

吡格列酮对高脂血症大鼠主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 和凋亡蛋白表达的影响

李 蓉, 蔡 辉, 董晓蕾, 赵凌杰, 赵智明

(南方医科大学南京临床医学院 南京军区南京总医院, 江苏省南京市 210002)

[关键词] 吡格列酮; 高脂血症; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; Bax; Bcl-2; 动脉粥样硬化

[摘 要] 目的 观察吡格列酮对高脂血症大鼠主动脉血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)和凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达的影响,并探讨其作用机制及 LOX-1 在吡格列酮调节凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达中的作用。方法 清洁型 SD 大鼠 26 只,随机分为对照组($n=9$)、高脂饮食组($n=17$),高脂饮食组喂养 12 周后再随机分为模型组($n=8$)和吡格列酮组($n=9$),分别干预 4 周后,检测各组血脂水平,HE 染色观察主动脉病理形态学改变,免疫组织化学法检测主动脉 LOX-1、Bax 和 Bcl-2 的表达。结果 高脂饮食组喂养 12 周后,血脂明显升高($P<0.01$);给药 4 周后,与模型组比较,吡格列酮组甘油三酯、总胆固醇水平明显降低($P<0.01$),且主动脉血管内皮基本完好,偶有脱落,平滑肌细胞增殖不明显。与对照组相比,模型组主动脉 LOX-1 和 Bax 蛋白表达明显升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低($P<0.01$);与模型组相比,吡格列酮组主动脉 LOX-1 和 Bax 蛋白表达明显降低($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值明显升高($P<0.01$)。结论 高脂饮食可引起主动脉 LOX-1 和凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 及 Bcl-2/Bax 比值的改变,而吡格列酮可降低血脂,调节 LOX-1 和凋亡蛋白表达,抑制内皮细胞凋亡,从而改善内皮细胞功能和动脉粥样硬化病理进程。

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

Effects of Pioglitazone on Expression of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 and Apoptosis Protein in Aorta of Hyperlipidemia Rats

LI Rong, Cai Hui, DONG Xiao-Lei, ZHAO Ling-Jie, and ZHAO Zhi-Ming
(School of Clinical Medicine, Southern Medical University&Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

[KEY WORDS] Pioglitazone; Hyperlipidemia; Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1; Bax; Bcl-2; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Aim To investigate effects of pioglitazone on the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and Bax, Bcl-2 in aorta of hyperlipidemia rats, and also to study the possible mechanism of pioglitazone, the effects of LOX-1 on pioglitazone regulating Bax, Bcl-2 expression. Methods 26 male SD rats were randomly divided into control group ($n=9$) and high-fat diets group ($n=17$). High-fat diets group raised for 12 weeks were randomly divided into model group ($n=8$) and pioglitazone treated group ($n=9$). After 4 weeks, serum lipid level of all rats was measured, HE staining was used to observe aortic pathological changes. LOX-1 and apoptosis protein of Bax, Bcl-2 in the aorta were analyzed by immunohistochemical method. Results After 12 weeks, the serum lipid level was significantly higher in high-fat diets group ($P<0.01$). Intervention with pioglitazone for 4 weeks, compared with model group, serum levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC) was decreased ($P<0.01$), and aortal endothelial tissue was intact, proliferation of smooth muscle cells were few in pioglitazone treated group. Compared with control group, the expression of LOX-1 and Bax protein in aorta were significantly increased ($P<0.01$), the Bcl-2 protein and ra-

[收稿日期] 2011-10-18
[基金项目] 中国博士后科学基金(20090461491)资助
[作者简介] 李蓉, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化与内皮细胞关系, E-mail 为 lirong01@ yahoo. com. cn. 蔡辉, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合基础与临床, E-mail 为 njzy_caihui@ 163. com. 董晓蕾, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合基础与临床, E-mail 为 dxlyxwdd@ 163. com.

tio of Bcl-2/Bax was markedly decreased in model group ($P < 0.01$). On the other hand, compared with model group, the expression of LOX-1 and Bax protein were lower, the Bcl-2 protein and ratio of Bcl-2/Bax were prominently higher in the pioglitazone treated group. **Conclusions** High-fat diets have an effect on expression of LOX-1 and apoptosis protein Bax and Bcl-2 in aorta, while pioglitazone can regulate the expression of LOX-1 and apoptosis protein, protecting endothelial from damage and apoptosis, improving the process of atherosclerotic pathological formation.

高脂血症是动脉粥样硬化(As)发生发展的常见危险因素,而凝血素样氧化型低密度脂蛋白受体1(LOX-1)是内皮细胞上氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的主要受体,参与As病变的发生发展^[1]。LOX-1可作为干扰内皮细胞功能障碍和As的分子靶点,为相关疾病的诊断和治疗提供了新的思路^[2]。吡格列酮是人工合成型过氧化体增殖物激活型受体 γ (PPAR γ)的高亲和性配体激活剂,广泛用于2型糖尿病患者治疗。近年来观察到吡格列酮有改善糖脂代谢、保护血管内皮功能、减少炎症指标、抑制平滑肌细胞增殖、抗血栓形成及稳定斑块等作用,可调节As病理过程^[3,4]。本研究通过观察吡格列酮对高脂大鼠主动脉LOX-1和凋亡蛋白表达的影响,进一步探讨其作用机制及LOX-1在吡格列酮调节凋亡蛋白Bax、Bcl-2表达中的作用,为其抗As作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

实验动物为健康的断乳21天SD雄性大鼠,清洁级,26只,体重 60 ± 9 g,由本院动物实验中心提供(使用许可证号SYXK(苏)2003-0032)。盐酸吡格列酮(15 mg/片)由杭州中美华东制药提供(批号081103)。甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、血清高密度脂蛋白胆固醇(HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDLC)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。LOX-1、Bcl-2和Bax一抗购自美国Santa Cruz公司;正常羊血清购自北京索莱宝公司;SP双染试剂盒、苏木素染色液、水性封片剂、多聚赖氨酸、AEC显色液均购自福州迈新生物科技有限公司。

1.2 主要仪器与设备

切片机(美国Leica公司CM1900),孵箱(上海精宏实验设备有限公司THZ-312),烤箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司101AS-3),光学显微镜(日本OLYMPUS 2X51-ARP),电镜(日本JEM-1011)。

1.3 高脂血症大鼠模型的建立及分组干预

选用26只SD雄性大鼠,均适应性喂养1周,随机分为对照组($n=9$)和高脂饮食组($n=17$),分别

给予普通饲料和高脂饮食(配方为鱼粉3%、猪油12%、白蔗糖5%、鸡蛋10%、胆固醇2%、胆酸盐0.5%、甲基硫氧嘧啶0.2%和67.3%基础饲料)喂养,第12周末从眼眶后静脉抽血化验以确定模型是否复制成功。将高脂饮食组大鼠随机分为模型组($n=8$)和吡格列酮组($n=9$),吡格列酮组予吡格列酮10 mg/(kg·d)连续灌胃,对照组和模型组予蒸馏水(1.5 mL/100 g)灌胃,每天1次,均干预4周。模型组和吡格列酮组高脂饲料进食量控制在15 g/(100 g·d),分早、中、晚三餐定时定量分别给予。

1.4 血脂测定

实验结束后,禁食24 h,于次日上午8时,用20%氯胺酮,以1 mL/100 g剂量麻醉后,剪开胸腔,暴露心脏,左心室穿刺取血5 mL,室温静置1 h后,3000 r/min离心5 min,分离血清,按照试剂盒步骤检测各组大鼠的血脂,TG用TPO-PAP法,TC用CHOD-PAP法,HDLC和LDLC用选择性沉淀法。

1.5 主动脉标本取材和组织学观察

将麻醉后的大鼠切开胸腹,游离胸腹主动脉全长,剥离外膜脂肪组织,于大鼠主动脉弓与胸主动脉交界处取材,剪一段2 cm长主动脉,生理盐水冲洗,置10%中性甲醛固定液中固定。常温下石蜡包埋,水平横切面制备石蜡切片,厚度4 μ m,HE染色,光学显微镜观察。

1.6 主动脉免疫组织化学染色

取上述组织蜡块切片,按照SP试剂盒步骤检测主动脉LOX-1、Bax和Bcl-2表达水平。经烤片、脱蜡、水化、去除内源性过氧化物酶、高压热修复后,3% H_2O_2 甲醇溶液处理切片15 min,分别滴加LOX-1、Bax和Bcl-2多克隆抗体(1:50),湿盒孵育2 h,加入酶标二抗50 μ L,室温37 $^{\circ}$ C,孵育30 min。再经DAB法显色,苏木素染液复染,用蒸馏水冲洗干净后封片。经光学显微镜观察,LOX-1、Bax和Bcl-2主要表达于细胞浆,阳性细胞被染成棕黄色或褐色,采用Image-pro Plus Version:6.0图像分析系统,随机选定4个视野检测其光密度值,结果以平均光密度(OD)表示。

1.7 统计学处理

两组比较采用两独立样本 t 检验,并检测方差齐性、正态性,方差齐用 t 检验,方差不齐用校正 t 检

验。多组资料组间比较采用单因素方差分析,方差齐性用 LSD,方差不齐用 Dunnett T3。统计变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血脂水平

与对照组相比,12 周后高脂饮食组 TG、TC 和 LDLC 显著升高($P < 0.01$),提示 17 只高脂饮食大鼠符合高脂血症模型要求^[5](表 1)。16 周后各组间比较 TC、TG 差异有显著性($P < 0.01$)。与对照组相比,模型组 TC、TG 显著升高($P < 0.01$),吡格列酮组 TC、TG 无显著改变($P > 0.05$)。与模型组相比,吡格列酮组 TC、TG 显著降低($P < 0.01$),HDLc 有升高趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$;表 2)。

2.2 大鼠主动脉组织形态学变化

对照组血管壁结构清晰、内皮细胞完整无脱落,内膜完整而光滑,中膜平滑肌走行清晰、无增生、厚度正常;模型组血管壁内皮细胞部分脱落,内膜增厚,血管壁向管腔内突出,可见中膜平滑肌增生、排列紊乱;

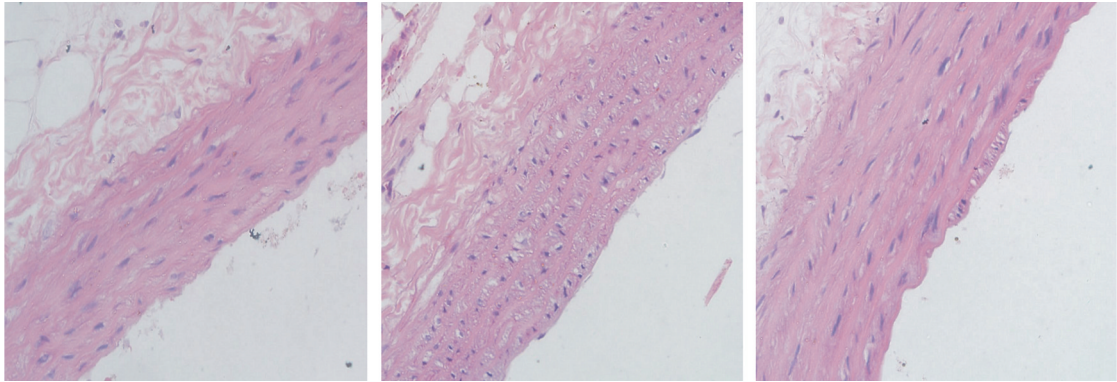


图 1. 各组主动脉组织形态学观察(HE, ×200) 从左到右依次为对照组、模型组和吡格列酮组。

Figure 1. Aortal pathological morphology of each group (×200)

2.3 大鼠主动脉 LOX-1 和凋亡蛋白 Bax 及 Bcl-2 的表达

与对照组相比,模型组大鼠主动脉内皮和新生内膜区域 LOX-1 和 Bax 蛋白阳性表达明显增多,Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值显著降低($P < 0.01$);

表 3. 各组主动脉 LOX-1 和凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Mean density of LOX-1 and apoptosis protein of Bax, Bcl-2 in aorta of each group($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	LOX-1	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax
对照组	6	0.175 ± 0.0153	0.314 ± 0.004	0.181 ± 0.008	1.736 ± 0.08
模型组	5	0.220 ± 0.015 ^a	0.146 ± 0.004 ^a	0.197 ± 0.007 ^a	0.741 ± 0.026 ^a
吡格列酮组	6	0.182 ± 0.014 ^b	0.187 ± 0.012 ^b	0.173 ± 0.007 ^b	1.083 ± 0.091 ^b

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

吡格列酮组血管内皮基本完好,偶有脱落,平滑肌细胞增殖不明显,排列规则,形态基本正常(图 1)。

表 1. 12 周后各组血脂水平($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

Table 1. Changes of plasma lipid in each group at 12-week ($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

血脂	对照组(n=9)	高脂饮食组(n=17)
TG	0.929 ± 0.150	1.729 ± 0.472 ^a
TC	1.831 ± 0.226	2.978 ± 0.934 ^a
HDLc	1.255 ± 0.092	1.356 ± 0.198
LDLC	0.195 ± 0.051	0.499 ± 0.337 ^a

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较。

表 2. 16 周后各组血脂水平($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

Table 2. Changes of plasma lipid in each group at 16-week ($\bar{x} \pm s$,mmol/L)

血脂	对照组(n=9)	模型组(n=8)	吡格列酮组(n=9)
TG	0.798 ± 0.195	1.534 ± 0.172 ^a	0.731 ± 0.319 ^b
TC	1.690 ± 0.318	3.084 ± 0.984 ^a	1.720 ± 0.249 ^b
HDLc	1.187 ± 0.148	1.168 ± 0.065	1.205 ± 0.206
LDLC	0.153 ± 0.050	0.214 ± 0.124	0.230 ± 0.079

a 为 $P < 0.01$,与对照组比较;b 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

而吡格列酮组 LOX-1 和 Bax 蛋白阳性表达较少,其平均光密度值较模型组显著降低($P < 0.01$),内膜区 Bcl-2 蛋白阳性表达较多,Bcl-2 平均光密度和 Bcl-2/Bax 比值显著升高($P < 0.01$;图 2 和表 3)。

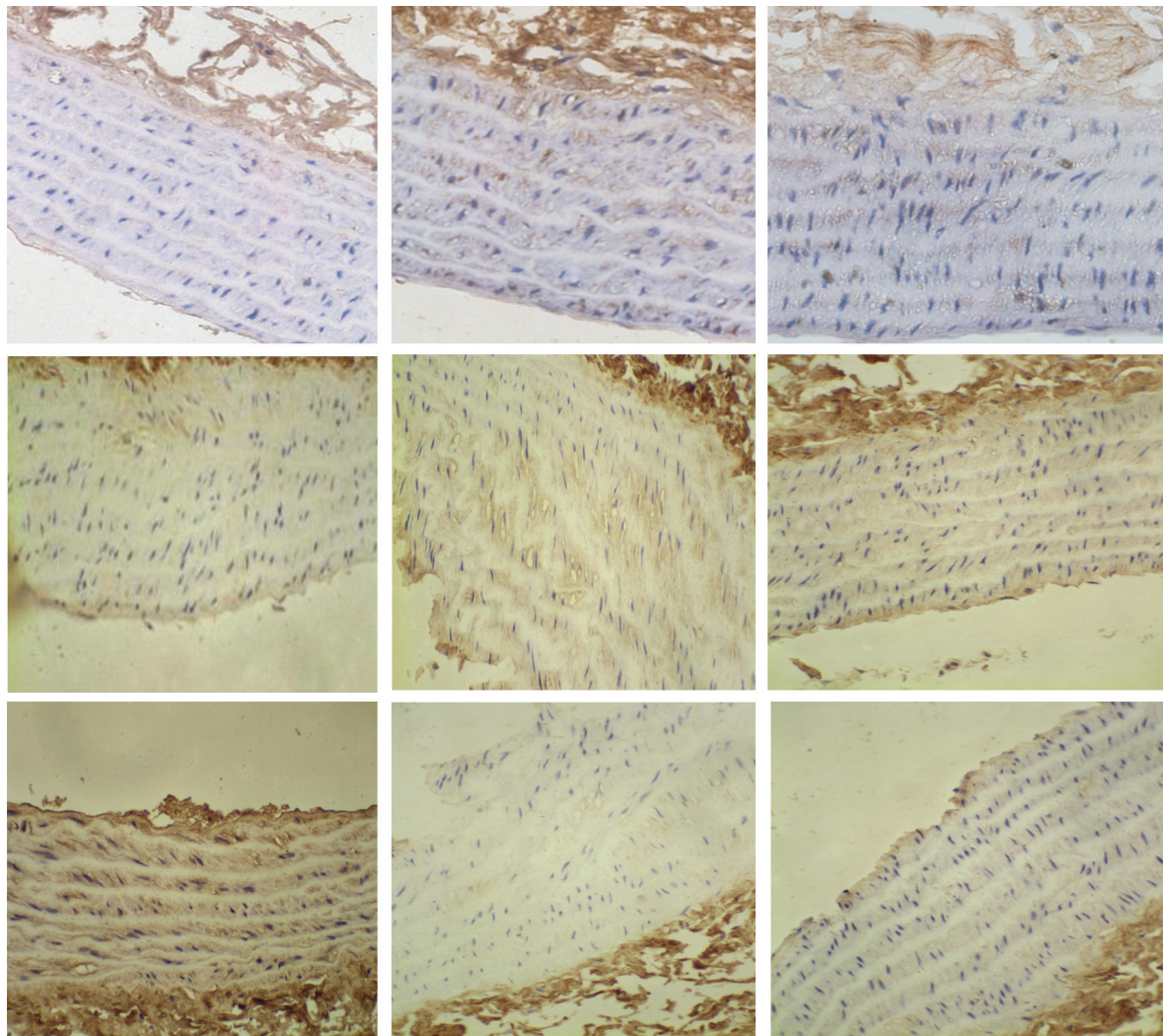


图 2. 各组主动脉 LOX-1 (上)、Bax (中) 和 Bcl-2 (下) 的表达 (×400) 从左到右依次为对照组、模型组和吡格列酮组。
Figure 2. LOX-1, Bax and Bcl-2 in aorta of each group (×400)

3 讨 论

高脂血症是影响 As 发生的主要原因,而 ox-LDL 是氧化应激的标志,LOX-1 是 ox-LDL 特异性血管受体,在 ox-LDL 介导的促 As 进程中有重要作用,可介导内皮细胞活化、损伤和细胞凋亡,平滑肌细胞和巨噬细胞内脂质聚集,活化血小板促进血栓形成,并增加斑块不稳定性^[1]。研究显示人类和家兔粥样硬化病变组织中 LOX-1 表达增加,并且早期病变表达多于晚期病变^[6]。As 早期病变阶段 LOX-1 主要表达于内皮细胞,尤其是易于病变区域的内皮细胞,在 As 进展期中 LOX-1 也存在于巨噬细胞、平滑肌细胞和新生微血管中,并且还和凋亡细胞共定位于粥样斑块处^[1],过度表达 LOX-1 诱导粥样硬化病变形成,而减少其表达可阻碍斑块的形成和发展^[2]。本研究通过 12 周高脂饮食喂养成功诱导高

脂血症大鼠模型,显示高脂饮食组 TC、TG、LDLC 显著高于对照组;主动脉病理形态学显示模型组内皮细胞结构改变,细胞损伤、脱落,内膜增厚,中膜平滑肌增生、排列紊乱;且 16 周后主动脉免疫组织化学显示,与对照组相比,模型组 LOX-1、Bax 蛋白表达明显增高,主要在内膜区域,而 Bcl-2 蛋白和 Bcl-2/Bax 比值明显减低,提示高脂饮食诱导大鼠早期 As 形成,可能与主动脉 LOX-1 和凋亡蛋白改变有关。

1997 年 Sawamura 等^[7]首先在牛主动脉内皮细胞上发现和鉴定 LOX-1,它主要表达于血管内皮细胞和血管丰富的器官组织中,能特异性结合、吞噬和降解 ox-LDL。LOX-1 是一种 II 型单链跨膜蛋白,结构上属于 C 型凝集素样家族,可被促炎性分子、氧化应激和机械刺激诱导上调,在某些病理状态下如高血压、高血脂、高血糖也表达上调^[1]。体外实

验研究显示 ox-LDL 培养内皮细胞后,呈时间依赖方式上调其受体 LOX-1 mRNA 表达,其高峰值在培养后 12 至 24 h 之间^[8]。As 病变中血清 LDL 浓度升高,提示 LDL 受体下降。用 ox-LDL 培养人冠状动脉内皮细胞后显示以时间和浓度依赖方式降低 LDL 受体表达,诱导超氧阴离子产生,此作用由内皮细胞受体 LOX-1 介导,因为抗 LOX-1 可阻止上述过程^[9]。

血管内皮细胞与 As 病理形成密切相关,内皮细胞损伤是 As 形成的早期始动环节。LOX-1 与 ox-LDL 在内皮细胞结合,激活促分裂原活化蛋白激酶,导致核因子 κ B 活化,增加活性氧产生和降低内皮型一氧化氮合酶活性,促进黏附分子、内皮素 1、单核细胞趋化因子表达^[1,6],从而诱导内皮细胞活化和损伤,启动 As 早期病理改变。LOX-1 活化介导内皮细胞损伤的另一条途径是程序性细胞死亡,即细胞凋亡途径。用 ox-LDL 处理内皮细胞后导致 p42/44 促分裂原活化蛋白激酶和核因子 κ B 活化,继之多种相关细胞凋亡的基因表达,降低抗凋亡蛋白如 c-IAP-1 和 Bcl-2,并激活 Capase-9 和 Caspase-3 凋亡信号通路,同时线粒体释放细胞色素 c 和 Smac,最终导致细胞凋亡,该过程可被 LOX-1 反义寡核苷酸抑制^[10]。

吡格列酮是人工合成型 PPAR γ 的高亲和性配体激活剂,属噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,因可以改善代谢和血管胰岛素抵抗而广泛用于 2 型糖尿病患者治疗。近来有研究显示吡格列酮治疗可阻止高脂饮食喂养的 LDLR^{-/-}小鼠早期 As 病损发展^[11],可能与其保护血管内皮功能、减少炎症指标、抑制平滑肌细胞增殖、抗血栓形成和稳定斑块等作用有关,从而在 As 病理过程中发挥一定保护作用^[3,4]。另外研究发现降糖药 PPAR γ 激动剂吡格列酮的抗 As 效应可能部分归于降低 LOX-1 表达,抑制单核细胞与内皮细胞的黏附作用^[12]。本研究给予高脂饮食大鼠吡格列酮 4 周灌胃治疗后,与模型组相比,TC 和 TG 水平显著降低,主动脉内膜区域 LOX-1、Bax 平均光密度明显降低,Bcl-2 平均光密度和 Bcl-2/Bax 比值显著升高,HE 染色示主动脉内皮病理损伤较模型组轻,提示吡格列酮可改善血脂代谢,调节凋亡蛋白表达,维持细胞完整性,保护血管内皮细胞功能,可能与主动脉 LOX-1 蛋白表达降低有关,这也为其抗 As 机制提供了新的思路,进一步从

细胞水平探究吡格列酮保护血管内皮、抗 As 作用的分子靶点。

[参考文献]

[1] Morawietz H. LOX-1 receptor as a novel target in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2010, 135(7): 308-312.

[2] 魏静静, 孙雷, 张树辉, 等. 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 和白细胞介素 1 β 在人粥样硬化冠状动脉中的表达及与动脉粥样硬化进展的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(11): 901-905.

[3] Pfutzner A, Weber MM, Forst T. Pioglitazone: update on an oral antidiabetic drug with antiatherosclerotic effects[J]. Expert Opin Pharmacother, 2007, 8(12): 1985-998.

[4] Erdmann E, Wilcox R. Pioglitazone and mechanisms of CV protection[J]. QJM, 2010, 103(4): 213-228.

[5] Hastay AH, Gruen ML, Terry ES, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and atherosclerosis in an obese hyperlipidemic mouse model[J]. J Nutr Biochem, 2007, 18(2): 127-133.

[6] Mehta JL. The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis[J]. Can J Cardiol, 2004, 20(Suppl B): 32B-36B.

[7] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein[J]. Nature, 1997, 386(6620): 73-77.

[8] Cilingiroglu M, Ozer K. The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor and its role in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2005, 7(2): 103-107.

[9] Hu B, Li D, Sawamura T, et al. Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 307(4): 1008-012.

[10] Li D, Mehta JL. Intracellular signaling of LOX-1 in endothelial cell apoptosis[J]. Circ Res, 2009, 104(5): 566-568.

[11] Nakaya H, Summers BD, Nicholson AC, et al. Atherosclerosis in LDLR-knockout mice is inhibited, but not reversed, by the PPAR γ ligand pioglitazone[J]. Am J Pathol, 2009, 174(6): 2007-014.

[12] 楚罗湘, 姜德谦, 刘照云. 吡格列酮对高脂饮食兔主动脉 LOX-1 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(10): 1342-349.

(此文编辑 许雪梅)