

[文章编号] 1007-3949(2010)18-08-0633-03

• 实验研究 •

## 罗格列酮减轻大鼠自体颈静脉移植后内膜增生

韩 露<sup>1</sup>, 修宗谊<sup>2</sup>, 张继倬<sup>1</sup>

(1 北京世纪坛医院, 北京市 100038 2 中国医科大学第一临床医院心外科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 冠状动脉搭桥术; 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ ; 罗格列酮; 颈静脉

[摘要] 目的 观察过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂对大鼠移植静脉内膜增生的影响。方法 建立大鼠颈静脉移植血管模型, 16只大鼠被随机分为罗格列酮组和模型组, 每组 8只, 饲养 6周。罗格列酮组应用罗格列酮。6周后观察大鼠的体重变化、内膜增生程度, RT-PCR 检测移植静脉过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  mRNA 表达。结果 术后饲养 6周, 模型组大鼠体重 ( $521.6 \pm 22.3$  g) 较罗格列酮组 ( $457.3 \pm 25.3$  g) 明显增加, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。与正常静脉相比, 罗格列酮组 (内膜厚度  $25.99 \pm 3.31 \mu\text{m}$ ) 和模型组 (内膜厚度  $35.28 \pm 5.76 \mu\text{m}$ ) 的移植静脉出现了明显内膜增生, 但罗格列酮组内膜增生比模型组明显减轻 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 检测发现罗格列酮组移植静脉过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  mRNA 表达显著高于模型组 ( $1.12 \pm 0.28$  比  $0.68 \pm 0.20$ ,  $P < 0.05$ )。结论 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂罗格列酮对大鼠移植静脉内膜增生有减轻作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Rosiglitazone Alleviates Intimal Hyperplasia of Jugular Vein Graft after Autologous Transplantation in Rats

HAN Lu<sup>1</sup>, XU Zong-Yi<sup>2</sup>, and ZHANG Ji-Zhuo<sup>1</sup>

(1 Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038 2 The First Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Bypass Grafting Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  Rosiglitazone Jugular Vein

[ABSTRACT] **Aim** To observe the intimal hyperplasia of peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) agonist rosiglitazone on vein graft. **Methods** Jugular veins graft model of rats were established. 16 rats were divided into rosiglitazone group and model group randomly (8 in each group), rosiglitazone was used in rosiglitazone group. The weight of rats, hyperplasia endomembrane on light microscope, RT-PCR result of electrophoresis were observed after six weeks. **Results** The weight in model group ( $521.6 \pm 22.3$  g) was increased compared with in rosiglitazone group ( $457.3 \pm 25.3$  g,  $P < 0.05$ ). Hyperplasia endomembrane in rosiglitazone group was  $25.99 \pm 3.31 \mu\text{m}$  and  $35.28 \pm 5.76 \mu\text{m}$  in model group compared with normal vein. Expression of PPAR $\gamma$  mRNA in rosiglitazone group ( $1.12 \pm 0.28$ ) was increased compared with model group ( $0.68 \pm 0.20$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone alleviates intimal hyperplasia of vein graft after autologous transplantation in rats.

冠状动脉搭桥手术是治疗冠状动脉狭窄的有效方法。大隐静脉因自身的优点, 被广泛用作血管桥, 但是静脉血管桥术后管腔狭窄不可避免, 10年通畅率 50% ~ 70%。多年来采用了许多的预防措施, 但效果都不是很理想。过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 是由配体激活的核转录因子, 属于核受体超家族成员, 它与配体结合后被激活, 与 9顺视黄酸类受体形成异二聚体, 然后与靶基因启动子上游的过氧化体增殖物反应元件结合而发挥转录调控作用<sup>[1]</sup>。噻唑烷二酮类药 (thiazolidinedione, TZD) 为

PPAR $\gamma$  配体, 是胰岛素的增敏剂。既往研究证明罗格列酮具有抗炎、抗动脉硬化及抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移, 保护血管内皮细胞等作用<sup>[2]</sup>, 但是对自体移植静脉的血管内膜增生是否影响尚未见相关报道。本文通过罗格列酮对大鼠移植静脉的影响来研究 PPAR $\gamma$  激动剂是否对自体移植静脉血管内膜增生有减轻作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 主要材料

实验动物为成年雄性 Wistar 大鼠 (280 ~ 320 g), 由中国医科大学实验动物中心提供。PE9600型 PCR 扩增仪、ABI PRISM 7000 荧光定量扩增仪、电泳仪等由中国医科大学中心实验室提供。罗格列酮 (4 mg/片) 由葛兰素史克集团公司生产。RT-PCR

[收稿日期] 2010-06-11

[修回日期] 2010-07-25

[作者简介] 韩露, 硕士, 研究方向为冠心病和干细胞移植。修宗谊, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病、心肌保护、房颤机制及预防。张继倬, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病、干细胞移植。

试剂盒为 TaKaRa 产品。

## 1.2 构建大鼠颈静脉自体移植血管

选择质量 280~320 g 的雄性大鼠 52 只, 用于构建大鼠颈静脉自体移植血管。以 10% 水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔麻醉, 颈前正中切口, 游离出右侧颈外静脉及颈总动脉。在颈总动脉的两端, 用无创血管夹阻断血流后, 中间横断, 阻断颈外静脉两端, 横断远心端, 10-0 缝线采用间断外翻法 4~6 针与动脉近心端行端端吻合, 吻合后将静脉近心端 (静脉长度约 2 cm) 横断, 采用同样方法与动脉远心端吻合, 结扎静脉游离端, 开放动脉血管, 检查漏血及通畅情况, 缝合手术切口。

## 1.3 动物饲养及分组

手术后存活及右侧颈动脉可触及波动的大鼠共 16 只 (其余 36 只因手术模型制作失败弃用), 随机分为罗格列酮组和模型组, 每组 8 只, 饲养 6 周。模型组给予自来水和普通食料, 罗格列酮组给予自来水 + 罗格列酮 0.4 mg/kg 和普通食料; 另取 8 只正常大鼠按正常饲养以供正常静脉用。

## 1.4 光镜组织切片

分别取正常大鼠的正常静脉 (正常饲养大鼠颈静脉) 及罗格列酮组和模型组的移植静脉以 10% 福尔马林固定, 行组织切片、HE 染色, 以观察内膜组织情况, 同时测定移植静脉内膜厚度。

## 1.5 组织 RNA 的提取和鉴定

取罗格列酮组和模型组的自体移植静脉经 RNA-LOCKER 保存, TRIzol 法抽提总 RNA, 荧光定量扩增仪测 RNA 光密度值, 表明样品 RNA 纯度。按照逆转录试剂盒说明书逆转录反应。按次序分别加入 MgCl<sub>2</sub> 2 μL, 10 × RT Buffer 1 μL, RNase Free dH<sub>2</sub>O 3.75 μL, dNTP 混合物 (各 10 mmol/L) 1 μL, RNase 抑制剂 0.25 μL, AMV 逆转录酶 10.5 μL, Random 9 mers 0.5 μL, 实验样品 RNA 1 μL, 并按以下条件进行逆转录: 30℃ 10 min, 42℃ 40 min, 99℃ 5 min, 5℃ 5 min 延续。取 cDNA 按次序分别加入 5 ×

PCR Buffer 10 μL, 灭菌蒸馏水 27.75 μL, TaKaRa E × TaqIMHS 0.25 μL, PPAR $\gamma$  上下游引物各 0.5 μL,  $\beta$ -action 上下游引物各 0.5 μL 行 PCR 反应。PPAR $\gamma$  上游引物为 5'-TGC GTC CCC GCC TTA TTA TT-3', 下游引物为 5'-GTG GAA GCC TGA TGC TTT ATC C-3'; 内参  $\beta$ -action 上游引物为 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3', 下游引物为 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'。PCR 反应条件为 94℃ 2 min, 94℃ 15 s, 58℃ 1 min, 72℃ 30 s, 循环 40 次, 72℃ 延伸。琼脂糖凝胶上电泳观察 PCR 产物。将电泳后的胶片置于电子成像仪分析。采用 Bandscan5.0 软件计算 PPAR $\gamma$  mRNA 相对值。

## 1.6 统计学方法

应用 SPSS 软件进行数据处理。组间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体重变化

术前罗格列酮组 ( $299.2 \pm 12.7$  g) 与模型组 ( $300.1 \pm 10.5$  g) 大鼠体重差异无显著性。术后饲养 6 周, 罗格列酮组大鼠体重增长 ( $457.3 \pm 25.3$  g) 不及模型组 ( $521.6 \pm 22.3$  g) 明显, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 内膜增生程度

与正常静脉相比, 罗格列酮组 (内膜厚度  $25.99 \pm 3.31$  μm) 和模型组 (内膜厚度  $35.28 \pm 5.76$  μm) 移植静脉出现了明显内膜增生 ( $P < 0.05$ ), 而且罗格列酮组内膜增生较模型组明显减轻 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 组织切片光镜下观察

正常大鼠颈静脉血管未见内膜增生, 罗格列酮组和模型组大鼠移植颈静脉均出现内膜增生, 但罗格列酮组仅出现轻度内膜增生, 而模型组颈静脉则内膜增生严重 (图 1)。

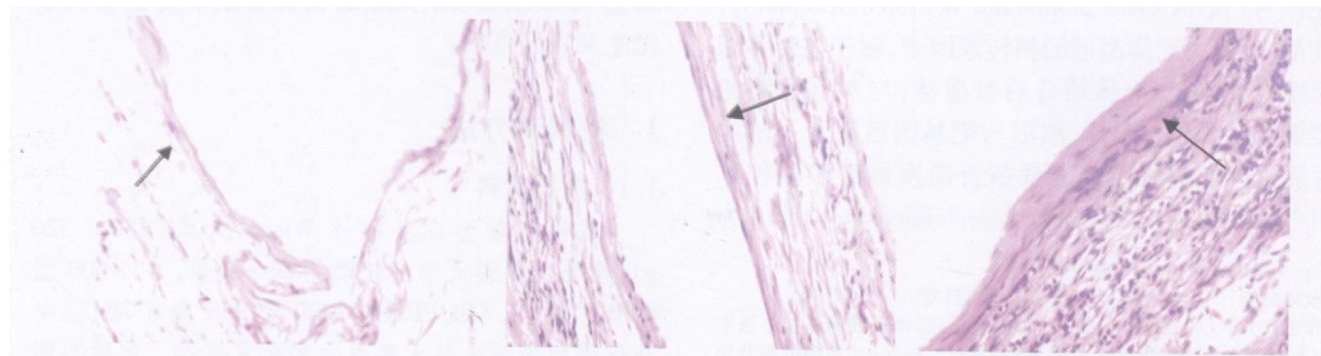


图 1 光镜下观察大鼠颈静脉形态学变化 ( $\times 100$ ) 从左到右依次为大鼠正常颈静脉、罗格列酮组移植颈静脉和模型组移植颈静脉。

## 2.4 RT-PCR 电泳结果

罗格列酮组移植静脉 PPAR $\gamma$  mRNA 表达显著高于模型组 ( $1.12 \pm 0.28$  比  $0.68 \pm 0.20$ ), 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ; 图 2)。

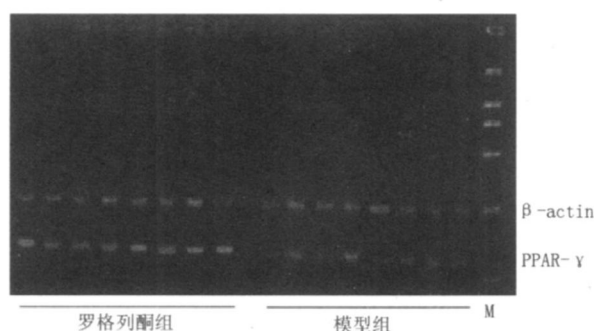


图 2 RT-PCR 电泳结果

## 3 讨论

冠状动脉搭桥术后大隐静脉内膜增生的机制十分复杂, 迄今为止尚未完全明了。目前认为, 由于游离血管时对血管壁的损伤以及静脉进入动脉环境后血流流速、变切力等血流动力学因素的变化导致血管内皮损伤脱落, 诱发血小板聚集、血栓形成。在局部多种生长因子、细胞因子、血管活性药物等的作用下, 血管中膜平滑肌细胞及外膜的成肌纤维细胞增殖、迁移至内膜, 在平滑肌细胞大量增殖的同时, 伴有细胞外基质的不断沉积, 最终导致血管内膜增生<sup>[3,4]</sup>。

本实验通过对大鼠移植静脉的研究, 发现罗格列酮组的内膜 ( $25.99 \pm 3.31 \mu\text{m}$ ) 较模型组 ( $35.28 \pm 5.76 \mu\text{m}$ ) 增生要明显减小, 罗格列酮组 PPAR $\gamma$  mRNA 表达量 ( $1.12 \pm 0.28$ ) 比模型组 ( $0.68 \pm 0.20$ ) 增加。说明罗格列酮组因罗格列酮的应用使得移植静脉的内膜增生较轻, 这可能因为 PPAR $\gamma$  是一种核激素受体超家族的激动剂, 罗格列酮能激活转录因子 PPAR $\gamma$  在巨噬细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞中表达。PPAR $\gamma$  与配体结合后被激活与 9-

顺视黄酸类受体形成异二聚体, 然后与靶基因启动子上游的过氧化体增殖物反应元件结合而发挥转录调控作用, 从而影响一些关键酶的基因表达, 如脂蛋白脂肪酶基因 (LPL)、小肠脂肪酸结合蛋白基因、激素敏感性脂肪酶基因 (HSL) 等, 从而影响脂肪细胞的分化, 减少脂质的沉积<sup>[5]</sup>。有文献报道, PPAR $\gamma$  具有调节平滑肌细胞的功能, 能抑制血管平滑肌细胞增殖、迁移。通过抑制  $\text{Ca}^{2+}$  向细胞的流入, 影响平滑肌细胞的收缩活性; 通过抑制基质金属蛋白酶 (MMP) 的分泌减慢平滑肌细胞的迁移<sup>[6]</sup>。这些使移植静脉内膜增生减缓。

实验中发现罗格列酮可以减少大鼠体重的增加, 这有利于减少因肥胖带来的心脑血管意外, 这可能与罗格列酮通过激活 PPAR $\gamma$  对参与葡萄糖生成、转运和利用的胰岛素基因的转录进行调控及影响脂肪分化有关<sup>[7]</sup>。

综上所述, PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮能减轻大鼠自体颈静脉移植后的内膜增生。

## 【参考文献】

- [1] Law RE, Goetze S, Xi XP, et al. Expression and function of PPAR gamma in rat and human vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2000, **101**: 131.
- [2] Shimizu T, Tsutsui H, Hayashilani S, et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2002, **106**: 3: 126-132.
- [3] Gando A, Gasparone I. Acute thrombosis of the sinus node artery: arrhythmological implications [J]. *Heart*, 2003, **89**: 5.
- [4] Ryan M J, Dillon SP, Mathur S, et al. PPAR (gamma) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice [J]. *Hypertension*, 2004, **43** (3): 661-666.
- [5] Camona MC, Louche K, Lefebvre R, et al. A new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator with potent antidiabetic and antiatherogenic effects [J]. *Diabetes*, 2007, **56** (11): 2797-808.
- [6] 王娟, 司书毅, 洪斌, 等. 与动脉粥样硬化密切相关的清道夫受体 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2004, **4** (6): 378-383.
- [7] Leiter EH, Reifsnnyder PC, Zhang W, et al. Differential endocrine responses to rosiglitazone therapy in new mouse models of type 2 diabetes [J]. *Endocrinology*, 2006, **147** (2): 919-926.

(此文编辑 许雪梅)