维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)06-0701-03

PPARs 和 NFκB 在高脂血症大鼠内皮细胞中表达的研究

黄 颖[1], 陈运贞[1], 吴 宏[2], 姜 蓉[2], 李 静[2]

(1.重庆医科大学临床学院心内科,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学院组胚教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨核转录因子 PPARα、PPARγ 和 NFκB 在正常及高脂血症大鼠主动脉内皮细胞中表达的变化以及 fibrate 干预后炎性因子 IL-6 的变化。方法:取正常及高脂血症大鼠模型主动脉冰冻切片行免疫组化分析 PPARα、PPARγ、NFκB 和 IL-6 的表达,PPARs 的人工合成配体 Gemfibrate 和 Bezafibrate 干预后的变化及其关系。结果:正常大鼠主动脉上有 PPARα、PPARγ、NFκB 和 IL-6 的弱表达。高脂血症时,主动脉内皮细胞层 PPARα、PPARγ、NFκB、IL-6 的表达增强,其 OD 值较正常大鼠显著增加($P<0.05$),NFκB 的活化明显。Fibrates 药物干预后,血脂下降(除 HDL),PPARα、PPARγ 进一步活化,IL-6 的表达减弱,对 NFκB 的表达无明显影响。结论:核转录因子 PPARs 和 NFκB 在高脂血症人鼠内皮细胞中均显著增加。Fibrates 类药物可通过活化相应受体 PPARs 部分抑制炎性因子的分泌。

【关键词】PPARs;NFκB;动脉粥样硬化

【中国图书分类法分类号】R544.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-11-07

Study on the expression of PPARs and NFκB in endothciial cells of hyperlipidemic rats

HUANG Ying, et al

(*Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the expression of PPARα, PPARγ and NFκB in the aortic endothelial cells of the normal and hyperlipidemic rats and the change of IL-6 with the treatment of fibrates in vivo. *Methods*: The hyperlipidemic rat was established by feeding the high cholesterol food. The expressions of PPARα, PPARγ, NFκB and IL-6 in endothelial cells located in the aorta were presented by immunohistochemistry. The alteration among the PPARα, PPARγ and IL-6 in the hyperlipidemic rat with the treatment of gemfibrate and bezafibrate was observed. *Results*: There was a weak expression of PPARα, PPARγ, NFκB and IL-6 in the normal rat aorta endothelial cells, which were all enhanced in the hyperlipidemic rat. NFκB was drastically presented. After the treatment of gemfibrate and bezafibrate the expression of PPARα increased, while that of IL-6 decreased relatively, but NFκB expression was not directly influenced. *Conclusion*: The expressions of PPARs and NFκB increased in hyperlipidemic rats. Fibrates may relieve the secretion of inflammation factors in vivo to some degree through the activation of PPARs.

【Key words】 PPARs; NFκB; Atherosclerosis

过氧化物体增殖剂活化受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是配体活化型的转录因子,属于核受体超家族[1]。可分为三种基因型即:α、β/δ、γ。调脂药 fibrates 和胰岛素增敏剂曲格列酮(troglitazone)分别是核转录因子 PPARα、PPARγ 的人工合成配体[2]。细胞核因子 κB(NFκB)是调控机体免疫和炎症反应因子表达的重要转录因子。如 IL-6、E-selectin、MHC-Ⅱ、COX-2 等的表达均受其调节。转录因子通过与 DNA 上的应答元件结合从而发挥其转录调节功能。同时也存在转录因子间的相互作用。已有文献显示 PPARs 在细胞水平可以通过与活化蛋白-1(AP-1),NFκB 相互作用,抑制炎性因子的表达[2,3]。

本文拟建立大鼠的高脂血症模型,在活体中对核转录因子 PPARs 与 NFκB 的表达以及 fibrates 干预后炎性因子的改变作一研究。

作者介绍:黄 颖(1973-),男,主治医师,博士,
主要研究方向:高血压、冠心病的基础与临床研究。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

雄性 Wistar 大鼠，由重庆医科大学动物试验中心提供；胆固醇(日本)丙基硫氧嘧啶(西南制药厂)；Bezafibrate(美国 Sigma 公司)；Gemfibrozil(湖南株洲湘江药业股份有限公司)；PPARα、PPARγ、NFκB、IL－6 多克隆抗体(美国 SantaCruz 公司)；免疫组化 SP 试剂盒，浓缩型 DAB 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)；GM2000－B 真彩色图像分析系统(北航)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色步骤(SP 试剂盒)

冰冻切片机制备厚度为 0.45μm 的冰冻组织切片，粘于赖氨酸处理过的玻片上。用预冷的丙酮固定 10min。可放于－70℃存放。3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶，加入非免疫性的动物血清(为第二抗来源动物的血清)封闭，0.2% tritonx－100 50μl 室温 10min。50μl 一抗，4℃ 12h 50μl 生物素化的二抗，37℃ 15～30min。50μl 过氧化物酶标记的链霉—卵白素溶液，室温 15min。100μl 新鲜配制的 DAB 溶液，显微镜下显色，观察，适时 PBS 冲洗。苏木素复染数秒至 1min。自来水冲洗，封片。

石蜡切片 HE 染色：标本经石蜡切片后，切片脱蜡，蒸馏水洗，苏木素染色 30min，自来水洗，伊红染色，5～10min。自来水冲洗，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，封片。

1.2.2 高脂血症大鼠模型的建立

采用喂养高脂饮食法，参照文献[4]在基础饲料的基础上加 10%的动物油、10%的胆固醇、0.1%的丙基硫氧嘧啶，制成特殊饲料。喂养大鼠 40 天(平均一只大鼠每天 20g 饲料)。基础饲料配方(重庆医科大学动物试验中心)：按 100 公斤饲料计算下列成分的重量(公斤)：玉米 34，麦麸 18，豆粕 12，植物油 0.5，盐 1，酵母 3，次粉 20，鱼粉，骨粉 2，鸡蛋 2，鱼肝油 0.5。

1.2.3 血脂检测

抽取大鼠外周静脉血，肝素抗凝。TC、TG 的检测分别用 CHOD－PAP 及 GPO－PAP 法，HDL－C 用 PEG 沉淀法。LDL 按 Friedwald 公式计算。均在本院临床检验科完成。

1.3 试验分组

正常大鼠研究分为 3 组：正常大鼠取材组：4 只；Gemfibrate 组：4 只，50μmol/l，2ml，腹腔注射 10 天；Bezafibrate 组：4 只，100μ mol/l，2ml，腹腔注射 10 天。抽取正常大鼠外周静脉血检测血脂(TC、TG、LDL、HDL)。取主动脉液氮冷冻保存，冰冻切片检测 PPARα、PPARγ、NFκB 和 IL－6 的表达。

高脂大鼠(喂养高脂饲料 40 天后)研究分为 4 组：高脂大鼠对照组(control group)：4 只，立即取材；饮食控制组(on diet group)：4 只，高脂饲料 40 天后改为普通饲料，10 天；Gemfibrate group：5 只，100μmol/L，2ml，腹腔注射 10 天取材；Bezafibrate group：5 只，100μmol/L，2ml，腹腔注射 10 天取材

各组均取主动脉、肝脏标本以及抽取外周静脉血检测血脂(TC、TG、LDL、HDL)。主动脉做连续冰冻切片检测 PPARα、PPARγ、NFκB 和 IL－6 的表达。肝脏 10%甲醛固定。石蜡切片，HE 染色。

1.4 分析方法

免疫组化图片用 GM2000－B 真彩色图像分析系统进行分析。主动脉内皮细胞层染色采用体视分析其光密度值。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，t 检验或 F 检验，$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 各试验大鼠组血脂的改变见表 1

高脂血症模型以高胆固醇为主，TC、LDL 在高脂大鼠组(hyperlipemia group)明显增高，分别为 4.47±1.50mol/L 和 3.62±1.20mmol/L。而甘油三脂(TG)未见明显增高。HDL 在各组也未见明显差异。饮食控制随访组的 TC、LDL 较高脂大鼠组显著下降，而较正常组以及 Gemfibrate、Bezafibrate 组则仍较高。Gemfibrate、Bezafibrate 组 TC 值与正常大鼠组没有差异，但 LDL 值仍较正常组高。

表 1 各试验组大鼠血脂的改变(mmol/l，$\bar{x} \pm s$)

项目	正常大鼠	高脂血症大鼠			
		Gem 组	Beza 组	饮食控制组	对照组
TC	1.49±0.03	1.59±0.02	1.63±0.03	1.92±0.02$^{\#}$	4.47±1.50*
TG	0.72±0.13	0.55±0.15	0.51±0.18	0.35±0.16	0.48±0.15
LDL	0.52±0.10	0.95±0.03$^{\$}$	0.94±0.02$^{\$}$	1.24±0.03$^{\#}$	3.62±1.20*
HDL	0.42±0.10	0.39±0.15	0.40±0.20	0.31±0.15	0.35±0.15

注：与其他组比较 $^{*}P<0.05$；与正常大鼠，Gem，Beza 组比较 $^{\#}P<0.05$；与正常大鼠组比较 $^{\$}P<0.05$

2.2 正常大鼠的主动脉内皮细胞 PPARα、PPARγ、NFκB 和 IL－6 的表达及干预试验结果

腹腔注射 fibrates 类药物可以诱导主动脉内皮细胞 PPARα、PPARγ 的表达。在浓度为 100pmol/L 时尤为明显。正常大鼠主动脉内皮细胞有 PPARα、PPARγ、NFκB 和 IL－6 的表达，为弱表达，高脂大

维普资讯 http://www.cqvip.com

鼠组 PPARα、PPARγ、NFκB、IL－6 的表达增强。在 gemfibrate、bezafibrate 干预后，高脂大鼠 PPARa、PPARγ 的表达增强，而 IL－6 的表达较前减弱。图像分析系统体视分析主动脉内皮细胞的光密度值(OD)。见表 2。

高脂大鼠的肝脏大体观察为乳白色、油腻感。石蜡切片 HE 染色可见高脂大鼠肝细胞脂肪样变，而饮食控制随访组肝脏的脂肪样变好转。Fibrates 干预组部分出现了肝细胞变性坏死样改变。

表 2 Fibrates 干预后高脂血症大鼠转录因子和炎性因子表达的变化(OD，$\bar{x} \pm s$)

项目	正常大鼠	高脂血症大鼠			
		饮食控制	Gem 组	Beza 组	对照组
PPARα	0.35±0.05	0.39±0.02	0.60±0.02*	0.62±0.03*	0.53±0.03*
PPARγ	0.32±0.03	0.38±0.04	0.54±0.03*	0.61±0.02*	0.52±0.04*
IL－6	0.30±0.10#	0.53±0.03	0.37±0.05#	0.35±0.03#	0.60±0.06
NFκB	0.25±0.03	0.49±0.04$	0.40±0.03$	0.42±0.03$	0.57±0.03$

注：与正常大鼠比较 * $ $P<0.05$；与对照组比较 # $P<0.05$。

3 讨 论

动脉粥样硬化的"炎性学说"近年来日益受到重视。炎性刺激可致内皮细胞凋亡，从而导致单核细胞、血小板侵入内皮下组织，引发动脉粥样硬化的进程。动脉粥样硬化又被称为特殊炎症性疾病。探讨动脉粥样硬化相关细胞的功能改变具有重要意义。细胞的信号传导的研究是探讨细胞对外界反应的根本途径。基因转录过程的调节直接和蛋白质的合成有关，而转录因子的作用更可以看作是细胞信号传导的终末调节分子。

PPARs 和 NFκB 对动脉粥样硬化形成所涉及的血管壁细胞均可发挥转录水平的调控作用。PPARs 与其配体结合后，即可通过与 DNA 上的应答元件结合以及与活化蛋白－1(AP－1)，信号传导和转录活化因子(STATs)，细胞核因子 κB(NFκB)等相互作用，在转录水平上调节其目标基因的表达，并在代谢性疾病中发挥作用[2]。尤为重要的是调脂药 fibrates 和抗糖尿病药 glitazones 分别是 PPARα 和 PPARγ 的人工合成配体。正因为如此，fibrate 类药物调脂的分子水平机理近年来才日渐丰富[2,5]。NFκB 可以调控健康状态下许多基因的表达如：细胞因子、趋化因子以及急性期反应蛋白等。它是一种广泛存在的转录因子，可被很多外来刺激所活化。在各种病理状态下发挥重要的调节作用[6]。

本文显示正常大鼠主动脉内皮细胞层有 PPARα、PPARγ、NFκB、IL－6 的弱表达。在高脂血症模型中，在脂质成分的作用下，主动脉内皮细胞 PPARα、PPARγ、NFκB、IL－6 的表达均增强，NFκB 的活化尤为明显，相应的调节目的基因 IL－6 的表达也显著增加。对正常大鼠予以 fibrates 类药物即可激活主动脉内皮细胞 PPARα、PPARγ 的活化。IL－6 是淋巴样及非淋巴样细胞产生的一种多功能细胞因子，其异常表达和失调是某些疾病的典型特征。在高脂血症的刺激下，主动脉壁已有一定程度的"炎性反应"。在予以 gemfibrate 和 bezafibrate 治疗后，TC、LDL 下降，肝脏的脂肪样变明显好转。同时 PPARα、PPARγ 在主动脉的表达也增强，而 IL－6 表达下降，NFκB 的表达无显著变化。结果提示 fibrates 类药物可以在活体中活化 PPARs，并可能在转录后水平同 NFκB 相互作用，抑制其功能从而导致炎性因子的表达下降。

本文显示 fibrates 类药物对 PPARγ 也有部分活化作用，以 bezafibrate 尤为明显。PPARs 的配体结合位点并非是很保守的。其亚型特异性取决于 Fibrate 的结构。有文献指出[2]：bezafibrate 对人和鼠的三种 PPARs 亚型的活化是一致的，而其它的一些 Fibrate 药物则优先主要活化 PPARα。试验中也注意到应用 fibrates 后，对肝脏有一定的副作用，可导致肝细胞变性坏死样改变。饮食控制随访组大鼠在改为普通饲料喂养后，高脂血症好转，肝脏的脂肪样变也较前缓解，但其主动脉上 IL－6 的表达仍较高。本文由于动物数量及方法学的限制，PPARs 与 NFκB 间的复杂关系仍有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid

(下转第 734 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

强，并可由受损的脑细胞逸出，使 Glu 等 EAA 破坏及转化增加[3]。

Glu、Asp 虽然是脑中重要的兴奋性神经递质，过多释放将产生兴奋毒性作用。近年研究结果表明，脑损伤后 Glu 异常释放并作用于受体，导致大量 Ca^{2+} 内流可能是引起神经细胞损害的主要机制：EAA 递质持续强烈作用于神经细胞膜上的 NMDA 受体，致使神经细胞膜通透性改变，Na^+，K^+，Ca^{2+} 等通道开放，引起 Na^+、Ca^{2+}、CI^- 内流，K^+ 外流，造成细胞内 Na^+，Ca^{2+} 浓度增加，Na^+，CI^- 大量内流导致神经细胞急性肿胀，而 Ca^{2+} 内流导致神经细胞迟发性损害[4]。细胞内 Ca^{2+} 持续增高，又引起 Ca^{2+} 控制的 EAA 释放增加形成恶性循环[5]。本实验发现在大鼠致伤后 5min 内给予 25% $MgSO_4$ 750μmol/kg 后，其 CSF 中 EAA 含量在 2h、8h 均显著低于损伤组，而 12h、24h、48h 和 72h 无显著改变。大量实验证明急性脑伤后，脑组织内 Mg^{2+} 浓度和血清中 Mg^{2+} 浓度均降低，外伤后低镁是导致继发性脑损害原因之一[6]。Mg^{2+} 是 NMDA 受体通道的非竞争性拮抗剂。本实验发现伤后 2h、8h 外源性镁可抑制 EAA 的释放，其机制可能是：①Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 内流的天然拮抗剂，可以阻断神经元细胞膜上的电压调节钙通道、受体闸门通道以及 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交换通道，另外细胞内 Mg^{2+} 可以防止细胞内 Ca^{2+} 被线粒体摄取，阻止线粒体内 Ca^{2+} 超载所致线粒体损伤[6]，从而阻断了因大量 Ca^{2+} 细胞内流进一步刺激 EAA 的释放，使 EAA 释放减少。②在脑损伤早期应用 $MgSO_4$ 可以有效地减轻血—脑屏障破坏程度[7]。可以使血浆中 EAA 进入 CSF 量减少。③Mg^{2+} 参与糖、脂肪、蛋白质的代谢，参与氧化磷酸化反应，$Na^+/K^+ - ATP$ 酶的激活，DNA、RNA 复制，保持膜结构稳定性和维持其通透性[8]。补充 $MgSO_4$ 后可以减少因脑损伤引起细胞膜破坏，使细胞质中 Glu 流入细胞外减少。同时，因能量改善后可以改善 CSF 中 EAA 的主动转运或摄取，增加其灭活作用。TBI 使用镁剂后 12h、24h、48h 和 72h CSF 中 EAA 与损伤组比较无显著性差异，表明 $MgSO_4$ 对正常范围的 EAA 释放无干预作用，而对早期过多释放有抑制作用。

参 考 文 献

[1] 江基尧，朱 诚，主编. 现代颅脑损伤学[M]. 第 1 版，上海：第二军医大学出版社，1999；124－131，509－511.

[2] Faden AI, Demediuk H, Panter SS, et al. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury [J]. Science, 1989；244(4906)：798.

[3] 于明琨，朱 诚，张光霁. 急性颅脑损伤患者脑脊液中兴奋性和抑制性氨基酸含量改变及其临床意义[J]. 第二军医大学学报，1995；16(2)：165－168.

[4] 陈恒胜，伍亚民，廖维宏. 大鼠脑损伤后脑组织递质性氨基酸变化及意义[J]. 中华创伤杂志，1996；12(2)：79－81.

[5] Benveniste H. Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia [J]. Acta Neurol Scand, 1988；78(6)：529.

[6] Heath DL, Vink R. Brain free magnesium concentration is predictive of moton outcome following traumatic axonal brain injury in rats[J]. Mgnes Res, 1999；12(4)：269－277.

[7] 朱志安，冯东福，张 红，等. 硫酸镁对大鼠脑损伤后血脑屏障通透性影响[J]. 急诊医学，2000；9(1)：11－13.

[8] Heath DL, Vink R. Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration[J]. Brain Res, 1996；738(1)：150－153.

(上接第 703 页)hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990；347：645－65.

[2] Torra IP, Gervois P, Staels B. Peroxisome proliferator－activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging[J]. Curt Opin Lipidol, 1999；10：151－159.

[3] Ricote M, Li AC, Willsson TM, et al. The peroxisome proliferator－activated receptor－γ is a negative regulator of macrophage activation[J]. Nature, 1998；391：82－86.

[4] 魏 泓，主编. 医学试验动物学[M]. 第 1 版，成都：科学技术出版社，1998；86.

[5] Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator－activated receptor alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 1999；10：245－257.

[6] Martin RD, Hoeth M, Warbinek RH, et al. The Transcription factor NF－κB and the regulation of vascular cell function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000；20：e83－e88.