

吡格列酮对胰腺炎相关性腹水诱导的人单核细胞炎症信号通路的影响

徐萍^{1*}, 王静¹, 侯彦强², 李清华¹, 陈诚³, 娄晓丽²

1. 上海交通大学附属第一人民医院松江分院消化科, 上海 201600

2. 上海交通大学附属第一人民医院松江分院中心实验室, 上海 201600

3. 南京医科大学, 南京 210029

[摘要] **目的** 用胰腺炎相关性腹水(PAAF)刺激人单核细胞,探讨PPAR γ 激动剂吡格列酮对细胞炎症信号通路的影响。**方法** PAAF收集自重症胰腺炎患者。将体外培养的人单核细胞THP-1分为4组:对照组(C组)、实验组(A组)、吡格列酮组(P组)、GW9662(G组)。A组用PAAF刺激细胞;P组加入终浓度为20 μ mol/L吡格列酮,2 h后再用PAAF刺激细胞;G组先加入PPAR γ 拮抗剂GW9662,30 min后加入吡格列酮,2 h后再用PAAF刺激细胞。12 h后收集4组细胞,采用实时定量PCR方法检测细胞TNF- α 、IL-6的mRNA表达,蛋白质印迹法检测NF- κ B p65、p38MAPK的活化程度和I κ B蛋白表达变化。**结果** PAAF刺激后,A组细胞促炎细胞因子TNF- α 、IL-6的mRNA表达增加,NF- κ B、p38MAPK活化,I κ B蛋白水平降低,与C组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);P组经吡格列酮干预后,TNF- α 、IL-6的mRNA表达降低,NF- κ B、p38MAPK活性下调,I κ B蛋白表达升高,与A组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);G组应用GW9662后可拮抗吡格列酮降低促炎细胞因子的作用,TNF- α 、IL-6的mRNA表达增加,NF- κ B、p38MAPK活化,I κ B蛋白水平降低,与P组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 吡格列酮可能通过抑制NF- κ B、p38MAPK炎症信号通路活化,减少促炎细胞因子产生,控制炎症发生发展。

[关键词] 吡格列酮;胰腺炎;单核细胞;NF- κ B;p38 丝裂原活化蛋白激酶类

[中图分类号] R 576.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1182-04

Effect of pioglitazone on inflammatory signaling pathways induced by pancreatitis-associated ascitic fluid in human monocytic cell line THP-1

XU Ping^{1*}, WANG Jing¹, HOU Yan-qiang², LI Qing-hua¹, CHEN Cheng³, LOU Xiao-li²

1. Department of Gastroenterology, Songjiang Branch, The First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201600, China

2. Central Laboratory, Songjiang Branch, The First People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201600, China

3. Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effect of pioglitazone on inflammatory signaling pathways induced by human pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF) in human monocytic cell line THP-1. **Methods** PAAF was collected from patients with severe acute pancreatitis. The cultured THP-1 cells were divided into 4 groups: control group (C), PAAF group (A), PPAR γ agonist pioglitazone group (P), and PPAR γ antagonist GW9662 group (G). Cells in group A were stimulated with PAAF, those in group P were treated with 20 μ mol/L PPAR γ agonist pioglitazone 2 h after stimulation with PAAF, and those in group G were treated with PPAR γ antagonist GW9662, pioglitazone (30 min later) and PAAF(2 h later) in turn. After incubation for 12 h, TNF- α and IL-6 mRNA expression was measured by real-time PCR, and Western blotting analysis was used to examine the expression of the phospho-p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear transcription factor (NF- κ B) p65 levels, and I κ B. **Results** Compared with group C, TNF- α and IL-6 mRNA expression in group A was increased, NF- κ B and p38MAPK protein levels were increased, and I κ B protein level was decreased ($P < 0.05$). Compared with group A, TNF- α and IL-6 mRNA expression was decreased in group P, NF- κ B and p38MAPK protein levels were down-regulated, and I κ B protein level was increased ($P < 0.05$). Compared with group P, TNF- α and IL-6 mRNA expression was increased in group G, NF- κ B and p38MAPK protein levels were increased, and I κ B protein level was

[收稿日期] 2012-06-13 **[接受日期]** 2012-10-31

[基金项目] 上海市自然科学基金(09ZR1429100),上海市松江区卫生局“医学领先合作项目”。Supported by Natural Science Foundation of Shanghai(09ZR1429100) and Leading Medical Cooperation Project of Health Department of Songjiang, Shanghai.

[作者简介] 徐萍,博士,主任医师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-67720376, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn

decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The results show that pioglitazone can inhibit PAAF-stimulated THP-1 inflammation by blocking p38MAPK and NF- κ B signaling pathway.

[Key words] pioglitazone; pancreatitis; monocytes; NF- κ B; p38 mitogen-activated protein kinases

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11): 1182-1185]

近年研究发现, PPAR γ 激动剂能够明显抑制促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 的产生, 在胰腺炎^[1]、炎症性肠病^[2]、关节炎^[3]、肺损伤^[4]、血管损伤^[5]等疾病中具有抗炎效应。吡格列酮作为人工合成的 PPAR γ 激动剂, 相对于脂肪酸、氧化脂肪酸、类花生酸类物质等天然激动剂, 对 PPAR γ 具有更高的选择性和更强的激活特性。我们的前期实验证实吡格列酮对大鼠重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 具有干预性保护作用, 它可能通过抑制 NF- κ B 的活化及下调 ICAM 的表达, 抑制炎症反应, 减轻胰腺及远隔脏器的损伤, 提高 SAP 大鼠的生存率^[1, 6-7]。本实验拟通过体外研究, 应用胰腺炎相关性腹水 (pancreatitis-associated ascitic fluid, PAAF) 作用于人单核细胞, 模拟人体内环境, 观察吡格列酮对 PAAF 诱导的人单核细胞炎症反应的影响, 并通过 PPAR γ 拮抗剂深入分析吡格列酮发挥抗炎作用的信号转导机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人单核细胞 THP-1 (中国科学院上海细胞库), 第一链 cDNA 合成试剂盒 (MBI 公司), TRIzol 试剂盒 (Invitrogen 公司), SYBR[®] PrimeScript[®] PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司), β -actin 单克隆抗体 (Sigma 公司), lamin b1 单克隆抗体 (Carlsbad 公司), NF- κ B p65 抗体、p38MAPK 抗体、磷酸化 p38MAPK 抗体 (CST 公司), I κ B 抗体 (Millipore 公司), RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司)、胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司), BCA 蛋白检测试剂盒 (Pierce 公司), ECL 显影液 (Amersham 公司)。吡格列酮和 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 (Sigma 公司)。

1.2 PAAF 的收集处理 无菌条件下腹腔穿刺收集 3 例临床诊断为 SAP (Balthazar CT 分级达 D 级以上和伴有其他器官功能不全) 患者的腹水, 在 4 $^{\circ}$ C 条件下 9 680 \times g 离心 15 min, 提取上清并用微孔滤膜逐层过滤, 将 3 例患者腹水混合后分装, -80 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.3 细胞培养及分组 THP-1 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵育箱进行培养。将细胞分为 4 组: 对照组 (C 组)、实验组 (A 组)、吡格列酮组 (P 组)、GW9662 组 (G 组)。按 5 \times 10⁵/ml 密度将细胞接种于 6 孔板, 每孔

1 ml 细胞悬液。A 组加入 100 μ l PAAF 及 900 μ l 细胞培养液, 使得 PAAF 终浓度为 5%; P 组在加入细胞悬液后加入终浓度为 20 μ mol/L 的吡格列酮进行干预处理, 2 h 后加入终浓度为 5% 的 PAAF; G 组在吡格列酮干预前加入终浓度为 10 μ mol/L 的 GW9662 (PPAR γ 拮抗剂), 其余处理同 P 组; C 组仅加入等体积的细胞培养液。各组终体积均为 2 ml。培养 12 h 后收集细胞。

1.4 实时定量 PCR 检测 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达 采用 TRIzol 一步法抽提细胞总 RNA, 实验步骤严格按照试剂说明书进行。应用第一链 cDNA 合成试剂盒按操作说明书合成 cDNA。实时定量 PCR 在 ABI7500 (Applied Biosystems) 检测系统中进行。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 内参照 β -actin 上游引物 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3', 下游引物 5'-GGG CCG GAC TCG TCA TAC-3', 扩增产物大小为 105 bp; TNF- α 上游引物 5'-TCA TCT ACT CCC AGG TCC TCT TCA-3', 下游引物 5'-GAT GGG CTC ATA CCA GGG C-3', 扩增产物大小为 139 bp; IL-6 上游引物 5'-TAC CCC CAG GAG AAG ATT CC-3', 下游引物 5'-GCC ATC TTT GGA AGG TTC AG-3', 扩增产物大小为 185 bp。记录每个 PCR 循环延伸期的荧光范围, 用 2^{- Δ ct} 代表各组细胞 mRNA 表达。

1.5 蛋白质印迹法检测 NF- κ B p65、p38MAPK 活性及 I κ B 蛋白表达 按常规方法提取细胞核蛋白及总蛋白 (核蛋白用于检测 NF- κ B p65 蛋白表达, 总蛋白用于检测其他指标), 用 BCA 蛋白浓度分析试剂盒测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白质进行垂直电泳、转膜, 5% 脱脂牛奶封闭后分别加特异性一抗, 室温摇床孵育 2 h, 分别加入相应二抗, 室温孵育 1 h, ECL 显影。Quantity one 软件分析图片, 以相应蛋白条带的灰度值来表示 NF- κ B p65、p38MAPK 的活性及 I κ B 蛋白表达水平。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件包对实验数据进行分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用单因素方差分析, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达 由图 1 可见, C 组细胞 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 仅有少量表达;

A 组给予 PAAF 刺激后单核细胞内 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 的表达量高于 C 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);P 组应用吡格列酮干预后可降低单核细胞 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 的表达,与 A 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);G 组应用 GW9662 后可拮抗吡格列酮降低促炎细胞因子作用,与 P 组相比 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

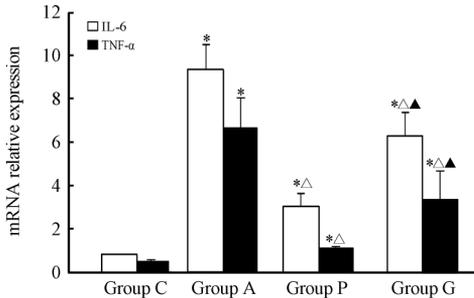


图 1 4 组细胞培养 12 h 后 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 表达变化
Fig 1 TNF- α and IL-6 mRNA expression 12 h after incubation in the 4 groups

Cells in group C were treated with culture medium, cells in group A were stimulated by PAAF, cells in group P were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ PPAR γ agonist pioglitazone before treatment with PAAF, and those in group G were treated with PPAR γ antagonist GW9662, pioglitazone and PAAF in order. * $P < 0.05$ vs group C; Δ $P < 0.05$ vs group A; \blacktriangle $P < 0.05$ vs group P. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

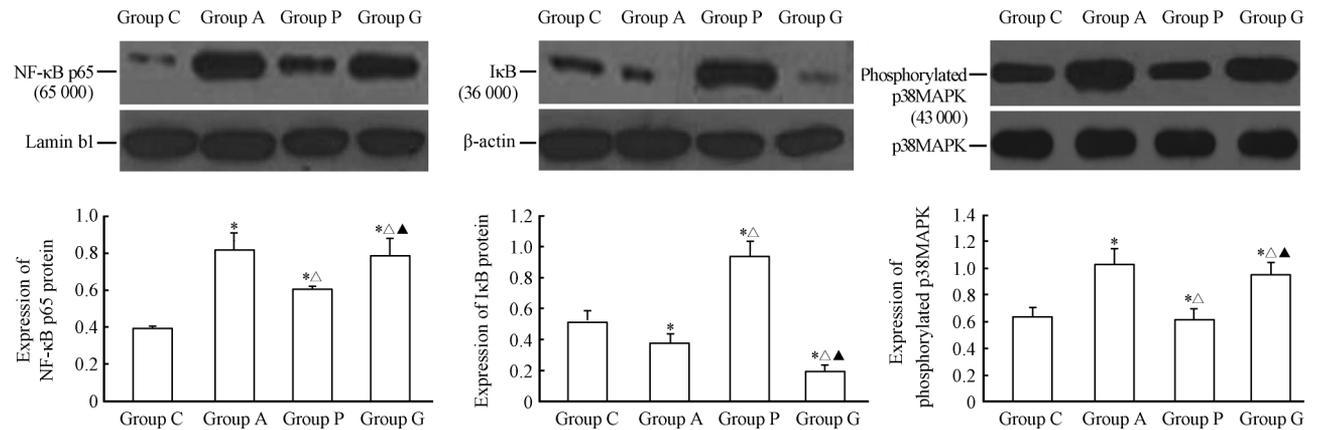


图 2 PAAF 刺激后 12 h 后细胞内 NF- κ B p65、I κ B 和磷酸化 p38MAPK 蛋白表达

Fig 2 NF- κ B p65, I κ B and phosphorylated p38MAPK expression 12 h after incubation in 4 different groups

Cells in group C were treated with culture medium, cells in group A were stimulated by PAAF, cells in group P were treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ PPAR γ agonist pioglitazone before treatment with PAAF, and cells in group G were treated with PPAR γ antagonist GW9662, pioglitazone and PAAF in order. * $P < 0.05$ vs group C; Δ $P < 0.05$ vs group A; \blacktriangle $P < 0.05$ vs group P. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

即活化,进入核内与相应 DNA 序列结合,调控诸多促炎细胞因子表达。TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 等炎症因子基因启动子上都具有 NF- κ B 的结合位点,因此这些因子的表达在基因水平上受到 NF- κ B

2.2 NF- κ B p65、I κ B 及磷酸化 p38MAPK 蛋白表达 由图 2 可见,C 组细胞核内可检测到 NF- κ B p65 弱表达,细胞内可检测到 I κ B 蛋白表达和磷酸化 p38MAPK 弱表达;经 PAAF 刺激后,A 组、P 组、G 组细胞核内 NF- κ B p65 表达量增加,细胞 I κ B 蛋白表达量降低,磷酸化 p38MAPK 表达量增加,与 C 组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);P 组应用吡格列酮干预后可见细胞核内 NF- κ B p65 表达量降低,细胞 I κ B 蛋白表达量较增加,磷酸化 p38MAPK 表达量降低,与 A 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);G 组应用 GW9662 后可拮抗吡格列酮作用,细胞核 NF- κ B p65 表达量增加,细胞 I κ B 蛋白表达量降低,磷酸化 p38MAPK 表达量增加,与 P 组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

急性胰腺炎时可通过激活多种信号通路产生 IL-6、TNF- α 等促炎细胞因子,其中 NF- κ B 及 p38MAPK 是细胞因子产生的两条主导信号通路^[8]。NF- κ B 是一种广泛存在于细胞中具有多向性转录调节作用的蛋白质因子,属于 NF- κ B/REL 家族成员。静息状态下 NF- κ B 与抑制蛋白 I κ B 结合,以无活性状态存在胞浆内。细胞外多种刺激可以活化 I κ B 激酶 (IKK) 而使 I κ B 磷酸化后降解,NF- κ B 随

的调控^[9]。p38MAPK 信号通路主要参与应激条件下细胞炎症反应和细胞凋亡过程^[10]。p38MAPK 通路激活与多种炎性细胞因子(如 IL-1、TNF- α 和 IL-6 等)的释放有关,故被认为是控制炎症反应最主要

的成员之一。Shibata 等^[11]研究神经系统小胶质细胞炎症反应发现,吡格列酮可通过抑制 NF- κ B 及 p38MAPK 活化保护神经元,阻碍疾病进展。Wei-guo 等^[12]发现吡格列酮可抑制血管紧张素 II 引起的树突状细胞的 NF- κ B 及 p38MAPK 活化。但吡格列酮是否也通过抑制人单核细胞 NF- κ B 及 p38MAPK 活化而发挥抗炎作用,现尚无研究报道。

我们前期的研究结果显示 NF- κ B 的活性与 SAP 大鼠胰腺局部炎症反应程度呈正相关,而应用吡格列酮干预后,能够减轻 SAP 大鼠的炎症程度,抑制 NF- κ B 的激活,减少细胞间黏附分子-1 的表达^[7]。本实验结果显示人单核细胞经 PAAF 作用后炎症因子 IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达升高,细胞核 NF- κ B p65 表达增加,即 NF- κ B 活化,而应用吡格列酮后可减少 IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达,并抑制 NF- κ B 激活;应用 GW9662 后 IL-6、TNF- α 基因表达和 NF- κ B p65 表达再次升高,提示吡格列酮可能通过 PPAR γ 依赖机制发挥对 NF- κ B 信号通路的抑制作用。此外,我们检测了 4 组细胞 I κ B 蛋白表达变化,发现对照组 I κ B 蛋白正常表达,PAAF 刺激后 I κ B 蛋白减少,吡格列酮作用后 I κ B 蛋白增加,与细胞核 NF- κ B p65 表达量变化相反。因此我们推测,吡格列酮保护人单核细胞、发挥抗炎作用与其减少 I κ B 蛋白降解,继而抑制 NF- κ B 活化密切相关。Zingarelli 等^[13]通过建立多种细菌性败血症的动物实验模型,也提出 PPAR γ 激动剂 15d-PGJ2 或环格列酮能够改善病情,减轻模型炎症与 PPAR γ 激动剂降低 IKK 的活性、减少 I κ B 的降解相关,与本研究结果一致。

本实验同时检测了 p38MAPK 的磷酸化水平。正常 THP-1 细胞中有磷酸化 p38MAPK 弱表达,说明 p38MAPK 信号转导通路参与维持细胞的基础生理状态。PAAF 刺激细胞后,磷酸化的 p38MAPK 表达明显升高,提示 p38MAPK 在单核细胞炎症反应中持续活化,促进炎症发生、发展。应用吡格列酮干预处理细胞后可一定程度下调 p38MAPK 的磷酸化水平,而 GW9662 可拮抗吡格列酮的这一作用,提示吡格列酮抗炎机制可能包括抑制 p38MAPK 促炎细胞信号通路。

综上所述,吡格列酮干预处理可能是通过抑制 NF- κ B p65 和 p38MAPK 的活性,下调下游促炎细胞因子水平从而减轻 PAAF 刺激的单核细胞炎症反应,提示在 SAP 早期采取积极的干预措施,有望阻止促炎细胞因子的级联释放,减少 SAP 并发症的发生。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Xu P, Xu K, Wang J, Jiang J P, Chen L Q. Pioglitazone: a promising therapeutic tool in sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56:1082-1089.
- [2] Sánchez-Hidalgo M, Martín A R, Villegas I, de la Lastra C A. Rosiglitazone, a PPAR γ ligand, modulates signal transduction pathways during the development of acute TNBS-induced colitis in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 562:247-258.
- [3] Afif H, Benderdour M, Mfuna-Endam L, Martel-Pelletier J, Pelletier J P, Duval N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 expression is diminished in human osteoarthritic cartilage and is down regulated by interleukin-1beta in articular chondrocytes[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9:R31.
- [4] Chima R S, Hake P W, Piraino G, Mangeshkar P, Denenberg A, Zingarelli B. Ciglitazone ameliorates lung inflammation by modulating the inhibitor kappaB protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway after hemorrhagic shock[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36:2849-2857.
- [5] Rinaldi B, Pieri L, Donniacuo M, Cappetta D, Capuano A, Domenici L, et al. Rosiglitazone reduces the inflammatory response in a model of vascular injury in rats[J]. *Shock*, 2009, 32:638-644.
- [6] 谢俊锋, 刘志坚, 白爱平, 姜景平, 范海青, 陈江, 等. 吡格列酮对重症急性胰腺炎大鼠肺组织中 ICAM-1 表达的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17:667-671.
- [7] Xu P, Zhou X J, Chen L Q, Chen J, Xie Y, Lv L H, et al. Pioglitazone attenuates the severity of sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13:1983-1988.
- [8] Liu H S, Pan C E, Liu Q G, Yang W, Liu X M. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9:2513-2518.
- [9] Schmid R M, Adler G. NF-KappaB/rel/IkappaB; implications in gastrointestinal diseases [J]. *Gastroenterology*, 2000, 118:1208-1228.
- [10] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway[J]. *Cell Res*, 2005, 15:11-18.
- [11] Shibata N, Kawaguchi-Niida M, Yamamoto T, Toi S, Hirano A, Kobayashi M. Effects of the PPAR γ activator pioglitazone on p38 MAP kinase and IkappaB α in the spinal cord of a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neuropathology*, 2008, 28:387-398.
- [12] Wei-guo Z, Hui Y, Shan L, Yun Z, Wen-cheng N, Fu-lin Y, et al. PPAR-gamma agonist inhibits Ang II-induced activation of dendritic cells via the MAPK and NF-kappaB pathways[J]. *Immunol Cell Biol*, 2010, 88:305-312.
- [13] Zingarelli B, Sheehan M, Hake P W, O'Connor M, Denenberg A, Cook J A. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-delta (12, 14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways[J]. *J Immunol*, 2003, 171:6827-6837.