

• 实验研究 •

环氧合酶 2 在慢性乙型肝炎肝组织中的表达

Expression of cyclooxygenase-2 in the liver of patients with chronic hepatitis B

邵建国*, 谢丰尔, 姚建国, 屈莉红, 顾春燕, 包 蕾

(南通医学院附属南通三院, 南通 226001)

[摘要] **目的:**观察环氧合酶 2(COX-2)在慢性乙型肝炎(乙肝)肝组织中的表达情况,以进一步认识其临床意义。**方法:**采用免疫组化 ABC 法,检测 33 例慢性乙肝及 4 例正常肝组织标本 COX-2 的表达;同时检测患者丙氨酸氨基转移酶(ALT)及 HBV DNA 等血清学指标。**结果:**正常肝组织中 COX-2 表达阴性;33 例慢性乙肝组织 COX-2 表达阳性者 31 例(93.9%)。COX-2 阳性表达程度在轻、中、重度肝炎间有显著性差异($P<0.05$),并随肝脏炎症程度的加重而表达加强。随着 COX-2 阳性表达程度增加,患者血清 ALT 水平也显著升高($P<0.05$),血清 HBV DNA 水平则无明显改变。**结论:**COX-2 在慢性肝炎组织中表达增加,且与病情轻重有关。提示可将其作为反映肝脏炎症程度的一项指标。

[关键词] 环氧合酶 2;肝炎,乙型,慢性;丙氨酸氨基转移酶;HBV DNA

[中图分类号] R 575.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1383-02

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)又称前列腺素过氧化合物合成酶,是前列腺素(PGs)生物合成的限速酶,目前发现该酶有 2 种类型即 COX-1 和 COX-2^[1-3]。COX-1 是一种结构酶,存在于大多数组织的核膜和微粒体中,通过促进 PGs 生成而维护人体正常生理功能,而 COX-2 是一种诱导酶,催化花生四烯酸合成 PGs 参与炎症反应。很多因素如细胞因子、内毒素及致癌物均可诱导 COX-2 的产生^[4]。COX 是非甾体类抗炎药(NSAIDs)的作用靶点,迄今已知 COX-2 与胃肠道疾病密切相关,如幽门螺杆菌(Hp)感染可诱导 COX-2 的表达上调从而参与胃黏膜炎症反应^[5];COX-2 在人溃疡性结肠炎和克罗恩病等炎症性肠病中过度表达,采用选择性 NSAIDs 类药物可明显改善炎症性肠病的病情和预后^[6-8]。对 COX-2 与肝脏的关系,迄今文献报道相对较少^[7]。我们收集了 33 例慢性乙肝肝组织标本,旨在了解 COX-2 在肝炎中的表达情况,以进一步认识其临床意义。

1 材料和方法

1.1 临床资料与组织标本 研究对象为 2001 年 4 月至 2004 年 5 月在本院住院的慢性乙肝患者,年龄 20~52 岁,平均(35.4±8.4)岁,男性 23 例,女性 10 例,临床诊断符合“2000 年病毒性肝炎防治方案”的诊断标准^[9]。经患者本人同意并签署知情同意书后,行肝穿刺检查。肝穿刺前均检测血常规、肝功能、HBV DNA 等血清学指标。标本经 10%中性甲醛、普通石蜡包埋后,切成 4~5 μm 厚的连续切片备用。另有 4 例为取自肝血管瘤旁正常组织作为对照。炎症活动程度按 Knodell 积分法(histological activity index, HAI)分为 3 度,即轻度(1~5 分),中度(6~12 分),重度(13~18 分)。

1.2 免疫组化方法 COX-2 多克隆抗体及 ABC 免疫染色试剂盒购自 Santa Cruz 公司。具体步骤为:石蜡切片经脱蜡、梯度水化后,置 10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中,用微波处理修复抗原,降至室温;10% H₂O₂ 甲醇孵育 15 min,滴加 10% 猴血清 15 min 以封闭非特异性抗原;倾去血清、滴加 1:100 稀释的 COX-2 多克隆抗体,4℃放置过夜, PBS 冲洗

次,每次 5 min,滴加生物素化二抗,37℃放置 60 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的卵白素,37℃放置 60 min;DAB 显色,苏木精复染,中性树脂封片。

1.3 结果判定 设阴性对照(以 PBS 置换一抗)以及阳性对照(明确 5-HT 染色阳性的小鼠小肠切片);光镜下观察与计算。每片观察相对染色较强、阳性细胞较多的一个 40 倍视野,统计阳性细胞所占的百分率,综合阳性细胞所占同一个 40 倍视野的细胞比例及其染色强度分为—(0~25%)、+(26%~50%)、++(51%~75%)、+++(>75%)共 4 级。

1.4 统计学处理 计量资料采用方差分析及 *t* 检验,等级资料采用等级分组秩和检验。

2 结果

2.1 COX-2 在慢性乙肝组织中的表达 COX-2 蛋白的阳性染色见于慢性乙肝患者肝细胞的胞质内,呈棕褐色,其分布以广泛性表达为主,偶见局灶性或散在性表达。而在正常肝组织肝细胞的胞质内无表达。33 例慢性乙肝患者中有 31 例(93.9%)COX-2 蛋白表达阳性;且随着肝脏炎症活动程度(轻、中、重度)的加重,其阳性表达强度增加,各组间经统计学处理,差异有显著性($P<0.05$),见表 1 和图 1。

表 1 COX-2 在不同病变程度慢性乙肝组织中的表达
(n)

慢性乙肝	N	COX-2 镜下分级			
		—	+	++	+++
轻度	11	2	9	0	0
中度	13	0	6	7	0
重度	9	0	0	3	6

[基金项目] 江苏省南通市科技局资助项目(S2025)。

[作者简介] 邵建国(1965-),男(汉族),博士,副教授、副主任医师。

*Corresponding author. E-mail: Sijg@ntdsyy.com

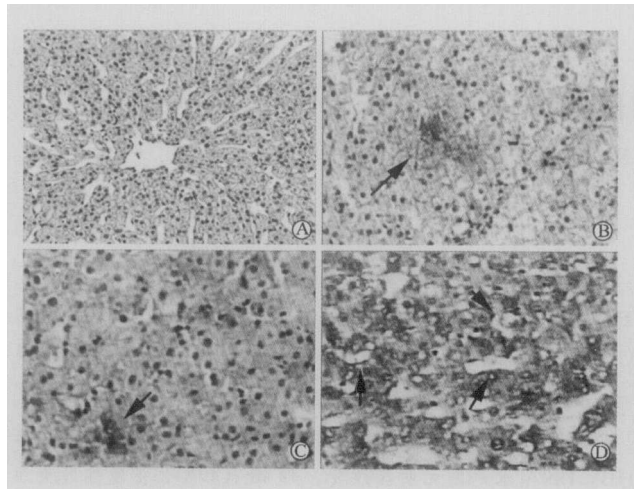


图 1 COX-2 在慢性肝炎组织中的表达(ABC 法, $\times 100$)
A: 正常肝组织; B~D: 慢性乙肝(轻、中、重度)

2.2 COX-2 与部分血清学指标之间的关系 随着 COX-2 阳性表达程度的增加,ALT 明显升高($P < 0.05$),而血清 HBV DNA 水平在各组间无统计学差异(表 2)。

表 2 COX-2 与部分血清学指标之间的关系

COX-2 分级	n	HBV DNA ($\times 10^5$ copy/ml)	ALT (U/L)
±	17	1.05 ± 0.29	113.5 ± 28.11
++	10	1.01 ± 0.51	$230.43 \pm 41.3^*$
+++	6	1.15 ± 0.27	$371.78 \pm 37.4^{*\Delta}$

* $P < 0.05$ 与 COX-2(±)组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 COX-2(+++)组比较

3 讨论

本研究结果显示,COX-2 在正常肝组织中不表达,在慢性肝炎中其表达程度与病情轻重程度有关,随着肝脏炎症活动程度的加重,COX-2 的表达也相应增加($P < 0.05$),这与 Nanji 等^[10]在研究小鼠酒精性肝损伤的报道结果一致。国外学者的研究^[11,12]表明,表达 COX-2 的细胞也表达诱导型一氧化氮合酶(iNOS),两者具有协同作用;COX-2、iNOS 和 IL-8 是一组可诱导蛋白,其启动子均含有核因子(nuclear factor, NF)- κ B 应答元件,炎症反应时,IL-1 β 和 TNF- α 等细胞因子水平提高,激活 NF- κ B,从而使 COX-2 表达上调。易辉等^[13]在小鼠应用选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布治疗酒精性肝损伤发现可使小鼠 COX-2 表达下调,肝脏炎症活动程度减轻,小鼠肝损伤明显好转,表明 COX-2 参与了小鼠肝损伤的炎症过程,同时也提示选择性 COX-2 抑制剂有望成为临床治疗肝炎的一项新举措。

ALT 是反映肝脏炎症活动的一项敏感指标,我们研究的资料显示,随着 COX-2 阳性表达程度的增加,ALT 也明显升高,提示 COX-2 可作为评判肝脏组织炎症活动程度的一项有用指标。HBV DNA 反映体内乙肝病毒的复制水平,我们的研究还显示,按 COX-2 阳性程度分级,血清 HBV DNA 水平在各组间无统计学差异,表明血清

HBV DNA 水平与肝脏炎症活动程度无关,这与文献报道^[14,15]一致。尽管 HBV 是乙肝的病原体,但机体的免疫反应很大程度上决定了患者的肝脏炎症活动的程度,因此,要了解肝脏的炎症活动程度需综合各项有用指标进行评判。

综上所述,COX-2 与肝脏炎症活动程度密切相关,随着炎症活动程度的加重,COX-2 的表达也增强,提示 COX-2 可作为评判肝脏组织学炎症活动程度的一项有用指标。

参考文献

- [1] DeWitt DL. Prostaglandin and peroxide synthase: regulation of enzyme expression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1083(2): 121-134.
- [2] Yokoyama C, Tanabe T. Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 165(2): 888-894.
- [3] Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer*, 2003, 7(1): 10.
- [4] Herschman HR. prostaglandin Synthase 2[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1299(1): 125-140.
- [5] 罗玉琴, 吴开春, 孙安华. 浅表性胃炎、胃黏膜不典型增生及胃癌组织中 COX-1、COX-2、iNOS 表达的意义[J]. *中华消化杂志*, 2000, 20(4): 223-226.
- [6] Singer JJ, Kawka DW, Schloemann S, et al. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(2): 297-306.
- [7] 刘敏, 成军, 张树林. 病毒性肝炎发病机制中环氧化酶的作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 212(2): 417-419.
- [8] Sano H, Kawchito Y, Wilder RL, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(17): 3785-3789.
- [9] 中华医学会传染病寄生虫学会和肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝病杂志*, 2000, 8(6): 324-329.
- [10] Nanji AA, Miao LL, Thomas P, et al. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(6): 943-951.
- [11] Taberner A, Schneider F, Potenza MA, et al. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immunolocalization and influence on vascular tone[J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(3): 262-270.
- [12] Izutani R, Loh EY, Reinecker H, et al. Increased expression of interleukin-8 mRNA in ulcerative colitis and Crohn's disease mucosa and epithelial cell[J]. *Inflammatory Bowel Dis*, 1995, 1(1): 37-47.
- [13] 易辉, 王新, 苗继延, 等. 环氧化酶-2 在大鼠酒精性肝损伤中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28(4): 340-342.
- [14] Zavaglia C, Mondazzi L, Maggi G, et al. Are alanine aminotransferase, hepatitis B virus DNA or IgM antibody to hepatitis B core antigen serum levels predictors of histological grading in chronic hepatitis B[J]? *Liver*, 1997, 17(1): 83-87.
- [15] Cheng AS, Chan HL, Leung NW, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in chronic hepatitis B and the effects of anti-viral therapy[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(2): 251-260.

[收稿日期] 2004-08-23

[修回日期] 2004-10-23

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群