

论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1380-04

COX-2 抑制剂在大鼠胰十二指肠移植缺血再灌注损伤中对 P 选择素和细胞间粘附分子-1 的影响

赵雪云, 张 力, 刘胜春 (400016 重庆, 重庆医科大学附属第一医院内分泌外科)

[摘要] 目的 探讨特异性环氧合酶-2 抑制剂(cyclooxygenase-2 inhibitor, COX-2 inhibitor) NS398 能否抑制大鼠胰十二指肠移植缺血再灌注损伤中 P 选择素(P-selectin, Ps)及细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达。方法 采用单纯随机抽样的方法将 75 只 SD 大鼠分为 3 组:假手术组(15 只)、移植组(15 对)、移植 + NS398 组(15 对)。各组均于术后 1、3、6 h 取血测定血清淀粉酶含量,光镜下观察胰腺病理改变,免疫组织化学法和 RT-PCR 法分别检测胰腺组织中 ICAM-1 及 Ps 的表达情况和基因水平的变化。结果 假手术组各时间点胰腺组织损伤不明显,血清淀粉酶不升高($P > 0.05$);随再灌注时间的延长,移植组胰腺组织损伤加重,血清淀粉酶较同时点假手术组明显升高($P < 0.05$);但与移植组比较,移植 + NS398 组胰腺组织损伤及血清淀粉酶升高均较轻($P < 0.05$)。假手术组各时点 Ps 和 ICAM-1 均不表达;移植组、移植 + NS398 组各时点 Ps 和 ICAM-1 均有表达,但移植 + NS398 组 Ps 和 ICAM-1 的表达均明显低于移植组($P < 0.05$)。结论 NS398 能抑制胰十二指肠移植缺血再灌注损伤大鼠的 Ps 及 ICAM-1 表达,对大鼠胰十二指肠移植缺血再灌注损伤有保护作用。

[关键词] 胰腺移植;缺血再灌注损伤;环氧合酶-2 抑制剂;P 选择素;细胞间粘附分子-1

[中图分类号] R656.64;R966;R977.3

[文献标志码] A

Effect of cyclooxygenase-2 inhibitor on P-selectin and intercellular adhesion molecule 1 in rats with ischemia/reperfusion injury following pancreaticoduodenal transplantation

Zhao Xueyun, Zhang Li, Liu Shengchun (Department of Endocrine Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To study whether specific cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS398 can inhibit the expression of P-selectin (Ps) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in rats with ischemia/reperfusion (I/R) injury following pancreaticoduodenal transplantation. **Methods** Seventy-five SD rats were randomly divided into sham operation group ($n = 15$), transplantation group ($n = 30$), and transplantation + NS398 group ($n = 30$). Blood samples were taken from 3 groups at 1, 3 and 6 h after operation. Serum amylase level was measured. Pancreatic lesion was observed under light microscope. Expression of Ps and ICAM-1 in pancreatic tissue was detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** The pancreatic tissue injury was not significant and the serum amylase level was not elevated in sham operation group at different time points ($P > 0.05$), which were aggravated with the prolongation of reperfusion ($P < 0.05$). The pancreatic tissue injury was severer and the serum amylase level was lower in transplantation + NS398 group than in transplantation group ($P < 0.05$). Ps and ICAM-1 were not expressed in sham operation group but expressed in transplantation group and transplantation + NS398 group at different time points. However, the expression levels of Ps and ICAM-1 were significantly lower in transplantation + NS398 group than in sham operation group ($P < 0.05$). **Conclusion** NS398 can inhibit the expression of ICAM-1 and PS in rats with I/R injury and protect rats against I/R injury following pancreaticoduodenal transplantation.

[Key words] pancreaticoduodenal transplantation; ischemia/reperfusion injury; cyclooxygenase-2 inhibitor; P-selection; intercellular adhesion molecule-1

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30871295). Corresponding author: Liu Shengchun, E-mail: liushengchun1968@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30871295)

[通信作者] 刘胜春, E-mail: liushengchun1968@163.com

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I-RI)是导致胰腺移植失败的重要原因之一,其病理生理过程以毛细血管循环衰竭、内皮细胞完整性破坏、白细胞的活化以及微血管通透性增加为特点。近年研究^[1-3]提示细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和P选择素(P-selectin, Ps)介导了胰腺移植缺血再灌注损伤中中性粒细胞的浸润,使中性粒细胞紧密地黏附并穿过血管内皮发挥作用,在胰腺移植缺血再灌注损伤中起着重要作用。许多研究表明COX-2作为一种诱导酶参与了炎症中血管内皮的损伤。此外,国外少量研究^[4-6]提示COX-2是诱导血管内皮细胞粘附分子等表达的“上游”事件。能否通过抑制COX-2来减少Ps和ICAM-1两个缺血再灌注损伤中的重要因素进而减轻移植缺血再灌注损伤,目前研究尚少。本实验在大鼠全胰十二指肠移植模型基础上,探讨特异性环氧合酶-2抑制剂NS398对胰腺移植缺血再灌注损伤中ICAM-1和Ps的影响,并分析其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要器材与试剂

显微手术器械(上海医疗器械厂),双目手术显微镜,特异性环氧合酶-2抑制剂NS398(美国Sigma公司),兔抗大鼠ICAM-1及Ps单克隆抗体、山羊抗兔IgG及DAB显色试剂盒(北京博奥森生物有限公司),RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司),Ps、ICAM-1及 β -actin引物(上海生工生物工程公司)。

1.2 实验动物及分组

清洁级健康封闭群SD大鼠75只(重庆医科大学实验动物中心提供),雄性,体质量250~350g,随机配为供受体。将受试大鼠采用单纯随机抽样的方法分为假手术组(15只)、移植组(15对)、移植+NS398组(15对),根据再灌注时间每组又分为再灌注1、3、6h 3个亚组,每个亚组5只或5对。假手术组:仅行左肾切除术,腹腔暴露时间同移植组、移植+NS398组;移植组:行胰十二指肠移植术,受体于术前30min腹腔注射同移植+NS398组NS398等量的生理盐水;移植+NS398组:手术方法同移植组,受体于术前30min腹腔注射NS398(10mg/kg)^[7-8],余方法同移植组。

1.3 大鼠胰十二指肠移植模型制备

按照受体比供体质量多50~80g进行供受体配对。采用将供体胰腹主动脉、门静脉分别与受体左肾动、静脉行套管吻合,供体十二指肠与受体空肠端侧吻合的方法建立胰十二指肠移植模型^[9]。

1.4 标本采集及术后指标检测

1.4.1 血清淀粉酶测定 各组分别于开放血供再灌注后1、3、6h经尾静脉取血2ml,2000r/min离心10min后取血清测定血清淀粉酶含量。

1.4.2 病理学观察 取移植胰腺10%甲醛固定,石蜡包埋,

5 μ m连续切片,HE染色,光镜下行常规病理观察。

1.4.3 免疫组化检测 采用免疫组织化学(SABC法)染色,观察各组胰腺组织中ICAM-1及Ps的表达;常规石蜡包埋,切片后室温下脱蜡,滴加血清工作液室温孵育10~15min,滴加一抗(兔抗鼠Ps、ICAM-1,1:150)37 $^{\circ}$ C孵育2~3h,滴加生物素标记二抗室温孵育10~15min,滴加链霉卵白素+辣根酶标记生物素室温孵育10~15min,DAB显色剂显色,苏木精复染,脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜下观察,以细胞质中明显的黄褐色为阳性。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测定阳性区域面积,以阳性区域面积大小反应蛋白的表达水平高低^[10]。

1.4.4 RT-PCR反应 取各组移植胰腺-80 $^{\circ}$ C保存,RT-PCR检测Ps及ICAM-1 mRNA的表达;各组胰腺组织按照TaKaRa公司试剂盒说明书进行总RNA提取后,行RT-PCR反应。Ps引物:上游5'-GCAGCTTTTCCTGTGATGAAG-3',下游5'-GAACATGAGAGCAGTCCAAGC-3',产物大小345bp;ICAM-1引物:上游5'-GACCCTGGAGATGGAGAAGAC-3',下游5'-GT-CAGATTAGGGGCTGGATTG-3',产物大小432bp; β -actin内参引物:上游5'-GAGCACCTGTGCTGCTCACCCCTAGG-3',下游5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACTCT-3',产物大小310bp;50 μ l体系反应条件:Ps,94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s循环30次,72 $^{\circ}$ C 10min;ICAM-1,94 $^{\circ}$ C 30s,59 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s循环30次,72 $^{\circ}$ C 10min; β -actin,94 $^{\circ}$ C 30s,56 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s循环30次,72 $^{\circ}$ C 10min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad凝胶图像成像仪观察。结果采用Image J图像分析软件分析,以目的基因与 β -actin条带灰度值比值来反映目的基因mRNA表达量。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 血清淀粉酶的变化

假手术组内差异无统计学意义($P > 0.05$)。移植组大鼠血清淀粉酶含量明显升高,组内比较以及与假手术组、移植+NS398组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植+NS398组组间比较以及与假手术组、移植组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组组间及组内血清淀粉酶含量比较(IU/L, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	术后1h	术后3h	术后6h
假手术组	1 395.13 \pm 138.10	1 404.05 \pm 123.48	1 358.37 \pm 151.21
移植组	2 122.57 \pm 156.20 ^a	3 117.43 \pm 128.62 ^a	4 113.34 \pm 134.50 ^a
移植+NS398组	1 658.06 \pm 114.15 ^{ab}	2 199.66 \pm 136.96 ^{ab}	2 642.58 \pm 113.87 ^{ab}

a: $P < 0.05$,与假手术组比较;b: $P < 0.05$,与移植组比较

2.2 各组胰腺组织病理学观察

假手术组均未见明显病理改变;移植组随着再灌注时间延长,组织病理改变逐渐加重,再灌注6h时可见小叶间隙增宽,间质血管扩张充血,明显的炎性细胞渗出、浸润,部分腺泡呈灶性坏死;移植+NS398组病理改变较移植组明显减轻,水肿、坏死及炎性细胞渗出、浸润均明显轻于移植组(图1)。

2.3 各组胰腺组织 Ps、ICAM-1 免疫组化结果

假手术组各时段 Ps 和 ICAM-1 均不表达;移植组、移植 + NS398 组各时段均可见主要表达于胰岛的 Ps 和 ICAM-1,且随着再灌注时间的延长,Ps 和 ICAM-1 的表达逐渐增加;移植 + NS398 组术后 1、3、6 h Ps 和 ICAM-1 的表达均明显低于移植组同时时间点 ($P < 0.05$,图 2、3,表 2)。

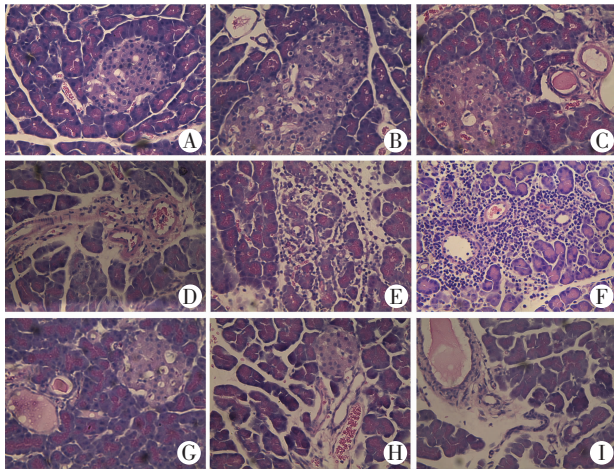


图 1 各组胰腺组织病理学观察 (HE ×400)

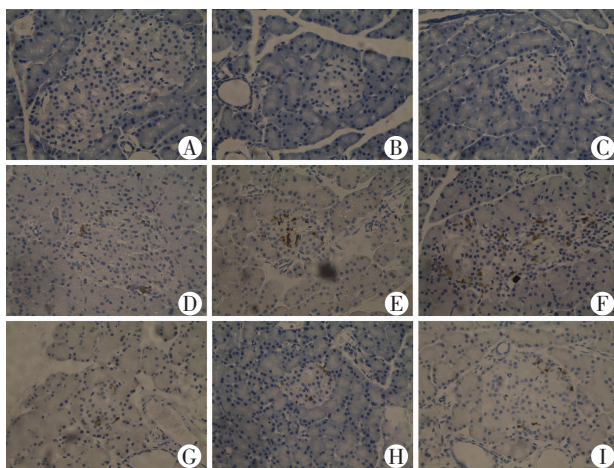


图 2 各组胰腺组织中 Ps 免疫组化染色观察 (SABC ×400)

表 2 各组胰腺组织中 Ps、ICAM-1 的蛋白表达比较 ($\mu\text{m}^2, n=5, \bar{x} \pm s$)

组别		术后 1 h	术后 3 h	术后 6 h
移植组	Ps	3 331 ± 1 470	6 508 ± 2 891	8 952 ± 4 207
	ICAM-1	3 638 ± 1 532	5 112 ± 2 428	10 323 ± 6 021
移植 + NS398 组	Ps	703 ± 253 ^a	1 738 ± 954 ^a	3 973 ± 1 286 ^a
	ICAM-1	691 ± 209 ^a	2 357 ± 1 154 ^a	5 320 ± 2 460 ^a

a: $P < 0.05$, 与移植组比较

2.4 各组胰腺组织中 Ps、ICAM-1 的 mRNA 表达情况

PCR 结果表明 Ps 和 ICAM-1 mRNA 在假手术组各时段中均未表达,在移植组、移植 + NS398 组各时段中均有表达。移植 + NS398 组术后 1、3、6 h Ps 的表达均低于移植组同时时间点 ($P < 0.05$),移植 + NS398 组术后 1、3、6 h ICAM-1 mRNA 的表

达亦均明显低于移植组同时时间点 ($P < 0.05$,表 3、图 4)。

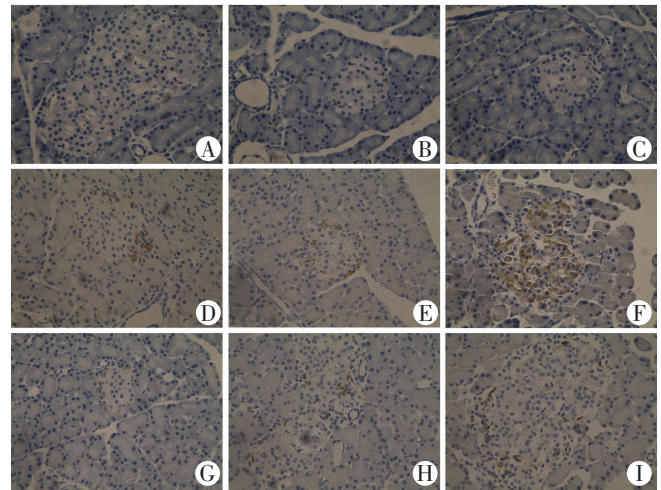


图 3 各组胰腺组织中 ICAM-1 免疫组化染色观察 (SABC ×400)

表 3 各组胰腺组织中 Ps、ICAM-1 的 mRNA 表达比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别		术后 1 h	术后 3 h	术后 6 h
移植组	Ps	0.627 ± 0.019	1.010 ± 0.016	1.172 ± 0.015
	ICAM-1	0.881 ± 0.012	1.255 ± 0.015	1.467 ± 0.017
移植 + NS398 组	Ps	0.239 ± 0.020 ^a	0.446 ± 0.018 ^a	0.625 ± 0.014 ^a
	ICAM-1	0.241 ± 0.014 ^a	0.544 ± 0.013 ^a	0.877 ± 0.016 ^a

a: $P < 0.05$, 与移植组比较

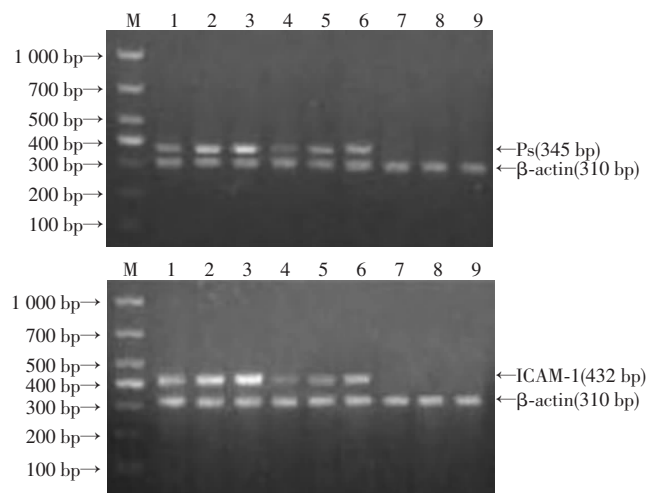


图 4 RT-PCR 检测各组胰腺组织中 Ps 与 ICAM-1 基因的表达

3 讨论

目前缺血再灌注损伤的机制尚未完全阐明,现多认为由于缺血期氧自由基过量生成以及白细胞与内皮细胞粘附增强,进而导致中性粒细胞附着于血管壁并游离出血管外,释放大量细胞毒性代谢产物而造成组织损伤^[11-12]。Ps 和粘附分子在此过程中起着至关重

要的桥梁作用:Ps 作为选择素家族的重要成员,主要储存在内皮细胞的分泌颗粒(Weibel Palade 小体)以及静止血小板的 α 颗粒和致密颗粒中,当组织发生炎症损伤时,在组胺、凝血酶、TNF- α 、IL-1 等协同下,Weibel Palade 小体和血小板 α 颗粒即与质膜融合使得Ps 在内皮细胞、血小板表面表达,起到粘附分子和中性粒细胞配基的作用,这将有利于细胞粘附分子与血小板激活因子(platelet activating factor, PAF)共同激活中性粒细胞^[13]。ICAM-1 主要是通过中性粒细胞表面的配体结合,促进内皮细胞表面中性粒细胞与内皮细胞紧密粘附,并参与中性粒细胞的跨膜过程,使得中性粒细胞渗出、积聚,进而发生炎症损伤。本实验采用免疫组化法以及 RT-PCR 法观察移植胰腺 Ps、ICAM-1 的表达情况,结果显示:假手术组两者均不表达,而移植组两者均明显表达,排除了移植术后 Ps、ICAM-1 的表达系手术所致。结合 HE 染色病理观察,Ps、ICAM-1 的升高伴随着中性粒细胞的浸润,表明 Ps、ICAM-1 参与了胰腺移植缺血再灌注损伤。

COX-2 是由 Simmons 等于 1989 年首次发现的一种诱导酶,在正常组织中几乎不表达,主要在炎症组织中的巨噬细胞和单核细胞中表达,常与缺血再灌注损伤、发热、创伤等密切相关。COX-2 诱导产生的血栓素 A₂(thromboxane A₂, TXA₂)可导致血小板和中性粒细胞粘附、积聚在血管内皮上,进而导致血管阻塞和通透性增加^[14]。研究^[15]发现特异性 COX-2 抑制剂尚能降低组织中的丙二醛(malondialdehyde, MDA),升高组织中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px),从而减轻缺血再灌注损伤。Hamada 等^[16]研究发现 COX-2 基因敲除的小鼠对肝脏缺血再灌注所致的损伤比野生型小鼠轻。本实验免疫组化及 RT-PCR 结果均显示:联合使用特异性 COX-2 抑制剂组,Ps、ICAM-1 的表达明显低于移植组,组织病理学观察移植 + NS398 组损伤亦轻于移植组,表明特异性 COX-2 抑制剂 NS398 可能通过降低 TAX2 等的产生,进而使移植胰腺 Ps 及 ICAM-1 的表达降低,减轻移植后缺血再灌注损伤,这与 Hamada 等^[16]的研究结果一致。

缺血再灌注损伤目前被认为是导致原发性移植器官无功能的抗原非依赖性机制中最重要的因素,对于移植胰腺,缺血再灌注损伤则是引起移植胰腺炎的主要原因。由于为胰腺小叶供血的独支小叶内动脉属于终动脉,这使得胰腺对缺血再灌注损伤更为敏感。本研究结果表明,经特异性 COX-2 抑制剂 NS398 处理后,明显抑制了移植胰腺组织内 Ps、ICAM-1 的表达,减轻了组织损伤,对胰腺移植后缺血再灌注损伤有保护作用。

参考文献:

- [1] Victorino G P, Ramirez R M, Chong T J, *et al.* Ischemia-reperfusion injury in rats affects hydraulic conductivity in two phases that are temporally and mechanistically separate [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(5): H2164 - H2171.
- [2] 田青水, 朱兴国, 李德春. P 选择素、细胞间黏附分子-1 在大鼠胰腺移植缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(11): 1343 - 1344.
- [3] Rouzet F, Bachelet-Violette L, Alsac J M, *et al.* Radiolabeled fucoidan as a P-selectin targeting agent for *in vivo* imaging of platelet-rich thrombus and endothelial activation[J]. *J Nucl Med*, 2011, 52(9): 1433 - 1440.
- [4] Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, *et al.* Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2-independent pathway[J]. *Brain*, 2006, 129(Pt 8): 1984 - 1992.
- [5] Yang S F, Chen M K, Hsieh Y S, *et al.* Prostaglandin E₂/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(39): 29808 - 29816.
- [6] Krotz F. Putting the vasoactive effects of COX-2-derived prostanoids into clinical perspective[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(2): 240 - 241.
- [7] Kopff M, Kopff A, Kowalczyk E. The effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative/antioxidative balance[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2007, 23(135): 184 - 187.
- [8] 张辉, 李玉民, 李汛, 等. 环氧合酶-2 在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中对前列腺素产物的影响[J]. *兰州大学学报: 医学版*, 2010, 36(4): 26 - 30.
- [9] 赵雪云, 张力, 刘胜春. 改进大鼠胰十二指肠移植模型的建立[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(10): 1222 - 1224.
- [10] 崔巍, 王硕仁, 朱陵群, 等. 平均光密度值分析法和阳性染色面积分析法在免疫组化图像分析中的对比研究[C]//2008 中华中医药学会内科分会中医内科学科建设研讨会论文集汇编. 北京: 中华中医药学会, 2008: 148 - 151.
- [11] Yanaka K, Camarata P J, Spellman S R, *et al.* Antagonism of leukocyte adherence by synthetic fibronectin peptide V in a rat model of transient focal cerebral ischemia[J]. *Neurosurgery*, 1997, 40(3): 557 - 563.
- [12] Scheiermann C, Colom B, Meda P, *et al.* Junctional adhesion molecule-C mediates leukocyte infiltration in response to ischemia reperfusion injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1509 - 1515.
- [13] Nishiwaki A, Ueda T, Ugawa S, *et al.* Upregulation of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 after retinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(11): 4931 - 4935.
- [14] Retailleau K, Belin-de-Chantemele E J, Chanoine S, *et al.* Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A₂ reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries[J]. *Hypertension*, 2010, 55(2): 339 - 344.
- [15] Ozturk H, Gezici A, Ozturk H. The effect of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, on liver ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats[J]. *Hepatol Res*, 2006, 34(2): 76 - 83.
- [16] Hamada T, Tsuchihashi S, Avanesyan A, *et al.* Cyclooxygenase-2 deficiency enhances Th2 immune responses and impairs neutrophil recruitment in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *J Immunol*, 2008, 180(3): 1843 - 1853.

(收稿:2011-12-05;修回:2012-01-02)

(编辑 龙亮)