维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0018-04

PPAR-γ 激动剂对急性 EAE 大鼠脑白质 TNF-α mRNA 表达的影响

袁宝玉,秦新月,彭国光

(重庆医科大学附属第一医院神经内科;重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator-actived receptors-γ,PPAR-γ)激动剂罗格列酮和非甾体类抗炎药布洛芬对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)大鼠肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)表达的影响。方法:建立大鼠 EAE 模型,分别给予罗格列酮和布洛芬预处理,通过各组间临床表现评分评价药物疗效,RT-PCR 法检测 TNF-α mRNA 的表达。结果:与 EAE 模型组大鼠相比,罗格列酮和布洛芬治疗组的症状明显改善,罗格列酮和布洛芬治疗组 TNF-α mRNA 表达较 EAE 模型组明显下调($P<0.01$)。两个治疗组间的各项指标间比较无明显差异($P>0.05$)。结论:罗格列酮和布洛芬明显改善 EAE 大鼠的临床表现,下调前炎症细胞因子 TNF-α mRNA 的表达。提示 PPAR-γ 激动剂对 EAE 或多发性硬化(multiple sclerosis,MS)具有抗炎的神经保护作用,布洛芬在 EAE 中的抗炎作用可能与激活 PPAR-γ 有关。

【关键词】实验性自身免疫性脑脊髓炎;肿瘤坏死因子;过氧化物酶体增殖物激活受体-γ;非甾体类抗炎药

【中国图书分类法分类号】R744.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-05-22

Effects of peroxisome proliferator-actived receptors-γ agonists on tumor necrosis factor-α expression in rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis

YUAN Baoyu, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of peroxisome proliferator-actived receptors-γ (PPAR-γ) agonists rosiglitazone and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) ibuprofen on tumor necrosis factor-α (TNF-α) mRNA expression in the brain of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Methods*: EAE models on rat were established by inoculating the homogenate containing spinal cord of guinea pig and complete Freund's adjuvant, and then treated by rosiglitazone and ibuprofen respectively. The improvement of clinical manifestations was assessed to determine the curative effect of the two medicines and TNF-α mRNA expression level was detected by RT-PCR. *Results*: Compared with EAE group, the groups with rosiglitazone and ibuprofen showed improvement in clinical manifestations, and the expression of TNF-α mRNA reduced markedly ($P<0.01$). Other index of the treated groups were no significantly different ($P>0.05$). *Conclusions*: PPAR-γ agonists rosiglitazone and NSAIDs ibuprofen could obviusely improve the clinical manifestations of EAE rats, and decrease the level of the expression of TNF-α mRNA, which suggested PPAR-γ agonists may have the anti-inflammation neural protective function on EAE or multiple sclerosis (MS), and the anti-inflammation of ibuprofen may be related to the activation of PPAR-γ.

【Key words】Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE); Tumor necrosis factor-α (TNF-α); Peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR-γ); NSAIDs.

多发性硬化(MS)是中枢神经系统常见的自身免疫性疾病,病变以早期的脱髓鞘和轴突丧失为主要改变,多累及中青年人群,具有很高的致残率,迄今尚无有效的治疗手段。EAE 与 MS 的免疫病理机制相似,是研究 MS 理想的动物模型。过氧化物体增殖剂激活的受体-γ(PPAR-γ)和某些非甾体类抗炎药(NSAIDs)通过调节多种细胞因子的产生,具有抗炎作用[1]。肿瘤坏死因子(TNF-α)是促发 MS 免疫

作者介绍:袁宝玉(1978-),男,硕士生,
主要研究方向:脱髓鞘疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

病理机制的主要炎性细胞因子,TNF-α 在 MS 病灶区表达明显增高,MS 患者的脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)及血中 TNF-α mRNA 表达阳性细胞数在病变活动期显著高于病变稳定期,并与神经功能损害程度相平行[2]。本研究旨在观察 PPAR-γ 激动剂(罗格列酮和布洛芬)对 EAE 大鼠脑组织中 TNF-α mRNA 表达水平的影响,探讨它们在 EAE 中的神经保护作用,为临床上多发性硬化治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年 Wistar 大鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供)32 只,雌性,体重 180~250g。

1.1.2 主要试剂 卡介苗、百日咳疫苗(北京生物制品研究所);医用石蜡油、医用羊毛脂(重庆化学试剂厂);罗格列酮(美国葛兰素史克公司);布洛芬(重庆太极集团);逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-potymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒、DNA Marker DL2000(上海生工生物技术公司);总 RNA 提取试剂 TRIZOL(Invitrogen 公司);

1.1.3 扩增引物 扩增引物为大鼠 TNF-α 及内参照 GAPDH 的部分 cDNA 序列,分别设计其扩增引物如表 1 所示(引物由上海生工生物技术公司合成)。

表 1 目的基因引物序列及扩增产物分子量

基因	引物序列	扩增长度
TNF-α	上游:5'-CAC GCT CTT CTG TCT ACT GA-3' 下游:5'-GGA CTC CGT GAT GTC TAA GT-3'	541bp
β-actin	上游:5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3' 下游:5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'	454bp

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 取体重 400g 左右的豚鼠,用过量 3%水合氯醛腹腔注射至死。迅速在冰上取脊髓,去除脊膜称重后用预冷的生理盐水制成 50%(m/v)的豚鼠脊髓生理盐水匀浆(GPSCH),4℃保存。取羊毛脂 10g,液体石蜡油 40ml,混合盛于三角烧瓶,高压灭菌 15 磅 30min,制成不完全弗氏佐剂,4℃保存。将失活的卡介苗原浆(80mg/ml)50μl 加入 1ml 不完全弗氏佐剂中,制成每毫升含 4mg 结核杆菌的完全弗氏性剂(Complete freunds adjuvant,CFA)。将等量的 GPSCH 和 CFA 混合,以无菌注射器在冰上抽打,直至成为油包水乳剂,此即为免疫抗原。4℃保存,12h 内使用。将 Wistar 大鼠用 3.5%水合氯醛(1ml/100g 体重)腹腔麻醉后,碘酒和酒精局部消毒。四足足垫内各注射免疫抗原 0.1ml,共计 0.4ml/只,同时后足足背皮内注射百日咳疫苗 0.1ml(含百日咳杆菌 1×10^{11} 个)

1.2.2 EAE 发病的评价及症状评分标准 按 Koh[3]报道的评分标准,0 分:正常,无发病;0.25 分:尾部远端肌张力丧失;0.5 分:全尾肌张力丧失;1 分:共济失调步态;2 分:一侧后肢麻痹;3 分:双后肢麻痹;4 分:双后肢加前肢瘫痪;5 分:濒死状态或死亡。以大鼠的发病达到或超过 1 分为临床 EAE 发病。

1.2.3 实验分组及干预措施 实验共分成 4 组,正常对照组、EAE 模型组、罗格列酮治疗组和布洛芬治疗组,每组 8 只,自免疫第 1 天起,至免疫后 18 天,每日灌胃治疗,罗格列酮的剂量为 4mg/(kg·d);布洛芬的剂量为 100mg/(kg·d),其余两组用等量生理盐水代替。每日观察动物的食欲、精神状态、行走情况等,免疫后第 18 天,全部处死,迅速取出脑,放入 -80℃冰箱保存待用。

1.2.4 RNA 分析 采用 TRIZOL 一步法提取细胞总 RNA。严格按照 RT-PCR 试剂盒操作,取 3μg 总 RNA 逆转录生成 20μl 产物,再各取 5μl 逆转录产物加入 20μl 的 PCR 体系中,分别扩增如下期待长度的产物:TNF-a(541bp),内参照 GAPDH(454bp)。PCR 反应条件如下:95℃预变性(5min)后,94℃变性(40s),58℃退火(40s),72C 延伸(1min)共 35 次循环,继续 72℃延伸(5min)。将 PCR 扩增产物 10μl 在 3%的琼脂糖凝胶上进行电泳。电泳完毕后,取出凝胶放入溴化乙锭溶液中染色 15min,然后在 BIO-RAD 凝胶扫描成像系统保存结果。最后用 Quantity one 半定量分析结果。

1.3 统计学处理 所有数据均用 SAS8.2 处理,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据均经正态检验及方差齐性检验,多组间参数比较采用单因素方差分析;组间两两比较采用 SNK-q 检验分析;$P<0.05$ 即认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 罗格列酮和布洛芬的疗效观察

EAE 模型组及治疗组在免疫后 18 天统一处死,其临床表现评分结果(表 2),大鼠在免疫后 12 天开始发病,从第 12 天开始,抽取 3 个时间点(第 12、15、

维普资讯 http://www.cqvip.com

18 天)对大鼠进行评分,结果显示,3 组大鼠的临床表现评分在 3 个时间点比较均有统计学意义,3 个时间点的 P 值均小于 0.05。利用 SNK-q 进行两两之间的比较,结果发现,与 EAE 模型组比较,布洛芬治疗组和罗格列酮治疗组的临床评分明显降低 ($P<0.05$),有统计学意义。两治疗组间的临床评分比较无统计学意义。结果表明,布洛芬和罗格列酮能够改善 EAE 大鼠的临床症状,两者疗效相似。

2.2 罗格列酮和布洛芬对 EAE 大鼠脑白质中 TNF-α mRNA 表达的影响

RT-PCR 产物电泳结果显示(图 1),与正常对照组比较,EAE 模型组、罗格列酮治疗组和布洛芬治疗组 TNF-α mRNA 的表达增高 ($P<0.01$);与 EAE 模型组比较,罗格列酮治疗组和布洛芬治疗组 TNF-α mRNA 表达明显降低($P<0.01$),两治疗组之间比较无显著性差异($P>0.05$),结果表明,罗格列酮和布洛芬能降低 EAE 大鼠脑白质 TNF-α mRNA 表达,对 EAE 有一定的治疗作用(表 3)。

表 2 EAE 模型组、布洛芬治疗组、罗格列酮治疗组之间的临床症状评分比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

group	12d	15d	18d
EAE	2.61 ± 1.69	2.71 ± 1.95	3.00 ± 1.35
ibuprofen	0.86 ± 1.18*	1.00 ± 0.26**	1.71 ± 1.38**
rosiglitazone	0.75 ± 1.20*△	0.98 ± 0.32**△	1.08 ± 0.36**△

**:$P<0.01$,与 EAE 组比较;*:$P<0.05$,与 EAE 组比较;△:$P>0.05$,与布洛芬组比较。

表 3 各组间脑组织 TNF-α mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

group	TNF-α mRNA
control	0.059 ± 0.045
EAE	0.842 ± 0.146 #
rosiglitazone	0.337 ± 0.089** #
ibuprofen	0.426 ± 0.111* #

#:$P<0.01$,与正常对照组比较;**:$P<0.01$,与 EAE 组比较;*:$P<0.05$,与 EAE 组比较。

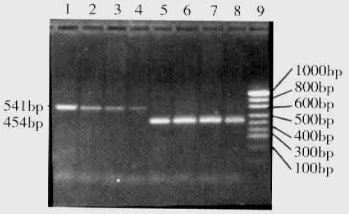


图 1 各组大鼠脑白质中 TNF-αmRNA 表达

注:1,5 为 EAE 模型组,2,6 为布洛芬治疗组,3,7 为罗格列酮治疗组,4,8 为正常对照组,9 为 marker。

3 讨 论

过氧化物酶体增殖物激活受体 -γ 属于细胞核受体超家族成员,是由配体激活的核转录因子[1]。它多在肝脏、心肌、结肠及脑组织中表达,主要功能是促进脂肪酸氧化。最近的研究表明,PPAR-γ 也可能参与炎症调控,特别是影响细胞因子的产生[4]。它在神经系统的许多疾病,如多发性硬化、阿尔茨海默病、帕金森病等的慢性炎症过程中起重要作用,主要参与炎症调控,通过调节多种细胞因子的产生,发挥抗炎作用[1]。最近研究发现,某些非甾体类抗炎药(NSAIDs)也能够激活 PPAR-γ,发挥和上述两种激动剂相似的效应。

肿瘤坏死因子 -α 是一类促炎症因子,参与多种疾病的炎症病理过程。TNF 是一种具有多种生物学活性的细胞因子,在 CNS 内可由星形细胞、小胶质细胞产生,参与 EAE 的发病过程[5]。Villarroya[6]等发现,MS 复发前后外周血细胞毒性 T 细胞分泌 TNF-α 的能力明显增强,故认为 TNF-α 在 EAE 发病机理中起重要作用。为了证实该两种药物在 EAE 中的疗效,并初步探讨它们作用的机制,本文对 TNF-α 的表达情况做了进一步的研究。研究表明,EAE 大鼠脑组织中 TNF-α mRNA 表达有明显的增高,肯定了在 EAE 大鼠 CNS 中 TNF-α 合成增加。我们的研究发现,罗格列酮组和布洛芬组大鼠脑白质中 TNF-α mRNA 的表达显著降低。不仅说明罗格列酮和布洛芬均能下调 TNF-α mRNA 的表达,而且从分子水平上肯定了两种药物对 EAE 的神经保护作用。该研究结果为临床应用 PPAR-γ 激动剂治疗 MS 提供了可靠的实验依据。

传统观念认为,NSAIDs 是环氧化酶(cycloxyge-

维普资讯 http://www.cqvip.com

nase,COX）抑制剂，因此其抗炎效应是通过抑制COX发挥作用,但是近年来发现,特异的COX-2抑制剂对AD没有疗效,而且可能存在COX非依赖途径[7]。最近研究发现，NSAIDs可以通过结合PPAR-γ而调节下游分子的产生,从而发挥广泛的生理效应[8]。因此,探索NSAIDs治疗EAE中的疗效,探讨其作用途径有非常重要的意义。研究表明,布洛芬能够明显减轻EAE的临床症状，下调TNF-α的表达,而且与罗格列酮的疗效没有差异。因此我们认为,NSAIDs对EAE的保护作用可能与激动PPAR-γ,下调炎症因子的产生而发挥作用有关。由于存在细胞因子之间的相互调节,其机制尚不十分清楚,需要进一步的实验研究。

研究结果显示，罗格列酮和布洛芬均能改善EAE的临床表现,降低TNF-α mRNA的表达。两种药物均为临床常用药物,为临床进一步研究提供了良好的实验基础。

（通讯作者：秦新月，教授，主任医师，博士生导师，E-mail:qinxinyue@yahoo.com）

参 考 文 献

[1] Lazennec G,Canaple L,Saugy D,et al.Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)by their ligands and protein kinase A activators[J].Mol Endocrinol,2000;14:1962-1975.

[2] Antella L,Kyozuka K,De Riso L,et al.Calcium,protease action, and the regulation of the cell cycle[J].Cell Calcium,1998;23(2-3): 123-130.

[3] Koh CS,Paterson PY.Suppression of clinical signs of cell-transferred experimental allergic encephalomyelitis and altered cerebrovascular permeability in Lewis rats treated with a plasminogen activator inhibitor[J].Cell-Immunol,1987;107(1):52-63.

[4] Delerive P,Fruchart JC,Staels B.Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control[J].J Endocrinol,2001;169:453-459.

[5] 关洪平,李树新,库宝善.肿瘤坏死因子α与中枢神经系统[J].生理科学进展,1998;1(29):55-58.

[6] Villarroya H,Violleau K,Ben-Younes-Chennoufi A,et al. Myelin-induced experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats: tumor necrosis factor alpha levels in serum and cerebrospinal fluid immunohistochemical expression in glial cells and macrophages of optic nerve and spinal cord[J].J Neuroimmunol,1996;64(1):55-61.

[7] Adamson DJ,Frew D,Tatoud R,et al.Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor γ signalling[J].Mol Pharmacol, 2002;61(1):7-12.

[8] Sastre M,Dewachter I,Landreth GE,et al.Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ Agonists Modulate Immunostimulated Processing of Amyloid Precursor Protein through Regulation of β-Secretase[J].The Journal of Neuroscience,2003;23(30):9796-9804.

（上接第 14 页）

（通讯作者：杜成友,Tel:(023)89011181;E-mail: duchengyou@126.com）

参 考 文 献

[1] Shapiro AM,Ryan EA,Rajotte R,et al.Improved function of islet grafts under steroid-free immunosuppression:will grafts work forever [J].Transplantation,2002;73(9):1528.

[2] Gu G,Dubauskaite J,Melton DA.Direct evidence for the pancreatic lineage:NGN3+cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors[J].Development,2002;129(10):2447-2457.

[3] Schwitzgebel VM,Scheel DW,Conners JR,et al.Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas[J].Development,2000;127(16):3533-3542.

[4] 张 雷,吴德全,孙 岩,等.大鼠胰岛分离的影响因素[J].中华内分泌代谢杂志,2002;18(6):491-492.

[5] Street CN,Jonathan RT,Lakey AM,et al.Islet graft assessment in the Edmonton Protocol implications for predicting long-term clinical outcome[J].Diabetes,2004;53(12):3107-3114.

[6] 宋陆军，秦新裕，牛伟新，等. 源于体外培养膜岛细胞中表达Ngn3的细胞是胰腺内分泌前体细胞的新证据[J].中华外科杂志，2005;43(1):42-45.