

· 论 著 ·

## 罗格列酮拮抗博莱霉素致大鼠肺纤维化的实验研究\*

刘维佳, 饶珊珊, 张湘燕, 刘琳  
(贵州省人民医院呼吸内科, 贵阳 550002)

**摘要:**目的 探讨罗格列酮抑制肺纤维化的作用及其机制。方法 将 24 只大鼠分为生理盐水对照组、罗格列酮对照组、博莱霉素组、罗格列酮干预组, 予博莱霉素诱导大鼠肺纤维化。HE 染色和 Masson 染色行病理学检查; 试剂盒检测肺组织中羟脯氨酸含量; 应用 Western blot 及荧光定量实时逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 的表达; 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TGF- $\beta_1$  浓度。结果 博莱霉素气管内注入后, Ashcroft 评分, 肺组织胶原沉积、羟脯氨酸含量, BALF 中 TGF- $\beta_1$  水平及肺组织中 TGF- $\beta_1$ 、PPAR $\gamma$ 、MMP-9 表达较生理盐水对照组增加; 给予罗格列酮干预后, 除 PPAR $\gamma$  表达进一步增加外, 上述指标均下降。博莱霉素组 PPAR $\gamma$  蛋白表达水平与 TGF- $\beta_1$  mRNA、MMP-9 mRNA 表达水平分别呈负相关。结论 罗格列酮对博莱霉素诱导的肺纤维化进程有拮抗作用, 其具体机制可能与上调 PPAR $\gamma$  蛋白表达, 抑制 TGF $\beta_1$ 、MMP-9 mRNA 转录有关。

**关键词:** 过氧化物酶体增殖物激活受体; 肺纤维化; 转化生长因子  $\beta$ ; 基质金属蛋白酶类; 罗格列酮

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)34-3436-03

## Experimental study of inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by rosiglitazone\*

Liu Weijia, Rao Shanshan, Zhang Xiangyan, Liu Lin

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

**Abstract:** Objective To explore the role of rosiglitazone in inhibiting pulmonary fibrosis and its mechanism. Methods 24 rats were divided into physiological saline control group, rosiglitazone control group, bleomycin group and rosiglitazone interference group. bleomycin was adopted to induce pulmonary fibrosis in rats. Hematoxylin and eosin (HE) staining and Masson staining were used to perform pathological examine. Kit was used to measure hydroxyproline content of pulmonary tissue. Western blot and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) were employed to probe expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect the concentration of TGF- $\beta_1$  in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Results After intratracheal infusion of bleomycin, Ashcroft score, collagen deposition and hydroxyproline content of pulmonary tissue, level of TGF- $\beta_1$  in BALF, and expression of TGF- $\beta_1$ , PPAR $\gamma$ , MMP-9 in pulmonary tissue were increased compared to those in physiological saline group. However, the indicators above were decreased after rosiglitazone interference, except PPAR $\gamma$  expression showing further increased. Levels of PPAR $\gamma$  protein expression had negative correlation to levels of TGF- $\beta_1$  and MMP-9 mRNA expression. Conclusion Rosiglitazone shows antagonism against bleomycin-induced pulmonary fibrosis which mechanism probably related to up-regulation of PPAR $\gamma$  protein expression and inhibition of TGF- $\beta_1$  and MMP-9 mRNA transcription.

**Key words:** peroxisome proliferator-activated receptors; pulmonary fibrosis; transforming growth factor beta; matrix metalloproteinases; rosiglitazone

罗格列酮是过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferators activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 的高效激动剂, 常作为胰岛素增敏剂用于糖尿病治疗。但近年发现, PPAR $\gamma$  激动剂在炎症反应、免疫调节中也发挥重要作用<sup>[1-4]</sup>, 参与某些器官纤维化进程<sup>[5-6]</sup>。本研究以大鼠为研究对象, 探讨 PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮在肺纤维化中的作用。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 主要试剂: PPAR $\gamma$  抗体、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 抗体及转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )、酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司生产, 罗格列酮由葛兰素史克有限公司生产, TaqDNA 聚合酶及 dNTP 由美国 Promega 公司生产, 羟脯

氨酸测试盒由南京建成生物工程公司生产。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及模型制备** 雄性 SD 大鼠 24 只, 鼠龄 10~12 周, 随机分为生理盐水对照组、罗格列酮对照组、博莱霉素组和罗格列酮干预组, 每组各 6 只。博莱霉素组及罗格列酮干预组按 5 mg/kg 向气管内注入 10 g/L 的博莱霉素, 生理盐水对照组及罗格列酮对照组气管内注入生理盐水 100  $\mu$ L。罗格列酮对照组及罗格列酮干预组于气管内注射当天开始以罗格列酮 4 mg/kg 灌胃, 1 次/天, 连续灌胃 28 d。气管内注射后第 28 天, 留取右肺。左肺行支气管肺泡灌洗。

**1.2.2 肺组织病理学检查** 组织切片 HE 染色后, 在光镜下行 Ashcroft 评分。组织切片行 Masson 染色后, 测定胶原蓝色阳染的平均积分光密度 (IOD 值)。

\* 基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目 (黔科合 J 字 20082182 号); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金资助项目 (黔省专合字 200762 号)。

**1.2.3 肺组织羟脯氨酸含量测定** 采用碱水解法,按试剂盒说明操作。

**1.2.4 支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 TGF-β<sub>1</sub> 的定量检测** 采用双抗体夹心 ELISA 法,按试剂盒说明操作,用酶标仪在 492 nm 处测吸光值,计算 TGF-β<sub>1</sub> 含量。

**1.2.5 Western blot 检测 PPARγ、MMP-9 表达** 取肺组织 100 mg,加入组织细胞裂解液及蛋白酶抑制剂充分匀浆,加入 10% 乙基苯基聚乙二醇 500 μL,离心取上清液。取 15 uL 蛋白加样于 12% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后分离胶与硝酸纤维素滤膜叠放于半干转移仪电转。将硝酸纤维素滤膜依次放入含有一抗、二抗的杂交袋中。用 ECL 染色。使用图像分析软件测定目的条带和内对照 Actin 的光密度值,分别以 PPARγ、MMP-9 与 Actin 光密度值的比值表示 PPARγ、MMP-9 的相对含量。

**1.2.6 实时荧光定量逆转录 (real time RT)-PCR 法检测肺组织 MMP-9、TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达** 取肺组织用 Trizol 一步法提取总 RNA。按 cDNA 合成试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中逆转录合成第 1 条 cDNA,以此为模板分别加入 MMP-9、TGF-β<sub>1</sub>、GAPDH 引物及荧光染料,在荧光定量 PCR 仪上进行扩增。采用 50 °C、30 s 作为退火期。测定各样品的循环阈值,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。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 进行统计分析。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 肺组织病理学检查** HE 染色光镜下观察,生理盐水对照组及罗格列酮对照组肺组织结构清晰,无明显充血、出血,炎性浸润和纤维化均不明显。博莱霉素组肺泡间隔明显增宽,肺组织结构破坏严重、纤维化明显、肺泡腔变形、偶见炎性细胞浸润,局部肺实变;罗格列酮干预组上述表现程度较轻,见插图 1~3。组织切片经 Masson 染色后细胞质、肌纤维和红细胞呈红色,胶原呈蓝色,见插图 4~6。各组 Ashcroft 评分及阳染胶原 IOD 值比较见表 1。

**表 1 Ashcroft 评分及阳染胶原 IOD 值比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )**

组别	Ashcroft 评分	阳染胶原 IOD 值
生理盐水对照组	0.43 ± 0.17	196.51 ± 28.02
罗格列酮对照组	0.52 ± 0.18	193.89 ± 18.92
博莱霉素组	5.76 ± 0.55*	662.57 ± 72.28*
罗格列酮干预组	3.73 ± 0.68*△	344.83 ± 43.31*△

\*: *P* < 0.01, 与生理盐水对照组、罗格列酮对照组比较;△: *P* < 0.01, 与博莱霉素组比较。

**表 2 各组羟脯氨酸含量、TGF-β<sub>1</sub> 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )**

组别	羟脯氨酸含量 (μg/g)	TGF-β <sub>1</sub> (pg/mL)
生理盐水对照组	252.15 ± 38.35	63.68 ± 10.03
罗格列酮对照组	246.32 ± 35.07	69.63 ± 10.48
博莱霉素组	590.45 ± 61.00*	299.05 ± 37.42*
罗格列酮干预组	337.42 ± 44.96*△	111.00 ± 23.57*△

\*: *P* < 0.01, 与生理盐水对照组、罗格列酮对照组比较;△: *P* < 0.01, 与博莱霉素组比较。

**2.2 肺组织中羟脯氨酸含量及 BALF 中 TGF-β<sub>1</sub> 水平** 博莱

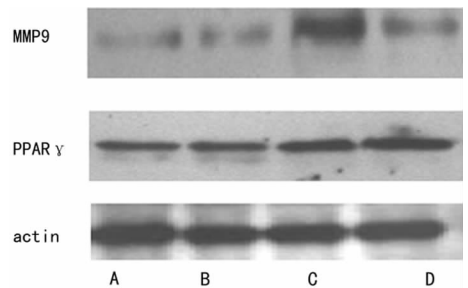
霉素组肺组织中羟脯氨酸含量及 BALF 中 TGF-β<sub>1</sub> 含量较生理盐水对照组明显升高,罗格列酮干预后较博莱霉素组明显下降 (*P* < 0.01), 见表 2。

**2.3 肺组织 PPARγ、MMP-9 蛋白表达** Western blot 检测结果示博莱霉素组肺组织 PPARγ 及 MMP-9 蛋白水平较生理盐水对照组增加,罗格列酮干预后 PPARγ 水平表达进一步增加,而 MMP-9 水平较博莱霉素组明显下降 (*P* < 0.01), 见图 7、表 3。

**表 3 肺组织 PPARγ、MMP-9 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )**

组别	PPARγ	MMP-9
生理盐水对照组	0.27 ± 0.07	0.14 ± 0.04
罗格列酮对照组	0.26 ± 0.08	0.15 ± 0.02
博莱霉素组	0.35 ± 0.04*	0.41 ± 0.04**
罗格列酮干预组	0.51 ± 0.09**▲	0.24 ± 0.04**▲

\*: *P* < 0.05, \*\*: *P* < 0.01, 与生理盐水对照组罗格列酮对照组比较;▲: *P* < 0.01, 与博莱霉素组比较。



A: 生理盐水对照组; B: 罗格列酮对照组; C: 博莱霉素组; D: 罗格列酮干预组。

**图 7 肺组织 PPARγ、MMP-9 Western 印迹结果图**

**2.4 肺组织 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 mRNA 表达** 荧光定量 RT-PCR 检测示博莱霉素组 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 表达较生理盐水对照组明显升高,罗格列酮干预后 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 水平较博莱霉素组明显下降 (*P* < 0.01), 见表 4。

**表 4 肺组织 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )**

组别	TGF-β <sub>1</sub>	MMP-9
生理盐水对照组	2.29 ± 0.42	1.71 ± 0.33
罗格列酮对照组	2.31 ± 0.63	1.75 ± 0.29
博莱霉素组	42.57 ± 5.46*	13.17 ± 3.30*
罗格列酮干预组	13.51 ± 3.20*△	7.47 ± 1.84*△

\*: *P* < 0.01, 与生理盐水对照组、罗格列酮对照组比较;△: *P* < 0.01, 与博莱霉素组比较。

**2.5 各变量间的相关性分析** 相关性分析显示博莱霉素组大鼠肺组织 PPARγ 蛋白水平与 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 mRNA 表达呈负相关,相关系数 *r* 值分别为 -0.865、-0.863 (均 *P* < 0.05)。

**3 讨 论**

PPARγ 与脂肪细胞分化、胰岛素抵抗、糖代谢、炎症及肿瘤发生等多种生物过程有关。罗格列酮等是目前研究最多的 PPARγ 合成配体。体外研究发现,原代肺成纤维细胞中 PPARγ 高表达;肺泡上皮细胞,支气管上皮细胞及细胞株 BE-AS2B、A549 和 H292 也表达 PPARγ<sup>[7-8]</sup>。PPARγ 及其配体在慢性阻塞性肺疾病、哮喘、气道黏液高分泌中具有免疫调节和抗炎作用<sup>[1-3]</sup>。

器官纤维化以细胞外基质大量沉积和广泛的组织重塑为主要改变,不同器官发生纤维化的具体机制有差别,但炎症损伤和修复是共同的过程。PPAR $\gamma$  基因缺陷的大鼠结扎胆管会导致严重的肝纤维化,而补充 PPAR $\gamma$  能减轻肝星状细胞激活和肝纤维化程度<sup>[9]</sup>。在慢性高血压负荷小鼠模型中,PPAR $\gamma$  激动剂能降低 MMP 和胶原合成,减轻高血压所致的左心室肥厚和心肌纤维化,逆转心室重塑<sup>[10]</sup>。肺炎反应和增生性改变是肺纤维化的重要病理生理改变。在体外实验中,PPAR $\gamma$  激动剂能抑制趋化因子诱导的嗜酸性粒细胞、单核巨噬细胞的趋化、嗜酸性粒细胞依赖的细胞毒作用,同时还能抑制促炎介质释放,从而减轻炎症程度<sup>[11-12]</sup>。对呼吸系统的研究显示 PPAR $\gamma$  活化后可以抑制中性粒细胞浸润、减少炎症介质的释放、减轻肺组织损伤<sup>[13-14]</sup>。PPAR $\gamma$  激动剂能抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的肺成纤维细胞向肌成纤维细胞分化<sup>[15]</sup>。在本研究中大鼠气管内注射博莱霉素后肺泡间隔明显增宽,结构破坏严重、胶原沉积,纤维化明显,Ashcroft 评分及肺组织羟脯氨酸含量明显升高,肺纤维化模型成立。予罗格列酮干预后,肺组织损伤减轻,胶原沉积减少,羟脯氨酸含量下降,Ashcroft 评分减少,肺纤维化程度明显减轻,提示罗格列酮对肺纤维化过程有拮抗作用。但罗格列酮在肺纤维化中的负性调控作用是否与抗炎作用有关有待进一步研究。在本研究中还观察到博莱霉素气管内注射后肺组织中 TGF- $\beta_1$  及 MMP-9 表达增加。TGF- $\beta_1$  主要由气道平滑肌细胞、肺泡上皮细胞和巨噬细胞产生,是重要的促肺纤维化细胞因子之一,在肺纤维化中促进胶原基因表达,促进细胞外基质合成与沉积。MMP-9 是机体内细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)降解的关键酶,主要降解 IV 型胶原。对特发性肺纤维化患者的肺成纤维细胞进行体外培养,发现其具有较正常者成纤维细胞不同的是显著增高了 MMP-9 及 TGF- $\beta_1$  的分泌能力。在本研究中大鼠给予罗格列酮干预后,PPAR $\gamma$  高表达,同时 BALF 中 TGF- $\beta_1$  蛋白水平、肺组织中 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达及肺组织中 MMP-9 蛋白水平、mRNA 表达均降低,相关性分析提示 PPAR $\gamma$  蛋白水平与 TGF- $\beta_1$  及 MMP-9 mRNA 表达分别呈负相关,提示罗格列酮可能通过上调 PPAR $\gamma$  表达,从而抑制 TGF- $\beta_1$  及 MMP-9 的转录,降低羟脯氨酸含量及胶原沉积等多个途径,最终导致肺纤维化程度减轻。

综上所述,罗格列酮能延缓博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化进程,其具体机制可能与上调 PPAR $\gamma$  表达,抑制 TGF- $\beta_1$  及 MMP-9 的转录有关。PPAR $\gamma$  配体对肺纤维化治疗可能有潜在的临床应用价值。

#### 参考文献:

- [1] Belvisi MG, Mitchell JA. Targeting PPAR receptors in the airway for the treatment of inflammatory lung disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(4):994-1003.
- [2] Belvisi MG, Hele DJ. Peroxisome proliferator-activated receptors as novel targets in lung disease [J]. *Chest*, 2008, 134(1):152-157.
- [3] 张湘燕,刘维佳,姚红梅,等.过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  在大鼠气道黏液高分泌中的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2010, 39(16):2103-2104.
- [4] 李华波.普伐他汀与罗格列酮联合作用对巨噬细胞 ABCA1 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(7):777-779.
- [5] Yang L, Stimpson SA, Chen L, et al. Effectiveness of the PPAR $\gamma$  agonist, GW570, in liver fibrosis [J]. *Inflamm Res*, 2010, 59(12):1061-1071.
- [6] Higashi K, Oda T, Kushiyama T, et al. Additive antifibrotic effects of pioglitazone and candesartan on experimental renal fibrosis in mice [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2010, 15(3):327-335.
- [7] Pawliczak R, Han C, Huang XL, et al. 85-kDa cytosolic phospholipase A2 mediates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in human lung epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36):33153-33163.
- [8] Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533(1/3):101-109.
- [9] Yang L, Chan CC, Kwon OS, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291(5):902-911.
- [10] Henderson BC, Sen U, Reynolds C, et al. Reversal of systemic hypertension-associated cardiac remodeling in chronic pressure overload myocardium by ciglitazone [J]. *Int J Biol Sci*, 2007, 3(6):385-392.
- [11] Wang W, Zhu Z, Zhu B, et al. Pioglitazone attenuates allergic inflammation and induces production of regulatory T lymphocytes [J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2010, 24(6):454-458.
- [12] Bassaganya-Riera J, Song R, Roberts PC, et al. PPAR-gamma activation as an anti-inflammatory therapy for respiratory virus infections [J]. *Viral Immunol*, 2010, 23(4):343-352.
- [13] Singh S, Loke YK, Furberg CD. Long-term use of thiazolidinediones and the associated risk of pneumonia or lower respiratory tract infection: systematic review and meta-analysis [J]. *Thorax*, 2011, 66(5):383-388.
- [14] Neri T, Armani C, Pegoli A, et al. Role of NF-kappaB and PPAR-gamma in lung inflammation induced by monocyte-derived microparticles [J]. *Eur Respir J*, 2011, 37(6):1494-1502.
- [15] Lin Q, Fang LP, Zhou WW, et al. Rosiglitazone inhibits migration, proliferation, and phenotypic differentiation in cultured human lung fibroblasts [J]. *Exp Lung Res*, 2010, 36(2):120-128.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-12)