



大鼠应激性溃疡自愈过程中环氧合酶表达的变化

应激性溃疡(SU)是机体在遭受严重创伤(烧伤、失血、颅脑外伤等)、重症疾病及严重心理障碍等应激状况下发生的以急性胃粘膜糜烂、溃疡和出血为特征的严重并发症。其发病机制较为复杂,迄今尚未完全阐明。环氧合酶(COX)至少有两种异构酶,即结构型COX-1及诱导型COX-2。已经明确胃粘膜上皮细胞的更新和修复受PGs的影响和调节,COX是促进花生四烯酸转变为前列腺素的关键酶,因此研究应激性溃疡自愈过程中COX-1和COX-2的作用以及基因表达的变化对于从基因水平寻找新的防治手段提供一种思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年雄性Sprague-Dwley(SD)大鼠42只,体质量200~220 g,购自南方医科大学实验动物中心。将大鼠随机分为7组,每组6只。

1.1.2 实验相关试剂 RT-PCR一步试剂盒:北京鼎国生物工程公司;Trizol试剂盒:Gibco;DEPC(焦炭酸二乙酯),电泳级琼脂糖,矿物油,溴化乙锭:Sigma;DNA载样缓冲液($\times 10$),DNA梯度标记:广州威佳科技公司。

1.1.3 实验仪器 低温离心机:美国Sigma公司;4800型PCR扩增仪:Perkin Elmer;紫外可见光分光分析仪:上海第三分析仪器厂;精密移液器(2 μ l、20 μ l、100 μ l、1000 μ l):德国Eppendorf公司;其他设备:冰盒、薄壁PCR扩增离心管,无菌且经DEPC处理过的不含Rnase的Eppendorf管,微型琼脂糖电泳槽,紫外灯箱及照相机,研钵,液氮冻存罐等。

1.1.4 寡核苷酸引物 所有引物参照文献[1]并在Medline网站基因库中核对,由上海生工生物科技公司合成。COX-1扩增产物长度561 bp, Sense 5'-AGCCCCTCATTACCCATCATTT-3'; Antisense 5'-CAGGGACGCCTGTTCTACGG-3'; COX-2扩增产物长度201 bp, Sense 5'-ACAACATTCCTTCCTTC-3', Antisense 5'-CCTTATTTCTTTACACACC-3'; β -actin扩增产物长度540 bp, Sense 5'-GTGGGGCG CCCCAGGCACA-3', Antisense 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。

1.2 方法

1.2.1 溃疡模型的制作 参考Brodie方法制作束缚-浸水应激(WRS)模型。分别于WRS结束后0、2、4、6、12、24 h时麻醉开腹,提取标本冻存。

1.2.2 标本总mRNA提取 将冷冻组织标本各约100 mg在一次性培养皿中切碎,立即移入含1 ml Trizol试剂的匀浆器中,冰上孵育30 min,充分匀浆,匀浆后室温放置5 min;低温(4 $^{\circ}$ C)12 000 g离心15 min(2 ml离心管);吸取上清液移至另一Eppendorf管中,加入200 μ l氯仿,强烈震荡15 s,室温下放置2~3 min;低温(4 $^{\circ}$ C)12 000 g离心15 min;取上层水相(RNA)体积约60%,加入500 μ l异丙醇(1.5 ml离心管)室温下放置10 min;低温(4 $^{\circ}$ C)12 000 g离心10 min;弃上清,沉淀中加入75%乙醇1 ml洗涤,低温7 500 g离心5 min;晾干;再弃上清,沉淀溶解于10 μ l焦炭酸二乙酯水中,65 $^{\circ}$ C水浴5 min。所提取的RNA用

紫外分光光度计检测吸光度值，以 $D_{260/280}$ 判断纯度。根据所测结果将提取的RNA稀释至终浓度 $0.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 置 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.3 RT-PCR 按文献报道的方法合成各基因寡核苷酸引物，选用看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因作为内参照。实验过程按试剂盒说明书进行，具体操作如下：①RT： $2 \mu\text{l}$ 各为 2.5 mmol/l 的dNTP混合液、 $1 \mu\text{l}$ $10\times$ PCR缓冲液， 25 mmol/L MgCl_2 $0.4 \mu\text{l}$ ，逆转录酶混合液(含AMV逆转录酶、RNasin) $1 \mu\text{l}$ ， $1 \mu\text{l}$ 总RNA样品， $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min ， $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 5 min 灭活逆转录酶活性，随后进行PCR操作，②PCR：上述逆转录产物，加入 $2 \mu\text{l}$ 各为 2.5 mmol/l 的dNTP混合液、 $10\times$ PCR缓冲液 $1.5 \mu\text{l}$ ，加入 15 mol/l 上下游引物各 $1 \mu\text{l}$ ，上机循环，用ddH₂O补足至 $25 \mu\text{l}$ ，然后 $97 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min ，冷却至 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ，加Taq DNA聚合酶 2 U ，加 $20 \mu\text{l}$ 轻矿物油覆盖于反应混合液上。PCR反应参数 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min 、 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 、 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s 、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s ，COX-1和COX-2为 30 个循环，GAPDH为 29 个循环。最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 充分延伸 10 min 。③琼脂糖凝胶电泳及结果分析：取PCR产物 $5 \mu\text{l}$ 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳，电泳缓冲液为TBE，电压 50 V ，每 $5\sim 10 \text{ min}$ 在紫外灯下检测条带的位置直至条带位于凝胶中央为止。电泳完毕后在紫外灯下观察拍照，全自动紫外光图象分析装置进行扫描分析，目的因子A值/ β -actin值即为目的因子mRNA的相对含量。

1.2.4 免疫组化 采用标准免疫组化ABC法染色，取石蜡包埋切片，常规脱蜡至水，微波加热 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 激活抗原， 0.3% 过氧化氢甲醇溶液室温孵育 20 min 以阻断内源性酶。一抗为山羊抗大鼠COX-1/COX-2多克隆抗体，工作浓度为 $1:200$ ， $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜孵育。具体实验步骤按ABC和DAB试剂盒说明进行。已知COX-1/COX-2表达阳性的胃癌组织切片为阳性对照，以PBS替代一抗作阴性对照。细胞核用苏木素复染 1 min 中性树脂封片。

1.3 统计学处理

各参数以 \bar{x} 表示，均数间比较采用ANOVA，两两比较时用LSD检验。配对资料采用配对t检验。全部统计在SPSS10.0软件上进行。

2 结果

2.1 RT-PCR检测COX mRNA在胃粘膜的表达

COX-2 mRNA在对照组胃组织几乎没有表达，在大鼠SU自愈 0 h 表达最高，此后逐渐下降，与对照组相比有明显差异($P<0.05$)；COX-1 mRNA 在对照组和SU自愈各组均明显表达，两者比较没有明显差异($P>0.05$ ，图1, 2)。

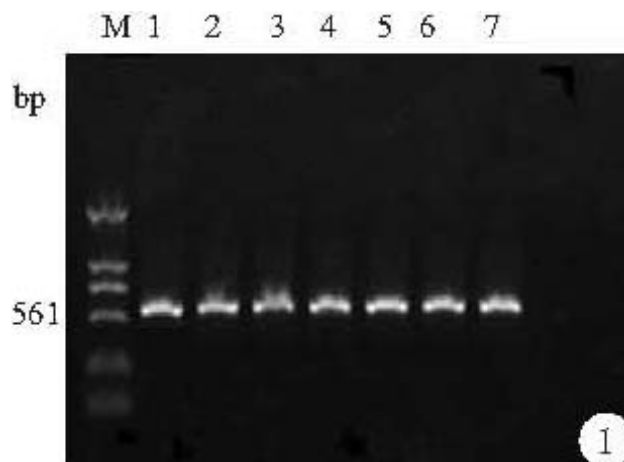


图1 胃粘膜COX-1 mRNA的表达

Fig.1 Expression of COX-1 mRNA in rat gastric mucosa

M: Marker; Lane 1: Control group; Lanes 2-7: 0, 2, 4, 6, 12, and 24 h after water immersion and restraint stress, respectively

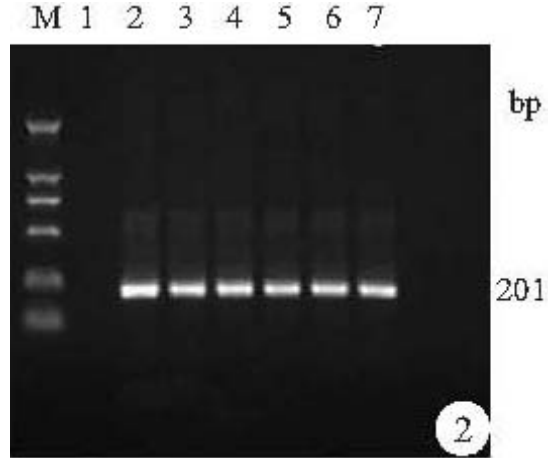


图2 胃粘膜COX-2 mRNA的表达

Fig.2 Expression of COX-2 mRNA in rat gastric mucosa

M: Marker; Lane 1: Control group; Lanes 2-7: 0, 2, 4, 6, 12 and 24 h after water immersion and restraint stress, respectively

2.2 免疫组织化学方法检测COX在胃粘膜组织的表达

在对照组正常胃粘膜内未见COX-2阳性染色。SU自愈0 h组胃粘膜 COX-2表达明显增加；大鼠SU自愈6 h组其胃粘膜表层上皮细胞和颈粘液细胞的胞质和胞核内都有高密度的COX-2染色；自愈24 h组胃粘膜COX-2阳性染色明显减弱。免疫组化显示 COX-1在对照组以及大鼠SU自愈过程相应组别的胃上皮细胞胞质内均有染色(图3, 4)。

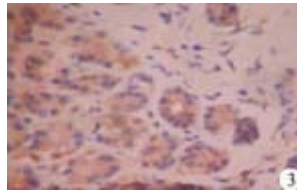


图3 COX-2在SU自愈6 h组胃粘膜的表达

Fig.3 Expression of COX-2 in rat gastric mucosa 6 h after water immersion and restraint stress (DAB staining, original magnification:×200)

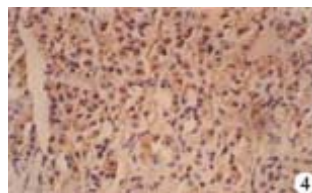


图4 COX-1在对照组胃粘膜内表达

Fig.4 Expression of COX-1 in the gastric mucosa of a control rat (DAB staining, original magnification:×200)

3 讨论

胃粘膜上皮细胞的更新和修复受PGs的影响和调节，COX是合成PGs的关键酶。九十年代以来已经明确COX是促进花生四烯酸转变为前列腺素的关键酶，COX至少有两种异构酶，即结构型COX-1及诱导型COX-2，目前还

有人推测可能存COX-3[2][3][4][5]。COX-1 mRNA和蛋白质稳定表达于大多数组织包括胃肠粘膜、肾脏、血管平滑肌和血小板中，调节PGI₂、PGE₁、PGE₂的合成，有保护胃粘膜、调节血管张力、促血小板聚集等作用。正常胃粘膜组织产生的前列腺素主要来源于COX-1，COX-1在胃粘膜中执行“看家”的生理功能[6]，如调节胃酸分泌和粘膜保护。因此，COX-1 mRNA和蛋白在胃粘膜中高表达。COX-2除在少数器官如肾、脑、胰腺、卵巢、睾丸、支气管上皮细胞等外很少或几乎不存在于胃肠黏膜、血小板中，可被细菌类脂多糖、白介素-1等多种炎症细胞因子诱导，在炎症部位其水平急剧升高，引起PGI₂、PGE₁、PGE₂含量增加，参与炎症反应。有研究表明[7][8]COX-2 mRNA和蛋白质主要表达于炎性细胞，但在壁细胞、内皮细胞、上皮细胞、纤维母细胞、滑膜细胞、软骨细胞也有表达。此外损伤过程中COX产物可能参与血管发生和细胞增生。有资料证实前列腺素类物质可以促进家兔角膜血管发生以及大鼠静脉血管芽生长，COX的抑制剂吲哚美辛和选择性COX-2抑制剂NS398能够通过抑制丝裂原激活蛋白激酶的活性等机制作用于血管内皮细胞而抑制血管发生[9][10]，而丝裂原激活蛋白激酶是一种参与激活最终引起细胞增生和/或分化的转录因子以及早期反应基因的多种信号途径的重要中介。除应激损伤可诱导COX-2在胃粘膜高表达外，其他因素还包括：幽门螺杆菌感染、胃粘膜的缺血和再灌注损伤、胃溃疡的愈合等[11][12][13]。

本实验观察到COX-2 mRNA在对照组正常胃组织几乎没有表达，而在大鼠SU自愈过程相应组别中表达显著增加，并随着自愈时间延长表达减弱；COX-1 mRNA在对照组和大鼠SU自愈过程相应组别中均有表达，这些结果与文献报道一致。而免疫组化结果提示：COX-2在对照组的正常胃粘膜内表达低，WRS3.5 h大鼠胃粘膜COX-2表达阳性增加，在大鼠SU自愈过程相应时段也表达阳性；大鼠SU自愈6 h，其胃粘膜表层上皮细胞和颈粘液细胞的胞质和胞核内都有高密度的COX-2染色，自愈24 h组COX-2阳性表达减弱。免疫组化显示 COX-1在对照组以及SU大鼠自愈过程相应组别的胃上皮细胞胞质内均有染色。

本研究清楚地显示，WRS所致大鼠胃粘膜损伤后，COX-2表达明显增加。文献报道：胃粘膜损伤后包括细胞因子、内毒素、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 和肝细胞生长因子含量均增加，COX-2的高表达可能与这些因子表达上调有关[14][15][16]。研究表明[5]在正常胃粘膜组织则是COX-1产生的前列腺素来调节胃酸分泌、保护胃粘膜。在SU自愈过程中则是COX-2来介导前列腺素分泌发挥保护性作用[17]。

参考文献:

- [1]Tomasz Brzozowski, Peter CH, Konturek, et al. Expression of COX-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress[J]. J Physiol, 2000, 94: 83-91.
- [2]Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, et al. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 303(3): 1248-54.
- [3]Tanaka A, Araki H, Komoike Y, et al. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs[J]. J Physiol Paris, 2001, 95(1-6): 21-7.
- [4]Peskar BM, Maricic N, Gretzera B, et al. Role of cyclooxygenase-2 in gastric mucosal defense[J]. Life Sci, 2001, 69(25-26): 2993- 3003.
- [5]Shaftel SS, Olschowka JA, Hurley SD, et al. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2003, 119(2): 213-5.
- [6]Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Expression of COX-1 and COX-2 in adaptive cytoprotection induced by mild stress[J]. J Physiol (Paris), 2000, 94(2): 83-91.
- [7]Tanaka A, Araki H, Hase S, et al. Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2002, 16 (Suppl 2): 90-101.
- [8]Takeeda M, Yamato M, Kato S, et al. Cyclooxygenase isozymes involved in adaptive functional responses in rat stomach after barrier disruption[J]. J Pharmacol Exp Ther,

2003, 307(2): 713-19.

[9]Leung WK, To KF, Go MY, et al. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2003, 23(5): 1317-22.

[10]Kanellis J, Watanabe S, Li JH, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2[J]. *Hypertension*, 2003, 41(6): 1287-93.

[11]Sakai T, Fukui H, Franceschi F, et al. Cyclooxygenase expression during *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils[J]. *Dig Dis Sci*, 2003, 48(11): 2139-46.

[12]Konturek SJ, Brzozowski T, Pajdo R, et al. Gastric preconditioning induced by short ischemia: the role of prostaglandins, nitric oxide and adenosine[J]. *Med Sci Monit*. 2001, 7(4): 610-21.

[13]Kishimoto Y, Wada K, Nakamoto K, et al. Levels of cyclooxygenase-1 and -2 mRNA expression at various stages of acute gastric injury induced by ischemia-reperfusion in rats[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 352(1): 153-57.

[14]Katafuchi T, Takaki A, Take S, et al. Endotoxin inhibitor blocks heat exposure-induced expression of brain cytokine mRNA in aged rats[J]. *Brain Res Mol Brain Res*,. 2003, 118(1-2): 24-32.

[15]Takahashi S, Shigeta J, Inoue H, et al. Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(5 Pt 1): G1137-45.

[16]Shimada T, Hiraishi H, Terano A. Hepatocyte growth factor protects gastric epithelial cells against ceramide-induced apoptosis through induction of cyclooxygenase-2 [J]. *Life Sci*, 2000, 68(5): 539-46.

[17]Mizuno H, Sakamoto CH, Matsuda K, et al. Induction of COX-2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112: 387-97.