

过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 激动剂罗格列酮对慢支大鼠肺组织基质金属蛋白酶 -9 表达的影响

刘栩晗 郭连英 沈 洁 施广霞

摘 要 **目的** 研究过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ) 的外源性强力配体激动剂罗格列酮 (RGD) 对慢支大鼠肺组织基质金属蛋白酶 -9 (MMP -9) 表达的影响。**方法** 采用熏烟加气管内滴注内毒素法建立慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠模型, 用酶联免疫吸附实验、实时定量 PCR 等方法分别测定其 MMP -9 基因及蛋白水平表达的改变。同时为了进一步探讨罗格列酮在肺部微环境下对基质金属蛋白酶 9 活性的影响, 通过支气管肺泡灌洗法得到了正常及慢支大鼠的肺泡巨噬细胞, 使之与罗格列酮共同培养, 观察其对肺泡巨噬细胞 MMP -9 表达的影响。**结果** 用熏烟加气管内滴注内毒素法建立的大鼠 COPD 模型, 其病理形态学改变与人类 COPD 的改变相似。罗格列酮可以抑制烟雾和内毒素刺激所致大鼠肺组织 MMP -9 mRNA 及蛋白表达的增加。**结论** 罗格列酮对 COPD 的防治作用可能是由于抑制了 MMP -9 mRNA 表达进而抑制了 MMP -9 蛋白表达所致。

关键词 基质金属蛋白酶 -9 慢性阻塞性肺病 罗格列酮 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ

Effect of PPAR γ Activators Rosiglitazone on Matrix Metalloproteinase -9 in Rats COPD. Liu Xuhan, Guo Lianying, Shen Jie, Shi Guangxia. Department of Endocrine, Dalian Municipal Central Hospital, Liaoning 116003, China

Abstract **Objective** To study the effect of strongly exogenous agonist rosiglitazone (RGD) of peroxisome proliferator - activated receptor γ (PPAR γ) on matrix metalloproteinase -9 (MMP -9) expression of lung tissue from chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats. **Methods** COPD rat model was established by fumigation cigarettes plus intratracheal instillation of endotoxin. MMP -9 gene and protein expression changes were measured by real - time quantitative PCR and enzyme - linked immunosorbent assay. Meanwhile, in order to further explore the effect of rosiglitazone on matrix metalloproteinase -9 activity under the lung microenvironment, normal and chronic bronchitis alveolar macrophages obtained by bronchoalveolar lavage were cocultured with rosiglitazone and its effect on MMP -9 expression of alveolar macrophages was observed. **Results** The pathological changes of bronchi and lung tissue from rat COPD model established by fumigation cigarettes plus endotoxin endotracheal drop were similar to those of human COPD. Rosiglitazone can inhibit increased MMP -9 mRNA and protein expression from smoke and LPS - induced rat lung tissues. **Conclusion** The prevention and treatment effect of rosiglitazone on COPD may be due to inhibition of MMP -9 mRNA thereby inhibiting the expression of MMP -9 protein.

Key words Matrix metalloproteinase -9; COPD; Rosiglitazone; PPAR γ

IV 型胶原降解基膜的破坏是慢性阻塞性肺病肺气肿 (COPD) 发生发展中的一个关键环节^[1]。基质金属蛋白酶 9 (MMP -9) 又称明胶酶 B, 是降解 IV 型胶原的最主要成员, 影响了 COPD 发生发展。过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ) 在肺组织广泛表达, 近来研究表明 PPAR γ 激活对慢性阻塞性肺病肺功能破坏有明显的预防作用^[2]。罗格列酮是高选择性 PPAR γ 的外源性强力配体激动剂, 本实验采用烟

熏加气管内滴加内毒素法建立大鼠慢性支气管炎肺气肿模型, 探讨 PPAR γ 受体激动剂罗格列酮对慢性阻塞性肺病大鼠肺组织基质金属蛋白酶 -9 表达的影响, 探讨 PPAR γ 激活防治慢性阻塞性肺病的机制。

材料与方法

1. 动物分组及模型制作: SD 大鼠 24 只, 雌雄各半, 体重 220 ~ 250g, 购自大连医科大学动物中心, 随机分成 3 组, 每组 8 只。(1) 健康对照组: 动物房饲养。(2) COPD 模型组: 采用烟熏加气管内滴加内毒素法, 即实验第 1、14 天气管内注入内毒素 (1mg/ml) 200 μ g, 次日始于密闭箱内熏烟, 每次 20 支, 每天 1h, 连续 28 天, 第 14 天除外。(3) 罗格列酮组: 每天熏烟前予以罗格列酮 20 μ g/kg 灌胃, 其余同模型组。第 29 天杀死大鼠进行病理学观察并对各组动物进行病理图文分析, 确定模型复制成功后进行下列各项指标测定。

基金项目: 辽宁省教育厅基金资助项目 (2004D137)

作者单位: 116003 大连市中心医院内分泌科 (刘栩晗); 116044 大连医科大学病理生理教研室 (郭连英、沈洁、施广霞)

通讯作者: 刘栩晗, 电子信箱: xuhanliu281277@ yahoo. com. cn

2. 支气管肺组织 PPAR γ 、MMP-9、基质金属蛋白酶抑制因子 1(TIMP-1)mRNA 的表达:(1)RNA 的提取及反转录反应:取冻存肺组织 30mg,按 RNeasy Mini Kit 说明书提取总 RNA。RNA 浓度及纯度用紫外分光光度计(ampersham)进行检测。保证 260/280 在 1.8~2.0 之间,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定完整性。反转录反应:1 μ g 总 RNA,5 $\times$ iScript Mix 4 μ l,iScript 反转录酶 1 μ l,去核酸酶水 12 μ l,组成总体积 20 μ l 的反应体系。反应条件:25 $^{\circ}$ C,5min;42 $^{\circ}$ C,30min;85 $^{\circ}$ C,5min,冷却至 4 $^{\circ}$ C。(2)实时定量 PCR 检测:在实时定量 PCR 扩增之前对引物进行普通 PCR 扩增以得到最适反应条件。实时荧光定量 PCR 按 iQ SYBR Green Mix Kit 说明书操作。建立 15 μ l 的反应体系:50ng 总 RNA 的反转录产物,上游引物 0.5 μ l (6 μ mol/L),下游引物 0.5 μ l (6 μ mol/L),2 $\times$ iQ SYBR Green Mix 7.5 μ l,去离子水 5.5 μ l。使用 iQ Syber Green Supermix 和 iCycler iQ Real-Time PCR Detection System 扩增。反应条件是:95 $^{\circ}$ C 3min,95 $^{\circ}$ C 10s 59 $^{\circ}$ C 45s 45 个循环。扩增之后,做溶解曲线检测产物的均一性,反应从 59 $^{\circ}$ C 开始,每个循环 10s 上升 0.5 $^{\circ}$ C 共 80 个循环。每个反应均重复 3 次。设立阴性对照。扩增之前测定每对引物的扩增效率,经检测所用引物的扩增效率均接近于 1。样本目标基因相对含量的计算使用 2 $^{-[\Delta\Delta C(T)]}$ 方法^[3]。 β -actin 作为内参基因。引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物列表

引物名称	序列号	引物序列
PPAR γ	NM_013124	5'-CATCAGTGGGAATTAAGGCA-3'
		5'-CTCTGGGTCAACAGGAGGAT-3'
MMP-9	NM_031055	5'-TCCTTGCAATGTGGATGTTT-3'
		5'-CGTCCTTGAAGAAATGCAGA-3'
TIMP-1	NM_053819	5'-CCTTGCAAACTGGAGAGTGA-3'
		5'-CTGCTAGCCCTTCTCAGAGC-3'
β -actin	NM_031144	5'-CGGTCAGGTCATCACTATCG-3'
		5'-TTCCATACCCAGGAAGGAAG-3'

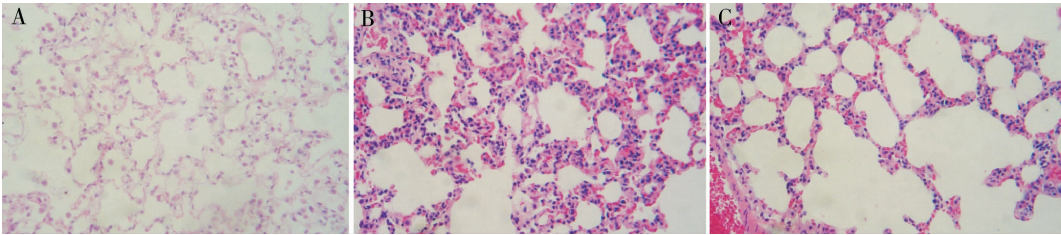


图 1 罗格列酮对慢支大鼠肺组织治疗作用的形态改变

A. 正常肺组织结构及细胞形态;B. 局部肺气肿,肺泡间隔增宽,炎细胞浸润,血管扩张充血;
C. 局部轻度肺气肿,肺泡间隔略增宽,少量炎细胞浸润,血管扩张充血明显改善

罗格列酮治疗组大鼠肺 PPAR γ 表达升高,MMP-9 的表达明显降低($P<0.05$)。而 TIMP-1 的表达不变,见图 2。

3. MMP-9 蛋白含量检测:应用酶联免疫吸附实验方法检测大鼠肺组织 MMP-9 蛋白含量,按试剂盒(rat matrix metalloproteinase 9 ELISA Kit,CUSABIO BIOTECH CO.,Ltd,CSB-E08008r)说明书进行操作。

4. 肺泡巨噬细胞分离培养及 MMP-9 的检测:正常及 COPD 模型组的大鼠腹腔注射 25% 的氨基甲酸乙酯麻醉后,颈总动脉放血致死,气管插管,向肺内灌注 PBS,每次 8~10ml,共 5 次,回收支气管肺泡灌洗液,1000r/min 离心 10min,弃上清,HS 破红细胞 1 次,PBS 洗 3 次,以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基悬浮细胞,调细胞浓度至 1×10^7 接种于 12 孔板中,分为 3 组:正常对照组,COPD 组,COPD+罗格列酮组。2h 后弃上清,PBS 洗 1 次,更换培养基,罗格列酮组含罗格列酮 20 μ g/ml。于 12、24、36、48h 留取细胞上清,ELISA 法(rat matrix metalloproteinase 9 ELISA Kit,CUSABIO BIOTECH CO.,Ltd,CSB-E08008r)检测 MMP9 的含量。

5. 统计学方法:采用 SPSS13.0 进行单因素方差分析,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺组织形态学变化:与未经任何处理的正常大鼠相比,模型组大鼠肺体积显著膨大,颜色发黑。显微镜下可见局部肺气肿,肺泡间隔增宽,炎细胞浸润,血管扩张充血。罗格列酮处理的大鼠肺体积较小,显微镜下可见局部轻度肺气肿,肺泡间隔略增宽,少量炎细胞浸润,血管扩张充血明显改善,见图 1。

2. 罗格列酮对慢支大鼠肺组织 PPAR γ 、MMP-9、TIMP-1 的影响。实时定量 RT-PCR 的结果显示与对照组相比,慢性支气管炎和肺气肿的改变之后支气管肺组织中 PPAR γ 表达降低,MMP-9 的表达明显增加。与对照组相比,罗格列酮治疗组 PPAR γ 表达升高,MMP-9 的表达增加。但与模型组相比较,

3. 罗格列酮对慢支大鼠肺组织 MMP-9 蛋白表达的影响:ELISA 的结果显示与对照组相比,慢性支气管炎和肺气肿的改变之后支气管肺组织中 MMP-

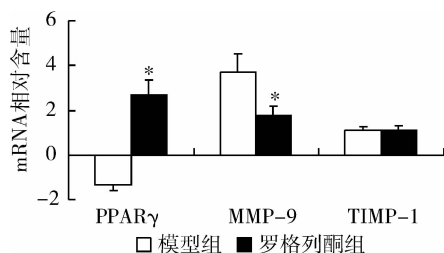


图 2 罗格列酮对慢支大鼠肺组织 PPAR γ 、MMP-9、TIMP-1 的影响
与模型组相比, * $P < 0.05$

9 的表达明显增加。罗格列酮治疗组 MMP-9 的表达低于模型组但高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 3。

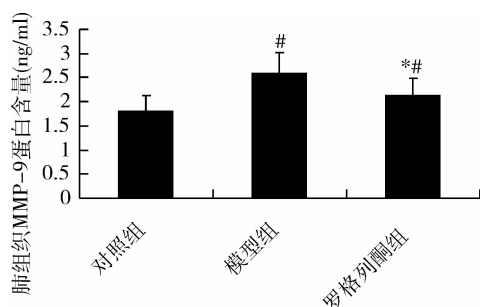


图 3 罗格列酮对慢支大鼠肺组织 MMP-9 蛋白表达的影响

与模型组相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, # $P < 0.05$

4. 罗格列酮对慢支大鼠肺泡巨噬细胞 MMP-9 分泌的影响。将烟雾和内毒素刺激发生慢性支气管炎肺气肿改变的支气管肺泡灌洗液中的肺泡巨噬细胞与罗格列酮共同培养, 可以看到 MMP-9 的分泌量明显受到抑制, 且在 36h 这种抑制作用最明显, 见图 4。

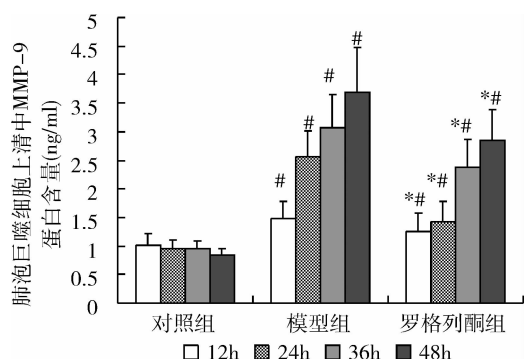


图 4 罗格列酮对慢支大鼠肺泡巨噬细胞 MMP9 分泌的影响

与模型组相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, # $P < 0.05$

讨 论

吸烟和反复下呼吸道感染是慢性阻塞性肺病两

个主要的致病因素, 本研究模拟这一过程, 用熏烟加气管内滴注大肠杆菌脂多糖的方法, 复制慢性阻塞性肺病大鼠模型。本试验及既往的研究结果表明, 所复制的大鼠模型基本符合人类 COPD 及小叶中心性肺气肿的特点, 模型复制成功, 可用于 COPD 的研究^[4]。

PPAR γ 属于核激素受体超家族的一员, 活化后可以与目标基因上游的特异的 DNA 反应元件 (PPRE) 相互作用而调控该目标基因的表达。罗格列酮属于噻唑烷二酮 (TZD) 类, 是用于 2 型糖尿病治疗的新型抗糖尿病药物, 同时也是过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 的配体。本实验结果显示罗格列酮处理大鼠肺组织支气管黏膜上皮细胞脱落较模型组明显减轻, 炎性细胞浸润以及肺泡壁断裂和肺泡腔扩大情况亦较单纯吸烟组减轻, 表明罗格列酮对大鼠慢性阻塞性肺病有防治作用。Real-time PCR 结果显示罗格列酮处理大鼠肺组织 PPAR γ 表达明显增加, 提示罗格列酮对大鼠慢性阻塞性肺病的防治作用是通过上调 PPAR γ 的表达实现的。

肺气肿形成的主要机制之一是蛋白酶和抗蛋白酶系统的失衡。既往的观点认为中性粒细胞分泌的弹性蛋白酶能降解肺组织的弹性蛋白, 从而对肺气肿的形成起主导作用。近年的研究表明黏附肺泡上皮细胞的基膜降解是肺气肿的重要特征, 而基质金属蛋白酶几乎能降解所有的细胞外基质成分。故近年来 MMPs 在肺气肿形成中的作用成为众多研究者关注的焦点。MMP-9 蛋白除了具有 MMPs 类的基本结构外, 在其催化区还包括一个与 2 型纤维连素类类似的结构, 因此与明胶和弹性蛋白有较高的结合力^[5]。此外, MMP-9 还包括一个高度糖基化的类似 V 型胶原结构域, 这个结构能影响此酶的底物特异性和对降解的抵抗力。与这些特殊结构相对应 MMP-9 的功能也多种多样, 除了是降解 IV 型胶原的最主要成员以外还能降解 V、VII 型胶原、蛋白聚糖、纤维结合素、弹性蛋白。因此 MMP-9 在 COPD 的发生发展中具有重要的作用。

MMP-9 的调节主要通过基因转录水平的调节来实现, 多种转录因子可以与 MMP-9 的启动子相结合, 调节其基因转录。本实验结果表明正常情况下支气管肺组织表达极少量的 MMP-9, 但在烟雾和内毒素刺激发生慢性支气管炎肺气肿改变之后, 支气管肺组织 MMP-9 基因及蛋白水平表达均增加, 而口服罗格列酮可以抑制这种烟雾和内毒素刺激所致的 MMP-9 表达增加。Real-time PCR 实验结果显示罗格

列酮不能改变 MMP-9 的生理抑制物 TIMP-1 的基因表达,提示罗格列酮是在基因转录水平直接调节 MMP-9 表达进而影响其蛋白表达。目前研究证实 PPAR γ 活化可以调节 MMP-9 的表达,并且这种调节作用可能是通过与转录因子 AP-1、STAT、NF- κ B 相互作用实现的,而不是直接与 MMP-9 启动子区的反应元件 (PPRE) 相互作用实现的^[6-10]。结合本次实验结果提示罗格列酮对 MMP-9 表达的影响是通过活化 PPAR γ 实现的。

为了进一步探讨罗格列酮在肺部微环境下对基质金属蛋白酶 9 表达的影响,通过支气管肺泡灌洗法得到了正常及慢支大鼠的肺泡巨噬细胞,使之与罗格列酮共同培养,结果显示将烟雾和内毒素刺激发生慢性支气管炎肺气肿改变的支气管肺泡灌洗液中的肺泡巨噬细胞与罗格列酮共同培养,可以看到 MMP-9 分泌明显受到抑制,这更进一步证明罗格列酮对烟雾和内毒素刺激后发生慢性支气管炎肺气肿改变的大鼠 MMP-9 的抑制作用,并提示这种抑制作用是通过支气管肺组织的某些固有细胞实现的。

综上所述,可以得出以下结论:①下调 MMP-9 基因转录进而抑制 MMP-9 蛋白分泌可能是罗格列酮对 COPD 的防治作用的机制之一;②基于罗格列酮在慢性阻塞性肺病实验模型中的防治作用,全面研究其药理作用,近而进行临床试验是可行的,并有广泛的应用前景。

参考文献

- 1 Yao PM, Buhler JM, d'Ortho MP, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase gelatinases A and B by cultured epithelial cells from hu-

- man bronchial explants [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(26): 15580-15589
- 2 Woerly G, Honda K, Loyens M, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation [J]. J Exp Med, 2003, 198(3): 411-421
- 3 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- 4 宋一平,崔德建,茅培英,等. 慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立及药物干预的影响 [J]. 军医进修学院学报, 2001, 22(2): 99-102
- 5 Shipley J. M, Doyle GA, Fliszar CJ, *et al.* The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats [J]. J Biol Chem, 1996, 271(8): 4335-4341
- 6 Hetzel M, Walcher D, Grüb M, *et al.* Inhibition of MMP-9 expression by PPAR γ activators in human bronchial epithelial cells [J]. Tharax, 2003, 58(9): 778-783
- 7 Lee CS, Kwon YW, Yang HM, *et al.* New mechanism of rosiglitazone to reduce neointimal hyperplasia: activation of glycogen synthase kinase-3 β followed by inhibition of MMP-9 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(4): 472-479
- 8 Lee SR, Kim HY, Hong JS, *et al.* PPAR γ agonist pioglitazone reduces matrix metalloproteinase-9 activity and neuronal damage after focal cerebral ischemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(1): 17-21
- 9 Ricote M, Li AC, Willson TM, *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation [J]. Nature, 1998, 391(6662): 79-82
- 10 Perez A, van Heeckeren AM, Nichols D, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in cystic fibrosis lung epithelium [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295(2): L303-L313

(收稿: 2010-12-18)

(修回: 2010-12-25)

针刺辅助治疗蛛网膜下腔出血继发性脑血管痉挛的临床研究

陈 为 刘平文 宁永江 柯雪红

摘 要 目的 观察针刺辅助治疗 SAH 继发性脑血管痉挛的作用。**方法** 40 例 SAH 继发性脑血管痉挛的患者随机分为对照组和治疗组,对照组 (20 例) 应用常规西医治疗,治疗组 (20 例) 在常规西医治疗基础上于入院后第 1 天起针刺水沟、百会、内关、合谷、四神聪、阴陵泉、阳陵泉 (时间为 30min, 1 次/天, 共 14 天), 观察两组病人的格拉斯哥昏迷计分 (Glasgow coma score, GCS)、

基金项目: 广东省科技计划项目 (93009)

作者单位: 510405 广州中医药大学第一附属医院

通讯作者: 柯雪红, 硕士生导师, 电子信箱: kexuehong@126.com