

## 罗格列酮对血管紧张素 $\text{Ang II}$ 诱导血管平滑肌细胞 血管紧张素 $\text{AT}_1$ 受体表达的影响

任利群, 郭晓珍, 李荧娟, 李艳志, 刘乃丰

(东南大学中大医院心脏科, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 内科学; 罗格列酮; 动脉粥样硬化; 过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ ; 血管紧张素  $\text{AT}_1$  型和 2 型受体; 血管平滑肌细胞; 大鼠

[摘要] 目的 探讨罗格列酮对血管紧张素  $\text{Ang II}$  诱导血管平滑肌细胞血管紧张素  $\text{AT}_1$  受体表达的影响及抗动脉粥样硬化可能的分子机制。方法 体外培养 SD 大鼠血管平滑肌细胞, 应用半定量逆转录聚合酶链反应和免疫组织化学技术, 测定罗格列酮对血管紧张素  $\text{Ang II}$  诱导大鼠血管平滑肌细胞血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体和 2 型受体 mRNA 和蛋白表达的剂量、时间依赖的影响。结果 基础状态下, 血管平滑肌细胞血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体和 2 型受体均有少量的表达。血管紧张素  $\text{Ang II}$  显著上调血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体 ( $P < 0.01$ ) 和下调 2 型受体的表达 ( $P < 0.05$ )。浓度依赖实验表明, 不同浓度罗格列酮 (20、30 和 50  $\mu\text{mol/L}$ ) 干预 12 h 均显著下调血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.01$ ), 上调 2 型受体 mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.01$  和 0.05)。时间依赖实验表明, 30  $\mu\text{mol/L}$  的罗格列酮干预后, 6 h 即出现明显的干预效应, 24 h 时下调血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体和上调 2 型受体 mRNA 和蛋白的作用最大, 与血管紧张素  $\text{Ang II}$  组比差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。结论 罗格列酮可呈浓度依赖和时间依赖性地下调血管紧张素  $\text{Ang II}$  诱导的大鼠血管平滑肌细胞血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体 mRNA 和蛋白的表达, 上调血管紧张素  $\text{AT}_2$  型受体 mRNA 和蛋白的表达。这可能是过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  激动剂罗格列酮发挥抗炎、抗动脉粥样硬化作用的重要机制。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effects of Rosiglitazone on the Expression of Angiotensin $\text{AT}_1$ Type 1 Receptor and Type 2 Receptor in Angiotensin $\text{Ang II}$ Induced Mice Vascular Smooth Muscle Cells

REN Li-Qun, GUO Xiao-Zhen, LI Ying-Juan, LI Yan-Zhi, and LIU Nai-Feng

(Department of Cardiology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China)

[KEY WORDS] Rosiglitazone; Atherosclerosis; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ; Angiotensin  $\text{AT}_1$  Type 1 and Type 2 Receptor; Vascular Smooth Muscle Cells; Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of rosiglitazone on the expression of angiotensin  $\text{AT}_1$  (Ang  $\text{AT}_1$ ) type 1 receptor (AT1R) and Ang  $\text{AT}_2$  type 2 receptor (AT2R) in Ang  $\text{Ang II}$  induced vascular smooth muscle cells (VSMC) and possible molecular mechanisms of anti-atherosclerosis. **Methods** VSMC of mice were cultured by the explant-attachment method. Using semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunochemistry, we measured the dose and time dependent effects of rosiglitazone on AT1R and AT2R mRNA and protein in Ang  $\text{Ang II}$  induced mice VSMC. **Results** Slight expressions of AT1R and AT2R were observed in cultured VSMC in vitro. Ang  $\text{Ang II}$  markedly upregulated the expression of AT1R mRNA and protein ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, Ang  $\text{Ang II}$  downregulated the expression of AT2R mRNA and protein ( $P < 0.01$  and 0.05). Twelve hours post different concentration rosiglitazone (20, 30, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment, the expression of AT1R mRNA and protein of VSMC were significantly attenuated ( $P < 0.01$ , vs Ang  $\text{Ang II}$  group). However, the expression of AT2R mRNA and protein of VSMC were markedly upregulated ( $P < 0.01$ , vs Ang  $\text{Ang II}$  group). At 6 hours post 30  $\mu\text{mol/L}$  rosiglitazone treatment, the expression of AT1R mRNA and protein decreased, and then the expression of AT2R mRNA and protein increased, reaching a maximum at 24 h post treatment ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Rosiglitazone can not only downregulate the expression of AT1R mRNA and protein, but also upregulate the expression of AT2R mRNA and protein in Ang  $\text{Ang II}$  induced VSMC in concentration-dependent and time-dependent manners. Above effects may be crucial mechanisms of the anti-inflammation and anti-atherosclerosis of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists.

[收稿日期] 2006-10-16 [修回日期] 2007-01-12

[基金项目] 东南大学国家自然科学基金预研项目 (XJ0690260)

[作者简介] 任利群, 博士研究生, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治, 联系电话 025-83272016, E-mail 为 rlq888@sina.com。郭晓珍, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向为糖尿病发病的机制和治疗, 联系电话 025-83272062, E-mail 为 gxiaozheng@sina.com。通讯作者刘乃丰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, 联系电话 025-83272001, E-mail 为 liunf@seu.edu.cn。

噻唑烷二酮类药物(thiazolidinediones, TZD)是新型的胰岛素增敏剂之一,合成型过氧化体增殖物激活型受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )配体激活剂吡格列酮和罗格列酮(rosiglitazone, Ros)目前被广泛应用于2型糖尿病的治疗。随着对其药理作用的深入研究,基础和临床实验均已证实其具有很强的抗炎、抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作用,但其确切的分子机制尚不清楚。已知肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)在心血管重塑、高血压、As和心功能衰竭等病理过程中起重要作用。血管紧张素 $\text{I}$ (angiotensin  $\text{I}$ , Ang  $\text{I}$ )是RAS最终的生物活性分子,必须与其特异性受体结合才能发挥一系列生物学效应。但是,有关PPAR $\gamma$ 配体激活剂对Ang  $\text{I}$ 受体表达的影响报道甚少。本研究借助逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和免疫组织化学等技术测定罗格列酮对Ang  $\text{I}$ 诱导大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC) Ang  $\text{I}$ 型受体(Ang  $\text{I}$  type 1 receptor, AT1R)和2型受体(Ang  $\text{I}$  type 2 receptor, AT2R)表达水平的影响,以探讨PPAR $\gamma$ 配体激动剂抗炎、抗As作用的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

鼠抗平滑肌 $\alpha$ 肌动蛋白单克隆抗体( $\alpha$ -SMA, Sigma公司), Ang  $\text{I}$ (Sigma, 美国), 盐酸罗格列酮原粉(上海三维制药有限公司, 批号 Lot 20050201), AT1R、AT2R和 $\beta$ -actin引物由上海申能博彩生物工程公司合成,内参照 $\beta$ -actin:上游5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA CC-3',下游5'-ATC GTA CTC CTG CTT GCT GA-3',扩增片段232 bp。AT1R:上游5'-CTA CCG CCC TTC AGA TAA CA-3',下游5'-CCA AAT CCA TAC AGC CAC TG-3',扩增片段352 bp。AT2R:上游5'-GGA CCT GTG ATG TGC AAA GT-3',下游5'-CAC GGG TAA TTC TGT TCT TG-3',扩增片段418 bp。羊抗AT1R、AT2R多克隆抗体(Santan Cruz Biotechnology 美国, SC-31181, SC-7420),二抗及DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, SP-9003, ZLF-9032),胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程公司),高糖DMEM培养基(Gibco公司),Trizol试剂盒(Roche公司产品,购自南京博飞生物技术工程公司, 1667157),RT-PCR试剂盒(TaKaRa, 购自宝生物工程大连有限公司)。CO<sub>2</sub>恒温细胞培养

箱(Series D-37520, Heraeus),倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂,型号XSZ-D2),光学倒置显微镜(日本Olympus公司,型号CK2),JEM-1200EX透射电镜(日本),PCR仪(Eppendorf, Germany, 型号22331),DNA/RNA测定仪(Pharmacia Bio, 型号Genequant  $\text{E}$ ),凝胶成像系统(美国, Pharmacia Biotech),DU70紫外分光光度计(美国, Beckman)。

### 1.2 动物与细胞实验分组

健康1个月龄雄性SD大鼠由上海斯莱克实验动物责任有限公司提供[清洁级,动物生产合格证书号:SCXK(沪)2003-0003]。细胞实验分组( $n=8$ ):空白对照组(含10%FBS的DMEM培养基),Ang  $\text{I}$ 组(1  $\mu\text{mol/L}$  Ang  $\text{I}$ ),不同浓度罗格列酮干预组(20、30、50  $\mu\text{mol/L}$ ),30  $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮干预不同时间组(6、12、24 h)。

### 1.3 大鼠血管平滑肌细胞的培养及鉴定

健康SD大鼠,颈椎脱臼致死后迅速取出胸主动脉,参照文献[1, 2],分离动脉中膜,剪制成1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm大小组织块,采用组织贴块培养法,倒置相差显微镜、透射电镜下观察细胞形态及特异性鼠抗平滑肌细胞 $\alpha$ -actin免疫细胞化学染色证实为VSMC。选6~10代处于对数生长期的鼠VSMC,细胞计数后将细胞密度调整至 $(5\sim 6) \times 10^3$ 个/L接种于6孔培养板,每孔2 mL,10% FBS的DMEM培养基、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下静置培养48 h。换成无血清DMEM培养基培养24 h,然后加入终浓度为1  $\mu\text{mol/L}$  Ang  $\text{I}$ 孵育6 h后随机分组,加入干预因素。

### 1.4 逆转录聚合酶链反应检测血管平滑肌细胞血管紧张素 $\text{I}$ 型受体和2型受体mRNA的表达

用Trizol-氯仿-异丙醇法提取干预好的细胞总RNA,所有样品的A260/A280比值均介于1.6~2.0。取1  $\mu\text{g}$  RNA样本,在含有AMV逆转录酶反应体系内逆转录成cDNA,反应产物立即扩增或分装-20  $^{\circ}\text{C}$ 冻存。然后进行cDNA的PCR扩增,PCR反应体系为50  $\mu\text{L}$ 。先在94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min,AT1R反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min  $\rightarrow$  59  $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,重复35个循环扩增,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。AT2R反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min  $\rightarrow$  57  $^{\circ}\text{C}$ 退火45 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,进行35个循环扩增,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min。各取PCR扩增产物5  $\mu\text{L}$ ,在2%琼脂糖凝胶电泳板上电泳30 min,用ImageMaster VDS扫描分析仪测定电泳条带的灰度值,根据公式计算目的DNA的相对量,即目的DNA的相对量=目的DNA条带的灰度值/ $\beta$ -actin条带的灰度值 $\times 100$ 。

## 1.5 免疫组织化学测定血管紧张素Ⅱ型受体和 2 型受体的蛋白表达

细胞浓度调整至  $3 \times 10^5$  个/L 接种于 24 孔培养板, 每组 3 孔, 每孔 0.8 mL 培养液 (10% FBS 的 DMEM 培养液)。24 h 待其贴壁后, 换无血清 DMEM 培养基, 24 h 后加入干预因素。免疫细胞化学染色时另设阴性对照 (以 PBS 代替一抗), 按 S-P 免疫组织化学试剂盒说明书进行。显微镜下细胞胞质中棕黄色颗粒者为阳性细胞, 结果用 Image Pro Plus 4.5 医学图文分析系统处理, 计算 10 个不同视野共 200 个细胞胞质棕黄色着色的平均吸光度 (A) 比值。

## 1.6 统计学分析

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 11.5 统计软件

包处理资料, 组间比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血管平滑肌细胞的鉴定

倒置相差显微镜下可见 VSMC 呈梭形或长梭形, 高低起伏呈现“峰谷样”特征 (图 1A)。透射电镜下可观察到平滑肌细胞所特有的胞质内呈条索状的肌丝 (图 1B) 和密斑 (图 1C)。经免疫细胞化学染色 (一抗为鼠抗平滑肌细胞  $\alpha$ -actin 单抗, DAB 显色), 胞质呈棕黄色至黄褐色, 肌丝结构清晰可辨, 沿细胞纵轴分布, 细胞核不着色 (图 2), 大于 98% 的细胞染色阳性, 证实培养的细胞为鼠 VSMC。



图 1. 大鼠血管平滑肌细胞的鉴定 A 为相差显微镜下观察 ( $\times 200$ ), B ( $\times 20\,000$ ) 和 C ( $\times 30\,000$ ) 为透射电镜观察。

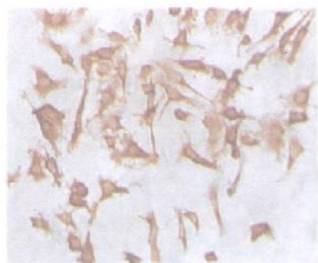


图 2. 大鼠血管平滑肌细胞  $\alpha$ -actin 免疫细胞化学染色 ( $\times 200$ )

### 2.2 罗格列酮对血管紧张素Ⅱ诱导大鼠血管平滑肌细胞血管紧张素Ⅱ型受体和 2 型受体 mRNA 表达的影响

与对照组比较, Ang Ⅱ组 AT1R mRNA 的表达显著增高 ( $P < 0.01$ ), 而 AT2R mRNA 的表达下降 ( $P < 0.01$ )。浓度依赖实验表明, 罗格列酮对 AT1R mRNA 的表达呈明显的浓度依赖性下调, 对 AT2R mRNA 的表达呈明显的浓度依赖性上调 (表 1 和图 3)。时间依赖性实验表明, 以 Ang Ⅱ ( $1\ \mu\text{mol/L}$ ) 预先培养 6 h, 再加入终浓度为  $30\ \mu\text{mol/L}$  的罗格列酮分别干预 6、12、24 h, AT1R mRNA 表达水平逐渐下降 ( $P <$

$0.01$ ), AT2R mRNA 的表达则逐渐上调 ( $P < 0.01$ , 表 2 和图 4)。

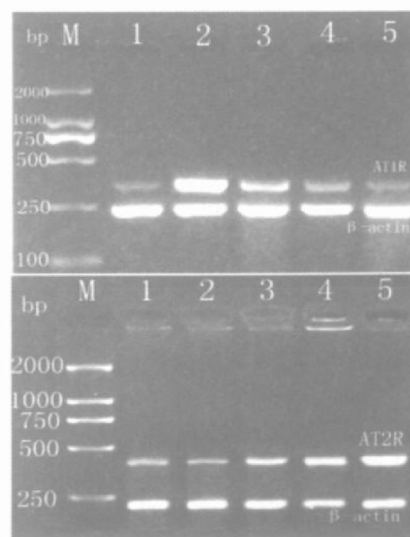


图 3. 不同浓度罗格列酮对血管平滑肌细胞血管紧张素Ⅱ型受体和 2 型受体 mRNA 表达的影响 M 为相对分子质量, 1 为对照组, 2 为血管紧张素Ⅱ组, 3~5 分别为 20、30 和  $50\ \mu\text{mol/L}$  罗格列酮干预组。



表 1. 不同浓度罗格列酮对血管平滑肌细胞血管紧张素 Ⅱ 1 型受体和 2 型受体 mRNA 表达的影响 (n= 6)

组 别	AT1R/ $\beta$ -actin	AT2R/ $\beta$ -actin
对照组	23.8% $\pm$ 4.7%	57.4% $\pm$ 5.1%
血管紧张素 Ⅱ 组	92.5% $\pm$ 12.2% <sup>a</sup>	40.6% $\pm$ 3.5% <sup>a</sup>
20 $\mu$ mol/L 罗格列酮干预组	45.2% $\pm$ 7.2% <sup>b</sup>	63.2% $\pm$ 5.8% <sup>b</sup>
30 $\mu$ mol/L 罗格列酮干预组	39.8% $\pm$ 6.3% <sup>b</sup>	94.3% $\pm$ 10.0% <sup>b</sup>
50 $\mu$ mol/L 罗格列酮干预组	34.7% $\pm$ 6.7% <sup>b</sup>	110.4% $\pm$ 11.6% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比; b 为  $P < 0.01$ , 与血管紧张素 Ⅱ 组比。

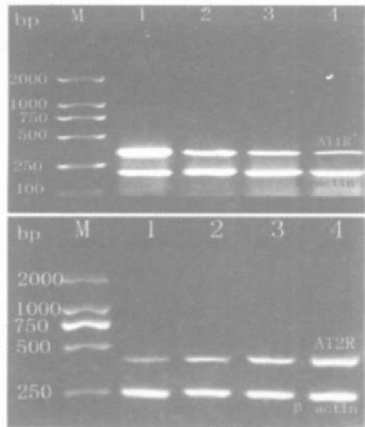


图 4. 罗格列酮干预不同时间后血管紧张素 Ⅱ 1 型受体和 2 型受体 mRNA 的表达 M 为相对分子质量, 1 为血管紧张素 Ⅱ 组, 2~ 4 分别为 30  $\mu$ mol/L 罗格列酮干预 6、12 和 24 h 组。

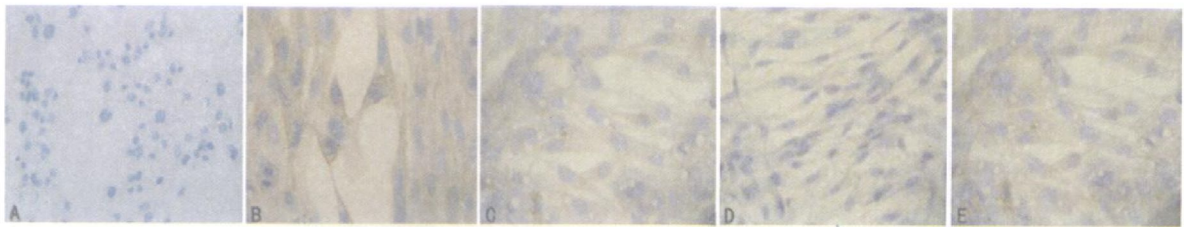


图 5. 血管紧张素 Ⅱ 1 型受体和 2 型受体蛋白表达 A 为阴性对照片 ( $\times 100$ ), B 为 1  $\mu$ mol/L 血管紧张素 Ⅱ 诱导血管紧张素 Ⅱ 1 型受体高表达 ( $\times 200$ ), C 为 50  $\mu$ mol/L 罗格列酮干预 12 h 后血管紧张素 Ⅱ 1 型受体表达 ( $\times 200$ ); D 为 1  $\mu$ mol/L 血管紧张素 Ⅱ 诱导血管紧张素 Ⅱ 2 型受体低表达 ( $\times 200$ ); E 为 30  $\mu$ mol/L 罗格列酮干预 24 h 后血管紧张素 Ⅱ 2 型受体表达 ( $\times 200$ )。

表 3. 不同浓度罗格列酮对大鼠血管平滑肌细胞血管紧张素 Ⅱ 1 型受体和 2 型受体蛋白表达的影响

组 别	孔数	AT1R 吸光度比值	AT2R 吸光度比值
对照组	3	0.84% $\pm$ 0.05%	1.09% $\pm$ 1.01%
血管紧张素 Ⅱ 组	3	1.50% $\pm$ 0.11% <sup>b</sup>	0.91% $\pm$ 0.05% <sup>a</sup>
20 $\mu$ mol/L 罗格列酮干预组	3	1.28% $\pm$ 0.01% <sup>c</sup>	1.26% $\pm$ 0.04% <sup>c</sup>
30 $\mu$ mol/L 罗格列酮干预组	3	1.12% $\pm$ 0.02% <sup>d</sup>	1.33% $\pm$ 0.03% <sup>d</sup>
50 $\mu$ mol/L 罗格列酮干预组	3	1.04% $\pm$ 0.05% <sup>d</sup>	1.40% $\pm$ 0.02% <sup>d</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与血管紧张素 Ⅱ 组比较。

表 2. 罗格列酮干预不同时间对血管平滑肌细胞血管紧张素 Ⅱ 1 型受体和 2 型受体 mRNA 表达的影响 (n= 6)

组 别	AT1R A/ $\beta$ -actin	AT2R A/ $\beta$ -actin
血管紧张素 Ⅱ 组	118.0% $\pm$ 13.5%	34.3% $\pm$ 3.1%
罗格列酮干预 6 h 组	62.4% $\pm$ 9.2% <sup>b</sup>	39.6% $\pm$ 4.3% <sup>a</sup>
罗格列酮干预 12 h 组	46.9% $\pm$ 6.3% <sup>b</sup>	57.3% $\pm$ 6.2% <sup>b</sup>
罗格列酮干预 24 h 组	34.4% $\pm$ 5.0% <sup>b</sup>	90.1% $\pm$ 10.4% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 血管紧张素 Ⅱ 组比较。

2.3 罗格列酮对血管紧张素 Ⅱ 诱导大鼠血管平滑肌细胞血管紧张素 Ⅱ 1 型受体和 2 型受体蛋白表达的影响

与对照组比较, Ang Ⅱ 组 AT1R 蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ), AT2R 蛋白的表达下降 ( $P < 0.05$ , 图 5)。罗格列酮各浓度干预组 (20、30 和 50  $\mu$ mol/L) AT1R 蛋白的表达均低于 Ang Ⅱ 组 ( $P < 0.01$ ), AT2R 蛋白的表达高于 Ang Ⅱ 组 ( $P < 0.05$ ), 呈明显的浓度依赖关系 (表 3)。用 Ang Ⅱ (1  $\mu$ mol/L) 预先培养 6 h, 再加入终浓度为 30  $\mu$ mol/L 的罗格列酮, 分别干预 6、12 和 24 h 后, AT1R 蛋白的表达呈时间依赖性地降低, 24 h 时最低 ( $P < 0.01$ ); 而 AT2R 蛋白的表达水平呈时间依赖性地增加 ( $P < 0.01$ , 表 4)。

3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 是一慢性、炎性、增生性疾病, 而 VSMC 异常增殖、迁移是 As、高血压和经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 术后血管再狭窄等增生性疾病共同的病理基础之一, 从细胞及分子水平探讨 VSMC 异常增殖、迁移的发生机制和干预措施是当今心血管领域的研究热点。Collins 等<sup>[3]</sup> 及赵全明等<sup>[4]</sup> 的研究证实, TZD 能抑制实验性 As 的发生和发展, 并不依赖于血糖、血

表 4. 罗格列酮干预不同时间对大鼠血管平滑肌细胞血管紧张素  $\text{AT}_1$  型受体和 2 型受体蛋白表达的影响

组 别	孔 数	AT1R 吸光度比值	AT2R 吸光度比值
血管紧张素 $\text{AT}_1$ 组	3	1.50% $\pm$ 0.11%	0.91% $\pm$ 0.05%
罗格列酮干预 6 h 组	3	1.32% $\pm$ 0.02% <sup>b</sup>	1.23% $\pm$ 0.03% <sup>a</sup>
罗格列酮干预 12 h 组	3	1.21% $\pm$ 0.01% <sup>b</sup>	1.37% $\pm$ 0.02% <sup>b</sup>
罗格列酮干预 24 h 组	3	1.09% $\pm$ 0.02% <sup>b</sup>	1.42% $\pm$ 0.03% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与血管紧张素  $\text{AT}_1$  组比较。

脂的调节作用,可能是通过抑制炎症介质和细胞因子的表达发挥作用。近期研究发现吡格列酮通过下调高脂血症刺激下凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor, LOX-1) mRNA 的表达,抑制 CD40/CD40L 信号通路的激活,阻断它们介导的与炎症有关的血管损伤,最终抑制高脂血症患者 As 的进程<sup>[5]</sup>。

在众多引起 VSMC 增殖的活性物质中,Ang  $\text{AT}_1$  备受关注,目前已发现 Ang  $\text{AT}_1$  可使多种生长因子如成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ )、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF)、血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 等合成增加,促进 VSMC 向内膜下增殖和迁移。Ang  $\text{AT}_1$  通过与细胞膜上的特异性受体结合后发挥生物学效应,Ang  $\text{AT}_1$  受体主要分 AT1R 和 AT2R 两个亚型。AT1R 的激活促进平滑肌细胞增殖迁移、细胞外基质沉积,促发炎症及血栓的形成。而 AT2R 的激活则对抗平滑肌细胞增殖,促进细胞凋亡,作为 AT1R 的对抗受体在体内起作用<sup>[6]</sup>。

本研究结果表明体外培养大鼠 VSMC 中 AT1R 和 AT2R 均呈低表达。Ang  $\text{AT}_1$  可显著上调大鼠 VSMC 中 AT1R mRNA 及蛋白的表达,这一效应可被 PPAR $\gamma$  配体激动剂罗格列酮浓度依赖和时间依赖性地抑制。此结果表明罗格列酮抑制 Ang  $\text{AT}_1$  上调平滑肌细胞 AT1R 表达的机制可能与 PPAR $\gamma$  信号通路的作用有关。迄今为止尚未证实 AT1R 基因从启动子到 980 区域存在过氧化体增殖物反应元件 (peroxisome proliferators responsive element, PPRE),因此推测,PPAR $\gamma$  激动剂很可能通过核因子  $\kappa\text{B}$  (nuclear factor kappaB, NF- $\kappa\text{B}$ )、信号转导子和转录激活子及激活蛋白 1 介导的信号通路,从转录水平负向调控 AT1R 的表达。而近期的研究<sup>[7]</sup>发现在 AT1R 基因启动子 258/234 区域内的 GC2box2 相关序列与此抑制效应相关,Sp1 过度表达与 GC2box2 相关序列作用刺激 AT1R 基因转录,而活化的 PPAR $\gamma$  通过蛋白-蛋白相互作用可抑制 Sp1 的表达,从而在转录水平抑制

AT1R 基因的表达。Takeda 等<sup>[8]</sup>研究结果表明 PPAR $\gamma$  配体在转录和蛋白两个水平上明显抑制内源性 AT1R 表达,并不影响 AT1R mRNA 稳定性。Diep 等<sup>[9]</sup>对 Ang  $\text{AT}_1$  灌注诱导高血压的研究中发现,Ang  $\text{AT}_1$  可引起血管 DNA 合成,AT1R、内皮细胞粘附分子以及核因子  $\kappa\text{B}$  等表达增强,PPAR $\gamma$  激动剂可阻止其表达,并能降低血压及减慢高血压的进展,纠正血管壁结构的异常,改善内皮功能。其实,TZD 拮抗心血管局部 RAS 激活的确切机制还有待于进一步探讨。

实验研究证实转基因使 AT2R 过表达可阻止自发性高血压大鼠的心室肥厚,却不依赖于血压<sup>[10]</sup>。有关 TZD 对 AT2R 表达的影响报道甚少,本实验证实了 TZD 抗 As 的作用不仅通过 AT1R 途径,同时也可通过上调 AT1R 的对抗受体 AT2R mRNA 和蛋白的表达发挥作用,但是 TZD 对 AT2R 表达调控的分子机制有待后续的研究进一步确定。

综上所述,TZD 类药物除直接的调脂、降糖作用外,通过对 Ang  $\text{AT}_1$  受体表达的调节,从而抑制 Ang  $\text{AT}_1$  介导的 VSMC 增殖、迁移,发挥其抗 As 作用,为 TZD 临床防治 As 提供新的实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 景涛,刘建平,何国祥. 组织贴壁法培养大鼠主动脉平滑肌细胞的探讨[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11 (9): 10-12.
- [2] 梁若斯,陈德. 成人动脉平滑肌细胞体外培养模型的建立[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12 (10): 31-34.
- [3] Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, et al. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and non-diabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 (3): 365-371.
- [4] 赵全明,颜东,宋爱丽,王伟,时强,王绿娅,等. 罗格列酮对 apoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33 (5): 399-404.
- [5] 楚罗湘,姜德谦,刘照云. 吡格列酮对高脂饮食兔主动脉 CD40L 表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (6): 494.
- [6] Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function [J]. *Hypertension*, 2000, 35 (1 Pt 2): 155-163.
- [7] Sugawara A, Takeuchi K, Urano A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, et al. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin  $\text{AT}_1$  receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells [J]. *Endocrinology*, 2001, 142 (7): 3 125-134.
- [8] Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2000, 102 (15): 1 834-839.
- [9] Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, et al. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin  $\text{AT}_1$  infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *Circulation*, 2002, 105 (19): 2 296-302.
- [10] Metcalfe BL, Huettelman MJ, Parilak LD, Taylor DG, Katovich MJ, Knot HJ, et al. Prevention of cardiac hypertrophy by angiotensin  $\text{AT}_1$  type-2 receptor gene transfer [J]. *Hypertension*, 2004, 43 (6): 1 233-238.

(此文编辑 许雪梅)