

郑媛, 付鹤玲, 侯道荣, 等. 解偶联蛋白 1 敲除加剧异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31 (9): 59–63.

Zheng Y, Fu HL, Hou DR, et al. Uncoupling protein 1 knockout aggravates isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 59–63.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 009

解偶联蛋白 1 敲除加剧异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构

郑媛, 付鹤玲, 侯道荣, 尹媛, 鲍丹*

(南京医科大学医药实验动物中心, 南京 210000)

【摘要】 目的 探究解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, *Ucp1*) 基因敲除对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构的长期影响。**方法** 分别对 2 月龄野生型大鼠和 *Ucp1* 基因敲除大鼠腹腔注射生理盐水或异丙肾上腺素 (30 mg/(kg · d), 连续 3 d) 建立大鼠心肌重构模型; 于注射后 1 个月, 分别对野生型大鼠和 *Ucp1* 基因敲除大鼠进行 M 型超声心动图、血清心肌损伤标志物乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和肌酸激酶同工酶 MB (creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB) 检测及病理组织学表型分析。**结果** 生理盐水组, *Ucp1* 基因敲除大鼠和野生型大鼠的心脏形态结构、功能和血清中 CK-MB 水平无明显差别。模型组, 与野生型大鼠相比, *Ucp1* 基因敲除大鼠心脏呈现显著的室壁变薄和心收缩功能减退的表型; 血清中 LDH 和 CK-MB 水平显著升高; 心肌细胞排列紊乱和间质纤维化程度更加严重。**结论** *Ucp1* 敲除加剧了异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌重构病理表型, *Ucp1* 可能是参与该病理进程的重要调控基因之一。

【关键词】 *Ucp1*; 心肌重构; 超声心动图

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0059-05

Uncoupling protein 1 knockout aggravates isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats

ZHENG Yuan, FU Heling, HOU Daorong, YIN Yuan, BAO Dan*
(Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China)

【Abstract】 Objective To explore the long-term effects of uncoupling protein 1 (*Ucp1*) knockout on isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats. **Methods** To establish the myocardial remodeling models, saline or isoproterenol was administered intraperitoneally at 30 mg/kg once per day for 3 consecutive days in wild-type (WT) and *Ucp1* knockout (*Ucp1*^{-/-}) rats at 2 months of age. The phenotype analysis of the WT and *Ucp1*^{-/-} rats was analyzed using M-mode echocardiography, the serum markers of myocardial injury lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), and histopathological examination at 1 month after the saline or isoproterenol administration. **Results** In the saline group, the echocardiographic parameters, serum marker of myocardial injury CK-MB, and fibrosis were comparable between the WT and *Ucp1*^{-/-} rats. In the model group, *Ucp1*^{-/-} rats had thin-walled ventricles and decreased cardiac

【基金项目】 江苏省自然科学基金 (青年基金项目) (BK20171046)。

【作者简介】 郑媛 (1983—), 女, 硕士。研究方向: 心血管动物模型的表型分析。Email: yuanzheng@njmu.edu.cn

【通信作者】 鲍丹 (1987—), 女, 博士。研究方向: 心血管相关动物模型的建立与相关调节基因功能分析及分子机制研究。
Email: jndwbaodan@njmu.edu.cn

function, and had higher serum LDH and CK-MB levels and more serious myocardial disarray and fibrosis in the heart tissue compared with WT rats. **Conclusions** *Ucp1* knockout aggravates isoproterenol-induced myocardial remodeling in rats. *Ucp1* may be an important modifier gene of myocardial remodeling.

【Keywords】 *Ucp1*; myocardial remodeling; echocardiography

解偶联蛋白(uncoupling proteins, UCPs)是阴离子载体蛋白超家族的成员之一,位于线粒体内膜,参与线粒体膜电位的调控^[1]。UCPs 的发现,提出了质子泄漏学说^[2],即在正常情况下线粒体内膜存在一定程度的质子泄漏,使线粒体内膜的跨膜质子梯度减低,以致刺激线粒体呼吸的质子驱动力降低,使线粒体呼吸链氧化磷酸化解偶联,导致 ATP 数量减少,能量以热能的形式释放。研究发现,UCPs 可减少线粒体氧化磷酸化过程中 ROS 的产生^[3]。

UCP1,又称产热素,是第一个被发现的 UCPs,主要在哺乳动物棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)中表达^[4]。UCP1 和(或)BAT 被激活后,棕色脂肪细胞会消耗葡萄糖和脂质,将能量从葡萄糖和游离脂肪酸氧化转换成热量^[5]。这种独特的代谢产热方式,使 UCP1 和 BAT 成为肥胖和 2 型糖尿病治疗的研究热点^[6]。

本实验室的前期研究发现,UCP1 在大鼠心脏组织中表达,并在异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的心肌重构模型^[7]大鼠心脏组织中表达显著升高;*Ucp1* 基因敲除导致心室壁和心收缩功能在 ISO 诱导的心肌重构急性期显著增加,但 *Ucp1* 基因敲除对心肌重构的长期影响仍未知。因此,本文旨在通过已建立的 *Ucp1* 基因敲除大鼠(*Ucp1*^{-/-})分析 *Ucp1* 基因敲除后对 ISO 诱导的心肌重构的长期影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用 *Ucp1*^{-/-} 大鼠由中国医学科学院医学实验动物研究所制作,同时敲除大鼠培育过程中使用的 SD 大鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2019-0011],大鼠饲养于南京医科大学医药实验动物中心屏障设施的饲养间[SYXK(苏)2020-0022],饲养间温度(23±2)℃,12 h/12 h 明/暗灯照,动物自由饮水和摄食。实验中所使用的实验动物为野生型(雌雄各 6 只)和 *Ucp1*^{-/-}(雌雄各 6 只)清洁级 SD 大鼠,8 周龄,体重约 250 g。实验中涉及动物操作程序均遵循 3R 原

则并已取得南京医科大学实验动物福利伦理审查委员会的批准(IACUC-1704011)。

1.2 主要试剂与仪器

ISO(I6504)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)生化检测试剂(990-63193)购自日本和光纯药工业株式会社;肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)生化检测试剂(H007 T)购自中国美康生物科技股份有限公司;小动物超声(Vevo 2100)购自加拿大 VisualSonics 公司;全自动血生化分析仪(7100)购自日本日立公司。

1.3 实验方法

1.3.1 ISO 诱导心肌重构大鼠模型

选用 2 月龄野生型(wild type, WT)大鼠和 *Ucp1*^{-/-} 大鼠腹腔注射生理盐水或 ISO(30 mg/(kg·d),连续 3 d)建立大鼠心肌重构模型。大鼠随机分成 4 组:WT 生理盐水组、*Ucp1*^{-/-} 生理盐水组、WT-ISO 组和 *Ucp1*^{-/-}-ISO 组(*n*=6)。

1.3.2 M 型超声心动图检测大鼠心脏的形态结构和功能

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行 M 型超声心动图检测。大鼠经 1.5%异氟烷气体麻醉,脱胸前区被毛,仰卧固定于加热板上,以保持体温,四肢固定,选用 MS250 的探头,进行心脏超声影像分析^[8]。

1.3.3 大鼠血清中 CK-MB 和 LDH 水平的检测

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,大鼠经 4%异氟烷气体麻醉,打开腹腔,钝性分离暴露腹主动脉,从腹主动脉分别采集 4 组大鼠 3 mL 外周血,室温放置 1 h 后,3000 r/min,4℃ 离心 10 min,获取血清。利用全自动血生化分析仪测定 LDH 和 CK-MB 水平。

1.3.4 病理组织学观察大鼠的心肌细胞形态和间质纤维化

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,二氧化碳法处死大鼠,打开胸腔取出心脏,将心脏组织固定在中性福尔马林 24 h 后进行修块、脱水、包埋、切片、苏木素-伊红(haematoxylin-eosin, HE)染色和 Masson 染色,镜下观察。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据运用 SPSS 16.0 统计学软件处理分析。如果数据符合正态分布,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较,若组间差异有统计学意义,进一步采用 Tukey's post-hoc 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 Ucp1 基因敲除加剧了 ISO 诱导的急性心肌缺血模型大鼠左心室的不利重构

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行 M 型超声心动图检测。结果显示,生理盐水组,与 WT 大鼠相比, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室收缩末期后壁厚度显著减小了 11.63% ($P<0.01$,图 1A),左心室内径呈增大且心收缩功能下降的趋势。ISO 组 WT 大鼠左心室收缩末期前壁厚度显著增加了 37.07% ($P<0.001$),说明 WT 大鼠仍处于 ISO 诱导的室壁肥厚代偿期;而 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室收缩末期前壁厚度未显著增加,且与 WT 大鼠相比, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室收缩末期前壁厚度显著减小了 14.10% ($P<0.05$,图 1B),说明 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠已由代偿期向失

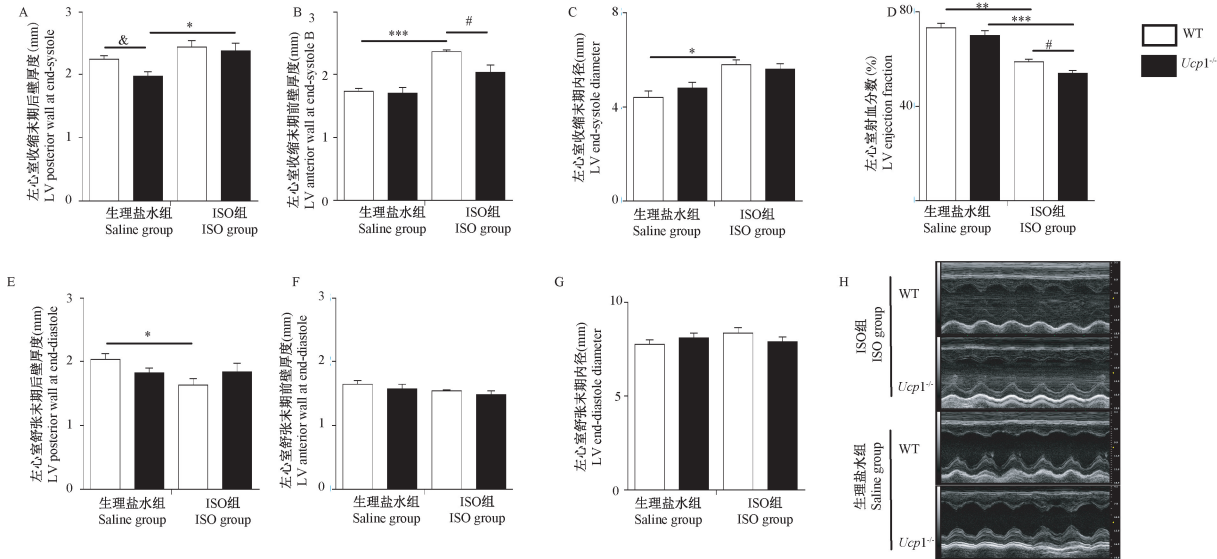
代偿期转换。再者,ISO 的诱导导致 WT 大鼠和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠左心室射血分数均显著降低($P<0.01$, $P<0.001$),且 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠的左心室射血分数显著低于 WT 大鼠($P<0.05$),说明 $Ucp1$ 基因敲除显著加剧了 ISO 诱导的心收缩功能减退(图 1C~H)。

2.2 Ucp1 基因敲除升高了 ISO 诱导的急性心肌缺血模型大鼠血清中心肌损伤标志物水平

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行血清 LDH 和 CK-MB 水平的检测。结果显示,生理盐水组,与 WT 大鼠相比, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 LDH 水平显著升高($P<0.05$,图 2A)。ISO 组与生理盐水组相比,WT 和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 LDH 水平均显著升高($P<0.05$,图 2A); $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 CK-MB 水平显著升高($P<0.01$,图 2B)。此外,ISO 注射后 1 个月, $Ucp1^{-/-}$ 大鼠血清 LDH 和 CK-MB 水平均显著高于 WT 大鼠($P<0.01$, $P<0.05$,图 2B)。

2.3 Ucp1 基因敲除加剧了 ISO 诱导的急性心肌缺血模型大鼠的病理组织学表型

于生理盐水或 ISO 注射后 1 个月,分别对 4 组大鼠进行心脏病理组织学表型分析。结果显示,生理盐水组,WT 大鼠和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠心肌细胞排列和间质纤维化程度无显著差别。ISO 组与 WT 大鼠相



注:A:左心室收缩末期后壁厚度;B:左心室收缩末期前壁厚度;C:左心室收缩末期内径;D:左心室射血分数;E:左心室舒张末期后壁厚度;F:左心室舒张末期前壁厚度;G:左心室舒张末期内径;H:M型超声心动图图片。与WT大鼠相比,& $P<0.05$;与同一品系生理盐水组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与WT大鼠ISO组相比,# $P<0.05$ 。

图1 ISO 诱导后 1 个月 WT 和 $Ucp1^{-/-}$ 大鼠心脏 M 型超声心动图分析

Note. A, Echocardiographic parameters of left ventricular (LV) posterior wall at end-systole. B, LV anterior wall at end-systole. C, LV end-systole diameter. D, LV ejection fraction. E, LV posterior wall at end-diastole. F, LV anterior wall at end-diastole. G, LV end-diastole diameter. H, Image of M-type echocardiography. Compared with WT rats, & $P<0.05$. Compared with saline treatment of the same strain, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with ISO treatment in WT rats, # $P<0.05$.

Figure 1 M-mode echocardiography analysis of WT and $Ucp1^{-/-}$ rats at 1 month after ISO administration

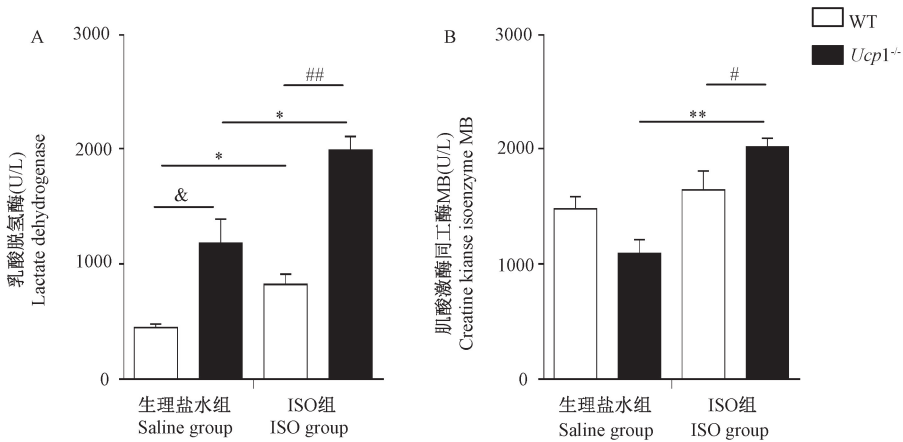
比, *Ucp1*^{-/-}大鼠心肌细胞排列紊乱(图 3A、B)和间质纤维化(图 3C)程度更加严重。

3 讨论

在对 ISO 诱导的大鼠心肌重构模型的长期观察过程中, 本研究发现, *Ucp1* 基因敲除显著加剧了 ISO 诱导的大鼠心脏的病理进程发展。具体表现为: ISO 诱导后 1 个月, 与 WT 大鼠相比, *Ucp1*^{-/-}大鼠左心室室壁厚度显著变薄、射血分数显著降低; 血清中心

肌损伤标志物 LDH 和 CK-MB 水平显著增高; 心肌细胞排列紊乱和间质纤维化程度更加严重。

UCP1 主要在哺乳动物 BAT 中表达。心肌细胞损伤发生后, 交感神经激活, 去甲肾上腺素释放^[9], 合并利尿肽释放^[10], 这些分子均是 BAT 生长和激活的重要影响因子。ISO 是 β 肾上腺素能受体的一种非选择性的激动剂, 被广泛地运用于心肌肥厚和心力衰竭的动物模型的构建^[11]。ISO 诱导的动物模型心脏组织的病理学和形态改变被认为是最接

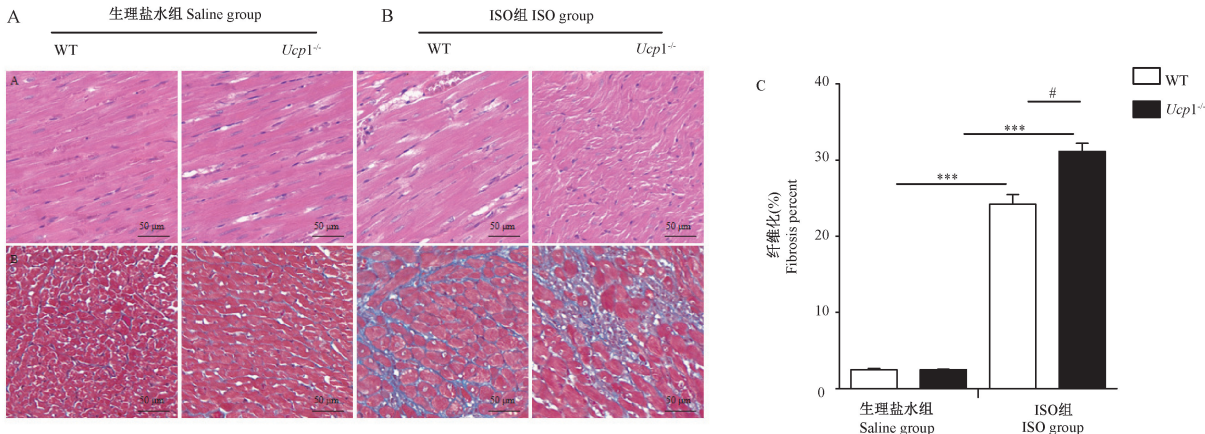


注: A: 血清乳酸脱氢酶; B: 肌酸激酶同工酶 MB。与 WT 大鼠相比, & *P* < 0.05; 与同一品系生理盐水组相比, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与 WT 大鼠 ISO 组相比, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01。

图 2 ISO 诱导后 1 个月 WT 和 *Ucp1*^{-/-}大鼠血清中心肌损伤标志物水平检测

Note. A, Serum marker of myocardial injury of lactate dehydrogenase (LDH). B, Creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB). Compared with WT rats, & *P* < 0.05. Compared with saline treatment of the same strain, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01. Compared with ISO treatment in WT rats, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01.

Figure 2 Serum marker of myocardial injury analysis of WT and *Ucp1*^{-/-} rats after ISO administration 1 month



注: A: 左心室 HE 染色观察; B: 左心室 Masson 染色观察; C: ImageJ 软件定量纤维化的相对水平。与同一品系生理盐水组相比, *** *P* < 0.001; 与 WT 大鼠 ISO 组相比, # *P* < 0.05。

图 3 ISO 诱导后 1 个月 WT 和 *Ucp1*^{-/-}大鼠病理组织学表型分析

Note. A, Magnification of HE-stained sections. B, Masson trichrome-stained sections of left ventricle. C, Quantitative analysis of the level of fibrosis using ImageJ software. Compared with WT rats, & *P* < 0.05. Compared with saline treatment of the same strain, *** *P* < 0.001. Compared with ISO treatment in WT rats, # *P* < 0.05.

Figure 3 Histopathological phenotyping analysis of WT and *Ucp1*^{-/-} rats after ISO administration 1 month

近临床上心脏病人的体征的。因此,本研究选用 ISO 构建大鼠心肌重构模型以及前期建立的 *Ucp1*^{-/-} 大鼠来明确 *Ucp1* 基因敲除对缺血性心脏疾病的长期影响是具有理论支撑和科学可行性的。

本研究发现,*Ucp1* 基因敲除后,生理盐水组,与 WT 大鼠相比,*Ucp1*^{-/-} 大鼠血清 LDH 水平显著升高,说明 *Ucp1* 基因敲除在生理状况下可能对心肌就存在一定的损伤刺激;此外,*Ucp1* 基因敲除后,ISO 诱导的大鼠心肌重构长期病理表型亦显著加剧,上述表型改变可能跟 *Ucp1* 基因敲除后 BAT 功能障碍相关。已有研究证实 BAT 的生物学功能受 *Ucp1* 的调控^[12],*Ucp1*^{-/-} 小鼠 BAT 激活能力受损^[13]。此外,现有研究发现,BAT 及其相关组织还具有调节多种心血管风险因子的功能。血管周周和心外膜脂肪组织(类似 BAT^[14])参与动脉粥样硬化和血压的调节^[15]。体外稳转 *Ucp1* 的 H9C2 细胞可抵抗缺氧/再氧化的损伤,提高心肌细胞的存活率,保留线粒体正常的结构和功能,减少缺氧后 ROS 的产生^[16];转基因过表达 *Ucp1* 的小鼠也可抵抗缺血/再灌注的损伤,显著改善再灌注阶段心功能的恢复^[17]。现有研究结果和本研究结果从正反两方面共同验证了 UCP1 的心脏保护性作用,但其潜在的分子机制仍需大量的后续研究证实。

综上所述,*Ucp1* 基因敲除会加剧 ISO 诱导的心肌重构的长期病理表型,增加 UCP1 的表达对缺血性心脏病具有保护作用,这为临床上防治药物的研发提供了理论和实验依据。

参考文献:

- [1] Laskowski KR, Russell RR. Uncoupling proteins in heart failure [J]. Curr Heart Fail Rep, 2008, 5(2): 75-79.
- [2] Divakaruni AS, Brand MD. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak [J]. Physiology (Bethesda), 2011, 26(3): 192-205.
- [3] Akhmedov AT, Rybin V, Marin-Garcia J. Mitochondrial oxidative metabolism and uncoupling proteins in the failing heart [J]. Heart Fail Rev, 2015, 20(2): 227-249.
- [4] Porter C. Quantification of UCP1 function in human brown adipose tissue [J]. Adipocyte, 2017, 6(2): 167-174.
- [5] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance [J]. Physiol Rev, 2004, 84(1): 277

- 359.
- [6] Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond [J]. Cell Metab, 2019, 29(1): 27-37.
- [7] Li Y, Feng J, Mo Y, et al. Concordance between cardio-protective effect on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia and phenolic content of different extracts of Curcuma aromatica [J]. Pharm Biol, 2016, 54(12): 3226-3231.
- [8] Guan F, Yang X, Li J, et al. New molecular mechanism underlying myc-mediated cytochrome P450 2E1 upregulation in apoptosis and energy metabolism in the myocardium [J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(1): e009871.
- [9] Manfrini O, Morgagni G, Pizzi C, et al. Changes in autonomic nervous system activity: spontaneous versus balloon-induced myocardial ischaemia [J]. Eur Heart J, 2004, 25(17): 1502-1508.
- [10] Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, et al. Acute changes in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia [J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(10): 1988-1995.
- [11] Zuo Z, Ji MY, Zhao K, et al. CD47 deficiency attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling in mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 7121763.
- [12] Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat [J]. Physiol Rev, 1984, 64(1): 1-64.
- [13] Meyer CW, Willershauser M, Jastroch M, et al. Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010, 299(5): R1396-R1406.
- [14] Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations [J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(2): e000582.
- [15] Chang L, Milton H, Eitzman DT, et al. Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension [J]. Circ J, 2013, 77(1): 11-18.
- [16] Bienengraeber M, Ozcan C, Terzic A. Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(7): 861-865.
- [17] Hoerter J, Gonzalez-Barroso MD, Couplan E, et al. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage [J]. Circulation, 2004, 110(5): 528-533.

[收稿日期] 2020-11-16