

# 罗格列酮治疗脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的实验研究<sup>\*</sup>

陕西省人民医院 王贵佐 陈芬芬<sup>1</sup> 李惟捷 史少剑<sup>2</sup> 刘璐 韩冬<sup>\*</sup>, 西安 710068

**摘要** 目的:探讨激活过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 对脂多糖 (LPS) 诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及可能的机制。方法:将 6~8 周的 BALB/c 小鼠 15 只随机分成 3 组,每组 5 只。对照组小鼠气管内滴注无菌磷酸缓冲盐溶液 60  $\mu$ L,作用 24 h;LPS 模型组小鼠气管内滴注 1 mg/mL LPS 60  $\mu$ L,作用 24 h;罗格列酮治疗组小鼠在气管内滴注 LPS 前 24 h 和 0.5 h 给予罗格列酮 (PPAR $\gamma$  激动剂) 灌胃 (20 mg/kg) 预处理,再气管内滴注 1 mg/mL LPS 60  $\mu$ L,作用 24 h。观察各组小鼠肺组织病理组织学变化,支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中炎症细胞总数及中性粒细胞变化,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 BALF 中促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和高迁移率族蛋白-1 (HMGB1) 的浓度,免疫印迹法 (Western Blot) 检测肺组织中晚期糖化终产物受体 (RAGE) 蛋白表达变化。结果:与对照组比较,在 LPS 诱导的小鼠模型中,组织病理学显示大量炎性细胞浸润,肺组织结构明显被破坏,BALF 内细胞总数、中性粒细胞数、促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  显著升高 (均  $P < 0.01$ ),而采用罗格列酮预处理小鼠明显抑制 LPS 诱发的上述改变。与对照组比较,LPS 模型组小鼠支气管肺泡灌洗液中 HMGB1 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ),Western Blot 检测肺组织匀浆 RAGE 的表达明显增加 ( $P < 0.05$ ),而罗格列酮预处理小鼠后,LPS 诱发的 HMGB1/RAGE 的上调被显著抑制。结论:激活 PPAR $\gamma$  可能通过抑制 HMGB1/RAGE 信号通路对 LPS 诱导急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征起保护作用。

**关键词** 罗格列酮; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ; 高迁移率族蛋白-1; 晚期糖化终产物受体; 急性肺损伤  
**中图分类号** R563 **文献标识码** A **DOI** 10.11768/nkjwzzzz20200519

**Experimental study of rosiglitazone in the treatment of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice** WANG Gui-zuo, CHEN Fen-fen<sup>1</sup>, LI Wei-jie, SHI Shao-jian<sup>2</sup>, LIU Lu, HAN Dong<sup>\*</sup>. Shanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

**Abstract** Objective: To investigate the protective effect and possible mechanism of activation of PPAR- $\gamma$  on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) in mice. Methods: Fifteen 6-8-week male BALB/c mice were randomly divided into three groups. The control group was given sterile PBS (60  $\mu$ L) only intratracheally. LPS model group was instilled intratracheally with 60  $\mu$ L of LPS (1 mg/mL) for 24 h. The mice in rosiglitazone-treated group were treated with twice rosiglitazone (30 mg/kg) orally at 24 h and 30 min separately before stimulation with LPS (1 mg/mL, 60  $\mu$ L) instilled intratracheally for 24 h. Twenty-four h after administration of LPS, the histopathological changes of lung tissue, and the number of total cells and neutrophils in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in each group were observed. The concentrations of TNF- $\alpha$  and HMGB1 in BALF were measured by ELISA. The expression of RAGE in lung tissue was detected by Western blotting. Results: As compared with the control group, number of inflammatory cells was significantly increased, lung tissue structure was significantly damaged, the total number of cells and neutrophils in BALF increased significantly, and TNF- $\alpha$  level in BALF increased significantly (all  $P < 0.01$ ). It was suggested that rosiglitazone exhibited protective effects on LPS-induced ALI in mice. As compared with the control group, the level of HMGB1 in BALF ( $P < 0.01$ ) and the expression of RAGE in lung tissue ( $P < 0.05$ ) were significantly increased in LPS model group, suggesting that HMGB1/RAGE signaling pathway was involved in the pathogenesis of ALI. However, the up-regulation of HMGB1/RAGE induced by LPS was significantly inhibited by rosiglitazone pretreatment in mice. Conclusions: This study suggests that activation of PPAR $\gamma$  by rosiglitazone protects LPS-induced ALI/ARDS by inhibiting HMGB1/RAGE signaling pathway.

**Key words** Rosiglitazone; PPAR $\gamma$ ; HMGB1; RAGE; Acute lung injury

<sup>\*</sup>基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (No:2020JM-656);陕西省中医药管理局课题资助项目 (No:2019-ZZ-JC037)

<sup>1</sup>西安交通大学第二附属医院

<sup>2</sup>华阴市人民医院

<sup>\*</sup>通信作者:韩冬, E-mail: sesory@yeah.net

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 发病机制包括炎症/抗炎的失衡和氧化/抗氧化的失衡<sup>[1, 2]</sup>。高迁移率族蛋白-1 (high mobility group box-1, HMGB1) 是促炎性细胞因子<sup>[3]</sup>。HMGB1 与晚期糖化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 结合后可以激活 NF- $\kappa$ B 等多种信号通路, 进一步引起促炎介质的产生和分泌, 另外还可促进 HMGB1 浓度升高和 RAGE 表达增加<sup>[4]</sup>。研究发现 HMGB1/RAGE 信号通路参与 ALI/ARDS 发病机制<sup>[5]</sup>。

激活过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR $\gamma$ ) 可发挥抗炎和免疫调节的作用<sup>[6]</sup>。PPAR $\gamma$  的配体包括内源性配体和合成性配体, 如罗格列酮等<sup>[6]</sup>。研究发现激活 PPAR $\gamma$  对包括 ALI 在内的多种动物模型亦具有潜在的保护作用<sup>[7]</sup>。然而激活 PPAR $\gamma$  能否抑制 HMGB1/RAGE 信号通路, 并且抑制 ALI 的发病尚待研究。本研究应用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 ALI 动物模型, 评估罗格列酮激活 PPAR $\gamma$  对炎症反应尤其是 HMGB1/RAGE 信号通路的作用。

## 材料与方法

**材料和试剂** BALB/c 雄性小鼠 [6 ~ 8 周龄, SYXK(陕)2016-006] 由陕西省人民医院中心实验室提供。罗格列酮片 (批号 10045192, 国药准字 H20020475) 购于 GlaxoSmithKline。LPS, *escherichia coli* 055:B5 购于 Sigma-Aldrich。兔抗鼠 RAGE 一抗购于美国 Cell signaling technology。TNF- $\alpha$  及 HMGB1 测定试剂盒为 R&D Systems ELISA 试剂盒。RIPA 裂解液由武汉博士德生物工程有限公司提供。

### 方法

1. 模型制作和实验分组。6 ~ 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠 (20 ~ 25 g) 15 只随机分成 3 组, 每组 5 只。对照组小鼠气管内滴注无菌 PBS 60  $\mu$ L, 作用 24 h; LPS 模型组小鼠气管内滴注 1 mg/mL LPS 60  $\mu$ L, 作用 24 h; 罗格列酮治疗组小鼠气管内滴注 LPS 前 24 h 和 0.5 h 均给予罗格列酮灌胃 (20 mg/kg), 再气管内滴注 1 mg/mL LPS 60  $\mu$ L 作用 24 h; 小鼠均在陕西省人民医院中心实验室 SPF 级动物房饲养, LPS 气道滴注 24 h 后处死小鼠。

2. 收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 及肺组织样本。造模 24 h 后用

10% 水合氯醛 0.8 mL/100g 腹腔注射处死 BALB/c 小鼠, 用 4 $^{\circ}$ C 预冷的无菌磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 0.7 mL 进行支气管肺泡灌洗, 重复灌洗 3 次, 支气管肺泡灌洗液的回收率达 80%。BALF 在 4 $^{\circ}$ C, 1000 转/min 离心 10 min。分别收集上清和沉淀, BALF 上清液在 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。细胞沉淀用无菌 PBS 重新重悬, 利用细胞计数板进行细胞计数。取细胞沉淀涂片, 晾干后进行瑞氏染色, 进行中性粒细胞计数。支气管肺泡灌洗后分离右肺组织并在 -80 $^{\circ}$ C 保存。

3. 肺组织病理学检查。取出分离后的左肺组织利用 10% 中性缓冲甲醛液固定, 固定后对左肺组织进行脱水, 透明石蜡包埋后切片 (5  $\mu$ m), 进行苏木精-伊红 (HE) 染色, 观察肺组织病理学改变。

4. 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测支气管肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  和 HMGB1 浓度。采用 ELISA 法检测支气管肺泡灌洗液上清中 TNF- $\alpha$  和 HMGB1 的浓度。所有操作均严格按照 R&D Systems 试剂盒说明书进行。

5. 免疫印迹法 (Western Blot) 检测 RAGE 表达。精密称取各组小鼠肺组织, 根据 RIPA 裂解液使用说明书制备肺组织匀浆, 肺组织与 RIPA 裂解液的比例为 1 mg:7.5  $\mu$ L, 用玻璃匀浆器上下、旋转充分碾磨。在冰上裂解 1 h 后, 14 000 g, 离心 20 min, 取上清, 利用 Western blotting 检测各组小鼠肺组织晚期 RAGE 表达变化, 应用 GAPDH 作为内参校正。

**统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计学软件, 符合正态分布的数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 非正态分布数据经正态转换后再进行统计学处理, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

**激活 PPAR $\gamma$  对肺组织病理改变的影响** 与对照组比较, LPS 模型组小鼠肺组织病理显示, 肺组织出血、水肿, 炎症细胞大量浸润, 正常的肺组织结构被破坏。而在 LPS 给药前 24 h 和 0.5 h 应用罗格列酮预处理后, 上述病理改变明显减轻, 见图 1。

**PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮对小鼠肺组织浸润炎症细胞数的影响** 与对照组比较, 气道内滴注 LPS 24 h 后, BALF 内炎症细胞总数及中性粒细胞计数显著升高 (均  $P < 0.01$ ), 见图 2。应用罗格列酮处理后可显著减轻 LPS 诱导小鼠 ALI 炎症细胞的浸润。

**激活 PPAR $\gamma$  对支气管肺泡灌洗液中细胞因子的影响** 与对照组比较, 气道内滴注 LPS 24 h 后

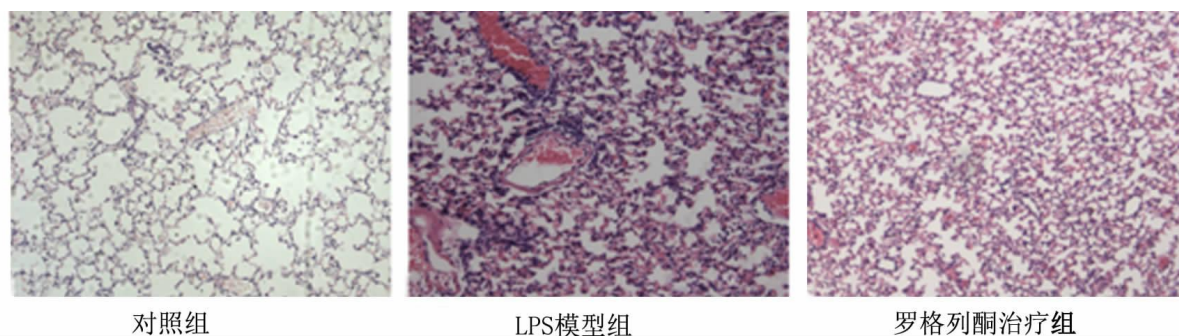
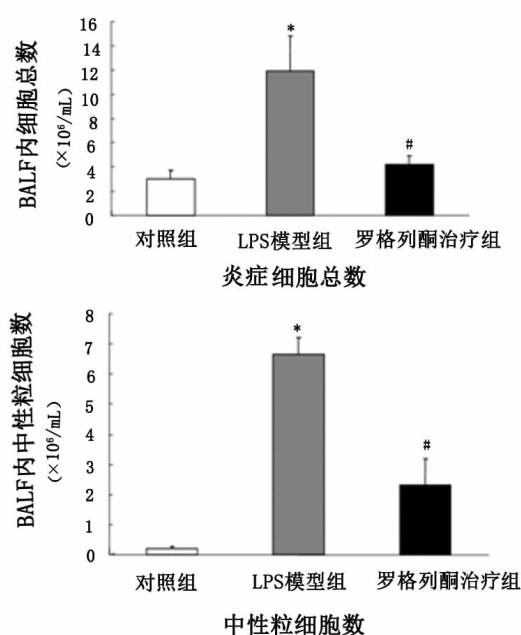
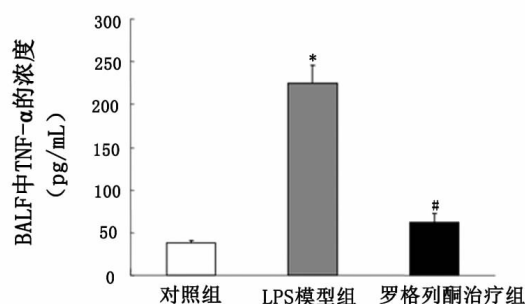


图1 PPAR $\gamma$  激动剂对 LPS 诱导小鼠 ALI 病理改变的影响(HE 染色,  $\times 200$ )



注:与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LPS 模型组比较, # $P < 0.01$

图2 激活 PPAR $\gamma$  对小鼠肺组织浸润炎症细胞数的影响  
BALF 中 TNF- $\alpha$  浓度显著升高 ( $P < 0.01$ ), 见图 3。在 LPS 干预前 24 h 和 0.5 h 应用罗格列酮预处理小鼠, BALF 中 TNF- $\alpha$  浓度显著下降。提示罗格列酮可抑制 ALI 小鼠促炎性细胞因子的分泌, 而对 ALI 发挥保护作用。

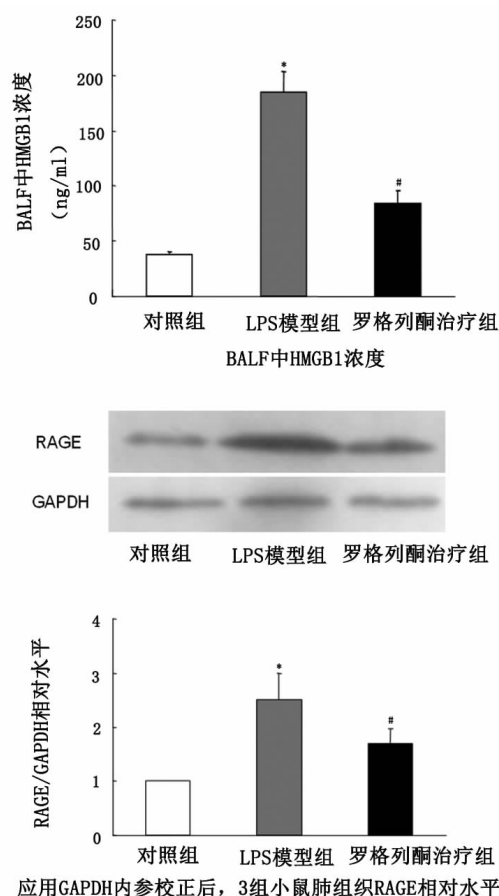


注:与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LPS 模型组比较, # $P < 0.01$

图3 激活 PPAR $\gamma$  对支气管肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  的影响

PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮对 HMGB1/RAGE 信号通路的调控 与对照组比较, 在 LPS 模型组 BALF 内的 HMGB1 浓度明显升高 ( $P < 0.01$ ); 进一步利用 Western Blot 检测肺组织匀浆, 与对照组比较, LPS

模型组肺组织内 HMGB1 受体 RAGE 蛋白表达增加了 2.5 倍 ( $P < 0.01$ )。而经罗格列酮预处理小鼠后, LPS 诱发的肺组织内上述改变被显著抑制, 提示罗格列酮可抑制促炎因子 HMGB1 的分泌, 减少 RAGE 在肺组织内的表达, 即抑制 HMGB1/RAGE 信号通路, 见图 4。



注:与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LPS 模型组比较, # $P < 0.01$

图4 PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮对 HMGB1/RAGE 信号通路的影响

## 讨论

多个研究显示配体激活 PPAR $\gamma$  可抑制 ALI 发生、发展, 对患者发挥保护作用<sup>[8, 9]</sup>。本研究同样显示了罗格列酮通过激活 PPAR $\gamma$  对 ALI 发挥保护作用。组织病理学研究发现气道内滴注 LPS 激发 24 h

后,内皮细胞和上皮细胞被严重破坏,导致肺水肿、肺出血,以中性粒细胞为主的炎症细胞在肺组织内大量浸润,肺部正常的组织形态结构消失,而罗格列酮预处理后可显著抑制 LPS 诱导的肺组织上述改变。与对照组比较,LPS 模型组中浸润的炎症细胞总数、中性粒细胞数及支气管肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  水平显著升高,而经罗格列酮治疗后,显著抑制上述改变,对肺组织发挥保护作用。

Gong 等<sup>[10]</sup>应用特异性 HMGB1 抗体治疗小鼠 ALI 模型,可显著减轻 LPS 诱导的炎症反应,对 ALI 发挥保护作用。进一步研究发现 RAGE 基因敲除小鼠对内毒素血症的耐受性显著增强,肺组织内的炎症反应明显减轻<sup>[11]</sup>。抑制 HMGB1/RAGE 信号通路可能是临床治疗 ALI/ARDS 的新方向。

近年来体外研究发现配体激活 PPAR $\gamma$  信号通路可抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎性细胞因子的分泌,促进抗炎性细胞因子 IL-10 的表达,抑制促炎基因诱导型一氧化氮合酶和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的活性<sup>[6]</sup>,提示激活 PPAR $\gamma$  信号通路可能具有抗炎的潜在作用。对 ALI<sup>[7]</sup>起保护作用。

激活 PPAR $\gamma$  通过抑制或降低 HMGB1 的分泌和浓度,可以有效抑制炎症反应和减轻脑损伤<sup>[12, 13]</sup>。本研究中,模型组小鼠 HMGB1 水平及 RAGE 表达较对照组显著增加,提示 HMGB1/RAGE 信号通路参与小鼠 ALI 发病机制,而在 LPS 气道滴注前 24 h 和 0.5 h 给予罗格列酮灌胃预处理后,可显著抑制 LPS 诱导小鼠 ALI 模型中 HMGB1 的浓度和 RAGE 的表达水平,同时浸润肺组织的炎症细胞显著减少,肺泡内出血减轻,肺组织结构破坏减轻,以及 TNF- $\alpha$  分泌减少。本研究结果提示罗格列酮可能是通过抑制 HMGB1/RAGE 轴,从而对 LPS 诱导 ALI 起保护作用。

#### 参考文献

1 公维梅. 急性呼吸窘迫综合征患者血清 cc16 蛋白和 mirna-122 表

- 达及其临床意义[J]. 内科急危重症杂志, 2020, 26 (1): 34-37.
  - 2 李峥, 梁耀元, 黄克刚. 急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征的诊治研究进展[J]. 内科急危重症杂志, 2012, 18 (3): 181-183.
  - 3 Wang M, Gauthier A, Daley L, et al. The Role of HMGB1, a Nuclear Damage-Associated Molecular Pattern Molecule, in the Pathogenesis of Lung Diseases[J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 31 (13): 954-993.
  - 4 Wang G, Han D, Zhang Y, et al. A Novel Hypothesis: Up-Regulation of Ho-1 by Activation of Ppargamma Inhibits HMGB1-Rage Signaling Pathway and Ameliorates the Development of ALI/ARDS[J]. J Thorac Dis, 2013, 5 (5): 706-710.
  - 5 Nakamura T, Fujiwara N, Sato E, et al. Effect of Polymyxin B-Immobilized Fiber Hemoperfusion on Serum High Mobility Group Box-1 Protein Levels and Oxidative Stress in Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome[J]. ASAIO J, 2009, 55 (4): 395-399.
  - 6 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.
  - 7 Wang YL, Guo XY, He W, et al. Effects of Alliin on LPS-Induced Acute Lung Injury by Activating Ppargamma[J]. Microb Pathog, 2017, 110: 375-379.
  - 8 Liu D, Geng Z, Zhu W, et al. 15-Deoxy-Delta(1)(2), (1)(4)-Prostaglandin J(2) Ameliorates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Rats[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127 (5): 815-820.
  - 9 Liu ZN, Zhao M, Zheng Q, et al. Inhibitory Effects of Rosiglitazone on Paraquat-Induced Acute Lung Injury in Rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34 (10): 1317-1324.
  - 10 Gong Q, Xu JF, Yin H, et al. Protective Effect of Antagonist of High-Mobility Group Box 1 on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice[J]. Scand J Immunol, 2009, 69 (1): 29-35.
  - 11 Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, et al. HMGB1 and Rage in Inflammation and Cancer[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 367-388.
  - 12 Gao M, Hu Z, Zheng Y, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonist Troglitazone Inhibits High Mobility Group Box 1 Expression in Endothelial Cells Via Suppressing Transcriptional Activity of Nuclear Factor KappaB and Activator Protein 1[J]. Shock, 2011, 36 (3): 228-234.
  - 13 Haraguchi T, Takasaki K, Naito T, et al. Cerebroprotective Action of Telmisartan by Inhibition of Macrophages/Microglia Expressing HMGB1 Via a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma-Dependent Mechanism[J]. Neurosci Lett, 2009, 464 (3): 151-155.
- (2020-04-21 收稿 2020-07-15 修回)