

PPAR δ 激动剂GW501516调控细胞自噬对脓毒症小鼠肠黏膜屏障的影响

陈凯立, 王婷, 罗智浩

(广东省中医院海南医院急诊科, 海口 570203)

摘要 目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体 δ (PPAR δ) 激动剂GW501516对脓毒症小鼠肠黏膜屏障的影响及其机制。方法 将脓毒症模型小鼠分为model组、GW501516组和GW501516+雷帕霉素 (Rap) 组, 另设置空白对照组 (sham组)。通过HE染色观察小肠黏膜病理损伤, ELISA检测血清中D-乳酸 (D-LA) 和二胺氧化酶 (DAO) 水平及小肠组织中分泌型免疫球蛋白A (sIgA) 和炎性细胞因子水平, 透射电子显微镜下观察小肠组织自噬体数量, Western blotting检测小肠组织中PPAR δ 及自噬相关蛋白表达水平。结果 与sham组比较, model组小鼠肠黏膜损伤严重, 血清中D-LA和DAO水平及小肠组织中sIgA和炎性细胞因子水平显著升高, 小肠组织出现过度自噬, PPAR δ 蛋白表达水平显著降低 (均 $P < 0.05$)。与model组比较, GW501516组小鼠肠黏膜损伤明显减轻, 血清中D-LA和DAO水平及小肠组织中sIgA和炎性细胞因子水平显著降低, 小肠组织的过度自噬被抑制, PPAR δ 蛋白表达水平显著升高 (均 $P < 0.05$)。Rap可显著抑制GW501516对脓毒症小鼠肠黏膜损伤的改善作用。结论 GW501516可通过抑制细胞自噬改善脓毒症小鼠肠黏膜屏障损伤。

关键词 脓毒症; GW501516; 过氧化物酶体增殖物激活受体 δ ; 自噬; 肠黏膜屏障损伤

中图分类号 R574.5 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2025)03-0246-06

网络出版地址 <https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250318.1426.004>

DOI: 10.12007/j.issn.0258-4646.2025.03.011

Effects of PPAR δ agonist GW501516 on the intestinal mucosal barrier in septic mice by regulating autophagy

CHEN Kaili, WANG Ting, LUO Zhihao

(Emergency Department, Guangdong Provincial Hospital of Chinese Medicine, Hainan Hospital, Haikou 570203, China)

Abstract **Objective** To investigate the mechanism of action of GW501516 on the intestinal mucosal barrier of septic mice. **Methods** Septic mice were divided into four groups: model, GW501516, GW501516 + Rap, and a sham group. Hematoxylin and eosin staining was used to observe the pathological injury of the small intestinal mucosa. D-lactate (D-LA) and diamine oxidase (DAO) levels in serum, as well as secreted immunoglobulin A (sIgA) and inflammatory factor levels in small intestinal tissues, were measured using the enzyme-linked immunosorbent assay. The number of autophagosomes in the intestinal tissue was determined using transmission electron microscopy. Peroxisome proliferator activated receptor δ (PPAR δ) and autophagy-related protein expression levels in small intestinal tissues were assessed using Western blotting. **Results** Compared with mice in the sham group, those in the model group exhibited severe intestinal mucosal injury, significantly higher D-LA and DAO serum levels, elevated sIgA and inflammatory factor levels in the small intestinal tissues, excessive autophagy in the small intestinal tissues, and significantly lower PPAR δ protein levels (all $P < 0.05$). Compared with the model group, intestinal mucosal injury was significantly reduced in the GW501516 group, with a significant decrease in serum D-LA and DAO levels, as well as reduced sIgA and inflammatory factor levels in small intestinal tissues. Excessive autophagy in small intestinal tissues was inhibited, and PPAR δ protein levels were significantly increased (all $P < 0.05$). However, Rap significantly inhibited the ameliorative effects of GW501516 on the intestinal mucosal injury in septic mice. **Conclusion** The PPAR δ agonist GW501516 improves intestinal mucosal barrier damage in septic mice by inhibiting autophagy.

Keywords sepsis; GW501516; peroxisome proliferator activated receptor δ ; autophagy; intestinal mucosal barrier injury

基金项目: 海南省自然科学基金 (822QN475, 822QN477)

作者简介: 陈凯立 (1980-), 男, 副主任医师, 本科。

通信作者: 陈凯立, E-mail: Ck1151208817810228@163.com

收稿日期: 2024-03-07

网络出版时间: 2025-03-19 10:47:36

脓毒症常继发于严重的感染, 是机体对感染反应失调从而导致危及生命的器官功能障碍, 是一种高病死率的临床综合征。肠道作为体内最大的细菌库, 是脓毒症的靶器官, 其损伤会加重或诱发脓毒症^[1]。肠黏膜屏障在脓毒症的发生和发展过程中起

重要作用^[2],因此,早期干预肠黏膜屏障损伤对抑制脓毒症恶化、改善预后具有重要意义。研究^[3]显示,抑制过度的自噬可减轻炎症性肠病肠黏膜屏障损伤。过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)是一类由配体激活的核转录因子,包含 α 、 δ (或 β)、 γ 亚基。目前,已明确PPAR α 和PPAR γ 参与调控脓毒症的病理进程^[4,5]。PPAR δ 能通过调控机体炎症反应改善脓毒症模型动物生存率^[6]。PPAR δ 可抑制自噬^[7],但有关PPAR δ 对脓毒症肠黏膜屏障损伤的研究鲜有报道。因此,本研究拟探讨PPAR δ 激动剂GW501516干预对脓毒症模型小鼠肠黏膜屏障的影响及其作用机制,为脓毒症肠黏膜屏障损伤的发病机制和药物靶点开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6J小鼠60只,雄性,8周龄,体重22~24 g,购自海南金港生物技术股份有限公司,动物生产许可证编号:SCXK(琼)2020-0001。于23℃、55%相对湿度的SPF级条件下饲养,明暗光照各12 h。本研究获得广东省中医院海南医院实验动物管理与使用委员会批准(审批号IACUC-HPHCM-2204014)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及脓毒症模型构建:将C57BL/6J小鼠随机分为假手术组(sham组)、模型组(model组)、PPAR δ 激动剂GW501516组(GW501516组)和GW501516+雷帕霉素组(GW501516+Rap组),每组15只。除sham组外,其他各组小鼠均采用盲肠结扎与穿孔术法建立脓毒症模型^[8]。术后,GW501516组小鼠皮下注射GW501516(0.5 mg/kg),GW501516+Rap组小鼠皮下注射GW501516(0.5 mg/kg)和雷帕霉素(5 mg/kg),1次/d;sham组和model组小鼠皮下注射等量溶媒。对各组小鼠进行大体观察。72 h后收集各组小鼠血清并于-20℃冻存。处死小鼠,采集近盲肠处小肠组织8 cm,取2 cm小肠组织置于4%多聚甲醛中固定,取3块1 mm×1 mm×1 mm小肠组织,置于2.5%戊二醛中固定,剩余小肠组织用PBS溶液洗净后于-80℃冻存。

1.2.2 HE染色:将小肠组织固定、脱水、石蜡包埋

后,进行组织切片,HE染色。由3位病理医师在光学显微镜下观察小肠组织病理改变,并按照CHIU's病理学评分^[9]判定小肠组织肠黏膜损伤程度。

1.2.3 ELISA检测:取100 mg冻存的小肠组织研磨,离心收集上清液。取血清和小肠组织上清液按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测小鼠血清中D-乳酸(D-lactic acid, D-LA)和二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)水平,以及小肠组织中分泌型免疫球蛋白A(secreted immunoglobulin A, sIgA)、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-6水平。

1.2.4 透射电子显微镜观察自噬体:小肠组织经脱水、包埋、固化,制备60 nm超薄切片,3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色。透射电子显微镜下观察小肠组织自噬体形成情况,计数3个视野中自噬体数量,取平均值。

1.2.5 Western blotting:将剩余的小肠组织研磨匀浆后提取蛋白,测定总蛋白浓度。取40 μ g蛋白样品进行电泳,转至PVDF膜,漂洗,封闭。加入PPAR δ 、Beclin-1、p62、LC-3和GAPDH一抗(均1:1 000稀释),4℃孵育过夜, TBST充分洗涤,加入HRP标记的二抗(1:10 000稀释),室温孵育1 h。TBST清洗后, ECL显色。以GAPDH为内参,使用ImageJ软件分析目标条带的光密度值,计算目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠大体情况

sham组小鼠精神状态、饮食和排便均正常,毛发光泽。sham组、model组、GW501516组和GW501516+Rap组小鼠72 h生存率分别为100%、60%、100%和80%。与sham组比较,model组小鼠精神萎靡,懒动,饮食和排便减少,毛发杂乱,72 h生存率显著降低($P < 0.01$)。与model组比较,GW501516组小鼠饮食和排便增多,毛发和精神状态逐渐恢复正常,72 h生存率显著升高($P < 0.05$)。与GW501516组比较,GW501516+Rap组小鼠精神、饮食、排便和毛发等情

况均变差,72h生存率降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

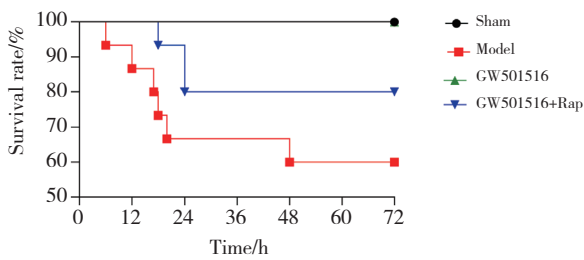
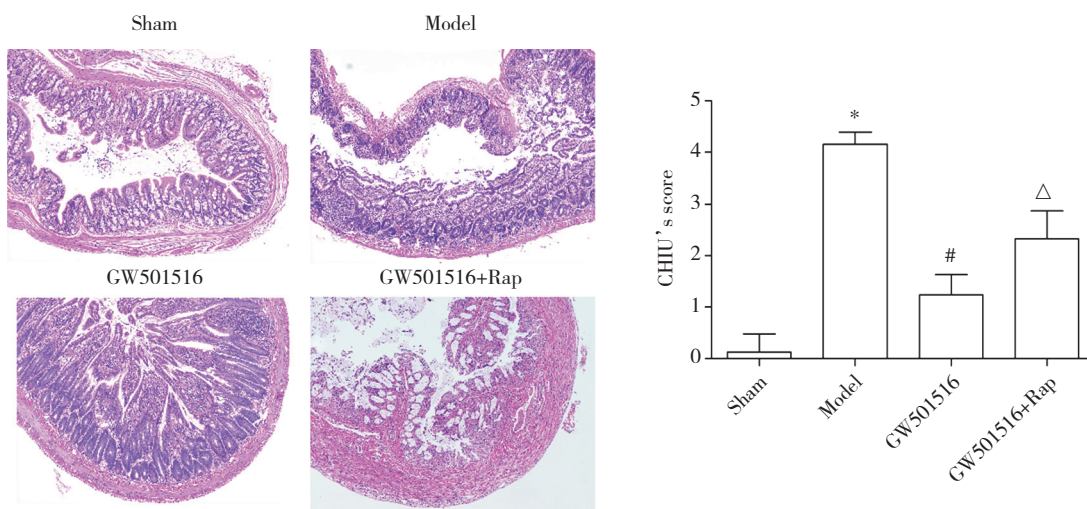


图1 各组小鼠生存曲线

Fig.1 Survival curve of mice in each group

2.2 GW501516对脓毒症小鼠小肠黏膜病理损伤的影响

sham组小鼠小肠组织正常。与sham组比较,model组小鼠小肠绒毛肿胀、坏死,出现大面积脱落,CHIU's病理学评分显著升高($P < 0.001$)。与model组比较,GW501516组小鼠小肠绒毛顶端出现坏死、脱落,结构较为完整,CHIU's病理学评分显著降低($P < 0.001$)。与GW501516组比较,GW501516+Rap组小鼠小肠绒毛坏死和脱落程度加重,CHIU's病理学评分显著升高($P < 0.001$)。见图2。



* $P < 0.001$ vs. sham group; # $P < 0.001$ vs. model group; $\Delta P < 0.001$ vs. GW501516 group.

图2 小肠组织病理学变化 HE $\times 200$

Fig.2 Histopathological changes of intestinal tissue HE $\times 200$

2.3 GW501516对脓毒症小鼠肠黏膜屏障损伤以及小肠组织炎症和免疫反应的影响

与sham组比较,model组小鼠血清中D-LA和DAO水平以及小肠组织中sIgA、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平显著升高($P < 0.001$)。与model组比较,GW501516组

小鼠血清中D-LA和DAO水平以及小肠组织中sIgA、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平显著降低($P < 0.001$)。与GW501516组比较,GW501516+Rap组小鼠血清中D-LA和DAO水平以及小肠组织中sIgA、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平显著升高($P < 0.001$)。见表1。

表1 各组小鼠血清中D-LA和DAO水平以及小肠组织中sIgA、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平

Tab.1 Levels of D-LA and DAO in serum and sIgA, IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in intestinal tissue of mice in each group

Group	n	D-LA (mg/L)	DAO (U/mL)	sIgA (μ g/mL)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
Sham	15	2.20 \pm 0.26	1.66 \pm 0.19	2.20 \pm 0.26	18.05 \pm 1.11	18.80 \pm 0.75	63.18 \pm 4.98
Model	9	6.88 \pm 0.47 ¹⁾	5.72 \pm 0.35 ¹⁾	6.88 \pm 0.47 ¹⁾	47.63 \pm 1.80 ¹⁾	31.34 \pm 1.00 ¹⁾	196.89 \pm 8.52 ¹⁾
GW501516	15	3.47 \pm 0.43 ²⁾	2.62 \pm 0.25 ²⁾	3.47 \pm 0.43 ²⁾	24.25 \pm 1.09 ²⁾	21.05 \pm 1.06 ²⁾	86.07 \pm 5.59 ²⁾
GW501516+Rap	13	5.20 \pm 0.50 ³⁾	3.93 \pm 0.36 ³⁾	5.20 \pm 0.50 ³⁾	31.98 \pm 1.04 ³⁾	27.80 \pm 0.92 ³⁾	140.91 \pm 7.30 ³⁾
F		280.193	425.672	1 182.653	459.847	964.204	370.893
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

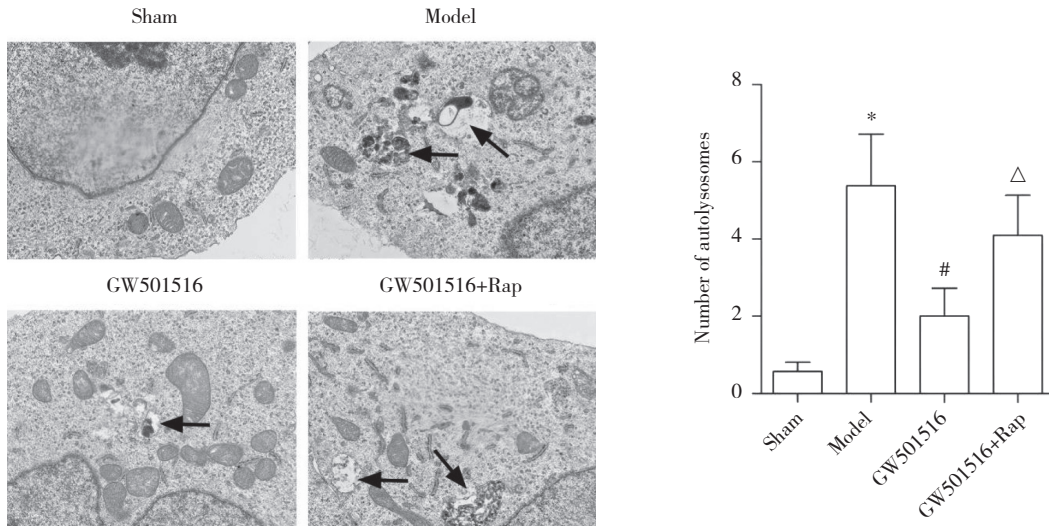
1) $P < 0.001$ vs. sham group; 2) $P < 0.001$ vs. model group; 3) $P < 0.001$ vs. GW501516 group.

2.4 GW501516对脓毒症小鼠小肠组织自噬体形成的影响

与sham组比较,model组小鼠小肠组织中自噬体数量显著升高($P < 0.001$)。与model组比较,GW501516

组小鼠小肠组织中自噬体数量显著降低($P < 0.001$)。与GW501516组比较,GW501516+Rap组小鼠小肠组织中自噬体数量显著升高($P < 0.001$)。见图3。

2.5 GW501516对脓毒症小鼠小肠组织中PPAR δ 和



* $P < 0.001$ vs. sham group; # $P < 0.001$ vs. model group; $\Delta P < 0.001$ vs. GW501516 group. The arrows show autolysosomes.

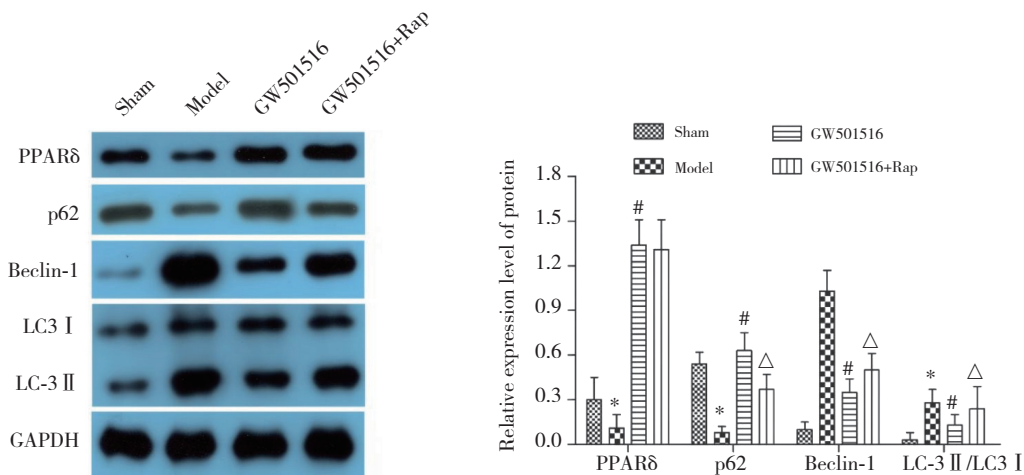
图3 各组小鼠小肠组织内自噬体 TEM $\times 8000$

Fig.3 Autophagosomes in intestinal tissue of mice in each group TEM $\times 8000$

自噬相关蛋白表达的影响

与sham组比较,model组小鼠小肠组织中PPAR δ 和p62蛋白表达水平显著降低,Beclin-1蛋白表达水平和LC-3 II/LC-3 I 比值显著升高($P < 0.001$)。与model组比较,GW501516组小鼠小肠组织中PPAR δ 和p62蛋白表达水平显著升高,Beclin-1蛋白表达水平和LC-

3 II/LC-3 I 比值显著降低($P < 0.001$)。与GW501516组比较,GW501516+Rap组小鼠小肠组织中p62蛋白表达水平显著降低,Beclin-1蛋白表达水平和LC-3 II/LC-3 I 比值显著升高($P < 0.001$),而PPAR δ 蛋白表达水平无统计学差异($P > 0.05$)。见图4。



* $P < 0.001$ vs. sham group; # $P < 0.001$ vs. model group; $\Delta P < 0.001$ vs. GW501516 group.

图4 各组小鼠小肠组织中PPAR δ 、Beclin-1、p62和LC-3蛋白表达水平

Fig.4 Expression levels of PPAR δ , Beclin-1, p62, and LC-3 protein in intestinal tissue of mice in each group

3 讨论

脓毒症发病机制复杂,涉及感染、炎症和免疫等,累及多个器官,其中肠道作为最大的免疫器官最先受损^[10]。研究^[11]发现,脓毒症时肠黏膜屏障损伤,通透性增加,大量释放炎症细胞因子,机体免疫力下降,启动全身炎症反应。本研究中,脓毒症模型小鼠精神萎靡,懒动,饮食和排便减少,毛发杂乱,72 h生存率显著降低,表明模型构建成功。

D-LA是细菌发酵的代谢产物,而DAO是小肠黏膜上层绒毛中的细胞内酶,小肠黏膜损伤时二者被释放入血,因此可用于反映肠黏膜通透性及肠道机械屏障的完整性和损伤程度^[12]。sIgA作为肠黏膜中介体液免疫的重要抗体,可通过免疫排斥作用吞噬肠上皮细胞黏附的病原菌^[13]。另外,炎症也是导致肠黏膜屏障损伤的关键因素,TNF- α 是调节免疫和炎症反应的核心指标,可促进炎症细胞因子IL-1 β 和IL-6产生,加重肠黏膜屏障损伤^[14]。本研究结果发现,脓毒症小鼠血清中D-LA和DAO水平及小肠组织中sIgA、IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平均升高,说明肠黏膜通透性增加,免疫功能被抑制,肠黏膜屏障损伤严重。

本研究还发现,脓毒症小鼠小肠组织内PPAR δ 呈低表达。PPAR参与脂质代谢、葡萄糖稳态、细胞增殖及分化、炎症反应和氧化应激等生理过程。文献^[15]报道,PPAR δ 配体GW0742可通过上调PPAR δ ,抑制NF- κ B转录活性,减少全身炎症细胞因子的释放及肺、肝脏和盲肠组织中性粒细胞的浸润,进而改善脓毒症大鼠全身炎症反应。给予PPAR δ 激动剂GW501516干预可显著提高脓毒症大鼠存活率,降低血清及肺组织中炎症细胞因子水平,改善脓毒症大鼠肺损伤^[16]。本研究结果显示,经GW501516干预后,脓毒症模型小鼠小肠黏膜病理损伤明显减轻,小肠通透性和炎症细胞因子水平降低,免疫功能改善,脓毒症肠黏膜屏障损伤减轻,小鼠状态恢复正常,存活率升高。

自噬对脓毒症的影响是近年的研究热点,其在肠黏膜屏障中的作用不可忽视^[17]。脓毒症早期可发生过度自噬,导致小肠黏膜受损^[18];而抑制过度自噬可减轻肠损伤^[19]。Beclin-1、p62和LC-3均为自噬的标志蛋白,其表达水平的变化可反映自噬的活

性。p62是一种选择性的自噬受体,其表达水平与自噬呈负相关。本研究结果显示,脓毒症小鼠小肠组织自噬体数量增多,Beclin-1蛋白表达水平和LC-3 II/LC-3 I蛋白比值升高,p62蛋白表达水平降低,提示脓毒症引起小肠组织过度自噬。PPAR δ 作为新型的自噬调节剂,通过调控AMPK/mTOR通路介导自噬^[20]。本研究中,经GW501516干预后,脓毒症模型小鼠小肠组织内PPAR δ 高表达,且明显抑制小肠组织过度自噬。雷帕霉素作为自噬激动剂,可抑制mTOR,导致自噬活性增强。本研究采用GW501516联合雷帕霉素干预,结果发现,雷帕霉素可显著抑制GW501516对脓毒症小鼠肠黏膜损伤的改善作用,且激活的PPAR δ 无法降低雷帕霉素引起的自噬活性。

综上所述,PPAR δ 激动剂GW501516可通过抑制细胞自噬改善脓毒症小鼠肠黏膜屏障损伤,但关于PPAR δ 介导自噬的分子机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 何锐,朱焯柯,滕文彬,等. 甘油可能通过水通道蛋白3减轻脓毒症小鼠肠黏膜屏障损伤[J]. 基础医学与临床,2020,40(5):655-661. DOI:10.3969/j.issn.1001-6325.2020.05.013.
- [2] HU QY,REN HJ,LI GW,et al. STING-mediated intestinal barrier dysfunction contributes to lethal sepsis[J]. EBioMedicine,2019,41:497-508. DOI:10.1016/j.ebiom.2019.02.055.
- [3] 吴东升,张彧,陈大光,等. 自噬在炎症性肠病肠黏膜屏障损伤中的作用[J]. 胃肠病学,2018,23(12):755-758. DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2018.12.012.
- [4] VANDEWALLE J,GARCIA B,TIMMERMANS S,et al. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha dysfunction in porcine septic shock[J]. Cells,2022,11(24):4080. DOI:10.3390/cells11244080.
- [5] VON KNETHEN A,SOLLER M,BRÜNE B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis[J]. Arch Immunol Ther Exp,2007,55(1):19-25. DOI:10.1007/s00005-007-0005-y.
- [6] BUSCH D,KAPOOR A,RADEMANN P,et al. Delayed activation of PPAR- β/δ improves long-term survival in mouse sepsis: effects on organ inflammation and coagulation[J]. Innate Immun,2018,24(4):262-273. DOI:10.1177/1753425918771748.
- [7] GOU Q,JIANG YD,ZHANG RY,et al. PPAR δ is a regulator of autophagy by its phosphorylation[J]. Oncogene,2020,39(25):4844-4853. DOI:10.1038/s41388-020-1329-x.
- [8] 杨李旺,杨蓉,赵焕新,等. 黄连解毒汤通过诱导自噬减轻脓毒症小鼠肝损伤[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(5):71-76. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20220424.
- [9] CHIU CJ,MCARDLE AH,BROWN R,et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg,1970,101(4):478-483. DOI: