论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0468-04

急性肺损伤大鼠肺组织 PPAR-γ 表达的研究

王建春[1],姜 鹏[2],黄 建[3],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呼吸科,乌鲁木齐 830000;[3]重庆武警医院呼吸科, 重庆 400061)

摘 要: 目的 在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)复制的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)大鼠模型中,观察PPARγ表达的改变,探讨PPAR-γ在ALI发病中的作用。**方法** 在LPS复制的大鼠ALI模型中,观察动脉血气、肺湿/干(W/D)比值、肺组织病理,用RT-PCR法检测肺组织PPAR-γ、TNF-α mRNA表达,用ELISA法检测TNF-α蛋白变化,并用免疫组化观察肺组织PPAR-γ的改变。**结果** ALI大鼠,PaO_2显著降低($P<0.05$),肺W/D比值显著高于对照组($P<0.05$),病理显示肺组织受损;肺组织TNF-α mRNA显著升高($P<0.05$),与此同时血浆TNF-α亦显著升高($P<0.05$)。正常大鼠肺组织可表达PPAR-γ,LPS致伤后肺组织PPAR-γ mRNA在1 h即开始下降,2 h降至谷底,并持续至实验结束。免疫组化显示致伤后1 、2 h与对照组无显著差异,从4 h显著降低并持续至8 h($P<0.05$)。**结论** 正常大鼠肺组织可表达PPAR-γ,LPS可引起ALI大鼠肺组织PPAR-γ的基因和蛋白水平表达下降,这可能与ALI炎症持续和损伤有关。

关键词: 过氧化物酶增殖体激活受体-γ(PPAR-γ);急性肺损伤(ALI);脂多糖(LPS)

中图法分类号: R322.35;R394.2;R563.02 **文献标识码:** A

PPARγ expressions in rat lung tissues after acute lung injury

WANG Jian-chun[1], JIANG Peng[2], HUANG Jian[3], QIAN Gui-sheng[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Urumchi General Hospital of Lanzhou Military Command, Urumchi Xinjiang 830000, [3]Department of Respiratory Diseases, Chongqing Armed Police Hospital, Chongqing 400061, China)

Abstract: Objective To observe the changes of PPARγ expressions in acute lung injury (ALI) rats and explore the role of PPARγ in the pathogenesis of ALI. **Methods** ALI model was induced by lipopolysaccharide (LPS) in 32 male Wistar rats. Another 8 matched normal rats were used as control. At 1, 2, 4, 8 h after ALI, arterial blood gas analysis, lung tissue wet/dry weight ratio, lung histopathological changes were observed; The expressions of PPARγ and TNF-α mRNA were detected by RT-PCR; TNF-αcontent was examined with ELISA; PPARγ protein in lung tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with control rats, PaO_2 of ALI rats decreased significantly ($P<0.05$); Lung wet/dry weight ratio rose ($P<0.05$); Lung tissues were damaged histopathologically; The expressions of TNF-α mRNA in lung tissues and blood plasma increased markedly ($P<0.05$). PPARγ expressed in lung tissues of control rats. PPARγ mRNA expressions in lung tissues decreased in 1 h after ALI, declined to the lowest level 2 h after ALI and kept at a low level to the end of observation peroid. Immunohistochemical staining of PPARγ showed that there was no difference between ALI rats and control rats at 1 h and 2 h after ALI, and significant decrease occurred 4 h after ALI and lasted to 8 h after ALI ($P<0.05$). **Conclusion** Lung tissues of normal rats express PPARγ. The decreased PPARγ mRNA and protein expressions in the rats of ALI caused by LPS may be associated with inflammation and damage of lung tissues.

Key words: peroxisome proliferator-activated receptor (PPARγ); acute lung injury; lipopolysaccharide

基金项目: 国家自然科学基金(30570808);全军医学科研"十一五"科技攻关项目(06G083)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570808) and the Key Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06G083)

作者简介: 王建春,男,四川省岳池县人,博士,主任医师,教授,主要从事肺部炎症性疾病/急性肺损伤方面的研究,发表论文40余篇。电话:(023)68774603,E-mail: wjc@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2007-06-06;**修回日期:** 2007-10-23

过氧化物酶增殖体激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)属于Ⅱ型核受体超家族成员,可分为 PPAR-α、PPAR-β(PPAR-δ 或 NUC-1)和 PPAR-γ 3 种亚型,三者在组织中的分布和表达不尽相同,其中 PPAR-γ 表达于脂肪细胞、单核细胞和巨噬细胞、肺泡及气道上皮细胞和血管内皮细胞等。近年研究表明 PPAR-γ 除具有调节体内糖、脂肪代谢、细胞分化等作用外,还具有抗炎、调节免疫的作用[1,2]。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是临床常见危重症,其死亡率极高。目前认为 ALI/ARDS 的本质是一种炎症反应,多种炎症介质和细胞因子参与发病[3]。因此我们推测,在 ALI/ARDS 中,PPAR-γ 可能参与发病,在炎症的失控中起一定作用,为此,我们在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)复制的大鼠 ALI 动物模型观察了肺组织 PPAR-γ 表达的改变,以进一步探讨 ALI/ARDS 的发病机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂和仪器

脂多糖(LPS,O_{111}:B_4,Sigma,美国),RT-PCR 试剂盒(RNA PCR kit Ver. 3.0,TaKaRa,日本),RNA 提取试剂(Tripure Kit, Roche,美国),大鼠 TNF-α ELISA 检测试剂盒(晶美生物技术有限公司,深圳), PTC-200 PCR 扩增仪(GENE 公司,美国), Alpha Innotech 凝胶成像分析系统(Alpha Innotech, 美国), Lambda Bio 紫外分光光度仪(Perkin-Elmer,美国),酶标分析仪(Vmax)(Molecular Devices, 美国),凝胶干燥仪(Bio-Rad 公司,美国),半干转膜仪(Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2　模型复制

健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量(172 ± 26)g,由第三军医大学实验动物中心提供,按完全随机化原则分入下列各组(n =8),LPS 1、2、4、8 h 组、生理盐水对照组。用 10% 盐酸氯胺酮溶液(50 mg/kg)腹腔注射麻醉 Wistar 大鼠,仰卧位固定于专用手术台上,消毒颈部皮肤,从颈外静脉缓慢注入 LPS(5 mg/kg),对照组注入等体积生理盐水。在 LPS 注射完后 1、2、4、8 h,采集颈动脉血,行动脉血气分析和 TNF-α 测定;然后大鼠放血活杀,取右肺下叶,行病理检查。另取左肺下叶部分肺组织,迅速置液氮中冻存备用;左肺其余肺叶作湿/干(W/D)测定。

1.3　RT-PCR 法检测肺组织中 PPAR-γ、TNF-α mRNA 的表达

取左肺下叶迅速放液氮中冻实,留做 RNA 提取备用。Tripure 常规一步法提取肺组织总 RNA,紫外分光光度计测定 $D(260)$、$D(280)$,计算 RNA 浓度。取 1 μg 的 RNA 进行电泳观察 RNA 质量。RT-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 PPAR-γ、TNF-α、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物经 PCR 法进行扩增:94 ℃变性 5 min 后进入 94 ℃变性 30 s,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 PPAR-γ、TNF-α 和 GAPDH 全长 cDNA 序列,经 Primer 5.0 软件设计,由日本 TaKaRa Biotech 公司合成。引物序列及反应条件见表 1。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,以目的 PPAR-γ 片段和 TNF-α 片段与 GAPDH 片段的平均光密度(IOD)比值作为 PPAR-γ mRNA 和 TNF-α mRNA 的相对量,并分别进行比较。

表 1　目的基因的引物序列及反应条件

基因名称	引物序列	目的片段长度	退火温度
PPAR-γ	正义链:5′-TTTACCACGGTTGATTTCTC-3′	319 bp	53 ℃
	反义链:5′-GCTTCAATCGGATGGTTCTT-3′		
TNF-α	正义链:5′-CTTCTGTCTACTGAACTTCGG-3′	380 bp	54 ℃
	反义链:5′-GTGCTTGATCTGTTGTTTCC-3′		
GAPDH	正义链:5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′	196 bp	55 ℃
	反义链:5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3′		

1.4　血浆 TNF-α 的检测

采用双抗体夹心 ELISA 法,按试剂盒说明书要求操作,显色后经全自动酶标仪检测。

1.5　肺组织 PPAR-γ 免疫组化观察

采用免疫组织化学染色法 (S-P 法)检测大鼠肺组织 PPAR-γ 蛋白的表达。应用 TIGER920 图像分析系统进行图像分析,以平均光密度(IOD)值表示。

1.6　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件作单因素方差分析,组间比较采用 q 检验。

2　结果

2.1　动脉血气分析结果

在 LPS 诱发的 ALI 各时相组,注射 LPS 后 1、2、4、8 h,PaO_2 较对照组均显著下降(P <0.05)。见表 2。

表 2　ALI 大鼠动脉血气的变化 (n =8,$\bar{x} \pm s$)

组别	pH	$PaCO_2$ (mmHg)	PaO_2 (mmHg)	HCO_3^- (mmol/L)
对照组	7.39 ± 0.03	39.25 ± 4.74	93.38 ± 9.10	23.65 ± 1.38
LPS 1 h 组	7.31 ± 0.02	42.78 ± 4.06	74.81 ± 11.28[a]	22.96 ± 1.55
LPS 2 h 组	7.23 ± 0.16	44.29 ± 8.47	68.80 ± 12.24[a]	26.29 ± 4.32
LPS 4 h 组	7.22 ± 0.08	44.59 ± 8.54[a]	62.71 ± 11.06[a]	29.77 ± 5.16[a]
LPS 8 h 组	7.33 ± 0.06	41.43 ± 7.18	70.90 ± 12.71[a]	24.62 ± 6.21

a:P <0.05,与对照组比较

2.2　肺组织 W/D 比值

LPS 致伤后 1、2、4、8 h 组肺 W/D 比值均显著高于对照组(P <0.05)。见表 3。

2.3 病理观察

肺组织 HE 染色显示,LPS 致伤后,2、4、8 h 肺组织有明显渗出、水肿及出血现象,可见肺泡结构破坏,伴局灶性肺不张和肺气肿,肺泡腔内大量炎性细胞浸润,大量均质红染样渗出物和微血栓及透明膜形成等病变。

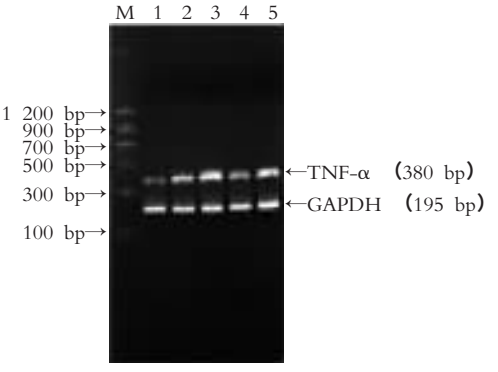
2.4 肺组织 TNF-α mRNA 的表达

RT-PCR 电泳结果显示在 380 bp 处,可见 TNF-α mRNA 表达。在 LPS 致伤后各时相组,肺组织 TNF-α mRNA 表达均较对照组显著升高($P<0.05$),以 LPS 2 h 组升高最明显,见表 3、图 1。

表 3 肺组织 W/D 比值、TNF-α mRNA 和血浆 TNF-α 的变化($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	W/D	TNF-α mRNA (IOD 比值)	TNF-α 浓度 (pg/ml)
对照组	4.05 ± 0.33	0.24 ± 0.05	5.66 ± 0.72
LPS 1 h 组	5.03 ± 0.51[a]	0.68 ± 0.07[a]	12.33 ± 1.79[a]
LPS 2 h 组	5.47 ± 0.54[a]	0.92 ± 0.05[a]	54.72 ± 6.62[a]
LPS 4 h 组	5.71 ± 0.68[a]	0.85 ± 0.06[a]	41.69 ± 5.26[a]
LPS 8 h 组	5.63 ± 0.43[a]	0.79 ± 0.07[a]	29.91 ± 3.39[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较



M:标准; 1:对照组; 2: LPS 1 h; 3: LPS 2 h; 4: LPS 4 h; 5: LPS 8 h

图 1 ALI 肺组织 TNF-α mRNA 的表达变化

2.5 血浆 TNF-α 变化

LPS 致伤后各时相组血浆中的 TNF-α 均较对照组显著升高($P<0.05$),且以 LPS 2 h 组升高最为显著。见表 3。

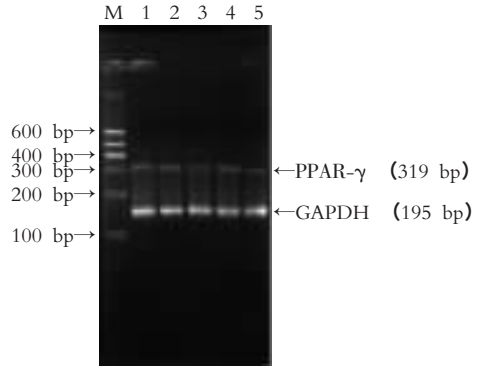
2.6 肺组织 PPAR-γ 的表达

2.6.1 肺组织 PPAR-γ mRNA 的表达变化 RT-PCR 电泳结果显示在 DNA 标准 319 bp 处,可见 PPAR-γ mRNA 表达。在 LPS 致伤后各时相组,可见 PPAR-γ mRNA 表达均较对照组显著下降($P<0.05$),且以 LPS 2 h 组下降最明显,见图 2,表 4。

表 4 肺组织 PPAR-γ mRNA 表达(IOD 比值, $n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	PPAR-γ mRNA	PPAR-γ 蛋白
对照组	0.38 ± 0.05	0.59 ± 0.07
LPS 1 h 组	0.36 ± 0.05	0.55 ± 0.06
LPS 2 h 组	0.25 ± 0.04[a]	0.54 ± 0.05
LPS 4 h 组	0.30 ± 0.05[a]	0.51 ± 0.06[a]
LPS 8 h 组	0.32 ± 0.03[a]	0.52 ± 0.05[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较



M:标准; 1:对照组; 2: LPS 1 h; 3: LPS 2 h; 4: LPS 4 h; 5: LPS 8 h

图 2 肺组织 PPAR-γ mRNA 的表达变化

2.6.2 肺组织 PPAR-γ 蛋白表达的变化 在生理盐水对照组,肺组织表达较高水平 PPAR-γ 蛋白,以细胞核着色为主,为棕色且色深,细胞质未见表达或偶表达,主要分布在肺泡上皮细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞;在 LPS 致伤后 4 h 与 8 h 组,可见 PPAR-γ 蛋白表达较对照组显著下降($P<0.05$),主要分布在肺间质的炎细胞和肺泡上皮细胞,见表 4、图 3、4。

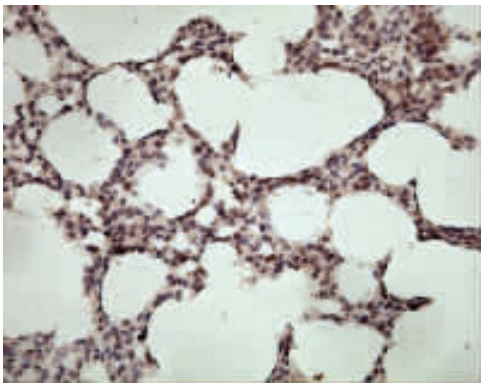


图 3 对照组肺组织免疫组化染色,肺组织表达较高水平的 PPAR-γ (S-P ×200)

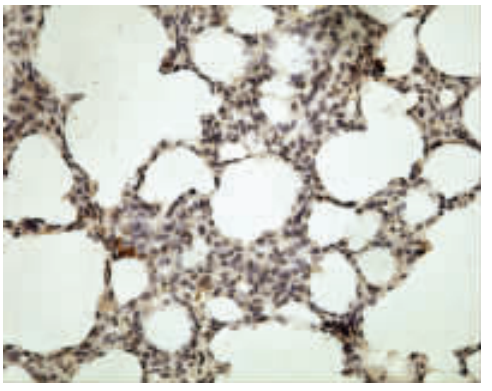


图 4 LPS 致伤后 4 h,肺组织免疫组化染色显示 PPAR-γ 表达降低 (S-P ×200)

3 讨论

经过近 40 年对 ALI/ARDS 的研究,人们对其发病机制的认识已取得了很大的进步,目前认为该综合征

是全身多脏器功能不全的肺部表现,有多种炎症介质和细胞因子如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8、IL-13、黏附分子、趋化因子、前列腺素、活性氧等参与发病,ALI/ARDS 的实质就是一种炎症反应,ALI/ARDS 的发生与炎症失控引起的过度炎症反应密切相关。因此寻找能调控炎症的活性物质一直是许多研究者追求的目标。近年,针对单一炎症介质和细胞因子的单克隆抗体在临床应用的失望使人们意识到寻找体内抗炎机制,以恢复体内的致炎和抗炎的平衡可能是调控炎症的最佳选择[3,4]。PPAR 是核激素受体家族的成员,它有 3 种亚型:PPAR-α、PPAR-β 和 PPAR-γ,三种亚型的分布和功能不完全相同。PPAR-γ 在全身广泛表达,脂肪组织、结肠、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、T-淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞中都有较高水平的表达。PPAR-γ 是一个配体激活转录因子,除具有调节脂肪代谢、细胞生长与分化的作用外,还具有调节机体免疫和炎症的作用[1,5,6,7]。

本研究结果显示,在 LPS 复制的 ALI 大鼠模型,LPS 致伤后,PaO_2下降,肺组织 W/D 比值升高,肺组织病理显示大量炎性细胞浸润、肺间质水肿,透明膜形成,提示肺组织结构严重受损。LPS 致伤 1 h 后,肺组织中 TNF-α mRNA 表达即显著增加,2 h 达高峰,且持续整个实验期;与此同时,血中 TNF-α 的浓度呈同步表现,提示大量炎症细胞因子释放参与 ALI。本实验结果显示,正常大鼠肺组织表达较高水平的 PPAR-γ mRNA;免疫组化结果显示,正常大鼠肺组织 PPAR-γ 主要位于肺泡上皮细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞,以胞核为主,与文献[8,9]报道一致。在 LPS 致伤后大鼠肺组织,PPAR-γ mRNA 在 1 h 即开始下降,2 h 下降最明显,并持续至实验结束。免疫组化结果显示 ALI 组 PPAR-γ 蛋白在致伤后 1 、2 h 与对照组无显著差异,从 4 h 显著降低并持续至 8 h。上述结果表明:LPS 可下调大鼠肺组织中 PPAR-γ mRNA 和蛋白的表达。

既往研究显示,PPAR-γ 被激活剂激活后具有调节细胞存活、蛋白表达、细胞因子和趋化因子表达的作用。PPAR-γ 激活剂诱导内皮细胞凋亡,减少炎症细胞募集,可抑制多种核因子如 NF-KB、AP-1、STAT-1、N-FAT、Erg-1、Jun 和 GATA-3 的活性。在炎症局部,PPAR-γ 抑制内皮细胞活性、黏附分子表达、促炎细胞因子(TNF-α、IL-8、IL-12)、趋化因子(MCP-1、MCP-3、IP-10)、血管活性介质 iNOS、ET-1、MMP 的活性,降低单核/巨噬细胞、血小板活性,抑制 T、B 淋巴细胞增殖和分化,从而发挥抗炎作用[1,5]。

本研究结果表明,正常大鼠肺组织的肺泡上皮细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞表达 PPAR-γ,在 LPS 致伤后,可引起 ALI 大鼠肺组织 PPAR-γ 的基因和蛋白水平表达逐渐下降并持续至实验结束,与此同时,体内的炎症细胞因子(TNF-α)大量释放,提示 PPAR-γ 表达减少可能与机体炎症失控有关,从而参与 ALI 发病。我们和其他研究者使用 PPAR-γ 激活剂(另文发表)进一步证实了上述结论[10]。本实验结果表明,使用 PPAR-γ 激活剂增强 PPAR-γ 活性可能具有抗炎、减轻肺损伤的作用,具有一定的临床应用前景。

参考文献:

[1] Moraes L A, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated activated receptor and inflammation[J]. Phar Ther, 2006, 110(3): 371 – 385.

[2] 姜　鹏, 王建春, 钱桂生. 过氧化物酶增殖体激活受体与炎症及免疫反应[J]. 生命的化学, 2005, 25(3): 232 – 235.

[3] 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.

[4] Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. J Pathol, 2004, 202(2): 145 – 156.

[5] Belvisi M G, Hele D J, Birrell M A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 533(1 – 3): 101 – 109.

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

[7] 姜　鹏, 赵咏梅, 王建春, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2012 – 2015.

[8] Patel H J, Belvisi M G, Bishop-Bailey D, *et al*. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy[J]. J Immunol, 2003, 170(5): 2663 – 2669.

[9] Wang A C, Dai X, Luu B, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(6): 688 – 693.

[10] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, *et al*. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice[J]. Crit Care Med, 2004, 32(2): 457 – 466.

(编辑　薛国文)