

胰高血糖素样肽-1 对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的作用及机制探讨

刘 美, 苟 思, 陈海涛, 陈重华[△]

四川大学华西药学院 药理教研室(成都 610041)

【摘要】 目的 探究在博来霉素(BLM)诱导的小鼠肺纤维化疾病上,胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的治疗价值和可能机制。**方法** 采用气管内一次性灌注 BLM(3 mg/kg)的方法建立小鼠肺部纤维化模型,同时腹腔注射 GLP-1 类似物利拉鲁肽(2 mg/kg),每天 1 次,连续给药 28 d。在注入 BLM 28 d 后,测定肺泡灌洗液中的细胞总数、巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的数量以及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的质量浓度;取肺组织进行 HE 染色和 Masson 染色;采用 Ashcroft 评分标准评定纤维化程度等级,测定羟脯氨酸(HYP)的含量;实时荧光定量 PCR 和免疫印迹法测定 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的表达;免疫印迹法评估核因子(NF)- κ B p65 的磷酸化,通过核转录因子酶联免疫试剂盒测定 NF- κ B p65 与 DNA 的结合。**结果** GLP-1 降低了 BLM 小鼠肺组织炎症细胞的浸润和肺泡灌洗液中 TGF- β 1 的含量, Ashcroft 评分等级和 HYP 含量亦降低,同时, BLM 导致的 α -SMA 和 VCAM-1 的过表达也被阻止,磷酸化 NF- κ B p65/总 NF- κ B p65 比值减小, NF- κ B p65 的 DNA 结合活性减弱。**结论** GLP-1 可能通过抑制 NF- κ B 激活,减轻 BLM 诱导的小鼠肺部炎症和纤维化。

【关键词】 胰高血糖素样肽-1 肺纤维化 转化生长因子- β 1 核转录因子- κ B

The Study of the Effect and Mechanism of Glucagon Like Peptide-1 in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice
LIU Mei, GOU Si, CHEN Hai-tao, CHEN Zhong-hua[△]. Department of Pharmacology, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: chengzhonghua-1@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the potential value and mechanisms of glucagon like peptide-1 (GLP-1) on bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods** Mice were treated with a single sublethal dose of BLM (3 mg/kg) via intratracheal infusion to produce pulmonary fibrosis, and then liraglutide (2 mg/kg) was given to the mice for 28 days by intraperitoneal injection. 28 days after BLM infusion, the number of total cells, macrophages and neutrophils, lymphocytes, and the content of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson's trichrome (MT) staining were performed. The Ashcroft score and hydroxyproline content were analyzed. Real time(RT)-qPCR and Western blot were used to evaluate the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). The phosphorylation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 was also assessed by Western blot. DNA binding of NF- κ B p65 was measured through TransAMTM NF- κ B p65 transcription factor ELISA kit. **Results** GLP-1 reduced inflammatory cells infiltration and the content of TGF- β 1 in BLAF in mice with BLM injection. The Ashcroft score and hydroxyproline content were decreased by GLP-1 administration. Meanwhile, BLM-induced overexpression of α -SMA and VCAM-1 were blocked by GLP-1 treatment in mice. GLP-1 also reduced the ratio of phospho-NF- κ B p65/total-NF- κ B p65 and NF- κ B p65 DNA binding activity in BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. **Conclusion** BLM-induced lung inflammation and pulmonary fibrosis were significantly alleviated by GLP-1 treatment in mice, possibly through inactivation of NF- κ B.

【Key words】 Glucagon like peptide-1 Pulmonary fibrosis Transforming growth factor-beta 1
Nuclear factor-kappa B

由肺损伤和炎症导致的特发性肺间质纤维化(IPF)是一种渐进的病因不明的间质性肺病,死亡率很高,糖皮质激素和免疫抑制剂治疗结果不甚理

想,患者 5 年生存率低于 50%^[1],因此我们需要探索新的治疗靶点。博来霉素(BLM)是临床治疗癌症的药物,长期用药可诱导肺部损伤及肺纤维化。因此,BLM 诱导的肺纤维化模型是经典的 IPF 动物模型^[2]。

持续的炎症导致成纤维细胞过度增殖和异常的细胞外基质(ECM)积累,从而造成肺纤维化。转化生长因子是 IPF 病理过程中关键的调节因子,在肺组织炎症与纤维化过程中起重要作用。研究人员证实, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达和 ECM 的积聚标志着成纤维细胞向肌成纤维细胞的转变^[3]。先前的研究显示,活化的核因子(NF)- κ B 在炎症条件下连接到血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的启动子上从而促进 VCAM-1 的表达^[4],动物模型中 VCAM-1 的表达也依赖于 NF- κ B 信号通路^[5]。到目前为止,大量研究表明 NF- κ B 会显著促进肺纤维化,在协调多种炎症相关基因的表达中发挥着重要作用^[6]。

胰高血糖素样肽-1(GLP-1)由肠黏膜 L 细胞分泌,是胰高血糖素原基因翻译后蛋白酶解加工的产物,可促进高糖诱导的胰岛素的分泌。GLP-1 受体(GLP-1R)是跨膜蛋白受体,在各组织广泛表达。一些研究发现,在离体鼠肺中分布着高亲和力的 GLP-1R^[7]。利拉鲁肽是一种广泛用于治疗 2 型糖尿病的 GLP-1R 激动剂。近来,一项研究发现利拉鲁肽通过抑制 NF- κ B 的活性而表现出抗炎作用^[8]。因此,我们推测 GLP-1 类似物利拉鲁肽能够减弱 BLM 诱导的小鼠肺纤维化。本研究通过 BLM 诱导建立小鼠肺纤维化模型,旨在探究 GLP-1 是否有治疗小鼠肺部炎症和肺纤维化的潜在价值,以及治疗过程中的可能机制。

1 材料和方法

1.1 动物

8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,18~22 g,四川大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(川)2013-113,适应性喂养 1 周。饲养环境:温度 20~25 ℃,湿度 70%,12 h 明暗周期可控的房间,自由获取食物和水。

1.2 药品、试剂与仪器

戊巴比妥钠、注射用盐酸博莱霉素、羟脯氨酸(HYP)标准品、兔抗 α -SMA 多克隆抗体(美国 Sigma 公司);利拉鲁肽注射液(丹麦 Novo Nordisk 公司);小鼠转化生长因子- β 1(TGF- β 1)ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司);Trizol 试剂、PrimerScript PCR 试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒(日本 TaKaRa Bio 公司);兔抗 VCAM-1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗磷酸化(phospho)-NF- κ B p65 多克隆抗体、兔抗 NF- κ B

p65 多克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司);兔抗 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG、考马斯亮蓝增强型蛋白质定量试剂盒(武汉博士德生物有限公司);TransAMTM NF- κ B p65 化学因子试剂盒(美国 Active Motif 公司)。

24G 静脉留置针,美国 BD 公司;UV-1601 紫外分光光度计,日本 SHIMADZU 公司;小型垂直板电泳槽、iQTM 5 实时荧光定量 PCR 检测系统、GelDoc1000 凝胶成像系统,美国 Santa Cruz 公司;ST-360 酶标仪,科华实验系统有限公司。

1.3 方法

1.3.1 BLM 诱导肺纤维化的动物模型的建立 将 40 只小鼠随机分成 4 组($n=10$):空白对照组,利拉鲁肽对照组(GLP-1 组),博莱霉素组(BLM 组),博莱霉素和利拉鲁肽组(BLM+GLP-1 组)。2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,BLM 组和 BLM+GLP-1 组气管内一次性灌注 3 mg/kg BLM 诱导产生肺纤维化^[3]。空白对照组和 GLP-1 组小鼠气管内灌注等量无菌生理盐水。GLP-1 组和 BLM+GLP-1 组腹腔注射 2 mg/kg 利拉鲁肽,每天 1 次,连续给药 28 d。空白对照组和 BLM 组腹腔注射等量无菌生理盐水。

1.3.2 收集肺泡灌洗液(BALF)和细胞计数 造模后第 28 d 腹腔给药后,小鼠腹主动脉放血处死,气管插管灌注 1.0 mL PBS 制得 BALF^[9]。样品 4 ℃、1000×g 离心 5 min,细胞球(沉渣)洗两次并重悬于 50 μ L PBS 缓冲液中。血细胞计数器计数总细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。无细胞的上清液储存在-70 ℃冰箱中用于生化指标的测量。

1.3.3 ELISA 检测 TGF- β 1 的表达 使用鼠型 TGF- β 1 酶联免疫试剂盒测定 BALF 上清液中 TGF- β 1 的质量浓度,操作根据试剂盒说明书进行。

1.3.4 组织病理学检查 将小鼠右肺下叶剪下固定在体积分数为 10%的中性甲醛中,苏木素-伊红染色(HE 染色),根据 Ashcroft 评分标准^[10]评分,分析纤维化程度;Masson 三色染色(MT)观察胶原沉积。

1.3.5 HYP 含量测定 精确称取左肺组织 50 mg,剪碎,加水解液水解完全,定容至 100 mL 后过滤收集滤液,活性炭除色素,再过滤,取 1 mL 调 pH 再定容至 50 mL 备用。取上述样品 1 mL,经氯胺 T 氧化后,与对二甲氨基苯甲醛反应生成红色化合物,测定 550 nm 处的吸光度,量化小鼠肺部 HYP

含量,代表小鼠左肺组织总胶原蛋白含量^[11]。

1.3.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 α -SMA 和 VCANH mRNA 的表达 引物序列如下:
 α -SMA (F) 5'-AATGACCCAGATTATGTTTGA GAC-C-3' 和 (R) 5'-TCCAGAGTCCAGCACAAT ACCAG-3';VCAM-1 (F) 5'-CATCTAAGAGTGT CAAAGAGGGAG-3'和(R) 5'-AGCCATCCACAG ACTTTAATACCAT-3'; β -actin (F) 5'- GATTA CTGCTCTGGCTCCTAGC-3'和 (R) 5'-ACTCAT CGTACTCCTGCTTGCT-3',小鼠 β -actin 为内参基因。Trizol 试剂提取右肺组织总 RNA 后,设置扩增条件为:95 ℃ 30 s,1 个循环;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环,按 PrimerScript PCR 试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒操作,2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法检测各目的基因的相对表达量^[12]。

1.3.7 免疫印迹法检测 α -SMA、VCAM-1 和 NF- κ B p65 蛋白的表达 取-80 ℃保存的右肺中叶制组织匀浆,4 ℃、14 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。牛血清蛋白质 (BSA) 为标准品,使用 Bradford 蛋白实验试剂盒测定蛋白含量。将每个样品 (25 μ g) 中包含的等量蛋白质在 8% Tris-glycine SDS 聚丙烯酰胺凝胶中分解。电泳后,分离的蛋白条带湿法转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜。非特异性结合膜用 5% 脱脂牛奶室温震荡封闭 1 h。PVDF 膜 4 ℃ 孵育 24 h,加入兔抗 α -SMA 多克隆抗体 (1 : 200)、兔抗 VCAM-1 多克隆抗体 (1 : 500)、兔

抗 phospho-NF- κ B p65 多克隆抗体 (1 : 1000)、兔抗 NF- κ B p65 多克隆抗体 (1 : 1000) 和兔抗 β -actin 多克隆抗体 (1 : 1000)。按 1 : 10 000 比例加入稀释了的二抗 (辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 稀释于 5% 脱脂牛奶-TBST),室温孵育 2 h。使用 ECL 试剂盒、GelDoc1000 凝胶成像系统使免疫检测蛋白直观化,利用 Quantity One 软件分析。以目的蛋白光密度值和内参蛋白 β -actin 光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.3.8 NF- κ B p65 DNA 结合活性实验 使用 TransAMTM NF- κ B p65 化学因子试剂盒,按照说明书检测 NF- κ B p65 DNA 结合活性。

1.3.9 统计学方法 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单向或双向方差 (ANOVA) 分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GLP-1 对 BALF 中细胞数量和 TGF- β 1 质量浓度的影响

见表 1。结果显示,空白对照组和 GLP-1 组细胞计数、TGF- β 1 质量浓度差异无统计学意义 ($P>0.05$),而 BLM 引起了大量炎症细胞浸润 (总细胞、中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞成分明显升高,差异有统计学意义),TGF- β 1 质量浓度也显著增加,差异有统计学意义,GLP-1 治疗后炎症细胞的数量和 TGF- β 1 的质量浓度降低 ($P<0.05$)。

表 1 小鼠 BALF 中炎症细胞的数量和 TGF- β 1 的质量浓度 ($\bar{x}\pm s,n=10$)
Table 1 The count of inflammatory cells and the mass concentration of TGF- β 1 in BALF in mice ($\bar{x}\pm s,n=10$)

Group	Total cells/ 10 ⁴ mL ⁻¹	Neutrophils/ 10 ⁴ mL ⁻¹	Macrophages/ 10 ⁴ mL ⁻¹	Lymphocytes/ 10 ⁴ mL ⁻¹	TGF- β 1/ (μ g/mL)
Control	6.5 $\pm$ 0.55	5.0 $\pm$ 0.79	0.8 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.07	41.13 $\pm$ 2.41
GLP-1	6.1 $\pm$ 0.32	5.2 $\pm$ 0.47	0.7 $\pm$ 0.07	1.1 $\pm$ 0.21	42.66 $\pm$ 2.54
BLM	12.3 $\pm$ 0.69 Δ	6.5 $\pm$ 0.58 Δ	2.8 $\pm$ 0.13 Δ	3.1 $\pm$ 0.09 Δ	78.52 $\pm$ 3.13 Δ
BLM+GLP-1	10.8 $\pm$ 0.72 Δ ·*	5.6 $\pm$ 0.35 Δ ·*	1.6 $\pm$ 0.12 Δ ·*	2.1 $\pm$ 0.15 Δ ·*	64.17 $\pm$ 2.88 Δ ·*

$\Delta P<0.05$, vs. control group; * $P<0.05$, vs. BLM group

2.2 GLP-1 对肺纤维化的影响

组织学检查显示 BLM 能够诱导肺部产生纤维化病变。病理变化包括肺泡壁明显增厚、大量炎症细胞浸润和细胞间隙中胶原蛋白的过度沉积。GLP-1 治疗后,上述病理变化有所减轻。空白对照组、GLP-1 组可观察到正常的组织细胞。Ashcroft 评分和 HYP 含量结果显示,与空白对照组相比,BLM 组小鼠显示出更高的 Ashcroft 分数和 HYP 含量;而相对于 BLM 组,BLM+GLP-1 组的 Ashcroft 分数和 HYP 含量均显著降低 (表 2,图 1)。

表 2 小鼠肺组织 Ashcroft 分数和 HYP 含量的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of the Ashcroft score and HYP content in mice ($\bar{x}\pm s$)

Group	<i>n</i>	Ashcroft score	HYP/ (μ g/mg)
Control	10	0.33 $\pm$ 0.027	36.82 $\pm$ 2.71
GLP-1	10	0.30 $\pm$ 0.065	34.51 $\pm$ 2.84
BLM	10	6.25 $\pm$ 0.184 Δ	76.12 $\pm$ 4.19 Δ
BLM+GLP-1	10	2.74 $\pm$ 0.031 Δ ·*	58.33 $\pm$ 3.77 Δ ·*

$\Delta P<0.05$, vs. control group; * $P<0.05$, vs. BLM group

2.3 GLP-1 对肺组织 α -SMA 和 VCAM-1 表达的影响

见表 3,图 2。RT-qPCR 和蛋白印迹法结果显示,BLM 组小鼠肺组织 α -SMA 和 VCAM-1 mRNA 及蛋白表达明显上调,差异有统计学意义($P <$

0.05)。GLP-1 治疗后,BLM 导致的 α -SMA 和 VCAM-1 的过表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

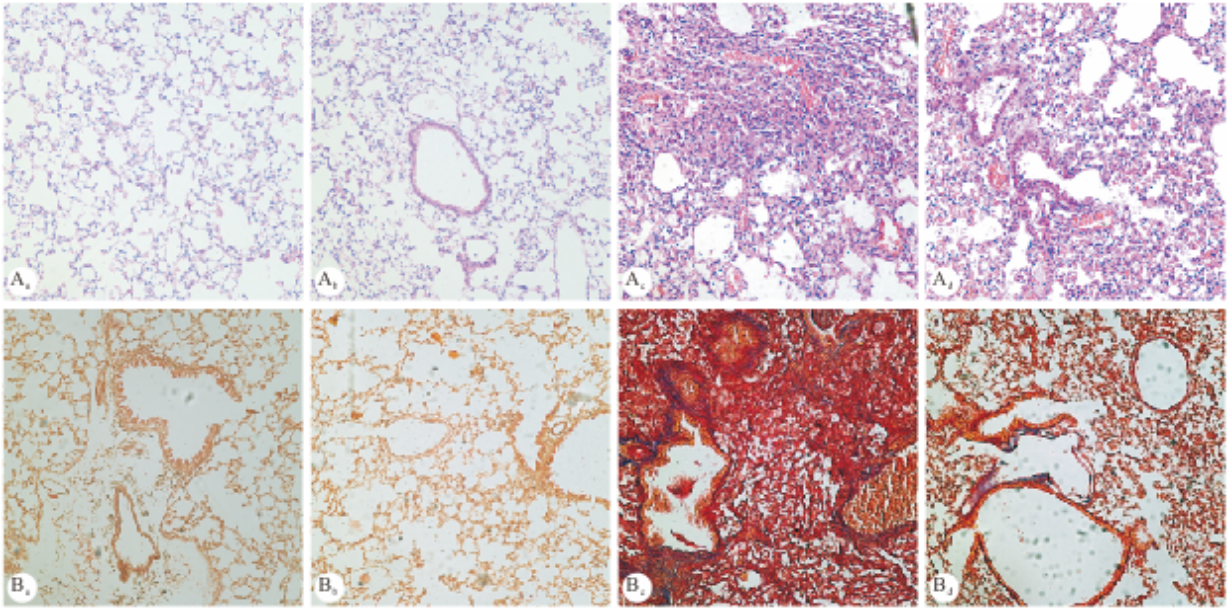


图 1 GLP-1 减弱 BLM 诱导的小鼠肺纤维化。×200

Fig 1 GLP-1 attenuates BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. ×200

A: HE staining; B: Masson staining; a: Control group; b: GLP-1 group; c: BLM group; d: BLM+GLP-1 group

表 3 小鼠肺组织中 α -SMA、VCAM-1 mRNA 和蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The mRNA and protein expression of α -SMA and VCAM-1 in lung of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	α -SMA mRNA	VCAM-1 mRNA	α -SMA protein	VCAM-1 protein
Control	1.000±0.047	1.000±0.027	0.400±0.027	0.480±0.035
GLP-1	0.960±0.033	1.060±0.025	0.420±0.048	0.350±0.061
BLM	1.540±0.051 [△]	1.960±0.084 [△]	0.960±0.132 [△]	0.980±0.184 [△]
BLM+GLP-1	1.310±0.029 ^{△,*}	1.640±0.038 ^{△,*}	0.700±0.059 ^{△,*}	0.650±0.037 ^{△,*}

△ $P < 0.05$, vs. control group; * $P < 0.05$, vs. BLM group

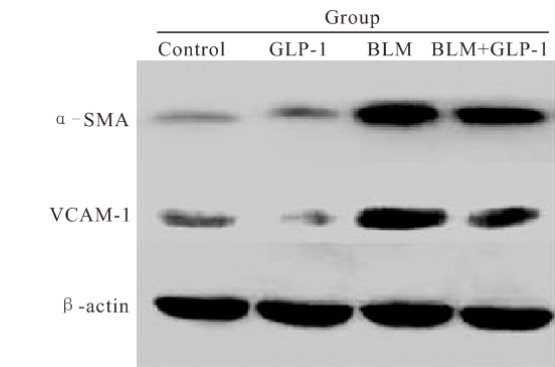


图 2 GLP-1 抑制 BLM 诱导的肺纤维化小鼠肺组织中 α -SMA 和 VCAM-1 蛋白的表达

Fig 2 GLP-1 reduces the protein expression of α -SMA and VCAM-1 in lung

2.4 GLP-1 对 NF- κ B 激活和 DNA 结合活性的影响

见表 4,图 3。免疫印迹法和 ELISA 结果显示,BLM 组的 NF- κ B p65 蛋白磷酸化水平、DNA 结合活性明显升高,而 GLP-1 治疗后,上述指标均明显降低。

表 4 小鼠肺组织中 phospho-NF- κ B p65 蛋白的表达和细胞核蛋白 NF- κ B p65 的质量浓度($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The protein expression of phospho-NF- κ B p65 and the mass concentration of nuclear protein NF- κ B p65 in lung of mice ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Phospho-NF- κ B p65/ total -NF- κ B p65	NF- κ B p65/ (ng/mL)
Control	10	0.52±0.033	1.00±0.18
GLP-1	10	0.45±0.025	1.10±0.06
BLM	10	0.92±0.131 [△]	2.46±0.36 [△]
BLM+GLP-1	10	0.66±0.074 ^{△,*}	1.64±0.29 ^{△,*}

△ $P < 0.05$, vs. control group; * $P < 0.05$, vs. BLM group

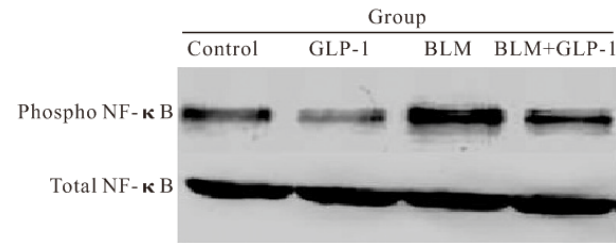


图3 GLP-1抑制BLM诱导的NF- κ B的激活

Fig 3 GLP-1 inhibits NF- κ B p65 activation in BLM induced pulmonary fibrosis in mice

3 讨论

肺纤维化的特征是ECM的过度沉积和肺结构的重构,是一种能够影响血管内皮细胞和肺泡上皮细胞间隙的间质性肺病。当炎症细胞浸润肺泡间隙,胶原过度沉积,气体交换受到抑制,功能性肺泡单位减少。IPF是最常见和最严重的间质性肺病,病因不明,发病率高。尽管有许多药物治疗,但无确切疗效,且患者的中位生存时间仅约2~4年。因此肺移植成了患者能够选择的唯一可行的治疗方法^[1]。

利拉鲁肽是GLP-1R激动剂,与人类内源性GLP-1有97%的序列一致性^[13],能模拟GLP-1的活动,克服药代动力学限制。离体鼠肺隔膜组织和人类II型肺泡细胞上都有GLP-1R。许多研究报道了GLP-1的抗炎作用,但对肺纤维化的价值仍然不得而知。致病假说认为首先是肺泡上皮细胞慢性损伤,紧接着炎症前细胞爆发,最后纤维增生因子释放,这些病变诱导了正常的组织修复反应^[14]。IPF患者的肺组织中发现了炎症细胞浸润,组织学观察也认定这些炎症细胞在IPF动物模型的纤维化进程中起到极其重要的作用^[15]。许多研究证明GLP-1能够抑制炎症反应中巨噬细胞和淋巴细胞的激活^[13]。最近,GUO等^[16]发现利拉鲁肽能够显著降低一些炎症性细胞因子的血清水平。本研究结果显示,肺部炎症细胞的浸润及炎症性细胞因子的表达将维持纤维化阶段,而GLP-1能够显著降低BALF中的中性粒细胞巨噬细胞、淋巴细胞的水平和Ashcroft分数,尤其是能够抑制BLM诱导的肺纤维化小鼠HYP含量的增加。这些结果表明GLP-1能够减弱BLM诱导的小鼠肺部炎症和肺纤维化。

炎症细胞使肺组织产生趋化因子和细胞因子来修复和重构肺结构,TGF- β 1是巨噬细胞分泌的一

种关键的促纤维化因子,是成纤维细胞修复反应的中枢。在动物模型和IPF患者的肺组织中,TGF- β 1明显增加^[17]。TGF- β 1可以调控成纤维细胞的转移、增殖和分化,这种分化的特点是将导致 α -SMA的表达和ECM的沉积。 α -SMA被认为是肌成纤维细胞的标志。本研究结果表明GLP-1降低了小鼠肺组织中BLM诱导的TGF- β 1和 α -SMA过表达。VCAM-1结合其它黏附分子共同调节白细胞和组织炎症。在炎症条件下,内皮细胞中VCAM-1的表达主要被活性氧诱导。同时,通过阻断白细胞与VCAM-1的结合,或者抑制VCAM-1信号转导,都能够减轻炎症反应。利拉鲁肽有潜在的抑制人类血管内皮细胞中VCAM-1 mRNA和蛋白表达的能力^[18]。本研究结果也表明,GLP-1显著抑制了BLM诱导的肺纤维化小鼠VCAM-1 mRNA和蛋白的表达。NF- κ B在炎症和纤维化反应中发挥着重要作用。高浓度的活性氧激活NF- κ B,导致血管内皮细胞中VCAM-1的表达。有研究者认为GLP-1能够显著降低巨噬细胞的浸润,并且能够直接抑制炎症通路^[19],这一点与早前的报告一致,即利拉鲁肽通过作用于血管内皮细胞抑制NF- κ B的激活从而发挥抗炎作用^[18]。本研究结果也表明,BLM诱导的肺纤维化小鼠的phospho-NF- κ B p65蛋白水平显著升高,而GLP-1治疗后phospho-NF- κ B p65蛋白水平受到抑制。来自动物模型和人类研究的证据表明,炎症和纤维化是IPF决定性阶段。持续的炎症反应的特点是炎症细胞浸润和炎性细胞因子增加,包括TGF- β 1、TNF- α 、白细胞介素-6和诱导型一氧化氮合酶。这些细胞因子启动子区域有NF- κ B的结合位点,因此NF- κ B可以调节基因表达。NF- κ B通路的激活取决于I κ B激酶,I κ B α 的降解导致NF- κ B p50/NF- κ B p65二聚体磷酸化和易位,最终导致各种基因的转录^[20]。本研究发现,BLM诱导的NF- κ B p65 DNA结合活性的增强能够通过注射GLP-1而缓解。因此,我们推断GLP-1在BLM诱导的肺纤维化中的抗炎和抗纤维化作用可能涉及到NF- κ B的失活。

综上,本研究证实GLP-1可能通过抑制NF- κ B的激活,从而减弱BLM诱导的小鼠肺部炎症和纤维化。提示GLP-1可能对肺纤维化有潜在益处。然而,GLP-1治疗肺纤维化的具体分子机制还有待确定,应进行更多的基础研究和临床研究进一步探索潜在机制。

参 考 文 献

- [1] RAGHU G. Idiopathic pulmonary fibrosis: guidelines for diagnosis and clinical management have advanced from consensus-based in 2000 to evidence-based in 2011. *Eur Respir J*, 2011, 37(4): 743-746.
- [2] CHUA FJ, GAULDIE J, LAURENT GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(1): 9-13.
- [3] VYALOV SL, GABBIANI G, KAPINCI Y. Rat alveolar myofibroblasts acquire alpha-smooth muscle actin expression during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*, 1993, 143(6): 1754-1765.
- [4] COOK-MILLS JM, MARCHESE ME, ABDALA-VALENCIA H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(6): 1607-1638.
- [5] TONG QS, ZHENG LD, LIN L, *et al.* Hypoxia-induced mitogenic factor promotes vascular adhesion molecule-1 expression via the PI-3K/Akt-NF-kappaB signaling pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(4): 444-456.
- [6] LI Q, VERMA IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734.
- [7] RICHTER G, GKE R, GKE B, *et al.* Characterization of receptors for glucagon-like peptide-1(7-36)amide on rat lung membranes. *FEBS Lett*, 1990, 267(1): 78-80.
- [8] HATTORI Y, JOJIMA T, TOMIZAWA A, *et al.* A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia*, 2010, 53(10): 2256-2263.
- [9] ZHU T, ZHANG W, WANG DX, *et al.* Rosuvastatin attenuates mucus secretion in a murine model of chronic asthma by inhibiting the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 125(8): 1457-1464.
- [10] ASHCROFT T, SIMPSON JM, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467-470.
- [11] WOESSNER JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*, 1961, 93: 440-447.
- [12] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] GARBER AJ. Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: a review of their efficacy and tolerability. *Diabetes Care*, 2011, 34(Suppl 2): S279-S284.
- [14] NOBLE PW, HOMER RJ. Idiopathic pulmonary fibrosis: new insights into pathogenesis. *Clin Chest Med*, 2004, 25(4): 749-758.
- [15] HAMMAN L, RICH AR. Fulminating diffuse interstitial fibrosis of the lungs. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 1935, 51: 154-163.
- [16] GUO N, SUN J, CHEN H, *et al.* Liraglutide prevents diabetes progression in prediabetic OLETF rats. *Endocr J*, 2013, 60(1): 15-28.
- [17] SCOTTON CJ, CHAMBERS RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*, 2007, 132(4): 1311-1321.
- [18] LIU HB, DEAR AE, KNUDSEN LB, *et al.* A long-acting glucagon-like peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *J Endocrinol*, 2009, 201(1): 59-66.
- [19] LEE YS, PARK MS, CHOUNG JS, *et al.* Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*, 2012, 55(9): 2456-2468.
- [20] 张晓晔, 周 妍, 刘卫青, 等. 核因子 κ B 反义寡核苷酸对博来霉素致小鼠肺间质纤维化形成及白细胞介素 4 表达的影响. *中华医学杂志*, 2007, 87(3): 195-199.

(2016-11-10 收稿, 2017-03-01 修回)

编辑 余 琳