基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.014

吡格列酮对实验性动脉粥样硬化小鼠治疗作用研究

吴成稳，周志强

（郑州大学第二附属医院普外科，河南 450014）

【摘 要】目的：研究吡格列酮对小鼠动脉粥样硬化（Atherosclerosis，AS）斑块面积以及对基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinases-9，MMP-9）表达的影响。方法：小鼠高脂饮食造模 16 周复制小鼠 AS 模型，从第 8 周开始给予吡格列酮，观察吡格列酮对血脂含量以及 AS 斑块面积的影响，免疫组织化学方法检测 MMP-9 表达。结果：与模型组相比，吡格列酮 10 mg/kg 可以显著降低 AS 小鼠甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白的水平（$P<0.05$），对高密度脂蛋白含量影响不大（$P>0.05$），吡格列酮可以减少主动脉斑块面积（$P<0.05$），降低 MMP-9 的表达（$P<0.05$）。结论：吡格列酮可能通过降低 AS 小鼠 MMP-9 的表达抑制 AS。

【关键词】吡格列酮；动脉粥样硬化；基质金属蛋白酶 9

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-07-26

Study of pioglitazone treatment for experimental atherosclerosis mice

WU Cheng-wen, ZHOU Zhi-qiang

(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibition effect of pioglitazone on the aortic plaque area of murine atherosclerosis and the expression of MMP-9. *Methods*: Mice were fed with high fat diets to build the model of atherosclerosis for 16 weeks. Pioglitazone was given from the 8th week and that effect on blood lipids, atherosclerotic plaque area and the expression of MMP-9 was observed through immunohistochemistry. *Results*: The concentrations of TC, TG and LDL were significantly reduced by pioglitazone at a dose of 10 mg/kg, but pioglitazone had little effect on HDL. Meanwhile, pioglitazone could reduce the aortic plaque area and the MMP-9 expression. *Conclusion*: Pioglitazone might inhibit atherosclerosis in mice by decreasing the expression of MMP-9.

【Key words】pioglitazone; atherosclerosis; matrix metalloproteinases-9(MMP-9)

作者介绍：吴成稳（1983-），男，在读硕士，研究方向：周围血管外科专业。

通信作者：周志强，男，教授，Email：qiang6364@sohu.com。

[11] Kang D H, Park E Y, Yu E S, et al. Renoprotective effect of erythropoietin (EPO): possibly via an amelioration of renal hypoxia with stimulation of angiogenesis in the kidney[J]. Kidney Int, 2005, 67(5): 1683.

[12] Madonna R, Shelat H, Xue Q, et al. Erythropoietin protects myocardin-expressing cardiac stem cells against cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(17): 2921-2928.

[13] Ning B, Zhang A, Song H, et al. Recombinant human erythropoietin prevents motor neuron apoptosis in a rat model of cervical sub-acute spinal cord compression[J]. Neurosci Lett, 2011, 490(1): 57-62.

[14] Sekiguchi N, Inoguchi T, Kobayashi K, et al. Erythropoietin attenuated high glucose-induced apoptosis in cultured human aortic endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(1): 218-222.

[15] Wu H, Dong G, Liu H, et al. Erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion induced lung injury by inhibiting tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 expression[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 602(2-3): 406-412.

[16] Yazihan N, Ataoglu H, Koku N, et al. Protective role of erythropoietin during testicular torsion of the rats[J]. World J Urol, 2007, 25(5): 531-536.

[17] Correa F, Soto V, Zazueta C. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(4): 787-798.

[18] Zhang F, Wang S, Cao G, et al. Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia[J]. Neurobiol Dis, 2007, 25(1): 45-53.

[19] Yazihan N, Ataoğlu H, Yener B, et al. Erythropoietin attenuates hydrogen peroxide-induced damage of hepatocytes[J]. Turk J Gastroenterol, 2007, 18(4): 239-244.

（责任编辑：关蕴良）

近年来，心脑血管疾病发病已超过肿瘤，成为我国发病率和病死率第一的疾病，而动脉粥样硬化（Atherosclerosis，AS）正是其发生、发展重要的病理基础。颈 AS 是全身动脉硬化的局部表现，其斑块稳定性对与脑栓塞脑缺血关系密切，其早期诊断对于血管外科治疗非常重要，严重影响病人的生存[1]。基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinases，MMP）在体内参与细胞外基质的降解与重构，随着病变的发展，MMPs 通过降解细胞外基质而使纤维帽变薄，最终发生破裂[2]。噻唑烷二酮类药物吡格列酮（Pioylitazone，PIO）是 PPAR-γ 激动剂，目前被用于治疗Ⅱ型糖尿病。过氧化物酶体增殖物激活受体γ（Peroxisome proliferators activated receptor-γ，PPAR-γ）是一种配体激活的核受体，能调控脂肪形成、胰岛素敏感度和脂类代谢。此外，PPAR-γ 激动剂在 AS 中表现出重要的抗炎活性，包括：(1)减少斑块巨噬细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞的 MMPs 失稳状态；(2)减少 AS 中重要效应细胞 T 细胞和单核细胞/斑块巨噬细胞的募集[3-5]。本研究旨在通过复制家小鼠 AS 模型，观察 PIO 对 AS 的作用和主动脉壁基质金属蛋白酶 9（Matrix metalloproteinases-9，MMP-9）表达的影响，探讨 PIO 可能的抗 AS 机制。

1 材料和方法

1.1 AS 模型建立及分组

健康雄性 C57BL/6J 品系小鼠 30 只，9 周龄，体重 21~24 g，实验前均以标准颗粒饲料适应性喂养 1 周，称重。随机分为 3 组，每组 10 只，分笼喂养，自由饮水。正常对照组予标准颗粒饲料；模型组给予含 2%胆固醇的颗粒饲料，4 g/只，持续 16 周；PIO 组给予含 2%胆固醇的颗粒饲料，4 g/只，持续16周，但从第 8 周开始每只灌胃 PIO 10 mg/(kg·d)。

1.2 方法

1.2.1 血脂检测 16 周末禁食 12 h，各组动物麻醉后下腔静脉取血，由日本 OLYMPUS 公司生产的 AD2700 全自动生化测试仪检测总胆固醇（Total cholesterol，TC）、甘油三酯（Triglyceride TG）、高密度脂蛋白胆固醇（High density lipoprotein cholesterol，HDLC）和低密度脂蛋白胆固醇（Low density lipoprotein cholesterol，LDLC）。

1.2.2 病理形态学和免疫组织化学检查 采血后剪取主动脉，用 10%甲醛固定。常规石蜡包埋、切片，进行肉眼观察、HE 染色和 MMP-9 免疫组化染色。MMP-9 免疫组化染色按试剂盒说明书进行。即用型 MMP-9 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，计量资料用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）和百分数（%）表示。血脂水平数据、斑块面积数据在模型组与正常组比较以及 PIO 组与模型组比较组间比较时采用 t 检验；染色强度分值等数据在 PIO 组和模型组比较时也采用 t 检验，可得出 P 值，当 $P<0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血脂水平比较

模型组 TC、TG 和 LDL-C 与正常对照组相比明显高于正常对照组，经 t 检验得出的 t 值分别为 2.735、2.972、2.944，相应的 P 值分别为 0.035、0.031、0.029，而 HDL-C 则无明显差异（t=1.876，P=0.152）；PIO 组 TC、TG 和 LDL-C 与模型组相比则明显下降，经 t 检验得出 t 值分别为 3.035、2.972、2.944，相应的 P 值分别为 0.012、0.014、0.013，而 HDL-C 无明显差异（t=1.725，P=0.163），结果见表 1。

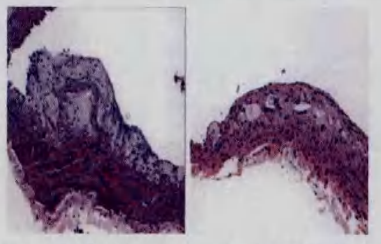
表 1 PIO 对动脉粥样硬化小鼠 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10 mmol/L）

组别	正常组	模型组	PIO组
TC	2.35 ± 0.31	13.76 ± 1.40*	10.54 ± 2.50#
TG	1.54 ± 0.22	3.67 ± 0.46*	2.11 ± 0.44#
LDL-C	1.34 ± 0.17	12.89 ± 3.11*	7.34 ± 2.54#
HDL-C	1.55 ± 0.21	1.98 ± 0.57	1.45 ± 0.43

*：P<0.05，模型组与正常对照组比较；#：P<0.05，PIO 组与高脂血症组比较

2.2 主动脉病理形态学改变

体视显微镜观察，模型组主动脉弹性明显下降，易碎，血管内膜可见大量泡沫细胞，泡沫细胞数量多，体积大，不规则，动脉内膜有明显隆起；PIO 组粥样病变明显减轻，主动脉大部分呈透明状，血管腔内泡沫细胞有增生，但较对照组明显减少，且动脉较对照组柔软有弹性，见图 1。



A. 模型组 B. PIO 组

图 1 模型组和 PIO 组小鼠动脉横截面 AS 病变的比较（HE×400）

2.3 主动脉壁斑块面积的改变

主动脉 AS 斑块定量分析图像分析测量结果发现，模型组斑块总面积以及斑块总面积/动脉总面积比与正常组相比明显增加，经 t 检验得出的 t 值分别为 2.735 和 2.972，相应的 P 值分别为 0.015 和 0.014；PIO 组斑块总面积以及斑块总面积/动脉总面积比与模型组相比明显减小，经 t 检验得出 t 值分别为 3.035 和 3.117，相应的 P 值分别为 0.012 和 0.011，结果见表 2。

2.4 MMP-9 免疫组织化学改变

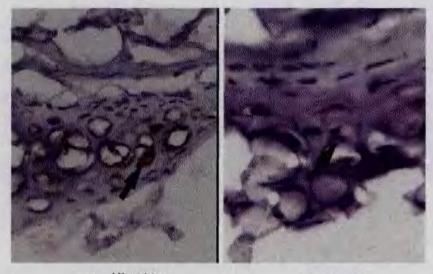
PIO 组 MMP-9 免疫组织化学染色强度、阳性细胞率、总积分与模型组相比明显降低，经 t 检验得出的 t 值分别为 2.859、3.124、2.645，相应的 P 值分别为 0.034、0.011、0.041，

结果见图 2 和表 3。

表 2 模型组、PIO 组及正常组主动脉面积与斑块面积比较

分组	动脉总面积	斑块总面积	斑块总面积/动脉总面积（%）
正常组	235.65	2.32	0.98
模型组	274.65	28.31*	10.31*
PIO组	289.33	5.84#	2.25#

*：$P<0.05$，模型组与正常对照组比较；#：$P<0.05$，PIO 组与模型组比较



A. 模型组　　B. PIO 组

图 2 MMP-9 在主动脉粥样斑块组织中的阳性表达（×100）

表 3 MMP-9 免疫组织化学表达（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

分组	染色强度（分）	阳性细胞率（%）	总积分（分）
模型组	2.3 ± 0.6	37.6 ± 12.5	4.3 ± 1.3
PIO组	1.2 ± 0.4#	15.9 ± 7.8#	2.5 ± 0.8#

#：$P<0.05$，PIO 组与模型组比较

3 讨 论

在 AS 的发生和发展过程中，动脉壁内膜是最早累及部位，当斑块形成并突入管腔时，由于富含脂质或管壁应力的增大，斑块可发生破裂，暴露的脂质和胶原可激活血小板，启动凝血反应形成血栓，则构成脑梗塞的重要危险因素。斑块的破裂易发生于纤维帽的边缘处，这些易破裂的区域含有大量的巨噬细胞，而 MMPs 主要存在于巨噬细胞丰富的肩部区域，大量的实验证实巨噬细胞源性的 MMPs 参与斑块的破裂[6,7]。MMP-9 又称为明胶酶 B，是 MMPs 家族中的一个重要成员，被认为与 AS 和血管重建关系最为密切。

PPAR-γ 是一类由配体激活的核转录因子，属于Ⅱ型核受体超家族成员，在受到配体激动剂激活后，与目标基因启动子内的反应元件结合，调控基因的转录过程。PPAR-γ 主要表达于脂肪细胞和肝细胞，在肾脏系膜细胞也有一定数量的表达，在脂肪细胞分化和脂质代谢中起着重要作用[8]。大量文献报道 PPAR-γ 可以从多方面发挥抗 AS 的作用，而其中一个关键环节就是抑制 MMP-9 的合成。噻唑烷二酮类降糖药是人工合成的 PPAR-γ 高亲和性配体，其主要药理作用是改善胰岛素抵抗及相关代谢紊乱，通过激活脂肪组织的 PPAR-γ，减少游离脂肪酸的生成；通过提高骨骼肌与肝脏对胰岛素的敏感性，增加骨骼肌对糖的摄取和减少肝糖的产生；改善胰岛 β 细胞功能。已上市的噻唑烷二酮类药物有曲格列酮、罗格列酮、吡格列酮，罗格列酮和吡格列酮已广泛用于胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的治疗[9]。已有文献证实，格列酮类药物减少 AS 小鼠模型主动脉根部 TNF-α 和 MMP-9 表达，抑制炎症反应[10]，AS 小鼠通过罗格列酮治疗而达到抑制 MMPs 表达和斑块巨噬细胞活性目的[11]。

PIO 对粥样斑块中 MMP-9 的作用尚未见报道。研究发现 PIO 下调小鼠主动脉壁粥样斑块中 MMP-9 表达，MMP-9 免疫组织化学表达在 PIO 组的染色强度、阳性细胞率、总积分均低于模型组。同时，研究也证实 PIO 能减轻小鼠主动脉 AS 程度，PIO 组斑块面积比明显低于模型组。PIO 可能通过激活 PPAR-γ，降低血浆 LDL-C、减少 MMP-9 的表达从而起到治疗 AS 作用。

参 考 文 献

[1] Falk E, Shah P K, Fuster V. Coronary plaque disruption[J]. Circulation, 1995, 92(3): 651-657.

[2] Dollery C M, McEwan J R, Henney A M, et al. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease[J]. Circulation Research, 1995, 77(5): 851-863.

[3] Brown J D, Plutzky J. Peroxisome proliferator activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets[J]. Circulation, 2007, 115(4): 514-518.

[4] Lehrke M, Lazar M A. The many faces of PPAR gamma[J]. Cell, 2005, 123(6): 993-999.

[5] Ricote M, Valledor A F, Glass C K, et al. Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004, 24(2): 221-230.

[6] Kong Y Z, Yu X, Tang J J, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques[J]. Atherosclerosis, 2005, 178(1): 207-215.

[7] Marx N, Froehlich J, Siam L, et al. Antidiabetic PPAR {gamma}-activator rosiglita-zone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2003, 23(2): 276-283.

[8] Asano T. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgammal) expresses in rat mesangial cells and PPARgamma agonists modulate its differentiation[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1497(1): 148-154.

[9] Wang M, Tafuri S. Modulation of PPAR: A activity with pharmaceutical agents: treatment of insulin resistance and atherosclerosis[J]. Journal of cellular biochemistry, 2003, 89(1): 38-47.

[10] Li A C, Brown K K, Silvestre M J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. J Clin Invest, 2000, 106(4): 523-531.

[11] Chang K. Pioglitazone suppresses inflammation in vivo in murine carotid atherosclerosis: Novel detection by dual-target fluorescence molecular imaging[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2010, 30(10): 1933-1939.

（责任编辑：冉明会）