

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0199-04

· 实验研究 ·

罗格列酮对高脂血症大鼠血管平滑肌细胞凋亡的影响及机制探讨

刘广辉¹, 李建平², 阳辉³

(南华大学附属第一医院 1. 心内科 3. ICU科, 湖南省衡阳市 421001;

2 深圳市光明新区公明医院内科, 广东省深圳市 518040)

[关键词] 罗格列酮; 血管平滑肌细胞; 磷酸化 Smad2/3

[摘要] 目的 观察罗格列酮对高脂血症大鼠血管平滑肌细胞凋亡及磷酸化 Smad2/3 表达的影响。方法 高脂饮食复制 SD 大鼠高脂血症模型, 酶消化法原代提取 SD 大鼠胸主动脉平滑肌细胞进行体外培养, 取 5~8 代细胞进行实验。无血清培养 24 h 后: 实验一分为 4 组: 对照组, ④罗格列酮组 (本实验所用罗格列酮均为 100 μmol/L), ④罗格列酮 + 过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPAR-γ) 阻断剂 GW 9662 组, 罗格列酮 + 抗转化生长因子 β1 (antiTGF-β1) 组, 分别用 Western blot 于 1 h 检测磷酸化 Smad2/3 水平, 24 h 后流式细胞学检测细胞凋亡; 实验二分为 2 组: 对照组, ④100 μmol/L 罗格列酮组, 分别于 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 和 24 h 用 Western blot 检测磷酸化 Smad2/3 水平。结果 24 h 后罗格列酮组细胞凋亡率较对照组明显升高 ($P < 0.05$), 罗格列酮 + GW 9662 组和罗格列酮 + 抗转化生长因子 β1 组细胞凋亡率较罗格列酮组明显降低 ($P < 0.05$); 罗格列酮处理后 0.5 h VSMC p-Smad2/3 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 且 1 h 达高峰 ($P < 0.05$), p-Smad2/3 水平达到高峰后又较快下降 ($P < 0.05$); 罗格列酮 + GW 9662 组和罗格列酮 + antiTGF-β1 组 p-Smad2/3 表达水平较罗格列酮组低 ($P < 0.05$)。结论 罗格列酮可能通过激活过氧化物酶体增生激活受体 γ, 诱导血管平滑肌细胞磷酸化 Smad2/3 表达水平上调从而诱导血管平滑肌细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effect of Rosiglitazone on Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell of Rat and Mechanism Exploration

LIU Chang-Hui, LI Jian-Ping, and YANG Hui

(Cardiology Department of the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Rosiglitazone; Vascular Smooth Muscle Cell; Phospho-Smad2/3

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of rosiglitazone on apoptosis and expression of Phospho-Smad2/3 of thoracic aorta vascular smooth muscle cell (VSMC) of hypercholesterol rat in vitro. **Methods** Primary cultures of rat VSMC were obtained enzymatically from dissociated hypercholesterol SD rat thoracic. Cells at passage five through eight were used in this experiment. After VSMC were serum-starved for 24 hours, they were randomly divided into two parts. Part 1, cells were subdivided into four groups: control group, ④ rosiglitazone group (concentration of rosiglitazone was 100 μmol/L in this experiment), ④ rosiglitazone + GW 9662 group, rosiglitazone + antiTGF-β1 group. The expression of p-Smad2/3 after 1 hour was detected by Western blot. The apoptosis of VSMC was observed by flow cytometry after 24 hours. Part 2, cells were subdivided into two groups: control group, ④ rosiglitazone group. Expression level of p-Smad2/3 after 0, 0.5, 1, 2, 6, 12, 24 hours were detected by Western blot. **Results** Our experiment show that the rate of apoptosis in VSMC treated with rosiglitazone was higher than control group ($P < 0.05$) after 24 hours. The rate of apoptosis in VSMC in the groups treated with rosiglitazone + GW 9662 or rosiglitazone + antiTGF-β1 were higher than the group treated with rosiglitazone ($P < 0.05$), from this we may conclude that GW 9662 and antiTGF-β1 would partly reverse the apoptosis of VSMC induced by rosiglitazone. The expression levels of p-Smad2/3 in the group treated with rosiglitazone were higher than the control group after 0.5 hour ($P < 0.05$), and the expression level of p-Smad2/3 reached the highest in 1 hour ($P < 0.05$) then decreased fast after top ($P < 0.05$), from this we may conclude that rosiglitazone was able to induce VSMC expression p-Smad2/3. Furthermore, the levels of p-Smad2/3 in the group treated with rosiglitazone was higher than the groups treated with rosiglitazone + GW 9662 or rosiglitazone + antiTGF-β1, from this we may conclude that the

[收稿日期] 2009-09-07 [修回日期] 2009-11-20

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目 (06JJ5045)

[作者简介] 通讯作者刘广辉, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病及心律失常介入研究, E-mail为 changfeiliu2006@yahoo.com.cn. 李建平, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的介入研究, E-mail为 ljplshg@eyou.com. 阳辉, 硕士, 住院医师, 研究方向为心血管疾病微循环及介入治疗, E-mail为 sinoyanghu@yahoo.com.cn.

GW 9662 and antiTGF- β 1 both could partly reverse the expression levels of p-Smad2/3 in VSMC induced by rosiglitazone

Conclusion The apoptotic effect of rosiglitazone in VSMC would be mediated by a mechanism that includes the activation of PPAR- γ , inducing the apoptosis of VSMC by up-regulation of the expression level of the P-Smad2/3

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell VSMC) 的过度增殖和凋亡减少是导致在动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 病人 PCI 术后再狭窄的重要因素^[1, 2]。噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂主要通过激活转录因子过氧化物酶体增殖物活化受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 发挥生物学作用。尽管目前已有大量关于噻唑烷二酮类通过激活 PPAR 诱导 VSMC 凋亡方面的研究, 然而对于其具体机制国内报道不多, 而高脂血症等病理状态下细胞功能研究少见, Smads 家族蛋白是新近发现的参与转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族在细胞内信号传导的一族蛋白质。Smad2、3 为受体激活型蛋白, 与 TGF- β 的 I 型受体结合形成受体复合物, 促进细胞外基质合成, 磷酸化 Smad2 是 Smad2 的活性形式。本实验通过对体外培养的高脂血症大鼠胸主动脉平滑肌细胞磷酸化 Smad2/3 (phospho-Smad2, P-smad2/3) 表达水平的观察, 对罗格列酮诱导 VSMC 凋亡的具体机制进行探讨, 为噻唑烷二酮类药物用于治疗再狭窄寻求理论依据。

1 材料与方法

1.1 高脂血症大鼠模型制作

高脂血症大鼠采用高脂饲料喂养 4 周, 高脂饲料配方为: 3% 胆固醇, 10% 猪油, 0.2% 丙硫氧嘧啶, 87.8% 基础饲料。喂养 4 周后行后续实验。

1.2 细胞的提取

参照 Del 等^[3]的方法经改进后提取大鼠平滑肌细胞, 即 SD 大鼠断颈处死后取胸主动脉, 剥去内膜和外层结缔组织, 胶原酶 (I 型) 消化, 含 20% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养液终止消化, 1 kr/min 4℃ 低温离心 8 min, 弃上清, 加含 20% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 DMEM 培养液使细胞重新混悬, 用血球计数器计数细胞数, 用 DMEM 培养液调节细胞密度为 2×10^8 个/L, 移入培养瓶中, 放置于 37℃、5% CO₂ 空气培养箱中培养。

1.3 流式细胞学检测细胞凋亡率

采用 5~8 代细胞无血清 DMEM 培养 24 h。分组处理方法: 分别予罗格列酮 100 μ mol/L (罗格列酮诱导 VSMC 凋亡的最适浓度^[4], 本实验中使用的罗格列酮均为此浓度)、罗格列酮及 GW 9662 20

μ mol/L, 罗格列酮及 TGF- β 1 抗体 50 mg/L 及空白对照组, 继续培养 24 h 胰酶消化, 1 kr/min 4℃ 低温离心 5 min, 弃上清, 用 70% 的酒精固定细胞, 4℃ 保存, 进行流式细胞学检测凋亡率。

1.4 Western-blot 检测 P-Smad2/3

以 Western-blot 法测定 P-Smad2/3 的表达, 同时以 β -actin 蛋白表达为参照。对照组、罗格列酮组分别于 0、0.5、1、2、6、12 h 和 24 h 培养结束时收集蛋白样品检测; 对照组、罗格列酮组、罗格列酮 + GW 9662 20 μ mol/L 组、罗格列酮 + anti-TGF- β 1 50 mg/L 组, 分别于 1 h 及 2 h 培养结束时收集蛋白样品检测。采用美国 Alpha Tnnotech 公司 Alpha Image TM 22000 型计算机凝胶成像分析系统测定各条带光密度 (OD) 值, 计算与相应 β -actin 蛋白 OD 值比值, 以此反映 P-Smad2/3 蛋白的表达水平。

1.5 统计学处理

实验所得数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 高脂血症大鼠模型复制成功

高脂饮食 4 周后动物血脂水平明显上升, 与对照组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$ 表 1)。

表 1 高脂模型组与对照组血脂水平比较

分组	n	总胆固醇	甘油三酯
对照组	6	1.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.31
高脂模型组	6	7.8 \pm 3.0 ^a	2.6 \pm 0.3 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.2 罗格列酮促进高脂血症大鼠血管平滑肌细胞凋亡

各干预组较对照组 VSMC 凋亡率升高; 罗格列酮 + GW 9662 组较对照组凋亡率下降; 而罗格列酮 + anti-TGF- β 1 组凋亡率高于罗格列酮 + GW 9662, 差异均有显著性 ($P < 0.05$ 表 2)。

2.3 罗格列酮可刺激高脂血症大鼠血管平滑肌细胞 P-smad2/3 表达

在罗格列酮处理后 0.5 h VSMC 的 P-smad2/3 表达水平开始明显升高 ($P < 0.05$), 1 h 时达高峰,

然后较快下降 ($P < 0.05$)。罗格列酮组 6 h 后 P-smad2/3 表达水平与 0 h 差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 1 和表 3)。

2.4 PPAR- γ 不同干预组 VSMC P-smad2/3 的表达水平比较 阻断剂 GW 9662 和 antiTGF- β 1 可阻断罗格列酮刺激的高脂血症大鼠血管平滑肌细胞磷酸化

VSMC 在不同干预组处理后 1 h 罗格列酮组 P-smad2/3 的表达水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$); 而罗格列酮 + GW 9662 组、罗格列酮 + antiTGF- β 1 组的 P-smad2/3 的表达水平较罗格列酮组降低 ($P < 0.05$); 而罗格列酮 + GW 9662 组与罗格

列酮 + antiTGF- β 1 组的 P-smad2/3 的表达水平差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 2 和表 4)。

表 2 不同干预组处理时大鼠血管平滑肌细胞凋亡率

分 组	细胞凋亡率
对照组	5.38% \pm 0.74%
罗格列酮组	51.04% \pm 5.14% ^a
罗格列酮 + GW 9662 组	12.54% \pm 1.84% ^{ab}
罗格列酮 + antiTGF- β 1 组	22.51% \pm 1.43% ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与罗格列酮组比较; c 为 $P < 0.05$ 与罗格列酮 + GW 9662 组比较。

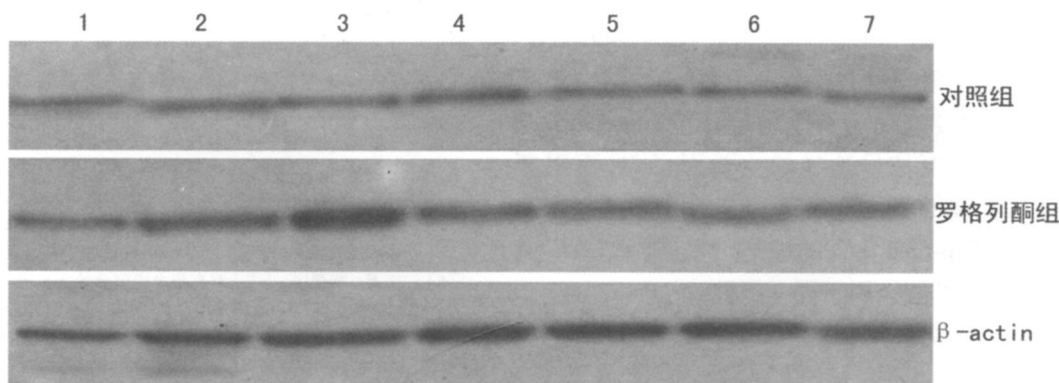


图 1 不同时间点血管平滑肌细胞 P-smad2/3 表达水平 1~7 分别为 0, 0.5, 1, 2, 6, 12 h 和 24 h

表 3 不同时间点血管平滑肌细胞 P-smad2/3 表达水平 OD 值比较

分 组	0 h	0.5 h	1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.4 \pm 0.12	0.5 \pm 0.08	0.58 \pm 0.15	0.62 \pm 0.10	0.45 \pm 0.18	0.49 \pm 0.08	0.48 \pm 0.11
罗格列酮组	0.39 \pm 0.10	1.0 \pm 0.08 ^a	1.5 \pm 0.18 ^{ab}	0.7 \pm 0.12 ^c	0.48 \pm 0.13	0.52 \pm 0.09	0.46 \pm 0.11

a 为 $P < 0.05$ 与 0 h 比较; b 为 $P < 0.05$ 与 0.5 h 比较; c 为 $P < 0.05$ 与 1 h 比较。

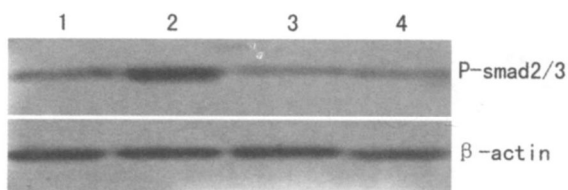


图 2 不同干预组血管平滑肌细胞 P-smad2/3 表达水平 1 为对照组, 2 为罗格列酮组, 3 为罗格列酮 + GW 9662 组, 4 为罗格列酮 + antiTGF- β 1 组。

表 4 不同干预组血管平滑肌细胞 P-smad2/3 表达水平

分 组	OD 值
对照组	0.58 \pm 0.15
罗格列酮组	1.5 \pm 0.18 ^a
罗格列酮 + GW 9662	0.38 \pm 0.03
罗格列酮 + antiTGF- β 1 组	0.36 \pm 0.04

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

3 讨论

罗格列酮促进血管平滑肌细胞凋亡的研究已见报道, 其机理可能与 PPAR- γ \rightarrow TGF- β 1 \rightarrow P-Smad2/3 这一信号传导途径相关, 但高脂血症等病理条件下罗格列酮对血管平滑肌细胞凋亡影响的机理探讨少见。目前, 高脂血症是冠心病的主要危险因素之一, 在临床较常见, 以往研究表明高脂血症能通过促进 SMC 异常增殖而导致 As 形成。另外, 高脂血清能促进体外培养的动脉 SMC 增生^[5, 6]。本研究发现, 高脂饮食 4 周后实验动物即形成明显高脂血症, 甘油三酯及总胆固醇水平均明显升高。动物模型复制较成功。

罗格列酮是 PPAR- γ 的特异性激动剂。研究发现内皮细胞、VSMC 以及单核细胞、巨噬细胞上均有 PPAR- γ 表达^[7], 体外细胞培养实验证明在血管内

膜中的平滑肌细胞比普通的平滑肌细胞有更高的 PPAR- γ 表达, 细胞凋亡亦高于普通细胞且活体内实验已证明 PPAR- γ 与再狭窄新生内膜的形成高度相关, 罗格列酮激活 PPAR- γ 作用于这类细胞起到抑制再损伤的发生发展的作用^[8]。本实验结果显示, 罗格列酮可诱导 VSMC 凋亡, 而 PPAR- γ 阻断剂 GW 9662 可逆转其大部份的效应, 说明罗格列酮诱导 VSMC 凋亡主要是通过激活 PPAR- γ 并通过其生物学效应而实现的。但 GW 9662 并不能完全阻断罗格列酮诱导的 VSMC 凋亡, 提示罗格列酮除通过激活 PPAR- γ 诱导 VSMC 凋亡的途径外可能还存在其它诱导凋亡的通路。抗 TGF- β 1 抗体可逆转大部分罗格列酮所诱导 VSMC 凋亡的效应, 提示 anti-TGF- β 1 作用于罗格列酮诱导的 VSMC 凋亡的某一主要通路或某一主要通路的一个主要环节。p-Smad2/3 是 TGF- β 的主要信号途径的主要因子^[9], 而阻断 TGF- β 1 既能降低罗格列酮所诱导的 VSMC 凋亡又能降低 VSMC p-Smad2/3 的表达水平, 提示 TGF- β 1 和 p-Smad2/3 可能作用于同一通路。

Smad2/3 属受体调节型 Smads, 其蛋白表达的多少意味着 Smad 信号转导通路激活的程度^[10]。TGF 主要由血小板、巨噬细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞分泌, 其信号主要由 SMAD 蛋白传入核内, 参与调节细胞的增殖分化、胚胎发育、血管重构、细胞外基质形成等^[11]。在本实验中, 阻断 PPAR- γ 与 TGF- β 1 后 p-Smad2/3 表达水平相近, 但两者所诱导的凋亡率差异却有显著性, 提示罗格列酮除了通过 PPAR- γ → TGF- β 1 → p-Smad2/3 这一信号传导途径诱导 VSMC 凋亡外, 还通过其它通路诱导 VSMC 凋亡。

本实验研究表明罗格列酮作为 PPAR- γ 的特异性激动剂, 先激活 PPAR- γ 诱导 TGF- β 1 表达, 再通

过 TGF- β 1 诱导 p-Smad2/3 表达, 进而诱导 VSMC 凋亡, 即 PPAR- γ → TGF- β 1 → p-Smad2/3 信号通路, 阻断 TGF- β 1 能逆转 PPAR- γ 所诱导凋亡的大部效应, 提示它可能是罗格列酮诱导 VSMC 凋亡的一条主要信号通路。p-Smad2/3 作为 TGF- β 1 下游的一个信号通路蛋白, 在罗格列酮诱导 VSMC 的凋亡中有重要地位, 但是否是这条信号通路最下游的目标基因还有等进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, et al. Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 132-139
- [2] 周晓莉, 雷寒. 罗格列酮抑制体外培养大鼠血管平滑肌细胞的增殖和迁移作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17**(2): 104-108
- [3] Del Rio M, Ruiz E, Tejerina T. Action of elgodipine on atherosclerosis development, cell growth, and oncogene expression in vascular smooth muscle cells [J]. *Gen Pharmacol* 1997; **28**: 463-468
- [4] Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG, et al. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta1, and a Smad2-dependent mechanism [J]. *Diabetes* 2005; **54**: 811-817
- [5] 王晶, 胡晋红. 三七对高脂血清刺激的大鼠血管平滑肌细胞增殖的抑制作用 [J]. *中国中药杂志*, 2006; **31**(7): 588-590
- [6] 陈小林, 马虹, 何小洪, 等. 增强型体外反搏抗动脉粥样硬化内皮机制的蛋白质组学研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009; **17**(7): 510-514
- [7] Wang CH, Ciliberti N, Li SH, et al. Rosiglitazone facilitates angiogenic progenitor cell differentiation toward endothelial lineage: a new paradigm in glitazone pleiotropy [J]. *Circulation* 2004; **109**: 1392-400
- [8] Boyle PJ, King AR, Olansky L, et al. Effects of pioglitazone and rosiglitazone on blood lipid levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective review of randomly selected medical records [J]. *Clin Ther* 2002; **24**: 378-396
- [9] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus [J]. *Cell* 2003; **113**: 685-700
- [10] Li H, Zhu H, Huang XR, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002; **13**: 1464-472
- [11] Denler S, Goumans M, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction [J]. *J Leukoc Biol* 2002; **71**: 731-740

(此文编辑 李小玲)