 IRI),IRI 模型组(不转染,按 1.4 制备 IRI),空白对照组(不转染,不制备 IRI)。各组再灌注加入生理剂量胰岛素(0.01 IU/L)的 M199 培养基<sup>[6]</sup>继续培养,选取再灌注后 0 min、15 min、1 h、2 h、6 h 为观察时间点。相同实验分为两部分。第一部分收集细胞进行 mRNA 及蛋白表达情况的分析;第二部分进行同位素示踪法测定心肌细胞 IRI 后 Glu 摄取率和心肌细胞胰岛素抵抗的确认。

### 1.6 RT-PCR 检测 *PPAR $\gamma$* 、*GLUT-4* 基因的表达

取各时间点心肌细胞洗涤后,按照 Trizol 使用说明进行各组细胞总 RNA 的提取。将 1  $\mu$ g 总 RNA 用于 RT-PCR,操作参照说明书。用于实验的 PCR 引物序列:*PPAR $\gamma$*  上游引物 5'-GGAGCCTAAGTTTGAGTTTGCTGTG-3',下游引物 3'-TGCAGCAGGTTGTCTTGATG-5';*GLUT-4* 上游引物 5'-CTCCAAGTGGACCTGTAACCTTCATC-3',下游引物 3'-GCCTCTGGTTTCAGGCACTC-5'; $\beta$ -actin 上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTGCTCCTA-3',下游引物 3'-GACTCATCGTAC TCCTGCTTGCTG-5'。RT-PCR 反应依试剂盒说明操作两步法:预变性:与变性条件各基因基本相同,分别为 95 °C 3 min;95 °C 10 s,60 °C 45 s 40 个循环;熔解曲线分析 95 °C 1 min,55 °C 1 min,55 °C 10 s 80 个循环。PCR 扩增结束后,以内参基因  $\beta$ -actin 为参照,根据各样本扩增曲线 Ct 值计算  $\Delta$ Ct,

以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示各目的基因的相对表达量。

### 1.7 Western blot 检测 *PPAR $\gamma$* 蛋白的表达

心肌细胞经过不同条件处理后,胰酶消化心肌细胞,冰浴 RIPA(强)细胞浆裂解液(每 1 mL RIPA 裂解液加入 10  $\mu$ L PMSF),裂解细胞 30 min,提取各组细胞总蛋白。运用 BCA 法测定蛋白含量,按 BCA 试剂盒说明书,对样本蛋白进行定量。通过煮沸使蛋白变性,配置制备聚丙烯酰胺凝胶,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。通过电转仪器转至 NC 膜,将漂洗过的转印膜,放入含 5%脱脂奶粉的封闭液中,摇床摇动,4 °C 封闭 1.5 h。分别加入抗目标蛋白及  $\beta$ -actin 的单克隆抗体,4 °C 孵育过夜,TBS-T 洗膜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体避光 4 °C 孵育 2 h 后,TBS-T 漂洗后通过化学发光显色(ECL)检测法显影,凝胶成像系统拍照,并测定各显色条带的灰度值,以目的条带与  $\beta$ -actin 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。

### 1.8 同位素示踪法测定 Glu 摄取率

各组细胞加入生理剂量胰岛素后开始计时,在各观察时间点加入 1  $\mu$ Ci 的 <sup>3</sup>H-DG,复氧孵箱共同孵育 10 min。加入 4 °C 生理盐水 1 mL 中止细胞的 <sup>3</sup>H-DG 摄取,吸弃上清液;加入 2~3 mL 生理盐水轻微漂洗后,弃上清以洗涤细胞;重复洗涤心肌细胞后加入 500  $\mu$ L 0.5% Triton X100 细胞裂解液裂解细胞过夜。将裂解完全的细胞裂解液转移至 1.5 mL 的 Eppendoff 管,5 000  $\times g$  离心 5 min,取 100  $\mu$ L 加入加有 10 mL 闪烁液的闪烁瓶,用液体闪烁仪测定 [<sup>3</sup>H] 每分钟放射性计数率(cpm)(此步在第三军医大西南医院核医学科进行),根据以下公式计算心肌细胞 Glu 摄取率<sup>[7]</sup>:成年大鼠心肌细胞 <sup>3</sup>H-DG 摄取率(‰)=1 000 cpm/(0.17 $\times$ 2.22 $\times$ 10<sup>6</sup>)=2.65 cpm $\times$ 10<sup>-3</sup>,从而判断不同实验组心肌细胞对胰岛素的敏感性。

### 1.9 统计学方法

数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,组内各时间点均数的多重比较采用单因素方差分析的 LSD 检验,方差不齐时用 Games-Howell 方法校正;两组间比较采用两个独立样本的 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 培养大鼠心肌细胞形态学、免疫组化鉴定和活性观察

新分离存活的单个成年大鼠心室肌细胞多呈长

杆状或矩形,横纹清晰(图 1),部分两端有明显的阶梯状,棱角分明,长 70~170  $\mu\text{m}$ ,宽 20~40  $\mu\text{m}$ 。其中约有 5%~10%左右的心肌细胞发生自发性节律收缩,大部分心肌细胞则呈静息状态。无血清 M199 培养基 37  $^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  孵箱可培养 1 周左右,之



图 1 新分离未贴壁心肌细胞。×200

图 2 心肌细胞肌动蛋白的免疫组化染色。SP ×100

图 3 心肌细胞台盼蓝染色。×200

Fig 1 Freshly isolated myocardial cells. ×200

Fig 2 The myocardial cell actin immunohistochemical staining, SP ×100

Fig 3 Myocardial cells by trypan blue staining (As seen in this figure, round apoptotic and shrunken cells and debri were dyed blue, while viable myocardium cells remained colorless and translucent, with long rod shape). ×200

## 2.2 IRI 后各组心肌细胞 $\text{PPAR}\gamma$ 、 $\text{GLUT-4}$ mRNA 表达检测

RT-PCR 结果显示:与空白对照组比较,IRI 模型组、空载体对照组  $\text{PPAR}\gamma$  mRNA 表达在再灌注后 0 min~1 h 不同程度增高,差异均有统计学意义 ( $P$  均 $<0.05$ ),然后逐渐下降,再灌注后 6 h 基本降至正常(与空白对照组比较  $P>0.05$ ),而 siRNA- $\text{PPAR}\gamma$  组  $\text{PPAR}\gamma$  mRNA 表达在再灌注后各时点均低于其余各组 ( $P$  均 $<0.05$ ),见图 4;与空白对照

后开始凋亡。免疫组化染色结果显示(图 2),心肌细胞肌动蛋白表达阳性,提示成功分离培养心肌细胞。台盼蓝染色(图 3)结果显示,新分离的心肌细胞 76%~93%具有活性,贴壁后心肌细胞活性可进一步提高。

组比较,IRI 模型组、空载体组、siRNA- $\text{PPAR}\gamma$  组  $\text{GLUT-4}$  mRNA 表达水平再灌注后 0 min~2 h 不同程度降低,差异均有统计学意义 ( $P$  均 $<0.05$ ),但随再灌注后时间的增加逐渐恢复。siRNA- $\text{PPAR}\gamma$  组  $\text{GLUT-4}$  mRNA 表达水平在再灌注后各时点较 IRI 模型组、空载体组均低,差异均有统计学意义 ( $P$  均 $<0.05$ ),在再灌注后 0 min 时间段最明显 ( $P<0.01$ ),较 IRI 模型组降低 36.68%,之后有增高趋势,但增长缓慢,见图 5;空载体组与 IRI 模型组相

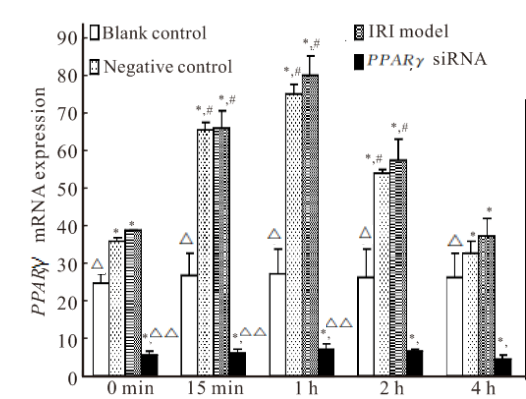


图 4 各组心肌细胞不同时间点  $\text{PPAR}\gamma$  mRNA 表达量

Fig 4 The mRNA expression of  $\text{PPAR}\gamma$  at each time point in each group of myocardial cells

$*$   $P<0.05$ , vs. blank control group in the same point;  $\Delta$   $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P<0.01$ , vs. IRI model group in the same point;  $\#$   $P<0.05$ , vs. 0 min in the same group

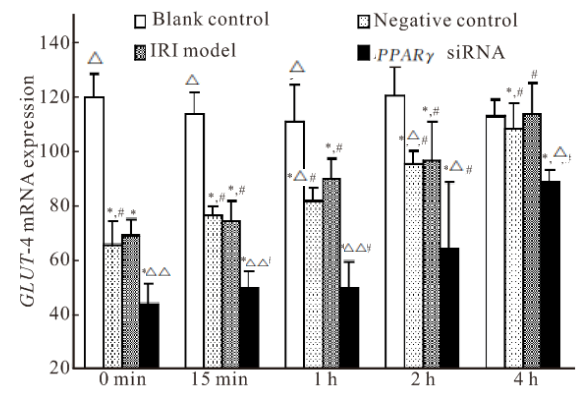


图 5 各组心肌细胞不同时间点  $\text{GLUT-4}$  mRNA 表达量的变化

Fig 5 The mRNA expression of  $\text{GLUT-4}$  at each time point in each group of myocardial cells

$*$   $P<0.05$ , vs. blank control group in the same point;  $\Delta$   $P<0.05$ ,  $\Delta\Delta$   $P<0.01$ , vs. IRI model group in the same point;  $\#$   $P<0.05$ , vs. 0 min in the same group

比,PPAR $\gamma$  mRNA、GLUT-4 mRNA 表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.3 IRI 后各组心肌细胞 PPAR $\gamma$  蛋白表达

Western bolt 结果显示,PPAR $\gamma$  蛋白相对分子质量为  $57.6\times10^3$ 。空白对照组成年大鼠心肌细胞 PPAR $\gamma$  蛋白质表达量各时间点无明显差异( $P>$

0.05);与空白对照组比较,IRI 模型组 PPAR $\gamma$  蛋白质表达量 0 min~6 h 均不同程度明显增高;空载体组 PPAR $\gamma$  蛋白质表达量各时间点与模型组接近;siRNA-PPAR $\gamma$  组 PPAR $\gamma$  蛋白质表达量相对模型组明显减少( $P<0.05$ ),但再灌注后各时间点差异不明显( $P>0.05$ ),见图 6。

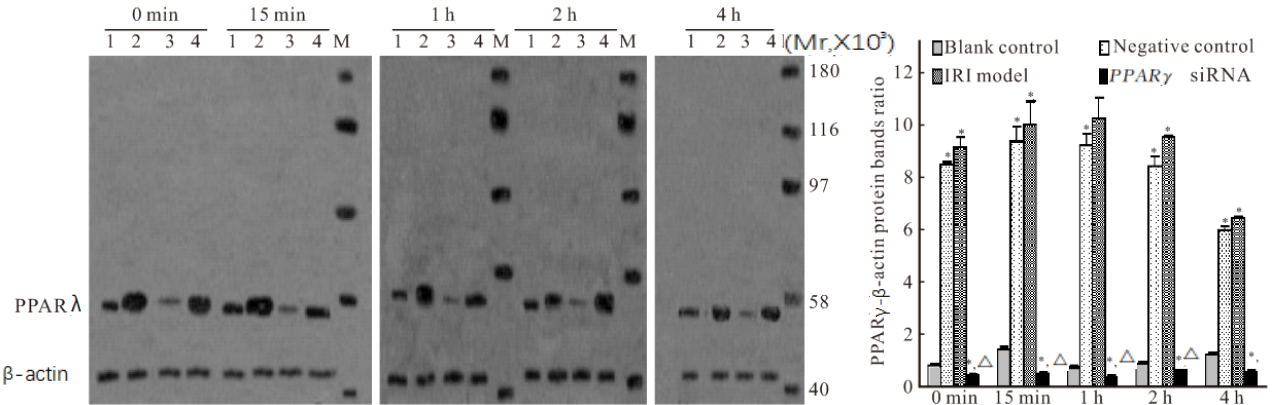


图 6 各组心肌细胞不同时间点 PPAR $\gamma$  蛋白表达

Fig 6 The protein expression of PPAR $\gamma$  in each group of myocardial cells

1: Blank control group; 2: IRI model group; 3: PPAR $\gamma$  siRNA group; 4: Empty group; M: Marker. \*  $P<0.05$ , vs. blank control group in the same point;  $\Delta P<0.05$ , vs. IRI model group and empty group in the same point

2.4 IRI 后各组心肌细胞 Glu 摄取率变化

见图 7。同位素示踪结果显示,生理浓度胰岛素刺激下空白对照组各时间点心肌细胞 Glu 摄取率无明显差异( $P>0.05$ );与空白对照组比较,IRI 模型组心肌细胞 Glu 摄取率 0 min 下降 49.33% ( $P<0.01$ ),15 min、1 h、2 h 分别下降 39.77%、23.87%、13.92% ( $P<0.05$ ),6 h 与空白对照组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),提示经过 IRI 心肌细胞出现了 Glu 的摄取和(或)转运障碍(抵抗),

即存在心肌细胞胰岛素抵抗。  
转染重组质粒后,与 IRI 模型组比较,siRNA-PPAR $\gamma$  组各时间点 Glu 摄取率均降低( $P<0.05$ ),0 min 下降 49.78%,15 min、1 h、2 h 分别降低 38.94%、18.61%、11.54% ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),6 h 开始恢复至 IRI 模型组水平( $P>0.05$ );与 IRI 模型组比较,空载体组下降较下降不明显( $P$  均  $>0.05$ ),见图 7。

3 讨论

胰岛素抵抗又被称为胰岛素不敏感,根据胰岛素刺激下的 Glu 摄取是评价组织和器官胰岛素敏感性公认指标<sup>[8-11]</sup>,本实验结果显示成年大鼠心肌细胞在 IRI 后糖的摄取量在再灌注 2 h 内明显较对照组降低,表明经过 IRI 心肌细胞出现了 Glu 的摄取和(或)转运障碍(抵抗),证实成年大鼠心肌细胞在缺血再灌注过程中存在胰岛素抵抗。

PPAR $\gamma$  是调节目标基因表达的核内受体转录因子超家族成员。活化的 PPAR 与 9-顺式视黄酸受体(RXR)形成异二聚体,然后与靶基因启动子上游的 PPAR 特异性反应元件(PPRE)结合,进而调节靶基因的转录,从而引起相关基因的转录或抑制<sup>[12]</sup>。目前已明确 PPAR $\gamma$  参与了糖代谢过程中某些关键蛋白或酶基因表达的调控,如促进 GLUT-4、

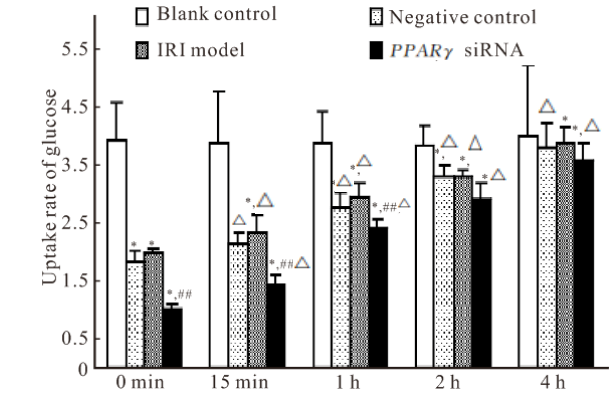


图 7 缺血再灌注后心肌细胞葡萄糖摄取率不同组各时间点变化  
Fig 7 Uptake rate of glucose of myocardial cells at each time point after IRI

\*  $P<0.05$ , vs. blank control group in the same point; #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , vs. IRI model group in the same point;  $\Delta P<0.05$ , vs. 0 min in the same group



磷脂酰肌醇-3 激酶(*PI3K*)基因表达<sup>[6,13]</sup>,能够改善糖代谢,增强胰岛素敏感性。本实验通过 siRNA 技术成功使成年大鼠心肌细胞 *PPAR $\gamma$*  基因的表达受到抑制,同位素示踪法<sup>3</sup>H-DG 摄取率检测结果显示,siRNA-*PPAR $\gamma$*  组<sup>3</sup>H-DG 摄取率显著低于模型组细胞,说明 *PPAR $\gamma$*  基因表达沉默后加重了成年大鼠心肌细胞在缺血再灌注过程中的胰岛素抵抗。

Glu 由细胞外进入细胞内必须有特殊的转运蛋白来携带,这些具有携带 Glu 功能的转运蛋白被称为葡萄糖转运蛋白(glucose transporters, GLUTs)。GLUT-4 是成年动物心肌 Glu 转运的主要蛋白,在心肌等各组织细胞 Glu 转运调节中起限速作用<sup>[14]</sup>。而在缺血再灌注期间,Glu 是心肌最重要的能量底物,增加心肌 Glu 的利用可改善缺血再灌注心脏收缩和舒张功能<sup>[15,16]</sup>。缺血细胞摄取 Glu 量的高低与 Glu 通过细胞膜转运率相关,GLUT-4 在转运中具有重要作用。Liao 等<sup>[17]</sup>认为 *PPAR $\gamma$*  能通过增加外周组织 GLUT-1 和 GLUT-4 的转录和蛋白合成,增加 GLUT-4 对胰岛素产生应答而易位于细胞表面,增加基础 Glu 的摄取和转运。

我们的前期实验<sup>[4]</sup>表明在心脏停搏液中加入 *PPAR $\gamma$*  的激动剂罗格列酮,可以提高 CPB 的 IRI 心肌细胞 *GLUT-4* mRNA 的表达,减轻心肌 IRI 及心肌胰岛素抵抗,改善心功能。本实验结果中:与空白对照组比较,IRI 模型组 *GLUT-4* mRNA 表达在再灌注 0 min 是降低的,在再灌注 15 min~6 h 表达逐渐增强,至 6 h 时段恢复正常水平;而 IRI 模型组 Glu 摄取率也随之升高并最终恢复空白对照组水平。证实了 *GLUT-4* mRNA 表达是 IRI 过程心肌 Glu 摄取的关键。*PPAR $\gamma$*  基因沉默后,与 IRI 模型组比较,*GLUT-4* mRNA 表达量在缺血再灌注 0 min 降低 36.68%,之后逐渐表达虽有增加但增加缓慢,继续再灌注 6 h 仍未恢复到 IRI 模型组水平。而本实验的 Glu 摄取率检测发现 *PPAR $\gamma$* -siRNA 组也出现了严重的 Glu 的摄取障碍,再灌注 6 h 时间点仍未恢复 IRI 模型组水平。提示,RNA 干扰沉默 *PPAR $\gamma$*  表达后,再灌注心肌细胞出现了 Glu 摄取率较模型组更进一步的减低,表明沉默 *PPAR $\gamma$*  后加重了再灌注心肌细胞胰岛素抵抗;沉默 *PPAR $\gamma$*  基因可以导致心肌胰岛素抵抗,从而加重心肌细胞 IRI,引起 Glu 摄取降低的原因可能是 *PPAR $\gamma$*  基因的表达沉默下调了 GLUT-4 的表达或

抑制了 GLUT-4 转位。

## 参 考 文 献

- 1 梁贵友,蔡庆勇,牛义民等. 葡萄糖转运蛋白 4 在犬体外循环心肌胰岛素抵抗发生中的作用. 中华实验外科杂志,2008;25(9):1105-1107.
- 2 蔡庆勇,梁贵友,牛义民等. 体外循环心肌胰岛素抵抗的实验研究. 遵义医学院学报,2006;29(4):348-350.
- 3 Liang GY, Cai QY, Niu YM, *et al.* Cardiac glucose uptake and suppressed expression/translocation of myocardium glucose transport-4 in dogs undergoing ischemia-reperfusion. *Exp Biol Med*,2008;233(9):1142-1148.
- 4 Liu B, Liang GY, Xu G, *et al.* Intervention of rosiglitazone on myocardium *Glut-4* mRNA during ischemia-reperfusion injury in cardio-pulmonary bypass in dogs. *Mol Cell Biochem*,2013;373(1-2):279-284.
- 5 Lang GY, Wu HS, Li J, *et al.* Role of insulin receptors in myocard ischaemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass. *Acta Cardiol*,2011;66(3):323-331.
- 6 Vander Heide RS, Rim D, Hohl CM, *et al.* An *in vitro* model of myocardial ischemia utilizing isolated adult rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol*,1990;22(2):165-181.
- 7 Chinetti G, Lestavel S, Fruchart JC, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  reduces cholesterol esterification in macrophages. *Circ Res*,2003;92(2):212-217.
- 8 Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, *et al.* Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol*,1979;236(6):E667-E677.
- 9 Ferrannini E, Mari A. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens*,1998;16(7):895-906.
- 10 Sinha S, Perdomo G, Brown NF, *et al.* Fatty acid-induced insulin resistance in L6 myotubes is prevented by inhibition of activation and nuclear localization of nuclear factor  $\kappa$ B. *J Biol Chem*,2004;279(40):41294-41301.
- 11 Kolter T, Uphues I, Eckel J. Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. *Am J Physiol*,1997;273(1 Pt 1):E59-E67.
- 12 Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*,1999;20(5):649-688.
- 13 石 锋,黄贵心. 核转录因子 *PPAR- $\gamma$*  与肥胖和 2 型糖尿病的关系. 医学综述,2005;11(1):32-34.
- 14 Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*,1999;341(1):248-257.
- 15 Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*,2007;115(25):3213-3223.
- 16 Luptak I, Yan J, Cui L, *et al.* Long-term effects of increased glucose entry on mouse hearts during normal aging and ischemic stress. *Circulation*,2007;116(8):901-909.
- 17 Liao W, Nguyen MT, Yoshizaki T, *et al.* Suppression of *PPAR- $\gamma$*  attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT-1 and GLUT-4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2007;293(1):E219-E227.

(2013-04-03 收稿,2013-07-17 修回)

编辑 沈 进