

低剪切力下调 PPAR 信号通路参与 BALB/c 小鼠局部血管早期病变的实验研究

张友明^{1,2}, 杨 笛², 吴恒芳², 卞智萍¹, 徐晋妣², 顾春荣¹, 陈相健^{1*}, 王连生^{2*}

(¹南京医科大学第一附属医院分子心脏病学,²心内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究局部血流低剪切力对 BALB/c 小鼠局部血管内皮细胞损伤及平滑肌细胞增殖的影响及其分子机制。方法: 以左侧颈总动脉套管植入术造成局部血流剪切力变化。30 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为假手术组($n = 10$, 普通饮食)、模型 1 组($n = 10$, 套管植入术+普通饮食)、模型 2 组($n = 10$, 套管植入术+高脂饮食)。术后喂养 8 周, 监测小鼠体重, 颈总动脉超声测量术后 3 d 和术后 8 周左、右颈总动脉血流峰值、血管舒张末内径及剪切力变化, 检测血脂水平, HE 染色观察颈总动脉病理形态学变化, 测量血管中膜厚度, 透射电镜观测颈总动脉内皮细胞、内皮下超微结构。芯片比较小鼠低剪切力区与自身正常剪切力区血管段基因表达谱变化, GO 及 KEGG 信号通路分析与细胞迁移及增殖相关基因和信号通路的变化并行实时定量 PCR (quantificational real time-polymerase chain reaction, QRT-PCR) 验证。结果: 与假手术组相比, 模型 1 组小鼠术后 8 周体重及血脂均无明显差异($P > 0.05$), 模型 2 组小鼠术后 8 周体重增加明显, 总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平均升高($P < 0.05$)。模型 1、2 组左侧颈总动脉套管近心端呈低剪切力变化, HE 染色可见内皮细胞不同程度损伤, 血管中膜增厚, 无脂纹和斑块形成; 电镜下可见有不同程度的内皮细胞空泡化形成, 内皮下未见脂质空泡和脂滴堆积。合并高脂喂养加强了低剪切力导致的血管病变。芯片检测提示与自身正常剪切力血管段相比, 低剪切力血管段标本呈现 miR-27a 上调(>2 倍), PPAR 信号通路下调, MAPK、TGF- β 、PI3K/Akt 及 NF- κ B 信号通路上调, 包括 TGFB2、END1、CTGF 等促细胞迁移及(或)增殖的基因上调 > 2.0 倍。QRT-PCR 验证结果显示: 相比于自身正常血管段, 在低剪切力血管段中 PPAR 下调 0.14 倍, TGFB2 和 EDN1 分别上调 2.51 倍和 1.83 倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $n = 4$), 与基因芯片结果相符。结论: BALB/c 小鼠颈总动脉套管植入术后 8 周, 与正常剪切力血管段相比, 低剪切力血管段局部见内皮细胞损伤及中膜增厚, 提示局部低剪切力变化是血管动脉粥样硬化早期病变的因素, 可能与其血管壁局部 PPAR 信号通路下调后引起的促细胞增殖、迁移相关基因表达及信号通路激活有关。

[关键词] 低剪切力; 动脉粥样硬化; PPAR 信号通路; 中膜增厚; 内皮细胞损伤

[中图分类号] R329.28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-607-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20150503

An experimental study of low shear stress down-regulated PPAR signaling pathway involved in early local vascular lesions of BALB/c mice

Zhang Youming^{1,2}, Yang Di², Wu Hengfang², Bian Zhiping¹, Xu Jindan², Gu Chunrong¹, Chen Xiangjian^{1*}, Wang Liansheng^{2*}

(¹Research Institute of Cardiovascular Disease, ²Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence and molecular mechanisms of low shear stress on local vascular endothelial injury and smooth muscle cell proliferation of BALB/c mice. **Methods:** Thirty BALB/c mice were randomly divided into three groups. Ten mice were taken as the sham-operated group and fed in a normal diet. The model one and model two were established by rapid perivascular collar placement at left common carotid artery (LCCA) and fed in a normal and a high-fat diet, respectively. The body weight was measured periodically. On the third day and eighth week post-operation, the alterations of peak blood flow, end-diastolic diameter of vessels and shear stress of carotid artery were assessed by carotid artery doppler ultrasound. The variations of lipid metabolism were detected by automatic biochemical analyzer during the eighth week post-operation. The pathomorphological and ultrastructural changes of

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81170220)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: chenxiangjian@njmu.edu.cn; drlswang@njmu.edu.cn

carotid artery were evaluated by hematoxylin-eosin staining and electron microscope, respectively. The gene expression profile changes in the low shear stress blood vessels and in the self-controlled normal shear stress blood vessels were compared by microarray, and then verified by (quantificational real time- polymerase chain reaction, QRT-PCR). GO and KEGG signaling pathway were analyzed and focused on the changes of genes and signaling pathways related to cell migration and proliferation. **Results:** Compared with sham-operated group, the body weight and serum lipids levels had no significant differences ($P > 0.05$) in group model one fed with normal diet at the eighth week post-operation. However, the body weight and serum lipids (TC, TG, LDL-C and HDL-C) significantly increased ($P < 0.05$) in group model two. The shear stress of left common carotid artery-proximal (LCCA-P) was low in group model one and model two. Meanwhile, there were endothelial cell damages, media thickening and endothelial cell vacuolation in the LCCA-P of both group model one and group model two. The lesions in group model two were more serious than those in group model one. But no fatty streaks, plaque formations and lipid accumulations were observed by light microscope and electron microscope. Microarray results suggested that compared with the self-controlled blood vessels from normal shear stress, the blood vessels from low shear stress presented a remarkable miR-27a expression elevation (> 2.0 -fold), PPAR signaling pathway down-regulation, MAPK, TGF- β , PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathway up-regulation, and the cell migration and / or proliferation-related genes up-regulation (TGFB2, END1, CTGF, etc.). The results of QRT-PCR were consistent with microarray. The expression of PPARG decreased to 0.14-fold ($P < 0.05, n = 4$), TGFB2 and EDN1 increased to 2.51-fold and 1.83-fold, respectively ($P < 0.05, n = 4$) in the blood vessels from low shear stress. **Conclusion:** Compared with the blood vessels from normal shear stress, the blood vessels from low shear stress showed the damage of local endothelial cells and media thickening after eight weeks post-operation in BALB/c mice. These changes may be associated with the down-regulation of local PPAR signaling pathways, thereby activating the genes expression and signaling pathways related to cell proliferation and migration.

[Key words] low shear stress; atherosclerosis; PPAR signaling pathway; media thickening; endothelial cell damages

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05):607-614]

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 发病率居高, 其导致的心脑血管疾病是人类死亡的主要原因, 但对其病因和发病机制仍不十分清楚。AS 形成是一个长期的病理过程, 其发病机制有炎症学说、脂质浸润学说、氧化学说、损伤反应学说、单克隆学说等。而另一些研究^[1-3]表明, AS 病变具有明显的位置选择性, 好发于血管分支开口处、分叉外侧壁、弯曲血管的内侧壁。这些部位都有着共同的血流动力学特征, 即剪切力的降幅低, 血流方向紊乱。上述诸学说并不能完全解释这种现象, Pober 等^[4]在此基础上提出剪切力学说 (shear stress hypothesis), 认为血流剪切力异常是促使 AS 病变形成的重要原因之一。过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 是核受体超家族中的一类配体依赖的核转录因子, 包括 α 、 β/δ 和 γ 3 种亚型, 大量研究证明 α 和 γ 在调节过氧化物酶体增殖、能量代谢、细胞分化及炎症反应等过程中发挥重要作用, 近年来 PPARs 信号通路在 AS 中的作用受到广泛关注。PPARs 主要通过抑制炎症反应和细胞增殖、迁移作用抑制 AS 的发生发展, 涉及 TGF/Smad、PI3K/Akt 等信号通路^[5-6]。PPARs 本身受多个 miRNAs 调控, 包括 miR-27a/b^[7-8]、miR-141^[9]、miR-22^[10] 以及 miR-130b^[11] 等。由于高脂饮食诱导 AS 模型已得到广泛认可^[12-14], 本研究旨在以 BALB/c

小鼠为对象, 观察剪切力对小鼠局部血管促 AS 的影响, 以及高脂饮食是否增加低剪切力对血管的病变作用, 探讨病变过程中 PPAR 信号通路的变化及其意义。

1 材料和方法

1.1 材料

6 周龄近交系雄性 BALB/c 小鼠, 体重约 22 g (南京医科大学实验动物中心); 内径为 0.3 mm 的硅胶管 (Dow Corning 公司, 美国); 手术器械主要包括体式显微镜、眼科剪、眼科镊、玻璃分针、持针器、手术缝针及 6-0 的手术缝合线。普通饲料 (粗蛋白 $\geq 20\%$ 、粗脂肪 $\geq 4\%$ 、粗纤维 $\leq 5\%$) 购自南京安立默科技公司; 高脂饲料 (42% 脂肪供能, 每 100 g 含繁殖鼠料 52.0 g、猪油 16.7 g、胆固醇 1.3 g、胆盐 0.3 g、蔗糖 15.0 g、酪蛋白 10.2 g、甲基硫氧嘧啶 0.1 g、预混料 2.0 g、麦芽糊精 2.4 g) 由上海斯莱克实验动物有限公司提供配方并生产。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

将 BALB/c 小鼠随机分为假手术组 ($n = 10$), 小鼠分离出左侧颈总动脉后不予干预, 普通饲料喂养; 模型 1 组 ($n = 10$), 小鼠分离出左侧颈总动脉予以套管, 普通饲料喂养; 模型 2 组 ($n = 10$), 小鼠

分离出左侧颈总动脉予以套管,高脂饲料喂养。定期观察小鼠体重、局部剪切力等变化。术后 8 周,将小鼠称重,测量双侧颈总动脉剪切力后(左侧颈总动脉分别测量套管近心端、套管区及套管远心端),取血,3 000 r/min 离心 10 min,取上清,-80℃保存备用;沿主动脉弓游离左、右颈总动脉,尽量剥离血管外膜的脂肪组织,保留手术组左侧颈总动脉硅胶管,用预冷 PBS 冲洗,置于 4%多聚甲醛 4℃固定后行病理检测用;部分血管置于 2.5%戊二醛 4℃固定后行电镜观测用。

1.2.2 BALB/c 小鼠颈总动脉模拟不同水平剪切力

采用颈动脉硅胶管植入法构建不同水平剪切力模型^[15]。经 1%戊巴比妥钠腹腔麻醉后固定,颈部剃毛并用 75%酒精消毒,颈正中部切开皮肤逐层分离颈部组织,找到并分离出左侧颈总动脉,小心剔除颈动脉周围的结缔组织,取 3 mm 长的硅胶管侧切后嵌至颈总动脉外周,取 3 根细线固定硅胶管,逐层缝合,待麻药失效后,放回鼠笼内。

1.2.3 BALB/c 小鼠颈总动脉血流动力学测量

分别于术后 3 d 和 8 周末进行颈总动脉超声数据测量。检测仪器为 Visual Sonics Vevo2100 彩色多普勒超声仪。由 Poiseulne 定律推导出可以粗略计算血流剪切力大小的公式 $\tau_m = 4 \mu V/D$ 。其中, τ_m 为峰值血流剪切力, μ 为血液粘滞度, V 为峰值血流速度, D 为舒张末期血管内径^[16]。

1.2.4 血脂检测

小鼠血清样本用全自动生化分析仪(Beckman Coulte Olympus AU5400,美国)进行检测,检测指标包括甘油三酯(triglyceride,TG)、血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol,LDL-C)及高密度脂蛋白(high density lipoprotein-cholesterol,HDL-C)。

1.2.5 组织病理学检测

将 4%多聚甲醛固定 24 h 后的颈总动脉取出,常规 PBS 清洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,纵向石蜡包埋制成蜡块,连续 4 μ m 切片。常规苏木素-伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色。使用图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0 software)测量颈总动脉中膜厚度,每个切片均测量 10 次,取其平均值计算,所有测量均在相同条件下进行。

1.2.6 电镜检测

小鼠颈总动脉经 2.5%戊二醛溶液固定后,1%锇酸固定,梯度酒精脱水,树脂包埋,连续 50 nm 切片,光镜下定位,透射电镜(FEI Tecnai G2 Spirit

Bio TWIN,美国)下观察。

1.2.7 基因芯片检测及 Real-time PCR 验证方法

基因表达谱芯片由上海其明信息技术有限公司提供。分别取模型 2 组小鼠左侧套管近心端血管段和同组右侧血管段,经过 RNA 抽提、RNA 质量检测、cDNA 合成、生物素标记、杂交、洗脱、扫描、检测信号值、过滤去除低于背景的弱信号值等过程,使用倍数法进行差异基因筛选,筛选标准为 Ratio ≥ 1.5 为上调基因,Ratio ≤ 0.5 为下调基因。筛选的差异基因基于基因本体学(gene ontology,GO)数据库进行基因功能注释,得到基因参与的所有功能,而后利用 Fisher 精确检验和多重比较检验计算每个功能的显著性水平(P-value)和误判率(FDR),从而筛选出差异基因所体现的显著性功能,显著性筛选的标准:P < 0.05 及 FDR < 0.05。筛选的差异基因基于 KEGG 数据库,对差异基因利用 Fisher 精确检验和卡方检验,把目标基因参与的信号转导通路进行显著性分析,按照 P < 0.05 进行筛选,得到显著性的信号转导通路。

选择 PPARG、TGFB2、EDN1 进行实时定量 PCR (quantificational real time-polymerase chain reaction,QRT-PCR)验证:按常规方法分别抽提套管近心端血管段和同组右侧血管段的总 RNA,并检测总 RNA 浓度和纯度。按照 PrimeScript™ RT Master Mix (大连宝生物工程有限公司)试剂盒说明书进行逆转录合成 cDNA。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,引物序列见表 1。最后行 Real-time PCR,按照 SYBR® Premix Ex Taq™ (大连宝生物工程有限公司)试剂盒说明书进行,反应条件:95℃ 预变性 30 s;然后 95℃ 5 s、60℃ 30 s,共 40 个循环数;绘制熔解曲线:95℃ 1 min、55℃ 30 s、95℃ 30 s。

表 1 基因引物

Table 1 Gene primers

引物名称	引物序列(5'→3')
PPARG	上游 AAGCCGTGCAAGAGATCACA
	下游 TTGGCCCTCTGAGATGAGGA
TGFB2	上游 CAGTGGGAAGACCCACATC
	下游 TGTAAGAGGGCGAAGGCAG
EDN1	上游 CAGAAGTTGACGCACAACCG
	下游 TTGCTAAGATCCAGCCAGC
GAPDH	上游 GGACCTCATGGCTACATGG
	下游 TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件统计分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较用 student's t

检验;多组均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重及血脂水平

各组小鼠术后恢复良好。术后8周时高脂饮食

喂养模型2组体重较普通饮食喂养模型1组明显增加($P < 0.05$),模型1组与假手术组小鼠体重无明显差别。与假手术组、模型1组相比,模型2组小鼠术后高脂喂养8周TC、TG、LDL-C及HDL-C水平均明显升高($P < 0.05$),而普通饮食假手术组与模型1组相比,血脂水平无统计学意义($P > 0.05$,表2)。

表2 小鼠术后喂养8周体重(g)及血脂水平

Table2 The levels of body weight and serum lipid in mice at the eighth week post-operation ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	体重(g)
假手术组	2.44 ± 0.27	0.74 ± 0.24	1.81 ± 0.21	0.40 ± 0.12	26.5 ± 0.9
模型1组	2.59 ± 0.30	0.79 ± 0.29	1.89 ± 0.25	0.41 ± 0.14	26.7 ± 0.8
模型2组	4.38 ± 0.26*#	1.40 ± 0.24*#	3.39 ± 0.27*	0.70 ± 0.15*#	29.1 ± 1.2*#

与模型组1比较,* $P < 0.05$;与假手术组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 小鼠颈总动脉血流速度峰值、血管舒张末内径及剪切力的变化

小鼠颈总动脉超声检测右侧颈总动脉(right common carotid artery,RCCA)、左侧颈总动脉-套管近心端(left common carotid artery-proximal,LCCA-P)、套管内(LCCA-I)及远心端(LCCA-D)峰值血流

速度及舒张末期血管内径,根据公式计算剪切力大小。套管术后3d双侧颈总动脉的血流动力学改变(图1);与RCCA相比,LCCA-P剪切力水平降低($P < 0.05$),LCCA-I剪切力水平升高($P < 0.05$),LCCA-D剪切力水平变化无统计学意义($P > 0.05$)。后续研究即主要关注低剪切力变化的LCCA-P。

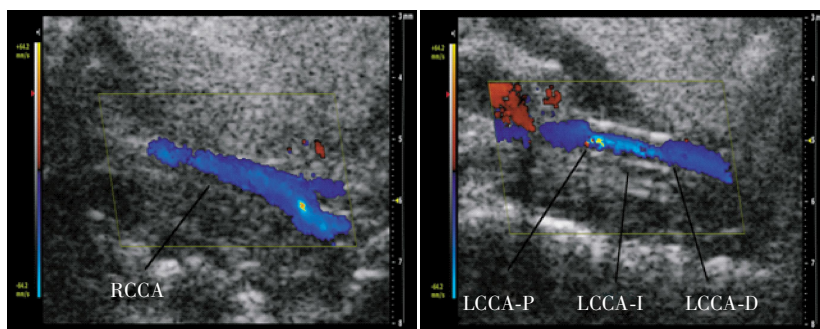
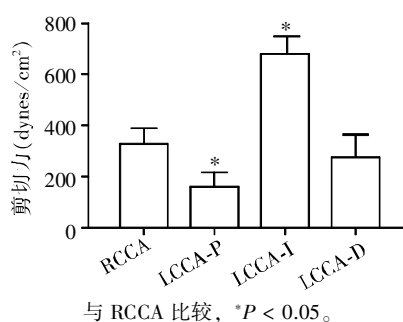


图1 套管术后3d多普勒超声下颈总动脉各部位剪切力的变化

Figure 1 The alterations of shear stress of carotid artery in the Doppler Ultrasound after third day post-operation

小鼠术后喂养8周后,假手术组、模型1组及2组RCCA血流动力学指标无明显差异($P > 0.05$,图2),与假手术组左侧颈总动脉血流动力学相比,均无明显差异($P > 0.05$)。模型1组及2组分别与同组RCCA

相比,LCCA-P血流速度峰值降低($P < 0.05$)、血管舒张末内径稍有增加,无统计学意义($P > 0.05$)、剪切力水平降低($P < 0.05$)。模型1组与2组之间相比,颈总动脉相应部位血流动力学无统计学意义($P > 0.05$)。

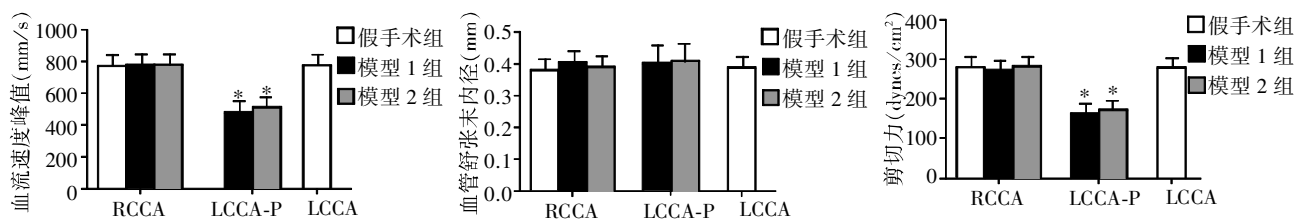


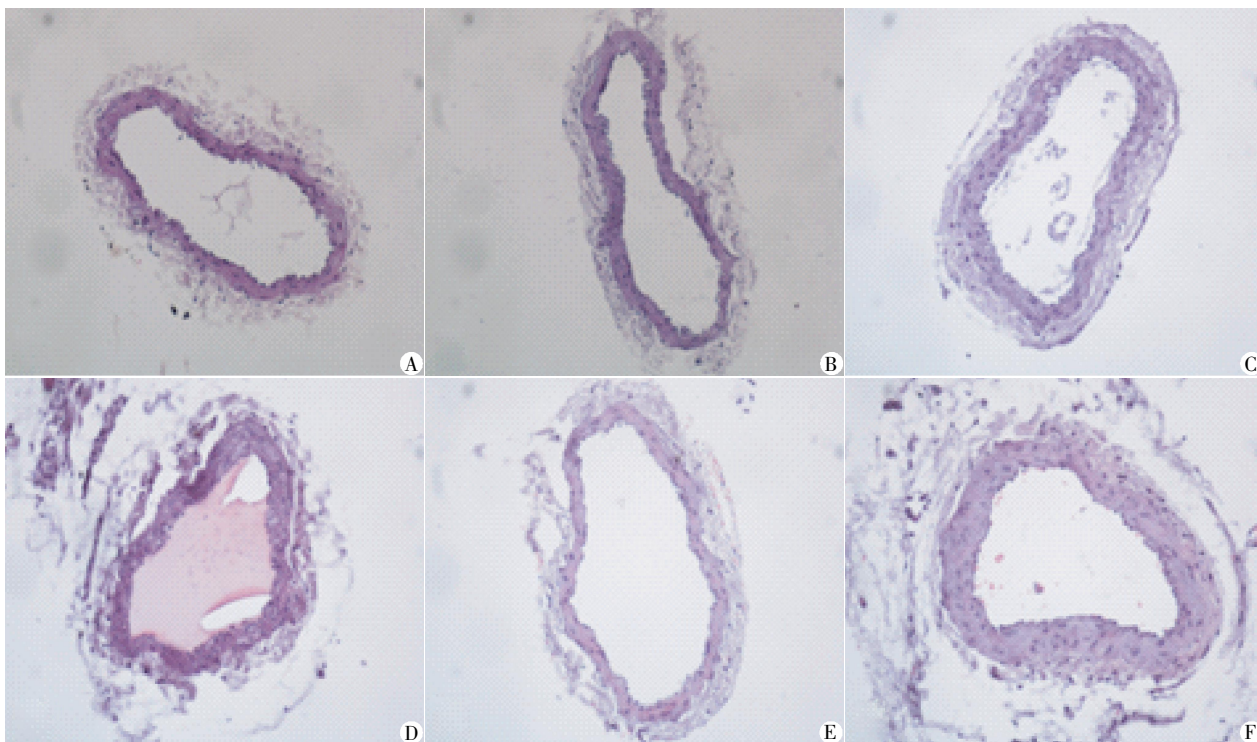
图2 小鼠术后喂养8周各组颈总动脉血流动力学比较

Figure 2 The alterations of hemodynamics of carotid artery at the eighth week post-operation

2.3 颈总动脉病理学变化

光镜下观察可见:假手术组的双侧颈总动脉及模型 1、2 组 RCCA 内膜光滑平整,内弹力板完整,层次清楚,中膜和外膜结构正常,未见明显病变(图

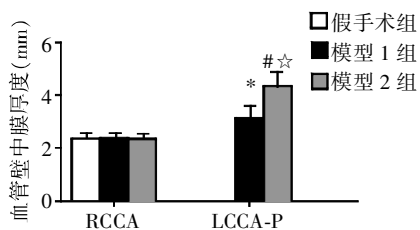
3A,B,C,E)。模型 1 及 2 组 LCCA-P 内皮细胞部分脱落,内膜下无脂纹和斑块形成,中膜增厚,外膜少量炎症细胞浸润,弹力板完整(图 3D、F)。颈总动脉各部位中膜厚度的比较见图 4。



A:假手术组 RCCA;B:假手术组 LCCA-P;C:模型 1 组 RCCA;D:模型 1 组 LCCA-P;E:模型 2 组 RCCA;F:模型 2 组 LCCA-P。

图 3 各组小鼠颈总动脉病理组织学比较(HE,×200)

Figure 3 Pathological changes of carotid artery(HE,×200)



与模型 1 组 RCCA 比较, * $P < 0.05$; 与模型 2 组 RCCA 比较, * $P < 0.05$; 与模型 1 组 LCCA-P 比较, * $P < 0.05$ 。

图 4 各组小鼠颈总动脉中膜厚度的比较

Figure 4 The media thickness of carotid artery

2.4 颈总动脉电镜下改变

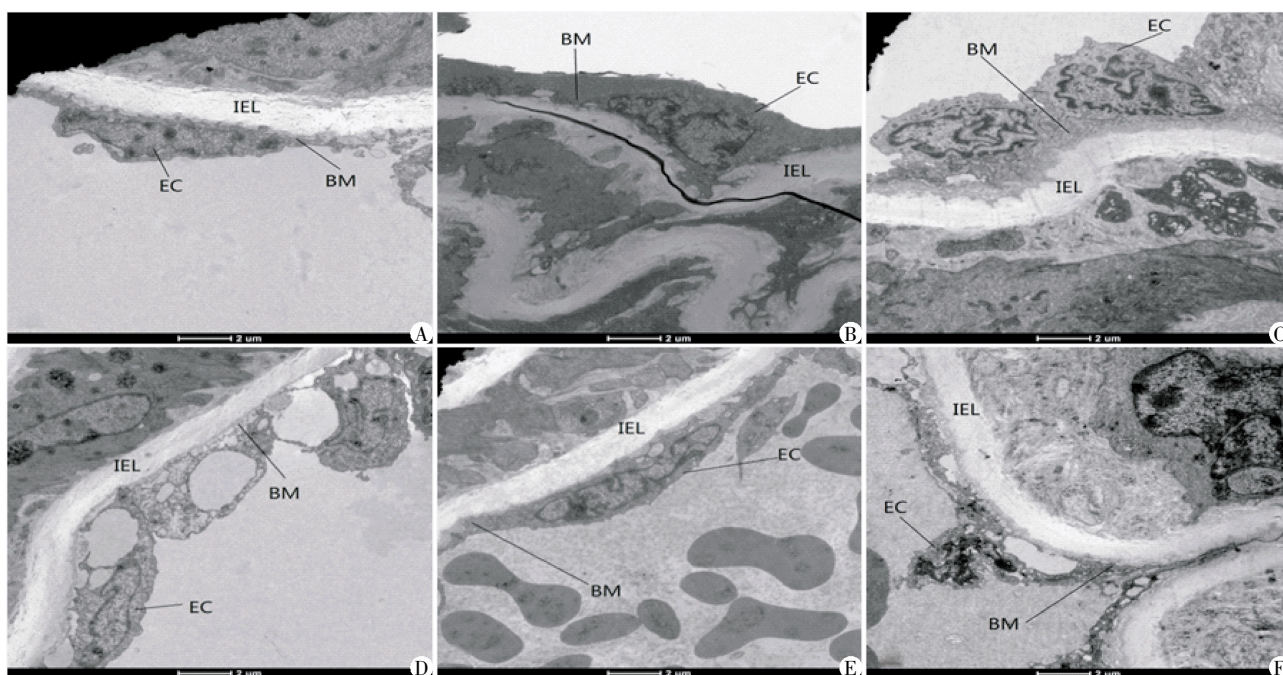
透射电镜下观察可见:假手术组的双侧颈总动脉、模型组 1/2 RCCA 内皮细胞形态完整,基膜、内弹力膜层未见明显增厚(图 5A、B、C、E);模型 1 组 LCCA-P 内皮细胞有明显空泡化形成,形态完整,基膜、内弹力膜层正常(图 5D)。模型 2 组 LCCA-P 内皮细胞有空泡化形成,形态改变,内皮下未见脂质空泡和脂滴堆积(图 5F)。

2.5 基因芯片比较 BALB/c 小鼠低剪切力血管及

自身正常剪切力局部血管 PPAR 信号通路表达变化

差异基因对比结果示:相比于自身正常剪切力血管段,低剪切力血管段 miRNAs 表达上调 > 2.0 的共有 4 个:miR-27a、miR-143/145、miR-4660 及 miR-5123 (图 6)。除 miR-143/145 外,未见有血流剪切力影响 miR-27a、miR-4660 及 miR-5123 表达的报道^[17],其中 miR-27a 能够与 PPAR- γ 3' 非转录区域的 miR-27 位点结合,抑制 PPAR- γ 的表达和功能^[7]。本实验中,相比于自身正常剪切力血管段,低剪切力血管段 PPAR γ 基因(编码 PPAR- γ 蛋白)表达下降至 0.46 倍。

Sueyoshi 等^[18]的研究证实动脉粥样硬化斑块内有 PPAR γ 高表达。而在血管壁,PPAR γ 信号通路可通过抑制炎症反应及细胞增殖、迁移抑制 AS 发生发展。本实验中,小鼠低剪切力 8 周血管段未见脂纹聚集及斑块形成,但出现明显的内皮损伤及中膜增厚等早期病变。GO 分析结果提示在小鼠低剪切力血管段有 12 个与细胞迁移相关基因(12/129)



A:假手术组 RCCA;B:假手术组 LCCA;C:模型 1 组 RCCA;D:模型 1 组 LCCA-P;E:模型 2 组 RCCA;F:模型 2 组 LCCA-P;EC:内皮细胞;BM:基膜;IEL:内弹力膜层。

图 5 小鼠颈总动脉透射电镜观察结果(×2 300)

Figure 5 The transmission electron microscopy results of carotid artery(×2 300)

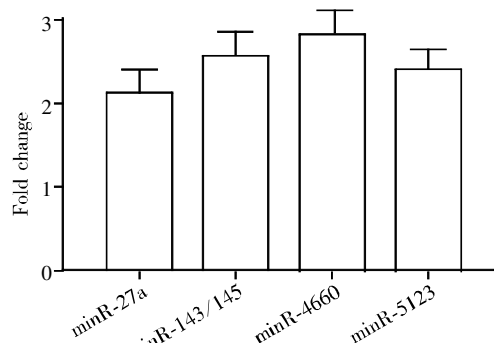
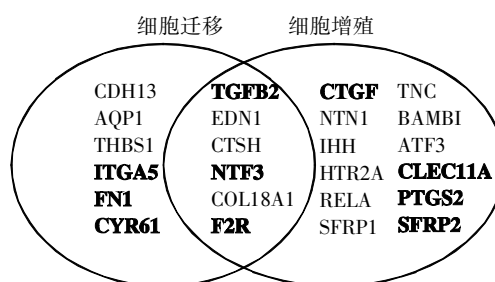


图 6 低剪切力诱导的 miRNAs 上调表达差异

Figure 6 The fold changes of elevated miRNAs induced by low shear stress

上调具有显著性功能(富集度 15.56, $P < 0.05$, FDR < 0.05), 其中包括 ITGA5 (编码整合素 $\alpha 5$)、FN1 (编码纤维连接蛋白 1)及 CDH13(编码 cadherin 13)等;有 18 个与细胞增殖相关基因(18/382)上调具有显著性功能 (富集度 7.88, $P < 0.05$, FDR < 0.05), 包括 CTGF(编码结缔组织生长因子)、PTGS(编码前列腺素内过氧化物酶)等。两者之间有 6 个基因重叠, 同时支配细胞迁移和细胞增殖, 其中包括 TGFB2(编码 TGF- $\beta 2$)、EDN1(编码内皮素-1)等基因(图 7)。

进一步信号转导通路分析结果提示低剪切力血管段有 16 个相关基因参与 PPAR 信号通路(16/81) 并显著性下调($P < 0.05$), 其中包括 PPARG 基因



粗体代表基因上调 > 2.0, 非粗体代表基因上调 1.5~2.0。

图 7 低剪切力血管段细胞迁移和细胞增殖相关基因的上调变化

Figure 7 Positive regulation of cell migration and cell proliferation related genes in low shear stress blood vessel

(编码 PPAR- γ 蛋白)、SCD2 基因 (编码脂酰辅酶 A 脱氢酶 2)及 FABP(编码脂肪酸结合蛋白), 而 MAPK 信号通路(14/259)、NF-kappa B 信号通路(10/103)、PI3K-Akt 信号通路 (18/356) 和 TGF- β 信号通路 (4/83), 其中包括 TGFB2(编码 TGF- $\beta 2$)显著性上调($P < 0.05$, 图 8)。

2.6 QRT-PCR 验证分析

运用 QRT-PCR 对上述 PPARG、TGFB2、EDN1 3 个基因进行验证, 结果显示: 相比于 RCCA, 在 LCCA-P 中 PPARG 下调 0.14 倍, TGFB2 和 EDN1 分别上调 2.51 倍和 1.83 倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $n = 4$), 验证结果表明与基因芯片结果一致(图 9)。

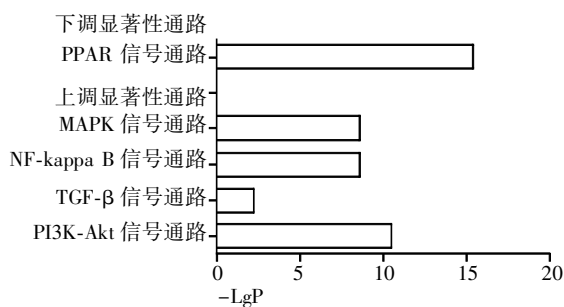
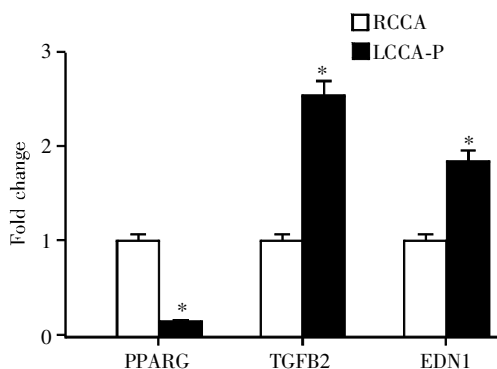


图 8 低剪切力血管段差异基因相关的信号通路

Figure 8 Differences gene related signaling pathway in low shear stress blood vessel



与 RCCA 比较, * $P < 0.05$ ($n=4$)。

图 9 QRT-PCR 验证结果

Figure 9 QRT-PCR results

3 讨论

AS 相关的心脑血管疾病是一类严重威胁人类生命的疾病,研究认为 AS 的发生与血流作用于血管壁的剪切力密切相关,因此研究剪切力对 AS 易感性的影响对阐明其发病机制、探索新的疾病治疗方法具有重要意义。

AS 形成过程中包括多种病理改变,如内皮损伤、脂质沉积、单核及淋巴细胞浸润、免疫反应等。其中,血管内皮细胞损伤被认为是 AS 产生的始动环节,内皮损伤后其通透性、黏附性增加、血液凝固改变等可促使使血管壁发生 AS 的一系列连锁反应^[19]。Cheng 等^[20]将一种剪切力诱发装置植入血管外周,在同一段血管的相邻区域模拟出不同数值水平和状态的剪切力。本研究使用 BALB/c 小鼠左颈总动脉套管植入术造模,术后 3 d 超声检测即提示,与假手术组左右颈总动脉、自身右侧颈总动脉相比,左颈总动脉套管近心端呈现低血流剪切力变化,持续 8 周后病理及电镜结果表明,套管近心端内皮细胞部分脱落,形态不完整,细胞质内空泡化形成,血管中膜增厚等病理变化,提示是由局部血流低剪切力所致的 AS 血管病变,高脂饮食可加重

上述病变。

血管内皮细胞损伤、血管平滑肌细胞以及单核/巨噬细胞等增殖迁移,是早期动脉粥样硬化发生发展的重要环节。在本实验中,与自身正常血流血管段相比,低剪切力血管段出现的上述血管早期病变可能与局部 PPAR 信号通路的下调相关。通过基因芯片检测,低剪切力血管段标本 miRNAs 表达上调 2 倍以上的有 4 个,包括 miR-27a。PPAR- γ 3'非转录区域有 miR-27a 结合位点,上调的 miR-27a 能够与其结合位点结合,转而抑制 PPAR- γ 的表达,使低剪切力段血管壁 PPAR- γ 表达量下降(基因芯片结果提示下降至正常血流段的 46%,QRT-PCR 验证下降为正常对照组的 14%)。低剪切力血管壁局部 PPAR 信号通路下调,解除其对 TGF/Smad 等信号通路的抑制作用,TGF 信号通路激活,相关细胞因子和生长因子分泌增加,如内皮细胞分泌内皮素-1(endothelin-1, ET-1),以及血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)下游介质结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的表达分泌,均促使 VSMC 的增殖和迁移;另一方面,PPAR 通路下调,PI3K-Akt 激酶信号通路激活,激活内皮细胞增殖及迁移等病变。本研究发现低剪切力区 MAPK、NF-kappa B 信号通路上调,与既往研究报道相符^[21]。低剪切力通过 MAPK、NF-kappa B 信号通路促进血管内皮细胞表达趋化因子,诱导单核巨噬细胞、淋巴细胞聚集引起局部炎症反应,从促进 AS 的发生发展。

综上所述,本研究通过颈总动脉套管植入造成 BALB/c 小鼠颈总动脉低剪切力变化。与假手术组及自身正常血流血管段相比,低剪切力血管段局部呈现内皮细胞损伤、中膜增厚等血管早期病变,可能与低剪切力血管段局部 PPAR 信号通路下调后引起的促细胞增殖、迁移相关基因表达及信号通路激活有关。

[参考文献]

- [1] Vanderlaan PA, Reardon CA, Getz GS. Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (1): 12-22
- [2] van Hinsbergh VW. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17 (6): 1018-1023
- [3] Schwenke DC, Carew TE. Initiation of atherosclerotic le-

- sions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions[J]. *Arteriosclerosis*, 1989, 9(6):895-907
- [4] Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology[J]. *Physiol Rev*, 1990, 70(2):427-451
- [5] 王芳, 马向华, 沈捷, 等. PPAR- γ 激动剂对瘦素刺激的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2008, 28(3):300-303
- [6] 陈永熙, 王伟铭, 周同, 等. PPAR- γ 作用及其相关信号转导途径[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(3):382-386
- [7] Kang BY, Park KK, Green DE, et al. Hypoxia mediates mutual repression between microRNA-27a and PPAR γ in the pulmonary vasculature[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e79503
- [8] Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPAR γ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(2):247-251
- [9] Hu W, Wang X, Ding X, et al. MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPAR α [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e34165
- [10] Gurha P, Wang T, Larimore AH, et al. microRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e75882
- [11] Tu K, Zheng X, Dou C, et al. MicroRNA-130b promotes cell aggressiveness by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11):20486-20499
- [12] Grundy SM. An international atherosclerosis society position paper: global recommendations for the management of dyslipidemia[J]. *J Clin Lipidol*, 2013, 7(6):561-565
- [13] Kawaguchi H, Miyoshi N, Miura N, et al. Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research: novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet[J]. *J Pharmacol Sci*, 2011, 115(2):115-121
- [14] Jensen TW, Mazur MJ, Pettigew JE, et al. A cloned pig model for examining atherosclerosis induced by high fat, high cholesterol diets[J]. *Anim Biotechnol*, 2010, 21(3):179-187
- [15] von der Thusen JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Induction of rapid atherogenesis by perivascular carotid collar placement in apolipoprotein E-deficient and low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *Circulation*, 2001, 103(8):1164-1170
- [16] Castier Y, Brandes RP, Leseche G, et al. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling[J]. *Circ Res*, 2005, 97(6):533-540
- [17] Neth P, Nazari-Jahantigh M, Schober A, et al. MicroRNAs in flow-dependent vascular remodelling[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(2):294-303
- [18] Sueyoshi S, Mitsumata M, Kusumi Y, et al. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- α and PPAR- γ in human atherosclerosis[J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(7):429-438
- [19] Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis[J]. *Circ J*, 2009, 73(4):595-601
- [20] Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress[J]. *Circulation*, 2006, 113(23):2744-2753
- [21] Shaik SS, Soltan TD, Chaturvedi G, et al. Low intensity shear stress increases endothelial ELR+ CXC chemokine production via a focal adhesion kinase-p38 β MAPK-NF- κ B pathway[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(9):5945-5955

[收稿日期] 2015-01-17