DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.007


# 地塞米松和阿斯匹林对猪肺血管内巨噬细胞环氧合酶II型的作用*

伍伟玲** 陈正堂 蔡恩齐 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 探讨地塞米松(DEX)和阿斯匹林(ASA)对脂多糖(LPS)致猪肺血管内巨噬细胞(PIM)环氧合酶-II(COX-II)表达及活性的影响。方法: 改良法分离、培养猪PIM, 分为: ①对照组; ②LPS组: 予LPS(10μg/ml)刺激; ③DEX组和④ASA组: 分别以2μmol/L DEX和500μmol/L ASA预处理2h, 再以LPS刺激。以反转录聚合酶链反应和免疫组化染色法检测COX-II mRNA及酶蛋白的改变; 放射免疫分析法测定细胞上清$PGE_2$浓度, 间接表示COX活性。结果: LPS组PIM COX-II mRNA和酶蛋白表达及$PGE_2$浓度较对照组升高, DEX组则降低($P < 0.01$); ASA组COX-II mRNA和酶蛋白表达与LPS组相似, 但$PGE_2$浓度却降低($P < 0.01$)。结论: DEX能抑制LPS诱导的PIM COX-II mRNA及酶蛋白的表达; ASA可通过抑制COX的活性而减少前列腺素的产生; 二者对急性呼吸窘迫综合征等急性炎症性疾病的治疗可能有一定作用。

关键词 肺血管内巨噬细胞; 环氧合酶-II型; 脂多糖; 地塞米松; 阿斯匹林

中图法分类号 R322.35; R971.1; R977.11

花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)代谢产物(AAM)如血栓素(Thromboxane, Tx)可使白细胞趋化、血小板聚集、肺微血管收缩, 导致肺血管内皮和肺泡上皮细胞损伤, 是急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)发病的重要炎症介质。环氧合酶(Cyclooxygenase, COX)是AA代谢通路的第一个限速酶, 晚近发现有COX-I和COX-II两个亚型: COX-I为结构型, 已发现在许多组织中有相对稳定的表达, 合成的前列腺素(Prostaglandin, PG)调节细胞的生理活动; COX-II则为诱导型, 静息细胞没有或仅少量表达, 但受脂多糖(LPS)、白介素(IL)-1等的刺激后, 表达则急剧增加, 使得PG大量合成、释放, 打破生理性PG平衡, 启动和放大机体的炎症反应[1]。地塞米松(Dexamethasone, DEX)和阿斯匹林(Aspirin)即乙酰水杨酸(Acetylsalicylic acid, ASA)分别为固醇类和非固醇类抗炎药物, 在临床上广为应用; 但它们是否通过COX-II起作用, 国内尚少见报道。本实验分离、培养猪肺血管内巨噬细胞(PIM), 观察DEX和ASA对LPS诱导的PIM COX-II的表达和活性是否有抑制作用, 旨在为ARDS等急性炎症性疾病的治疗提供新的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 PIM的分离、培养

改良法分离、培养和纯化5~8周龄健康猪PIM, 台盼蓝染色计数并判断细胞活力[2]。

### 1.2 细胞的处置

吹打下贴壁的PIM, 分设4组, 行下列处置: ①正常对照组: PIM在无血清的RPMI 1640培养基(Sigma)中培养; ②LPS刺激组: LPS(Sigma)10μg/ml刺激培养细胞; ③DEX干预组: DEX(Sigma)2μmol/L预处理PIM 2h后, 如上加入LPS刺激; ④ASA干预组: ASA(Sigma)500μmol/L预处理PIM 2h后, 如上加入LPS刺激。于刺激后30 min、1、2、4、6h和8h收获细胞。

### 1.3 COX-II mRNA检测

用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法[3]。一步热酚法提得细胞总RNA, 取1μg, 65℃变性5 min, 依次加入0.5μg oligo-dT15(Promega), 4μl×5 RT-PCR合酶缓冲液(Synthese buffer, 含$Mg^{2+}$ 2.5 mmol/L, Promega), 0.125 mmol/L dNTP, 10 U反转录酶(AMV), 0.01 mmol/L DTT及40 U RNAase抑制剂, 总体积20μl, 42℃孵育60 min, 95℃ 10 min终止反应, 完成cDNA第一链的合成。PCR时, COX-II寡核苷酸引物根据Lee等[4]的设计合成:

正义引物: 5′-ACTCACTCAGTTTGTTGAGTCATTC-3′

反义引物: 5′-TTTGATTAGTACTGTAGGGTTAATG-3′

用这对引物可特异性扩增出583 bp的COX-II cDNA系列。为进行质控, 每次行RT-PCR时, 都按Osawa等的方法, 对应扩增黄嘌呤磷酸转移酶(Hypoxanthine phosphoribosyl

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670311

** 伍伟玲, 女, 35岁, 住院医师, 硕士, 现在空军广州医院 广州, 510602

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

transterase, HPRT)作为外对照。取 1μl反转录反应液,分别加入 5μl 10× PCR缓冲液, 1.75 mmol/L $Mg^{2+}$, 0.2 mmol/L dNTP, 0.4μmol/L COX-Ⅱ 或 HPRT寡核苷酸引物, 5个单位 Taq DNA聚合酶,总反应体积为 50μl,一式三管。PCR反应所需变性、退火和延伸温度分别为 94℃, 55℃和 72℃,反应时间均为 1 min,共 30次循环。首次循环 94℃需 2 min。反应完成后取 5μl PCR反应产物行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。以 PCR Marker为分子量标准,对电泳黑白照片进行密度扫描,测其积分光密度值。

### 1.4 COX-Ⅱ酶蛋白的检测[5]

用链霉抗生素蛋白-过氧化物酶连接法(Streptavidin-peroxidase conjugated method)。取刺激后 30 min, 1 2 4 7 8 12 16 20 h和 24 h的细胞,加羊抗鼠 COX-Ⅱ多克隆抗体(一抗,中山公司), 4℃过夜;再加生物素标记兔抗山羊 IgG(二抗), 37℃温育 0.5 h, DAB显色 5 min。阴性对照时一抗用 0.01 mol/L PBS代替。染色后光镜下作定性观察,用图像分析系统作定量分析。在每帧图像上随机取 10个细胞的积分光密度值代表免疫反应强度。

### 1.5 PIM上清 $PGE_2$浓度测定

用放射免疫法。调 PIM为 5× $10^6$,如上施以刺激;离心, PBS洗 2次;加入含 30μmol/L AA的新鲜 RPMI 1640培养液,培养 10 min;离心,留取上清,用 $^3H$标记的 $PGE_2$测量试剂盒(购自 301医院)检测,操作方法按说明书进行。

### 1.6 统计分析

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较行双因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 各组 PIM COX-Ⅱ mRNA表达的比较

4组 PIM HPRT mRNA表达恒定,无显著差异,见图 1,表明我们的实验结果具有可比性。对照组无 COX-Ⅱ mRNA表达; LPS刺激后,则显著增加,并于刺激后 4 h达峰值($P<0.01$),见图 2。与 LPS组相比, DEX组各时相点的表达均受抑制($P<0.01$),总抑制率达 58%。ASA组各时相点无明显变化($P>0.05$),其表达趋势与 LPS组相似。

### 2.2 各组 PIM COX-Ⅱ酶蛋白变化的比较

对照组几乎无表达。LPS刺激后, COX-Ⅱ酶蛋白显著增加($P<0.01$),其表达峰值在刺激后 12 h。与 LPS组比较, DEX组各时相点均被显著抑制($P<0.01$),总抑制率为 75%; ASA组 COX-Ⅱ酶蛋白表达无明显变化($P>0.05$),见表 1,图 3。

### 2.3 各组 PIM上清 $PGE_2$浓度的变化

对照组各时相点无显著变化; LPS组各点均显著高于对照组($P<0.01$),峰值在刺激后的 12 h; DEX组显著低于 LPS组($P<0.01$),但仍显著高于对照组($P<0.05$); ASA组显著低于对照组和 LPS组($P<0.01$),见表 2。

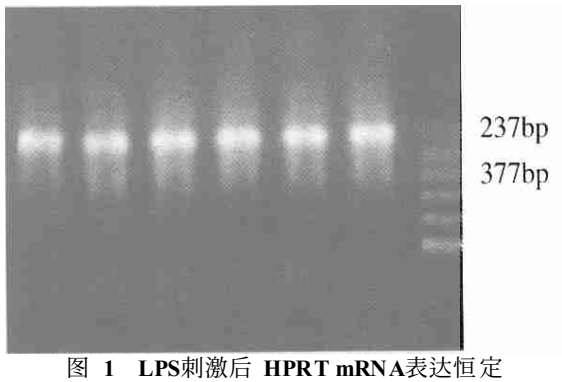



图 1　LPS刺激后 HPRT mRNA表达恒定

**Fig 1　Constant expression of HPRT mRNA after LPS-stimulation**

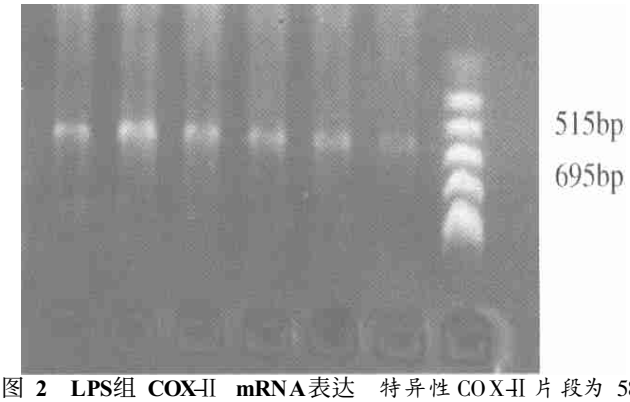



图 2　LPS组 COX-Ⅱ mRNA表达　特异性 COX-Ⅱ片段为 583 bp,表达峰值在 LPS刺激后 4 h

**Fig 2　Expression of COX-Ⅱ mRNA in the PIM stimulated with LPS**　Specific series of COX-Ⅱ located at 583 bp, peak of the expression was found at 4 h after LPS stimulation

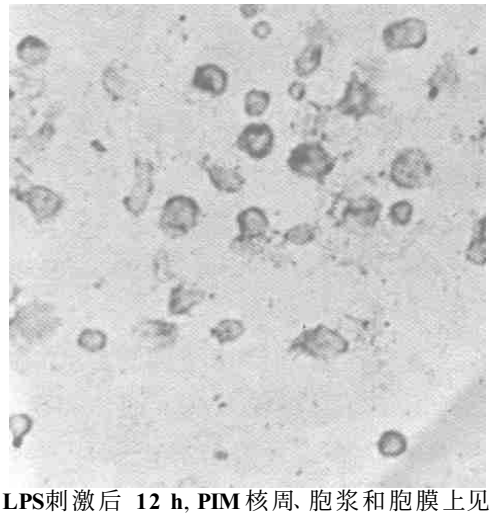


图 3　LPS刺激后 12 h, PIM核周、胞浆和胞膜上见棕褐色 COX-Ⅱ酶蛋白阳性着色　(免疫组化× 200)

**Fig 3　Brown positive staining of COX-Ⅱ protein in cell membrane, nuclear envelope and cytoplasm**　(Immunohistochemistry× 200)

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

表 1 LPS刺激后各组 PIM COX-Ⅱ 酶蛋白比较($n$= 8)

Tab 1 Comparison of the level of COX-Ⅱ after LPS-stimulation ($n$= 8)

| | 30 min | 1 h | 2 h | 4 h | 6 h |
|---|---|---|---|---|---|
| Control group | 3.29± 2.34△ | 4.56± 3.26△ | 5.15± 3.33△ | 5.80± 3.34△ | 5.79± 2.53△ |
| LPS-stimulated group | 36.50± 9.63** | 28.64± 8.61** | 35.22± 6.70** | 38.83± 10.68** | 60.63± 14.24** |
| DEX-treated group | 8.94± 2.93△** | 10.45± 1.86△** | 11.53± 3.47△** | 13.60± 5.57△** | 17.33± 3.79△** |
| ASA-treated group | 17.90± 4.63**# | 21.96± 4.47**# | 29.19± 9.20**# | 36.8± 49.53**# | 62.20± 16.53**# |
| | 8 h | 12 h | 16 h | 20 h | 24 h |
| Control group | 5.14± 2.46△ | 4.82± 2.54△ | 5.69± 3.61△ | 6.30± 2.24△ | 6.67± 4.22△ |
| LPS-stimulated group | 87.12± 16.49** | 101.73± 17.31** | 82.73± 17.13** | 61.68± 10.32** | 47.59± 17.00** |
| DEX-treated group | 19.36± 2.65△** | 20.99± 3.05△** | 18.66± 5.86△** | 18.47± 5.30△** | 11.54± 4.72△** |
| ASA-treated group | 86.61± 17.23**# | 100.21± 17.44**# | 79.67± 23.30**# | 74.26± 15.71**# | 47.77± 12.16**# |

** : $P$ < 0.01 $vs$ control;△: $P$ < 0.01 $vs$ LPS;# : P< 0.01 $vs$ DEX

表 2 各组 PIM上清 $PGE_2$浓度比较(ng/ml,$n$= 8)

Tab 2 Comparison of the content of $PGE_2$ in PIM supernan among the groups(ng/ml,$n$= 8)

| | 30 min | 1 h | 2 h | 4 h | 6 h |
|---|---|---|---|---|---|
| Control group | 1.47± 0.09△ | 1.40± 0.03△ | 1.45± 0.06△ | 1.42± 0.04△ | 1.39± 0.04△ |
| LPS-stimulated group | 2.74± 0.07** | 3.49± 0.24** | 4.71± 0.22** | 4.99± 0.58** | 6.34± 1.76** |
| DEX-treated group | 1.70± 0.04△** | 1.72± 0.06△** | 1.81± 0.14△** | 1.85± 0.01△** | 1.89± 0.02△** |
| ASA-treated group | 1.22± 0.21△# | 1.25± 0.06△# | 1.14± 0.02△# | 1.05± 0.04△#* | 1.00± 0.08△#* |
| | 8 h | 12 h | 16 h | 20 h | 24 h |
| Control group | 1.41± 0.06△ | 1.36± 0.04△ | 1.33± 0.01△ | 1.35± 0.01△ | 1.40± 0.06△ |
| LPS-stimulated group | 6.78± 0.75** | 8.85± 0.16** | 6.41± 0.18** | 5.73± 1.22** | 4.95± 1.17** |
| DEX-treated group | 1.97± 0.20△* | 2.23± 0.13△* | 2.14± 0.41△* | 1.83± 0.13△* | 1.72± 0.06△* |
| ASA-treated group | 0.93± 0.05△#* | 0.63± 0.06△*# | 0.61± 0.04△*# | 0.36± 0.01△*# | 0.37± 0.01△*# |

* : $P$ < 0.05,** : P< 0.01 $vs$ Control;△: $P$ < 0.01 $vs$ LPS;# : $P$ < 0.01 $vs$ DEX

## 3 讨论

目前认为,由 COX-Ⅱ 催化产生的大量 PG可导致机体的炎症反应,而 COX-Ⅰ 代谢产物则主要维持细胞的生理活动。因此,选择性抑制 COX-Ⅱ ,不但有助于恢复机体的 PG平衡,减轻炎症反应,而且还可避免治疗上的副作用。这在 ARDS等急性炎症性疾病的防治中有重要作用。

DEX作为调节全身炎症反应的药物,在临床上早已得到广泛应用。PG是糖皮质激素的作用靶。研究表明,糖皮质激素不抑制 COX-Ⅰ 的表达,而对血清等诱导的 COX-Ⅱ 表达有显著抑制作用[6]。这可能是其抗炎作用的一个重要途径。本实验发现,DEX对 LPS诱导的 PIM COX-Ⅱ mRNA表达的平均抑制率为 58%,同时对 COX-Ⅱ 酶蛋白表达的平均抑制率达 75%。表明 DEX可在基因转录和酶蛋白翻译两个水平抑制 COX-Ⅱ 的表达,且后者的作用似更强一些;而 COX活性的抑制率在 70% 左右,与酶蛋白表达抑制水平相当,提示 DEX主要通过抑制 COX-Ⅱ 的蛋白表达,而使 COX活性降低,以 $PGE_2$为代表的 AAM即减少。因此,从选择性抑制 COX-Ⅱ ,减少炎症介质释放出发,糖皮质激素在 ARDS的防治中仍有一定的地位;但其增加感染等副作用,限制了在临床的应用,值得深入研究。

ASA作为用于临床 100余年的老药,有抗炎、解热、镇痛等突出特点,是非甾体类抗炎药物(Non-steroidal anti-inflamatory drugs, NSAID)的典型代表。本实验发现,ASA对 LPS诱导的 PIM COX-Ⅱ mRNA及酶蛋白表达均无显著抑制作用;但 ASA干预组 COX活性显著降低,甚至低于对照水平,提示 ASA对 COX-Ⅱ 的抑制在蛋白翻译后,且对 COX活性的抑制缺乏选择性[7]。而对 COX-Ⅰ 活性的抑制即

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

产生治疗上的副作用,如胃溃疡和肾功能衰竭等,因而难以在临床大量应用。晚近有人根据 COX-II 与 COX-I 结构上的差异,开发出对前者的亲合力强于后者 200倍的"超级 ASA"(Super aspirin),极大地提高了对 COX-II 抑制的选择性,为临床 ARDS等急性炎症性疾病的治疗带来了新的希望[8]。

## 参考文献


1 Williams C S, Dubois R N. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? Am J Physiol, 1996, 270(33): G393

2 李胜亮,陈正堂,金敬顺.脂多糖致肺血管巨噬细胞形态和功能的改变.中华结核和呼吸杂志, 1998, 21(3): 167

3 Slater D M, Berger L C, Newton R, *et al*. Expression of cyclooxygenase type 1 and 2 in human fetal membranes at term. Am J Obstet Gynecol, 1995, 172(1 Pt 1): 77

4 Lee S H, Soyoola E, Chanmugam P, *et al*. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. J Biol Chem, 1992, 267(36): 25934

5 Harrls R C, McKanna J A, Akai Y, *et al*. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. J Clin Invest, 1994, 94(6): 2504

6 Dewitt D L, Meade E A. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglantin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isoenzymes. Arch Biochem Biophy, 1993, 306(1): 94

7 Mancini J A, Vickers P J, O′neill G P, *et al*. Altered sensitivity of aspirin acetylated prostaglandin G/H synthase-2 to inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Mol Pharmacol, 1997, 51(1): 52

8 Service R F. Closing in on a stomach sparing aspirin substitute. Science, 1996, 273(5282): 1660


(收稿: 1999-05-10;修回: 1999-08-18)

(编辑　汪勤俭)

# Effects of dexamethasone and aspirin on cyclooxygenase-II in porcine pulmonary intravascular macrophages stimulated with lipopolysaccharide*

Wu Weiling, Chen Zhengtang, Cai Enqi (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Xinqiao, 400037)

**Abstract** **Objective**: To study the effects of dexamethasone (DEX) and acetylsalicylic acid (ASA) on the expression and activity of cyclooxygenase-II (COX-II) in porcine pulmonary intravascular macrophages (PIM) stimulated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods**: Isolated porcine PIM were cultured and divided into the control group; LPS-stimulated group of which the PIM were stimulated with LPS (10μg/ml); DEM or ASA-treated groups of which the PIM were pre-cultured with DEX (2μmol/L) or ASA (500μmol/L) 2 h prior to LPS stimulation. The changes of COX-II mRNA were determined with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and those of COX-II protein with immunohistochemistry. The level of prostaglandin $E_2$ ($PGE_2$), which serves to express the activity of COX-II, in the supernatant of PIM was measured with radio-immunoassay (RIA). **Results**: COX-II mRNA expression, COX-II protein and $PGE_2$ level were significantly higher in LPS group than in the control but lower in DEX-treated group than in LPS group ($P < 0.01$). In ASA group, the changes of COX-II mRNA expression and COX-II protein were similar to those of LPS group but $PGE_2$ level was significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion**: DEX can inhibit the expression of COX-II mRNA and COX-II protein after LPS stimulation of porcine PIM and ASA can only inhibit the activity of COX-II by showing the decrease of $PGE_2$. Both DEX and ASA may exert certain therapeutic effects on acute inflammatory diseases such as acute respiratory distress syndrome.

**Key words** pulmonary intravascular macrophage; cyclooxygenase-II; lipopolysaccharide; dexamethasone; aspirin

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670311

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