文章编号:1000-5404(2006)17-1801-03

论著

选择性 COX-2 抑制剂 NS398 干预对 HIBD 新生鼠脑细胞凋亡的影响

温恩懿,赵聪敏,张雨平,王丽雁 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

提 要:目的 研究新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 干预后不同时段脑原位细胞凋亡的变化。**方法** 于制备新生大鼠左脑的 HIBD 模型前 30 min,腹腔注射 NS398 20 mg/kg,同时设未注射组及假手术组对照,应用 TUNEL 染色方法及图像分析软件研究于 HI 后 24 h、7 d 脑皮层及海马 TUNEL 染色阳性细胞百分率变化。**结果** 假手术组组脑组织中偶见 TUNEL 染色阳性细胞;未注射组缺氧缺血(HI)后 24 h TUNEL 染色阳性细胞数较多,至 HI 后 7d 明显减少;NS398 干预组染色阳性细胞数较未注射组明显减少。**结论** 应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 于 HIBD 新生鼠,可以有效减少 HI 后凋亡细胞,提示 NS398 对发育期脑组织缺氧缺血损伤存在保护作用。

关键词:脑缺氧缺血损伤;环氧合酶 2;NS398;TUNEL;凋亡;新生鼠
中图法分类号:R329.28;R743.31;R971 **文献标识码**:A

NS398 on cell apoptosis in neonatal rat brain after hypoxic-ischemic brain damage

WEN En-yi, ZHAO Cong-min, ZHANG Yu-ping, WANG Li-yan (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the cell apoptosis after injecting NS398 in neonatal rat brain injured by hypoxia and ischemia. Methods The model of hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) was established in 48 Wistar rats. Intraperitoneal injection of NS398 at dose of 5, 20, 40 mg/kg respectively was carried out in 36 HIBD rats 30 min before hypoxia. There were also sham operation group in which the normal saline took the place of NS398. Ischemic cortex and hippocampus were sampled for analysis at 24 h, and 7 d after the onset of hypoxic-ischemic damage. The expression and number of apoptotic cells in the cortex and hippocampus were examined with TUNEL. Results The percentage of TUNEL-positive cells in HIBD group was higher than that of sham operation group. The percentage of TUNEL-positive cells in NS398 groups significantly decreased as compared with that of HIBD group. NS398 group at dose of 20 mg/kg was of no difference with NS398 group at dose of 40 mg/kg, but significantly lower than NS398 group at dose 5 mg/kg. Conclusion NS398 can reduce the TUNEL-positive cells, and 20 mg/kg and 40 mg/kg are the more effective dosage. NS398 is of the effective capability to inhibit the brain damage in the growth period when HI happened.

Key words: hypoxic-ischemic brain damage; cyclooxygenase 2; NS398; TUNEL; apoptosis; neonatal rat

细胞凋亡已被公认为是缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage,HIBD)中神经元死亡的重要形式。减少神经元凋亡的发生,继而减轻脑损伤及后遗症的发生,是近年来的研究热点。实验证明在新生儿 HIBD 发生发展过程中环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2 COX-2)起重要作用。本实验通过应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 干预后研究新生大鼠 HIBD 时不同时段脑原位细胞凋亡的变化,探讨其对 HIBD 过程中神经元的保护作用。

作者简介:温恩懿(1973-),男,四川省内江市人,硕士,主治医师,主要从事新生儿疾病方面的研究。电话:(023)68755602,E-mail:wenenyi@cta.cq.cn
通讯作者:赵聪敏,电话:(023)68774602
收稿日期:2005-10-31;**修回日期**:2006-06-15

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选择 7 日龄(P7)健康 Wistar 大鼠共 60 只,由第三军医大学实验动物中心提供,体质量 12~15 g,随机分组为 HIBD 组;NS398 5 mg/kg 剂量干预组,20 mg/kg 剂量干预组,NS398 40 mg/kg 剂量干预组以及假手术组,每组 12 只,用于 HI 后 24 h、7 d 时两个时相点检测,每时相点 6 只。

1.2 模型建立

1.2.1 HIBD 模型 参照 Rice 法制作[1]。选择 P7 Wistar 大鼠,乙醚吸入麻醉后,置仰卧位,四肢头部固定,75% 酒精消毒,作颈部正中切口,分离并结扎左颈总动脉,缝合皮肤后置于自制 1 L 容积缺氧仓内,以氧氮混合气(氧浓度为 8%)1~2 L/min 持续灌注 2.0 h,制成 HIBD 模型。缺氧仓置于恒温水浴箱中,维持

环境温度在37～37.5 ℃。缺氧后将新生鼠放回母鼠身边常规喂养。缺氧缺血后出现自发左旋或夹尾左旋者纳入实验。

1.2.2 NS398处置 NS398干预组于缺氧前30min予按照分组随机予以5、20、40 mg/kg剂量腹腔注射NS398。HIBD组于缺氧前同样条件下腹腔注射等量生理盐水。

1.2.3 假手术组 仅予以分离左侧颈总动脉,不予以结扎后缝合皮肤,不予以缺氧处置,术前30 min腹腔注射等量生理盐水。

1.2.4 标本制备与采集 各组大鼠在规定时间点予戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔注射深麻醉,开胸剪开右心耳,以4%多聚甲醛经左心室灌注至流出液清亮。迅速断头取前脑,予以常规脱水、石蜡包埋、连续冠状切片,片厚10 μm,用于TUNEL染色。

1.3 TUNEL染色

按试剂盒说明操作(由博士德公司提供)。

1.4 原位细胞凋亡检测

以染色后的神经元细胞核出现棕黄色为阳性。每张切片于双侧脑半球选择2个位置相应、不重复的视野(皮层及海马部位),放大100倍,Tiger图像分析软件(重庆大学提供)测出其中阳性率(%),每例标本选择3张切片,计算平均值及标准差。

1.5 统计分析

实验数据以($\bar{x}\pm s$)%表示,运用统计软件SPSS 11.0进行方差齐性检验,并通过SNK分析方法进行组间分析比较。

2 结果

2.1 HIBD新生鼠脑细胞凋亡的变化

HIBD新生鼠患侧脑组织额顶皮层、纹状体及海马处均可见染色质浓缩呈棕黄色颗粒的圆形或卵圆形TUNEL染色阳性细胞,以额顶皮层相对多见(图1)。TUNEL染色阳性细胞数随时间减少,HI后24 h阳性细胞数较多,至HI后7 d明显减少。HI后24 h、7 d,HIBD组凋亡细胞数明显高于假手术组,假手术组脑组织中偶见TUNEL染色阳性细胞,24 h及7 d时检测未见显著差异。

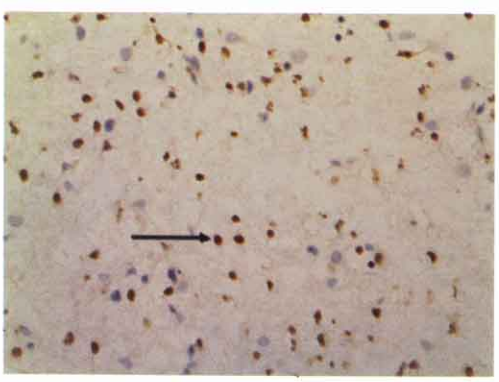


图1 HIBD组,24 h,皮质细胞凋亡(箭头)
(TUNEL染色,苏木精复染×400)

2.2 NS398干预后HIBD新生鼠脑细胞凋亡的变化

HI后,HIBD组患侧不同剂量NS398干预后不同时相点凋亡细胞数均较HIBD组明显减少;明显高于假手术组(图2),2个观测时间点中5 mg/kg剂量干预组均显著高于20、40 mg/kg剂量干预组;20 mg/kg剂量干预组与40 mg/kg剂量干预组间未见显著差异存在($P>0.05$)(表1)。

表1 24 h及7 d时各组大鼠左侧脑组织凋亡细胞阳性率对比[($\bar{x}\pm s$)%]

组别	例数	24 h	7 d
HIBD组	6	$41.12\pm3.5^{a,b}$	21.33 ± 2.12^{b}
NS398 5 mg/kg剂量组	6	$20.63\pm2.67^{a,c,d}$	$10.63\pm1.72^{c,d}$
NS398 20 mg/kg剂量组	6	$16.21\pm3.10^{a,c}$	8.07 ± 2.10^{c}
NS398 40 mg/kg剂量组	6	$15.87\pm2.85^{a,c}$	8.47 ± 1.28^{c}
假手术组	6	0.77 ± 0.41	0.61 ± 0.26

a:$P<0.01$,与7 d时比较;b:$P<0.01$,与NS398剂量组及假手术组比较;c:$P<0.01$,与假手术组比较;d:$P<0.01$,与NS398 20、40 mg/kg剂量组比较

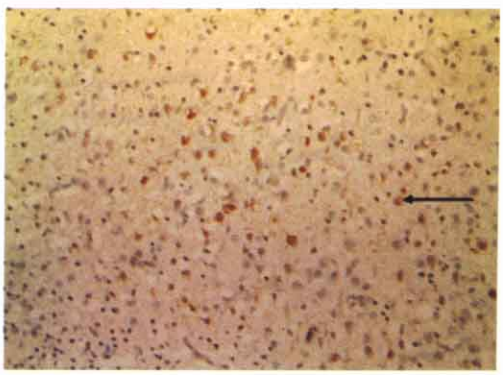


图2 NS398 20 mg/kg组,24 h,皮质细胞凋亡(箭头)
(TUNEL染色,苏木精复染×200)

3 讨论

HIBD后神经细胞是通过坏死或凋亡途径死亡,何种途径取决于时间、部位、年龄、损害因素及其强度,还可能与神经连接方式和细胞类型有关[2]。在HIBD中,坏死主要发生于缺血中心,而凋亡主要发生在缺血区周围,且是迟发性神经元死亡的主要形式。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX),又称前列腺素G/H合成酶(prostaglandin synthase, PGS)。分为:结构型(COX-1),存在于大多数组织中,不受诱导剂或类固醇激素影响;诱导型(COX-2),受配体诱导或受糖皮质激素抑制,在大多数组织中以极低拷贝数表达。COX是催化花生四烯酸(AA)合成前列腺素(PG)以及血栓素的限速酶,其活性对控制前列腺素类物质的合成,有着重要作用。其催化步骤为:① AA在COX催化下生成PGG_2;②PGG_2在过氧化物酶催化下进一步生成为PGH_2;③PGH_2受下游细胞特异性酶作用下生成不同终产物,如TXA_2、PGE_2等[3]。

脂多糖、IL-1、TNF等许多炎症刺激因子均可诱导COX-2的基因表达,且使用糖皮质激素可以抑制COX-2,但不会影响COX-1[4]。说明COX-2作为一种重要酶,存在与机体损伤及炎症的密切关系。

既往实验已证明 HIBD 后伴随 COX-2 明显表达，并说明其为 HIBD 后出现神经损伤一个早期的重要指标并和损伤的持续存在相伴随[5]。传统非甾体类抗炎药（nonsteroial anti-inflamatory drugs，NSAIDs）对 COX 几无选择性，主要抑制 COX-1，在发挥作用的同时又可致各系统（肝、肾、消化、呼吸、血液、皮肤）的不良反应。近年来，通过研制对 COX-2 具高选择性的药物，以减弱其对胃肠黏膜的攻击，在临床上受到良好的评价。

本实验应用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 于新生鼠 HIBD 模型，发现 HIBD 动物给予 NS398 治疗使得 HIBD 发生 24 h、7 d 时能明显减少 HIBD 后皮层及海马区凋亡细胞数目，证明了于 HIBD 中通过腹腔注射选择性 COX-2 抑制剂 NS398 可以显著减少缺氧缺血对脑组织的神经元死亡，从而达到减轻脑损伤治疗目的。由于既往缺乏 NS398 应用于新生鼠资料，本实验根据成年大鼠应用资料，选择了 5、20、40 mg/kg 予以应用，通过细胞凋亡检测，结果显示 3 种剂量 NS398 干预后均能起到显著抑制 HIBD 鼠脑细胞凋亡的作用；其中 20、40 mg/kg 剂量干预组治疗后未见显著差异，优于 5 mg/kg 剂量干预组，20、40 mg/kg 剂量干预组抑制凋亡作用相当，20、40 mg/kg 为较佳抑制剂量。

虽然选择性 COX-2 抑制剂的治疗已广泛用于多种成人疾病的临床治疗，但选择性 COX-2 抑制剂对于新生儿 HIE 的治疗作用还有许多问题需要进一步研究解决：① 如缺血损伤时对于白质损伤时的治疗效果，本实验中证实了 COX-2 对 HI 后的神经元存在保护作用，但对胶质细胞损伤后的保护作用于实验中还尚未涉及；②由于已有研究提示其参与了胚胎器官的生长发育[6]，COX-2 是否同样参与出生后的器官与组织的正常生长发育，目前还缺乏研究资料；③与本实验相对应的是：通过对系列与神经细胞共同源自外胚层组织产生的恶性肿瘤的研究表明[7,8]，COX-2 在肿瘤组织中存在表达增强，使用选择性 COX-2 抑制剂治疗则可以促进肿瘤细胞的凋亡。进一步研究提示 COX-2 被认为与控制肿瘤细胞生长、移行，并抑制肿瘤细胞凋亡有关。另有报道使用选择性 COX-2 抑制剂治疗于大鼠胃溃疡缘细胞可使源自外胚层组织产生的胃黏膜上皮细胞增殖显著减少，延迟溃疡的愈合[9]。因此对于虽然 HI 后爆发性的 COX-2 表达增强可致成熟神经细胞的急性死亡和继发性凋亡，但是否存在一定量的 COX-2 表达增强可以减轻 HI 后的神经细胞凋亡的可能？故而使用选择性 COX-2 抑制剂对于 HI 损伤后的远期保护作用还需要进一步探讨；④选择性 COX-2 抑制剂虽然较传统 NSAIDs 已明显降低了使用的不良反应，但仍然存在较多的副作用。已有实验显示，选择性 COX-2 抑制剂能降低肾脏血流量，减少钠的分泌，提示其可能存在肾脏功能影响[10]，另有研究表明，当肾脏对 PGs 依赖性增加时，昔布类选择性 COX-2 抑制剂可能存在肾功能和肾血流的影响[11]。而其于成人疾病的治疗中，目前表现出的如心血管等方面的不良反应仍很严重，于临床试验中显示选择性 COX-2 抑制剂罗非昔布（Rofecoxib，Vioxx，万络）血管内血栓形成事件发生率为萘普生的 3 倍[12]。另有研究表明，服用高剂量罗非昔布的患者，其患冠心病的危害是非服药组的 1.7 倍，因此，罗非昔布已停止临床使用。另外如环氧合酶与脂氧合酶（COX-2/5-LOT）双重抑制剂替尼达普（Tenidap）也因其肝毒性而停止使用。因此对于处于生长期的儿童，选择性 COX-2 抑制剂的临床应用的安全性还需要进一步评估和更深入的研究。

参考文献：

[1] RICE J E, 3rd., VANNUCCI RC, BRIERLEY J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131 - 141.

[2] NORTHINGTON F J, FERRIERO D M, GRAHAM E M, *et al*. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis While Delayed Neuronal Death Is Apoptosis [J]. Neurobiol Dis, 2001, 8(2): 207 - 219.

[3] CRYER B, DUBOIS A. The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase--a review [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 1998, 56(5 - 6): 341 - 361.

[4] CROFFORD L J, WILDER R L, RISTIMAKI A P, *et al*. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids [J]. J Clin Invest, 1994, 93(3): 1095 - 1101.

[5] 温恩懿，赵聪敏，王丽雁，等. 新生大鼠脑缺氧缺血损伤时的 COX-2 表达变化[J]. 第三军医大学学报，2004，26(21)：1947 - 1949.

[6] VIO C P, BALESTRINI C, RECABARREN M, *et al*. Postnatal development of cyclooxygenase-2 in the rat kidney[J]. Immunopharmacology, 1999, 44(1 - 2): 205 - 210.

[7] CECCARELLI C, PIAZZI G, PATERINI P, *et al*. Concurrent EGFr and Cox-2 expression in colorectal cancer: proliferation impact and tumour spreading[J]. Ann Oncl, 2005, 16(Suppl 4): iv74 - iv79.

[8] EIBL G, TAKATA Y, BOROS L G, *et al*. Growth stimulation of COX-2-negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor[J]. Cancer Res, 2005, 65(3): 982 - 990.

[9] SCHMASSMANN A, TARNAWSKI A, PESKAR B M, *et al*. Influence of acid and angiogenesis on kinetics of gastric ulcer healing in rats: interaction with indomethacin[J]. Am J Physiol, 1995, 268(2 Pt 1): G276 - G285.

[10] STANFIELD K M, BELL R R, LISOWSKI A R, *et al*. Expression of cyclooxygenase-2 in embryonic and fetal tissues during organogenesis and late pregnancy [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003, 67(1): 54 - 58.

[11] SWAN S K, RUDY D W, LASSETER K C, *et al*. Effect of Cyclooxygenase-2 Inhibition on renal function in elderly persons receiving a low-salt diet. A randomized, controlled trial [J]. Ann Intern Med, 2000, 133(1): 1 - 9.

[12] BOMBARDIER C, LAINE L, REICIN A, *et al*. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group [J]. N Engl J Med, 2000, 343(21): 1520 - 1528.

（编辑　王　红）