

大鼠应激性溃疡自愈过程中环氧合酶表达的变化

徐俊¹, 宋于刚², 桑显富¹, 鲍光欣¹, 李旭¹, 武钢¹, 陈东升¹(南方医科大学南方医院¹急诊科,²消化内科, 广东广州 510515)

摘要:目的 研究大鼠应激性溃疡自愈过程中环氧合酶的表达;探讨环氧合酶在应激性溃疡自愈过程的作用机制。方法 应用免疫组织化学和 RT-PCR 方法检测大鼠应激性溃疡自愈过程中环氧合酶蛋白和 mRNA 的表达变化。结果 对照组的大鼠胃粘膜 COX-2 表达极低,而在溃疡自愈过程中其表达显著增加($P<0.05$),并随自愈时间而减弱;COX-1 在应激性溃疡自愈各组 and 对照组中均表达,自愈各组与对照组相比没有明显差异($P>0.05$)。结论 大鼠应激性溃疡自愈过程中 COX-1 和 COX-2 均有表达,参与了应激性溃疡的自愈过程,其作用可能主要与 COX 介导分泌的前列腺素有关。

关键词: 应激性溃疡;环氧合酶

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)01-0091-03

Changes in cyclooxygenase gene expression during spontaneous recovery from stress ulcer in rats

XU Jun¹, SONG Yu-gang², SANG Xian-fu¹, BAO Guang-xin¹, LI Xu¹, WU Gang¹, CHEN Dong-shen¹

¹Department of Emergency, ²Department of Gastroenterology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the changes in gene expression of cyclooxygenase (COX) during spontaneous recovery from stress ulcer in rats exposed to water immersion and restraint stress (WRS). **Methods** A rat model of stress ulcer was established by means of WRS, in which the changes in COX expression were detected with immunohistochemistry and reverse transcription (RT)-PCR. **Results** Very low levels of COX-2 expression were detected in the gastric mucosa of the control rats, and the expression increased significantly during the healing process of the stress ulcer ($P<0.05$). COX-1 expression in the gastric mucosa showed no significant difference between the control group and the stress ulcer groups during healing ($P>0.05$). **Conclusion** COX-1 and COX-2 expressions in rat gastric mucosa during the recovery from stress ulcer participate in the recovery of the damaged mucosa possibly by mediating prostaglandin secretion.

Key words: stress ulcer; cyclooxygenase

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'-AGCC-CCTCATTACCCATCATTT-3'; Antisense 5'-CAGGG-ACGCCTGTTCTACGG-3'; COX-2 扩增产物长度 201 bp, Sense 5'-ACAACATTCCTTCCTTC-3'; Antisense 5'

收稿日期:2005-09-23

基金项目:广东省自然科学基金(010578)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (010578)

作者简介:徐俊(1969-),硕士,主治医师,E-mail: xzy1996@fimmu.com

通讯作者:宋于刚

-CCTTATTTCTTTTCACACC-3'; β -actin 扩增产物长度 540 bp, Sense5'-GTGGGGCG CCCCAGGCACA-3', Antisense5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-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 °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 °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 °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 焦碳酸二乙酯水中,65 °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 μ g/ μ l 置-20 °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 μ l 各为 2.5 mmol/l 的 dNTP 混合液、1 μ l 10 \times PCR 缓冲液,25 mmol/L MgCl₂ 0.4 μ l, 逆转录酶混合液(含 AMV 逆转录酶、RNasin)1 μ l, 1 μ l 总 RNA 样品,37 °C 水浴 30 min,95 °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 μ l 各为 2.5 mmol/l 的 dNTP 混合液、10 \times PCR 缓冲液 1.5 μ l, 加入 15 mol/l 上下游引物各 1 μ l, 上机循环,用 ddH₂O 补足至 25 μ l, 然后 97 °C 变性 5 min, 冷却至 4 °C, 加 Taq DNA 聚合酶 2 U, 加 20 μ l 轻矿物油覆盖于反应混合液上。PCR 反应参数 94 °C 5 min、94 °C 30 s、56 °C 45 s、72 °C 60 s, COX-1 和 COX-2 为 30 个循环, GAPDH 为 29 个循环。最后 72 °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 μ 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 5~10 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 °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 °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)。

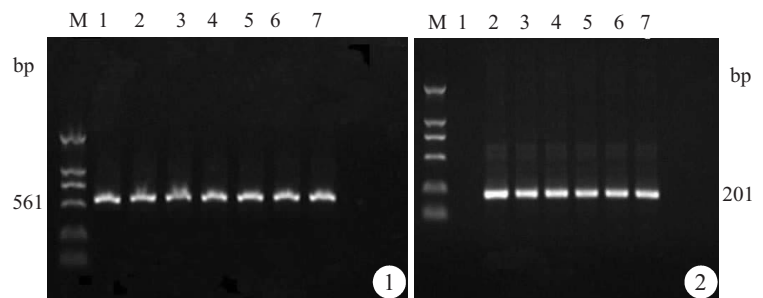


图 1 胃粘膜 COX-1 mRNA 的表达

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)。

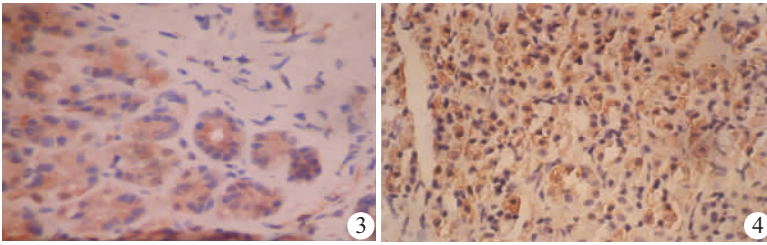


图 3 COX-2 在 SU 自愈 6 h 组胃粘膜的表达

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^[2-5]。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^[11-13]。

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^[14-16]。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.

(下转 97 页)

EB 病毒与鼻咽癌、Burkitt 淋巴瘤和 Hodgkin 病等肿瘤的发生有关,特别是潜伏膜蛋白 -1(LMP-1)、核心抗原 -1(EBNA-1)等在肿瘤的发病中起重要作用。EB 病毒编码的小分子 RNA(EBERs)在组织细胞中拷贝数较高,原位杂交检测具有高度敏感性,可反映 EB 病毒感染的真实状况。我们应用合成的寡核苷酸探针在鼻咽癌组织原位检测 EBER-1,66 例鼻咽癌标本中 64 例为阳性,占 97%,2 例角化型鼻咽癌为 EBER 阴性。结果显示,鼻咽癌 EBER-1 表达程度在(+++)~(++++)的 49 例标本中,45 例 CD25 表达程度为(+++)。统计分析结果显示,EB 病毒感染同 CD25⁺淋巴细胞表达正相关($P<0.001$)。Kube 等人^[11]用 EB 病毒编码的 EBNA-1 转染淋巴瘤细胞株 L428,发现转染后的 L428 细胞株 CD25 表达增强。Vockerodt 等人^[12]将 EB 病毒表达细胞株 B95-8 和 Burkitt 淋巴瘤细胞株共培养,同时用 LMP-1 转染 Burkitt 淋巴瘤细胞株。结果显示,同 B95-8 共培养的 Burkitt 细胞株 CD25 表达显著升高。LMP-1 转染的淋巴瘤细胞株,CD25 表达也有明显的高表达,同时证明 LMP-1 通过 NF κ B 途径诱导 CD25 表达。因此,LMP-1 和 EBNA-1 等 EB 病毒编码的产物可能与鼻咽癌中 CD25⁺淋巴细胞升高表达相关。

参考文献:

- [1] 周振英,吴晓柳,朱月清,等. 恶性肿瘤患者外周血细胞 CD25 表达的临床意义[J]. 肿瘤防治研究,2001,28(2): 117-18.
Zhou ZY, Wu XL, Zhu YQ, et al. Clinical signification on CD25 express of peripheral blood cells in patients with malignant tumors [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2001, 28(2): 117-18.
- [2] 孙文辉,邱国强,吴浩清,等. CD25 在检测恶性肿瘤中的临床研究[J]. 中国肿瘤临床康复,1998,5(1): 17-18.
- [3] Bor CS, Rong HL, Hong NH, et al. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma[J]. Hum Immunol, 1997, 56: 39-47.
- [4] Bor CS, Rong HL, Hong NH, et al. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression[J]. Cancer Res, 2001, 61: 237-42.
- [5] Ferradine L, Miescher S, Stoeck M, et al. Cytotoxic potential despite impaired activation pathways in T lymphocytes infiltrating nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Cancer, 1991, 47: 362-70.
- [6] Hsu MM, Hsu HC, Lui LT. Local immune reaction in nasopharyngeal carcinoma, with special reference to its prognostic evaluation [J]. Head Neck, 1989, 11(6): 505-10.
- [7] Lakhdar M, Ellouz R, Kammoun H, et al. Presence of *in vivo*-activated T cell expressing HLA-DR molecules and IL-2 receptors in peripheral blood of patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Int J Cancer, 1987, 39: 663-69.
- [8] Liang SW, Kuan CC, Wing YL, et al. Clinical significance of serum soluble interleukin 2 receptor- α in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 1445-51.
- [9] Lgnacio M, Monica R, Antonio R, et al. Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) *in situ* and infiltrative human breast cancer: an immunohistochemical comparative study [J]. Breast Cancer Res, 2004, 6: R1-R7.
- [10] Eric Tartour, Laurent Deneux, Veronique Mosseri, et al. Soluble interleukin-2 receptor serum level as a predictor of locoregional control and survival for patients with head and neck carcinoma [J]. Cancer, 1997, 79: 1401-8.
- [11] Kube D, Vockerodt M, Weber O, et al. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is associated with enhanced expression of CD25 in the Hodgkin cell line L428 [J]. J Virol, 1999, 73 (2): 1630-36.
- [12] Vockerodt M, Tesch H, Kube D. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 activates CD25 expression in lymphoma cells involving the NF κ B pathway [J]. Genes and Immun, 2001, 2(8): 433-41.
- [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, 12: 387-97.

(上接 93 页)

- [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