

沙漠干热环境腹部肠管火器伤后肝脏 COX-2 的表达与肝细胞凋亡的关系研究

钱若筠 刘江伟[△]

(兰州军区乌鲁木齐总医院麻醉科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探讨沙漠干热环境下猪腹部肠管火器伤后肝脏环氧化酶-2(COX-2)的表达与肝细胞凋亡之间的关系。方法 沙漠干热环境组和常温环境组各 42 头长白仔猪随机等分为对照组和伤后 1h、2h、4h、8h、12h 和 24h 组 7 个时间组,实验各组在建立腹部肠管火器伤模型后,用免疫组化图像分析法测定各组肝组织 COX-2 的表达,采用 TUNEL 法观察肝细胞凋亡情况,并检测血清 ALT 的变化。结果 沙漠干热环境组和常温环境组中各实验组 COX-2 表达水平及肝细胞凋亡率均明显高于对照组($P<0.01$),在沙漠干热环境组,各实验组肝脏 COX-2 表达水平明显高于相对应的常温组($P<0.01$),肝细胞凋亡率在 1h、2h、4h、8h 明显高于相对应的常温组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肝脏 COX-2 的表达水平和肝细胞凋亡率在沙漠干热环境组和常温组中的第 1 个高峰值均出现在伤后 2h 组,沙漠干热环境组的第 2 个高峰值出现在伤后 8h 组,而常温环境组的第 2 个高峰出现在伤后 12h 组,血清 ALT 的变化趋势与 COX-2 的表达及细胞凋亡的趋势相似,肝脏 COX-2 表达水平和肝细胞凋亡率在沙漠干热环境组和常温环境组均具有相关性,相关系数分别为 0.973 和 0.945 ($P<0.01$)。结论 沙漠干热环境腹部肠管火器伤后肝脏 COX-2 的水平明显高于常温组,COX-2 的表达与肝细胞凋亡的变化趋势一致,且密切相关,提示在沙漠干热环境腹部肠管火器伤后 COX-2 可能通过促进肝细胞凋亡在继发性肝脏损害过程中起重要作用。

关键词 腹部损伤;火器伤;沙漠;干热环境;环氧化酶-2;凋亡

中图分类号:R651 R826.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)11-2079-04

Expression of Hepatic COX-2 and Hepatocyte Apoptosis in Pigs after Intestinal Firearm Wound in Hot and Dry Desert Environment

QIAN Ruo-yun, LIU Jiang-wei[△]

(Department of Anesthesiology, Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Region of PLA, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expressions of hepatic COX-2 and apoptosis in pigs after intestinal firearm wound in dry heat environment of desert. **Methods:** A total of 84 Chang-Bai piglets were equally divided randomly into dry heat environment group and normal environment group, and each group were divided into 7 group: control group and wounded 1h group, 2h group, 4h group, 8h group, 12h group, 24h group. The model of intestinal perforations due to abdominal firearm wound was established in wounded groups. Paraffin-embedded liver sections were assayed for Hepatic COX-2 expression and measured with immunohistochemical staining and image analysis in all groups, apoptosis was assayed using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL) assay. **Results:** Levels of hepatic COX-2 expressions and hepatocellular apoptosis indexes in wounded groups were significantly elevated compared to control group in both environment groups ($P<0.01$), Levels of hepatic COX-2 expressions in wounded groups of dry heat environment group were significantly elevated compared to the corresponding same time group of normal environment ($P<0.01$). hepatocellular apoptosis indexes in 1h, 2h, 4h, 8h groups of dry heat environment group were significantly elevated compared to the corresponding same time group of normal environment ($P<0.05$ or $P<0.01$). Both levels of hepatic COX-2 expressions and hepatocellular apoptosis indexes reached their first peak at 2h group in both environment groups; however, they reached their second peak at different time group, which was at 8h group for the dry heat environment group and 12h group for the normal environment group. Serum ALT had the similar changing trend as the levels of hepatic COX-2 expressions and hepatocellular apoptosis. Levels of hepatic COX-2 expressions and hepatocellular apoptosis indexes correlated with each other significantly both in dry heat environment and in normal environment, correlated ratio were 0.973 and 0.945 ($P<0.01$), respectively. **Conclusion:** Levels of hepatic COX-2 expressions in wounded groups of dry heat environment group were significantly elevated compared to the corresponding same time group of normal environment. Levels of hepatic COX-2 expressions and hepatocellular apoptosis indexes had the same changing tendency in dry heat environment and in normal environment, and they intimately correlated each other, suggested that COX-2 may through promoting hepatocellular apoptosis which play a important role in secondary liver injury after intestinal firearm wound in dry heat environment.

* 基金项目 兰州军区医药卫生科研基金资助项目(LXH-2005019)

作者简介 钱若筠(1962-) 女,主任医师,科主任,从事麻醉学临床及基础研究及创伤研究,

电话:13619910596 E-mail:ruoyunq@sina.com

[△]通讯作者 刘江伟 电话:13999891506 Email:ljw273@sohu.com

(收稿日期 2011-01-10 接受日期 2011-01-31)

ronment of desert.

Key words: Abdominal injuries; Fireman wound; Desert; Dry heat environment; Cyclooxygenase-2; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R651 R826.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)11-2079-04

前言

环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)为一种“诱导型酶”,主要在炎症细胞中表达,与疼痛、发热、肿瘤及损伤等关系密切。近年来研究表明,COX-2与肝损伤关系密切^[1]。我们先前的研究表明沙漠干热环境下腹部肠管火器伤后,肝细胞凋亡与肝功能损害密切相关^[2]。本研究探讨沙漠干热环境腹部肠管火器伤后肝脏 COX-2 的表达与肝细胞凋亡之间的关系,以进一步探究 COX-2 在沙漠干热环境腹部肠管火器伤后继发性肝损伤过程中的作用,为 COX-2 抑制剂在腹部肠管火器伤的救治中可能存在的应用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用解放军 63650 部队提供的健康长白仔猪 84 头,2-3 月龄,体质量(27-33)kg,平均体重(31.2 ± 1.4)kg,雌雄不限,随机分为沙漠干热组和常温组,每组均为 42 头,每组又随机等分为不致伤的对照组、伤后 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 和 24 h 组 7 个亚组。沙漠干热环境组实验场地位于新疆塔克拉玛干沙漠边缘,时间在 2006 年 7-8 月,实验从中午 12:00 开始,沙漠干热组实验动物在沙漠干热环境下预热 3 h 后致伤,平均气温(41.2 ± 0.9)℃,平均相对湿度(22.3 ± 1.3)%,辐射热强度 4.184 J/cm²·min,常温组实验动物在常温环境下致伤,常温及实验室环境:平均温度(23.7 ± 0.4)℃,平均相对湿度(55.6 ± 1.4)%,沙漠干热组和常温组动物在致伤后 15 min 内转移到实验室进行观察。

1.2 腹部火器伤模型

参照文献^[3]的方法建立腹部肠管火器伤模型,枪伤前动物常规禁食 12 小时,自由饮水。5%盐酸氯胺酮注射液 20mg/kg+0.05%硫酸阿托品注射液 0.04mg/kg 对猪耳后肌肉注射麻醉后,将猪行走位悬吊于戈壁军用靶场门廊上,四肢自然下垂,完全暴露腹部,于脐水平后方 2cm 处右侧腹壁皱襞下缘无毛区标记射击点。采用军用 54 式手枪,7.62mm 手枪弹,经专业机构校准:子弹出膛初速度 430-435m/s,弹丸重量 5.5g,撞击能量 508.48-520.37J,专业射手用手枪距猪侧腹壁 30cm 处瞄准射击点,从右侧腹壁垂直射入,左侧对应位置射出弹头。

在相应的时间点开腹取相应的并肝组织,常规甲醛固定,石蜡包埋肝组织。沙漠干热组和常温组中的对照组除不致伤外,其余步骤与实验相同。

1.3 免疫组化图像分析法检测 COX-2 的表达

COX-2 抗体为福州迈新公司产品(工作浓度 1:100),按 SABC 法免疫组化试剂盒说明书操作。PBS 代替一抗作阴性对照。用 Image-pro Plus5.0 医学图像分析软件检测每组细胞阳性染色的累积光密度值,用来表示 COX-2 表达相对量。每张切片随机选取 5 个不重叠的高倍镜视野分析,分析过程中所有切片

的放大倍数(400×)光源强度均相同。

1.4 细胞凋亡的原位检测

将肝组织切片按 TUNEL 试剂盒(福建迈新公司)提供的方法进行检测,随机选取 5 个不重叠的高倍镜视野(400×)BI-2000 医学图像分析系统分别拍照。计算 5 个高倍视野下的凋亡细胞数,用 5 个高倍视野下的凋亡细胞总数除以细胞总数来计算凋亡指数,凋亡指数以凋亡细胞数/100 个细胞表示。

1.5 血清肝生化测定

实验各组分别于伤后 1h、2h、4h、8h、12h 和 24h 各时间点抽取猪耳缘静脉血,对照组回实验室后立即抽血,静置 30min 后离心,东芝全自动生化分析仪(TBA-40FR)测血清中 ALT 水平。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.5 行单因素方差分析, LSD-t 检验进行两两比较,两变量相关分析用 Pearson 直线相关分析。

2 结果

2.1 动物存活情况

对照组和伤后 1h、2h、4h、12h 组动物全部存活,伤后 8h、24h 组各死亡 1 头。干热组中 2h 组、4h 组、8h 组、24h 组各死亡 1 头,12h 组死亡 2 头。死亡主要原因为腹腔内出血和感染。

2.2 肝组织 COX-2 表达的变化

COX-2 的阳性表达以肝细胞、枯否细胞、血管内皮细胞和胆管内皮细胞为主,黄色或棕黄色颗粒主要位于胞浆内,少数位于核膜(图 1)。对照组仅见少量肝细胞阳性表达,用医学图像分析系统检测各组肝组织 COX-2 的表达,经统计学处理,沙漠干热环境组和常温环境组中肝脏组织 COX-2 的表达均明显高于对照组($P < 0.01$),除对照组外,沙漠干热环境组肝脏 COX-2 的表达明显高于相对应的常温组($P < 0.01$),沙漠干热环境组和常温组肝脏 COX-2 表达的第 1 个高峰值均出现在伤后 2h 组,沙漠干热环境组的第 2 个高峰值出现在伤后 8h 组,而常温环境组的第 2 个高峰出现在伤后 12h 组,两个环境组中第 2 个高峰值 > 第 1 个高峰值($P < 0.01$)(见表 1)。沙漠干热环境组中除 4h 组和 12h 组,其他各组与上一个时间组之间均有显著性差异($P < 0.01$),常温环境组 COX-2 的表达均与上一个时间组之间有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 肝组织细胞凋亡变化

凋亡细胞以肝细胞为主,也有少量枯否细胞和血管内皮细胞(图 2),阳性细胞胞核为棕色。两个环境组伤后各组肝细胞凋亡指数均较对照组有明显增加($P < 0.01$);沙漠环境组在 1h、2h、4h、8h 组的细胞凋亡指数明显高于相对应的常温环境组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),沙漠环境组和常温环境各组中的各组细胞凋亡指数均与前一时间点之间有显著差异($P < 0.01$),沙漠环境组和常温环境组的细胞凋亡指数均在 2h 出现第 1 个峰值,第 2 个峰值分别出现在第 8h 和 12h,第 2 个峰值均 > 第 1 个峰值($P < 0.01$)(表 1)。

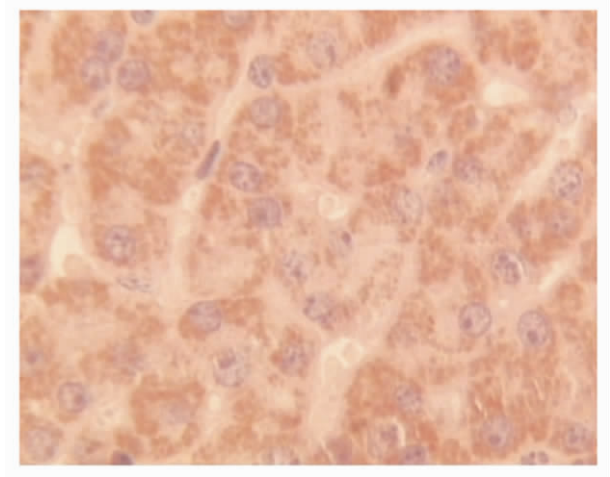


图 1 干热 12h 组 COX-2 肝组织阳性表达 (SABC, 400×)
Fig. 1 Hepatic COX-2 positive expression in dry heat environment group after 12h (SABC, 400×)

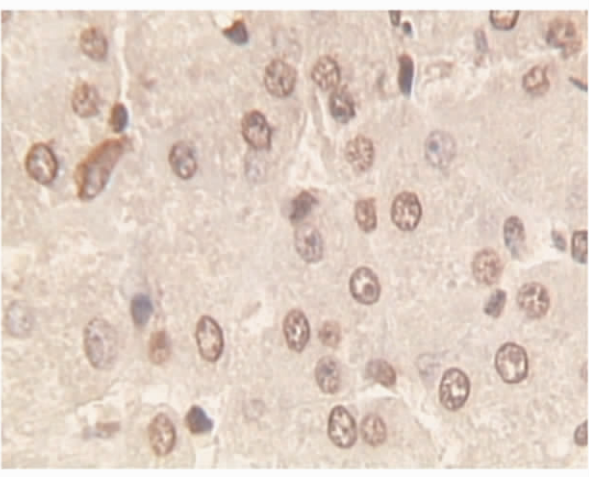


图 2 干热 12h 组肝组织 TUNEL 凋亡图(400×)
Fig. 2 Hepatic apoptosis in dry heat environment group after 12h (400×)

2.4 血清 ALT 的变化

干热环境实验组和常温环境实验组在伤后各时间点 ALT 均高于对照组(P<0.01);各实验组的细胞凋亡指数均与前一时间点之间有显著差异(P<0.01);沙漠环境组的 ALT 在 1h、4h、8h 均明显高于常温环境组(P<0.01);沙漠环境组和常温环境组的 ALT 均在 2h 出现第 1 个峰值,第 2 个峰值分别出现在第 8 h 和 12h,第 2 个峰值均>第 1 个峰值(P<0.01)(表 1)。

2.5 相关性分析

Pearson 直线相关分析表明,沙漠干热环境和常温环境下,COX-2 的表达与细胞凋亡率均呈正相关,相关系数分别为 0.973 和 0.945 (P<0.01);COX-2 的表达与 ALT 均呈正相关,相关系数分别为 0.933 和 0.899 (P<0.01);细胞凋亡率与 ALT 成正相关,相关系数分别为 0.953 和 0.948 (P<0.01)。

表 1 沙漠干热环境下各组 COX-2 的表达与凋亡率和 ALT 的变化($\bar{x} \pm s$)
Table 1 COX-2 expression, apoptosis indexes and ALT changes in dry heat environment groups

Group	COX-2(IOD)		apoptosis indexes (%)		ALT	
	Dry heat	Normal	Dry heat	Normal	Dry heat	Normal
	environment group	environment group	environment group	environment group	environment group	environment group
Control group	1990.96± 70.35	1886.40± 288.51	2.98± 0.74	2.65± 0.37	49.62± 3.82	48.00± 0.97
1h group	7509.95± 332.42 ^{a,c,d}	5844.48± 317.80 ^{c,d}	21.18± 2.23 ^{b,c,d}	19.04± 0.72 ^{c,d}	71.54± 3.32 ^{a, c,d}	63.00± 1.25 ^{cd}
2h group	19238.65± 411.23 ^{a,c,d}	15487.37± 429.53 ^{cd}	49.51± 4.18 ^{b,c,d}	42.92± 1.98 ^{cd}	110.34± 12.38 ^{cd}	99.20± 3.27 ^{cd}
4h group	18744.22± 507.41 ^{a,c}	10199.54± 309.50 ^{cd}	42.61± 3.20 ^{a,c,d}	32.17± 1.50 ^{cd}	94.05± 6.03 ^{a,c,d}	68.75± 2.18 ^{cd}
8h group	24746.74± 743.12 ^{a,c,d}	17046.63± 547.63 ^{cd}	76.47± 3.64 ^{a,c,d}	48.97± 1.73 ^{cd}	141.57± 3.93 ^{a,c,d}	80.96± 1.11 ^{cd}
12h group	24294.63± 665.82 ^{a,c}	20859.64± 613.10 ^{cd}	72.26± 4.98 ^c	73.40± 2.93 ^{cd}	129.32± 5.36 ^{cd}	133.07± 5.99 ^{cd}
24h group	22249.63± 859.49 ^{a,c,d}	13328.99± 546.63 ^{cd}	61.41± 3.98 ^{cd}	60.37± 3.99 ^{cd}	104.07± 5.33 ^{cd}	105.56± 3.41 ^{cd}

Note : dry heat environment group compare with normal environment group aP<0.01, bP<0.05; all groups compare with control group cP<0.01, all groups compare with forward time group dP<0.01

3 讨论

COX-2 是一种诱导型酶,当细胞受到炎症等刺激时可高表达,是炎症介导的细胞毒性重要的决定因素之一,近年来研究证实,COX-2 在各种形式的肝损伤组织中表达均明显升高,在肝损伤的发生、发展过程中起重要作用^[4-6]。沙漠干热环境腹部肠管火器伤后继发性肝脏损害的机制在国内外少有研究,本研究表明,腹部肠管火器伤后在沙漠干热环境组和常温环境组中肝脏组织 COX-2 的表达均明显高于对照组(P<0.01),除对照

组外,沙漠干热环境组肝脏 COX-2 的表达明显高于相对应的常温组(P<0.01),沙漠干热环境组和常温组肝脏 COX-2 表达的第 1 个高峰值均出现在伤后 2h 组,沙漠干热环境组的第 2 个高峰值出现在伤后 8h 组,而常温环境组的第 2 个高峰出现在伤后 12h 组,肝细胞凋亡的变化趋势与 COX-2 的变化趋势一致,经相关性分析表明,沙漠干热环境及常温环境下腹部肠管火器伤后肝脏 COX-2 的表达与肝细胞凋亡密切相关,且二者均与我们先前研究的肝脏 ALT 变化趋势一致^[2],提示沙漠干热环境下由于干热环境的热损伤、内毒素、腹部火器伤本身的

损伤及火器伤的 " 远达效应 " 等相互作用, 诱发 COX-2 在肝脏的高表达, 并通过诱发肝细胞凋亡在沙漠干热环境下腹部肠管火器伤继发性肝脏损害过程中起重要作用。

关于 COX-2 与细胞凋亡的机制研究, 在肿瘤学中研究普遍认为 COX-2 可抑制肿瘤细胞的凋亡, 从而在肿瘤的发生发展过程中起重要作用^[7]。本研究结果提示 COX-2 在腹部肠管火器伤后的继发性肝损害过程可能起到促进细胞凋亡的作用, 与肿瘤学中的研究结果相反。关于 COX-2 在创伤和炎症领域诱导细胞凋亡的研究较少, Takashi H^[8]等应用 COX-2 基因敲除大鼠进行肝脏缺血再灌注损伤机制研究发现, 在损伤发生后, 凋亡抑制因子 Bcl-2 and Bcl-xL 能够正常表达在 COX-2(-/-)大鼠肝脏, 而在野生型对照大鼠的肝脏中却缺少这两种因子的表达, 相比较而言, 在缺血再灌注损伤发生后, COX-2(-/-)大鼠肝脏的 caspase-3 活性和 TUNEL 染色的阳性凋亡细胞却明显减少, 表明 COX-2 缺少可使肝细胞凋亡减少, 从而减少肝脏损伤的发生, 提示 COX-2 促进肝细胞凋亡作用在肝脏缺血再灌注损伤中起到重要作用。COX-2 的表达可能干预野生型大鼠肝脏 Bcl-2 和 Bcl-xL 模式表达, 可能使肝脏更易于凋亡。与此相关的研究表明, COX-2 的催化产物 PGE2 和 PGF2a 能够增加缺血大脑的 caspase-3 活性, 从而促进脑细胞凋亡^[9]。在 Takashi H 等研究发现, 在缺血再灌注损伤中, COX-2 缺陷大鼠肝脏中与野生型大鼠肝脏相比, 其 PGE2 的水平明显降低。

尽管腹部肠管火器伤后肝脏继发性损害过程中 COX-2 诱导肝细胞凋亡的确切机制尚待进一步研究, 但我们可以推测, 沙漠干热环境腹部肠管火器伤后 COX-2 可能通过调控制各种凋亡因子来促进肝细胞凋亡, 从而在继发性肝脏损害过程中起重要作用, 本研究为 COX-2 选择性抑制剂在沙漠干热环境腹部火器伤救治中的应用提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 吕月涛, 刘江伟, 冯德元, 等. 环氧酶-2 与肝损伤[J]. 中国现代普通外科进展, 2007, 10(4): 341-343
Lv Yue-tao, Liu Jiang-wei, Feng De-yuan, et al. Cyclooxygenase-2 and

liver injury[J]. Chinese journal of current advances in general surgery, 2007, 10(4): 341-343(In Chinese)

- [2] 刘江伟, 张永久, 李泽信, 等. 沙漠干热环境下猪腹部肠管火器伤后肝细胞凋亡和肝功能变化 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(11): 1228-1231
Liu Jiang-wei, Zhang Yong-jiu, Li Ze-xin, et al. Changes of hepatocellular apoptosis and hepatic function in pigs with intestinal perforations due to abdominal firearm wound in dry-heat desert environment [J]. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi, 2008, 16(11): 1228-1231
- [3] 刘江伟, 张永久, 李泽信, 等. 常温和干热环境下腹部肠管火器伤动物模型的建立[J]. 创伤外科杂志, 2007, 9(5): 408-410
Liu Jiang-wei, Zhang Yong-jiu, Li Ze-xin, et al. Establishment of porcine models of firearm wound of intestine in normal temperature environment and dry heat environment [J]. Trauma Surg, 2007, 9(5): 408-410
- [4] Keller SA, Paxian M, Lee SM, et al. Kupffer cell ablation attenuates cyclooxygenase-2 expression after trauma and sepsis [J]. J Surg Res, 2005, 124(1): 126-133
- [5] Nanji AA. Role of Kupffer cells in alcoholic hepatitis [J]. Alcohol, 2002, 27(1): 13-15
- [6] Kim SH, Chu HJ, Kang DH, et al. NF-kappa B binding activity and cyclooxygenase-2 expression in persistent CCl₄ (4)-treated rat liver injury[J]. J Korean Med Sci, 2002, 17(2): 193-200
- [7] 张军莉, 刘江伟. 环氧酶-2 与胰腺癌. 临床军医杂志[J]. 2009, 37(2): 312-314
Zhang Jun-li, Liu Jiang-wei. Cyclooxygenase-2 and pancreatic cancer [J]. Clin J Med Offic, 2009, 37(2): 312-314
- [8] 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
- [9] Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(31): 11790-11795