论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0888-05

PPAR-γ通过PI3K/Akt及NF-κB通路调控猪颈动脉支架植入术后的血管重构

郑 波,杨源瑞,周振华,吴虹辰,刘 渠,陈康宁 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经内科)

[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)在猪颈动脉支架植入术后血管重构中的作用。**方法** 将12只小型猪分为正常对照组($n=4$)和介入手术组($n=8$),介入手术组采用猪颈动脉支架植入建立动物模型,分为支架组($n=4$)和罗格列酮(ROSI)组($n=4$)。术后3个月,应用数字减影血管造影(digital subtraction angiography,DSA)技术及HE染色评估血管形态学变化,应用免疫组织化学方法检测p-Akt及NF-κB的表达变化,应用Western blot方法检测支架段血管PPAR-γ、Akt、p-Akt及NF-κB的表达变化。**结果** ①猪颈动脉DSA和HE染色结果发现支架组血管狭窄较ROSI组明显($P<0.01$)。②免疫组织化学染色结果发现支架组颈动脉血管p-Akt和NF-κB表达较正常对照组明显增加($P<0.01$),ROSI组颈动脉血管p-Akt和NF-κB表达较支架组明显降低($P<0.01$)。③Western blot检测结果显示:支架组PPAR-γ蛋白表达水平较正常对照组明显降低($P<0.01$),NF-κB和p-Akt蛋白表达水平较正常对照组明显增加($P<0.05$);ROSI组PPAR-γ蛋白表达水平较支架组明显增加($P<0.01$),NF-κB和p-Akt蛋白表达水平较支架组明显降低($P<0.01$);Akt在正常对照组、支架组和ROSI组中的蛋白表达量差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PPAR-γ可能通过调节PI3K/Akt及NF-κB的表达,从而改善支架植入术后的血管重构。

[关键词] 过氧化物酶体增殖物激活受体-γ;Akt;p-Akt;NF-κB;血管重构;猪

[中图法分类号] R322.121; R363.22; R394.3 [文献标志码] A

PPAR-γ regulates vascular remodeling after pig carotid artery stent implantation through PI3K/Akt and NF-κB pathway

Zheng Bo, Yang Yuanrui, Zhou Zhenhua, Wu Hongchen, Liu Qu, Chen Kangning (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of peroxisome proliferator activated receptors-γ (PPAR-γ) in swine vascular remodeling after carotid artery stent implantation. **Methods** Totally 12 miniature pigs were randomly divided into normal control group ($n=4$) and intervention group ($n=8$). The animals of intervention group were adopted to establish the animal model of carotid artery stenting, and then randomly divided into stent subgroup ($n=4$) and rosiglitazone treatment (ROSI) subgroup ($n=4$). In 3 months after surgery, digital subtraction angiography (DSA) and HE staining was used to assess vascular morphology, immunohistochemical staining was applied to detect the expression of P-akt and NF-κB, and Western blotting was employed to detect the expression of PPAR-γ, Akt, p-Akt and NF-κB. **Results** DSA and HE staining demonstrated that vascular stenosis was more severe in the stent subgroup than the ROSI group ($P<0.01$). Immunohistochemical staining showed that the expression of p-Akt and NF-κB were significantly increased in the carotid artery stent groups than normal control group ($P<0.01$), and that in ROSI subgroup was significantly lower than in the stent subgroup ($P<0.01$). Western blot analysis showed that the protein expression level of PPAR-γ was significantly lower ($P<0.01$), and those of NF-κB and p-Akt were obviously higher in the stent subgroup than the normal control group ($P<0.05$), while that of PPAR-γ was significantly enhanced ($P<0.01$), and those of NF-κB and p-Akt were markedly reduced in the ROSI subgroup than in the stent subgroup ($P<0.01$). However, there was no significant difference in the protein expression of Akt in normal control group, stent subgroup and ROSI subgroup ($P>0.05$). **Conclusion** PPAR-γ might mediate the expression of PI3K/Akt and NF-κB,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271672)

[通信作者] 陈康宁,E-mail:ckn_640826@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140219.1115.017.html(2014-02-19)

and then improve the vascular remodeling after stent implantation.

[**Key words**] peroxisome proliferator activated receptors-γ; Akt; p-Akt; NF-κB; vascular remodeling; swine

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271672). Corresponding author: Chen Kangning, E-mail: ckn_640827@126.com

过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR-γ)属于核受体转录因子超家族成员,主要在脂肪组织中表达,调节糖脂代谢及脂肪细胞的分化。近年发现 PPAR-γ 还表达于巨噬细胞、内皮细胞及血管平滑肌细胞中,具有抗炎、抗动脉粥样硬化和心血管保护等功能[1]。目前,研究证实 PPAR-γ 可以改善高血压引起的血管重构[2],由于支架植入术后支架释放膨胀对血管壁的机械张力刺激和高血压对血管的作用机制类似,因此,本研究探讨 PPAR-γ 对支架植入后血管重构的可能作用,为深入研究 PPAR-γ 改善支架植入后血管重构的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 实验用巴马小型猪 12 只,雌雄不限,3~4 月龄,体质量(19.2±1.4)kg,购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要药物和试剂 罗格列酮钠片(太极集团涪陵制药厂)、鼠抗猪单克隆 NF-κB p65 抗体(GTX13594,GeneTex 公司)、兔抗猪多克隆 PPARG 抗体(AHP1461,ABD Serotec 公司)、兔抗猪多克隆 beta Actin 抗体(GTX16039,GeneTex 公司)、兔抗猪多克隆 Phospho-Akt (Ser473)和 Akt 抗体(Cell Signiling 公司,9271 和 9272)。

1.1.3 主要器械和仪器 5F 及 8F Ⅱ型血管造影用鞘组(RS*A50K10SQ,Terumo 公司),泥鳅导丝(0.035′,Cordis 公司),冠脉导丝(0.014′,Cordis 公司),5F 造影导管及 8F 导引导管(Cordis 公司),4 mm×18 mm 球扩式支架(Apollo,Microport 公司),数字减影血管造影机(DSA)(Artis floor,Siemens 公司),化学发光成像仪(IS4000MM,Kodak 公司)。

1.1.4 动物伦理 实验过程符合动物伦理相关规定,并得到第三军医大学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 12 只小型猪分为介入手术组($n=8$)和正常对照组($n=4$),介入手术组分为罗格列酮(rosiglitazone,ROSI)组[罗格列酮水溶液 0.5 mg/(kg·d)]和支架组(等体积 0.9% 氯化钠注射液),采用鼻饲胃管给药,时间为术前 7 d 至术后 3 个月。

1.2.2 猪颈动脉支架植入 术前 3 d 喂养阿司匹林 100 mg/d 和氯吡格雷 75 mg/d,经右侧腹股沟斜形切口逐层分离暴露股动脉,并置入 8F 动脉鞘,置鞘成功后静推肝素 2 000 U。肝素生理盐水润湿器械,沿泥鳅导丝将 8F 导引导管送至猪颈动脉近端,退出泥鳅导丝,将 4 mm×18 mm 球扩式支架送至颈动脉远端,16 atm 持续 30 s 释放支架,间隔 60 s,重复扩张 1 次,使扩张后与扩张前血管内径比达到(1.1~1.2):1,支架释放后,退出球囊,重复造影确认无严重内膜撕裂和血栓形成,并且远端血管显影良好为手术成功。手术成功后,退出 8F 导引导管,拔出 8F 动脉鞘,结扎股动脉,缝合切口。术后 3 d 每天给予 480 万青霉素钠肌注抗感染,同时每只猪给予阿司匹林 100 mg/d、氯吡格雷 75 mg/d 口服抗血小板聚集,直至动物处死。

1.2.3 血管造影及标本采集 支架植入术后 3 个月,麻醉小型猪,暴露左侧股动脉,穿刺并植入 5F 动脉鞘,沿泥鳅导丝将 5F 造影导管送至猪颈动脉近端,重复造影显示支架段血管情况。造影结束后,静推氯化钾溶液处死动物,取出颈动脉支架段及邻近 5 mm 的血管标本,一部分放入 4% 多聚甲醛中,另一部分放入液氮中保存备用。

1.2.4 血管形态学评估 将 4% 多聚甲醛固定的标本经塑料包埋,硬组织切片机切片[3]行 HE 染色。运用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像编辑,逐步测算血管管腔面积、内弹力膜面积、新生内膜面积及管腔狭窄百分比。其中新生内膜面积=内弹力膜面积-管腔面积,管腔狭窄率=[1-(管腔面积/内弹力膜面积)]×100%。

1.2.5 免疫组织化学染色检测 NF-κB、p-Akt 表达变化 由于树脂对免疫组化染色结果的影响,故将支架段血管用剪刀剪成 2 mm 的小段,在显微镜下仔细分离剥除支架,然后石蜡包埋切片,用 S-P 法检测 NF-κB、p-Akt 的表达,DAB 显色,苏木精复染。结果判定:NF-κB 表达主要定位在细胞核及细胞质,p-Akt 表达主要定位在细胞质。免疫组化染色的结果参考 Krajewski 等[4]标准判断,采用双盲法在显微镜下进行评分。先按阳性细胞比例将无、>1%~25%、>25%~50%、>50%~75% 及 >75%~100% 依次计为 0~4 分;按着色程度分为:基本未着色,染色与背景相似者为 0 分;着色浅,略高于背景者为 1 分;中度着色,明显高于背景者为 2 分;强染,着色深者为 3 分。综合两项后为总得分。

1.2.6 Western blot 检测 PPAR-γ、Akt、p-Akt 及 NF-κB 的表达变化 取出液氮中保存的标本,按照蛋白提取试剂盒操作说明对组织蛋白进行提取,采用 BCA 法测量蛋白浓度。将所提取蛋白经 6% 的 SDS-PAGE 电泳约 1.5 h,分离出目的条带,再分别电转至 PVDF 膜上,将 PVDF 膜置于封闭液中 37℃ 封闭 1.5 h;分别加入相应的一抗于 4 ℃ 孵育过夜;次日 TBST 缓冲液洗膜,再加入二抗 37 ℃ 孵育 1.5 h;TBST 缓冲液洗膜,ECL 法进行显影,用 Image J 图像分析系统成像并分析,以目的蛋白条带灰度值与 β-actin 蛋白条带灰度值的比值表示相对蛋白含量。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 GraphPad Prism 5 统计分析软件,2 组间比较行配对样本 t 检验。

2 结果

2.1 猪颈动脉支架植入术后3个月血管形态学变化

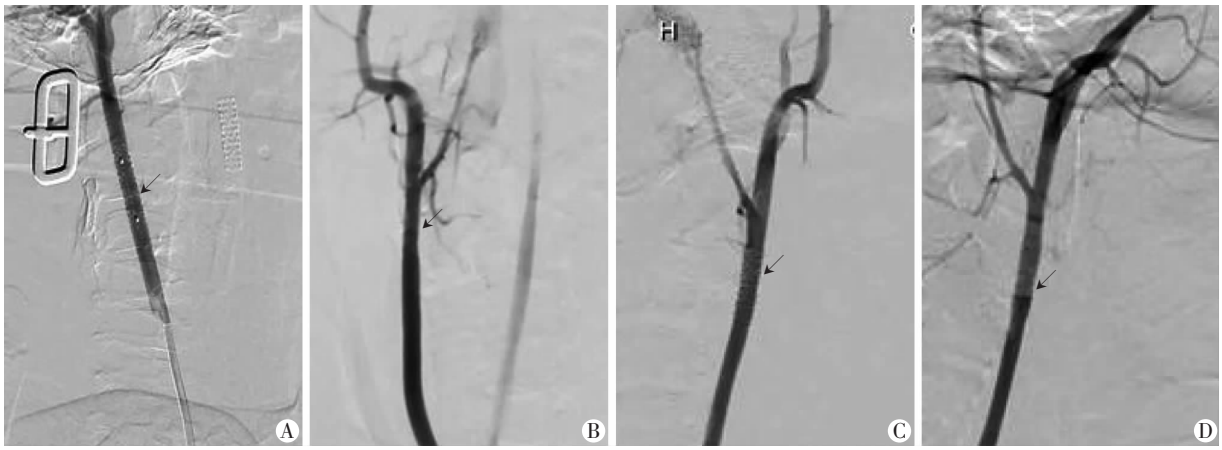
猪颈动脉支架植入术后3个月,DSA检查发现支架组支架植入段颈动脉变细,管腔明显狭窄,ROSI组颈动脉粗细一致,管腔未见明显狭窄(图1)。颈动脉支架段HE染色(图2)可见:支架组动脉内弹力层破坏、局部弹力纤维排列紊乱,内膜明显增厚;ROSI组动脉内弹力层完整,局部弹力纤维排列有序,内膜轻度增厚。运用Image-Pro Plus 6.0软件进行图片编辑后得知:支架组内弹力膜面积与ROSI组内弹力膜面积相仿($P=0.37$);支架组管腔面积明显低于ROSI组管腔面积($P<0.01$);支架组新生内膜面积明显高于ROSI组新生内膜面积($P<0.01$);支架组管腔狭窄率明显高于ROSI组管腔狭窄率($P<0.01$,表1)。

表1 支架组和ROSI组血管面积、管腔狭窄率比较($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血管管腔面积(mm^2)	内弹力膜面积(mm^2)	新生内膜面积(mm^2)	管腔狭窄率(%)
支架组	11.74±0.37	15.74±0.50	4.01±0.56	25.41±2.97
ROSI组	13.63±0.54	15.98±0.51	2.35±0.72	14.60±4.27
P值	<0.01	0.37	<0.01	<0.01

2.2 免疫组织化学染色评估各组颈动脉NF-κB和p-Akt的表达变化

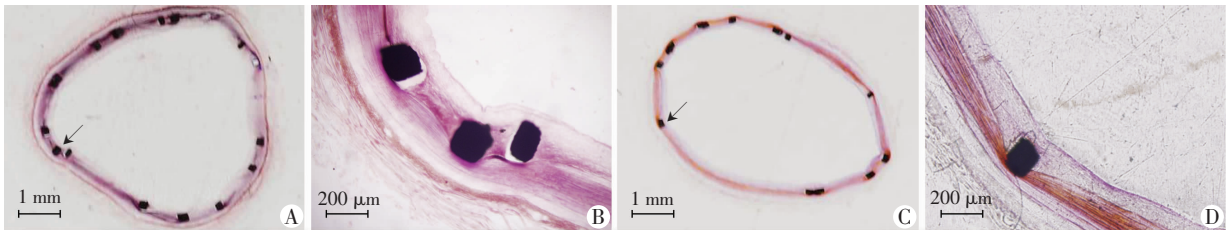
术后3个月,各组颈动脉NF-κB的免疫组织化学染色(图3)提示:正常对照组颈动脉NF-κB未见明显表达;支架组颈动脉NF-κB表达明显(4.63±0.52),着色深,以支架鞘处尤其明显;ROSI组颈动脉NF-κB表达较少(2.13±0.35),着色浅。与正常对照组相比,支架组NF-κB蛋白表达量明显增加($P<0.01$);与支架组相比,ROSI组NF-κB蛋白表达量明显减少($P<0.01$)。



↑:支架植入段

A:支架组支架植入时;B:支架组术后3个月;C:ROSI组支架植入时;D:ROSI组术后3个月

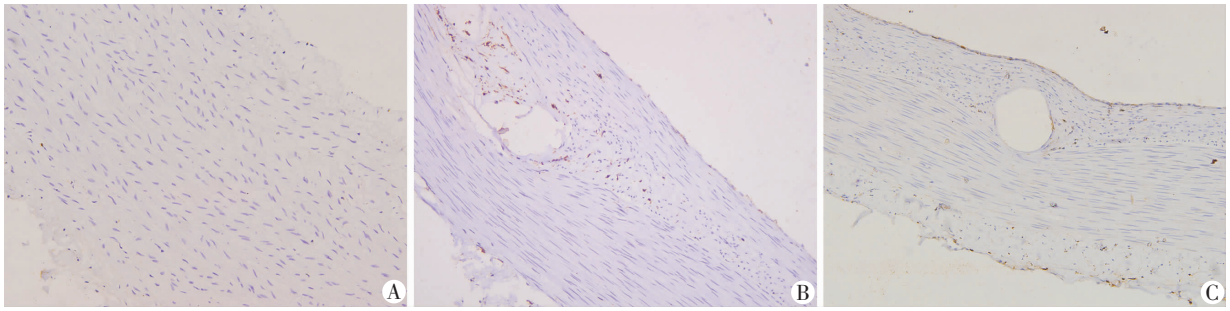
图1 支架组和ROSI组猪颈动脉造影表现



↑:放大部位

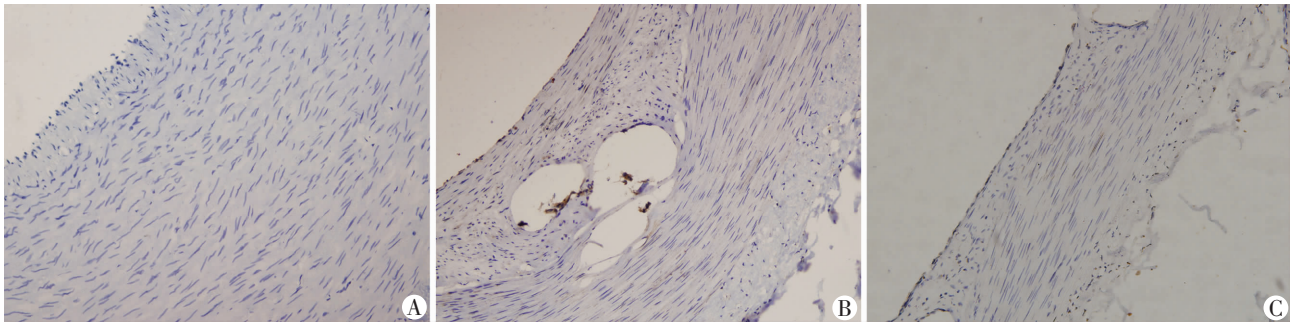
A:支架组(微距摄像);B:支架组;C:ROSI组(微距摄像);D:ROSI组

图2 支架组和ROSI组猪颈动脉HE染色观察



A:正常对照组;B:支架组;C:ROSI组

图3 免疫组化染色观察3组猪支架段颈动脉NF-κB的表达 (S-P ×200)



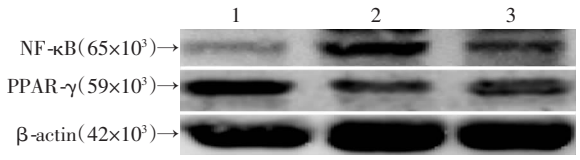
A:正常对照组;B:支架组;C:ROSI 组

图 4 免疫组化染色观察 3 组猪支架段颈动脉 p-Akt 的表达 (S-P ×200)

p-Akt 在正常对照组、支架组和 ROSI 组颈动脉中的相对表达量分别为(0.88 ±0.64)、(4.63 ±0.52)和(2.13 ±0.64)。与正常对照组相比,支架组 p-Akt 的表达明显增加($P<0.01$);与支架组相比,ROSI 组 p-Akt 的表达明显减少($P<0.01$),见图 4。

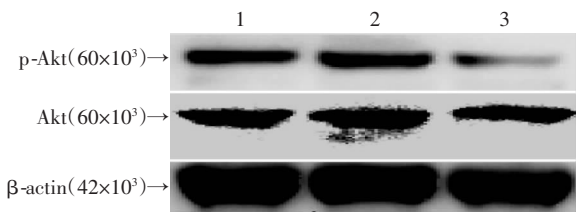
2.3 Western blot 检测各组颈动脉 PPAR-γ、Akt、p-Akt 及 NF-κB 的表达变化

Western blot 检测结果(图 5、6)显示,与正常对照组相比,支架组 PPAR-γ 蛋白表达水平明显降低[(0.482 2 ±0.053 8) *vs* (0.165 1 ±0.043 1),$P<0.01$],NF-κB 和 p-Akt 蛋白表达水平明显增加[(0.047 0 ±0.033 8) *vs* (0.398 4 ±0.047 4);(0.268 8 ±0.043 5) *vs* (0.329 7 ±0.043 7),$P<0.05$];与支架组相比,ROSI 组 PPAR-γ 蛋白表达水平明显增加[(0.165 1 ±0.043 1) *vs* (0.431 0 ±0.041 2), $P<0.01$],NF-κB 和 p-Akt 蛋白表达水平明显降低[(0.398 4 ±0.047 4) *vs* (0.190 9 ±0.049 2);(0.329 7 ±0.043 7) *vs* (0.073 8 ±0.030 2),$P<0.01$]。Akt 在正常对照组、支架组和 ROSI 组中的蛋白相对表达量分别为(0.323 8 ±0.037 0)、(0.364 5 ±0.042 2)、(0.354 0 ±0.038 2),Akt 蛋白表达量在各组差异无统计学意义($P>0.05$)。



1:正常对照组;2:ROSI 组;3:支架组

图 5 Western blot 检测 3 组猪颈动脉血管 PPAR-γ、NF-κB 的表达



1:正常对照组;2:ROSI 组;3:支架组

图 6 Western blot 检测 3 组猪颈动脉血管 Akt、p-Akt 的表达

3 讨论

血管重构是指血管在各种内、外因素损伤后所产生的细胞增殖、坏死、迁移以及细胞外基质合成、降解所致的动态性血管构型变化过程,血管重构导致的管壁增厚以及血管腔狭窄甚至闭塞是引起各种心脑血管疾病的重要病理基础[5-6]。研究表明,脑血管支架植入术后的再狭窄过程与血管重构密切相关。由于支架植入对血管内皮的损伤及术后支架对血管壁的持续刺激,激活血小板、中性粒细胞、单核巨噬细胞、T 淋巴细胞等炎症细胞,合成和分泌多种炎症因子,诱发炎症反应,导致血管平滑肌细胞的迁移和增殖、细胞外基质的堆积、新生内膜形成,从而引起血管重构,当炎症反应过强、持续或反复存在,则导致了支架内再狭窄的发生[7]。

PPAR-γ 为核受体转录因子,是 PPARs 家族的一个成员,主要分布于脂肪细胞,与配体结合后启动多种基因转录和蛋白表达,参与糖和脂肪代谢的调控。此外,PPAR-γ 在血管内皮细胞、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)以及单核细胞上也有丰富表达,具有活跃的血管生物学效应,可改善内皮功能,抑制血管炎症反应,抑制 VSMCs 的增殖和迁移等[8]。最近的研究证实 PPAR-γ 在脑小动脉血管重构中也具有明确的作用。Beyer 等[9]在脑动脉血管重构的研究中证实了 PPAR-γ 对抗血管重构的作用。他们发现 PPAR-γ 基因失活突变小鼠的脑小动脉最大舒张直径减小,血管壁厚度和横断面积增大,脑小动脉发生肥厚性内向性重构,提示 PPAR-γ 在脑血管重构中起到关键的作用。本研究结果显示:支架植入术后 3 个月,支架组内弹力膜面积与 ROSI 组内弹力膜面积相仿($P=0.37$);支架组管腔面积明显低于 ROSI 组管腔面积

($P<0.01$)；支架组新生内膜面积明显高于ROSI组新生内膜面积($P<0.01$)；支架组管腔狭窄率明显高于ROSI组管腔狭窄率($P<0.01$)。ROSI减轻了支架植入后的血管重构，降低了支架内再狭窄。本研究结果进一步证实了PPAR-γ在脑血管重构中起到了关键的作用。

既往研究表明，PPAR-γ激动剂罗格列酮激活PPARγ可抑制巨噬细胞的活化[10]，抑制炎性因子(TNF-α、IL-6、IL-1β)的释放，并抑制NF-κB和AP-1基因的表达，从而抑制了炎症反应及炎症级联反应[11-12]。另外，PPAR-γ激动剂罗格列酮激活PPARγ还可抑制VSMCs中PI3K/Akt信号通路[13]，降低AngⅡ和PDGF诱导DNA和蛋白合成的作用，阻断细胞周期的运行而抑制VSMCs的增殖迁移，因而对AngⅡ和PDGF诱导的细胞生长起负性调节作用[14-15]。

目前，关于PPAR-γ在脑血管重构中的具体机制尚不明确。本实验通过猪颈动脉支架植入建立动物模型，观察PPAR-γ激动剂罗格列酮对颈动脉血管重构的影响。研究发现，支架组PPAR-γ蛋白表达水平较正常对照组明显降低($P<0.01$)，ROSI组PPAR-γ蛋白表达水平较支架组显著增加($P<0.01$)；支架组NF-κB和P-Akt蛋白表达水平较正常对照组明显增加($P<0.05$)，ROSI组NF-κB和P-Akt蛋白表达水平较支架组显著降低($P<0.01$)，Akt蛋白表达量在各组中无统计学意义。我们推测：PPAR-γ可能通过对PI3K/Akt及NF-κB通路的调节，抑制了支架植入术后的炎症反应及VSMC的增殖迁移，从而调节颈动脉支架植入后的血管重构。因此，PPAR-γ可能是脑动脉支架植入术后调控脑动脉重构的关键分子，通过对PPAR-γ的进一步研究可能成为防治脑动脉支架植入术后动脉重构及支架内再狭窄的重要研究点。

参考文献：

[1] Millar J S. Novel benefits of peroxisome proliferator-activated receptors on cardiovascular risk[J]. Curr Opin Lipidol, 2013, 24(3): 233-238.

[2] Zhang L, Xie P, Wang J, *et al*. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension[J]. J Biol Chem, 2010, 285(18): 13666-13677.

[3] Shinke T, Geva S, Pendyala L, *et al*. Low-dose paclitaxel elution by novel bioerodible sol-gel coating on stents inhibits neointima with low toxicity in porcine coronary arteries[J]. Int J Cardiol, 2009, 135(1): 93-101.

[4] Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, *et al*. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2[J]. Am J Pathol, 1994, 145(6): 1323-1336.

[5] 杨源瑞，郑波，周振华，等. 猪颈动脉支架植入术后PPAR-γ的表达变化及对血管平滑肌表型转化的影响[J]. 第三军医大学学报，2014，36(4)：321-325.

[6] Puato M, Piergentili C, Zanardo M, *et al*. Vascular remodeling after carotid artery stenting[J]. Angiology, 2007, 58(5): 565-571.

[7] 许海燕，乔树宾，李建军，等. 炎症和血脂控制对冠状动脉介入治疗术后血管病变的不同影响[J]. 中华医学杂志，2009，89(32)：2249-2252.

[8] Hamblin M, Chang L, Fan Y, *et al*. PPARs and the cardiovascular system [J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(6): 1415-1452.

[9] 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.

[10] Olefsky J M, Glass C K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 219-246.

[11] Wang N, Verna L, Chen N G, *et al*. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(37): 34176-34181.

[12] Diep Q N, El-Mabrouk M, Cohn J S, *et al*. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma[J]. Circulation, 2002, 105(19): 2296-2302.

[13] Bruemmer D, Yin F, Liu J, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(6): 1005-1018.

[14] Bruemmer D, Blaschke F, Law R E. New targets for PPARgamma in the vessel wall: implications for restenosis[J]. Int J Obes (Lond), 2005, 29(Suppl 1): S26-S30.

[15] 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.

(**收稿**：2013-12-24；**修回**：2014-01-21)

(编辑　王小寒)