

· 论 著 ·

过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$  在大鼠气道黏液高分泌中的表达及意义\*张湘燕, 刘维佳<sup>△</sup>, 姚红梅, 冯端兴, 张程  
(贵州省人民医院呼吸内科, 贵阳 550002)

**摘要:**目的 探讨过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )在内毒素诱导大鼠气道黏液高分泌中的作用。方法 将 12 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组和内毒素组。采用 HE 染色和阿辛蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色进行气道上皮杯状细胞计数及检测气道黏液物质表达。用免疫组化染色及实时定量-PCR 检测气道及肺组织黏蛋白 5AC(MUC5AC)、PPAR $\gamma$  蛋白及 mRNA 表达。结果 内毒素组气道上皮杯状细胞积分、气道黏液物质、气道及肺组织 MUC5AC、PPAR $\gamma$  蛋白及 mRNA 表达均较对照组升高( $P < 0.05$ )。相关性分析显示,内毒素组气道及肺组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平与气道及肺组织 MUC5AC mRNA 表达水平呈负相关( $r = -0.829, P < 0.05$ )。结论 PPAR $\gamma$  参与了内毒素诱导气道黏液高分泌的发生。

**关键词:**过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$ ; 气道; 黏液高分泌; 内毒素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.006

中图分类号:R365.562

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2103-02

## Expression and significance of peroxisome proliferator activated receptor gamma in mucus hypersecretion in rat airway epithelium\*

ZHANG Xiang-yan, LIU Wei-jia<sup>△</sup>, YAO Hong-mei, et al.

(Department of Respiratory Medicine, People's Hospital of Guizhou Provincial, Guiyang, Guizhou 550002, China)

**Abstract: Objective** To investigate the influence and mechanism of peroxisome proliferator activated receptor gamma(PPAR $\gamma$ ) on mucus hypersecretion induced by endotoxin in rat airway. **Methods** 12 male SD rats were randomly divided into control group and endotoxin group. The count of epithelial goblet cell, the expression of mucin in bronchial tissues were examined by HE staining and alcian blue-periodic acid Schiff(AB-PAS) staining, respectively. Expressions of MUC5AC, PPAR $\gamma$  protein and mRNA were respectively measured with immunohistochemistry and real time PCR. **Results** Compared with control group, the count of epithelial goblet cell, the expression of mucin, MUC5AC, PPAR $\gamma$  protein and mRNA were increased in endotoxin group ( $P < 0.05$ ). The expression of PPAR $\gamma$  protein was negatively correlated with the expression of MUC5AC mRNA ( $r = -0.829, P < 0.05$ ). **Conclusion** PPAR $\gamma$  involves in the occurrence of airway mucus hypersecretion induced by endotoxin.

**Key words:** peroxisome proliferator activated receptor gamma; airway; mucous hypersecretion; endotoxin

呼吸道过度分泌黏液和黏液成分改变所致的黏稠度增加可引起气流阻塞和呼吸道反复感染。近年来研究证明,气道黏液高分泌增加了慢性气道疾病的住院率及病死率,是影响病情和预后的独立危险因素<sup>[1]</sup>。由于目前尚无治疗气道黏液高分泌特异有效的药物,因此进一步阐明气道黏液高分泌的发生机制,将有助于干预气道黏液调控的重要环节,有效控制气道黏液高分泌。本研究以大鼠为研究对象,探讨过氧化物酶体增植物激活受体  $\gamma$ (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )在内毒素诱导气道黏液高分泌中的作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 内毒素 E. coli 055 : B5(美国 Sigma 公司)、黏蛋白 5AC(MUC5AC)单克隆抗体(美国 Neomarkers 公司)、PPAR- $\gamma$  多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、免疫组化染色 SP 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)、RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(立陶宛 MBI 公司)、Taq DNA 聚合酶及 dNTP(美国 Promega 公司)等。

**1.2 动物模型制备及分组** 健康清洁级雄性 SD 大鼠 12 只,体质量 200~220 g,鼠龄 10~12 周,随机分为对照组和内毒素组。对照组以 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射,麻醉生效后切开颈部皮肤,暴露气管,向气管内注入生理盐水 100  $\mu$ L,

随后将大鼠直立,并轻轻晃动 1~2 min。内毒素组操作方法同前,参考 Yanagihara 等<sup>[2]</sup>的方法,气管内注入浓度为 2 g/L 的 LPS 100  $\mu$ L。

**1.3 标本收集** 气管注药后第 4 天,腹腔注射 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠,取其右中肺置于 4%甲醛中固定,剪取靠近中心气道的其余右肺组织置液氮中保存备用。

**1.4 气道上皮杯状细胞计数及黏液物质测定** 采用 HE 及阿辛蓝-过碘酸雪夫(AB-PAS)染色进行杯状细胞计数及检测气道黏液物质表达。于光镜( $\times 200$ )下采集 5 个完整的支气管横断面图像,计算杯状细胞占有上皮细胞的比例,并采用积分法进行半定量分析,杯状细胞占有上皮细胞比例: $< 5\%$ 为 0 分; $\geq 5\sim 25\%$ 为 1 分; $> 25\sim 50\%$ 为 2 分; $> 50\sim 75\%$ 为 3 分; $> 75\%$ 为 4 分。应用 IMAGE-Pro plus4.5 图像分析系统以相对着色面积表示气道黏液物质的表达。

**1.5 气道及肺组织 MUC5AC、PPAR- $\gamma$  蛋白测定** 用免疫组化链菌素过氧化物酶连接(SP)法检测气道及肺组织 MUC5AC、PPAR $\gamma$  表达。用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性细胞呈棕黄色。高倍镜下观察 MUC5AC 为胞浆显色,PPAR $\gamma$  为胞核显色。应用 IMAGE-Pro plus4.5 进行图像分析,以平均积分光密度为指标对免疫组化染色进行定量分析。

\* 基金项目:贵州省高层次人才科研条件补助经费资助项目(TZJF-2006-37)。 <sup>△</sup> 通讯作者,电话:13984883020; E-mail: weijia902@

**1.6 检测气道及肺组织 MUC5AC、PPAR $\gamma$  mRNA 表达** 采用实时定量 PCR(real-time PCR)检测 MUC5AC、PPAR $\gamma$  mRNA 表达。取靠近中心气道及右肺组织,用 Trizol 常规一步法提取气道及肺组织总 RNA。按 cDNA 合成试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中进行反应,逆转录合成第 1 条 cDNA,以此为模板分别加入 MUC5AC、PPAR $\gamma$ 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物及荧光染料在实时定量 PCR 仪上进行扩增,94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 20 s,50 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 40 s,共 40 次,72 °C 再延伸 5 min。MUC5AC 引物序列:上游引物 5'-TCC TTC TTG TCA ATG GTG TCT-3',下游引物 5'-ACC AGG TTC AGG ACA AGT AG-3',扩增长度为 151 bp。PPAR- $\gamma$  引物序列:上游引物 5'-GTC TCA CAA TGC CAT CAG GTT-3',下游引物 5'-TTC AGC TGG TCG ATA TCA CT-3',扩增长度为 90 bp。GAPDH 引物序列:上游引物 5'-CCT CAA GAT TGT CAG CAA T-3',下游引物 5'-CCA TCC ACA GTC TTC TGA GT-3',扩增长度为 141 bp。上述引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。将实时定量 PCR 仪检测荧光强度的时相统一设定在扩增反应退火期,采用 50 °C、30 s 作为退火期。测定各样品循环阈值(Ct 值),并与标准曲线进行比较,计算目的基因相对于管家基因的定量。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数比较采用方差分析,均数两两比较采用  $q$  检验。相关性分析采用 Pearson 法。以  $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 气道上皮杯状细胞及黏液物质的变化** 与对照组比较,内毒素组气道上皮杯状细胞积分及气道黏液物质的表达明显增加(表 1)。

表 1 两组大鼠气道上皮杯状细胞积分及黏液物质变化( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	杯状细胞积分(分)	AB-PAS 染色阳性相对着色面积(%)
对照组	0.50 $\pm$ 0.11	4.18 $\pm$ 0.70
内毒素组	2.73 $\pm$ 0.33*	56.49 $\pm$ 9.57*

\*:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

**2.2 气道及肺组织 MUC5AC、PPAR $\gamma$  蛋白及 mRNA 的表达** MUC5AC 阳性染色颗粒主要见于支气管黏膜上皮,部分见于黏膜下腺体(插图 I 图 1、2)。与对照组比较,内毒素组气道及肺组织 MUC5AC 蛋白及 mRNA 表达明显增加。PPAR $\gamma$  阳性染色颗粒主要见于气道上皮细胞、气道及肺泡周围浸润的炎症细胞。与对照组比较,内毒素组气道及肺组织 PPAR- $\gamma$  蛋白及 mRNA 表达增加(表 2)。

**2.3 相关性分析** 内毒素组气道及肺组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平与气道及肺组织 MUC5AC mRNA 表达水平呈负相关( $r = -0.829, P < 0.05$ )。

表 2 两组大鼠气道及肺组织 MUC5AC、PPAR $\gamma$  蛋白及 mRNA 的表达( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	MUC5AC		PPAR $\gamma$	
	平均积分光密度	相对拷贝数	平均积分光密度	相对拷贝数
对照组	1785.00 $\pm$ 236.05	2.42 $\pm$ 0.68	825.84 $\pm$ 107.02	2.23 $\pm$ 0.53
内毒素组	3998.95 $\pm$ 513.13*	39.03 $\pm$ 9.43*	1121.08 $\pm$ 202.53*	6.00 $\pm$ 1.44*

\*:与对照组比较, $P < 0.05$ 。

## 3 讨 论

气道黏液主要由气道上皮杯状细胞、黏膜下腺体分泌,适量黏液分泌对保持黏膜湿润、防御病原微生物和有害物质的侵入及维持黏液纤毛清除功能具有重要作用。黏蛋白(mucin, MUC)质和量的变化对黏液的黏弹性起主要作用,其中由杯状细胞产生的 MUC5AC 不管是在健康个体还是气道疾病患者都是气道分泌黏液中最主要的黏蛋白成分<sup>[3]</sup>。MUC 过度表达、气道上皮杯状细胞、黏液分泌细胞增生与化生以及贮存的黏蛋白分泌增多是气道黏液高分泌发生的主要病理机制。许多因素,如空气污染物、细菌成分、细胞因子、炎症介质等都可增加气道上皮细胞 MUC 表达,导致气道黏液高分泌。由于细菌感染是慢性气道疾病发生、发展和反复加重的重要因素,尤其革兰阴性菌是最主要的致病菌之一,因此感染对 MUC 表达信号通路的调控倍受关注。

PPAR $\gamma$  于 1990 年由 Issemann 和 Green<sup>[4]</sup> 首先从小鼠肝脏克隆出来,是一类由致密分子构成依赖配体激活的核转录因子,主要功能是与配体结合后通过对靶基因转录的调节引起蛋白合成和使生物学效应发生改变。早期研究认为,PPAR $\gamma$  的功能仅限于调控脂肪细胞分化、脂质和糖代谢。近年来研究发现,PPAR $\gamma$  除具有调节脂肪代谢、糖代谢、细胞分化凋亡等生物学效应外,还可能参与炎症控制并具有免疫调节作用<sup>[5]</sup>。对呼吸系统的研究发现,气道上皮、支气管黏膜下层和气道平滑

肌均有 PPAR $\gamma$  表达,可能与慢性气道炎症有关<sup>[6-7]</sup>。Birrel 等<sup>[8]</sup> 对大鼠预先给予 PPAR $\gamma$  激动剂——罗格列酮处理,能明显减少内毒素(LPS)刺激引起的气道中性粒细胞聚集和多种细胞因子的释放。在哮喘的动物模型中,雾化吸入罗格列酮后可使 IL-2、IL-4 和 IFN- $\gamma$  等细胞因子产生减少,肺部炎症减轻,黏液分泌减少<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,在正常大鼠气道及肺组织有少量 PPAR $\gamma$  蛋白及 mRNA 表达,气管内注射 LPS 后气道上皮杯状细胞、气道黏液物质、气道及肺组织 MUC5AC 蛋白及 mRNA 表达明显增加,机体出现气道黏液高分泌改变,同时气道 PPAR $\gamma$  蛋白及 mRNA 表达亦有所增加。表明 LPS 作为革兰阴性细菌细胞壁外膜的主要结构成分,侵入机体后可刺激气道上皮杯状细胞数目增多,上调气道上皮细胞 MUC 基因 MUC5AC 的表达,促进 MUC 的合成,而 PPAR $\gamma$  参与了细菌诱导气道黏液高分泌的发生。进一步的相关性分析显示,气道及肺组织 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平与气道及肺组织 MUC5AC mRNA 表达呈负相关,提示 PPAR $\gamma$  对 LPS 诱导的气道黏液高分泌可能存在负性调控作用,但具体的调控机制是否与 PPAR $\gamma$  的抗炎作用有关尚待深入研究。

## 参考文献:

- [1] Groneberg DA, Wagner U, Chung KF. Mucus and fatal asthma[J]. Am J Med, 2004, 116(1):66. (下转第 2107 页)

管通透性促进腹水形成。

免疫组化结果表明, PVL 组大鼠肠系膜 VEGF 染色呈强阳性, 而 SO 组则呈弱阳性, 两组主要在血管内皮细胞胞浆中表达。由于在预实验中, 作者观察到术后第 3 天大鼠腹水形成总量和腹水 VEGF 含量最高, 故只选择术后第 3 天大鼠肠系膜作 VEGF mRNA 分析。结果表明, 术后第 3 天 PVL 组大鼠肠系膜组织 VEGF mRNA 表达明显高于 SO 组, 与 Geerts 等<sup>[4]</sup> 研究结果一致。国外学者通过复制门静脉高压小鼠模型也得出了同样结果<sup>[5-6]</sup>。业已证实, VEGF 是强有力的血管生成因子, 可以引起血管内皮细胞分裂增生并形成新生血管, 减少细胞凋亡, 促进细胞增生, 对不同器官损伤均起到一定保护作用<sup>[7-8]</sup>。但研究发现 VEGF 促血管再生的同时亦可使血管通透性增高, 导致液体渗出增加。

有资料表明, 沙利度安通过降低  $TNF_{\alpha}$  而下调 VEGF 表达, 通过产生氢氧基等发挥抗血管新生作用<sup>[9-11]</sup>。本研究结果显示, 采用沙利度安腹腔注射 3 d 后大鼠腹水形成总量与 PVL 组相比明显减少; 同时肠系膜组织 VEGF mRNA 表达亦明显降低。作者推测沙利度安可能通过下调 VEGF 表达来减少腹水形成。Lopez-Talavera 等<sup>[12]</sup> 研究显示沙利度安可改善门静脉高压大鼠高动力内脏循环状态, 并可降低门静脉压力。

综上所述, 门静脉高压可增加由于渗透性改变所致大鼠腹水形成, VEGF 高表达可能与大鼠腹水形成有关, 抑制 VEGF 的活性可能是治疗肝硬化患者顽固性腹水的一种新的治疗策略。

(衷心感谢日本福岡大学医学部消化内科向坂彰太郎教授对本文的大力支持和帮助)

#### 参考文献:

- [1] Moore KP, Aithal GP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis[J]. *Gut*, 2006, 55(Suppl 6): S1.
- [2] 赵永忠, 王波, 王天才, 等. 血管内皮生长因子在大鼠门脉高压胃病中的作用初探[J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(3): 189.
- [3] Groszmann RJ, Vorobioff J, Riley E. Splanchnic hemodynamics in portal-hypertensive rats: measurement with gamma-labeled microspheres[J]. *Am J Physiol*, 1982, 242

(2): 156.

- [4] Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study[J]. *Liver Int*, 2006, 26(7): 889.
- [5] Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, et al. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(3): 886.
- [6] Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, et al. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1): 98.
- [7] 董晓灵, 王曙光, 张玉君, 等. VEGF 对大鼠 50% 减体积肝脏移植术后肝再生的影响[J]. *重庆医学*, 2008, 37(9): 959.
- [8] 郎明健, 曾秋棠, 陈波, 等. VEGF 基因转染乳鼠心肌细胞移植治疗心梗的研究[J]. *重庆医学*, 2005, 34(11): 1669.
- [9] Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications[J]. *Leukemia*, 2001, 15: 1950.
- [10] Sauer H, Gunther J, Hescheler J, et al. Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 151.
- [11] Andr'e L M, Darid RF, Bronya S, et al. Thalidomide and thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro[J]. *J Neuro Oncol*, 1999, 43(2): 109.
- [12] Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, et al. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats[J]. *Hepatology*, 1996, 23: 1616.

(收稿日期: 2010-01-03 修回日期: 2010-06-17)

(上接第 2104 页)

- [2] Yanagihara K, Seki M, Cheng PW. Lipopolysaccharide induces mucus cell metaplasia in mouse lung[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(1): 66.
- [3] Young HW, Williams OW, Chandra D, et al. Central role of MUC5AC expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 37(3): 273.
- [4] Issemann I, Green S. Activation of a number of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. *Nature*, 1990, 347: 645.
- [5] Lee KS, Park SJ, Kim SR, et al. Modulation of airway remodeling and airway inflammation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma[J]. *J Immunol*, 2006, 177(8): 5248.
- [6] Wang AC, Dai X, Luu B, et al. Peroxisome proliferators-

activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24: 688.

- [7] Ward JE, Tan X. Peroxisome proliferator activated receptor ligands as regulators of airway inflammation and remodelling in chronic lung disease[J]. *PPAR Res*, 2007, 2007: 14983.
- [8] Birrel MA, Patel HJ, McCluskie K, et al. PPAR-gamma agonists as therapy for diseases involving airway neutrophilia[J]. *Eur Respir J*, 2004, 24: 18.
- [9] Honda K, Marquillies P, Capron M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113: 882.

(收稿日期: 2009-12-17 修回日期: 2010-01-15)