

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.002

罗格列酮通过调节 PPAR- γ /NFAT/IL-2 信号通路 治疗克罗恩病大鼠

姚嘉茵¹, 刘涛¹, 丛龙玲², 鲁义³, 邝敏¹, 高翔¹

(1. 中山大学附属第六医院消化内科, 广州 510655; 2. 广州市中医医院消化内科, 广州 510130;
3. 广州市中医医院麻醉科, 广州 510130)

[摘要] 目的: 探讨罗格列酮对CD大鼠模型的作用及具体机制。方法: 采用三硝基苯磺酸(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)诱导建立实验性结肠炎大鼠模型, 40只SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、罗格列酮组[20 mg/(kg·d)灌胃]及GW9662组[1 mg/(kg·d)灌胃]。对大鼠CD疾病活动指数(disease activity index, DAI)、结肠大体损伤指数(colon macroscopic damage index, CMDI)和结肠组织学损伤指数(tissues damage index, TDI)进行评分; 心脏穿刺取血检测超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, Hs-CRP)以及红细胞沉降率(sedimentation rate, ESR)变化; RT-PCR方法检测结肠组织PPAR- γ /活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)/白介素-2(interleukin-2, IL-2)上下游基因表达的变化。结果: 罗格列酮干预有效降低DAI, CMDI及TDI评分($P < 0.05$), 下调血清炎症指标, 促进大鼠肠黏膜PPAR- γ 基因的表达, 抑制NFAT及下游IL-2基因表达。结论: 罗格列酮有效减少实验性结肠炎大鼠的临床活动, 改善大体及组织学改变, 其治疗作用可能通过调节PPAR- γ /NFAT/IL-2信号通路实现。

[关键词] 克罗恩病; 罗格列酮; GW9662; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

Rosiglitazone ameliorates Crohn's disease rat models by regulating PPAR- γ /NFAT/IL-2 signaling pathway

YAO Jiayin¹, LIU Tao¹, CONG Longling², LU Yi³, ZHI Min¹, GAO Xiang¹

(1. Department of Gastroenterology, Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510655;
2. Department of Gastroenterology, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130;
3. Department of Anesthesiology, Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China)

Abstract **Objective:** To clarify the effect and mechanisms of rosiglitazone on CD rat model. **Methods:** Rat model of experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) was established. Forty SD rats were randomly divided into a control group, a model group, a rosiglitazone group [20 mg/(kg·d), oral gavage] and GW9662 group [1 mg/(kg·d), oral gavage]. The disease activity index (DAI), colon

收稿日期 (Date of reception): 2019-04-23

通信作者 (Corresponding author): 高翔, Email: doctorgaoxiang@yeah.net

基金项目 (Foundation item): 广东省中医药局科研项目 (20191247)。This work was supported by the Scientific Research Project of Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province, China (20191247).

macroscopic damage index (CMDI) and tissues damage index (TDI) were evaluated. Levels of inflammation factors including sedimentation rate (ESR) and hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP) were measured via cardiac puncture blood sampling. Gene expressions of PPAR- γ /nuclear factor of activated T-cells (NFAT)/interleukin-2 (IL-2) in colon tissue were detected by RT-PCR. **Results:** Rosiglitazone effectively decreased the scores of DAI, CMDI and TDI ($P < 0.05$), down-regulated the inflammatory index of serum, promoted gene expression of PPAR- γ and inhibited gene expressions of NFAT and downstream IL-2 in colon tissue. **Conclusion:** Rosiglitazone effectively reduces the clinical activity and improves the gross and histological changes in experimental colitis rats, the therapeutic effect of is probably achieved by regulating the PPAR- γ /NFAT/IL-2 signaling pathway.

Keywords Crohn's disease; rosiglitazone; GW9662; peroxisome proliferator-activated receptor- γ

克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD),是一种反复发作的慢性肠道炎症病变,其发病机制尚未明确,目前认为和遗传、感染、免疫紊乱以及肠道微生物生态失衡相关^[1]。CD的治疗药物包括糖皮质激素、5氨基水杨酸及硫唑嘌呤等免疫抑制剂以及生物制剂,以上药物均存在毒副作用^[2]。因此,深入研究CD的发病机制及有效治疗药物是消化科领域的研究重点与难点。本课题组既往研究^[3]发现:n-3多不饱和脂肪酸通过激动过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ)对CD大鼠模型有治疗作用。本研究拟采用PPAR- γ 激动剂罗格列酮及抑制剂GW9662干预三硝基苯磺酸(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)诱导的实验性结肠炎大鼠模型,进一步明确PPAR- γ /活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)/白介素-2(interleukin-2, IL-2)信号通路在CD致病中的作用。

1 对象与方法

1.1 动物建模及分组

实验性结肠炎大鼠模型的构建如下^[4]:大鼠麻醉后经肛门灌入TNBS原液100 mg/kg+50%乙醇0.25 mL,倒悬位持续30 s,每隔10 d重复灌肠,4次后(d 0, d 10, d 20, d 30)可制成TNBS诱导的实验性结肠炎大鼠模型。此模型以IL-12启动的I型辅助T细胞(type I T helper cells, Th1)类免疫反应为主,病理改变与人类CD相似,目前广泛用于CD的动物实验研究。

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级SD大

鼠(雌雄各半)共40只,体重(180 \pm 10)g,鼠龄4~6周,购自中山大学医学院实验动物中心。实验动物质量合格证:SCXK(粤)2018-0031。本研究动物实验按照国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)(Pub. No. 85-23, revised 1996)以及活体动物实验研究(Animal Research: Reporting In Vivo Experiments, ARRIVE)指南进行。所有大鼠随机均分为4组:空白对照组、模型组(TNBS)、罗格列酮组[20 mg/(kg·d)灌胃,成都恒瑞制药有限公司,批号160902]和GW9662组[1 mg/(kg·d)灌胃,购于美国Sigma公司]。采用灌胃方式给予药物干预,从实验第1天开始至第30天结束,1次/d灌胃。采用人动物剂量换算公式换算为大鼠用量:大鼠剂量=(X mg/kg \times 70 kg \times 0.018)/0.2 kg=6.3X mg/kg。至d30结束实验,大鼠均麻醉下处死,取血,留取结肠组织。

1.2 大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)评估

每日对各组大鼠体重、大便情况进行观察与记录。利用以下公式计算体重下降百分比:第 n 天体重下降/=%=(第 $n-1$ 天体重-第 n 天体重)/第 $n-1$ 天体重 \times 100%。具体评分项目见表1。

1.3 大鼠结肠组织大体形态损伤指数评估

大鼠麻醉后处死,取结肠组织,根据表2行结肠大体损伤指数(colon macroscopic damage index, CMDI)评分。

1.4 大鼠组织学损伤指数评估

结肠组织固定、包埋、切片并且HE染色后,在显微镜下观察组织学改变。根据表3进行组织学损伤指数(tissues damage index, TDI)评分。

表1 DAI评分^[3]

Table 1 DAI scores

评分	体质量下降 /%	粪便性状	隐血情况
0	无	正常	隐血阴性
1	1~5	—	—
2	6~10	半稀便	隐血阳性
3	11~15	—	—
4	>15	稀便	肉眼血便

表2 大鼠CMDI^[3]

Table 2 Rat CMDI

评分	肉眼观察到的表现
0	结肠黏膜无损伤
1	局部结肠黏膜充血水肿但无糜烂、溃疡形成
2	有线形溃疡形成但无显著炎症发生
3	在1个部位上有线性溃疡形成并且有炎症
4	在2个或以上的部位有溃疡形成和/或炎症
5	沿结肠长轴有2个或以上部位有溃疡形成和炎症, 长度超过1 cm
6~8	溃疡形成超过2 cm

1.5 各组大鼠外周血炎症指标比较

大鼠麻醉后, 心脏穿刺取血, 离心(2 000 r/min) 5 min后提取血清, 采用乳胶凝集比浊法检测超敏C反应蛋白(hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)以及魏氏法测定血沉(sedimentation rate, ESR)。

1.6 大鼠结肠组织 PPAR- γ /NFAT/IL-2 各因子基因表达水平

采用TRIzol(美国Invitrogen公司)法提取大鼠结肠组织总RNA。按照GenBank序列, 用Vector NTI suite软件(美国Invitrogen公司)确定大鼠的PPAR- γ , NFAT和IL-2的引物序列(表4)。使用核酸蛋白测定仪测定RNA纯度和浓度, 其A260/A280值在1.8~2.0之间。按ReveTra DASHTM RT-PCR试剂盒说明书进行反转录和PCR扩增(反应条件为: 变性95 °C 10 s, 退火52 °C 60 s, 延伸72 °C 45 s, 共35~38个循环, 最后95 °C延伸10 min)。Gel-Pro Analyzer 4.0软件(美国Media Cybernetics公司)进行PCR产物定量分析。

表3 大鼠结肠TDI^[3]

Table 3 Rat colon TDI

评分	显微镜下结肠组织损伤表现
0	没有损伤
1	较弱的黏膜和/或黏膜下炎症浸润和充血水肿, 黏膜轻度糜烂, 伴有毛细血管增生, 而黏膜肌层保持完整
2	在1分的基础上, 范围达标本的50%以上
3	显著地炎症浸润和充血水肿, 有溃疡形成并延伸到黏膜下层和黏膜肌层, 较少的炎症细胞浸润黏膜固有层但无肌层坏死
4	在3分的基础上, 范围达标本的50%及以上
5	广泛的溃疡形成, 伴有凝固性坏死, 有数量众多的中性粒细胞浸润, 细胞坏死达黏膜固有肌层
6	在5分的基础上, 范围达标本的50%及以上

表4 各基因引物序列

Table 4 Primers for each target gene

基因	序列	循环数	退火温度/°C
PPAR- γ	5'-CGTATTACGTACGTA-3'	35	52
	3'-GCATAATGCATGCAT-5'		
NFAT	5'-TCAGTTACGTATCGC-3'	36	52
	3'-AGTCAATGCATAGCG-5'		
IL-2	5'-CATGCGATCGTACATG-3'	35	52
	3'-GTACGCTAGCATGTAC-5'		
GAPDH	5'-ATCGTACGATACGTAC-3'	35	52
	3'-TAGCATGCTATGCATG-5'		

1.7 统计学处理

应用SPSS 22.0统计软件进行数据分析, 采用单因素方差分析方法进行统计学处理, 进而采用Bonferroni检验组间差异。计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组DAI, CMDI及TDI评分

使用DAI评分指数评估各组临床疾病活动度,

CMDI指数评估结肠大体标本形态学损伤程度以及TDI指数评估光镜下组织学损伤情况。结果显示: 罗格列酮干预降低DAI, CMDI及TDI评分 ($P < 0.05$), 有效减少实验性结肠炎大鼠的临床活

动, 改善大体及组织学改变, 有效治疗大鼠实验性结肠炎。PPAR- γ 抑制剂GW9962干预组DAI、CMDI及TDI评分较模型组及罗格列酮干预组升高 ($P < 0.05$; 图1, 图2)。

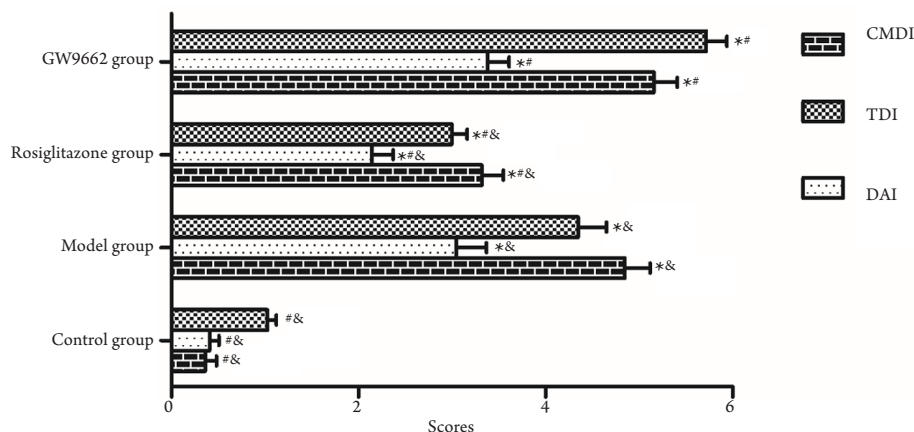


图1 各组大鼠DAI, CMDI及TDI评分

Figure 1 DAI, CMDI and TDI scores of rats in each group

与空白对照组比较, $*P < 0.05$; 与模型组比较, $*P < 0.05$; 与GW9662组比较, $^{\&}P < 0.05$ 。

Compared with the control group, $*P < 0.05$; compared with the model group, $*P < 0.05$; compared with the GW9662 group, $^{\&}P < 0.05$.

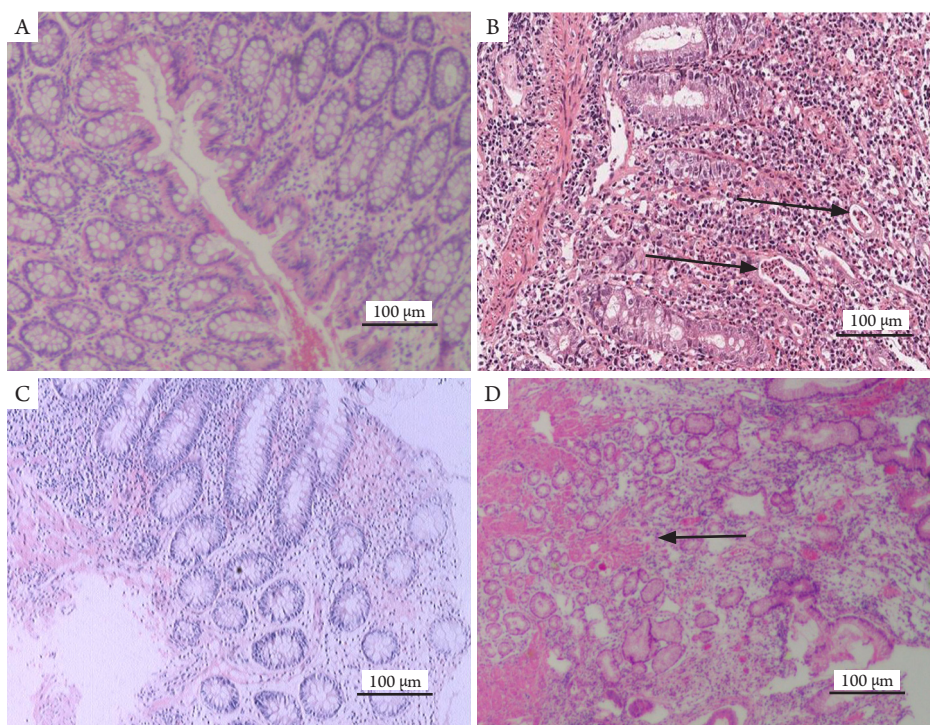


图2 各组大鼠肠黏膜病理表现(HE, $\times 400$)

Figure 2 Pathological examination of colon mucosa of rats in each group (HE, $\times 400$)

(A)空白对照组; (B)模型组(箭头指示隐窝炎和隐窝脓肿); (C)罗格列酮组; (D)GW9662组(箭头指示幽门腺化生和隐窝结构紊乱)。

(A) Control group; (B) Model group (arrows refer to cryptitis and crypt abscess); (C) Rosiglitazone group; (D) GW9662 group (arrow refers to pyloric glands metagenesis and crypt structure disorder).

2.2 各组大鼠血清炎症指标比较

采用ESR及CRP作为大鼠血清炎症状态的评估指标。结果显示：TNBS造模后模型组大鼠血清炎症指标均显著升高($P<0.05$)。罗格列酮治疗有效降低炎症指标($P<0.05$)，而GW9662组ESR与CRP较罗格列酮组升高($P<0.05$)，与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$ ，表5)。

2.3 各组 PPAR- γ /NFAT/IL-2 信号通路各因子表达变化

采用RT-PCR法检测PPAR- γ /NFAT/IL-2信号

通路各因子的基因表达水平。结果显示：模型组大鼠结肠组织PPAR- γ ，NFAT基因表达水平与空白对照组大鼠比较差异无统计学意义($P>0.05$)，而IL-2基因表达水平较对照组升高($P<0.05$)。罗格列酮干预促进大鼠结肠组织PPAR- γ 表达，下调NFAT以及下游IL-2基因表达($P<0.05$)。GW9662有效抑制PPAR- γ 表达，上调NFAT表达，促进IL-2表达($P<0.05$)。GW9662对IL-2表达的促进作用与TNBS干预相仿，两者差异无统计学意义($P>0.05$ ，图3)。

表5 各组大鼠血清炎症指标($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Table 5 Rat serum inflammatory index in each group ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	ESR/(mm·h ⁻¹)	CRP/(mg·L ⁻¹)
空白组	10.55 ± 1.65 ^{#&}	2.13 ± 1.22 ^{#&}
模型组	24.43 ± 3.07 [*]	9.11 ± 1.03 [*]
罗格列酮组	19.00 ± 2.65 ^{**&}	5.62 ± 1.19 ^{**&}
GW9662组	24.50 ± 3.45 [*]	8.00 ± 1.26 [*]

与空白对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与GW9662组比较，[&] $P<0.05$ 。

Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$; compared with the model group, [#] $P<0.05$; compared with the GW9662 group, [&] $P<0.05$.

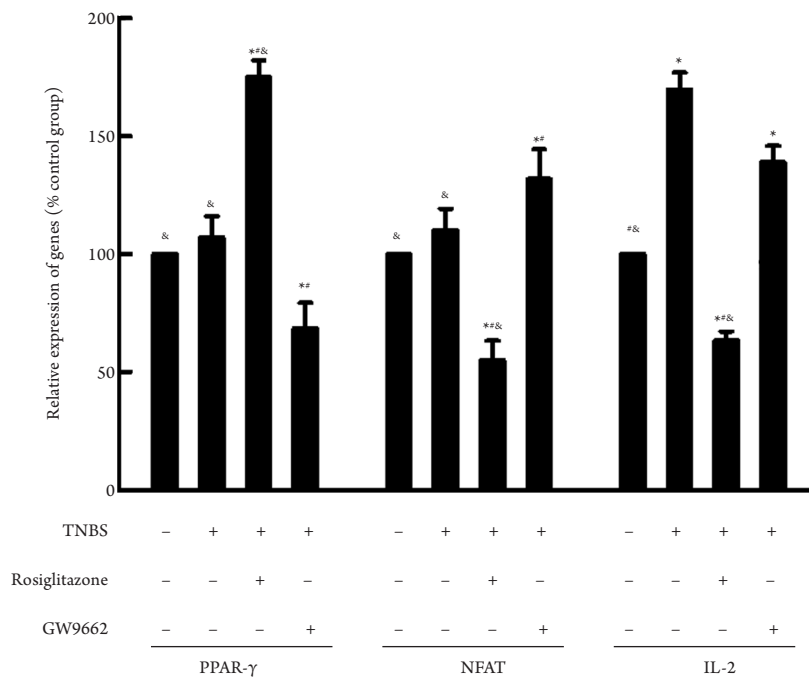


图3 各组大鼠PPAR- γ /NFAT/IL-2信号通路各因子表达变化

Figure 3 Relative mRNA expression of PPAR- γ /NFAT/IL-2 signaling pathway in each group

与空白对照组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与GW9662组比较，[&] $P<0.05$ 。

Compared with the control group, ^{*} $P<0.05$; compared with the model group, [#] $P<0.05$; compared with the GW9662 group, [&] $P<0.05$.

3 讨论

近10年来我国CD的发病率逐年增高, 据统计, 2/3的CD患者会在疾病发展的过程中接受手术治疗^[5]。因此, CD患者生活质量下降, 且需要承担巨大的医疗费用。作者前期已发表文章^[3-4]证实: 免疫相关的信号通路异常是CD致病的重要因素, 靶向调控信号通路有望成为CD精准治疗的发展方向。

PPAR- γ 在结肠组织中高表达, 调控着脂肪代谢、糖代谢、细胞凋亡及免疫平衡等, 是机体内维持内环境平衡的关键调节点^[6]。NFAT是一类转录因子家族, 受PPAR- γ 调控, 促炎因子IL-2是其重要的下游因子^[7]。外国学者^[8]使用PPAR- γ ^{+/-}杂合子小鼠建立结肠炎模型时发现: PPAR- γ 基因缺失的小鼠更容易诱导成为实验性结肠炎动物模型, 这进一步表明: PPAR- γ 在维持肠道稳态中有不可忽视的作用。Fu等^[9]发现: PPAR- γ 与特定配体结合后可以通过抑制NFAT的转录影响NFAT表达, 以此抑制T细胞在炎症中的活化, 进一步抑制下游促炎因子IL-2的表达, 达到一定的抑制炎症作用。然而, PPAR- γ /NFAT/IL-2在CD动物模型中的具体致病作用尚未被报道。

TNBS诱导的实验性结肠炎发病机制和组织病理学改变与人类CD类似, 是目前广泛用于CD动物研究的成熟动物模型^[10]。本研究结果显示: TNBS诱导的模型组大鼠临床疾病活动评分, 大体形态损伤, 组织学损伤评分及血清炎性指标均显著升高, 而且结肠组织促炎因子IL-2表达升高, 提示CD大鼠模型中存在免疫失衡。然而, 模型组大鼠并未见PPAR- γ 和NFAT的改变, 提示TNBS并不是通过改变PPAR- γ /NFAT通路诱导致病。罗格列酮干预后显著改善大鼠临床症状、大体及组织学改变, 下调炎性指标; RT-PCR检测结果显示: 罗格列酮激动PPAR- γ , 抑制NFAT表达, 进而抑制下游IL-2基因表达, 产生抑制炎症的作用。而PPAR- γ 的抑制剂GW9662则起加剧疾病的作用。综上所述, CD大鼠存在免疫紊乱, 罗格列酮通过调节PPAR- γ /NFAT/IL-2信号通路治疗CD大鼠, PPAR- γ /NFAT/IL-2是CD致病的重要免疫通路。

参考文献

1. Annese V, Duricova D, Gower-Rousseau C, et al. Impact of new treatments on hospitalisation, surgery, infection, and mortality in IBD:

- A focus paper by the epidemiology committee of ECCO[J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(2): 216-225.
2. Torres J, Boyapati RK, Kennedy NA, et al. Systematic review of effects of withdrawal of immunomodulators or biologic agents from patients with inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(7): 1716-1730.
 3. Yao J, Lu Y, Zhi M, et al. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate Crohn's disease in rats by modulating the expression of PPAR- γ /NFAT[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8315-8322.
 4. Yao JY, Lu Y, Zhi M, et al. Inhibition of the interleukin-23/interleukin-17 pathway by anti-interleukin-23p19 monoclonal antibody attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced Crohn's disease in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 2105-2110.
 5. Mitrev N, Vande Castele N, Seow CH, et al. Review article: Consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 46(11/12): 1037-1053.
 6. Vetuschi A, Pompili S, Gaudio E, et al. PPAR- γ with its anti-inflammatory and anti-fibrotic action could be an effective therapeutic target in IBD[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(24): 8839-8848.
 7. Xu S, Jiang B, Wang H, et al. Curcumin suppresses intestinal fibrosis by inhibition of PPAR γ -mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 7876064.
 8. Su Y, Shen X, Chen J, et al. Differentially expressed genes in PPAR γ -deficient MSCs[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 471: 97-104.
 9. Fu Y, Ma J, Shi X, et al. A novel pyrazole-containing indolizine derivative suppresses NF- κ B activation and protects against TNBS-induced colitis via a PPAR- γ -dependent pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 135: 126-138.
 10. He Q, Li X, Liu C, et al. Dysbiosis of the fecal microbiota in the TNBS-induced Crohn's disease mouse model[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(10): 4485-4494.

本文引用: 姚嘉茵, 刘涛, 丛龙玲, 鲁义, 郅敏, 高翔. 罗格列酮通过调节 PPAR- γ /NFAT/IL-2 信号通路治疗克罗恩病大鼠[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(8): 1622-1627. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.002

Cite this article as: YAO Jiayin, LIU Tao, CONG Longling, LU Yi, ZHI Min, GAO Xiang. Rosiglitazone ameliorates Crohn's disease rat models by regulating PPAR- γ /NFAT/IL-2 signaling pathway[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(8): 1622-1627. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.08.002