DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.034
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
1202 2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)10-1202-03

槲皮素对烫伤大鼠肠粘膜 PGE_2 代谢的影响

孟德胜,汪仕良 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究槲皮素(Quercetin,Que)对烫伤大鼠肠粘膜 PGE_2 水平的影响及其作用机制。方法 放免法测定烫伤大鼠肠粘膜 PGE_2 水平的变化,微量酸滴定法测定磷脂酶 A_2(PLA_2)活性,底物荧光法测定环氧合酶(COX)活性,原位杂交检测前列腺素转移因子(PGT)mRNA 表达变化。结果 Que 可降低伤后 12 h 组肠粘膜 PGE_2 水平,升高伤后 72 h 组肠粘膜 PGE_2 水平。Que 对烫伤大鼠肠粘膜 PLA_2 活性无明显影响。Que 可使两种 COX 异构酶的活性比 COX-1/COX-2 明显上升。40 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 的 Que 可降低大鼠伤后肠粘膜 PGT mRNA 的表达。结论 Que 有可能通过调节大鼠肠粘膜 COX-1/COX-2 酶活性比率,降低 PGE_2 降解速率,维持适当水平的 PGE_2,而发挥粘膜保护作用。

关键词:槲皮素;烧伤;肠粘膜;PGE_2
中图法分类号:R347;4644.02;R977.29 文献标识码:A

Effect of quercetin on PGE2 metabolism in intestinal mucosa of burned rats

MENG De-sheng, WANG Shi-liang (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of quercetin on PGE2 levels in the intestinal mucosa of burned rats and its mechanism. **Methods** The PGE_2 levels in the intestinal mucosa in rats inflicted to 30% TBSA III burns were measured with radioimmunosassay. The activities of PLA_2 and cyclooxygenase in the mucosa were detected with micro-acid titration and substance-fluorescence method respectively. The expression of rPGT mRNA in the mucosa was detected by in situ hybridization. **Results** Quercetin reduced the level of PGE_2 12 h postburn, and increased 72 h postburn in the intestinal mucosa. Quercetin had no influence on the activity of PLA_2, but obviously increased the activity ratio of COX-1/COX-2. At the dosage of 40 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, quercetin reduced the intensity of rPGT mRNA expression in the intestinal mucosa of burned rats. **Conclusion** Protective function of quercetin on the intestinal mucosa of burned rats may rely on regulating the activity ratio of COX-1/COX-2, reducing PGE_2 degradation and maintaining proper PGE_2 level.

Key words: quercetin; burn; intestinal mucosa; PGE_2

胃肠道粘膜上皮细胞在全身组织中的更新代谢率较快,细胞的增生、分化、移行和凋亡过程易受多种因素影响,严重烫伤可造成胃肠道粘膜损伤。花生四烯酸的代谢产物前列腺素(Prostaglandings PGs)是经典的炎症介质,可介导炎症反应,造成组织损伤;但某些 PGs 如 PGE_2、PGI_2 等是维持肠粘膜的完整性所不可缺少的,因此 PGs 在胃肠道粘膜病理生理中的作用尚待进一步研究。槲皮素(Quercetin,Que)属黄酮类化合物,药理作用广泛,有资料表明槲皮素对烫伤造成的肠粘膜损伤具有保护作用[1],本研究探讨槲皮素对烫伤大鼠肠粘膜 PGE_2 代谢的影响,旨在阐明槲皮素的肠粘膜保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Que(上海试剂二厂);PGE_2 放免分析试剂盒、花生四烯酸(AA 苏州医学院血栓室);DCFD(Sigma 化学试剂);COX-2 选择性抑制剂 Nimsulide(Sigma 化学试剂);rPGT cDNA 质粒 Matrine(2 748 bp)Victor L. Schuster 教授惠赠;FT-608^{125}I 放免测定仪(中国),BACKMAN 紫外分光光度计(德国),850 型荧光分光光度计(日本);CS-1 型超声波粉碎机(中国);PHS-2TC 型精密数显酸度计(浙江海天电子仪器厂)。

1.2 动物模型的制备

Wistar 大鼠 64 只,体重 180~220 g,由本校实验动物中心提供。动物背部除毛,饲养 24 h 后以(94±1)℃热水烫伤 18~20 s,烫伤面积占总体表面积的 30%,病理学检验证实为III度烫伤。

1.3 动物分组

伤后 12 h 处理组:动物 32 只,随机分为 1 个对照组和 3 个用药组,每组 8 只,用药组分别给予 20、40、80 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 以 20% DMSO 溶解的 Que,对照组给予含 20% DMSO 的生理盐水,于伤后 12 h 处死动物,刮取肠粘膜,迅速置液氮中保存备测。伤后 72 h 处理组:分组和给药方法同伤后 12 h 处理组,于伤后 72 h 处死动物,刮取肠粘膜,迅速置液氮中保存备测。

1.4 PGE_2 的测定

参照试剂盒说明书进行。准确称取肠粘膜约 150 mg,2 ml 生理盐水匀浆,5 000 r/min 离心 30 min,取上清液 100 μl 与相同体积的^{125}I 示踪剂混匀后加入相应抗体与之反应,再以聚乙二醇 4000 吸附抗原抗体复合物,离心后 γ 计数仪测定放射性,推算样品中 PGE_2 的含量。

1.5 磷脂酶 A_2(PLA_2)活性的测定

按微量酸滴定法[2]进行。以每毫克粘膜在 60 ℃与底物共

作者简介:孟德胜(1966-),男,山东省滨州市人,博士,讲师,主要从事中药药理学方面的研究,现在附属大坪医院野战外科研究所药剂科工作。电话:(023)68752967

收稿日期:2001-07-02;修回日期:2002-03-11

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

同孵育 1 h所消耗盐酸的纳摩尔数(nmol/mg)表示 PLA_2 活性。

1.6　环氧合酶(cyclooxygenase, COX)活性的测定[3]

肠粘膜 100 mg 以预冷的含 0.002 mol/L $CaCL_2$ 的PBS 匀浆, 冰浴下超声处理 15 s×3 次, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液作为备测酶液。分 A、B、C 3 管, 分别加入待测酶液 20 μl、1 mol/L Tris-HCl 20 μl、50 μmol/L DCFD 20 μl、20 μmol/L Hematin 20 μl; C 管另加入 2.5 μmol/L Nimsulide 20 μl; 30 ℃ 温浴 10 min 后, B 管和 C 管各加入 9.0 μmol/L AA 20 μl; 继续 30 ℃ 温浴 20 min 后, 迅速转移至 2 ml 预冷(冰浴 0 ℃)PBS 中, 混匀, 2 h 内测荧光强度(激发波长 450 nm, 发射波长 550 nm, 狭缝 5 nm)。COX 活性以每 100 mg 肠粘膜所发射荧光强度表示。COX 总活性= B−A, COX-1 活性= C−A, COX-2 活性= B−C。

1.7　前列腺素转移因子(Prostaglanding transporter, PGT)mRNA 的表达[4]

原位杂交检测大鼠肠粘膜 PGT mRNA 表达变化。按常规进行鼠 rPGT cDNA 质粒的转化、扩增、抽提和纯化。BamH Ⅰ 酶切、回收目的基因片段、凝胶电泳检测, 片段约为 0.4 kb。按宝灵曼公司试剂盒说明书, 用地高辛配基随即引物法标记 PGT cDNA 探针。冰冻切片以 4% 多聚甲醛固定, 蛋白酶 K 消化后, 加入变性探针杂交 15 h, 再加入抗体反应 30 min, 最后以 NBT 显色。

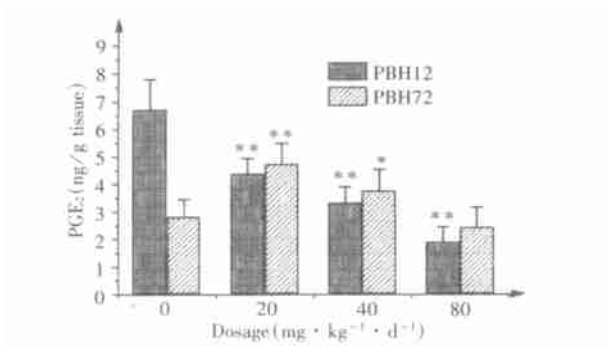
1.8　统计学处理

采用 SPSS 软件对实验数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两处理因素之间进行 t 检验, 两参数之间相关性进行直线相关分析。

2　结果

2.1　槲皮素对烫伤大鼠肠粘膜内 PGE_2 水平的影响

以高、中、低(20、40、80 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)3 个剂量灌胃给药后发现, 伤后 12 h 3 个剂量组 PGE_2 水平均显著降低, 且具有剂量依赖性; 而对伤后 72 h 的实验结果显示, 低剂量和中剂量的槲皮素使 PGE_2 水平显著升高, 高剂量组则与烫伤对照组无显著性差异, 见图 1。



*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

图 1　槲皮素对烫伤大鼠肠粘膜内 PGE_2 水平的影响

Fig 1　Influence of Que on the PGE_2 levels in intestinal mucosa of burned rats

2.2　槲皮素对肠粘膜 PLA_2 活性的影响

在所选定的剂量范围内, Que 对伤后 12 h 和 72 h PLA_2 活性无明显影响, 各剂量组均与烫伤对照组无显著性差异, 见图 2。

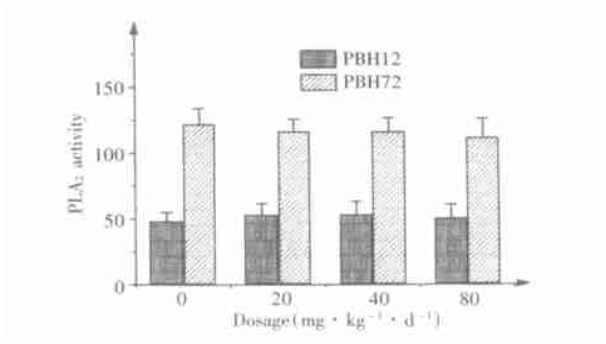


图 2　槲皮素对肠粘膜 PLA_2 活性的影响

Fig 2　Effect of Que on the PLA_2 activity in intestinal mucosa of burned rats

2.3　槲皮素对肠粘膜 COX 活性的影响

大鼠烫伤后 12 h, 肠粘膜 COX 总活性较高, 不同剂量的 Que 对之具有抑制作用, 且呈剂量依赖性, 而其中主要是对 COX-2 的抑制; 中、高剂量组 COX-1/COX-2 的比值亦明显高于对照组。大鼠伤后 72 h, COX 总活性降低但仍高于正常水平, 中剂量的 Que 可使 COX 总活性升高, 并与对照组存在显著性差异, 其中主要是升高了 COX-1 的活性, 对 COX-2 作用不显著; 低剂量与对照组相比 COX-1 和 COX-2 活性均无显著性差异; 高剂量组可明显降低 COX 总活性, 其中主要是降低 COX-2 活性, COX-1 活性也有所降低, 但与对照组相比无显著性差异; 中剂量组 COX-1/COX-2 的比值明显高于对照组, 见表 1。

表 1　槲皮素对肠粘膜 COX 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect Que on the COX activities in intestinal mucosa of burned rats($\bar{x} \pm s$)

Dose	COX activity (Fluoresceut infensity/100 mg)			
($mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$)	COX	COX-1	COX-2	cox-1/cox-2
PBH12　0	397.1±101.5	97.50±28.75	299.6±88.43	0.325±0.100
20	320.2±97.25	99.63±21.20	220.6±97.25	0.452±0.102
40	292.0±75.71 *	96.42±30.29	195.8±75.40 *	0.493±0.105 *
80	222.4±66.36 **	75.16±15.59	147.2±25.70 **	0.511±0.106 **
PBH72　0	238.4±74.40	95.25±29.90	142.9±47.72	0.667±0.211
20	256.6±85.60	119.5±25.33	137.8±48.85	0.867±0.256
40	344.5±106.6 *	187.3±44.25 **	157.7±55.30	1.187±0.349 *
80	177.0±73.44 *	84.40±18.85	92.60±29.78 *	0.911±0.305

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Control; PBH12: 12 h post injury; PBH72: 72 h post injury

2.4　槲皮素对肠粘膜 PGTmRNA 表达的影响

40 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 的槲皮素对烫伤后 12 h 两个时相点大鼠肠粘膜的 rPGT mRNA 表达水平无明显影响, 但可明显降低伤后 72 h 大鼠肠粘膜 rPGT mRNA 的表达, 用药组水平约与相应非用药组表达强度的比值为 0.46±0.14。

3　讨论

烫伤引起肠粘膜损伤的发病机制尚不完全清楚, 多种因素在此过程中起作用, 胃肠粘膜防御能力的改变即是其中较为重要的因素。作为炎症介质 PGE_2 可

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

扩张血管，增加血管通透性，加强白细胞趋化，促进溶酶体酶释放，从而造成烫伤初期肠粘膜损害；但适当水平的 PGE_2 对多种刺激因素造成的胃粘膜损伤具有保护作用[5]。本研究前期的工作证实烫伤后 72 h，肠粘膜内 PGE_2 水平的显著降低，并与肠粘膜损伤程度呈正相关（另文发表）。本实验结果表明槲皮素可降低烫伤 12 h 肠粘膜 PGE_2 水平，提高烫伤 72 h 肠粘膜 PGE_2 水平，使其维持在适当水平，这可能是其肠粘膜保护作用的机制之一。

PLA_2 是 PGs 合成途径中的第一个限速酶，本实验在所选定的剂量范围内 Que 对 PLA_2 活性影响不显著，说明 PLA_2 非 Que 粘膜保护的主要作用靶。COX 是 PGs 合成的第二个限速酶，近年来的研究证实有两种形式的 COX 存在即稳定表达型 COX-1 和可诱导表达型 COX-2。一般认为 COX-2 主要参与炎症反应，非甾体抗炎药的抗炎作用源于对 COX-2 的抑制；COX-1 则主要参与生理状态下的 PGs 合成，非甾体抗炎药的胃肠道副作用即源于对 COX-1 的抑制[6,7]。本实验结果显示在烫伤后 COX 活性增加高峰期（伤后 12 h）Que 可呈剂量依赖性地抑制 COX 总活性，其中主要是抑制 COX-2 活性。大鼠烫伤后 72 hQue 表现出明显的双向作用：剂量为 40 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 的 Que 可显著增加大鼠肠黏膜 COX 总活性，其中主要是增加 COX-1 的活性；剂量增加为 80 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$y 时 Que 对大鼠肠粘膜 COX 总活性和 COX-2 活性又显示抑制作用。其共同规律是 Que 可增加烫伤大鼠肠粘膜两种 COX 异构酶 COX-1/COX-2 的活性比率。Que 调节 COX 活性的多样性尚无合理解释，需进一步研究。PGT 是前列腺素自身代谢和发挥生理作用的重要介质，一般认为它具有以下三个方面的作用，首先可介导新合成的 PGs 从细胞释放，第二可介导上皮 PGs 的转运，第三可介导 PGs 的清除与降解[8]。PGs 的降解不仅需要 PGT 的介导，还需要多种酶的参与。有资料显示 Que 对参与 PGs 降解的酶类如 NADPH 依赖性 3alpha/beta-HSD[9] 和一种从兔肾脏提取的羰基降解酶[10] 具有抑制作用，本实验结果表明 40 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 的 Que 可降低大鼠伤后肠粘膜 PGT mRNA 的表达。因此，Que 可能通过多种途径降低了 PGE_2 的降解速度。

综合本实验结果我们认为，Que 有可能通过调节烫伤大鼠肠粘膜 COX-1/COX-2 酶活性比率，降低 PGE_2 降解速率，维持适当水平的 PGE_2 从而发挥肠粘膜保护作用。

参考文献：

[1] 孟德胜，汪仕良. 槲皮素等对烫伤小鼠肠粘膜损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报，2000，16(6)：673－675.

[2] 陈思锋，吴立中. 体液和组织磷脂酶 A_2 简便快速测定法[J]. 第二军医大学学报，1989，10(3)：254－256.

[3] Ikuo Morita，William L Smith，David L DeWitt，*et al*. Expression-activity profiles of cells transfected with prostaglandin endoperoxide H synthase measured by quantitative fluorescence microscopy[J]. Biochemistry，1995，34(21)：7 194－7 199.

[4] 蔡文琴，王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川省科学技术出版社，1994. 406－434.

[5] Geraldo J，Ferraz P，Wallace J L，*et al*. Prostaglandins modulate the responsiveness of the gastric microcirculation of sodium nitroprusside in cirrhotic rats[J]. Hepatology，1996，23(10)：123－129.

[6] Hawkey C J. Non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy causes and treatment[J]. Scand J Gastroenterol，1996，31(suppl 220)：124－127.

[7] Trevethic M A，Oakely I，Clayton N M，*et al*. Non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastric damage in experimental animals：Underlying pathological mechnism[J]. Gen Pharmacol，1995，26(7)：1 455－1 459.

[8] Kanai N，Lu R，Satriano J A，*et al*. Identification and characterization of a prostaglandin transporter[J]. Science，1995，268(5 212)：866－869.

[9] Nakajin S，Fujita Y，Ohno S，*et al*. Purification and characterization of 3alpha/beta-hydroxysteroid dehydrogenase from mature porcine testicular cytosol[J]. J Steroid Biochem Mol Biol，1994，48(2－3)：249－256.

[10] Imamura Y，Higuchi T，Nozaki Y，*et al*. Purification and properties of carbonyl reductase from rabbit kidney[J]. Arch Biochem Biophys，1993，300(2)：570－576.

（编辑 郭建秀）

（上接 1201 页）

动平板试验通过改变运动时的速度与坡度，逐级增加运动负荷量，从而增加心肌的耗氧量，检测心肌供血情况，并对患者进行监护和心功能评定，作为一种无创性检查，临床上越来越受到重视。

本研究结果表明，活动平板试验预测冠状动脉狭窄的敏感性较高，特异性较低，说明活动平板试验对心肌缺血的较高检测率，特异性较低主要是由于冠脉造影侧重于较大的冠状动脉形态变化，对直径小于 0.6 mm 的小血管难以确定，不能简单地说冠脉造影阴性就没有冠心病；再者，对于一些心脏神经官能症的患者，也会出现活动平板试验阳性而冠脉造影阴性的结果。因此，在临床进行活动平板试验时应注意筛选，如结合患者的病史、体征、冠心病的易患因素等进行综合考虑。

单支病变与多支病变患者活动平板试验在运动中、后 S-T 段的下移程度、出现时间和持续时间在统计学上存在显著性差异，说明 S-T 段的下移程度、出现时间和持续时间与其冠状动脉的病变范围有关，即多支病变较单支病变的 S-T 段下移程度严重，阳性出现时间早，持续时间长；多支病变者在低负荷运动量时就过早出现缺血性 ST 改变。可以说明活动平板试验对冠心病的程度具有较高的预测价值。

关键词：活动平板试验；冠状动脉狭窄

中图法分类号：R443.8；R541.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] Ribisl P M，Liu J，Miysa I，*et al*. Comparison of computer ST criteria for diagnosis of severe coronary artery disease[J]. Am J Cardiol，1993，71(3)：546.

[2] 赵 学. 现代介入心脏病学实用技术[M]. 重庆：重庆出版社，1994. 28.

[3] 黄 宛. 临床心电学[M]. 第 5 版. 北京：人民卫生出版社，1998. 90－94.

[4] 邓玉莲，许春萱，邱丽纹，等. 心电图负荷试验对无症状心肌缺血诊断的评价[J]. 心电学杂志，1995，14(4)：217.

（编辑 薛国文）

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