

• 论著 •

WY14643 对急性肺损伤大鼠肺组织 PPAR- α 表达的影响及其机制研究

姜鹏 王建春 赵咏梅 钱桂生

【摘要】 目的 探讨 WY14643 对急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织中过氧化物酶增殖体激活受体- α (PPAR- α)表达的影响及其可能机制。**方法** 将 104 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、脂多糖(LPS)致伤组(ALI 组)、1 mg/kg PPAR- α 激活剂 WY14643 治疗组(LW 1 mg 组)和 3 mg/kg WY14643 治疗组(LW 3 mg 组)。用 LPS(5 mg/kg) 静脉注射复制大鼠 ALI 模型,注射 LPS 15 min 后再次分组按剂量静脉注射 WY14643。分别于制模后 1、2、4 和 8 h 活杀大鼠,观察肺组织病理变化;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织中 PPAR- α mRNA 表达;蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 PPAR- α 蛋白表达。**结果** ALI 组 PPAR- α mRNA 表达均较对照组降低,差异有显著性(P 均 <0.05);LW 1 mg 组在 2 h 和 4 h、LW 3 mg 组在 2、4 和 8 h PPAR- α mRNA 表达均较 ALI 组相应时间点升高,差异均有显著性(P 均 <0.01);而 LW 1 mg 组与 LW 3 mg 组在 1、2、4 和 8 h PPAR- α 蛋白表达均较 ALI 组相应时间点显著升高(P 均 <0.01);LW 1 mg 组在 4 h 和 8 h 与 LW 3 mg 组在 2、4 和 8 h PPAR- α 蛋白表达均较对照组升高,差异有显著性($P<0.01$);LW 1 mg 与 LW 3 mg 组间比较其作用差异也有显著性($P<0.05$)。**结论** ALI 大鼠肺组织 PPAR- α 和蛋白表达均明显下降;WY14643 对 PPAR- α 具有较明显的上调作用。

【关键词】 过氧化物酶增殖体激活受体; WY14643; 肺损伤,急性; 炎症反应

Influence and mechanism of peroxisome proliferation activated receptor - α expression induced by WY14643 in rat lung with acute lung injury JIANG Peng*, WANG Jian-chun, ZHAO Yong-mei, QIAN Gui-sheng. * Department of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: WANG Jian-chun (Email: wjc@mail. tmmu. com. cn)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of WY14643 [peroxisome proliferation activated receptor - α (PPAR - α) activator, 4 - cholro - 6 - (2.3 - xylidino) - 2 - pyrimidin-ylthio acetic acid] on PPAR- α expression in lung of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) and its mechanism. **Methods** One hundred and four male Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, ALI group, WY14643 1 mg group and WY14643 3 mg group. Wistar rats were given LPS (5 mg/kg) before intratracheal challenge with WY14643 (1 mg/kg and 3 mg/kg). Rats of all groups were sacrificed at 1, 2, 4, 8 hours after LPS challenge. The levels of PPAR- α mRNA in lung were measured by semi-quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction, the levels of PPAR- α protein in rats lung homogenate were measured by Western blot. **Results** The levels of PPAR- α mRNA at 2, 4 and 8 hours in WY14643 1 mg group and WY14643 3 mg group were significantly higher than that in ALI group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The levels of PPAR- α mRNA at all time in ALI group was significantly lower than that in control group ($P<0.01$). Meanwhile, the levels of PPAR- α protein at all time in WY14643 1 mg group and WY14643 3 mg group were significantly higher than that in ALI group ($P<0.01$). The level of PPAR- α mRNA at 4 hours and 8 hours in WY14643 1 mg group and at 2, 4 and 8 hours in WY14643 3 mg group were significantly higher than those in control group too ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The expressions of PPAR- α mRNA and protein are all significantly low in the lung of rats with acute lung injury. WY14643 may upregulate the level of PPAR- α in the lung tissue in rats with acute lung injury.

【Key words】 peroxisome proliferation activated receptor - α ; WY14643; acute lung injury; inflammation

基金项目:全军医学科研“十五”计划重点基金项目(01Z074)

作者单位:430037 重庆,第三军医大学新桥医院呼吸病研究所(姜鹏,王建春,钱桂生);830000 兰州军区乌鲁木齐总医院普内科(赵咏梅)

通讯作者:王建春(Email: wjc@mail. tmmu. com. cn)

作者简介:姜鹏(1973-),男(汉族),山东海阳人,医学硕士,主治医师(Email: jipzym@126. com 或 jipzym@21cn. com)。

过氧化物酶增殖体激活受体(PPARs)是一种细胞核内受体,属 II 型核受体超家族成员,由激活剂活化后可调控多种核内靶基因的表达,影响人体糖脂代谢、细胞发育等过程^[1]。PPARs 在体内可分为 α 、 β 和 γ 3 型^[2]。研究表明,WY14643 是 PPAR- α 人工合成激活剂,除可降脂或降糖外,还具有抗炎作

用^[3]。本实验旨在研究 PPAR- α 激活剂 WY14643 对脂多糖(LPS)复制的急性肺损伤(ALI)模型大鼠肺脏 PPAR- α 表达的影响,以及可能涉及的分子机制,以期探讨这种药物在炎症性疾病中可能的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器:①LPS(E. coli. O111:B4)以及 WY14643(美国 Sigma 公司);Tripure RNA 提取液(美国 Roche 公司);逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(日本 TaKaRa Biotech 公司);山羊抗 PPAR- α 单克隆抗体 IgG(一抗,美国 Santa Crus 公司);生物素标记兔抗羊 IgG(二抗)、辣根过氧化物酶(HRP)标记链霉卵白素工作液(三抗)、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂(北京中山生物技术有限公司);蛋白质免疫印迹法(Western blot, 美国 Cell Signaling Technology)和增强化学发光法(ECL)显色检测试剂盒(美国 Promega 公司)。②PE9600 型 PCR 仪(Applied Biosystem 公司);Lamda Bio-20 紫外分光光度计(P-E 公司);凝胶密度扫描系统(美国 UVP 公司);电泳-电转移系统(Mini PROTEAN System, 美国 Bio-RAD);垂直电泳槽(北京六一仪器厂);Laboguge 400 R 低温离心机(德国 Heraeus)。

1.2 实验动物分组及模型复制:104 只 8 周龄雄性 Wistar 大鼠,平均体重(175 $\pm$ 10)g,第三军医大学实验动物中心提供。在本实验室适应 10 d(恒温、恒湿,标准鼠食喂养)后,按随机数字表法分为对照组(8 只)、LPS 致伤组(ALI 组,32 只)、1 mg/kg WY14643 治疗组(LW 1 mg 组,32 只)和 3 mg/kg WY14643 治疗组(LW 3 mg 组,32 只)。后 3 组分别于制模后 1、2、4 和 8 h 活杀,每组 8 只。动物模型复制按以下方法进行:大鼠以质量分数为 10%的盐酸氯胺酮(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,ALI 组大鼠经颈静脉缓慢注射溶解于生理盐水中的 LPS(质量分数为 0.2%,5 mg/kg),15 min 后经颈静脉再次注射质量分数为 10%的二甲亚砷(DMSO)1 ml/kg,止血后放回鼠笼。LW 1 mg 组与 LW 3 mg 组则在注射 LPS 15 min 后再次经颈静脉缓慢注射溶解于 10% DMSO 的 WY14643(1 mg/kg 和 3 mg/kg)。对照组注射等量生理盐水和 DMSO。

1.3 肺组织常规病理观察:参考文献[4]进行,肺组织经石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色显示。

1.4 肺组织 PPAR- α mRNA 表达:用 RT-PCR 法测定。将各组大鼠在预定时间点经颈动脉放血活

杀后,取左肺下叶迅速放液氮中冻存,备 RNA 提取用。Tripure 常规一步法提取肺组织总 RNA。取 1 μ g RNA 进行逆转录反应,按试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中反应。经 30 $^{\circ}$ C 10 min、48 $^{\circ}$ C 30 min、99 $^{\circ}$ C 5 min、5 $^{\circ}$ C 5 min 逆转录合成第 1 条 cDNA,以此为模板分别用 PPAR- α 引物和内对照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物经 PCR 方法进行扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,共 35 次。上述引物均源自 Gen Bank 中 大鼠 PPAR- 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 产物在质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,凝胶成像系统分析成像,以 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物为内参照,以目的 PPAR- α 片段与 GAPDH 片段的条带积分吸光度(OA)比值作为 PPAR- 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

Table 1 Feature of two gene				
基因名称	引物序列	目的片段 长度(bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)	GenBank 编号
PPAR- α	正义链:5'-AGGCTATCCCAGGCTTTGC-3'	487	58	M88592
	反义链:5'-GCGTCTGACTCGGTCTTCTTG-3'			
GAPDH	正义链:5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3'	195	55	M17701
	反义链:5'-CAAAGTTGTTCATGGATGACC-3'			

1.5 Western blot 法检测大鼠肺组织 PPAR- α 蛋白表达:采用单去污剂裂解液性提取组织蛋白后,用紫外分光光度计测定样品蛋白浓度并初步定量。蛋白用 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;经质量分数为 12%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),常规将蛋白转移至硝酸纤维膜上;用质量分数为 5%的脱脂奶粉封闭 30 min;羊抗大鼠 PPAR- α 一抗(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,用三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBST)洗涤 15 min $\times$ 4;加兔抗羊 IgG HRP(二抗,1:1 000)室温孵育 2 h,加入 HRP 标记的链霉卵白素工作液(三抗)室温下孵育 2 h,用 TBST 洗涤 15 min $\times$ 3,再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 15 min $\times$ 1,然后用 ECL 显色。图像用计算机扫描处理,采用 Quantity One 软件进行数据分析,设定对照组 PPAR- α 条带积分吸光度(OA)值为 1,并计算各组各时间点条带的 OA 值,进行 PPAR- α 半定量分析。

1.6 统计学处理:数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件包行 t 检验、方差分析及 SNK 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学观察:对照组肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变,间质血管无充血,肺泡腔内未见中性粒细胞浸润。ALI 组 2、4 和 8 h 肺组织均有明显渗出,水肿及出血,大量炎症细胞浸润,肺泡结构破坏,伴局灶性肺不张和肺气肿,可见肺泡腔内炎性细胞浸润,大量均质红染样渗出物和微血栓及透明膜形成等病变。

2.2 肺组织 PPAR- α mRNA 的表达 (图 1~4, 表 2):ALI 不同时间点组 PPAR- α mRNA 表达均较对照组明显降低 (P 均 < 0.01); 各 WY14643 治疗组 PPAR- α mRNA 的表达均明显提高,均高于同期对照组和 ALI 组,其中 LW 3 mg 组的升高大于 LW 1 mg 组,差异均有显著性 (P 均 < 0.01)。



M: DNA Marker; A: 对照组; B~E: ALI 组 1、2、4 和 8 h

图 1 LPS 致伤对大鼠肺组织 PPAR- α mRNA 表达的影响

Figure 1 Effects of LPS on PPAR- α mRNA expression in rat lung

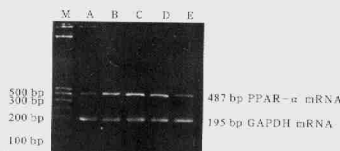


M: DNA Marker; A: 对照组; B~E: LW 1 mg 组 1、2、4 和 8 h

图 2 WY14643 1 mg/kg 对大鼠肺组织 PPAR- α mRNA 表达的影响

Figure 2 Effects of WY14643 1 mg/kg on PPAR- α mRNA expression in rat lung

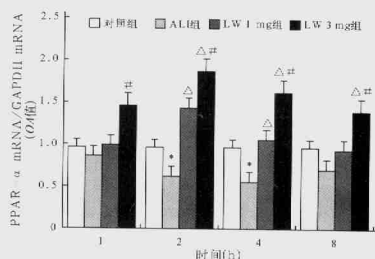
2.3 Western blot 结果 (图 5, 图 6, 表 2):ALI 组 PPAR- α 蛋白在 LPS 作用 1 h 即明显减少, 4 h 降至最低, 8 h 仍维持较低水平, 各时间点与对照组相比差异均有显著性 (P 均 < 0.01)。LW 1 mg 组和 LW 3 mg 组 PPAR- α 蛋白均在 1 h 即有所升高, 4 h 达高峰, 8 h 略有回落, 与对照组和 ALI 组相比差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。LW 3 mg 组与 LW 1 mg 组相比差异均有显著性 (P 均 < 0.05)。



M: DNA Marker; A: 对照组; B~E: LW 3 mg 组 1、2、4 和 8 h

图 3 WY14643 3 mg/kg 对大鼠肺组织 PPAR- α mRNA 表达的影响

Figure 3 Effects of WY14643 3 mg/kg on PPAR- α mRNA expression in rat lung

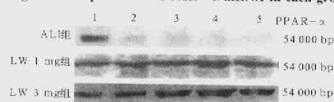


注: 与对照组比较, $*P < 0.01$; 与 ALI 组同时点比较, $\Delta P < 0.01$;

与 LW 1 mg 组同时点比较, $\#P < 0.05$

图 4 各组 PPAR- α mRNA 表达

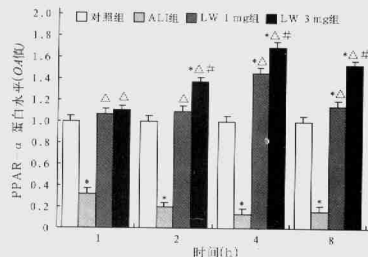
Figure 4 Expression of PPAR- α mRNA in each group



1: 对照组; 2: 1 h; 3: 2 h; 4: 4 h; 5: 8 h

图 5 Western blot 检测各组肺组织 PPAR- α 蛋白表达

Figure 5 Expression of PPAR- α protein by Western blot



注: 与对照组比较, $*P < 0.01$; 与 ALI 组同时点比较, $\Delta P < 0.01$;

与 LW 1 mg 组同时点比较, $\#P < 0.05$

图 6 PPAR- α 蛋白表达的变化

Figure 6 Changes of the expression of PPAR- α protein

表 2 WY14643 对大鼠肺组织 PPAR- α mRNA 及其蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effects of WY14643 on mRNA and protein expression of PPAR- α in lung tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	PPAR- α mRNA/GAPDH mRNA(OA 值)				PPAR- α 蛋白水平(OA 值)			
	1 h	2 h	4 h	8 h	1 h	2 h	4 h	8 h
对照组	0.94 $\pm$ 0.11	0.97 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.10	1.000 $\pm$ 0.012	0.986 $\pm$ 0.016	0.991 $\pm$ 0.011	0.977 $\pm$ 0.012
ALI 组	0.86 $\pm$ 0.14	0.62 $\pm$ 0.09*	0.56 $\pm$ 0.05*	0.71 $\pm$ 0.12	0.324 $\pm$ 0.036*	0.194 $\pm$ 0.018*	0.138 $\pm$ 0.024*	0.160 $\pm$ 0.026*
LW 1 mg 组	0.99 $\pm$ 0.09	1.43 $\pm$ 0.12 Δ	1.06 $\pm$ 0.13 Δ	0.91 $\pm$ 0.09	1.122 $\pm$ 0.127 Δ	1.196 $\pm$ 0.135 Δ	1.460 $\pm$ 0.246* Δ	1.146 $\pm$ 0.144* Δ
LW 3 mg 组	1.46 $\pm$ 0.13 $\#$	1.87 $\pm$ 0.18 $\Delta\#$	1.62 $\pm$ 0.12 $\Delta\#$	1.39 $\pm$ 0.09 $\Delta\#$	1.226 $\pm$ 0.136 Δ	1.369 $\pm$ 0.146* $\Delta\#$	1.696 $\pm$ 0.158* $\Delta\#$	1.520 $\pm$ 0.201* $\Delta\#$

注:与对照组比较:* $P<0.01$;与 ALI 组同时时间点比较: $\Delta P<0.01$;与 LW 1 mg 组同时时间点比较: $\# P<0.05$

3 讨论

ALI 是指机体遭受严重创伤、感染等打击后,出现以肺泡毛细血管膜损伤,导致肺水肿和微肺不张为特征,临床表现为呼吸窘迫和顽固性低氧血症的综合征。LPS 致 ALI 主要是通过体内与脂多糖结合蛋白(LBP)和其他介质的作用,最终引起核转录因子- κ B(NF- κ B)、激活蛋白-1(AP-1)活化,释放大细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等所致^[5,6]。ALI 时肺组织及外周血中炎性介质水平明显增高;同时,肺泡Ⅱ型上皮细胞(ATⅡ)凋亡与过度的炎症反应对肺组织的破坏也同样重要。肺泡上皮细胞本身具有屏障和促进 ALI 修复的功能^[5]。

WY14643 被确认为 PPAR- α 的特异性激活剂,早期研究主要局限于其对脂代谢的调节及对炎症反应的控制作用^[3]。用 WY14643 治疗野生型小鼠,可使腹膜巨噬细胞表达 TNF- α 水平下降^[7]。PPARs 被激活剂激活时主要通过抑制 NF- κ B 和 AP-1 的活性,引起下游细胞因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 表达减少而起抗炎作用^[8]。为此,我们推测 PPAR- α 可能参与了 ALI 的病理过程。

有关 PPAR- α 激活剂在 ALI 中抗炎作用的报道极少。本实验中用 LPS 成功复制了 ALI 大鼠模型,在此基础上通过给予不同剂量 PPAR- α 激活剂 WY14643(1 mg/kg, 3 mg/kg)以观察 WY14643 对大鼠肺组织中 PPAR- α mRNA 及其蛋白表达的影响。RT-PCR 结果显示,正常肺组织中即有一定数量 PPAR- α mRNA 的表达,LPS 致伤 1 h 后 PPAR- α mRNA 即有所下降,4 h 降至谷底,8 h 有所回升,但仍低于对照组。给予不同剂量 PPAR- α 激活剂 WY14643 后,肺组织中 PPAR- α mRNA 表达量较 ALI 组在各时间点均有不同程度的升高,尤其以 2 h 和 4 h 差异显著。Western blot 结果显示,正常肺组织中亦有一定数量 PPAR- α 蛋白表达,LPS 致伤 1 h 后 PPAR- α 即明显下降,4 h 降至谷底,8 h 仍维持在较低水平。给予不同剂量 PPAR- α

激活剂 WY14643 后,肺组织中 PPAR- α 蛋白表达量较 ALI 组在各时间点均有不同程度的升高,尤其以 4 h 和 8 h 差异显著。实验结果提示,PPAR- α 无论在基因转录水平还是蛋白水平,均与其激活剂间存在一定的量-效关系,WY14643 能显著上调 ALI 肺组织中 PPAR- α 的表达。Delerive 等^[8]认为,PPAR 与 NF- κ B 和 AP-1 之间蛋白-蛋白的相互作用是导致炎症反应基因表达受抑制的主要分子机制。近年的研究也证实,LPS 诱导的 ALI 过程中,NF- κ B 活性的增强也与 LPS 导致的炎症反应有关^[9]。PPAR- α 激活剂 WY14643 使 PPAR- α 表达增加,可能通过抗炎途径在一定程度上抑制 ALI 的发生和发展,值得今后进一步研究。

参考文献:

- Willson T M, Brown P J, Sternbach D D, et al. The PPARs, from orphan receptors to drug discovery[J]. J Med Chem, 2000, 43: 527-550.
- Ziuzenkov O, Perrey S, Marx N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors[J]. Curr Atheroscler Rep, 2002, 4: 59-64.
- Delerive P, Fruchart J C, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control[J]. J Endocrinol, 2001, 169: 453-459.
- 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京:人民军医出版社, 2003: 69-72.
- 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28: 97-101.
- Yang H, Young D W, Gusovsky F, et al. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated toll-like receptor 4. MD-2 is required for activation of mitogen-activated protein kinases and Elk-1[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 20861-20866.
- Hill M R, Clarke S, Rodgers K, et al. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia[J]. Infect Immun, 1999, 67: 3488-3493.
- Delerive P, Gervois P, Fruchart J C, et al. Induction of I kappaB alpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 36703-36707.
- 黄杨, 尹文, 宋祖军, 等. 一氧化氮对内毒素刺激肺泡巨噬细胞核因子- κ B 的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 537-539.

(收稿日期: 2006-02-16 修回日期: 2006-05-25)

(本文编辑: 李银平)