基础研究 文章编号:0253-3626(2010)02-0216-04

吡格列酮对兔动脉粥样硬化血管壁 ICAM-1 表达的影响

许庆华[1], 关瑞锦[2],韩莉莉[3],李小林[2],王洪燕[2]

(1. 福建医科大学附属泉州第一医院呼吸科,泉州 362000; 2. 福建省立医院 福建省心血管病研究所心内科,福州 350000; 3. 福建省心血管病重点实验室,福州 350000)

【摘 要】目的:探讨吡格列酮对动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)血管壁细胞间粘附分子(Intercellular adhesion molecule-1,ICAM-1)表达的影响。方法:新西兰兔随机分成 5 组:A:正常对照,B:正常 + 低剂量吡格列酮(Pioglitazone,PIO),C:病理对照,D: 病理+低剂量 PIO,E: 病理+高剂量 PIO。采用免疫组化及逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 的方法观察吡格列酮血管壁 ICAM-1 蛋白及 mRNA 表达的影响。结果: AS 斑块内有 ICAM-1 蛋白和 mRNA 高表达, PIO 可抑制 ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达($P<0.05$),高剂量较低剂量抑制程度更大($P<0.05$)。结论: PIO 可抑制 AS 斑块 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达,进而发挥抗 AS 炎症的作用。

【关键词】动脉粥样硬化;吡格列酮; 噻唑烷二酮; 细胞间黏附分子 -1; 炎症

【中国图书分类法分类号】R543.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-28

Effect of pioglitazone on expression of ICAM-1 in an atherosclerotic rabbit aorta

XU Qing-hua, et al

(*Department of respiratory Medicine, the First Hospital of Quanzhou Affiliated Fujian Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of pioglitazone (PIO) on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in atherosclerotic rabbit aorta. *Methods*: Newzealand white rabbits were divide into 5 groups: normal control, normal+low dose of PIO, and AS control, AS+low dose of PIO, AS+high dose of PIO. Immunohistochemistry was used to detect the protein of ICAM-1. Reverse transcription -polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA of ICAM-1. *Results*: ICAM-1 protein and mRNA in AS plaques. PIO could inhibit the expression of ICAM-1 protein and mRNA ($P<0.05$). The effect of high dose was more than that of were highly expressed low dose($P<0.05$). *Conclusion*: PIO could inhibit the expression of ICAM-1 and further produce its anti-inflammatory effect on AS.

【Key words】Atherosclerosis; Pioglitazone; Thiazolidinedions; ICAM-1; Inflammation

作者介绍:许庆华(1974-),男,硕士,

研究方向:心肺血管病发病机理与治疗。

nocareinoma:implication for a novel diagnostic marker[J].Anticancer Res, 2004,24(2B):881-886.

[8] Electron Kebebew, Miao Peng, Patrick A, et al.Id-1 gene expression is up-regulated in hyperplastic and neoplastic thyroid tissue and regulates growth and differentiation in thyroid Cancer Cells[J]. J Clin Endocrinol Metab,2004,89(12):6105-6011.

[9] Damdinsuren B,Nagano H,Kondo M, et al.Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation[J]. Int J Oncol,2005,26(2):319-327.

[10] Hiu-Fung Yuen, Chee-Wai Chua, Yuen-Piu Chan, et al. Id proteins expression in prostate cancer: high-level expression of Id_4 in primary prostate cancer is associated with development of metastases[J].Modern Pathology,2006,19(7):931-941.

[11] Ling M T, Wang X, Ouyang X S, et al.Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id_1 induced serum independent prostate cancer cell growth[J].Oncogene,2002,21(55):8498-8505.

[12] 李晓军,汪 萍,贾 丽,等.Id_3-EGFP 融合基因表达载体的构建及其在人肺癌细胞 A549 中的表达[J].Chin J LabMeal,2006,29(12): 1111-1115.

[13] Anna Lasorella, Takuma Uo and Antonio Iavarone. Id proteins at the cross-road of development and cancer[J]. Oncogene,2001,20(58): 8326-8333.

[14] Ming-Tat Lingy, Tracy C.M.Lauy, Chun Zhou, et al. Overexpression of Id_1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor(VEGF)[J]. Carcinogenesis, 2005,26(10):1668-1676.

(责任编辑:关蕴良)

动脉粥样硬化(Atherosclerosis,AS)是一个慢性炎症过程,炎症因子参与介导 AS 各阶段的炎症反应[1]。吡格列酮(Pioglitazone,PIO)是新一代噻唑烷二酮类(Thiazolidinedions,TZDs)药物,国外荟萃分析和大型临床实验已显示其优越的抗 AS 潜力和应用价值。本研究用 PIO 干预治疗 AS 动物模型,探讨 PIO 对血管壁 ICAM-1 表达的影响以及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组

雄性新西兰白兔 55 只(体重 1.9 ~ 2.3 kg,购自上海生旺实验动物有限公司),实验室适应性喂养普通饲料 10 d。随机分为 5 组:A 正常对照组(8 只):假手术+普通饲料+安慰剂喂养;B 正常 + 低剂量 PIO 组(11 只):假手术+普通饲料+吡格列酮(2.5 mg/(kg·d));C 病理对照组(12 只):腹主动脉内膜损伤+高脂饲料+安慰剂喂养;D 病理+低剂量 PIO 组(12 只):腹主动脉内膜损伤+高脂饲料+低剂量吡格列酮(2.5mg/(kg·d));E 病理+高剂量 PIO 组(12 只):腹主动脉内膜损伤+高脂饲料+高剂量吡格列酮(10 mg/(kg·d))。PIO(商品名艾可拓,天津武田药品有限公司提供)剂量参考 Masahiko[2]的实验确定。

1.2 AS 模型制作

实验开始,A 和 B 组继续喂养普通饲料 100 g/d,C、D、E 组开始喂养高脂饲料(1%胆固醇+10%蛋黄粉+5%猪油+84%普通饲料)100 g/d。实验第 2 周末,对 C、D、E 组行腹主动脉内膜损伤术[3]。A 和 B 组手术只进行右股动脉远端结扎,未送入球囊损伤腹主动脉内膜。术后按上述饲料继续喂养至第 10 周末。

1.3 给药与取材

实验第 3 周开始,即手术后第 1 d,开始灌胃给药。A、C 组每只兔 10 ml 生理盐水灌胃,B、D 组每只兔按 2.5 mg/kg 计算 PIO 药量,稀释于 10 ml 生理盐水灌胃,E 组每只兔按 10 mg/kg 计算药量,稀释于 10 ml 生理盐水灌胃,每日 1 次。实验第 10 周末,采用空气栓塞法处死动物。取双侧髂动脉分权处至以上 2 cm 处动脉,生理盐水冲净管腔血液,标记后置入液氮罐,统一转移至 -50℃冰箱保存,备 RT-PCR 用。再向上剪取 1 cm 动脉,冲净,保存于 4%中性甲醛溶液 12 ~ 24 h,备免疫组化染色用。

1.4 免疫组化检测 ICAM-1 表达

标本石蜡包埋,切片厚度 5 μm。免疫组化采用 SP 法(SP 试剂盒购自福建迈新生物技术公司),标记抗体采用单克隆小鼠抗人 ICAM-1 抗体(sc-8439)(SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC 美国),标本氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,同时作不加一抗而其它条件均相同的阴性对照。光镜下阅片,观察每张切片 5 个具有代表性的高倍视野,每个视野计数 100 个细胞。具体判断标准如下:阳性反应为细胞浆呈棕黄色。根据染色程度进行评分:染色强度弱者(淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色)为 1 分,染色强度强者(呈黄至棕黄色染色)为 3 分,中等染色强度者(染色强度介于前两者之间)为 2 分;根据着色细胞百分率进行评分:着色细胞占计数细胞百分率 <5%为 0 分,5 ~ 25%为 1 分,26 ~ 50%为 2 分,51% ~ 75%为 3 分,>75%为 4 分。将每张切片染色强度得分与着色细胞百分率得分各自相乘,为其最后得分。得 0 ~ 1 分为阴性(-),得 2 ~ 3 分为弱阳性(+),得 4 ~ 5 分为中等阳性(++),6 分及以上为强阳性(+++)。

1.5 RT-PCR 检测 ICAM-1mRNA 表达

1.5.1 引物设计与合成 从 Genbank 查获目标基因 ICAM 及内参标基因三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的 mRNA 序列,设计合成引物。ICAM-1 登陆号 DQ893785 扩增产物片断:407 bp,上游引物:5'-GAGCTGTTTGAGAACACCTC-3' 下游引物:5'-TCACACTTCACTGTCACCTC-3'。GAPDH 登陆号 L23961 扩增产物片断:476 bp,上游引物:5'-GAGCTGAACGGGAAACTCAC- 3';下游引物:5'-GGTCTGGGATGGAAACTGTG- 3'。

1.5.2 组织总 RNA 抽提 参照 Trizol RNA 提取试剂盒说明书(Gibco 公司)的流程提取组织总 RNA。用分光光度计测定 RNA 量和纯度 OD_{260}/OD_{280} 均在 1.7 ~ 2.0 之间。

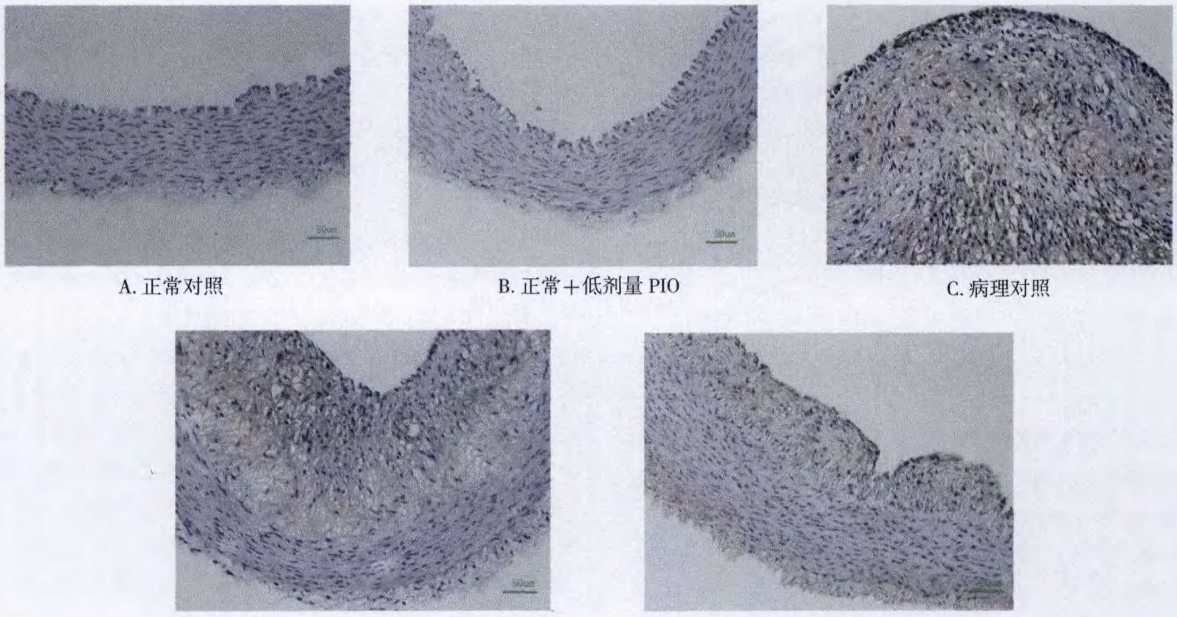
1.5.3 cDNA 合成 参照反转录试剂盒 (Promega 公司)说明书进行。反应体系:总 RNA 1 μg,10 × 逆转录 Buffer 2 μl,25 mmol/l $MgCl_2$ 4 μl,100 mmol/l dNTP 2 μl,RNA 酶抑制剂 0.5 μl,AMV 逆转录酶 15 U,随机引物 0.5 μg,加 DEPC-H_2O 至总体积 20 μl。反应条件为:42℃ 15 min,95℃ 5 min,4℃ 5 min。

1.5.4 半定量 PCR 取 2 μl cDNA 进行目标基因和内参标基因 PCR 反应。反应体系:cDNA 2 μl, Taq 酶 2 U,10 mmol/l dNTPs 0.5 μl,10 × PCR buffer 2.5 μl,25 mmol/l $MgCl_2$ 1.5 μl,10 pmol/μl 上游引物 1 μl,10 pmol/μl 下游引物 1 μl, 加去离子水至 25 μl。ICAM-1 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,56℃退火 40 s,72℃延伸 40 s,最后 72℃延伸 8 min;循环次数分别设定为 28、30、32、34、36、38。GAPDH 反应条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 40 s,72℃延伸 40 s,最后 72℃延伸 8 min;循环次数分别设定为 24、26、28、30、32、34。

1.5.5 电泳及图像分析 各取 PCR 产物 5 μl,经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,应用 Imagemaster VDS-CL 对凝胶成像,计算 PCR 产物电泳条带灰度积分,并以 GAPDH 的灰度积分进行标准校对。目标基因 PCR 产物的相对量=目标基因电泳条带灰度积分 / GAPDH 电泳条带灰度积分。

1.6 统计学处理

计量资料(ICAM-1 PCR 产物相对量)用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行统计学处理。对等级资料(ICAM-1 免疫组化染色积分)采用非参数检验(秩和检验),多个样本均数间比较用 Kruskal-Wallis H 检验,两样本均数间比较用 Mann-Whit-



A. 正常对照　B. 正常＋低剂量 PIO　C. 病理对照

D. 病理＋低剂量 PIO　E. 病理＋高剂量 PIO

图 1　各组 AS 斑块内 ICAM-1 表达(免疫组化染色，×100)

表 1　各组 ICAM-1 染色积分比较

分组	－(例)	＋(例)	＋＋(例)	＋＋＋(例)	秩和/例数
A 正常对照	6	2	0	0	10.38
B 正常＋低剂量 PIO	8	2	0	0	9.80
C 病理对照	0	0	3	8	42.05▲
D 病理＋低剂量 PIO	0	0	7	5	37.54▲■
E 病理＋高剂量 PIO	0	4	5	2	29.59▲■◆

▲与 A 组比较 $P<0.05$，■与 C 组比较 $P<0.05$，◆与 D 组比较 $P<0.05$



A. 正常对照；B. 正常＋低剂量 PIO；C. 病理对照；D. 病理＋低剂量 PIO；E. 病理＋高剂量 PIO

图 2　各组 ICAM-1mRNA RT-PCR 产物电泳

表 2　各组 ICAM-1 mRNA 产物相对量比较($\bar{x}\pm s$)

分组	ICAM-1/GAPDH
A 正常对照	0.54 ± 0.04
B 正常＋低剂量 PIO	0.53 ± 0.05
C 病理对照	0.88 ± 0.07▲
D 病理＋低剂量 PIO	0.70 ± 0.03▲■
E 病理＋高剂量 PIO	0.64 ± 0.04▲■◆

▲与 A 组比较 $P<0.05$，■与 C 组比较 $P<0.05$，◆与 D 组比较 $P<0.05$

ney U 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义(显著性)。数据处理采用 SPSS12.0 统计软件。

2　结　果

各组实验动物共 52 只存活至第 10 周末。正常对照组和病理＋低剂量 PIO 组全部存活；正常＋低剂量 PIO 存活 10 只，1 只死于灌胃给药误入气管窒息；病理对照和病理＋高剂量 PIO 各存活 11 只，各有 1 只死于腹泻。

2.1　AS 斑块内 ICAM-1 蛋白表达

免疫组化显示，正常对照组和正常＋低剂量 PIO 组腹主动脉壁内皮细胞和平滑肌细胞胞浆中有轻微 ICAM－1 蛋白表达。病理对照组 AS 斑块内的内皮细胞、泡沫细胞、平滑肌细胞的胞膜和胞浆有广泛强烈的 ICAM-1 蛋白表达。病理＋低剂量 PIO 组血管内膜的内皮细胞和泡沫细胞的胞膜和胞浆有较多 ICAM-1 蛋白表达，平滑肌平滑肌细胞胞浆仅有轻度表达，病理＋高剂量 PIO 组 ICAM-1 蛋白分布与之相同，表达强度、数量更少(图 1，表 1)。

2.2　AS 斑块内 ICAM-1mRNA 表达

各组血管 AS 斑块内 ICAM－1mRNA RT-PCR 产物电泳图及比较见(图 2、表 2)。结果显示 PIO 可抑制 AS 兔斑块内 ICAM-1mRNA 表达($P<0.05$)，高剂量较低剂量抑制程度更大

（$P<0.05$）。低剂量 PIO 对正常兔血管 ICAM-1mRNA 表达未产生有统计学意义的影响（$P>0.05$）。

3 讨 论

3.1 TZDs 作用的分子机制[4]

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（peroxisome proliferator-activated receptor-γ，PPARγ）是配体激活的转录因子——核受体家族成员之一，在 AS 病变中的内皮细胞、单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、平滑肌细胞中均有表达，参与这些细胞代谢活动和结构变化，对 AS 的发生、发展、转归发挥重要的调控作用。TZDs 是人工合成特异性 PPARγ 激动剂。在血管细胞内，PPARγ 被 TZDs 激活后，一方面，与另一核受体——视黄醇类 X 受体形成异二聚体，随后结合在靶基因启动子区的特异性 PPAR 反应元件（PPREs）上，进而调节控制脂质和糖类代谢的基因，即转录激活。这些 PPREs 由一致的 AGGTCA 重复序列组成，中间被 1 或 2 个核苷酸隔开。另一方面，PPARγ 激活后还能通过防碍其他信号通路及其下游转录因子（包括 NFκB、AP1、STAT 等），以非 DNA 结合的方式抑制炎症基因表达；或者与 DNA 结合后，通过募集辅阻遏物，抑制炎症基因发挥抗炎特性，即转录抑制。

3.2 吡格列酮对 ICAM-1 的作用

黏附分子是主要的炎症因子，与 AS 的形成、发展及稳定性密切相关[1]。主要分为五大类：整合素家族、选择素家族、免疫球蛋白超家族、钙离子依赖的细胞黏附素家族、其它未归类的分子。免疫球蛋白超家族是一组含有多个免疫球蛋白样细胞外结构域的糖蛋白，与整合素家族黏附分子互为受体与配体，参与细胞识别和黏附。主要有 ICAM-1、血管细胞黏附分子（VCAM-1）、血小板内皮细胞黏附分子（PECAM-1）。ICAM-1 是一个高糖化（8 个糖化位点）的 90 ku 的整合膜蛋白，其结构含有 5 个类似免疫球蛋白区，一个膜转移蛋白和一个细胞质部位，它在内皮细胞、上皮细胞、单核细胞和淋巴细胞上均有表达。ICAM-1 的表达需要 mRNA 和蛋白质的生物合成。在通常情况下 ICAM-1 的表达处于低水平，但在各种炎症介质的刺激下其表达迅速增加[5]。

目前，吡格列酮对 AS 斑块 ICAM-1 作用的研究罕见报道。本实验观察到，ICAM-1 的 mRNA 和蛋白在病理对照组 AS 斑块内高度表达，ICAM-1 蛋白分部于内皮细胞、泡沫细胞的胞膜和胞浆中。PIO 干预可减少 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达，并呈一定的量效关系，进而发挥抗 AS 炎症的作用。

相关报道可供参考，Cuzzocrea 等[6]建立角叉藻聚糖诱导的气道水肿和胸膜炎动物模型，罗格列酮与角叉藻聚糖同时皮下注射或提前注射均能发挥有效的抗炎作用。罗格列酮减少动物模型肺组织 ICAM-1 的表达。提前给予 PPARγ 拮抗剂双酚丙烷二环氧丙醚（BADGE）可明显对抗罗格列酮的抗炎作用。提示罗格列酮对 ICAM-1 的抑制作用与激活 PPARγ 有关。Jackson 等[7]实验显示：环格列酮和曲格列酮可抑制人主动脉内皮细胞 VCAM-1 的 mRNA 和蛋白表达。他认为，NF-B 是粘附分子的关键的转录因子，与其他粘附分子特异性转录因子协同作用。推测 NF-B 是由一类特异性亚基（如：p50（NF-B1），p52（NF-B2），p65（Rel A），c-Rel，and Rel B）组成的二聚物。TZDs 通过抑制特异性 NF-κB 二聚物形成或在 VCAM-1 启动子区抑制辅助转录因子而抑制 VCAM-1 表达。已知人内皮细胞 ICAM—1 基因启动子区也有 NF—κB 的结合位点[8]，吡格列酮抑制 ICAM—1 表达的分子机制能否用上述其他 TZDs 药物抑制 VCAM-1 的机制来解释？需要更进一步实验证实。

参 考 文 献

[1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999,340(2):115-126.

[2] Masahiko I, Akihiko H, Hiroshi Y, et al.Characterization of an inhibitory effect of pioglitazone on balloon-Injured vascular smooth muscle cell growth[J].Metabolism,2001,50(8):955-962.

[3] 仲 琳，张 运，张 梅，等.兔动脉粥样硬化易损斑块模型的建立[J].基础医学与临床，2005，25(4):370-374.

[4] Marx N, Duez H, Fruchart JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells[J]. Circulation Research,2004,94(9):1168-1178.

[5] Diamond MS, Staunton DE, Marlin SD, et al. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation[J].Cell,1991,65(6): 961-971.

[6] Cuzzocrea S,Pisano B,Dugo L,et al. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation[J]. Eur J Pharmacol, 2004,483(1):79-93.

[7] Jackson SM, Parhami F, Xi XP, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial cell interaction[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,1999, 19(19):2094-2104.

[8] Harry C,Thomas P. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial Cells[J]. J Biol Chem,1995,270(2):933-943.

（责任编辑：关蕴良）