

罗格列酮对脓毒症大鼠血糖及肺部炎症反应的影响

周灵芝*, 张 熠, 康 婷, 高顺利

(南华大学附属第一医院儿科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 探索罗格列酮对脓毒症大鼠血糖及肺部炎症反应的影响。**方法** 采用结肠结扎穿孔法建立脓毒症大鼠模型, 36 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 分别为脓毒症组、罗格列酮处理组和假手术组, 每组 12 只。分别于造模后 12 h, 24 h 行血浆血糖检测; HE 染色及髓过氧化物酶 (MPO) 活性检测观察肺组织中中性粒细胞聚集情况; 荧光定量 PCR 检测肺组织炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达变化。每时间点检测大鼠 6 只。**结果** 与假手术组比较, 脓毒症组大鼠肺部炎症因子 IL-6、TNF- α 表达增高。肺组织微血管通透性增加, 肺泡壁增厚, 间质水肿, 白细胞浸润, MPO 活性明显增强 ($P < 0.05$); 与脓毒症组比较, 罗格列酮处理组肺间质水肿程度减轻, 白细胞浸润减少, 炎症因子的表达受到抑制 ($P < 0.05$)。三组大鼠各时间点血糖差别不明显 ($P > 0.05$)。**结论** 罗格列酮能够降低脓毒症大鼠肺组织炎症因子 IL-6、TNF- α 的表达, 减轻炎症反应。但对大鼠血糖无明显影响。

关键词: 罗格列酮; 脓毒症; 肺; 炎症反应

中图分类号: R631 文献标识码: A

Effect of Rosiglitazone on the Blood Glucose and Pulmonary Inflammation in Septic Rats

ZHOU Lingzhi, ZHANG Yi, KANG Ting, et al

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of rosiglitazone on the control of blood glucose and pulmonary inflammation in septic rats. **Methods** The model of septic rat was established by ligation and puncture on the colon. 36 SD rats were randomly divided into three groups, they were sepsis group, sepsis with rosiglitazone intervention group (ROSI 0.3 mg/kg) and sham-operated group, 12 rats in each group. Blood glucose was tested 12 and 24 hours after intervention. IL-6, TNF- α expression level in lung tissue were detected by quantitative PCR. Neutrophil aggregation status was observed by HE staining and myeloperoxidase (MPO) activity detection. 6 rats were executed in each time. **Results** Compared with sham-operated group, TNF- α and IL-6 mRNA expression level in sepsis group were obviously increased. The permeability of lung microvascular, thickness of alveolar wall, edema of interstitial and activity of MPO were significantly enhanced in sepsis group ($P < 0.05$); Compared with sepsis group, the inflammatory cytokines expression level and the degree of lung inflammation in rosiglitazone intervention group were significantly reduced ($P < 0.05$). There were no differences in blood glucose level between three groups. ($P > 0.05$). **Conclusion** Rosiglitazone can inhibit the expression of TNF- α and IL-6 and reduce inflammation response in septic lung tissue without influence on blood glucose. It has certain effect on septic lung injure.

Key words: rosiglitazone; sepsis; lung; inflammation

脓毒症是由感染导致的全身炎症反应综合征 (system inflammatory response syndrome, SIRS), 是严重创伤、休克、外科大手术后常见的并发症。脓毒

症时, 由于炎症介质的“瀑布样释放”可导致多器官功能障碍综合征 (multi organ dysfunction syndrome, MODS), 其中肺脏是最易受累的器官。研究发现过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂罗格列酮 (Rosiglitazone ROSI) 可通过抑制炎症介质的表达而

减轻炎症反应,ROSI 在脓毒症及缺血再灌注损伤发生过程中都发挥着抗炎作用。本文就 ROSI 对结肠结扎穿孔模型大鼠血糖及肺部炎症反应的干预作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理 SD 大鼠 36 只,体重 250~300 g,雌雄不拘,由南华大学实验动物部提供。实验前及实验过程中自由摄食、饮水。动物随机分为 3 组,脓毒症组、罗格列酮处理组 (ROSI 0.3 mg/kg) 和假手术组。每组 12 只。脓毒症组:行盲肠结扎穿孔术。假手术组:开腹,暴露盲肠,不行盲肠结扎穿孔术。罗格列酮处理组:手术同脓毒症组,术后立即尾静脉注射稀释后 (0.3 mg/mL) 的罗格列酮,以后每 12 h 一次。A、C 组均按体重计算注射等量生理盐水。造模后 12 h、24 h 氯胺酮麻醉处死大鼠留取标本。各组大鼠均监测体温、呼吸频率、血压、心率及摄食状况。

1.2 主要试剂与仪器 罗格列酮购自美国 Cayman 公司;髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 比色活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;HE 染色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;荧光定量 PCR 检测试剂盒购自北京天根公司;Trizol 购自 invitrogen 公司;引物合成由上海生物工程有限公司完成 (IL-6:上游引物 5-AGCCCACCAG-GAACGAAAGTC-3 下游引物, 5-TGGAAGTTGGGG-TAGG AAGGA-3,片段大小 559bp;TNF- α :上游引物 5-TGCCTCAGCCTCTT CTCATT-3 下游引物 5-GCTT-GGTGGTTTGCTACGAC-3,片段大小 209bp;GAPDH:上游引物 5-GTCAGTGGTGGACCT GACCT-3 下游引物 5-AGGGGTCT ACATGGCAACTG-3,片段大小 420 bp)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血常规及血糖检测 大鼠颈动脉采血后立即采用上海 ABX 全自动血细胞分析仪检测血常规,日本东芝全自动生化仪检测全血葡萄糖浓度。

1.3.2 肺组织形态学观察 右肺中叶用 10% 甲醛固定,常规石蜡切片。进行苏木精—伊红 (HE) 染色,普通光镜下观察肺组织的肺泡充血、水肿及炎症细胞浸润情况。

1.3.3 MPO 活性测定 准确称取肺组织重量 100 mg/例,剪碎组织块,与配制好的匀浆介质按重

量体积比 1:19 匀浆 (10000r/min、匀浆液 1 mL),制备成 5% 的组织匀浆。检测按照试剂盒说明书进行。

1.3.4 炎症因子检测 大鼠处死后,立即取新鲜左下肺新鲜标本以预冷的 PBS 冲洗干净后立即液氮研磨,Trizol 法提取总 RNA,按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书逆转录,北京天根公司染色法荧光定量 PCR 试剂盒行 PCR 检测。

1.4 统计学处理 采用 $\Delta\Delta CT$ 法计算 TNF- α 、IL-6 mRNA 的表达量,内参 GAPDH 进行校正。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 及 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 脓毒症大鼠模型的建立 参照 Remick DG 等关于盲肠结扎穿孔术脓毒症大鼠模型的手术方式及诊断标准,脓毒症组及罗格列酮处理组大鼠术后 12 h 均出现摄食减少、发热症状,肛温平均增加 1.5 $^{\circ}\text{C}$;呼吸频率较术前增加 1 倍;心率较术前增加 50%;白细胞增高 1 倍以上,符合脓毒症大鼠诊断标准。假手术组大鼠术后 12 h 摄食基本正常,体温、心率、呼吸变化不明显。白细胞稍有上升,但较术前增加不到 1 倍。

2.2 血糖的检测 如表 1 所示,三组大鼠各时间点血糖水平无明显差异 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血浆葡萄糖浓度检测 (mmol/L)

组别	0 h	12 h	24 h
脓毒症组	4.45 $\pm$ 0.89	5.38 $\pm$ 1.08	6.12 $\pm$ 1.12
ROSI 组	4.36 $\pm$ 0.71	4.31 $\pm$ 0.91	5.78 $\pm$ 0.95
假手术	5.46 $\pm$ 0.95	5.53 $\pm$ 1.12	4.50 $\pm$ 0.89

2.3 肺组织形态学改变 如图 1 所示,假手术组小鼠肺组织小叶结构清晰,肺泡腔干净,肺泡间质少量炎性细胞浸润,肺泡壁无增厚,支气管黏膜上皮完整。脓毒症组肺组织充血明显,肺泡间质有大量炎性浸润,肺泡壁增宽,肺泡腔内可见炎性渗出,肺组织病理改变 12~24 h 逐渐加重。ROSI 处理后肺组织充血程度、肺泡间质炎性浸润和渗出较脓毒症组明显改善,肺泡壁无明显水肿。

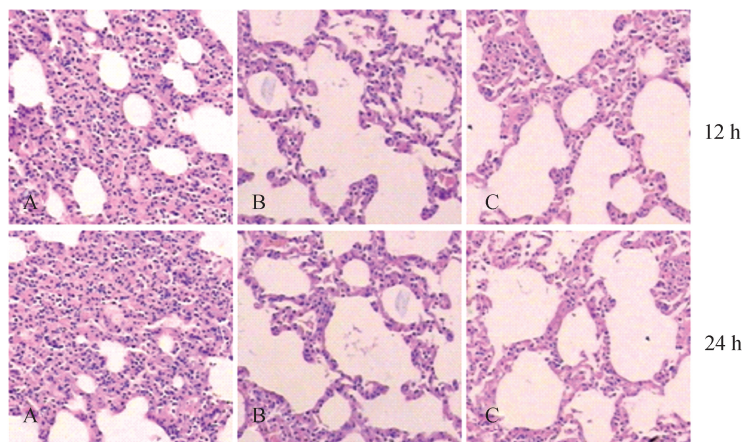


图 1 各组大鼠肺部组织病理变化(HE,100 ×) A:脓毒症组;B:罗格列酮处理组;C:假手术组

2.4 肺组织 MPO 活性的变化 结果表明,与假手术组比较,脓毒症组术后 12,24 h,小鼠肺部 MPO 活性均显著增强,ROSI 干预后,MPO 活性明显降低。结果见图 2。

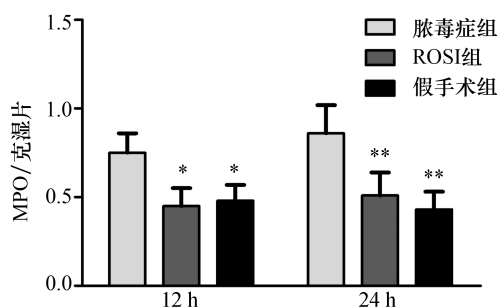


图 2 ROSI 对脓毒症大鼠肺组织 MPO 的干预作用 与脓毒症组比较, * : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$

2.5 炎症因子的变化 建模后 12 h,24 h 各组大鼠肺部炎症因子水平如图 3、4 所示。脓毒症组 IL-6、TNF- α mRNA 水平在 12 h,24 h 逐渐增高。ROSI 处理组在 12 h,24 h IL-6、TNF- α mRNA 水平有增高,但高峰水平低于同期脓毒症组($P < 0.05$)。假手术组炎症因子各时间点变化不明显且低于同期其他两组($P < 0.05$)。

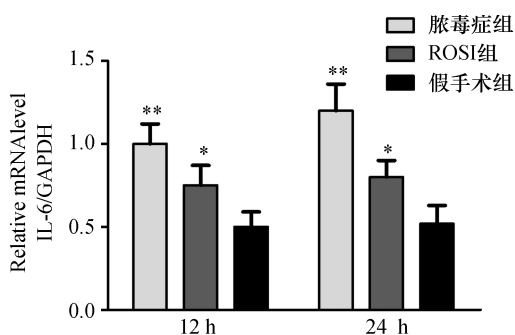


图 3 ROSI 对脓毒症大鼠肺组织 IL-6 mRNA 表达的影响 与假手术组比较, * * : $P < 0.01$ 。与脓毒症组及假手术组比较, * : $P < 0.05$

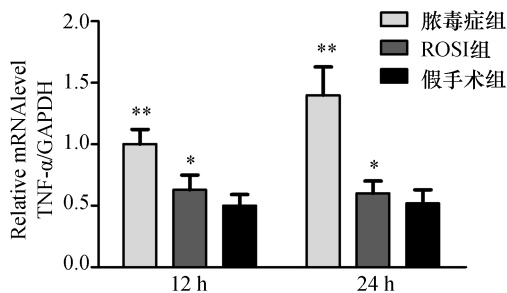


图 4 ROSI 对脓毒症大鼠肺组织 TNF- α mRNA 表达的影响 与假手术组比较, * * : $P < 0.01$;与脓毒症组比较, * : $P < 0.05$

3 讨 论

罗格列酮通过与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptors gamma, PPAR γ) 结合,使 PPAR γ /RXR α 发生空间构象改变,与辅抑制因子脱离并结合辅激活因子,进而与靶基因启动子上的 PPARE 结合,激活靶基因转录而激活

细胞内信号通路发挥其作用。PPAR γ 活化可以调控 NF- κ B 和 AP-1 信号转导通路,在转录水平抑制 IL-6、TNF- α 的表达而发挥抗炎作用。研究表明罗格列酮与吡格列酮可以抑制支气管哮喘、动脉硬化、炎症性肠病等器官的慢性炎症反应,减轻病变部位中性粒细胞及淋巴细胞的浸润与炎症因子的表达。二者能够减轻脓毒症大鼠的全身炎症反应,而对于

脓毒症最易损伤的肺脏,罗格列酮对肺部炎症细胞浸润、炎症因子表达及其对大鼠血糖的影响目前尚无报道。

本研究通过采用盲肠结扎穿孔术构建脓毒症大鼠模型,通过罗格列酮尾静脉注射的方法,研究发现,盲肠结扎穿孔后 12 小时大鼠出现明显全身炎症反应表现,达到脓毒症诊断标准,此时大鼠肺组织已经受累,表现为组织 MPO 活性明显增高,肺泡间质充血及炎性细胞浸润,肺泡壁增宽,肺泡腔内可见炎性渗出。而罗格列酮治疗能降低组织 MPO 活性,减轻肺组织充血程度,减少肺泡间质炎性浸润,减轻肺泡壁水肿。各组大鼠肺部炎症因子检测也表明,脓毒症组大鼠 12~48 小时肺部炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平逐渐增高。而予以罗格列酮治疗后,TNF- α 、IL-6 水平有明显减低。这一实验结果提示,罗格列酮在盲肠结扎穿孔导致的脓毒症大鼠肺损伤中具有明确的抑制炎症介质释放,减轻炎症反应的作用。

为了明确罗格列酮在减轻脓毒症炎症反应的同时对血糖的影响情况,本实验同时检测了各组大鼠的血糖,研究发现,三组大鼠各时间点血糖无明显差异,未因罗格列酮降糖作用而出现低血糖。我们分析其原因可能是脓毒症组大鼠炎症因子水平增加最高,全身炎症反应导致的应激最为强烈,此时大鼠摄食基本停止,机体血糖水平依靠应激性升高维持在正常。ROSI 组大鼠炎症反应相对较轻,可以适当摄食,罗格列酮对血糖降低的影响通过大鼠摄食及炎症应激所导致的升高得到调控,因此血糖也维持在正常范围。假手术组大鼠基本无明显炎症反应,摄食正常,血糖稳定在正常水平。当然,其确切的血糖调控机制还有待进一步实验研究阐明。

综上所述,本研究表明,罗格列酮能够降低脓毒症大鼠肺组织炎症因子 IL-6、TNF- α mRNA 的表达,减轻炎症反应。但对大鼠血糖无明显影响且不会导致低血糖发生。本研究可能为罗格列酮的临床应用及脓毒症的药物治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Balk RA. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS); where did it come from and is it still relevant

- today[J]. Virulence, 2014, 5(1): 20-26.
- [2] Schorr CA, Zanotti S, Dellinger RP. Severe sepsis and septic shock: management and performance improvement[J]. Virulence, 2014, 5(1): 190-199.
- [3] Fry DE. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues[J]. Am Surg, 2012, 78(1): 1-8.
- [4] Celinski K, Dworzanski T, Korolczuk A, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptors-gamma ligands on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats[J]. J Physiol Pharmacol, 2011, 62(3): 347-356.
- [5] Zhao Y, Huang Y, He J, et al. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, attenuates airway inflammation by inhibiting the proliferation of effector T cells in a murine model of neutrophilic asthma[J]. Immunol Lett, 2014, 157(1-2): 9-15.
- [6] Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture[J]. Shock, 2000, 13(2): 110-116.
- [7] Li Y, Hou M, Wang JG, et al. Changes of lymph metabolites in a rat model of sepsis induced by cecal ligation and puncture[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 73(6): 1545-1552.
- [8] Gada E, Owens AW, Gore MO, et al. Discordant effects of rosiglitazone on novel inflammatory biomarkers[J]. Am Heart J, 2013, 165(4): 609-614.
- [9] Belvisi MG, Hele DJ. Peroxisome proliferator-activated receptors as novel targets in lung disease[J]. Chest, 2008, 134(1): 152-157.
- [10] Denning GM, Stoll LL. Peroxisome proliferator-activated receptors: potential therapeutic targets in lung disease[J]. Pediatr Pulmonol, 2006, 41(1): 23-34.
- [11] Soskic SS, Dobutovic BD, Sudar EM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherosclerosis[J]. Angiology, 2011, 62(7): 523-534.
- [12] Celinski K, Dworzanski T, Fornal R, et al. Comparison of anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in prophylactic treatment of experimental colitis[J]. J Physiol Pharmacol, 2013, 64(5): 587-595.

(此文编辑:秦旭平)