

# 角叉菜诱导大鼠胸膜炎中环氧化酶-2的生成及 NS-398对其选择性抑制作用

杨秋生\*, 原田芳照<sup>1</sup>, 鹿取信<sup>1</sup>

(首都医科大学药理学教研室, 北京 100054; <sup>1</sup> 日本北里医科大学药理学教研室)

**摘要** 目的:检测角叉菜诱导的大鼠胸膜炎渗出细胞中 COX-2 的存在并观察 NS-398 对其活性的影响。方法:用 SDS-PAGE 和 Western blot 分析及 PGHS-1 和 PGHS-2 抗血清,识别并检测胸膜炎渗出细胞中的 COX-2。酶活性用 TLC 法测定。结果:致炎后 5 h, PGHS-2 出现, 19 h 时消失,而 PGHS-1 在注射角叉菜前后均出现。此外,在胸膜炎大鼠和正常大鼠的肺、胃、肾微粒体中,只检测到 PGHS-1, 未检测到 PGHS-2。新的非甾体抗炎药 NS-398,可明显抑制 COX-2 活性( $IC_{50} = 4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。结论:COX-2 仅存在于角叉菜诱导的炎症部位;NS-398 可选择性抑制 COX-2,并呈剂量依赖性。

**关键词** 环氧化酶-2(前列腺素 H 合成酶-2); 胸膜炎; 免疫印迹; NS-398[ N-(2-环己氧-4-硝基苯)甲烷磺胺 ]

环氧化酶(COX)或称前列腺素 H 合成酶(PGHS)是花生四烯酸(AA)代谢、前列腺素(PGs)和血栓素 A<sub>2</sub>(TAX<sub>2</sub>)生物合成过程中重要的限速酶之一。最近的研究发现:COX 有两种形式:COX-1,即通常所指的环氧化酶,存在于大多数组织细胞中,而它的异构体 COX-2,是一种被诱导的酶,仅存在于多种刺激因子如 PMA, LPS 和 IL-1 等引起的炎症组织中<sup>[1,2]</sup>,并在一些组织中证实有 COX-2 mRNA 的存在<sup>[3,4]</sup>,然而在实验动物炎症模型上证据极少。因此为了证实炎症组织中 COX-2 的存在,我们以大鼠胸膜炎模型检测了 COX-2 的生成并在体外观察了 NS-398 对两种酶催化的 AA 代谢产物 PGE<sub>2</sub> 的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 大鼠胸膜炎渗出细胞、肺、胃、肾微粒体的制备及免疫印迹分析(Western blot analysis)

Sprague Dawley(SD)大鼠(♂, 9~10 周龄),胸膜炎组胸膜腔内注射 2%角叉菜 0.2 ml,对照组注射等量生理盐水( $n = 6$ )。在一定时间内乙醚吸入麻醉断头处死,收集胸腔渗出液,细胞分离后悬浮于  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4, 含色氨酸  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )中,经超声震荡 5 min 将细胞破碎,

于  $700 \times g$  离心 10 min,  $4^\circ\text{C}$ 。取上清液加入 0.5% Tween 20,  $140\,000 \times g$  离心 1 h,  $4^\circ\text{C}$ , 沉淀部分悬浮于  $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

分离大鼠肺、胃及肾,分别用  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液制成匀浆。在  $12\,000 \times g$  离心 20 min,取上清液于  $100\,000 \times g$  离心 1 h,  $4^\circ\text{C}$ 。沉淀部分按前述方法悬浮保存。所有操作均在  $4^\circ\text{C}$  下进行。用 Bio Rad 蛋白分析法(Bio Rad Co. 美国)测定制备样品中蛋白含量,分别加样  $10 \mu\text{l}$  ( $50 \sim 75 \mu\text{g}/\text{lane}$ ),进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS-PAGE)<sup>[5]</sup>。开始电流 10 mA, 30 min。当待测样品进入分离胶后将电流调至 20 mA, 30 min。电泳展开后转移到 Immobilon-P 纤维膜(Millipore Co. 日本)上,用 Block Ace(大日本制药)封闭后,与 PGHS-1 和 PGHS-2(Calyma Chem 美国)抗血清反应。再与羊抗兔 IgG 作用。以 70-ku 分子标记蛋白(Molecular mark protein, LKB, 瑞典)定位<sup>[6]</sup>,进行蛋白印迹分析<sup>[7]</sup>。免疫染色的具体步骤按厂家(Konica Co. 日本)试剂说明书进行。

### 2 体外 AA 代谢产物的 TLC 分离和放射性强度测定

将 COX-1 和 COX-2(Calyma Co. 美国)分别加入  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液中,其中含血红蛋白  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和色氨酸  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在此反应系

统中加入不同浓度吲哚美辛(Merck Co.)和 NS-398 [ *N*-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methane sulfonamide, Taisho 制药,日本 ],以等量缓冲液为对照,于 37℃ 温育 4 min。然后加入 <sup>3</sup>H-AA (74 kBq·ml<sup>-1</sup>) 20 μl 继续反应 2 min。用 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 终止反应,经乙酸乙酯提取 2 次。合并提取液经旋转蒸发后溶于乙酸乙酯中进行 TLC 分离(20 cm × 20 cm 硅胶板,Whatman Co.美国)。展开剂为乙酸乙酯-异辛烷-乙酸-水(90:50:20:100)。经 γ-放射色谱摄影仪定位后将样品分别刮下,加入 ASC-II 闪烁液 6 ml 进行放射性强度测定。以产物 PGE<sub>2</sub> 生成量,计算药物对 COX-1 和 COX-2 活性的抑制作用。抑制率(%) = (对照放射性计数 - 给药放射性计数) / 对照放射性计数 × 100%。

实验数据经统计学 *t*-检验处理。

### 实验结果

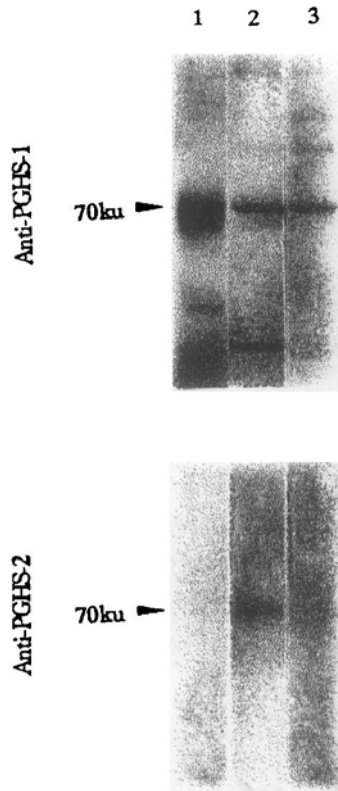


Fig 1 Immunoblot analysis of pleural cells. lane 1 : pleural lavage cells from normal rats ; lane 2 : pleural exudate cells at 5 h of pleurisy ; lane 3 : pleural exudate cells at 19 h of pleurisy . The position of 70-ku molecular marker protein is indicated .

### 1 大鼠胸腔渗出细胞及肺、胃、肾微粒体的免疫印迹分析

胸腔渗出细胞免疫印迹图谱如图 1 所示。按文献<sup>[6]</sup>报道,70 ku 标准分子量蛋白质,与人的 PGHS-1和 PGHS-2 的分子量相似。本实验中,正常大鼠胸腔渗出细胞中只有 PGHS-1 蛋白染色区带,其存留在 5 h 和 19 h 保持于同一水平。而在角叉菜诱导的大鼠胸膜炎渗出细胞(92%为多形核白细胞,少量单核细胞),致炎前无 PGHS-2 区带,致炎后 5 h 出现,19 h 消失。这与培养的人脐索静脉内皮细胞中所测结果<sup>[8]</sup>相一致。以前的实验<sup>[9]</sup>证实:角叉菜致胸膜炎 1~7 h, PGE<sub>2</sub> 和 TXB<sub>2</sub> 明显升高并可被阿司匹林抑制。PGHS-2 印迹的时间过程与胸膜炎渗出细胞中 PGs 水平相吻合。图 2 显示:PGHS-1 染色区带存在于正常大鼠和胸膜炎 5 h 后大鼠的肺、胃、肾中,而在这些组织中 PGHS-2 区带均未出现,明显低于检测水平,这表明即使动物有炎症感染时,PGHS-2(COX-2) 也仅存在于炎症部位,而不存在于感染动物的其它组织。

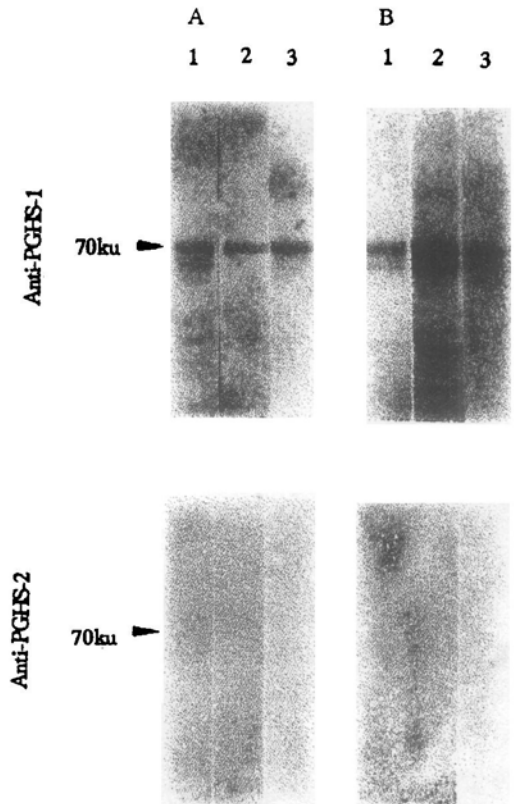


Fig 2 Immunoblot analysis of microsomal fractions of the lung (lane 1), stomach (lane 2) and kidney (lane 3). Panel A, from normal control rats ; panel B, from rats of 5 h of pleurisy . The position of 70-ku molecular marker protein is indicated .

## 2 NS-398 对 AA 代谢产物的影响

在环氧酶作用下, AA 代谢产物主要为 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGE<sub>2</sub> 和 PGD<sub>2</sub>。给药后 3 种产物的生成都受到不同程度抑制, 仅以与炎症密切相关的 PGE<sub>2</sub> 作图(图 3)。结果表明: 在体外 NS-398 可明显抑制 COX-2, 并呈剂量依赖性, IC<sub>50</sub> = 4.5 μmol·L<sup>-1</sup>。相同剂量对 COX-1 的影响很小, 剂量增至 100 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 对 COX-1 的抑制率约为 30%。在本实验剂量范围内, 未得出 IC<sub>50</sub>。说明 NS-398 对 COX-2 的抑制作用具有较强选择性。吲哚美辛对 COX-1 和 COX-2 活性的抑制程度近似, IC<sub>50</sub> 分别为 0.75 μmol·L<sup>-1</sup> 和 1 μmol·L<sup>-1</sup>。

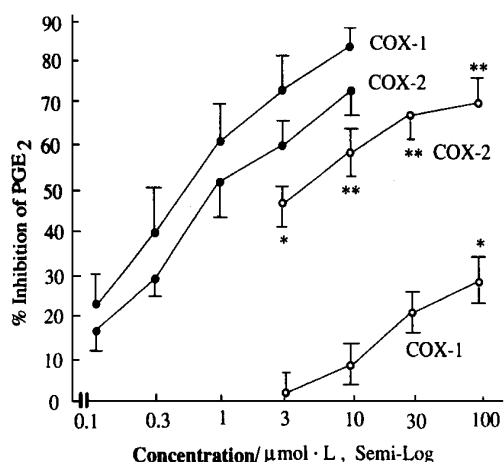


Fig 3 Effects of NS-398 (○) and indomethacin (●) on COX-1 and COX-2 activity ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control).

## 讨 论

COX(PGHS)催化 AA 转变成 PGs, 是阿斯匹林及其它非甾体抗炎药(NSAIDs)作用的靶位。许多炎症介质可以使 COX-2 mRNA 和酶蛋白含量升高, 而对 COX-1 无影响。目前, 很多环氧酶抑制剂如阿司匹林、吲哚美辛正广泛用于临床。由于其对各部位选择性不高, 在发挥抗炎作用的同时, 对抗了 PGE<sub>2</sub> 对胃粘膜的保护作用, 引起胃粘膜及其它组织严重不良反应。本文的研究表明: 角叉菜所致胸膜炎 5 h 时确有 COX-2 的检出。研究组其他学者的测定证实: 地塞米松(3 ~ 30 mg·kg<sup>-1</sup> ip), NS-398 (3 mg·kg<sup>-1</sup> ip) 可以抑制 COX-2 和 PGE<sub>2</sub> 的生成及炎性渗出<sup>[10]</sup>, 这表明 COX-2 参与了炎症部位 PGs 的生物合成。此外, 近年的研究表明: COX-1 和

COX-2 对各种抑制剂的敏感性不同<sup>[11]</sup>, 大多数环氧酶抑制剂对 COX-1 的抑制作用比对 COX-2 的作用强<sup>[12]</sup>。本观察证实: 在胸膜炎大鼠的肺、胃、肾中只检测到 COX-1, 未检测出 COX-2, 这可为选择性 COX-2 抑制剂作为无胃、肾副作用的新抗炎药提供一个合理依据。

据报道, 新的非甾体抗炎药 NS-398, 0.3 ~ 5 mg·kg<sup>-1</sup> 可以发挥抗炎止痛作用, 一次口服给药 1 000 mg·kg<sup>-1</sup> 对胃肠道无明显损害<sup>[13]</sup>。本实验在体外直接检测了 NS-398 对 COX-1 和 COX-2 催化的 AA 代谢主要产物 PGE<sub>2</sub> 生成的影响, 可以合理解释 NS-398 与炎症有关的选择性抑制作用机制。

致谢 本工作得到日本内藤纪念科学振兴财团奖学金资助。

## 参 考 文 献

- 1 Ó Sullivan MG, Huggins EM, Meade EA, et al. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **187**: 1123
- 2 Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, et al. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 9049
- 3 Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, et al. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3 T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 12866
- 4 Ó Banion MK, Sadowski HB, Winn V, et al. A serum- and glucocorticoids-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase related protein. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 23261
- 5 东京大学医学研究所癌研究部编. 细胞工学实验プロトコール. 东京: 秀润出版(株), 1992. 161
- 6 Ishimura K, Suzuki T, Fukui K, et al. Immunocytochemical localization of prostaglandin endoperoxide synthase in the bovine intestine. *Histochemistry*, 1993, **99**: 485
- 7 Mitchell JA, Belvisi MG. Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol*, 1994, **113**: 1008
- 8 Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 7384
- 9 Harada Y, Tanaka K, Uchida Y, et al. Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenin-induced pleurisy: A profile analysis using gas chromatography-mass spectrometry. *Prostaglandins*, 1982, **23**: 881

- 10 Katori M, Harada Y, Hatanaka K, *et al.* Induction of prostaglandin H synthase-2 in rat carrageenin-induced pleurisy and effect of a selective COX-2 inhibitor. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res*, 1995, **23**: 345
- 11 Meade E, Smith WL, Dewitt DL, *et al.* Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 6610
- 12 Mitchell JA. Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 11693
- 13 Futaki N, Yoshikawa K, Hamasaka Y, *et al.* NS-398, a novel non-steroidal anti-inflammatory drug with potent analgesic and antipyretic effects, which causes minimal stomach lesions. *Gen Pharmacol*, 1993, **24**: 105

## INDUCTION OF CYCLOOXYGENASE 2 IN RAT CARRAGEENIN INDUCED PLEURISY AND ITS SELECTIVE INHIBITION BY NS-398

Yang Qiusheng( Yang QS) , Harada Yoshiteru<sup>1</sup> , Katori Makoto<sup>1</sup>

( Capital University of Medical Science , Beijing 100054 ; <sup>1</sup>Kitasato University , Japan)

**ABSTRACT** **AIM:** To detect cyclooxygenase-2(COX-2)/ prostaglandin H synthase-2(PGHS-2) in cells of pleural exudate and investigate the effect of NS-398 on its activity. **METHODS:** COX-2 was tested by SDS-PAGE and Western blot in cells of the pleural exudate induced in rats by intrapleural injection of 0.2 ml of 2% carrageenin. TLC was used to analyze the activity of COX-2. **RESULTS:** The examination using PGHS-1 or PGHS-2 antiserum showed that PGHS-2 appeared at the 5th hour after carrageenin injection, and vanished at the 19th hour. While, PGHS-1 appeared in cells before and after carrageenin injection. Furthermore, only PGHS-1, but not PGHS-2, was detected in the microsomal fraction of the lung, stomach and kidney of pleurisy-affected and normal control rats. NS-398, a novel nonsteroidal anti-inflammatory agent, suppressed the activity of COX-2 with  $IC_{50} = 4.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . **CONCLUSION:** COX-2 is only present in inflammatory site induced by carrageenin. NS-398 may selectively inhibit COX-2 activity in a dose-dependent manner.

**KEY WORDS** cyclooxygenase-2 ( prostaglandin H synthase-2 ); pleurisy; Western blot; N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methane sulfonamide