

# 环氧合酶 2 基因在大鼠脑缺血再灌注损伤中的表达及意义

于维东<sup>1</sup>, 杨 军<sup>2</sup>, 范红杰<sup>3</sup>, 胡新华<sup>2</sup>

(中国医科大学 1. 附属第一医院干诊三病房, 2. 附属第一医院外科, 辽宁省沈阳市 110001;

3. 附属第二医院神经内科, 辽宁省沈阳市 110003)

[关键词] 神经病学; 环氧合酶; 局灶性脑缺血; 再灌注损伤; 大鼠

[摘要] 目的 探讨局灶性脑缺血再灌注损伤过程中环氧合酶 2 基因的表达及其意义。方法 采用栓线法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型。随机分为 8 组: 假手术组, 缺血 2 h 组, 缺血再灌注 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 组, 每组 10 只。评定神经功能损伤, HE 染色观察脑组织形态学改变。Northern blot、Western blot 和免疫组织化学染色方法检测脑组织环氧合酶 2 mRNA 和蛋白产物表达。结果 神经功能缺损表现随缺血再灌注时间的延长而逐渐加重。缺血 2 h 组环氧合酶 2 mRNA 和蛋白产物表达比假手术组明显增加 ( $P < 0.01$ ), 再灌注后表达逐渐增强, 再灌注 12 h 环氧合酶 2 的 mRNA 表达达高峰 ( $0.92 \pm 0.30$ ), 再灌注 24 h 环氧合酶 2 的蛋白产物表达达高峰 ( $0.72 \pm 0.18$ ), 与其它组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。结论 环氧合酶 2 基因在局灶性脑缺血再灌注损伤中的表达呈动态变化过程, 环氧合酶 2 可能与缺血再灌注后迟发性神经细胞死亡有关。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

## The Expression and Significance of Cyclooxygenase-2 in Ischemic Reperfusion Injury of Middle Cerebral Artery in Rats

YU Wei-Dong, YANG Jun, FAN Hong-Jie, and HU Xin-Hua

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Cyclooxygenase; Focal cerebral ischemia; Reperfusion injury; Rat

[ABSTRACT] Aim To explore the expression and significance of cyclooxygenase (COX-2) during the focal ischemic reperfusion injury of middle cerebral artery in rats. Methods The model of focal ischemic reperfusion injury of middle cerebral artery was built in rats by placing an intraluminal suture. 80 rats were divided into 8 groups, which were control group, ischemia for 2 hours, ischemic reperfusion for 3 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours. The nerve function was evaluated and the change of brain tissue injury was observed by HE stain. Northern blot, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of COX-2. Results Manifestation of neurologic impairment gradually aggravated with the extension of reperfusion time. The mRNA and protein expression of COX-2 increased significantly after ischemia for 2 hours, and gradually reinforced after reperfusion, which reached the peak from 12 hours to 24 hours after reperfusion ( $P < 0.01$ ).

Conclusion The expression of COX-2 gene in focal cerebral ischemia reperfusion injury was dynamic changing process. The expression of COX-2 protein may be involved in the delayed neuronal death after ischemic reperfusion injury.

缺血性脑血管病导致脑组织损伤, 许多分子生物学机制参与了这一病理损伤过程, 其中花生四烯酸环氧合酶途径的代谢产物在这一过程中具有重要作用。环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 是催化花生四烯酸生成前列腺素  $H_2$  的限速酶, 前列腺素  $H_2$  是前列腺素类物质形成的中间体, 而前列腺素类物质是重要的炎性介质, 可以介导许多细胞病理生理过程<sup>[1,2]</sup>。本研究我们拟观察局灶性脑缺血后 COX-2 基因及蛋白产物表达的变化, 探讨其作用及可能的

机制, 为缺血性脑血管病的防治提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型的制作及分组

Wistar 大鼠 80 只, 雌雄不拘, 体重 250 ~ 300 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。随机分为 8 组 (每组 10 只): 假手术组、缺血 2 h 组、缺血 2 h 再灌注 3、6、12、24、48 和 72 h 组。参照 Longa 等<sup>[3]</sup> 方法略加改进制备动物模型。栓线采用 5 号高碳素尼龙线 (直径 0.2 mm, 经肝素浸泡处理), 头端烫为圆钝。常规大鼠手术, 栓线经左侧颈总动脉和颈外动脉分叉处通过颈内动脉入颅至大脑前动脉, 阻断左侧大脑中动脉所有血液来源, 建立大鼠左侧大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型。尼

[收稿日期] 2006-11-17 [修回日期] 2007-03-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (30600631); 辽宁省教育厅高等学校科研项目 (05L485)

[作者简介] 于维东, 硕士, 主治医师, 研究方向为脑缺血再灌注损伤机制及防治, E-mail 为 yuweidongcmu@126.com。杨军, 博士, 副教授, 研究方向为缺血再灌注损伤机制。范红杰, 硕士, 副教授, 主要从事缺血性脑血管病的防治研究。

龙线插入深度距分叉处 18~20 mm,术毕缝合皮肤,外留 1 cm 长尼龙线头,以清醒后出现对侧上肢为重的瘫痪及同侧 Homer 征为模型成功的标准。预定再灌注时点轻轻提拉所留线头至有阻力时,提示尼龙线头端已至颈外动脉残端,血流再通。假手术组除插尼龙线深度为 10 mm 外其余步骤同上。各组动物到达预定时间,采用 4% 多聚甲醛溶液灌流固定,立即取脑自视交叉平面向后冠状切开制成 5 mm 厚的新鲜脑组织块,液氮中冻存备 mRNA 及蛋白印迹检测或者用 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,常规制成厚度 4  $\mu$ m 的石蜡切片,备 HE 和免疫组织化学染色。模型制作成功判定标准参考 Longa 等<sup>[2]</sup>的 5 分制评分标准进行评分,0 分为无神经损伤症状;1 分为不能完全伸展对侧前爪;2 分为向外侧转圈;3 分为向对侧倾倒;4 分为不能自发行走,甚至意识丧失。所有实验动物术中及术后发生抽搐、昏迷、感染或死亡者,未达到预定时间者均弃之不计,再随机补充。

## 1.2 Northern 杂交检测环氧合酶 2 mRNA 表达

1.2.1 提取总 RNA 采用 Trizol 试剂抽提总 RNA,具体方法是:取液氮中保存的脑组织 200 mg 分别放在陶瓷研钵中液氮低温环境下碾碎成粉末,加入 Trizol 试剂匀浆,离心后取上清液经氯仿抽提后再经等体积异丙醇沉淀,75% 酒精清洗 2 次、离心,DEPC 水溶解沉淀,紫外分光光度仪测定 OD 值(A260/A280),甲醛变性凝胶电泳检测 28S 和 18S rRNA 条带。

1.2.2 制备 cDNA 探针 首先将 mRNA 逆转录为 cDNA,根据 COX-2 在 GenBank 的序列(AF233596)设计引物,上游 5'-ATCAGGTCATCGGTGGAGAG-3',下游 5'-CTGCTGTACAG CGATTGGA-3',进行 PCR 扩增(产物长度 579 bp)。扩增产物测序后构建 pBluescript II 载体,扩增后采用 Prime-a-Gene 随机引物标记试剂盒(Promega 公司)进行  $\alpha$ -32P-dCTP 标记。

1.2.3 Northern 杂交 取 30  $\mu$ g 总 RNA 按《分子克隆实验指南》<sup>[4]</sup>中所述方法经 1% 琼脂糖—甲醛凝胶变性电泳分离,将凝胶上的 RNA 转移到硝酸纤维素滤膜,真空炉 80℃ 干烤 0.5 h。42℃ 条件下,用含有 50% 甲酰胺、6  $\times$  SSC、5  $\times$  Denhardt 溶液、0.5% SDS、100 g/L 变性鲑精 DNA 的杂交液进行预杂交 3 h,再加入  $\alpha$ -32P-dCTP 标记的 cDNA 探针进行杂交 16~18 h,杂交膜先后经 2  $\times$  SSC(0.5% SDS)、2  $\times$  SSC(0.1% SDS)、0.1  $\times$  SSC(0.5% SDS)和 0.1  $\times$  SSC 分别漂洗,-70℃ 放射自显影 48 h 后洗片。凝胶自动成像系统上对 X 线片摄像,分析各条带吸光度值,进

行半定量分析。

## 1.3 Western blot 检测环氧合酶 2 蛋白产物表达

参照《分子克隆实验指南》<sup>[3]</sup>配制细胞裂解液,剪碎组织后机械匀浆,4℃ 低温 12 000 r/min 离心 10 min。考马氏亮蓝 R250 染色法测总蛋白质浓度,将各组蛋白浓度调到同一水平。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔加蛋白样品 100  $\mu$ g,电泳后通过半干式电转移仪(美国 Bio-Rad 公司)将蛋白转到硝酸纤维素滤膜。丽春红 S 染色确定转膜情况并标记蛋白 Marker 位置。5% 脱脂奶粉 TBS 缓冲液封闭 4℃ 冰箱过夜;一抗 1:1 000 稀释,室温下摇 2 h 后 TBS 洗膜 3 次;按 1:1 000 加入过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG-HRP 60 min,TBS 洗 3 次后加入 ECL 2~3 min,暗室显影 2 min 后冲洗胶片。凝胶成像分析系统上摄像分析,计算出吸光度值。COX-2 和 GAPDH 抗体均为武汉博士德公司产品(兔 IgG 多抗)。

## 1.4 HE 染色和免疫组织化学染色

石蜡标本切片,厚 4  $\mu$ m,常规脱蜡至水,行 HE 染色,光镜下观察。抗 COX-2 抗体为武汉博士德公司产品(兔 IgG 多抗,工作浓度 1:100)。按试剂盒说明常规 SABC 法染色,DAB 显色。PBS 代替一抗作阴性对照。400 倍光镜下随机观察缺血周围 6 个不重叠的视野,每视野不少于 100 个细胞,取平均数。

## 1.5 统计学处理

SPSS10.0 统计软件处理数据,组内差异采用方差分析,组间比较采用配对 *t* 检验。

# 2 结果

## 2.1 神经功能损伤观察及评定

假手术组未发现神经功能缺损表现,评分为 0 分;缺血 2 h 组表现为不能完全伸展对侧前爪,评分为 1 分;缺血 2 h 再灌注 24 h 组,4 只表现为行走时向右侧划圈,评分为 2 分,3 只表现为向对侧跌倒,评分为 3 分;缺血 2 h 再灌注 72 h 组,1 只表现为向对侧跌倒,评分为 3 分,1 只表现为不能自发行走但未昏迷,评分为 4 分(表 1)。

## 2.2 病理形态学观察

光镜下,假手术组神经细胞未见明显改变。缺血 2 h 组、缺血再灌注 3 h 组在皮层无明显改变,外侧纹状体可见散在的神经细胞坏死征象。缺血再灌注 12 h 组,左侧大脑中动脉供血区范围内可见神经细胞坏死征象,表现为神经细胞呈三角形或多角形、细胞固缩深染、核仁消失、神经细胞胞质浓缩、深染,呈嗜酸性改变。缺血再灌注 24~72 h 各组在上述



区域内呈更大损害改变,细胞周围间隙扩大,梗塞中心坏死物脱失,仅残留疏松网状结构,梗塞区有散在毛细血管外渗血。

表 1. 神经功能缺损评分结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

分 组	神经功能缺损评分
假手术组	0
缺血 2 h	$1.2 \pm 0.3$
缺血再灌注 3 h	$1.5 \pm 0.4$
缺血再灌注 6 h	$1.8 \pm 0.4^a$
缺血再灌注 12 h	$2.3 \pm 0.6^{ab}$
缺血再灌注 24 h	$2.6 \pm 0.8^{ab}$
缺血再灌注 48 h	$2.9 \pm 0.7^{ab}$
缺血再灌注 72 h	$3.0 \pm 1.2^{ab}$

a 为  $P < 0.01$ , 与缺血 2 h 组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注 3 h 组比较。

### 2.3 Northern blot 检测环氧合酶 2 mRNA 的表达

Northern 杂交结果提示,在 4.3 kb 处可见 COX-2 mRNA 表达。假手术组 COX-2 mRNA 表达较少;缺血 2 h 组可见 COX-2 mRNA 表达增加;缺血再灌注 3 h 组 COX-2 mRNA 表达进一步增加;缺血再灌注 12 ~ 24 h 组 COX-2 mRNA 表达达高峰,之后表达开始下降,再灌注 72 h COX-2 mRNA 的表达明显减少(图 1 和表 2)。

### 2.4 Western blot 检测环氧合酶 2 蛋白产物的表达

假手术组 COX-2 蛋白产物表达很少;缺血 2 h 组可见 COX-2 蛋白产物表达增加;再灌注后 COX-2 蛋白产物表达逐渐增强,再灌注 24 h 时达到高峰,之后表达开始有所下降(图 2 和表 2)。

### 2.5 免疫组织化学染色法检测环氧合酶 2 蛋白产物的表达

环氧合酶 2 (COX-2) 阳性细胞核呈棕黄色。假

手术组很少见 COX-2 阳性细胞;缺血 2 h 组 COX-2 蛋白主要在半暗带区,尤其是细胞形态完整的神经元,而胶质细胞无表达;再灌注 3 ~ 12 h 组在缺血侧额顶叶皮层可见大量棕黄色淡染阳性细胞。缺血再灌注 24 h,缺血中心额顶叶皮层很少有 COX-2 阳性细胞,缺血边缘区相当于缺血半暗带即扣带皮层、内侧纹状体等可见大量 COX-2 阳性表达,表达随再灌注时间延长而逐渐增强。再灌注 72 h 组,缺血中心无 COX-2 阳性细胞。大脑皮层阳性细胞多为神经细胞,而海马回阳性细胞多为颗粒细胞和锥体细胞(图 3 和表 2)。

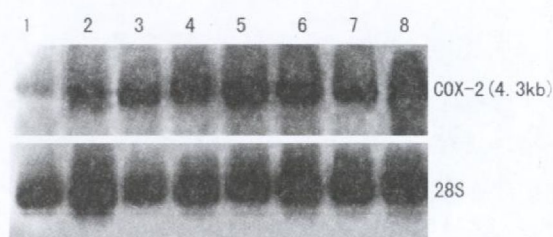


图 1. Northern blot 检测环氧合酶 2 mRNA 表达结果 1 为假手术组, 2 为缺血 2 h 组, 3 ~ 8 分别为缺血再灌注 3、6、12、24、48 和 72 h 组。

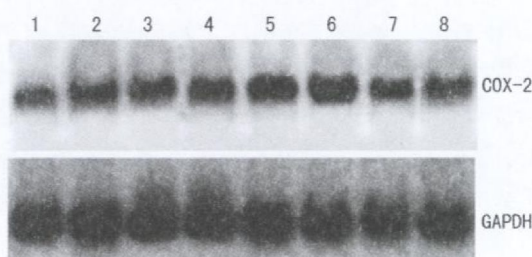


图 2. Western blot 检测环氧合酶 2 蛋白产物表达结果 1 为假手术组, 2 为缺血 2 h 组, 3 ~ 8 分别为缺血再灌注 3、6、12、24、48 和 72 h 组。

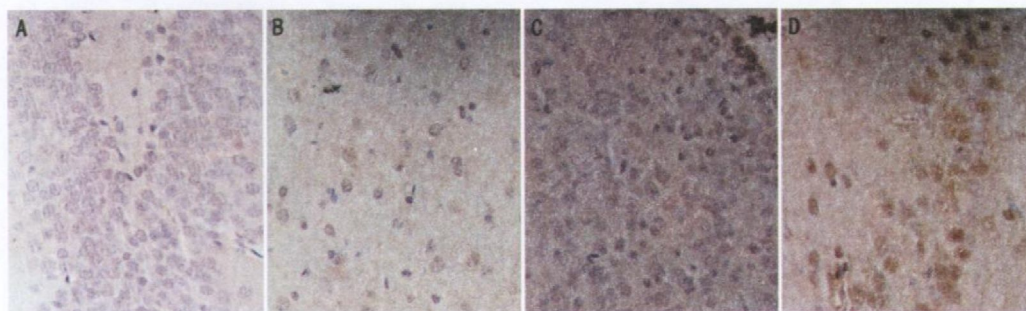


图 3. 免疫组织化学染色法检测环氧合酶 2 蛋白产物表达 ( $\times 400$ )

A 为假手术组, B 为缺血 2 h 组, C 为再灌注 6 h 组, D 为再灌注 24 h 组。

表 2. 环氧合酶 2 mRNA 和蛋白产物表达结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

分 组	COX-2 mRNA	COX-2 蛋白	COX-2 阳性 细胞(个/HP)
假手术组	0.07 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.24 ± 0.12 <sup>b</sup>	8 ± 3 <sup>ab</sup>
缺血 2 h	0.32 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.10 <sup>b</sup>	28 ± 6 <sup>b</sup>
缺血再灌注 3 h	0.45 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.14 <sup>b</sup>	48 ± 10 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 6 h	0.62 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.47 ± 0.20 <sup>a</sup>	66 ± 18 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 12 h	0.92 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.24 <sup>a</sup>	84 ± 21 <sup>a</sup>
缺血再灌注 24 h	0.86 ± 0.22 <sup>a</sup>	0.72 ± 0.18 <sup>a</sup>	104 ± 25 <sup>a</sup>
缺血再灌注 48 h	0.48 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.16 <sup>a</sup>	62 ± 14 <sup>ab</sup>
缺血再灌注 72 h	0.32 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.15 <sup>b</sup>	46 ± 15 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与缺血 2 h 组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与缺血再灌注 12 ~ 24 h 比较。

### 3 讨论

缺血性脑血管病导致脑组织损伤,多种分子生物学机制参与这一病理损伤过程。脑缺血激发花生四烯酸释放以及环氧合酶产物如前列腺素、血栓素和自由基水平增高,被认为是脑缺血再灌注损伤的重要机制。人们发现脑缺血诱导 COX-2 基因及蛋白产物表达,前列腺素代谢产物也明显增加。Nogawa 等<sup>[5]</sup>采用逆转录聚合酶链反应证实在缺血 6 h 同侧脑半球中 COX-2 mRNA 表达上调,12 h 表达达高峰。Kinouchi 等<sup>[6]</sup>采用原位杂交方法发现 COX-2 mRNA 在缺血半暗带区即大脑中动脉皮层周边、邻近皮层以及内侧纹状体强烈表达。我们采用栓线法制成大脑中动脉局灶性脑缺血及再灌注损伤动物模型,研究 COX-2 的 mRNA 及蛋白产物表达情况,结果表明,缺血 2 h 和再灌注 3 h 即有 COX-2 mRNA 表达增加,提示缺血和再灌注均可诱导 COX-2 基因的激活。再灌注持续 24 h 以上,缺血中心额顶叶皮层很少有 COX-2 阳性细胞,在缺血边缘区相当于缺血半暗带即扣带皮层、内侧纹状体等可见 COX-2 阳性细胞。我们推测,短期缺血没有发生神经元坏死,COX-2 蛋白诱导并表达。随着缺血再灌注时间延长,神经元发生坏死,缺血中心额顶叶皮层发生梗死而进入不可逆损伤期,所以 COX-2 阳性细胞表达明显减少,而此时梗死中心周边扣带皮层、内侧纹状体

等仍处于可逆性缺血期,仍有大量 COX-2 阳性细胞。再灌注损伤时间愈长,坏死中心愈大,可挽救半暗带区愈窄,COX-2 阳性细胞减少。

环氧合酶 2(COX-2)蛋白主要由半暗带区、邻近皮层(扣带皮层)和远隔脑区(海马)的神经元表达,尤其是由细胞形态完整的神经元表达,提示 COX-2 可能并不介入脑缺血后急性损伤。目前,COX-2 蛋白的诱导和表达在细胞死亡的作用机制仍不清楚。本实验中,神经功能缺损表现随缺血再灌注时间的延长而逐渐加重,病理染色进一步证实神经细胞坏死范围逐渐扩大。COX-2 的 mRNA 和蛋白产物表达却在再灌注 12 ~ 24 h 达到高峰后逐渐降低,受损害的神经元仅在形态尚完整时过度表达 COX-2,之后即逐渐出现神经元坏死,提示 COX-2 蛋白表达可能与缺血所致的迟发性神经元死亡有关。有研究表明<sup>[7]</sup>,COX-2 抑制剂应用能阻止缺血细胞死亡和再灌注损伤,减小梗死体积,说明 COX-2 蛋白对梗死边缘延迟性神经元死亡有重要作用。COX-2 抑制剂的应用减少了延迟性神经元死亡,可能成为缺血性脑疾病防治新的研究方向。

### 【参考文献】

- [1] Williams CS, Dubois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270 (3pt1): G393-400.
- [2] 陈琳,匡希斌. 异构前列腺素与临床氧化应激性损伤疾病[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (5): 667-669.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 克隆化基因所表达蛋白质的检测与分析[M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1992; 363-371.
- [5] Nogawa S, Zhang F, Ross ME, Iadecola C. Cyclooxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage [J]. *J Neurosci*, 1997, 17 (12): 2 746-755.
- [6] Kinouchi H, Huang H, Arai S, Mizoi K, Yoshimoto T. Induction of cyclooxygenase-2 messenger RNA after transient and permanent middle cerebral artery occlusion in rats: comparison with c-fos messenger RNA by using in situ hybridization [J]. *J Neurosurg*, 1999, 91 (6): 1 005-012.
- [7] Hewett SJ, Vliasz TF, Vidwans AS, Hewett JA. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 293 (2): 417-425.

(此文编辑 许雪梅)