论著

文章编号:1000-5404(2005)20-2012-04

过氧化物酶增殖体激活受体β在急性肺损伤大鼠肺组织的表达及其意义

姜 鹏[1],赵咏梅[2],王建春[1],黄 建[1],钱桂生[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]兰州军区乌鲁木齐总医院内科,乌鲁木齐 830000)

提 要:目的 观察内毒素(lipopolysaccharide, LPS)复制的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)大鼠肺组织过氧化物酶增殖体激活受体β(peroxisome proliferation activated receptor-β, PPARβ)表达的变化,探讨PPARβ在ALI中可能的作用。**方法** 将40只雄性Wistar大鼠随机分为对照组、LPS致伤1、2、4 h组和8 h组。用LPS(5 mg/kg)静脉注射复制大鼠ALI模型,分别在LPS致伤后1、2、4、8 h时活杀大鼠,测定各组肺组织湿/干重比(W/D)及肺组织病理变化;采用RT-PCR法检测肺组织中PPARβ mRNA的表达;采用免疫组化法检测肺组织中PPARβ的表达。**结果** LPS致伤后2、4、8 h肺组织W/D较对照组均显著升高($F=19.61$, $P<0.01$);LPS致伤后1、2、4 h PPARβ mRNA表达分别较对照组显著升高($F=86.96$, $P<0.01$);而LPS致伤后2、4、8 h组PPARβ表达阳性细胞光密度值较对照组显著升高($F=6.89$, $P<0.05$)。**结论** PPARβ在ALI大鼠肺组织表达升高,提示其可能参与了急性肺损伤的发生发展。

关键词: 过氧化物酶增殖体激活受体;急性肺损伤;炎症反应

中图法分类号: R322.35;R392.11;R563 **文献标识码:** A

Expression of peroxisome proliferation activated receptor-β in lung of rats with acute lung injury by lipopolysaccharide

JIANG Peng[1], ZHAO Yong-mei[2], WANG Jian-chun[1], HUANG Jian[1], QIAN Gui-sheng[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Medicine, Urumchi General Hospital of Lanzhou Military Command Area, Urumchi 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and role of peroxisome proliferation activated receptor-β (PPARβ) in lung of rats stimulated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Thirty-two male Wistar rats were established into acute lung injury models by venous injection of LPS and another eight LPS were injected with normal saline as controls. All rats were sacrificed at 1, 2, 4, 8 h after injection of 5 mg/kg LPS. The ratio of lung wet/dry weight were measured. Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical method were used to measure the expression of PPARβ mRNA and PPARβ protein in the lung. **Results** The ratio of lung wet/dry weight in rats killed at 2 h, 4 h and 8 h after LPS injection was significantly higher than that of control group ($F=19.61$, $P<0.01$). The expression of PPARβ mRNA (IOD) in rats killed at 1 h, 2 h and 4 h after LPS injection was significantly higher than that in control group ($F=86.96$, $P<0.01$) and PPARβ (IOD) at 2 h, 4 h and 8 h were significantly higher than that in control group ($F=6.89$, $P<0.05$). **Conclusion** Our data showed the expression of PPARβ was high in rat lung and PPARβ maybe play a major role in acute lung injury.

Key words: peroxisome proliferator-activated receptors; acute lung injury; inflammation

过氧化物酶增殖体激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是一种细胞核内新的甾体激素受体,属Ⅱ型核受体超家族成员,在体内可分为3型,即α、β和γ。PPARα及PPARγ由其激活剂活化后可调控多种核内靶基因的表达,影响人体糖脂代谢、细胞发育等过程[1,2],而PPARβ的功能目前仍然不详。最近研究表明[3],PPARβ可能与许多炎性疾病密切相关。PPARβ在急性肺损伤肺组织中的表达

基金项目: 全军医学科学技术研究"十五"计划指令性课题(01Z074)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (01Z074)

作者简介: 姜 鹏(1973-),男,山东省海阳市人,硕士研究生,主治医师,主要从事ALI/ARDS机制发面的研究。电话:(023)68755320; E-mail: jipzym@126.com

通讯作者: 王建春,电话:(023)68774603, E-mail: wjc@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-07-10;**修回日期:** 2005-09-12

变化尚少见文献报道。本实验拟用半定量 RT-PCR 和免疫组织化学染色法观察脂多糖复制的大鼠急性肺损伤(acute lung injury, ALI)模型肺脏中 PPARβ 的表达情况,以探讨 PPARβ 在 ALI 中可能的作用。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS Ecoli:O111:B_4):美国 Sigma 公司;Tripure RNA 提取液:美国 Roche 公司;RT-PCR 试剂盒:日本 TaKaRa Biotech 公司;山羊抗 PPARβ 单克隆抗体 IgG(一抗):美国 Santa Crus 公司;S-P 免疫组化试剂盒及 DAB 显色剂:北京中山生物技术有限公司。

PE9600 型 PCR 仪:Applied Biosystem 公司;Lamda Bio-20 紫外分光光度计:P-E 公司;凝胶密度扫描系统:美国 UVP 公司;电热真空干燥箱:上海实验仪器总厂。

1.2　实验动物分组及模型的复制

雄性 Wister 大鼠 40 只,8 周龄,体质量(175 ± 10) g,由第三军医大学实验动物中心提供。在本实验室适应 10 d(恒温恒湿,标准鼠食喂养)后按完全随机的原则分为 5 组:对照组(control)、LPS 后 1 h 组(L1h)、LPS 后 2 h 组(L2h)、LPS 后 4 h 组(L4h)、LPS 后 8 h 组(L8h),每组 8 只。

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)动物模型复制按以下方法进行:大鼠以 10 % 盐酸氯胺酮(50 mg/ kg) 腹腔注射麻醉后,按 5 mg/kg 的剂量经颈静脉注射溶解于生理盐水中的 LPS(0.2%)。对照组注射等量的生理盐水。各组大鼠在预定时相点放血活杀。

1.3　肺组织湿/干比值(W/D weight ratio)测定

采用真空干燥法:各实验组的肺组织(左肺肺叶)称湿重后,置真空干燥箱内,70 ℃,真空 4 mmHg 条件下烘烤 24 h 后称干重,计算 W/D 比值。

1.4　病理组织学检查

取大鼠右肺叶肺组织经 10% 甲醛磷酸缓冲液固定,石蜡包埋切片, HE 染色,常规光镜下观察。

1.5　RT-PCR 法测定大鼠肺组织 PPARβ mRNA 的表达

取右肺下叶迅速放液氮中冻实,留做 RNA 提取备用。①Tripure:常规一步法提取肺组织总 RNA。紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 波长的 D 值,计算 RNA 浓度。取 1 μg 的 RNA 进行电泳观察 RNA 质量。②RT-PCR:按试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中进行反应。经 30 ℃ 10 min,48 ℃ 30 min, 99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min 逆转录合成第 1 条 cDNA ,以此为模板分别用 PPARβ 引物和内参照 3 - 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)引物经 PCR 方法进行扩增:94 ℃变性 5 min 后进入 94 ℃变性 30 s, 56 ℃退火 30 s ,72 ℃延伸 50 s 的热循环,共 35 次。上述引物均源自 GenBank 中大鼠 PPARβ(No. U40064)和 GAPDH(No. M17701)全长 cDNA 序列,经 Primer5. 0 软件设计, PPARβ 引物正义:5′-CATCCACGACATTGAGACG-3′,反义:5 ′-GACTGGCAGCGGTAGAAC -3′,合成片段长度 118 bp;GAPDH 引物正义:5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′,反义:5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC - 3′,合成片段长度 195 bp。由日本 TaKaRa Biotech 公司合成。③产物分析:取 PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳。经凝胶成像系统分析成像,以 GAPDH mRNA 的 RT -PCR 产物为内参照,以目的 PPARβ 片段与 GAPDH 片段的条带光密度(IOD)比值作为 PPARβ mRNA 的相对量分别进行比较。

1.6　免疫组化染色法测定大鼠肺组织 PPARβ 的表达

采用 S-P 法,严格按照试剂盒说明书操作:将 4 μm 厚的石蜡切片脱蜡至水,3% 甲醇- 双氧水室温孵育 10 min,用 pH = 6, 0.01 mol/L 的柠檬酸进行抗原修复(煮沸 8 min),保温 10 min,冷却至室温,再用 PBS 洗 3 min × 3 次,然后滴加正常兔血清工作液,室温孵育 10 min 后,滴加一抗 (用抗体稀释液按 1∶200 稀释) 4 ℃冰箱过夜,用 PBS 洗 3 min × 3 次,滴加生物素标记的兔抗山羊 IgG 工作液(二抗) , 37 ℃水浴锅内孵育 30 min ,再次 PBS 洗 3 min × 3 次,滴加辣根酶 HRP 标记链霉卵白素工作液(三抗) 37 ℃水浴锅内孵育 30 min ,PBS 洗 3 min × 3 次,DAB(现配)显色 3 ~ 10 min,镜下控制着色深度,自来水洗终止,苏木素复染 2 min,最后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。阴性对照用 PBS 替代一抗,其余步骤同上。以细胞核出现棕黄色染色为阳性。每个样本任选 10 个视野,应用 Tiger920 彩色病理图像分析系统自动检测阳性细胞光密度值,分别取其平均值,进行统计分析,并用尼康照相机拍摄典型视野。

1.7　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 医学统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　肺组织 W/D 比值测定

L2h(5.47 ± 0.34)、L4h(5.71 ± 0.38)和 L8h 组(5.33 ± 0.33)肺 W/D 比值显著高于对照组(4.40 ± 0.36);各组间差异十分显著($F = 19.61$, $P < 0.01$)。

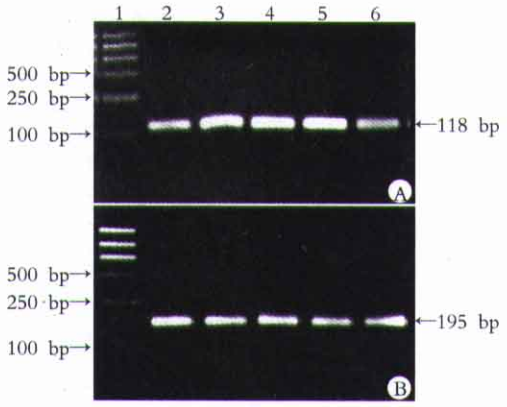
2.2　病理组织检查

2.2.1　大体观察　　LPS 各时相组肺脏大体标本均有不同程度的肿胀,伤后 1 h 包膜下可见到暗红色点状病灶,2、4 h 后出血点扩大呈斑片状,肺脏色泽暗红,体积、质量增加,脏层胸膜张力增高,切面可有淡红或白色泡沫样液体溢出。而对照组肺外观呈粉红色,无明显异常改变。

2.2.2　光镜观察　　肺组织石蜡切片,HE 染色显示对照组:肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变,间质血管无充血,肺泡腔内未见中性粒细胞浸润;L2h、4h 和 8h 组肺组织有明显渗出、水肿及出血,大量炎症细胞浸润,肺泡结构破坏,伴局灶性肺不张和肺气肿,可见肺泡腔内炎性细胞浸润,大量均质红染样渗出物和微血栓及透明膜形成等病变。

2.3　LPS 刺激对大鼠肺组织 PPARβ mRNA 表达的影响

PPARβ 与 GAPDH mRNA 的吸光度比值(IDV)间比较,L1h(1.08 ± 0.12)、L2h(1.39 ± 0.09)、L4h 组(1.46 ± 0.13)均显著高于对照组(0.65 ± 0.09);各组间差异非常显著 ($F = 86.96$, $P < 0.01$),见图 1。



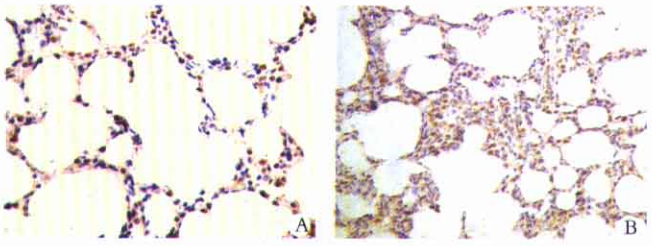
A: PPAR β; B: GAPDH L1h. 1:DL2000 DNA marker; 2: Control; 3: L1h; 4: L2h; 5: L4h; 6: L8h

图1 PPARβ mRNA 在 ALI 大鼠肺组织的表达

Fig 1 Expression of PPARβ mRNA in lung of ALI rats

2.4 肺组织 PPARβ 的免疫组化表达情况

免疫组化普通镜检发现对照组可见一定数量的 PPARβ 阳性细胞，以核着色为主，为棕色且色深，胞浆未见表达或偶表达，主要分布在肺泡上皮细胞，见图2。LPS 致伤后2、4 h 和8 h 组 PPARβ 阳性细胞光密度值明显增高，主要分布在肺间质的炎细胞和肺泡上皮细胞，见图2。对照组阳性细胞光密度值为(0.61 ±0.05)，L2h 组(0.78 ±0.17)，L4h 组(0.90 ±0.14)，L8h 组(0.81 ±0.12)，各组间差异非常显著($F=6.89$, $P<0.05$)。



A: Control group; B: Gruop of 4 h after LPS injection

图2 对照组和 LPS4 h 组肺组织 PPARβ 的免疫组化结果 (S-P ×200)

Fig 2 Expression of PPARβ protein by immunohistochemical method (S-P ×200)

3 讨论

PPARα、PPARβ 和 PPARγ 在组织中的分布和表达不尽相同且有不同的配体结合区域。在大多数组织细胞中 PPARα、β 和 γ 是共表达的。PPARα 在肝细胞、心肌细胞、肠上皮细胞、肾近曲小管上皮细胞和肌肉组织表达较高。PPARγ 则高表达于成纤维细胞、平滑肌细胞、乳腺细胞、脾脏的红白髓质，骨髓前体细胞、单核细胞和巨噬细胞、肺泡及气道上皮细胞、血管内皮细胞等细胞中。PPARβ 的表达组织特异性不明显，PPARβ 在肺组织中也有一定量的表达，主要分布在气道、肺泡上皮细胞，气道和肺血管平滑肌细胞及肺血管内皮细胞中[4,5]。PPARα 除了参与调节脂肪酸的 β-氧化和脂蛋白新陈代谢过程外，也参与调控炎症反应。PPARγ 则是体内调节糖、脂代谢的关键调节子，同时 PPARγ 也参与调节细胞分化、恶性肿瘤的形成且有抗炎、调节免疫和抗增殖活性的作用。而 PPARβ 的作用目前仍不十分清楚[6]。

ALI 是指机体遭受严重创伤、感染等打击以后，出现以肺泡毛细血管膜损伤，导致肺水肿和微肺不张为特征，临床表现为呼吸窘迫和顽固性低氧血症的综合征。至今其病死率居高不下。在 ALI 的诸多诱因中，革兰阴性菌所致内毒素血症是最常见的基础病之一，在体内 LPS 致 ALI 主要是通过其与 LBP 和其它介质的作用下最终引起 NF-κB、AP-1 的活化，释放大量细胞因子(TNF-α，IL-1β 等)所致[7,8]。ALI 时肺组织有大量炎性细胞浸润，且肺组织及外周血中的炎性介质水平明显增高。同时，肺泡上皮Ⅱ型细胞的凋亡与过度的炎症反应对肺组织的破坏也同样重要。肺泡上皮细胞本身具有屏障和促进 ALI 修复的功能[8]。

本实验用 LPS 复制了 ALI 大鼠模型，观察 PPARβ mRNA 与 PPARβ 蛋白在 LPS 致伤后不同时相肺组织中表达的变化。根据大鼠肺组织病理检查及肺组织 W/D 比值结果均显示，LPS 复制的 ALI 模型是成功的；肺组织中 PPARβ mRNA 在 LPS 致伤后 1 h 即有所升高，4 h 升至峰顶，8 h 有所回落，但仍高于对照组；用彩色图像分析系统分析免疫组化结果显示，对照组肺组织表达一定数量的 PPARβ，以核着色为主，胞浆未见表达或偶表达，主要分布在肺泡上皮细胞，与文献[4]报道一致，LPS 致伤各组 PPARβ 的表达则较对照组显著升高，主要分布在肺间质的炎细胞和肺泡上皮细胞。实验结果显示，ALI 大鼠肺组织中 PPARβ 无论在其基因转录水平还是蛋白水平均较正常肺组织表达升高，只是 PPARβ 在上述两水平的表达存在时间差，即蛋白表达要迟于转录 2 h 以上。为此我们推测 PPARβ 可能参与了 ALI 的病理过程，我们考虑 PPARβ 可能是炎症反应信号通路中的一支，PPARβ 还受其它因素的影响所致。研究表明，PPARs 与其配体作用后可通过抑制或协同 NF-κB 和激活蛋白-1(AP-1)的活化，引起下游细胞因子如 IL-1、IL-8 和 TNF-α 表达减少或增加而与炎性疾病密切相关[9]。我们研究发现[10]：PPARα 在其激活剂 wy14643 的激活下，可明显降低 ALI 大鼠肺组织及血浆中 TNF-α 等炎性介质的水平，并能改善 PaO_2 及肺组织的炎性浸润。因此我们推测 PPARβ 在其配体(包括激动剂和抑制剂)作用下，通过抑制或激活核因子 NF-κB 及 AP-1 等信号转导途径在一定程度上可能影响 ALI 的发生和发展。值得今后做进一步的研究。

参考文献：

[1] Willson T M, Brown P J, Sternbach D D, *et al*. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery[J]. J Med Chem, 2000, 43(4): 527-550.

[2] Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors [J]. Lancet, 1999, 354(9173): 141-148.

[3] Jove M, Laguna J C, Vazquez Carrera M. Agonist-induced activation releases peroxisome proliferator-activated receptor β/δ from its inhibition by palmitate-induced nuclear factor-κB in skeletal muscle cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1734(1): 52-61.

[4] Braissant O, Foufelle F, Scotto C, *et al*. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs): tissue distribution of PPAR-α, -β, and -γ in the adult rat [J]. Endocrinology, 1996, 137(1): 354-366.

[5] Inoue K, Kawahito Y, Tsubouchi Y, *et al*. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma in human lung cancer [J]. Anticancer Res, 2001, 21(4A): 2471-2476.

[6] Clark R B. The role of PPARs in inflammation and immunity[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(3): 388-400.

[7] Yang H, Young D W, Gusovsky F, *et al*. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1[J]. J Biol Chem, 2000, 275(27): 20861-20866.

[8] 钱桂生，王建春. 急性呼吸窘迫综合征研究进展[J]. 第三军医大学学报，2004，26(10)：843-844.

[9] Delerive P, Gervois P, Fruchart J C, *et al*. Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators [J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36703-36707.

[10] 姜 鹏，王建春，钱桂生. 过氧化物酶增殖体激活受体α mRNA在急性肺损伤大鼠肺组织表达的变化[J]. 中国急救医学，2005，25(6)：439-441.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2005)20-2015-01

个案与短篇

早期妊娠小鼠荷瘤对胚胎着床的影响

Effects of bearing tumor at early pregnancy on embryo implantation in mouse

马 芳，王智彪，王 媛，赵 颉 （重庆医科大学生物医学工程系医学超声研究所，重庆 400016）

在血绒毛胎盘型动物(包括人和小鼠)中，成功的植入取决于囊胚侵入性和子宫内膜接受性的密切合作[1]。早期妊娠荷瘤的机体可能对妊娠的生理产生一定的影响。本研究采用妊娠第1天皮下和腹腔使早期荷瘤小鼠，分别与第4.5天和第5天观察胚胎发育状况、胚胎体外植入能力和体内着床位点数及其子宫内膜的组织学变化。

1 材料与方法

1.1 研究对象

健康、成年NIH小鼠，由重庆医科大学实验动物中心提供，8~12周龄，体质量25~30 g，雌雄按2∶1合笼，次晨开始查阴栓，发现阴栓为妊娠第1天。实验组：将第1天妊娠小鼠右腋皮下和腹腔分别接种腹腔传代保种的H22(小鼠肝癌)和S180(小鼠骨肉瘤)0.1 ml。对照组：正常妊娠、未处理NIH小鼠。

1.2 方法

1.2.1 第4.5天的囊胚发育率和体外培养 取实验组和对照组第4.5天小鼠，脱颈处死，75%乙醇常规消毒，剪取双侧子宫角，用1 ml注射器连接30G 1/2皮试针头吸取DMEM/F12培养基冲洗子宫腔，收集胚胎，在倒置显微镜观察囊胚发育率及其形态。同时挑取发育至中晚期且质量良好的囊胚，移入到小鼠成纤维细胞NIH3T3细胞铺底的6孔培养板中，每孔10~30枚胚胎，加入含20% FBS、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、15 mmol/L HEPES及2 mmol/L L-谷氨酰胺的DMEM/F12(1∶1)培养液，置于37 ℃、5% CO_2、相对湿度为95%~100%的孵箱中培养，每24小时添换培养液。在倒置显微镜下选择合适的视野后，通过自动视频时差显微摄像系统(video time-lapse microscopy)观察、记录小鼠囊胚的24 h的脱带率、48 h的贴附率和72 h的扩展率。

1.2.2 第5天妊娠鼠的胚胎着床位点数 取实验组和对照组第5天小鼠，用5%的台盼蓝0.2 ml从尾静脉注入，10 min后，待口周、眼球部位呈现蓝色时，剖腹，取出子宫观察蓝染位点，计数胚胎着床数。

1.2.3 第5天妊娠子宫的组织学变化 取实验组和对照组第5天小鼠，剖腹取子宫，4%甲醛固定，石蜡包埋，4 μm连续切片，HE染色，观察组织学变化。

1.3 统计学处理

用SPSS统计软件包对计量资料行方差分析，计数资料行χ^2检验。

2 结果

荷瘤组第4.5天的大部分胚胎发育成囊胚，形态饱满、折

（下转2019页）

作者简介：马 芳(1976-)，女，四川省达州市人，博士研究生，讲师，主要从事肿瘤与胚胎方面的研究。电话：(023)68485022，E-mail：mafangmed@yahoo.com.cn

收稿日期：2005-05-30；修回日期：2005-08-02