论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1204-02

罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血清 NOS/NO 的影响

高凌云,何作云,牟 娇 (第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 探讨罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血清 NOS/NO 的影响。**方法** 20 只 8 周龄 apoE 基因敲除小鼠分为动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)模型组和罗格列酮干预组,另取 10 只 8 周龄野生型 C57/BL 小鼠作为正常对照组,3 组均饲喂普通饮食,罗格列酮组给予 10 mg·kg^{-1}·d^{-1}罗格列酮,12 周后获取静脉血和主动脉标本。用硝酸还原酶法测定 NO 及 NOS。用全自动生化分析仪测定血脂水平。HE 染色后镜下观察主动脉病变。**结果** AS 模型组主动脉形成明显的动脉粥样硬化斑块,罗格列酮干预组病变较 AS 组轻;AS 组血浆 NO、NOS 含量均显著低于正常对照组($P<0.05$),罗格列酮干预组 NO、NOS 含量均显著高于模型组。**结论** 罗格列酮具有抗 AS 作用,且其抗 AS 作用可能与其逆转受损的内皮细胞功能有关。

关键词:罗格列酮;动脉粥样硬化;apoE 基因敲除小鼠;一氧化氮;一氧化氮合酶

中图法分类号:R446.112;R543.502;R977.15 **文献标识码**:A

Effect of rosiglitazone on serum NOS/NO in apolipoprotein E knockout mice

GAO Ling-yun, HE Zuo-yun, MOU Jiao (Cardiovascular Diseases Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the effect of rosiglitazone on serum NOS/NO in apolipoprotein (apo) E knockout mice. **Methods** Twenty eight-week-old apoE knockout mice were intragastrically administrated 0.2 ml 5% sodium carboxymethycellulose for 12 weeks to establish the animal models of atherosclerosis, in which half of mice simultaneously received 10 mg·kg^{-1}·d^{-1} rosiglitazone as treatment. Ten wildtype mice were used as the normal control group. All mice were fed on normal chow diet. After 12 weeks, aorta were used for histomorphometric analysis by means of HE. Vessel blood was collected for plasma lipid, NO and NOS. **Results** Histomorphometric analysis showed that the area of atherosclerosis plaque in mice receiving rosiglitazone was significantly smaller than the mouse models of atherosclerosis, while the plasm lipid, NO and NOS were higher. **Conclusion** Rosiglitazone can inhibit the development of atherosclerosis, which mechanism is related to the protection of vascular endothelial function.

Key words: rosiglitazone; arteriosclerosis; apoE-knockout mice; NO; NOS

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors,PPARs)是核受体超家族中的一类由配体激活的核转录因子,在多种组织中均有表达,人们在动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)的病变处,也监测到了 PPARα 和 PPARγ[1]。近年来研究表明 PPARγ 特异性配体激动剂罗格列酮有抗动脉粥样硬化的作用,但其机制尚不完全清楚。本研究通过建立小鼠 AS 模型,检测其血清一氧化氮合酶(nitricoxide synthase,NOS)和 NO 及罗格列酮对其影响,探讨罗格列酮防治 AS 的作用和可能机制,为其临床应用提供一些理论依据。

作者简介:高凌云(1973-),女,山西省霍州市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事动脉粥样硬化的发病机制及防治方面的研究,发表论文 6 篇。电话:(023)68774601,E-mail:gaolingyun1973@yahoo.com.cn

通讯作者:何作云,电话:(023)68755593

收稿日期:2005-11-29;修回日期:2006-03-30

1 材料与方法

1.1 材料

20 只 8 周龄,体质量 20~22 g,雄性 apoE 基因敲除小鼠(apoE-knockout 小鼠,遗传背景为 C57/BL),购于北京大学实验动物中心,10 只野生型的 C57/BL 小鼠购于第三军医大学大坪医院实验动物中心。罗格列酮商品名为文迪雅,由天津葛兰素史克公司提供。血清 NOS/NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

apoE 小鼠分为 AS 模型组和罗格列酮干预组,每组各 10 只,2 组予普通饮食喂养的同时,罗格列酮组每天给予 10 mg·kg^{-1}·d^{-1}罗格列酮(混悬于 5% 羧甲基纤维素钠 0.2 ml)灌胃。模型组仅用 0.2 ml 5% 羧甲基纤维素钠灌胃,10 只野生型的 C57/BL 小鼠作为正常对照组,喂养 12 周后处死。处死前摘眼球采血 1.5 ml,立即离心(800×g,10 min),获取血清,用日立 7150 全自动生化分析仪测定血浆总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白

胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。血管组织按照常规石蜡包埋、切片、HE 染色，光镜下观察动脉粥样硬化病变，用 Image Pro Plus 5.1 进行图像分析。血清 NO 及 NOS 检测按照试剂盒说明操作，采用硝酸还原酶法。

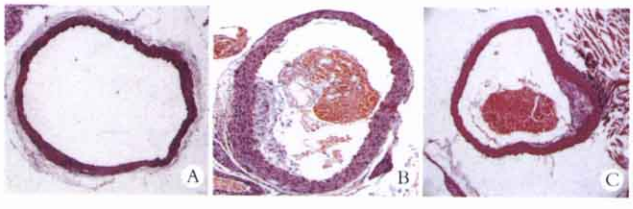
1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠病理变化的影响

饲养 12 周后，正常对照组的内膜完整，未见泡沫细胞聚集，无动脉粥样硬化病变形成。AS 模型组可见内膜完整性破坏，内膜下大量的泡沫细胞聚集，形成明显的动脉粥样硬化斑块，而罗格列酮灌胃组泡沫细胞聚集程度及动脉粥样硬化斑块面积低于模型组(斑块面积平均降低了 24.3%)，见图 1。



A：正常对照组；B：AS 模型组；C：罗格列酮干预组

图 1　各组小鼠主动脉横切面病理变化　(HE × 100)

2.2　罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血脂的影响

表 1 结果显示，与正常对照组相比，动脉粥样硬化模型组血脂各项指标除 HDL-C 外，均显著增高($P < 0.05$)，而罗格列酮组的血脂各项指标均较 AS 组增高，但差异无统计学意义。

表 1　罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血脂的影响(C_B/mmol · L^{-1})

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	1.89 ± 0.22	0.94 ± 0.41	0.34 ± 0.06	0.87 ± 0.21
AS 模型组	7.87 ± 2.79[a]	1.37 ± 0.59[a]	3.15 ± 0.31[a]	1.24 ± 0.24
罗格列酮干预组	8.42 ± 1.62	1.97 ± 1.19	4.53 ± 0.29	1.56 ± 0.25

a：$P < 0.05$，与正常对照组比较

2.3　罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠 NO、NOS 水平的影响

动脉粥样硬化模型组 NO、NOS 含量均显著低于正常对照组($P < 0.05$)，而罗格列酮干预组 NO、NOS 含量均显著高于模型组($P < 0.05$)。

3　讨论

AS 的病因复杂，其发病与多种致病因素有关。apoE 基因缺陷小鼠是应用基因同源重组靶基因技术于 1992 年培育成功，该小鼠 apoE 基因敲除后，造成血浆含胆固醇丰富的残粒清除受阻，当喂以低脂、低胆固醇的普通饲料时即可出现高胆固醇血症，并自发地形成纤维斑块和复合斑块，且斑块的分布与人类 AS 斑块的分布极为相似，是进行 AS 发病机制和防治研究可靠的动物模型[2]。

本结果表明，AS 模型组血管组织内膜损伤，内皮下大量的泡沫细胞聚集，出现显著的动脉粥样硬化斑块，而罗格列酮灌胃组其动脉内膜损伤及泡沫细胞聚集程度较 AS 模型组减轻。表明罗格列酮具有抗 AS 的作用。然而生化指标却表明，罗格列酮组血脂水平较 AS 模型组高，可能是由于 TZDs 上调 CD36 受体的表达，有助于巨噬细胞摄入氧化的大而轻的 LDL-C，抑制清道夫受体 A1 的表达，减少小而密的 LDL 摄入，故罗格列酮虽使 TC、LDL-C 水平不变或轻微增加，但致动脉粥样硬化的小而密的 LDL 下降[3]。

内皮细胞是血液和血管壁之间的屏障层，众所周知，动脉粥样硬化形成的起始步骤就是内皮细胞功能障碍，体内外各种损伤因子包括高脂血症可导致内皮细胞功能受损，其中 NO 水平降低是内皮细胞功能障碍的标志之一，而 NO 水平降低是由于内皮功能受损后，NOS 酶活性降低所致。本结果表明，AS 模型组 NO、NOS 含量均显著低于正常对照组，而罗格列酮干预组 NO、NOS 含量均显著高于 AS 模型组。这与文献[4,5]报道的结果一致。由于基质金属蛋白-9(MMP-9)可以水解细胞外基质，便于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells，VSMCs)的迁移，罗格列酮可以通过增加内皮细胞 NO 的合成来抑制 MMP-9 转录因子 Ets-1 的活性，减少 MMP-9 的产生，抑制 VSMCs 的迁移，从而抑制 AS 斑块的形成。

参考文献：

[1] BISHOP-BAILEY D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system[J]. Br J Pharmacol, 2000, 129(5): 823 - 834.

[2] SMITH J D, BRESLOW J L. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research[J]. J Intern Med, 1997, 242(2): 99 - 109.

[3] AKIYAMA T E, SAKAI S, LAMBERT G, *et al*. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(8): 2607 - 2619.

[4] EBERHARDT W, AKOOL-EL S, REBHAN J, *et al*. Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability[J]. J Biol Chem, 2002, 277(36): 33518 - 33528.

[5] SIDHU J S, COWAN D, KASKI J C. The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(10): 1757 - 1763.

(编辑　张大春)