

# 环氧化酶 2 在肝衰竭模型肝损伤中的表达

## Hepatic expression of cyclooxygenase-2 in mice hepatic failure model

刘江<sup>1</sup>, 施柏年<sup>1</sup>, 何建方<sup>2</sup>, 戴利成<sup>2</sup>

(1. 浙江省湖州市中心医院感染内科, 湖州 313000; 2. 湖州市中心医院中心实验室)

**[摘要]** 目的:探讨环氧化酶 2(COX-2)在肝衰竭损伤肝组织中的表达。方法: BALB/c 小鼠随机分为正常对照组( $n=6$ )和肝衰竭组( $n=24$ ),前者以生理盐水 200  $\mu$ l 腹腔注射,后者采用内毒素(LPS)10  $\mu$ g/kg 和 *D*-氨基半乳糖(*D*-Gal)900 mg/kg 联合腹腔注射,对照组在注射后 8 h,肝衰竭组在注射后不同时点(2、4、6、8 h)检测血浆谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白介素 10(IL-10)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF  $\alpha$ )、细胞黏附分子 1(ICAM-1);处死动物,以原位灌注消化法分离肝 Kupffer 细胞后,半定量 RT-PCR 检测其中 COX-2 mRNA 的表达。结果:与对照组相比,肝衰竭组血浆 ALT、AST、IL-10、TNF  $\alpha$ 、ICAM-1 水平均显著升高( $P<0.05$ ),且随损伤时间的延长而逐渐升高( $P<0.001$ );COX-2 mRNA 仅在肝衰竭组表达,表达量随肝损伤时间延长也逐渐增高( $P<0.001$ )。结论:COX-2 在损伤肝组织中大量表达,且表达量随肝损伤程度而升高,提示其可能参与了 LPS/*D*-Gal 诱导的肝衰竭模型肝损伤过程。

**[关键词]** 环氧化酶 2;肝;肝功能衰竭

**[中图分类号]** R 575.3      **[文献标识码]** B      **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0444-03

肝衰竭是各种病因导致的肝细胞广泛变性、坏死,肝功能严重损害的临床综合征,病情重、预后差,其发病机制尚不清楚。内毒素血症与细胞因子在肝衰竭发生发展中起重要作用。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激多种细胞合成花生四烯酸(AA)代谢产物前列腺素(PG)E<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub> $\alpha$ 、血栓素 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>),参与单核巨噬细胞系统介导的细胞毒性作用,而此过程依赖于 PG 合成的限速酶即环氧化酶 2(COX-2)<sup>[1]</sup>。本实验应用 LPS 联合 *D*-氨基半乳糖(*D*-galactosamine, *D*-Gal)复制肝衰竭模型,来观察 COX-2 在肝衰竭模型中的表达。

### 1 材料和方法

1.1 动物 选用雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠,体质量约 20 g,由中国科学院上海医学实验动物中心提供,8~12 周龄。实验室内室温 20℃ 喂养 2 周后进行实验,实验前禁食 12 h,禁水 4 h。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 完全培养液(Gibco,美国),原位灌注消化液:5% collangenase(Sigma,美国)、Percoll 梯度离心液(广州威佳科技有限公司),*D*-Gal(重庆医科大学生物工程研究室),LPS(*E. coli* O55:B5, Sigma,美国),小鼠 IL-10、ICAM-1、TNF  $\alpha$  ELISA 试剂盒(上海晶美生物科技公司),TRIzol(Invitrogen 公司)。引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。 $\beta$ -actin:上游 5'-GGC ATG GGT CAG AAG GAT TCC-3',下游:5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC CGC-3',产物 500 bp;COX-2:上游:5'-ACA CTC TAT CAC TGG CAC CC-3',下游:5'-GAA GGG ACA CCC CTT CAC AT-3',产物 580 bp。

1.3 动物分组 30 只 BALB/c 小鼠分成正常对照组和肝衰竭组。正常对照组 6 只,腹腔注射生理盐水 200  $\mu$ l,8 h 后处死动物;肝衰竭组 24 只,腹腔注入 *D*-Gal /LPS (*D*-Gal 900 mg/kg, LPS 10  $\mu$ g/kg),分别在注射后 2、4、6、8 h 处死动物

(每时点 6 只)。所有动物在处死后进行心脏采血和分离 Kupffer 细胞。小鼠实验期间均正常饮食和饮水。

1.4 生化检测 上述各组动物处死后的心脏血标本-20℃ 保存。ALT、AST 用 Olympus 2700 自动生化仪检测。

1.5 肝脏病理变化 肝组织标本用 10% 甲醛固定,石蜡包埋,3  $\mu$ m 厚连续切片并进行 H-E 染色。

1.6 肝脏 Kupffer 细胞分离、纯化、鉴定 原位灌注法获得肝非实质细胞悬液后, Percoll 梯度液 SPS 液按梯度液与细胞悬液(2~3):1 的比例铺层,2 000 r/min 离心 20 min,获得富含 Kupffer 细胞的肝非实质细胞。将细胞移入试管中,以培养液制成细胞悬液,加入 24 孔培养板孔内培养(5% CO<sub>2</sub> 恒温箱内,37℃),用不含小牛血清的 RPMI 1640 培养液,调整细胞密度为 1.5  $\times$  10<sup>6</sup>/ml,接种于培养孔中,孵育 30~60 min 后取出,洗去非贴壁细胞,获得纯化的小鼠肝 Kupffer 细胞,消化下贴壁的 Kupffer 细胞,离心洗涤,最终获得的细胞团块悬浮在 2 ml RPMI 1640 完全培养液中,计数获得的细胞量,以锥虫蓝染色检测细胞活性。作免疫细胞化学染色并采用印度墨汁吞噬试验,在荧光显微镜下对 Kupffer 细胞进行鉴定。结果显示 Kupffer 细胞纯度 95.5%,活性细胞占 94.8%。

1.7 RT-PCR 将 Kupffer 细胞调整细胞密度为 10<sup>6</sup>/管,每管按步骤分别加入 1 ml TRIzol,0.2 ml 氯仿,0.5 ml 异丙醇,1 ml 75% 乙醇,孵育,提取总 RNA。然后取总 RNA 3.0  $\mu$ g,分别加 Oligo(dT)<sub>10</sub> 1  $\mu$ l,5  $\times$  RT-PCR 缓冲液 4  $\mu$ l, Rasin 1  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ l,逆转录酶 M-MLV(200 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l,补充经 DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ l,混匀后 37℃ 60 min。取逆转录产物 5  $\mu$ l,加 10  $\times$  Taq 酶缓冲液 5  $\mu$ l, dNTPs 1  $\mu$ l,上下游引物各 1  $\mu$ l,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, Taq 酶 0.3

**[作者简介]** 刘江,硕士,主治医师。

E-mail: liujiangxm@yahoo.com.cn

$\mu\text{l}$ ,加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应的条件是:95℃变性 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 45 s, 72℃ 45 s,循环 30 次,然后,72℃ 7 min。取 5  $\mu\text{l}$  PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶进行电泳观察结果。用 PDQuest™ (Bio-Rad Laboratories)分析 PCR 产物的灰度,半定量分析 COX-2 mRNA/ $\beta$ -actin 灰度比值。

1.8 血浆 IL-10、TNF  $\alpha$ 、ICAM-1 的检测 各小鼠采 EDTA 抗凝血,离心,留血浆-20℃保存备用。分别用 ELISA 试剂盒按说明书操作检测。

1.9 统计学处理 数据处理用 SPSS 10.0 软件。所有数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,多样本均数比较用单因素方差分析。

## 2 结果

2.1 小鼠肝衰竭模型建立的评估 在造模后 2 h 发现部分肝窦充血,少量炎症细胞浸润,肝组织结构仍完整,4~6 h 有少量肝细胞凋亡,片状坏死、炎症细胞浸润,8 h 见大量肝细胞凋亡、片状坏死,肝窦严重充血和坏死,无肝小叶结构,肝细胞组织模糊,有凋亡小体及弥漫性炎细胞浸润。造模后

ALT、AST 明显升高( $P<0.05$ ,表 1)。

表 1 肝衰竭组各时点小鼠 ALT、AST 的变化

( $n=6, \bar{x}\pm s, z_B/U \cdot \text{L}^{-1}$ )

组别	ALT	AST
正常对照	40.6±10.2	51.3±6.3
肝衰竭		
2 h	159.2±28.1	353.7±22.3
4 h	439.2±20.7*	532.5±73.2*
6 h	978.0±100.7*	1 172.3±70.2*
8 h	4 849.5±232.3*	4 520.5±260.7*

\*  $P<0.05$  与正常对照组比较

2.2 肝损伤情况 本研究检测促炎因子 TNF  $\alpha$ 、ICAM-1 和抗炎因子 IL-10 来评价肝损伤情况,发现在肝衰竭组中促炎因子 TNF  $\alpha$ 、ICAM-1 和抗炎因子 IL-10 的 4 个时点比较的  $F$  值分别为 84.1、103.5、74.3( $P<0.001$ ),说明随着时间的延长它们逐渐增高(表 2),而此时肝损伤程度逐渐加重。

表 2 肝衰竭组各时点 COX-2 的表达和 TNF  $\alpha$ 、ICAM-1、IL-10 的变化

( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

组别	COX-2 mRNA/ $\beta$ -actin	TNF $\alpha$ ( $\rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	ICAM-1 ( $\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	IL-10 ( $\rho_B/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
正常对照	0	58.6±10.2	167.2±22.5	22.4±3.0
肝衰竭				
2 h	0.46±0.03	320.5±86.6*	220.5±26.4	29.2±4.5
4 h	0.53±0.03	482.2±52.9*	375.6±34.7*	33.4±5.8*
6 h	0.67±0.02	650.3±95.1*	468.6±43.7*	39.2±6.7*
8 h	0.85±0.08	1 056.0±132.5*	656.3±62.3*	89.8±12.6*

\*  $P<0.05$  与正常对照组比较

2.3 COX-2 的表达变化 正常对照组 COX-2 mRNA 不表达,而肝衰竭组 COX-2 mRNA/ $\beta$ -actin 的灰度值随着时间的延长而增加,2、4、6、8 h 4 个时点比较的  $F$  值为 82.7( $P<0.001$ ),说明 COX-2 的表达逐步升高(表 2)。

## 3 讨论

COX-2 是一种诱导酶,在细胞外网状结构和细胞核边缘起作用,通过催化前列腺素和其他花生四烯酸代谢产物的生物合成,参与炎症反应。COX-2 基因启动子中含有 NF- $\kappa$ B、AP-1 等转录因子结合位点<sup>[2]</sup>。COX-2 的表达可被 LPS,白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF  $\alpha$ )、丝裂原、癌基因、血清、表皮生长因子(EGF)、转移生长因子(TGF)、血小板激活因子(PAF)、内皮素(ET)等诱导。

TNF  $\alpha$  是一种主要由单核巨噬细胞产生的细胞因子,能导致肝细胞凋亡,引起炎症细胞浸润、肝细胞损伤、坏死。ICAM-1 广泛分布于淋巴结和扁桃体血管内皮细胞、白细胞、巨噬细胞等表面。内毒素可通过诱导产生 TNF  $\alpha$  和 IL-1 而上调肝细胞和内皮细胞上 ICAM-1 的表达,导致白细胞黏附,增高血管阻力,造成肝微循环障碍,影响肝细胞的营养与氧供,造成休克和急性肝衰竭。IL-10 是一种单链糖蛋白,能参与抑制细胞合成炎症因子、集落刺激因子等主要负反馈调节机制,广谱抑制单核巨噬细胞炎症介质 IL-1、IL-6、IL-8、

TNF  $\alpha$  的合成及表达。实验发现在 LPS/D-Gal 诱导的肝衰竭模型中,作为促炎因子的 TNF  $\alpha$  最先升高,而后促炎因子 ICAM-1 和抑炎因子 IL-10 也逐步升高,这是机体的一种应答反应,细胞因子之间的不平衡在肝衰竭的发生发展中起了很重要的作用。

D-Gal 是一种氨基糖,在肝内通过半乳糖途径代谢,可以消耗半乳糖代谢途径的中间产物尿二苷磷酸,进而抑制尿嘧啶核苷的代谢,抑制保护性蛋白的合成。利用在肝脏 D-Gal 致敏的基础上模拟内毒素血症的原理,我们成功复制了肝衰竭模型。LPS 在不同剂量及不同时间均不同程度引起 NF- $\kappa$ B 的活化<sup>[3]</sup>,从而进一步诱生大量的 TNF  $\alpha$ 、IL-1、IL-6、PGs、氧自由基等细胞炎症因子的释放,放大其毒性作用。而 LPS、NF- $\kappa$ B、TNF  $\alpha$ 、IL-1 均能诱导 COX-2 的活化,后者又能导致大量的 PG 和其他 AA 代谢产物的生物合成,加速加重炎症反应的发生发展,这些细胞因子彼此之间形成一个独特的细胞因子和化学介质网络,通过协同作用导致肝细胞坏死。LPS 刺激多种细胞合成 AA 代谢产物参与单核巨噬细胞系统介导的细胞毒作用,具体的细胞机制尚不清楚。文献<sup>[4、5]</sup>认为: LPS 结合肝巨噬细胞 CD14 受体,导致有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAP kinase)活化及细胞溶质的磷脂酶 A<sub>2</sub>(cytosolic phospholipase, cPLA<sub>2</sub>) 磷酸化;同时, LPS 活化 NF- $\kappa$ B、AP-1 等转录因子,致 cPLA<sub>2</sub> 表达并且激活 COX-2

表达;磷酸化的 cPLA<sub>2</sub> 致细胞的 cPLA<sub>2</sub> (cellular cPLA<sub>2</sub>) 活化,引起磷脂释放为 AA; cPLA<sub>2</sub> 耦合 COX-2,后者耦合 PGD<sub>2</sub> 合成酶,导致 PDG<sub>2</sub> 合成。

Victorov 等<sup>[6]</sup>证实 LPS 可刺激大鼠 Kupffer 细胞合成 COX-2,促进 PGs 释放。本实验观察到,正常对照组 Kupffer 细胞不表达 COX-2 mRNA。在肝衰竭组, LPS 能上调 Kupffer 细胞 COX-2 mRNA 和血浆 TNF α、ICAM-1、IL-10 水平,且随着时间的延长而增强,说明 COX-2 参与了肝衰竭的发生发展过程。有文献认为 COX-2 与肝癌、肝纤维化也有密切的关系<sup>[7,8]</sup>。因此,进一步探讨 COX-2 作为肝脏疾病治疗的一个靶点可能有积极的意义。

[参考文献]

[1] Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms[J]? *Am J Physiol*, 1996, 270(3 Pt 1): G393-G400.

[2] Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, et al. Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42:710-718.

[3] 王永堂,鲁秀敏,蒋建新,等. 内毒素肝损伤过程中枯否细胞

NF-κB 和 AP-1 活性变化及其生物学意义[J]. *生命科学研究*, 2002, 6:224-229.

[4] Dieter P, Hempel U, Kamionka S, et al. Prostaglandin E2 affects differently the release of inflammatory mediators from resident macrophages by LPS and muramyl tripeptides [J]. *Mediators Inflamm*, 1999, 65:295-303.

[5] Dieter P, Scheibe R, Jakobsson PJ, et al. Functional coupling of cyclooxygenase 1 and 2 to discrete prostanoid synthases in liver macrophages[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276: 488-492.

[6] Victorov AV, Hoek JB. Secretion of prostaglandins elicited by lipopolysaccharide and ethanol in cultured rat Kupffer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215:691-697.

[7] Callejas NA, Casado M, Diaz-Guerra MJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2001, 33:860-867.

[8] Cheng J, Imanishi H, Iijima H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis[J]. *Hepatol Res*, 2002, 23:185-195.

[收稿日期] 2006-01-16 [修回日期] 2006-03-20  
[本文编辑] 孙岩