



PPAR γ 激动剂对COPD大鼠炎症及血管重塑指标的影响

王琛, 李智, 谭林

引用本文:

王琛, 李智, 谭林. PPAR γ 激动剂对COPD大鼠炎症及血管重塑指标的影响[J]. 中国临床医学, 2020, 27(4): 670-673.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191756>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

夜间低氧对慢性阻塞性肺疾病患者血清IL-6、IL-8的影响

Effects of nocturnal hypoxia on serum IL-6 and IL-8 in patients with chronic obstructive pulmonary disease
中国临床医学. 2019, 26(6): 905-908 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20191464>

MitoK_{ATP}通道在异氟醚对急性肺损伤保护作用中的影响

Effect of MitoK_{ATP} channel on protective effect of isoflurane on acute lung injury
中国临床医学. 2020, 27(3): 510-514 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200596>

新型冠状病毒肺炎患者不同临床转归影响因素分析

Risk factors and their influence on the COVID-19 patients with different outcome
中国临床医学. 2020, 27(2): 183-188 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200490>

骨髓间充质干细胞移植对光气吸入性肺损伤大鼠肺组织及血浆炎症因子的干预作用

The intervention effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on inflammatory factors in lung tissue and plasma of phosgene inhalation lung injury rats
中国临床医学. 2017, 24(3): 400-404 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170124>

携带血管紧张素转换酶2基因的人脐带间充质干细胞尾静脉注射移植可减轻博来霉素诱导的大鼠急性肺损伤

Intravenous human umbilical mesenchymal stem cells carrying angiotensin converting enzyme 2 gene in alleviating acute lung injury induced by bleomycin in rats
中国临床医学. 2018, 25(2): 230-238 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20171005>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20191756

PPAR γ 激动剂对 COPD 大鼠炎症及血管重塑指标的影响

王琛, 李智, 谭林*

青岛大学附属青岛市市立医院重症医学科, 青岛 266071

[摘要] **目的:**探讨 PPAR γ 激动剂罗格列酮与慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠的血管重塑、炎症指标白介素-8(IL-8)的相关性。**方法:**36只 Wistar 大鼠随机分为非药物治疗组(A组)、药物治疗组(B组)、空白对照组(C组),A、B组用烟熏、低氧、脂多糖(LPS)的方法建立 COPD 大鼠模型;B组第3周起同时给予盐酸罗格列酮药物治疗,C组给予相同体积的生理盐水模拟造模和治疗。**结果:**血管壁病理示 B组血管壁重塑、胶原蛋白的沉积及血管周围中性粒细胞浸润情况较 A组减轻,但仍较 C组严重。A组、B组、C组之间肺血管壁/肺血管总面积(MA%)差异具有统计学意义($P<0.01$),A组 MA%较 C组明显升高,B组 MA%较 A组明显下降。炎症指标 IL-8 在 3组之间差异具有统计学意义($P<0.01$),其中 A组明显高于 B组,B组高于 C组。3组的肺组织中 PPAR γ 转录水平差异具有统计学意义($P<0.01$),C组、B组、A组肺组织中 PPAR γ 转录水平逐渐下降,其中 A组明显高于 B组,B组高于 C组。Pearson 分析显示 B组大鼠中 PPAR γ 转录水平与 MA%比值、炎症指标 IL-8 均负相关($r=-0.662,-0.615;P<0.05$),而 B组中 MA%与 IL-8 正相关($r=0.980,P<0.05$)。**结论:**PPAR γ 激动剂罗格列酮通过上调 PPAR γ 转录水平抑制 COPD 大鼠肺部 IL-8 的升高和血管周围中性粒细胞聚集、抑制了肺血管壁的重塑。

[关键词] 肺性;慢性阻塞性;血管重塑;炎症;PPAR γ ;IL-8

[中图分类号] R 56.3;R543.2 **[文献标志码]** A

Effects of PPAR γ agonists on inflammation and vascular remodeling in COPD rats

WANG Chen, LI Zhi, TAN Lin*

Intensive Care Unit, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of rosiglitazone hydrochloride on vascular remodeling and IL-8 in rat models of chronic obstructive pulmonary disease(COPD). **Methods:** Thirty-six Wistar rats were randomized to three groups: non-treatment group (group A), treatment group (group B), and blank group (group C). Rat model of COPD was established in groups A and B by using smoking, hypoxia and intratracheal lipopolysaccharide. The rats in group B were treated with rosiglitazone from week 3, and those in group C were given identical dose of normal saline. **Results:** The vascular wall pathology showed that the vascular wall remodeling, collagen deposition, and perivascular neutrophils infiltration in group B were alleviated than in group A, but more serious than in group C. The ratio of pulmonary vascular wall/total vascular area in group A were higher than that in groups C and B ($P<0.01$). The level of IL-8 in group A were higher than in groups C and B ($P<0.01$). PPAR γ mRNA in lung tissue increased in order of groups A, B, and C ($P<0.01$). Pearson analysis showed that in group B, the levels of PPAR γ mRNA were negatively correlated with the ratio of pulmonary vascular wall/total vascular area and the level of IL-8 ($r=-0.662$ and $-0.615, P<0.05$). **Conclusions:** Rosiglitazone inhibits the remodeling of the pulmonary vascular wall in COPD rats by upregulating transcription of PPAR γ and inhibiting the increase of IL-8 and the infiltration of neutrophils around the vascular wall.

[Key Words] pulmonary disease, chronic obstructive; vascular remodeling; inflammation; peroxisome proliferators-activated receptor γ ; IL-8

根据最新的《全球疾病负担》报告,目前所有非传染性慢性肺部疾病加在一起构成全球非传染性疾病的第3大死因,其中2016年慢性阻塞性肺疾病

(COPD)造成230万人死亡^[1]。在COPD中,肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)的患病率与病情的严重程度密切相关,多达90%的患者静息平

[收稿日期] 2019-10-07 **[接受日期]** 2020-04-12

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(2009-H2028)。Supported by Shandong Province Medical and Health Science and Technology Development Plan Project (2009-H2028).

[作者简介] 王琛,硕士,主治医师。

*通信作者(Corresponding author). Tel: 0532-88905391, E-mail: 1059037278@qq.com

均肺动脉压(mPAP)超过 20 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)。约有 1% 的 COPD 患者患有严重的 PH, mPAP 值在 35~40 mmHg, PH 在 COPD 中的存在和严重程度对患者生存率有重要影响。缺氧引发的肺血管收缩是 PH 的主要致病机制, 持续的血管收缩导致肺血管结构的变化, 主要影响肺小动脉。在 COPD 中, 炎症、低氧、烟草烟雾的暴露导致血管重塑、肺血流动力学改变^[2]。

过氧化物酶增殖物活化受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 的激动剂罗格列酮在 COPD 患者中给药时可抑制香烟烟雾诱导的支气管上皮细胞炎症因子、趋化因子和活性氧类(reactive oxygen species, ROS)等的产生, 且罗格列酮可剂量依赖性地抑制脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)产生, PPAR γ 参与 COPD 的气道炎症过程^[3], 但针对其在 COPD 患者炎症因子白介素-8(IL-8)的产生和肺动脉的血管重塑的作用研究尚少。肺小动脉血管的重塑是导致 PH 的主要原因, 目前 COPD 合并 PH 患者的治疗仍以针对诱因治疗为主, 临床治疗效果不佳, 个体化差异较大。为此, 本研究拟探讨盐酸罗格列酮调控 PPAR γ 转录水平对 COPD 大鼠炎症因子的产生和肺小动脉血管重塑的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂 雄性 Wistar 大鼠 36 只, 购自青岛市药物检验检疫所, 6~8 周龄, 体质量 180~220 g, SPF 级饲养。试剂: 哈德门(山东中烟工业有限责任公司, 中国); 盐酸罗格列酮(文迪雅, 4 mg/片); LPS(美国 Sigma 公司); 大鼠白介素-8(IL-8) ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国); TRIzol 试剂、M-MuLV 一步法 RT-PCR 试剂盒、引物(上海生工生物工程技术有限公司)。主要仪器: 自制烟熏箱和低氧仓。低氧仓大小约 54 cm×30 cm×32 cm, 钻 5 个直径 3 cm 孔, 使仓内保持常压, 并往仓内注入氮气调节氧浓度, 使氧体积分数维持在 0.1 左右。

1.2 动物分组及处理 将大鼠按数字法随机分为药物治疗组(A组)、非药物治疗组(B组)和空白对照组(C组), 每组 12 只。A组参照钟小宁等^[4]方法制作 COPD 肺动脉高压大鼠模型, B组与 A组相

似, 但第 3 周开始每只大鼠每天给予盐酸罗格列酮 1 mg 治疗; C组给予相同体积生理盐水模拟造模, 正常饲养。

1.3 组织学检查 以 100 g/L 水合氯醛(4 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠后, 打开胸腔, 取双肺分别置于一 70℃ 冰箱和 40 g/L 中性甲醛中保存备用。肺组织以 40 g/L 中性甲醛固定后, 常规脱水包埋, 并进行苏木精-伊红染色。每只大鼠肺组织切片随机选择 5 个视野, 按照文献^[5]的方法观测直径 50~100 μ m 的腺泡内肌化型小动脉的血管壁面积、血管总面积, 并计算血管壁面积/血管总面积(MA%)比值。

1.4 IL-8 检测 准备好标准品并用洗涤缓冲液 1:1 稀释于反应孔内, 后取大鼠肺组织 50 mg, 加入适量生理盐水捣碎, 离心 10 min 后取待测样品上清液 50 μ L 置于反应孔内, 立即加入 50 μ L 生物素标记的抗体, 盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 1 h, 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 震荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干, 重复此操作 3 次后, 每孔加入 80 μ L 的亲合链酶素-HRP, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 30 min; 甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干, 重复此操作 3 次后, 每孔加入底物 A、B 各 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 37℃ 温育 10 min, 避免光照, 取出酶标板, 迅速加入 50 μ L 终止液, 加入终止液后立即在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(D)值, 以 D 值为纵坐标, 相应的待测物质浓度为横坐标, 绘制相应曲线, 并根据其 D 值由标准曲线换算出相应浓度。

1.5 RT-PCR 检测 PPAR mRNA 的转录水平 取肺组织 50 mg, 加入 0.5 mL TRIzol 提取总 RNA, 测定 RNA 浓度。取 1 μ L mRNA 产物按照一步法反转录试剂盒说明书合成 cDNA, 以此为模板行 PCR 扩增。引物通过 Primer Premier5 软件设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。PPAR 上游引物序列为 5'-T CTCT CCGTAAT GGAAGACC-3', 下游引物序列为 5'-GCAT TAT GA GACAT CCCCAC-3'; actin 上游引物序列为 5'-AGCCAT GTAGCCA TCC-3', 下游引物序列为 5'-AGCCAT GTAGCCA TCC-3'。将 RT-PCR 产物在 12 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳(100 V)30 min, 在紫外灯下检测目的条带电泳情况, 应用 Scion image 软件对电泳条带进行吸光度扫描, 以面积吸光度表示条带的丰

度,以此作为 mRNA 表达的强度,以 actin 作为内参照,PPAR γ mRNA 的相对表达水平采用 PPAR γ /actin 计算得出。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计处理。组间死亡率比较采用 Fisher 确切概率法,PPAR γ 转录水平、MA%与 IL-8 值多组间比较采用单因素方差分析 LSD 法,组间相关性分析采用 Pearson 相关性分析,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 存活率分析 A 组有 2 只大鼠分别在第 5、6 周死亡;B 组、C 组大鼠无死亡。因样本量 <40 ,所以采用 Fisher 确切概率法进行计算。A 组大鼠存活率低于 C 组,组间差异无统计学意义(Fisher 值=3.856, $P=0.167$)。

2.2 血管壁病理改变 病理切片结果(图 1)示:A 组大鼠血管壁周围中性粒细胞增多,即淋巴细胞形成,管壁平滑肌层增厚,其外观可见大量胶原沉积。C 组大鼠血管壁周围无明显炎性细胞浸润,血管壁平滑肌层未见增厚,无胶原沉积。B 组血管壁重塑及炎性浸润情况较 A 组减轻,但仍较 C 组严重。病理切片由经验丰富的病理科医师双盲读片。光镜下病理评分基于以下变量:肺小动脉周围中性粒细胞浸润、血管平滑肌层增厚程度。严重程度评分:无损伤=1 分(无病理改变);轻度损伤=2 分(有中性粒细胞浸润,且血管壁轻度增厚);重度损伤=3 分(大量中性粒细胞浸润且血管壁明显增厚)。每个样本有 5 个切片,被随机分析,以平均值作为样本的最终评分。结果见图 1。

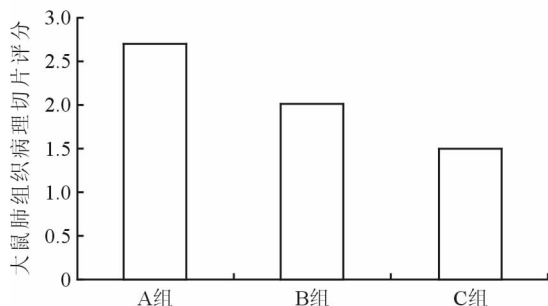


图 1 大鼠肺组织病理切片评分

2.3 肺小动脉血管重塑比较 对直径 50~100 μm 肌化性动脉进行分析,结果(表 1)显示:A 组、B 组、C 组间 MA%差异具有统计学意义($F=47.84$, $P<0.01$),A 组 MA%较 C 组明显升高,B 组 MA%较

A 组明显下降(P 均 <0.05)。

2.4 IL-8 检测指标比较 结果(表 1)表明:A 组、B 组、C 组之间 IL-8 差异具有统计学意义($F=47.87$, $P<0.01$),A 组明显高于 B 组,B 组高于 C 组(P 均 <0.05)。

表 1 A、B、C 组 MA%和 IL-8 比较

组别	MA%	IL-8/(pg \cdot mL $^{-1}$)
A 组($n=10$)	47.98 \pm 4.33*	25.27 \pm 4.42*
B 组($n=12$)	36.83 \pm 6.34* Δ	15.78 \pm 4.72* Δ
C 组($n=12$)	25.42 \pm 5.15	8.61 \pm 2.53

* $P<0.05$ 与 C 组比较; $\Delta P<0.05$ 与 A 组比较

2.5 肺组织 PPAR γ 转录水平比较 结果(图 2)表明:A、B、C 组之间差异具有统计学意义($F=96.39$, $P<0.01$),C 组、B 组、A 组 PPAR γ /actin 指标逐渐下降,A 组明显高于 B 组,B 组高于 C 组(P 均 <0.05)。

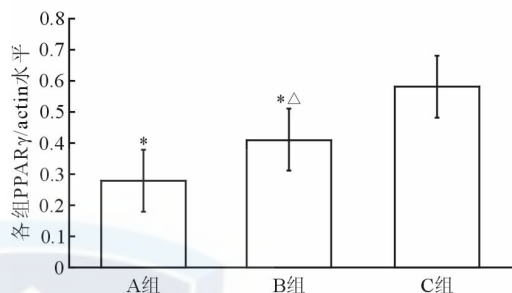


图 2 3 组 PPAR γ /actin 水平比较

* $P<0.05$ 与 C 组比较; $\Delta P<0.05$ 与 A 组比较

2.6 PPAR γ 转录水平与 MA%、IL-8 值的相关性 B 组大鼠中 PPAR γ 转录水平与 MA%负相关($r=-0.662$, $P<0.05$),与 IL-8 值负相关($r=-0.615$, $P<0.05$),而 B 组中 MA%与 IL-8 正相关($r=0.980$, $P<0.05$)。

3 讨论

COPD 是感染引起的、进行性气道炎症,慢性气道炎症在 COPD 中起主要作用,可引起杯状细胞增加、黏液腺增生、肉芽肿和肺气肿,导致巨噬细胞激活并释放 TNF- α 、IL-6、IL-8、单核细胞趋化肽-1(MCP-1)、白三烯 B-4 和 ROS 等炎症介质和趋化因子。目前气道上皮细胞已被证实可分泌 IL-8,引起小气道纤维化进展,是 COPD 的炎性标志物。另有国外研究^[6]表明,IL-8 是使中性粒细胞聚集的主要细胞因子,其也被认为是 COPD 发展的关键因素。

香烟烟雾足以刺激 COPD 气道中 IL-8 的过度释放,且在 COPD 急性加重期时,中性粒细胞和循环中的 IL-8 可在气道中大量聚集。

在 COPD 慢性炎症的损伤与修复过程中,肺小动脉血管平滑肌的增殖和血管壁周围大量的胶原沉积共同参与了肺血管壁结构的重建^[7-8]。目前作为 PPAR γ 激动剂的噻唑烷二酮(TZD),其与糖皮质激素受体相似,是具有抗氧化作用的核激素受体超家族成员之一,通过多种机制发挥有效的抗氧化和抗炎作用,包括下调 NF- κ B 和其他促炎转录因子^[3],虽然其主要作为新型胰岛素增敏剂,被广泛用于 2 型糖尿病的治疗,但也在多种肺细胞类型中普遍表达,包括肺血管内皮细胞和平滑肌细胞。在实验性肺高压动物模型(主要通过低氧诱导肺高压)中,肺和肺小动脉中的 PPAR γ 表达下调,导致发展为 PH,这提示 PPAR γ 在 PH 中具有保护作用。PPAR γ 激动剂 TZD 药物罗格列酮激活 PPAR γ 是对抗 PH 的有前途治疗剂,可以保护肺小动脉,部分原因是可以通过抑制肺动脉平滑肌细胞增殖和迁移而实现该作用^[9]。

本研究主要探讨 PPAR γ 激动剂是否在低氧、烟熏、LPS 诱导下的 COPD 大鼠肺组织中有抑制促炎因子 IL-8 的生成和改善血管重塑的作用。病理切片显示,B 组肺血管壁重塑及其周围的中性粒细胞浸润较 A 组减轻,但仍较 C 组严重;相关实验结果显示,A 组、B 组大鼠的 MA% 比值、IL-8 均高于 C 组,A 组大鼠明显高于 B 组。A、B、C 组肺组织内 PPAR γ 的转录水平依次递增,B 组大鼠 PPAR γ 转录水平与 MA% 比值、IL-8 均负相关。以上结果说明 PPAR γ 激动剂罗格列酮可以抑制肺血管平滑肌细胞的增殖、抑制血管结构重塑、抑制促炎因子 IL-8 生成,抑制 IL-8 的生成可能抑制了肺血管周围中性粒细胞的浸润,而肺部炎症是 COPD 进展的核心机制^[10],那么本研究表明,罗格列酮可能是通过抑制其血管周围的炎症、中性粒细胞的浸润,从而抑制血管壁的重塑和胶原蛋白的沉积,但是其中的具体生物学机制如何尚不清楚,这为进一步的研究提供了方向。

综上所述,罗格列酮在 COPD 大鼠中可通过激活 PPAR γ 而有效抑制 IL-8 的生成,从而抑制肺血管壁

平滑肌细胞的增殖和胶原蛋白的沉积,这为罗格列酮治疗 COPD 肺高压提供了一定的理论支持,为临床探索治疗肺高压的新型药物提供了新思路。

参考文献

- [1] VEGA-SÁNCHEZ Á E, TÉLLEZ-NAVARRETE N A, PÉREZ-PADILLA R. Chronic obstructive pulmonary disease: perspectives for primary health care[J]. *Rev Invest Clin*, 2019,71(1):55-63.
- [2] GHIGNA M R, MOOI W J, GRÜNBERG K. Pulmonary hypertensive vasculopathy in parenchymal lung diseases and/or hypoxia: number 1 in the Series "Pathology for the clinician" Edited by Peter Dorfmueller and Alberto Cavazza [J]. *Eur Respir Rev*, 2017,26(144):170003.
- [3] LAKSHMI S P, REDDY A T, REDDY R C. Emerging pharmaceutical therapies for COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017,12:2141-2156.
- [4] 钟小宁,白晶,施焕中,等.慢性支气管炎与肺气肿大鼠气道炎症与重塑的实验研究[J].*中华结核和呼吸杂志*, 2003,26(12):750-755.
- [5] 陈劲龙,冉丕鑫.血管内皮生长因子与烟雾暴露所致大鼠肺气肿发病关系的研究[J].*中华结核和呼吸杂志*, 2003,26(11):671-674.
- [6] GARTH J, BARNES J W, KRICK S. Targeting cytokines as evolving treatment strategies in chronic inflammatory airway diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(11):3402.
- [7] LU X, MURPHY T C, NANES M S, et al. PPAR γ regulates hypoxia-induced Nox4 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells through NF- κ B[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(4): L559-L566.
- [8] SANTOS S, PEINADO V, RAMIREZ J, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary arteries of smokers and patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003,167(9):1250-1256.
- [9] YANG K, ZHAO M, HUANG J, et al. Pharmacological activation of PPAR γ inhibits hypoxia-induced proliferation through a caveolin-1-targeted and -dependent mechanism in PSMCs[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(4): C428-C438.
- [10] LEA S, PLUMB J, METCALFE H, et al. The effect of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands on *in vitro* and *in vivo* models of COPD[J]. *Eur Respir J*, 2014,43(2):409-420.

[本文编辑] 廖晓瑜,贾泽军