DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.026
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)21-1947-03

论著

新生大鼠脑缺氧缺血损伤时的COX-2表达变化

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

提 要:目的 采用免疫组化方法研究新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)时环氧合酶2(COX-2)的表达变化。方法 通过制备新生大鼠左脑的HIBD模型,应用免疫组化方法研究2、6、24、72 h、7 d时不同时相点脑皮层及海马CA1区COX-2免疫化学阳性细胞的表达及免疫细胞化学阳性数表达变化。结果 7日龄Wistar大鼠对照组可见微量COX-2阳性表达,HIBD 2 h后即见明显增高,并于6~24 h出现表达高峰,其后出现下降,并可维持明显表达至7d。结论 新生鼠HIBD可诱导COX-2表达,并可能参与HIBD后的神经毒性损伤。

关键词:脑缺氧缺血损伤;环氧合酶2;免疫组化;新生鼠
中图法分类号:R743.310.2 文献标识码:A

Cyclooxygenase 2 expression in neonatal rats contributes to hypoxic-ischemic brain damage

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

Abstract: Objective To study the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) in neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). Methods A model of HIBD in the left brain of 7-day-old Wistar rats was established. The ischemic cortex was sampled for analysis at 2, 6, 24, and 72 h, and 7 d after the onset of hypoxic-ischemic damage. The expression and number of the positive cells of COX-2 in the cortex and hippocampus at different time points were observed by immunohistochemistry. Results Low level of COX-2 immunohistochemical expression was observed in the control group. COX-2 positive cells were upregulated in ischemic brain at 2 h and peaked between 6—24 h significantly ($P<0.01$), but declined at 72 h. Conclusion HIBD can induce the upregulation of COX-2 expression and may participate in hypoxic-ischemic brain injury.

Key words: hypoxic-ischemic brain damage; cyclooxygenase 2; immunohistochemistry; neonatal rat

近年研究表明环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)在新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)发生发展过程中起重要作用。但其作用时相及表达方式尚不清楚,本实验旨在研究新生大鼠HIBD时COX-2的时相改变,进一步明确COX-2与HIBD之间的相互作用,为选择性COX-2抑制剂的应用提供理论依据。

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,由第三军医大学实验动物中心提供,体质量12~15 g,共36只。随机分为正常对照、HIBD-2 h、HIBD-6 h、HIBD-24 h、HIBD-72 h、HIBD-7 d组,每组6只。

1.2 模型建立

1.2.1 HIBD模型 参照Rice法制作:P7 Wistar大鼠,乙醚吸入麻醉,由颈部正中切口分离并结扎左侧颈总动脉,缝合后置于1L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,维持温度在37~37.5 ℃。缺氧缺血后出现自发左旋或夹尾左旋者纳入实验。

1.2.2 正常对照组 无任何处理。

1.2.3 冰冻切片制作 实验动物于相应时相点予深麻醉,以4%多聚甲醛行左心室灌注。断头取前脑,弃去额极2 mm,余脑组织用4%多聚甲醛固定,20%蔗糖溶液浸泡,锡箔纸包裹,-70 ℃冰箱保存,-20 ℃恒冷切片机上连续冠状切片,片厚20 μm,用于免疫组化。

作者简介:温恩懿(1973-),男,四川省内江市人,硕士研究生,主治医师,主要从事新生儿疾病方面的研究。电话:(023)68755602
收稿日期:2004-06-11;修回日期:2004-10-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 免疫组化

按试剂盒说明操作，一抗为兔抗鼠 COX-2 抗体 BA0738（由博士德公司提供）。

用 Tiger 图像测量软件（重庆大学提供），选取皮层及海马进行阳性细胞数总计分析并照片。

1.4 统计学分析

实验数据以（$\bar{x}\pm s$）%表示，运用统计软件 SPSS11.0 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 新生大鼠 COX-2 表达

COX-2 在处置后 2 h 即见明显细胞阳性表达，在 6～24 h 达最高，并持续增高到 7 d；对照组可见微量阳性表达。HIBD 组明显低于对照组（$F=27.701$，$P<0.01$），见表 1。

表 1 新生大鼠 **HIBD COX-2** 免疫化学阳性细胞数总计百分比比较

Tab 1 Comparison of the percentages of total number of immunochmical positive cells stained by COX-2 in neonatal HIBD rats

Group	n	$(\bar{x}\pm s)$%
HIBD-2 h	6	1.85±0.14#*
HIBD-6 h	6	2.28±0.10#△
HIBD-24 h	6	2.16±0.18#▲
HIBD-72 h	6	1.78±0.13#★
HIBD-7 d	6	1.53±0.14#
Control	6	0.16±0.07

#：$P<0.01$，*vs* control；*：$P<0.01$，*vs* HIBD-6 h；△：$P>0.05$，*vs* HIBD-24 h；▲：$P<0.01$，*vs* HIBD-72 h；☆：$P<0.01$，*vs* HIBD-7 d

2.2 HIBD COX-2 阳性细胞

免疫细胞化学阳性表达细胞主要见于星形胶质细胞及神经元细胞，其中以星形胶质细胞为最明显（图 1）；阳性细胞表达部位主要见于皮质、海马，其中以血管旁表达最为明显（图 2）。



图 1 **HIBD 6 h** 组，海马可见大量阳性星形胶质细胞及神经元，其中胶质细胞较少，但染色反应较强，而神经元较多，染色较弱，似呈现非特异性 （SABC×100）

Fig 1 Massive amount of positive astrocytes and neurons, few strong positive glial cells, but large amount of weak positive neurons could be found in the hippocampus in HIBD-6 h group （SABC×100）

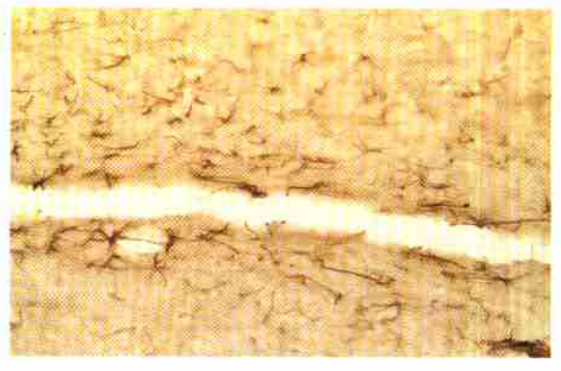


图 2 **HIBD** 组，染色阳性星形胶质细胞于小血管周围富集（SABC×200）

Fig 2 Large positive astrocytes around the small vessels in HIBD groups （SABC×200）

3 讨论

环氧合酶（cyclooxygenase，COX），分为：结构型（COX-1）及诱导型（COX-2）。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[1]。

近年研究表明环氧合酶 2（COX-2）在 HIBD 发生发展过程中起重要作用。但其作用时相及表达方式尚不清楚，本实验采用新生鼠 HIBD 模型，通过免疫组化方法测定其在 HIBD 发生发展过程中的表达，证实 HIBD 新生鼠存在 COX-2 表达明显增强，在 6～24 h 后最高，并持续增高到 7 d 后，与 Kinoshita 等[2] 通过 COX-2 mRNA 检测与免疫组化方法检测结果基本一致；COX-2 免疫阳性细胞表达主要为星形胶质细胞，并在小血管周围明显增强，提示 HIBD 时 COX-2 增高与血管源性的炎症因子及内皮细胞参与密切相关，并可能存在相互协同作用。同时神经元也见表达，与 Strauss 等[3] 的研究也基本一致。HIBD 后迅速伴随 COX-2 明显表现这一特征说明其可以被作为 HI 发生后继发神经损伤一个重要早期指标。

文献[4] 报道神经细胞的 COX-2 过表达增强了兴奋性氨基酸兴奋毒性的强度以及破坏性，并与早期快反应基因 *c-fos* 及 *zif*-268 增强表达相一致。另有研究表明，使用 COX-2 抑制剂 DFU 可以完全抑制谷氨酸盐对培养的神经细胞的神经毒性，并阻止约 50%NMDA 介导的神经毒性[5]，提示 COX-2 与兴奋中毒密切相关。文献[6] 报道 COX-2 可能是脑缺血后氧自由基产生的主要机制。Morioka 等[7] 的实验证明 COX-2 机制亦与 NO 介导的神经损伤相关。

依据 COX-2 于 HIBD 后的明显表现，有理由推测

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

选择性COX-2 抑制剂对于 HIBD 具有保护效应，有必要对其应用进行进一步的研究，从而最终为临床防治新生儿缺氧缺血性脑病提供新的途径。

参考文献：

[1] 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.

[2] Kinoshita Y, Ueyama T, Senba E, *et al*. Expression of c-fos, heat shock protein 70, neurotrophins, and cyclooxygenase-2 mRNA in response to focal cerebral ischemia/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate[J]. J Neurotrauma, 2001, 18(4): 435—445.

[3] Strauss K I, Marini A M. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(5): 627—638.

[4] Kelley K A, Ho L, Winger D, Freire-Moar J, *et al*. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2[J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 995—1004.

[5] Strauss K I, Marini A M. Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(5): 627—638.

[6] Shigeru Nogawa, Fangyi Zhang, M. Elizabeth Ross, *et al*. Cyclo-Oxygenase-2 Gene Expression in Neurons Contributes to Ischemic Brain Damage[J]. J Neurosci, 1999, 17: 2746—2755.

[7] Morioka N, Inoue A, Hanada T, *et al*. Nitric oxide synergistically potentiates interleukin-1 beta-induced increase of cyclooxygenase-2 mRNA levels, resulting in the facilitation of substance P release from primary afferent neurons: involvement of cGMP-independent mechanisms[J]. Neuropharmacology, 2002, 43(5): 868—876.

（编辑 刘洪娥）

文章编号：1000-5404(2004)21-1949-01

个案与短篇

易被误诊的肝癌肺转移 1 例

A case of easily misdiagnosed liver cancer metastasis into the lung

吴定国，唐春兰 （第三军医大学西南医院呼吸内科，重庆 400038）

患者，男性，65 岁，因胸痛伴咳嗽、咳痰 6 个月入院，无发热、咯血，无腹痛、腹胀、大便稀溏，每天约 3～5 次，小便正常。体检：T 36.5 ℃、P 90 次/min、R 20 次/min、BP 120/70 mmHg。一般情况可，皮肤巩膜轻度黄染。左背部有一约 6 cm×8 cm 包块，质软，无压痛，双上肺语颤稍减弱，双上肺呼吸音减弱，未闻及干湿啰音。心律不齐，偶可闻及早搏。腹平坦，右下腹稍有压痛，无反跳痛及肌紧张，肝脾未触及，肝区无叩痛，移动性浊音(－)，双下肢无水肿。入院后查肝功能示：ALT 55 IU/L，AST 75 IU/L，TP 63.5 g/L，Alb 35.2 g/L，TBIL 26.1 μmol/L；凝血酶原时间：14.0 s；乙肝三对：HBsAg (＋)，Anti-HBe (＋)，Anti-HBc (＋)；血清癌胚抗原：7.35 ng/mL，血甲胎蛋白：48 ng/mL(正常对照 0～31 ng/ml)。背部包块活检示胶原纤维及少量鳞状上皮。胸部 CT 检查示：双上肺后段见团块状软组织影并与后胸壁连接，双侧邻近肋骨有破坏征象，右侧胸腔少量积液；肝脏内见多发团片状低密度影。经 CT 引导下行左上肺后段肿块穿刺，取到灰白色组织 1 条，长约 2 cm，镜检：送检组织见癌组织，癌细胞呈多边形，胞浆嗜酸性，核圆形、卵圆形，深染，有异型性，可见核分裂像。癌细胞呈条索状、腺样排列，间质血窦丰富。病理报告为：(左上肺)见有癌组织浸润，考虑为肝癌转移。免疫组化检查示：AFP 阳性，CK 弱阳性。结合病理形态学改变及免疫组化 AFP 阳性的结果，患者肝癌肺转移诊断明确。

讨论

根据国内 3 254 例原发性肝癌的研究资料，首发症状以肝区痛最为常见，约占 57.2%，其次是上腹包块(37.0%)、纳差(34.2%)、乏力(27.9%)、消瘦(26.4%)、腹胀(24.4%)、发热(10.3%)、腹泻(5.8%)、急性腹痛(3.4%)、无症状(0.3%)。少数以黑便、呕血、黄疸、下肢水肿为首发症状[1]。当原发性肝癌发生转移时，可产生相应的转移灶症状，如：转移至肺可引起咳嗽、咯血，转移至胸膜可引起胸痛和血性胸水。本例患者以胸痛伴咳嗽、咳痰等肺部症状为首发症状，无肝区疼痛、上腹包块、腹胀、咯血等症状，体征上以肺部的阳性体征为主，无肝大、肝区叩痛、黄疸、腹水及恶病质等体征，查肝功能为 Child-pugh A 级，血甲胎蛋白仅轻度升高，CT 检查所见之肺部团块状软组织影酷似原发灶，而肝脏内多发低密度影酷似转移灶，以上这些特点在“肝癌肺转移”的患者实属罕见，易导致“肺癌肝转移”的诊断。这个病例提示：在诊断“肺癌肝转移”或“肝癌肺转移”前，应尽可能做穿刺活检，行病理及免疫组化检查，以免误诊。

关键词：肝肿瘤；肺转移；穿刺活检
中图法分类号：R735.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘 倩，王文奇. 肝癌[M]. 北京：人民卫生出版社，2000. 259—260.

（编辑 陈聪连）

作者简介：吴定国(1981－)，男，重庆市人，七年制学员。电话：(023)13527465263
通信作者：唐春兰，电话：(023)68752863
收稿日期：2004-05-12；修回日期：2004-07-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net