

· 短篇论著 ·

过氧化物酶体增殖物激活受体 δ 激动剂在肾小管上皮细胞炎性反应中的作用

杨旭 李德天 久米真司 前川聪 宇津贵

过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)有3种异构体:PPAR α 、PPAR δ 和PPAR γ 。作为转录因子的PPARs,通过调节特定的目的基因的表达,影响脂代谢、糖代谢稳态、细胞分化、免疫反应、炎症反应和肿瘤等^[1-2]。PPAR α 激动剂(贝特类)和PPAR γ 激动剂(噻唑烷二酮)作为降脂药物和胰岛素增敏剂已经在临床上广泛应用,而且被证明具有肾脏保护作用^[3-4]。而PPAR δ 激动剂对肾脏作用的研究才刚刚起步,我们拟研究PPAR δ 激动剂L165041在肾小管上皮细胞炎性反应中的作用,为PPAR δ 激动剂在肾脏疾病中的应用提供理论基础。

一、材料和方法

1. 主要试剂:小鼠近曲小管上皮细胞系(mProx)由滋贺医科大学肾内科实验室建立,PPAR δ 激动剂L165041(英国Tocris),重组TNF- α 、棕榈酸钠和胎牛血清白蛋白(美国Sigma),PPAR δ siRNA(美国Ambion),lipofectamin 2000(美国Invitrogen),兔抗PPAR δ 多克隆抗体(美国Santa Cruz),PCR引物设计在Primer 5.0引物设计辅助软件上进行,日本TaKaRa生物技术有限公司合成。

2. L165041对棕榈酸和TNF- α 诱导mProx炎性反应的作用:永生mProx的建立参考文献[5],mProx同步化后,加入10 μ mol/L L165041预孵3 h,后分别加入150 μ mol/L棕榈酸和10 nmol/L TNF- α 刺激12 h。收集细胞,用RT-PCR方法测定MCP-1 mRNA的表达,对照组以0.5% DMSO代替L165041。

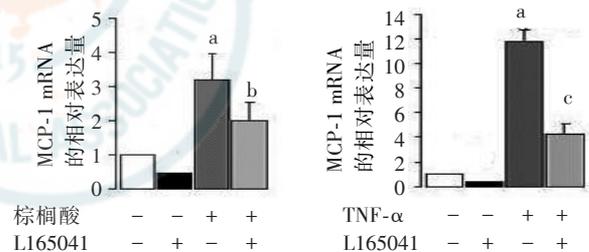
3. PPAR δ 基因沉默对L165041抗炎作用的影响:用lipofectamin 2000进行mProx PPAR δ siRNA的瞬时转染,转染后细胞同步化后,给予10 μ mol/L L165041预孵3 h,后加入150 μ mol/L棕榈酸或10 nmol/L TNF- α 刺激12 h,RT-PCR方法测定MCP-1 mRNA的表达水平。在阴性对照组用scramble代替PPAR δ siRNA,结果互相比较。mRNA的表达水平用标准曲线法来定量。以GAPDH为内参,分别计算目的基因与GAPDH的比值。引物序列:GAPDH正义链 ATGGCCTTCCGTGTTTCCT,反义链

GCCTGCTTCACCACCTTCT;单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)正义链 GCCCACTCACCTGCTGCTACT,反义链 CCTGCTGCTGGTGATCCTCTTGT;PPAR δ 正义链 TAGAAGCCATCCAGGACACC,反义链 CCGTCTTCTTTAGCCACTGC。

4. 统计学处理:所有细胞实验重复3~4次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析中的Scheffe检验。采用Statview 5.0软件分析。

二、结果

1. L165041能抑制棕榈酸和TNF- α 诱导的炎性反应:150 μ mol/L棕榈酸和10 nmol/L TNF- α 刺激mProx 12 h能诱导MCP-1 mRNA表达增加(均 $P < 0.01$),而10 nmol/L的L165041能抑制棕榈酸和TNF- α 诱导的MCP-1 mRNA表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图1。



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与棕榈酸组比较,^b $P < 0.05$;与TNF- α 组比较,^c $P < 0.01$

图1 L165041对棕榈酸或TNF- α 诱导的mProx MCP-1 mRNA表达的影响(RT-PCR)

2. 转染PPAR δ siRNA对PPAR δ 的阻断效率及对L165041作用的影响:Western印迹和RT-PCR法结果显示,PPAR δ siRNA能在蛋白和mRNA水平明显阻断PPAR δ 受体的表达,见图2。在转染PPAR δ siRNA细胞中,L165041仍然能够发挥抗炎作用,抑制棕榈酸和TNF- α 诱导的MCP-1 mRNA表达增加($P < 0.05$),说明L165041的抗炎作用非PPAR δ 受体依赖。且在转染PPAR δ siRNA细胞中,相比未转染细胞,棕榈酸能引起更明显的MCP-1表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

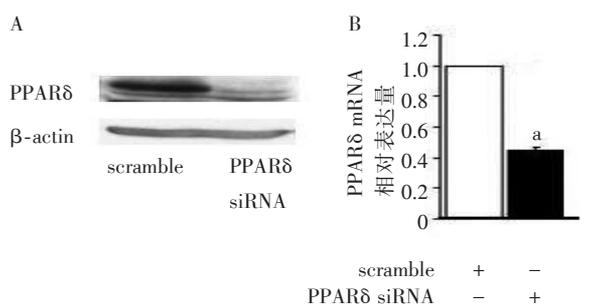
三、讨论

近年的研究显示,PPAR δ 作为核激素受体家族的一员,在炎症反应、动脉粥样硬化、脂肪酸代谢等过程中起重要作用^[6-7]。在我们以前的实验中已经证明了选择性的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.07.014

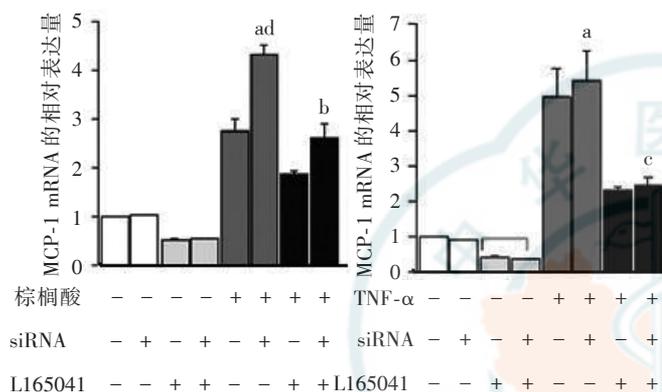
作者单位:110004 沈阳,中国医科大学附属盛京医院肾内科(杨旭、李德天);日本滋贺医科大学内分泌、肾脏、神经内科(久米真司、前川聪、宇津贵)

通信作者:李德天,Email: lidt@sj-hospital.org



注:A:Western印迹;B:RT-PCR法;与阴性对照组比较,^a $P < 0.05$

图2 转染 PPARδ siRNA 对 PPARδ 的阻断效率



注:与转染 PPARδ siRNA 对照组比较,^a $P < 0.01$;与转染 PPARδ siRNA+棕榈酸或 TNF-α 组比较,^b $P < 0.01$;与转染 PPARδ siRNA+L165041 组比较,^c $P < 0.01$;与棕榈酸组比较,^d $P < 0.01$

图3 L165041 对转染 PPARδ siRNA mProx 中棕榈酸或 TNF-α 诱导 MCP-1 mRNA 表达的影响(RT-PCR)

PPARδ 激动剂 GW501516 和 GW0742 都能在肾小管上皮细胞发挥抗炎作用^[8]。本研究结果亦证明,选择性的 PPARδ 激动剂 L165041 在肾小管上皮细胞发挥抗炎作用。研究结果证实了,PPARδ 激动剂具有的抗炎作用是这类药物所共有的。PPARδ 激动剂可能是一种潜在的能延缓肾小管间质损伤和炎症反应的新选择。

PPARδ 激动剂的抗炎机制不明,有研究证明一些 PPARδ 激动剂的抗炎作用是通过直接对细胞内信号传导通路的抑制实现的,而不是通过激活受体上调靶基因来实现的^[2,9]。我们的研究结果也支持这一结论。

本研究显示,PPARδ 在饱和脂肪酸诱导的肾小管上皮细胞炎症反应中发挥作用。相对于未转染 PPARδ siRNA 细胞,在转染 PPARδ siRNA 的细胞中,棕榈酸能引起更明

显的炎症反应,说明在肾小管上皮细胞中 PPARδ 受体的存在对于饱和脂肪酸诱导的炎症反应十分重要,受体的缺失或功能降低能降低细胞对饱和脂肪酸刺激的耐受性。

参 考 文 献

- [1] Dreyer C, Krey G, Keller H, et al. Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell*, 1992, 68: 879-887.
- [2] Gervois P, Fruchart JC, Staels B. Drug Insight: mechanisms of action and therapeutic applications for agonists of peroxisome proliferator-activated receptors. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007, 3: 145-156.
- [3] Isshiki K, Haneda M, Koya D, et al. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes*, 2000, 49: 1022-1032.
- [4] Park CW, Zhang Y, Zhang X, et al. PPARalpha agonist fenofibrate improves diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney Int*, 2006, 69: 1511-1517.
- [5] Takaya K, Koya D, Isono M, et al. Involvement of ERK pathway in albumin-induced MCP-1 expression in mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284: F1037-F1045.
- [6] Barish GD, Atkins AR, Downes M, et al. PPARdelta regulates multiple proinflammatory pathways to suppress atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 4271-4276.
- [7] Bishop-Bailey D, Bystrom J. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in inflammation. *Pharmacol Ther*, 2009, 124: 141-150.
- [8] Yang X, Kume S, Tanaka Y, et al. GW501516, a PPARdelta agonist, ameliorates tubulointerstitial inflammation in proteinuric kidney disease via inhibition of TAK1-NFkB pathway in mice. *PLoS One*, 2011, 6: e25271.
- [9] Schnegg CI, Kooshki M, Hsu FC, et al. PPARdelta prevents radiation-induced proinflammatory responses in microglia via transrepression of NF-kB and inhibition of the PKCalpha/MEK1/2/ERK1/2/AP-1 pathway. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52: 1734-1743.

(收稿日期:2013-03-26)

(本文编辑:杨克魁)