维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)03-0391-04

罗格列酮抑制鼠动脉平滑肌细胞增殖的实验研究

周晓莉[1]，雷 寒[1]，柳 青[2]

（1. 重庆医科大学附属第一医院心内科，重庆 400016；2. 重庆医科大学附属第一医院中心实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨 PPAR-γ 合成型配体罗格列酮对大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响。方法：采用组织贴块法原代培养大鼠主动脉平滑肌细胞并传代，根据细胞生长的形态特点和免疫细胞化学染色进行细胞鉴定。取第五代纯化细胞血清饥饿 24h，然后用 PDGF-BB 或 bFGF（20ng/ml）刺激 24h，按实验分组在 30min 前加或不加入不同浓度（1~10umol/L）的罗格列酮进行预处理，应用 MTT 法检测细胞增殖活力，流式细胞仪分析细胞周期分布。结果：镜下培养细胞呈典型的“谷峰状”生长，免疫细胞化学染色显示胞浆内特异的 α 平滑肌肌动蛋白阳性表达。PDGF-BB 或 bFGF 均能诱导平滑肌细胞增殖，MTT 中 A_{490} 值增加，G_0/G_1 期细胞减少，S 期细胞增多。罗格列酮预处理能够抑制平滑肌细胞增殖，抑制细胞从 G_0/G_1 期向 S 期转变，且呈明显的剂量依赖关系。结论：罗格列酮能够抑制生长因子诱导的血管平滑肌细胞的增殖。

【关键词】PPAR-γ；罗格列酮；平滑肌细胞；细胞增殖

【中国图书分类法分类号】R329.2+8 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-04-14

Inhibitory effects of rosiglitazone on rat aortic smooth muscle cell proliferation

ZHOU Xiaoli, et al

(*Department of cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstracr】*Objective*: To explore the inhibitory effect of pharmacological ligand to PPAR γ-rosiglitazone on smooth muscle cell proliferation of rat aorta. *Methods*: smooth muscle cells were prepared from rat aortas using explant technique and identified by their specific growth characteristic and immunocytochemistry. The fifth passage cells were made quiescent by serum starvation for 24 hours, and then cells were stimulated with PDGF-BB or bFGF (20ng/ml) for 24 hours in the presence or absence of rosiglitazone (1~10umol/L), pretreated for 30 minutes. MTT assay was applied to assess cellular viability. Flow cytometry was used for cell cycle analysis. *Results*: Under microscope, the cultured cells possessed "peak and valley" characteristics for smooth muscle cell. Immunocytochemical staining with specific mAb against α-actin demonstrated these cells were positive. Smooth muscle cell proliferation was induced by PDGF-BB or bFGF with an increase A_{490} in MTT. The cell number was reduced in the S phase and increased in the G_0/G_1 phase. Cell proliferation and transition from G_0/G_1 to S were inhibited using pretreatment of rosiglitazone in a dose-dependent manner. *Conclusion*: Rosiglitazone has inhibitory influence on vascular smooth muscle cell proliferation induced by growth factors.

【Key words】PPAR-γ; Rosiglitazone; Smooth muscle cell; Cell proliferation

经皮冠状动脉介入术（percutaneous coronary intervention，PCI）是目前冠心病的主要治疗手段，但术后血管的再狭窄限制了其远期疗效和临床应用。由于血管中膜层平滑肌细胞在多种细胞因子和生长因子作用下大量增殖并迁移至内膜是再狭窄过程中的关键环节[1]，因此抑制平滑肌细胞的增殖是治疗再狭窄的靶点之一。过氧化物酶体增殖物激活型受体 γ（Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ，PPAR-γ）是配体激活型核转录因子，在细胞的增殖、分化、凋亡中起重要的调节作用。近年来有研究表明：PPAR-γ 在正常血管壁的所有细胞中均有表达，血管损伤后的新生内膜中 PPAR-γ 的表达增加，提示 PPAR-γ 可能参与血管再狭窄的形成[2]。本研究旨在观察 PPAR-γ 的合成型配体罗格列酮（Rosiglitazone）能否在体外抑制生长因子诱导的动脉平滑肌细胞的增殖，为 PCI 术后再狭窄的预防和治疗提供一条新的思路。

作者介绍：周晓莉(1974-)，女，主治医师，主要研究方向：冠心病的防治。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

9~12 天新生 SD 大鼠购自重庆医科大学实验动物中心。RPMI-1640 干粉培养基、D-Hanks 粉、标准胎牛血清、胰蛋白酶粉(1∶250)等购自 HyClone 公司。鼠抗平滑肌 α 肌动蛋白单克隆抗体,购自 Zymed 公司。SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中山生物技术公司。MTT、DMSO(分析纯)购自 Sigma 公司。重组人 PDGF-BB 和 bFGF 购自 Cyto-Lab 公司。Rosiglitazone 购自 Cayman 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 断颈处死大鼠,分离取出胸主动脉,剥去外膜结缔组织,剖开血管,剥去内膜层细胞,剪血管段为 1mm² 大小的组织块,均匀贴于培养瓶底面,加入含 10%胎牛血清的 1640 培养液,在 37℃、5% CO_2 培养箱中半开放式原代培养。待组织块周围的细胞相互汇合、铺满瓶底时,进行首次传代。以后按 1∶3 比例用 0.25%胰酶消化传代,传代周期为 5~7 天。其中采用自然纯化、机械刮除、差异贴壁 3 种方法进行细胞纯化[5]。

1.2.2 细胞鉴定 应用倒置相差显微镜观察细胞形态和生长特点。将第五代对数生长期的细胞悬液接种于预先放置 2 张 7mm×22mm 盖玻片的培养瓶中,培养 2~3 天后,取出盖玻片,PBS 漂洗 5min×3 次,4%多聚甲醛室温下固定 20~30min,PBS 再次漂洗 5min×3 次,然后按照 SP 免疫组化试剂盒说明书逐条进行操作(一抗为鼠抗平滑肌 α 肌动蛋白单克隆抗体,DAB 试剂盒显色)。

1.2.3 实验分组及处理 实验共分为 9 组:1.对照组;2.PDGF-BB(20ng/ml)组;3.PDGF-BB+ Rosiglitazone(1μmol/L)组;4.PDGF-BB+Rosiglitazone(5μmol/L)组;5.PDGF-BB+Rosiglitazone(10μmol/L);6.bFGF 组(20ng/ml)组;7.bFGF+Rosiglitazone(1μmol/L)组;8.bFGF+Rosiglitazone(5μmol/L)组;9. bFGF+Rosiglitazone(10μmol/L)组。

1.2.4 MTT 法检测 取生长状态良好的第五代纯化细胞、0.25%胰酶消化成单细胞悬液,调整细胞密度为 2×10^4/ml,按每孔 200μl 接种于 96 孔板中,在含 10%胎牛血清的 1640 培养液中孵育 24h,然后换无血清 1640 培养液继续孵育 24h 使细胞同步,按预先的实验设计向相应孔内加入不同浓度的 Rosiglitazone(1.5、10μmol/L)、30~45min 后再向相应孔内加入 PDGF-BB(20ng/ml)或 bFGF(20ng/ml),孵育 24h 后每孔内加入 20μl MTT 溶液(5g/L),孵育 4h,吸尽各孔内溶液,加入 DMSO150μl,充分振荡 10min,在 ELx800 型酶联免疫仪上选用 490nm 波长测定每孔的吸光度值(A)。每组设 6 个重复孔。

1.2.5 流式细胞仪检测 取生长状态良好的第五代纯化细胞,以 2×10^5/ml 的密度接种于 25ml 培养瓶中,在含 10%胎牛血清的 1640 培养液中孵育,3 天左右达 80%融合时,换无血清 1640 培养液继续孵育 24h 使细胞同步,按预先的实验设计向相应瓶中加入不同浓度的 Rosiglitazone(1.5、10μmol/L)、30~45min 后再向相应瓶中加入 PDGF-BB(20ng/ml)或 bFGF(20ng/ml),孵育 24h 后用 0.25%胰酶消化收集细胞(每组细胞计数>1×10^6 个),PBS 洗涤并制成单细胞悬液,4℃预冷乙醇(终浓度为 70%)固定细胞,低速离心弃固定液,冷 PBS 再洗 2 次,加入 RNase A 原液(终浓度为 50μg/ml),37℃孵育 30min,再加入碘化内啶(Propidium Iodide,PI)染液(终浓度为 50μg/ml)混匀,4℃避光孵育 30min,上流式细胞仪(Epics XL,Coulter)检测细胞周期分布。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

所有数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用 SAS 软件进行统计学处理。两组间比较用 t 检验,多组间比较用方差分析。$P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 平滑肌细胞的培养及鉴定

原代培养时,约 90%的组织块接种成活,细胞形态大小不一,为多种细胞混杂生长。经反复传代和人工纯化,5 代后平滑肌细胞纯度达 98%以上。显微镜下单个平滑肌细胞呈梭形或带状、呈典型的“合峰状”生长。免疫组化染色显示胞浆内特异的 α 平滑肌肌动蛋白阳性表达,见图 1。



图 1 培养的平滑肌细胞 α-actin 免疫细胞化学染色(×200)

2.2 Rosiglitazone 对平滑肌细胞增殖活力的影响

应用 MTT 法检测细胞增殖活力,结果显示:不同浓度的 Rosiglitazone 均能抑制 PDGF-BB 或 bFGF 诱导的血管平滑肌细胞的增殖且浓度越大抑制作用越强,见表 1。

2.3 Rosinlitazone 对平滑肌细胞增殖周期的影响

应用流式细胞仪检测细胞周期分布,结果显示:PDGF-BB 或 bFGF 刺激后,细胞周期分布发生变化,G_0/G_1 期细胞比例减少,S 期细胞比例增多。而预先用 Rosiglitazone 处理可阻止细胞由 G_0/G_1 期向 S 期转化,且呈剂量依赖性,见表 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 Rosiglitazone 对平滑肌细胞的增殖活力的影响

Group	n	A_{490}
Control	6	0.236 ± 0.021
PDGF(20ng/ml)	6	0.422 ± 0.019*
PDGF+ RSG(1 μ mol/L)	6	0.386 ± 0.023**
PDGF+ RSG(5 μ mol/L)	6	0.311 ± 0.018**
PDGF+ RSG(10 μ mol/L)	6	0.247 ± 0.024**
bFGF(20ng/ml)	6	0.428 ± 0.025*
bFGF+RSG(1 μ mol/L)	6	0.393 ± 0.027#
bFGF+RSG(5 μ mol/L)	6	0.310 ± 0.023#
bFGF+RSG(10 μ mol/L)	6	0.248 ± 0.019#

注：*: $P < 0.05$ vs Control 组；**: $P < 0.05$ vs PDGF 组；#: $P < 0.05$ vs bFGF 组

表 2 Rosiglitazone 对平滑肌细胞的增殖周期的影响(%)

Group	n	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	3	70.25 ± 0.431	19.13 ± 0.266	11.62 ± 0.107
PDGF(20ng/ml)	3	33.29 ± 0.325*	52.47 ± 0.403*	14.24 ± 0.128
PDGF+ RSG(1 μ mol/L)	3	46.56 ± 0.361**	39.98 ± 0.309**	13.46 ± 0.142
PDGF+ RSG(5 μ mol/L)	3	57.67 ± 0.397**	30.41 ± 0.285 **	11.92 ± 0.135
PDGF+ RSG(10 μ mol/L)	3	68.24 ± 0.402**	20.19 ± 0.273**	11.57 ± 0.099
bFGF(20ng/ml)	3	38.26 ± 0.442*	51.37 ± 0.403*	10.37 ± 0.101
bFGF+RSG(1 μ mol/L)	3	49.06 ± 0.387#	37.26 ± 0.296#	13.68 ± 0.143
bFGF+RSG(5 μ mol/L)	3	58.04 ± 0.391#	29.90 ± 0.224#	12.06 ± 0.087
bFGF+RSG(10 μ mol/L)	3	68.77 ± 0.405#	21.03 ± 0.248#	10.20 ± 0.099

注：*: $P < 0.05$ vs Control 组；**: $P < 0.05$ vs PDGF 组；#: $P < 0.05$ vs bFGF 组

3 讨 论

PCI术后再狭窄的预防和治疗是心血管内科领域的研究热点。再狭窄的实质是局部血管损伤后的一种过度修复反应，其中血管中膜层的平滑肌细胞在 PDGF 和 FGF 等生长因子诱导下发生表型改变，大量增殖并迁移至内膜是再狭窄的关键环节，因此抑制平滑肌细胞的增殖是治疗再狭窄的靶点之一。迄今人们已对多种具有抗增殖效应的药物进行了研究，包括 PDGF 受体拮抗剂曲匹地尔、PDGF 受体酪氨酸激酶抑制剂 RPR127963、FGF 拮抗剂 TMPP 等[4]，多数药物在动物试验中有一定疗效，但结果并不统一。免疫抑制剂雷帕霉素和抗癌药紫杉醇的局部应用能有效抑制平滑肌细胞的增殖和迁移，从而抑制支架植入术后新生内膜的形成[5,6]，被誉为是冠心病介入治疗史上的又一次革命性进步，但这两种药物洗脱支架价格昂贵，其远期疗效和安全性还需进一步确定。因此，寻找安全有效的抑制血管平滑肌细胞增殖的药物仍然任重道远。

近年来，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（Peroxisome Proliferator-Activated Receptors γ，PPAR-γ）越来越受到人们关注。PPAR-γ 是一种由配体激活的核转录因子，通过与特异的 DNA 反应元件作用后调控多种靶基因的转录表达，除了调节体内糖、脂等能量代谢平衡外、PPAR-γ 在多种细胞的增殖、分化及凋亡过程中也发挥重要作用[7]。新近研究表明：PPAR-γ 在动物和人的血管壁平滑肌细胞、内皮细胞、单核 / 巨噬细胞、动脉粥样硬化病灶及血管损伤后的新生内膜中均有高表达[2,8,9]，显示了 PPAR-γ 可能在血管的炎症反应和慢性增殖性病变，如动脉粥样硬化和 PCI 术后再狭窄过程中扮演一定的角色。PPAR-γ 配体包括天然型和合成型两大类。其中合成型配体的代表是噻唑烷二酮类化合物（thiozolidiones，TZDs），它们是新型胰岛素增敏剂，为 PPAR-γ 选择性高亲合力激活物，在毫微克分子浓度水平即可发挥作用，主要包括罗格列酮（rosiglitazone）、曲格列酮（troglitazone）、吡格列酮（pioglitazone）等[10]。

为探讨 PPAR-γ 配体在平滑肌细胞增殖中的作用，本研究初步观察了不同浓度的 Rosiglitazone（1，5，10 μ mol/L）对体外培养的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响。结果发现：在生长因子 PDGF-BB 和 bFGF 诱导下，血管平滑肌细胞明显增殖，G_0/G_1 期（静止期 /DNA 合成前期）细胞减少，S 期（DNA 合成期）细胞增多，而预先应用 Rosiglitazone 处理 30min 后，G_0/G_1 期→S 期转变的细胞减少，细胞增殖受到抑制，且具有明显的剂量依赖关系，即 10u-mol/L 的 Rosiglitazone 显示最大的抑制效应。PPAR-γ 配体抑制平滑肌细胞增殖的具体机制尚不清楚，有研究提示 Rosiglitazone 可能下调细胞增殖转导通路中 MAPK 下游的核转录因子 ELK-1 和 c-fos 的表达，从而抑制细胞的增殖[11,12]。另有研究表明 Rosiglitazone 可能通过抑制视网膜母细胞瘤蛋白（Rb）的磷酸化和减少细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂（CDKIs）中 P27kip1 和 P21cip1 的降解，从而阻滞细胞 G1→S 的转变[13]。

本研究初步提示 PPAR-γ 配体能够抑制生长因子诱导的血管平滑肌细胞的增殖，为进一步的深

维普资讯 http://www.cqvip.com

人研究奠定了基础。PPAR-γ 配体有望在血管再狭窄的治疗中发挥一定的作用。

参 考 文 献

[1] Wilcox JN. Molecular biology: insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention [J]. Am J Cardiol, 1993;72(13):88E-95E.

[2] Law RE, Goetz S, Xi XP, et al. Expression and function of PPAR-in rat and human vascular smooth muscle cells [J]. Circulation, 2000;101(11):1311-1318.

[3] 周晓莉, 雷 寒, 柳 青. 小鼠主动脉平滑肌细胞的培养 [J]. 基础医学与临床, 2005;25(6):564-567.

[4] Samer MG, Philip H, Neal AS. Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions [J]. Pharmcol Ther, 2001;92(2-3):165-178.

[5] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et a1. A randomixed comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularisation [J]. N Engl J Med, 2002;346:1773-1780.

[6] Grube E, Silber S, Hauptmann KE, et a1. TAXUS I six-and twelve-month results from a randomized,double- blind trial on a slow-release psclitaxe1-eluting stent for de novo coronary lesions [J]. Circulation, 2003;107(1):38-42.

[7] Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review [J]. Domest Anim Endocrinol, 2002;22:1-23.

[8] Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 1998;83(11):1097 -1103.

[9] Marx N, Sukhova G, Murphy C, et al. Macrophages in human atheroma contain PPAR- : differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR-) expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR-activation in mononuclear phagocytes in vitro[J]. Am J Pathol, 1998;153:17 -23.

[10] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator -activated receptor gamma (PPARgamma) [J]. J Biol Chem, 1995;270(22):12953-12956.

[11] Goetze S, Kim S, Xi XP, et al. Troglitazone inhibits mitogenic signaling by insulin in vascular smooth muscle cells [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000;35(5):749-757.

[12] Law RE, Meehan WP, Xi XP, et al. . Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia [J]. J Clin Invest, 1996;98(8):1897-1905.

[13] Wakino S, Kintscher U, Kim S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2000;275(29):22435-22441.

(上接第 379 页) 流,频谱形态正常。术后 1 w、2 w,移植静脉通畅率仍为 100%,但 2w 时,对照组有 1 只兔移植静脉狭窄。术后 4 w,实验组及对照组各有 1 只兔移植静脉闭塞,其余移植静脉均通畅,仍无管腔狭窄,术后 4 w 时通畅率比较差异无显著性($P>0.05$)。同时,彩超结果还显示,术后 4 w 内,实验组与对照组兔移植静脉均未见扩张,管径及流速于术后 1 天即处于较稳定状态,表明取兔颈内、外静脉的带瓣双静脉自体移植与带瓣单静脉自体移植相比,手术后 4 w 内,血管管径及血流动力学情况均无统计字差异,然而,因其解决了移植静脉瓣膜抗逆向压力及口径问题,可望成为治疗下肢深静脉功能不全的新方法。因本实验观察时间仅为术后 4 w,远期效果有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Tawes RL, Barron ML, Coello AA, et al. Optimal therapy for advanced chronic venous insufficiency [J]. asc Surg, 2003;38(2): 411-415.

[2] Iafrati M, O' Donnell TF. Surgical reconstruction for deep venous insufficiency [J]. Mal Vasc, 1997;22(3):193-197.

[3] Gruss JD. Reconstructive venous valve surgery [J]. Zentralbl Chir, 2001; 126(6): 461-465.

[4] Taheri SA, Lazar L, Elias SM, et al. Vein valve transplant[J]. Surgery, 1982;91(1):28-33.

[5] Raju S, Fredericks R. Valve reconstruction procedures for nonobstructive venous insufficiency: Rationale, techniques, and results in 107 procedures with two- to eight-year follow-up [J]. Vasc Surg, 1988;7:301-310.