文章编号:1000-5404(2009)20-1989-04

论著

PPAR-γ激动剂促大鼠急性心肌梗死后血管新生与eNOS表达调控

何 泉,雷 寒,柳 青,覃 数,马康华,王 惠 (重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆 400016)

摘 要:目的 研究PPAR-γ激动剂罗格列酮对大鼠急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后血管新生及内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)表达调控的影响。**方法** 健康成年SD大鼠60只,用随机数字表法分为假手术组、对照组、罗格列酮组、罗格列酮+L-NAME(NOS抑制剂)组、L-NAME组,每组12只。结扎大鼠冠状动脉左前降支建立急性心肌梗死动物模型。灌胃给予罗格列酮(3 mg·kg^{-1}·d^{-1})2周,同时腹腔内注射给予L-NAME(40 mg·kg^{-1}·d^{-1})2周。检测梗死周围缺血区CD31阳性染色血管数;以Western blot及RT-PCR检测缺血区丝氨酸^{1177}磷酸化内皮型一氧化氮合酶(phosphorylized endothelial nitric oxide synthase at Ser^{1177},p-eNOS Ser^{1177})蛋白及eNOS mRNA的表达。**结果** ①与对照组比较,罗格列酮组心肌梗死后CD31阳性染色血管数显著增加($P<0.05$),而NOS抑制剂L-NAME则抑制了罗格列酮的这一作用。②罗格列酮组eNOS mRNA表达与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而p-eNOS Ser^{1177}蛋白水平显著升高($P<0.05$)。**结论** 罗格列酮能促进大鼠急性心肌梗死后血管新生,其机制可能与其促进eNOS的磷酸化,从而介导内皮源性一氧化氮(endothelium-derived nitric oxide,EDNO)合成增加有关。

关键词: 过氧化物酶体增殖物激活受体-γ;急性心肌梗死;血管新生;内皮型一氧化氮合酶
中图法分类号: R364.33;R542.22;R972 **文献标识码:** A

PPAR-γ agonist improves myocardial angiogenesis by regulating eNOS expression after acute myocardial infarction in rats

HE Quan, LEI Han, LIU Qing, QIN Shu, MA Kang-Hua, WANG Hui (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of rosiglitazone, one of the PPAR-γ agonist, on angiogenesis and eNOS expression after experimental myocardial infarction (MI) in rats. **Methods** Totally 60 healthy adult SD rats were randomly and equally divided into 5 groups, sham operation group, control group, rosiglitazone group, rosiglitazone plus L-NAME (inhibitor of NOS) group and L-NAME group. Left anterior descending coronary was undergone permanent occlusion to establish the MI model. Rosiglitazone (3 mg·kg^{-1}·d^{-1}) was administered *via* oral gavage, and L-NAME was given by intraperitoneal injection. In 2 weeks after the corresponding treatment, the rats were sacrificed and the heart was removed. The number of microvessels positive to CD31 in the ischemic area near the infarction myocardium was counted. Western blot analysis and RT-PCR was carried out for the expressions of phosphorylized endothelial nitric oxide synthase at Ser^{1177} (p-eNOS Ser^{1177}) and eNOS mRNA. **Results** ①Compared with the control group, the number of CD31 positive microvessels was significantly larger in rosiglitazone group ($P<0.05$), but L-NAME aborted the angiogenic effect of rosiglitazone. ② The expression of eNOS mRNA in rosiglitazone group was not improved significantly compared with that in control group ($P>0.05$), whereas levels of p-eNOSS^{1177} protein were significantly increased by rosiglitazone ($P<0.05$). **Conclusion** Rosiglitazone can improve myocardial angiogenesis after AMI. The angiogenic effect of rosiglitazone is associated with increased phosphorylation of eNOS, and finally increases release of endothelium-derived nitric oxide (EDNO) after AMI in rats.

Key words: PPAR-γ; acute myocardial infarction; angiogenesis; endothelial nitric oxide synthase

基金项目: 国家自然科学基金(30670869)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670869)
作者简介: 何 泉,男,四川省巴中市人,博士,讲师,主要从事冠心病的基础及临床方面的研究。E-mail: hequan822@yahoo.cn
通信作者: 雷 寒,电话:(023)89012898,E-mail: hanleicqmu@gmail.com
收稿日期: 2009-02-26;**修回日期:** 2009-04-17

缺血性心脏病的治疗性血管新生(angiogenesis)是目前研究的热点之一,而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其下游内皮源性一氧化氮(endothelium-derived nitric oxide, EDNO)生成通路的调控是较普遍采用的策略之一。噻唑烷二酮(thiazolidinediones, TZDs)类药物是特异性过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferators-activated receptors-γ, PPAR-γ)激动剂,不仅改善2型糖尿病患者胰岛素抵抗,而且在多种心血管疾病的动物模型中显示出保护效应[1]。初步研究显示,PPAR-γ激动剂具有促进内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)产生更多的EDNO,提高内皮祖细胞迁移活性等作用[2,3]。但PPAR-γ激动剂是否促进心肌血管新生,目前尚无一致结论。所以,本研究拟观察PPAR-γ激动剂罗格列酮对大鼠急性心肌梗死后心肌微血管新生的影响,并检测缺血区丝氨酸^{1177}磷酸化内皮型一氧化氮合酶(phosphorylized endothelial nitric oxide synthase at Ser^{1177}, p-eNOS Ser^{1177})和eNOS mRNA表达,以探讨罗格列酮对eNOS表达的调控。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药品

罗格列酮购自太极药业,兔抗鼠CD31、p-eNOS及β-actin抗体购自美国Sigma公司,免疫组化和RT-PCR试剂盒购自武汉博士德生物制剂有限公司,L-NAME为进口分装。

1.2 实验动物及分组

健康清洁级成年SD大鼠60只,8~12周龄,购自重庆医科大学实验动物中心,体质量250~350 g,雌雄不拘,随机数字表法分为假手术组、罗格列酮组、对照组、L-NAME(NOS抑制剂)组、罗格列酮+L-NAME组,每组12只。罗格列酮组及罗格列酮+L-NAME组大鼠于建模后灌胃给予罗格列酮3 mg·kg^{-1}·d^{-1},共2周,以10%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为助溶剂,生理盐水稀释,其余各组给予等量DMSO及生理盐水,L-NAME组及罗格列酮+L-NAME组腹腔内注射给予一氧化氮合酶抑制剂L-NAME40 mg·kg^{-1}·d^{-1} 2周。

1.3 心肌梗死模型建立

除假手术组外其余各组均建立急性心肌梗死动物模型。取大鼠以3.5%水合氯醛300 mg/kg腹腔内注射麻醉,气管插管,呼吸机机械通气,呼吸机人工呼吸,呼吸频率60次/min,潮气量2 ml/100 g,沿胸骨左缘第3~4肋骨切开胸腔并暴露心脏,于冠状动脉前降支中段以6-0无损伤缝合线穿入冠脉下,带硅胶管结扎建立AMI模型,结扎后心肌变为苍白而且搏动减弱以及30 min后心电图肢导联ST段显著抬高大于0.2 mV提示结扎有效。假手术组冠状动脉下穿线而不结扎。

1.4 血管密度的检测

给药2周后处死大鼠,分离左心室。以4%的甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋。每只大鼠由梗死边缘区向正常组织横向切取心肌组织切片5张(切片厚度4 μm),1张用于HE染色。另4张以CD31单克隆抗体行免疫组织化学染色。染色方法参照说明书进行:10%甲醛固定,2%血清封闭2 h,Ⅰ抗(兔抗鼠CD31抗体,1∶200)4 ℃孵育过夜;Ⅱ抗(生物素标记的羊抗兔IgG,1∶100)37 ℃,2 h;SABC复合物(链霉素-生物素-抗生物素-辣根过氧化酶复合物),37 ℃,2 h;DAB显色,复染,中性树脂封片。阴性对照以相同量的正常羊血清代替一抗。每张切片选取5个高倍视野行血管计数并取其平均值,再取4张切片的平均值为该例大鼠的最终血管密度检测值。

1.5 p-eNOS Ser^{1177}检测

采用Western blot方法检测p-eNOS Ser^{1177}蛋白水平,术后2周取梗死边缘缺血区心肌组织并裂解,研磨,组织匀浆,4 ℃ 15 000 r/min,离心15 min,上清加入等量2×Sample Buffer。加热4 min,4 ℃ 15 000 r/min,离心15 min,取上清。检测蛋白浓度,等量上样至12.5% SDS-PAGE,240V电泳15 min,电转至硝酸纤维膜,先加入一抗(p-eNOS 1∶500,β-actin 1∶400),4 ℃过夜。再加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温1 h, DAB显色,凝胶成像分析系统进行密度扫描。

1.6 eNOS mRNA检测

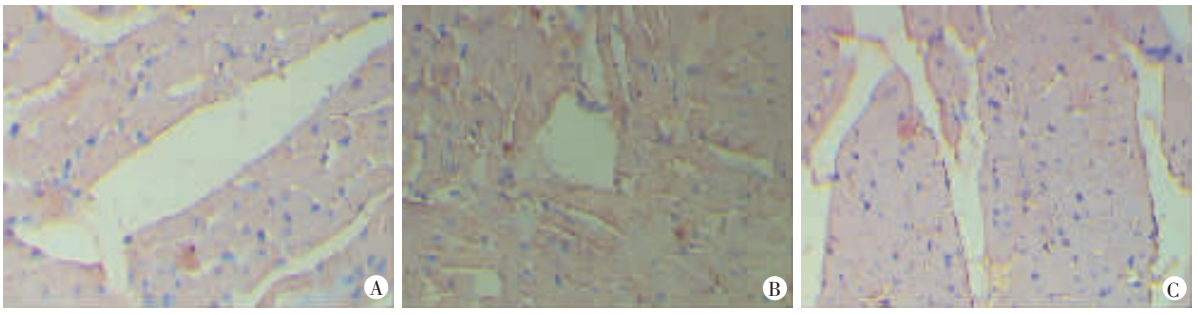
分别取各组大鼠梗死边缘缺血区心肌组织100 mg进行RT-PCR分析。采用Trizol试剂(上海生工产品)按说明书介绍的方法提取组织总RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度,分装后-80 ℃保存备用;采用MMLV逆转录试剂盒(上海生工产品),按操作说明将组织总RNA中的mRNA逆转录成cDNA;以β-actin为内参照行PCR反应,PCR引物采用Primer5.0软件设计,由上海生物工程有限公司合成,eNOS上游引物:5′-TGTGACCCTCACCGATACAA-3′,下游引物:5′-CTGGCCTTCTGCTCATTTTC-3′,产物大小212 bp;β-actin上游引物:5′-GACCTGACTGACTACCTCAT-3′,下游引物:5′-AGCAAGCAGGAGTAGACGA-3′,产物大小542 bp。扩增条件:β-actin:94 ℃预变性3 min;94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s;循环28次;72 ℃延伸8 min。eNOS:94 ℃预变性3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s;循环32圈;72 ℃延伸8 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观测并照相,电泳结果用Quantity One(Bio-Rad公司)分析系统进行电泳条带积分灰度值分析。

1.7 计算机图像分析

将Western blot、RT-PCR图像输入计算机,采用北航CM-2000B型生物医学图像分析系统,测定各显色条带的积分灰度值,用β-actin条带为内参照进行校正,各条带的积分灰度值与β-actin条带的积分灰度值之比半定量表示其表达水平。

1.8 统计学方法

所得数据以$\bar{x} \pm s$表示,用SPSS 10.0统计分析,多组间比较用方差分析和q检验,2组间比较用配对t检验。



A:对照组; B:罗格列酮组; C:罗格列酮 + L-NAME 组

图 1　免疫组化检测罗格列酮对大鼠 AMI 缺血区血管新生的影响　(SABC ×400)

2　结果

2.1　心肌血管密度检测结果

CD31 主要表达于血管内皮,高倍光学显微镜下血管计数结果显示:与对照组比较,罗格列酮组心肌梗死边缘缺血区心肌微血管计数显著增加[(55 ± 12) *vs* (26 ± 6),$P < 0.05$]。而 L-NAME 组及罗格列酮 + L-NAME 组缺血区心肌微血管计数与对照组比较差别无统计学意义[(34 ± 10) *vs* (26 ± 6)、(31 ± 8) *vs* (26 ± 6),$P > 0.05$]。各组大鼠 AMI 缺血区血管新生结果见图 1。

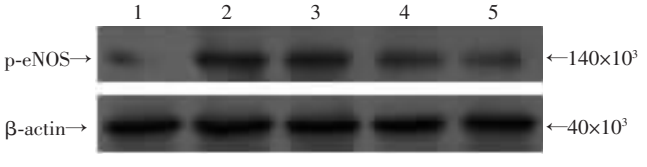
2.2　p-eNOS Ser^{1177} 检测结果

各组样本在特定的位置均可见 p-eNOS Ser^{1177} 蛋白特异的免疫染色反应,将 Western blot 目的条带与标准蛋白分子量相对比。图像分析及统计分析结果表明:假手术组 p-eNOS Ser^{1177} 表达水平很低,对照组 p-eNOS Ser^{1177} 表达增强($P < 0.05$);与对照组比较,罗格列酮组 p-eNOS Ser^{1177} 表达进一步增强($P < 0.05$)。见表 1 及图 2。

表 1　罗格列酮对缺血区心肌 eNOS 蛋白及 mRNA 表达的影响
($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-eNOS Ser^{1177}	eNOS mRNA
假手术组	0.15 ± 0.02	0.09 ± 0.03
罗格列酮组	0.38 ± 0.06^{ab}	0.15 ± 0.06^{a}
罗格列酮 + L-NAME 组	0.34 ± 0.05^{a}	0.18 ± 0.05^{a}
对照组	0.22 ± 0.03^{a}	0.17 ± 0.04^{a}
L-NAME 组	0.24 ± 0.04^{a}	0.16 ± 0.07^{a}

a: $P < 0.05$,与假手术组比较; b: $P < 0.05$,与对照组比较

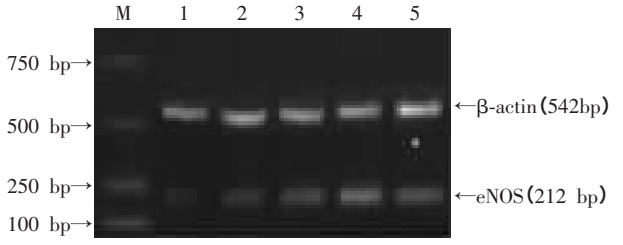


1:假手术组; 2: 罗格列酮组; 3: 罗格列酮 + L-NAME 组; 4:对照组; 5: L-NAME 组

图 2　罗格列酮对大鼠 AMI 后缺血区心肌磷酸化 eNOS 表达的影响

2.3　eNOS mRNA 的表达

通过 RT-PCR 检测,eNOS 的电泳条带清晰。假手术组心肌组织 eNOS mRNA 呈低水平表达,而其余各组 eNOS mRNA 表达均较假手术组显著增强($P < 0.05$);与对照组比较,罗格列酮组 eNOS mRNA 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1 和图 3。



M: 标准; 1:假手术组; 2: 罗格列酮组; 3: 罗格列酮 + L-NAME 组; 4:对照组; 5: L-NAME 组

图 3　罗格列酮对大鼠 AMI 后缺血区心肌 eNOS mRNA 表达的影响

3　讨论

本实验结果表明罗格列酮(3 mg · kg^{-1} · d^{-1}, 2 周)具有明显的促心肌梗死后缺血区心肌血管新生的作用。Huang 等[4]发现匹格列酮能显著提高糖尿病小鼠缺血肢体 CD31 阳性染色微血管密度。而 Panigrahy[5]及 Murata[6]等分别报道了 PPAR-γ 激动剂对肿瘤组织及脉络膜血管新生的抑制作用。从目前的研究来看,不同种类的 PPAR-γ 激动剂在不同的组织或动物模型中对血管新生产生了不同甚至相反的结果。这种情况的出现可能与以下因素有关:①TZDs 类 PPAR-γ 激动剂均有非 PPAR-γ 依赖性效应,而不同种类的 TZDs 类药物可能产生不同的非 PPAR-γ 依赖性效应。②PPAR-γ 激动剂对缺血组织及血供丰富组织血管新生影响可能不同。③血管新生是一个相当复杂的过程,有多种细胞及促血管生长因子及其下游通路参与,故 PPAR-γ 激动剂对体外培养细胞的增殖和迁移以及促血管生长因子表达的影响与在体(*in vivo*)研究可能出现互相矛盾的结果。

本研究中,以 NOS 抑制剂 L-NAME 抑制 eNOS 合成 NO 后,罗格列酮促心肌血管新生作用被完全消除,

提示罗格列酮促心肌血管新生由 NO 通路介导。既往研究表明:EDNO 不仅可以诱导内皮细胞的增殖和迁移[7],还参与干细胞或祖细胞的动员、募集[8],从而介导促血管生长因子如 VEGF 等的促血管新生作用,但外源性 NO 则可能不具有促血管新生作用[9]。Chen 等[10]以 eNOS 基因转移使大鼠心肌梗死后心肌微血管密度显著提高。与硝普钠等外源性 NO 供体产生的 NO 不同,罗格列酮及 eNOS 基因转移的促血管新生作用可能源于 eNOS 合成更多的 EDNO。

Polikandriotis 等[11]体外实验研究表明:罗格列酮增加培养的人脐静脉血管内皮细胞 NO 的释放,其机制与罗格列酮促进 eNOS 的磷酸化有关,而 Gonon 等[12]进一步在大鼠离体心脏的缺血再灌注模型中发现罗格列酮促进 eNOS 合成 EDNO 与其促进 eNOS 的磷酸化从而提高 eNOS 酶活性有关。本实验结果也表明:罗格列酮并未促进 eNOS 基因转录,而是上调磷酸化 p-eNOS Ser^{1177} 水平,由此推测:本研究中,罗格列酮通过促进 eNOS 磷酸化而提高 eNOS 酶活性,使得由 eNOS 产生的 NO 增加,从而发挥其促血管新生作用。

罗格列酮是特异性 PPAR-γ 激动剂,但 eNOS 基因增强子区域并未发现 PPAR 反应元件(PPAR response elements, PPREs),所以罗格列酮并不能促进 eNOS 基因表达[13]。此外,罗格列酮促进 eNOS 磷酸化的上游机制尚未完全阐明,可能参与诱导 eNOS Ser1177 磷酸化的上游通路包括蛋白激酶 B、细胞外信号调节激酶、AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、钙调素依赖激酶 II、蛋白激酶 G、蛋白激酶 A 等,而以上激酶的激活可能是 PPAR-γ 依赖性的[14-17]。尽管如此,调控罗格列酮诱导 eNOS Ser1177 磷酸化的确切机制还需要进一步研究来阐明。

本实验结果表明:罗格列酮长期使用可能通过促进大鼠 AMI 后缺血区心肌 eNOS 磷酸化而提高 eNOS 酶活性,从而释放更多 EDNO,介导心肌血管新生。但临床治疗剂量的罗格列酮对心肌血管新生的影响如何,以及罗格列酮改善心肌血管新生对心脏功能及患者长期预后的影响,以及其促血管新生作用对动脉粥样斑块稳定性的影响等问题还需更多的基础及临床研究来阐明。

参考文献:

[1] 何 泉, 雷 寒, 覃 数, 等. 罗格列酮抑制粘附分子表达减轻大鼠急性心肌梗死再灌注后无再流[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(2): 128-131.

[2] 高凌云, 何作云, 牟 娇. 罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠血清 NOS/NO 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1204-1205.

[3] Pistrosch F, Herbrig K, Oelschlaegel U, *et al*. PPARgamma-agonist rosiglitazone increases number and migratory activity of cultured endothelial progenitor cells[J]. Atherosclerosis, 2005, 183(1): 163-167.

[4] Huang P H, Sata L, Nishimatsu H, *et al*. Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice[J]. Biomed Pharmacother, 2008, 62(1): 46-52.

[5] Panigrahy D, Singer S, Shen L Q, *et al*. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(7): 923-932.

[6] Murata T, He S, Hangai M, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(8): 2309-2317.

[7] Gooch K J, Dangler C A, Frangos J A. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation[J]. J Cell Physiol, 1997, 171(3): 252-258.

[8] Muller P, Kazakov A, Semenov A, *et al*. Pressure-induced cardiac overload induces upregulation of endothelial and myocardial progenitor cells[J]. Cardiovasc Res, 2008, 77(1): 151-159.

[9] Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Haralabopoulos G, *et al*. Evidence that nitric oxide is an endogenous antiangiogenic mediator[J]. Br J Pharmacol, 1994, 111(3): 894-902.

[10] Chen L L, Yin H, Huang J. Inhibition of TGF-beta1 signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through angiogenesis and reduction of apoptosis[J]. Cardiovasc Pathol, 2007, 16(4): 221-230.

[11] Polikandriotis J A, Mazzella L J, Rupnow H L, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(9): 1810-1816.

[12] Gonon A T, Bulhak A, Labruto F, *et al*. Cardioprotection mediated by rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, in relation to nitric oxide[J]. Basic Res Cardiol, 2007, 102(1): 80-89.

[13] Calnek D S, Mazzella L, Roser S, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 23(1): 52-57.

[14] Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284(1): R1-R12.

[15] Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, *et al*. Hsp90 ensures the transition from the early Ca^{2+}-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(35): 32663-32669.

[16] Cho D H, Choi Y J, Jo S A, *et al*. Nitric oxide production and regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by prolonged treatment with troglitazone: evidence for involvement of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma-dependent and PPAR-gamma-independent signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2004, 279(4): 2499-2506.

[17] 缪培智, 金 贤, 汪海娅, 等. 罗格列酮及环格列酮对血管紧张素Ⅱ体外诱导大鼠主动脉外膜成纤维细胞增殖的抑制作用[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(4): 706-709.

(编辑 张 维)