文章编号:1000-5404(2009)04-0311-04

论著

PPAR-γ在高血压血管平滑肌细胞表型转化中的作用

张莉莉[1],李敬诚[2],王景周[2],谢 鹏[1] ([1]重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

摘 要:目的 观察过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator activated receptors-γ,PPAR-γ)在高血压血管平滑肌细胞(VSMC)表型转化中的作用。**方法** 应用基因重组技术使PPAR-γ过表达和表达抑制,Western blot方法检测分化型VSMC标志物α-SMA和未分化型VSMC标志物OPN的蛋白表达,应用DNA合成率检测和细胞计数的方法测定细胞增殖率,常规病理切片和HE染色观察血管形态学改变。**结果** ①PPAR-γ激动剂罗格列酮可降低SHR大鼠血压,并改善主动脉血管重构。②SHR大鼠主动脉中OPN表达增多而α-SMA表达减少,应用罗格列酮可抑制上述改变。③SHR大鼠来源的VSMC中OPN表达增多而α-SMA表达减少,细胞增殖率升高,PPAR-γ过表达使细胞增殖率降低,并抑制OPN和α-SMA的表达改变。**结论** PPAR-γ可抑制高血压VSMC向未分化表型的转化,可能是其改善高血压血管重构的重要机制。

关键词: 过氧化物酶体增殖物激活受体-γ;血管平滑肌细胞;血管重构;表型转化
中图法分类号: R322.12;R394.3;R544.102 **文献标识码:** A

Role of peroxisome proliferators-activated receptor-gamma in phenotypic transforming of vascular smooth muscle cells in hypertension

ZHANG Li-li[1], LI Jing-cheng[2], WANG Jing-zhou[2], XIE Peng[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the effect of peroxisome proliferators activated receptor gamma (PPAR-γ) on phenotypic transforming of vascular smooth muscle cells (VSMC) in hypertension. **Methods** Spontaneous hypertension rats (SHR) and WKY rats both aged 4 months were included. SHR rats as well as WKY rats were divided to be fed with normal chow, and chow added with rosiglitazone (10 mg·kg^{-1}·d^{-1}) for 16 weeks. VSMC were isolated from SHR rats and WKY rats and cultured by patch-attaching method, then respectively divided into 3 groups after treated with genetic recombination technology: normal VSMC, PPARγ overexpressed VSMC and PPARγ silenced VSMC. Expressions of OPN and α-SMA, which respectively represent the undifferentiated and differentiated VSMC, were detected by Western blotting. Cell proliferation was determined by detecting DNA synthesis and cell counting. The changes of arteries were evaluated pathologically. **Results** Rosiglitazone decreased blood pressure and ameliorated vascular remodeling of aorta in SHR rats. Aorta of SHR showed an upregulation of OPN and downregulation of α-SMA, which could be inhibited by rosiglitazone. VSMC from SHR rats showed an upregulation of OPN and downregulation of α-SMA, and increased cell proliferation. These changes were all inhibited by rosiglitazone. In the cells that overexpressed PPARγ, the cell proliferation rate was lower, and the expressions of OPN and α-SMA were depressed, compared with the corresponding control cells. **Conclusion** PPAR-γ could inhibit the phenotypic transforming of VSMC, and this might be responsible for the amelioration of vascular remodeling in hypertension.

Key words: peroxisome proliferators activated receptor gamma; vascular smooth muscle cells; vascular remodeling; phenotypic transforming

基金项目: 重庆市自然科学基金(2006BB5097);中国博士后科学基金(20070410780)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Municipal (2006BB5097) and the Postdoctoral Science Foundation of China (20070410780)
作者简介: 张莉莉,女,山东省东阿县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事血管神经病学方面的研究。电话:(023)68757842
通信作者: 李敬诚,电话:(023)68757841
收稿日期: 2008-05-26;**修回日期:** 2008-07-22

过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator activated receptors-γ, PPAR-γ)属于核受体超家族成员,主要分布于脂肪细胞,参与调控糖和脂肪代谢。近年发现 PPAR-γ 还表达于血管内皮和平滑肌细胞中,具有重要的心血管保护作用。多项研究证实 PPAR-γ 可改善高血压引起的血管重构[1,2]。但具体机制还不明确。本研究探讨 PPAR-γ 对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)表型转化的可能作用,为深入研究 PPAR-γ 改善高血压血管重构的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

PPAR-γ、α 平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和骨桥蛋白(OPN)抗体均为兔抗大鼠抗体,购自 Santa Cruz 公司。293FT 细胞和 pLP 慢病毒载体系统购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶均购自 New England Biolabs。DNA 寡核苷酸片段由上海 Bioasia 公司合成。^{3}H-thymidine 购自中国同位素公司。

1.2 实验分组

在体实验应用4月龄自发性高血压大鼠(SHR)10 只和对照大鼠(WKY)10 只(均购自上海实验动物中心)。分为 SHR 普食组、WKY 普食组、SHR 干预组和 WKY 干预组。普食组大鼠应用普通饲料喂养,干预组大鼠饲料中按照 10 mg·kg^{-1}·d^{-1}添加罗格列酮。每组 5 只大鼠,共饲养 16 周。

贴块法培养 VSMC,取 5 ~ 10 代细胞用于实验。SHR 和 WKY 来源的 VSMC 分别命名为 SHR-C 和 WKY-C,再分组如下:PPARγ 正常表达组(nor-PPAR)、PPARγ 过表达组(ov-PPAR)、PPARγ 干扰组(int-PPAR)。ov-PPAR 和 int-PPAR 组细胞分别用 PPAR-γ 腺病毒表达载体和 RNAi 慢病毒载体进行转染使 PPAR-γ 过度表达和表达沉默。每组细胞设 6 个平行孔。

1.3 真核质粒表达载体的构建和 VSMC 的细胞转染

PPAR-γ RNAi 慢病毒载体构建的具体方法见文献[3]。

腺病毒表达载体的构建:应用重组腺病毒载体(pAdEasy-1)系统。将 PPAR-γ 基因克隆到穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上,电转入含骨架质粒的 BJ5183 细胞,使穿梭质粒与骨架质粒在 BJ5183 细胞中重组,再把重组体转染 293FT 细胞,产生腺病毒颗粒。

VSMC 的细胞转染:提前 1 d 将 VSMC 细胞接种于 6 孔培养板,次日移除原有培养基,分别加入上述 2 种病毒液。混匀后 37 ℃孵育过夜。分别用 G418 和卡那霉素进行抗性筛选,得到 PPAR-γ 基因沉默和过表达的 VSMC 细胞,扩增后行蛋白检测。

1.4 PPAR-γ、α-SMA 和 OPN 蛋白表达的检测

采用 Western blot 法。细胞蛋白的提取应用蛋白裂解液直接裂解细胞,组织蛋白提取先将腹主动脉剪碎置于裂解液中,再用匀浆机充分匀浆,4 ℃离心后收集上层蛋白溶液,定量后用于检测。蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 4 ℃过夜,分别加入 1∶1 000 稀释的抗体,37 ℃孵育 4 h,再加入相应的二抗 4 ℃孵育过夜。化学发光法显色,凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)进行图像分析。

1.5 细胞增殖率检测

将各组 VSMC 接种于 24 孔培养板(10^5个/孔),24 h 后分别进行细胞计数和细胞 DNA 合成率检测。细胞计数用胰酶消化后制成细胞悬液,用 Coulter Counter 进行细胞计数。DNA 合成率检测应用^{3}H-TdR(胸腺嘧啶)掺入法:无血清培养基培养 VSMC 细胞 8 h 后,加入^{3}H-TdR (终浓度 37 MBq/ml),培养24 h 后收集细胞进行液闪记数,重复 6 次。用 ^{3}H-TdR 掺入率反映 VSMCs DNA 合成速率。

1.6 鼠尾动脉血压测定

采用鼠尾血压测定仪(Powerlab,澳大利亚),按照仪器说明书进行测量。每只动物测 2 次,取平均值。

1.7 腹主动脉组织形态学观察

常规石蜡包埋,病理切片,HE 染色后光镜观察。Motic image advance 3.0 图像分析系统检测内径、中膜、中膜/内径、中膜横切面积。

1.8 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 11.0 统计软件进行配对 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠鼠尾血压情况

大鼠饲养 16 周后检测鼠尾血压,发现 SHR 组大鼠血压较 WKY 组明显升高,以收缩压升高更为明显($P<0.01$);应用罗格列酮干预后,SHR 大鼠的鼠尾收缩压和舒张压均较 SHR 普食组显著降低($P<0.05$),与 WKY 普食组相比仍较高,但无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

2.2 血管组织形态学改变

WKY 普食组和干预组大鼠腹主动脉内膜均一,中层平滑肌细胞和弹力纤维排列有序,管壁无增厚。SHR 组大鼠主动脉出现平滑肌细胞增生,血管中膜增厚,中膜横切面积增加,中膜/内径比值升高($P<0.01$);应用罗格列酮干预后,SHR 大鼠的主动脉中膜变薄,中膜横切面积减小,中膜/内径比值降低($P<0.05$),重构指标明显改善。见表 2、图 1。

表 1 各组大鼠鼠尾血压(p/mmHg, $n=5$, $\bar{x} \pm s$)

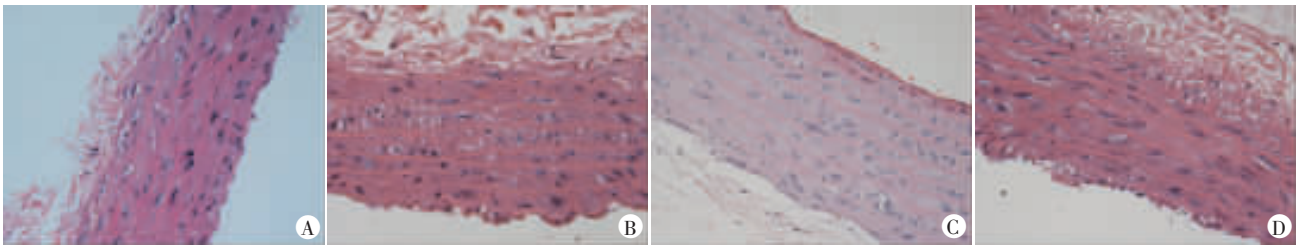
组别	WKY		SHR	
	收缩压	舒张压	收缩压	舒张压
普食组	115.67 ± 4.49	145.75 ± 6.85[b]	92.29 ± 4.60	106.13 ± 7.28[a]
干预组	112.71 ± 6.54	121.62 ± 7.85[c]	92.01 ± 5.33	95.48 ± 5.07

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 WKY 普食组比较;c: $P<0.05$,与 SHR 普食组比较

表 2 各组大鼠腹主动脉血管重构指标的改变($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	WKY				SHR			
	内径(μm)	中膜(μm)	中膜/内径(%)	中膜横切面积(μm^2)	内径(μm)	中膜(μm)	中膜/内径(%)	中膜横切面积(μm^2)
普食组	1 598.0 ± 68.4	91.5 ± 11.7	5.6 ± 0.8	515.1 ± 33.6	1 552.6 ± 94.7	128.9 ± 10.3[b]	8.4 ± 0.7[b]	636.3 ± 48.5[b]
干预组	1 619.3 ± 74.8	88.3 ± 12.9	5.4 ± 0.6	491.4 ± 50.8	1 563.5 ± 90.1	104.2 ± 17.4[c]	6.7 ± 0.8[ac]	543.3 ± 31.4[c]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与 WKY 普食组比较;c: $P<0.05$,与 SHR 普食组比较

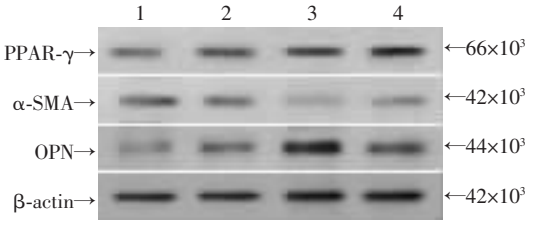


A：WKY 普食组；B：WKY 干预组；C：SHR 普食组；D：SHR 干预组

图 1　各组大鼠腹主动脉形态学观察（HE×400）

2.3　大鼠腹主动脉中 PPAR-γ 和表型标志分子的表达

SHR 组大鼠腹主动脉中 PPAR-γ 蛋白表达较 WKY 普食组明显增多（$P<0.01$）；WKY 干预组较 WKY 普食组的 PPAR-γ 表达明显增多（$P<0.05$），SHR 干预组较 SHR 普食组的 PPAR-γ表达轻度增多，但没有显著性差异（$P>0.05$）。见图 2、表 3。



1：WKY-普食组；2：WKY-干预组；3：SHR-普食组；4：SHR-干预组

图 2　大鼠主动脉中 PPAR-γ 和表型标志分子的表达

SHR 组大鼠腹主动脉中 α-SMA 含量显著低于 WKY 大鼠（$P<0.01$）；应用罗格列酮干预后 SHR 主动脉中 α-SMA 的表达较普食组显著升高（$P<0.05$），但仍较 WKY 普食组的水平明显降低（$P<0.05$）。见图 2、表 3。

SHR 组大鼠腹主动脉中 OPN 含量显著高于 WKY 大鼠（$P<0.01$）；应用罗格列酮干预后 SHR 主动脉中 OPN 的表达较普食组显著减少（$P<0.01$），但仍较 WKY 普食组的水平明显升高（$P<0.01$）。见图 2、表 3。

表 3　各组大鼠腹主动脉中 PPAR-γ 和表型标志分子的表达（$\bar{x}\pm s$）

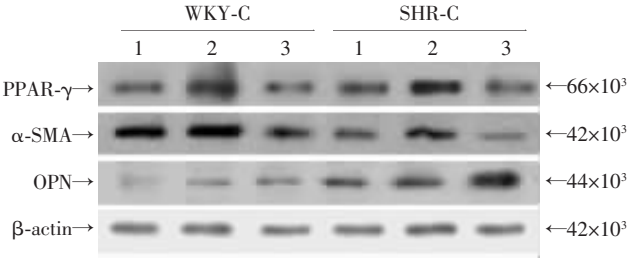
组别	WKY			SHR		
	PPAR-γ	α-SMA	OPN	PPAR-γ	α-SMA	OPN
普食组	4.1±0.32	7.7±0.57^{b}	4.3±0.50	1.9±0.18^{b}	1.2±0.23	5.6±0.36^{b}
干预组	5.8±0.58^{a}	8.1±0.69^{b}	4.1±0.39	2.8±0.22^{ac}	1.6±0.24	3.8±0.41^{bd}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 WKY 普食组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 SHR 普食组比较

2.4　VSMC 细胞中 PPAR-γ 和表型标志分子的表达

SHR-C 组细胞中的 PPAR-γ 蛋白表达较 WKY-C 组细胞明显增多（$P<0.01$）；2 组细胞在分别转染腺病毒和慢病毒载体后，PPAR-γ 蛋白表达分别表现为显著增多和降低（$P<0.01$），达到了 PPAR-γ 过表达和表达沉默的预期效果。见图 3、表 4。

对于 WKY-C 细胞，PPAR-γ 过表达对 α-SMA 和 OPN 的表达没有明显影响，但 PPAR-γ 基因沉默则使 α-SMA 表达显著降低（$P<0.05$）和 OPN 表达显著升高（$P<0.01$）。对于 SHR-C 细胞，PPAR-γ 过表达使 α-SMA 表达显著升高（$P<0.01$），而 OPN 表达显著降低（$P<0.05$），PPAR-γ 基因沉默则使 α-SMA 表达显著减少（$P<0.05$），OPN 表达显著升高（$P<0.05$）。见图 3、表 4。



1：nor-PPAR；2：ov-PPAR；3：int-PPAR

图 3　VSMC 中 PPAR-γ 和表型标志分子的表达

表 4　各组 VSMC 细胞中 PPAR-γ 和表型标志分子的表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	WKY-C			SHR-C		
	PPAR-γ	α-SMA	OPN	α-SMA	OPN	α-SMA
nor-PPAR	1.6±0.21	3.1±0.23	0.4±0.05	2.9±0.18^{a}	1.0±0.08	3.7±0.29
ov-PPAR	4.2±0.37^{b}	3.3±0.42	0.6±0.08	4.4±0.45^{d}	2.2±0.10d	2.3±0.31^{c}
int-PPAR	0.5±0.06^{b}	1.7±0.26^{a}	1.5±0.37^{b}	1.1±0.12^{d}	0.7±0.09c	4.3±0.55^{c}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 WKY-C- nor-PPAR 组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 SHR-C- nor-PPAR 组比较

2.5　VSMC 细胞中 DNA 合成和细胞计数情况

对于 WKY-C 细胞，PPAR-γ 过表达对 DNA 合成和细胞计数没有明显的影响，但 PPAR-γ 基因沉默则使 DNA 合成和细胞计数显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$）；对于 SHR-C 细胞，PPAR-γ 过表达使 DNA 合成和细胞计数显著减少（$P<0.01$），而 PPAR-γ 基因沉默则使 DNA 合成和细胞计数明显增多（$P<0.05$）。见表 5。

表 5　各组 VSMC 增殖情况检测（$\bar{x}\pm s$）

组别	WKY-C		SHR-C	
	DNA 合成（dpm×10³）	细胞计数（×10⁵）	DNA 合成（dpm×10³）	细胞计数（×10⁵）
Nor-PPAR	1.7±0.15	4.8±0.37	3.2±0.27^{b}	7.4±0.69^{b}
Ov-PPAR	1.4±0.09	4.3±0.22	1.8±0.16^{d}	4.7±0.65^{d}
Int-PPAR	2.4±0.28^{a}	6.5±0.73^{b}	4.6±0.54^{c}	8.6±0.78^{c}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 WKY-C- Nor-PPAR 组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 SHR-C- Nor-PPAR 组比较

3　讨论

PPAR-γ 属于过氧化物酶体增殖物激活受体

PPARs 家族成员,主要表达于脂肪细胞、心脏、骨骼肌和肾脏组织中[4],参与调节糖和脂肪代谢。近年发现 PPAR-γ 还表达于血管壁细胞中,可改善内皮功能,抑制炎症反应,抑制 VSMC 的增殖和迁移等,具有心血管保护作用[5]。研究表明自发性高血压大鼠血管壁的 PPAR-γ 表达升高[6],升高的 PPAR-γ 对多种类型的高血压具有改善作用[7]。此外,PPAR-γ 还可改善高血压引起的血管重构:应用罗格列酮活化 PPAR-γ 可改善 AngⅡ诱导的肠系膜动脉和主动脉的血管重构[1],还可预防高血压大鼠的阻力动脉发生肥大性重构[2]。而 PPAR-γ 基因突变的小鼠则易于发生脑小动脉的肥厚性内向性重构[8]。本研究也显示 SHR 组大鼠主动脉中的 PPAR-γ 表达增多,罗格列酮在促进 PPAR-γ 表达的同时还降低 SHR 大鼠鼠尾血压,并使 SHR 大鼠主动脉的中膜变薄,横切面积减小,中膜/内径比值降低,提示上调的 PPAR-γ 可能参与了罗格列酮的降压作用,并可改善肥厚性血管重构。上述结果与国外的研究报道一致,验证了 PPAR-γ 改善高血压及动脉重构的作用。

关于 PPAR-γ 改善高血压血管重构的具体机制,诸多研究提示可能与其抑制基质金属蛋白酶 MMP-9 表达[2]、干扰 PI3K 和 MAPK 信号途径[1],阻断 AngⅡ及其 AT-1 受体的作用有关[9]。但并未形成一致的认识。由于血管重构起始于 VSMC 的表型转化及其后的细胞增殖和迁移,本研究探讨 PPAR-γ 是否对 VSMC 表型转化具有调节作用。VSMC 有分化(收缩)和未分化(合成)2 种表型,成人血管中主要为分化型 VSMC。当血管损伤时,VSMC 体积增大,肌纤维减少,细胞器增多,即转化为未分化型,并获得增殖、迁移以及合成和分泌细胞外基质的能力,启动血管重构过程。参考文献报道,我们选择 α-SMA 和 OPN 分别作为分化型和未分化型 VSMC 的标志性分子[10]。结果显示与 WKY 组相比,SHR 大鼠主动脉中的 α-SMA 表达降低,而 OPN 表达升高,提示 SHR 大鼠主动脉中的 VSMC 发生表型转化,由分化型转化为未分化型;而应用罗格列酮上调 PPAR-γ 表达后则可抑制上述标志分子的改变,抑制 VSMC 向未分化型转化。

进一步的离体研究显示 SHR 来源的 VSMC 向未分化型转化明显,并具有活跃的增殖能力,表现为 SHR-C 中的 α-SMA 表达降低而 OPN 表达升高,同时 DNA 合成和细胞计数明显升高。而 PPAR-γ 的表达变化则对上述改变具有重要的影响:PPAR-γ 过表达可抑制 SHR-C 细胞增殖和向未分化型的转化;而 PPAR-γ 基因沉默则可促进 WKY-C 和 SHR-C 向未分化表型转化,促进细胞增殖。这与在体实验结果相一致。

上述在体和离体的研究结果均证实 PPAR-γ 对高血压 VSMC 表型转化具有重要的调节作用,可促进高血压 VSMC 向分化表型的转化,抑制向未分化表型的转化,抑制 VSMC 的增殖。未分化型 VSMC 是高血压动脉血管壁中 VSMC 的主要表型,由于具有较强的增殖迁移能力以及合成分泌基质蛋白的能力,VSMC 在血管内膜下大量聚集并分泌基质蛋白,导致动脉管壁增厚,构成了高血压血管重构的重要病理基础。因此,PPAR-γ 对于 VSMC 表型转化的调节作用可能成为其改善高血压血管重构的重要机制。

总之,本研究表明 PPAR-γ 在高血压 VSMC 表型转化中起重要的调节作用,这可能是 PPAR-γ 改善高血压血管重构的重要机制。我们将在下一步的研究中深入探讨相关的分子机制和信号通路,为临床防治高血压血管病变奠定实验基础,并为寻找新的治疗靶点提供理论依据。

参考文献:

[1] Benkirane K, Viel E C, Amiri F, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates angiotensin II-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in blood vessels *in vivo*[J]. Hypertension, 2006, 47(1): 102 – 108.

[2] Schiffrin E L. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(3): H1037 – H1043.

[3] Zhang L L, Zhu Z M, Cao T B, *et al*. Blockage of PPARδ increase the expression of inflammatory factors in 3T3-L1 cells stimulated with TNFα[J]. J Med Coll PLA, 2006, 21(2): 77 – 81.

[4] Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliott C, *et al*. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1706 – 1716.

[5] Walcher D, Marx N. Insulin resistance and cardiovascular disease: the role of PPARgamma activators beyond their anti-diabetic action[J]. Diab Vasc Dis Res, 2004, 1(2): 76 – 81.

[6] Diep Q N, Schiffrin E L. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats[J]. Hypertension, 2001, 38(2): 249 – 254.

[7] Ryan M J, Didion S P, 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.

[8] Beyer A M, Baumbach G L, Halabi C M, *et al*. Interference with PPARgamma signaling causes cerebral vascular dysfunction, hypertrophy, and remodeling[J]. Hypertension, 2008, 51(4): 867 – 871.

[9] Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, *et al*. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension[J]. Arterioscler Thromb Vas Biol, 2003, 23(1): 45 – 51.

[10] Ratajska A, Zarska M, Quensel C, *et al*. Differentiation of the smooth muscle cell phenotypes during embryonic development of coronary vessels in the rat[J]. Histochem Cell Biol, 2001, 116(1): 79 – 87.

(编辑 汪勤俭)