

帕瑞昔布对肝部分切除术老年大鼠海马炎症反应的影响

马兢 王菲菲 彭勉

【摘要】目的 研究帕瑞昔布对肝部分切除术老年大鼠海马炎症反应的影响。**方法** 选择 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 20 月龄, 体重 500~600 g, 随机分为三组: 对照组(C 组, $n=10$), 手术组(S 组, $n=30$) 及帕瑞昔布组(P 组, $n=30$)。采用肝部分切除术建立手术创伤导致海马炎症反应模型。P 组大鼠在异氟醚麻醉下行肝部分切除术, 并于术前 1 h 腹腔注射帕瑞昔布 10 mg/kg, 术后每日腹腔注射帕瑞昔布 2 mg/kg 直至处死。S 组大鼠在异氟醚麻醉下行肝部分切除术, 术前 1 h 腹腔注射与 P 组等量的生理盐水。C 组腹腔注射与以上各组等量的生理盐水。干预后第 1、3、7 天处死大鼠, 取海马组织, 采用实时定量 PCR 法检测环氧合酶-2(COX-2)mRNA 的表达量, Western blot 法检测 COX-2、半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的蛋白表达量, ELISA 法检测前列腺素 E2(PGE2)的含量。**结果** 干预后第 1、3 天 S 组和 P 组 COX-2 mRNA 及蛋白表达、PGE2 含量、caspase-3 蛋白表达明显高于 C 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但 P 组明显低于 S 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。干预后第 7 天三组大鼠 COX-2 mRNA 及蛋白表达、PGE2 含量、caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义。**结论** 肝部分切除术可导致海马炎症反应, 帕瑞昔布可显著抑制此种炎症反应, 其机制可能与下调海马 COX-2 mRNA 和蛋白表达、PGE2 含量和 caspase-3 蛋白表达有关。

【关键词】 帕瑞昔布; COX-2; caspase-3; 海马; 炎症

Effect of parecoxib on hippocampal inflammation following partial hepatectomy in rats MA Jing, WANG Feifei, PENG Mian. Department of Anesthesiology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: PENG Mian, Email: sophie_pm@msn.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of parecoxib on hippocampal inflammation following partial hepatectomy in aged rats. The effects of selective COX-2 inhibitor (parecoxib) on hippocampal inflammation were also evaluated. **Methods** Seventy male rats, aged 20 months, weighing 500-600 g, were randomly divided into three groups: control ($n=10$), surgery ($n=30$), and parecoxib ($n=30$). Control animals received sterile saline to control for the effects of injection stress. Rats in the surgery group received partial hepatectomy under isoflurane anesthesia and sterile saline injection. Rats in the parecoxib group received surgery and anesthesia similar to surgery group rats, and parecoxib treatment. On postanesthetic day 1, 3 and 7, animals were euthanized to assess the hippocampal COX-2 expression, PGE2 production and caspase-3 expression. **Results** Surgery significantly increased the expression of COX-2 mRNA and protein expression, PGE2 production and caspase-3 protein expression on day 1 postoperatively ($P<0.01$), until day 3 ($P<0.05$) compared to control group. Parecoxib treatment group significantly suppressed COX-2 mRNA and protein expression, PGE2 production and caspase-3 protein expression on postoperative day 1 and day 3 ($P<0.05$ or $P<0.01$), in comparison with the surgery group. There was no significant difference between control group and other groups of the expression of COX-2 mRNA and protein expression, PGE2 production and caspase-3 protein expression on day 7. **Conclusion** Partial hepatectomy induces a short-term hippocampal inflammatory response in the rats. Parecoxib suppressed the hippocampal inflammation via the down-regulation of COX-2 mRNA and protein, PGE2 and caspase-3 protein in rats following partial hepatectomy.

【Key words】 Parecoxib; COX-2; caspase-3; Hippocampus; Inflammation

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(30901393)
作者单位: 430071 武汉市, 武汉大学中南医院麻醉科
通信作者: 彭勉, Email: sophie_pm@msn.com

POCD 是老年患者术后常见的中枢神经系统并发症, 多表现为焦虑, 精神错乱, 学习和记忆功能减退。有研究表明, POCD 与中枢炎症反应有关^[2]。而环氧合酶-2(COX-2)抑制剂在一定程度上可抑制

中枢炎症反应^[3]。目前,关于 COX-2 对中枢炎症反应的影响及可能的机制尚不清楚。本研究拟评价帕瑞昔布对肝部分切除术大鼠海马组织中 COX-2、caspase-3 表达及 PGE2 含量的变化,以探讨 COX-2 抑制剂在中枢炎症反应病理生理过程中的作用及可能的机制。

材料与方 法

实验动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只,20 月龄,体重 500~600 g,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供,随机分为三组:对照组(C 组),手术组(S 组)及帕瑞昔布组(P 组)。采用肝部分切除术建立手术创伤导致海马炎症的动物模型。

P 组大鼠在异氟醚麻醉下行肝部分切除术,并于术前 1 h 腹腔注射帕瑞昔布 10 mg/kg,术后每日腹腔注射帕瑞昔布 2 mg/kg 直至处死。S 组大鼠在异氟醚麻醉下行肝部分切除术,术前 1 h 腹腔注射与 P 组等量的生理盐水。C 组腹腔注射与以上各组等量的生理盐水。各组于干预后第 1、3、7 天每个时点各取 10 只大鼠麻醉下断头取脑,在冰盘上分离出海马组织,迅速冻存于-70℃冰箱以备后续检测。

实时定量 PCR 法检测大鼠海马组织中 COX-2 mRNA 的表达量。采用 Western blot 法检测大鼠海马组织中 COX-2、caspase-3 的蛋白表达量。ELISA 法检测大鼠海马组织中 PGE2 的含量。

RT-PCR 法检测大鼠海马 COX-2 mRNA 的表达 提取总 RNA,并在逆转录酶的作用下合成 cDNA;cDNA 保存于-20℃备用。根据 GeneBank 中 大鼠 COX-2 的 cDNA 序列,采用 Primer 软件,设计引物扩增编码基因序列。引物由 Invitrogen 公司合成,内参照采用 β -actin。引物序列如下,COX-2:5'-CCTTGAACACGGACTTGCTC-3'(上游引物),5'-AGGTTTCAGGGAGAAGCGTT-3'(下游引物),181 bp。 β -actin:5'-CGTTGACATCCGTAAGA-CCTC-3'(上游引物),5'-TAGGAGCCAGGGCAG-TAATCT-3'(下游引物),110 bp。PCR 完成以后,在 ABI Prism SDS 2.0 软件上进行自动分析,查看基因扩增的情况,导出相应循环域值(Ct);采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,以 $2^{-\Delta Ct}$ 值作为目的基因 COX-2 的相对表达量。

Western blot 法检测大鼠海马组织中 COX-2、caspase-3 的蛋白表达量 采用考马斯亮蓝法测定待测组织总蛋白浓度。按总体积 25 μ l、终浓度 $5 \times$ RSB、含 50 μ g 蛋白混合样品,不足体积以 $1 \times$ PBS

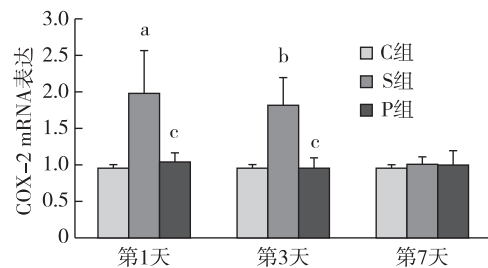
补充,余下步骤按试剂盒说明操作。凝胶成像系统分析每条带的整合密度值,用与内参照 β -actin 的灰度值的比值表示 COX-2、caspase-3 的表达水平。

ELISA 法检测 PGE2 的含量 ELISA 操作步骤均严格按照所购买试剂盒(上海信然生物技术有 限公司)说明书进行。所购买的试剂盒采用双抗体 一步夹心法 ELISA。往预先包被 PGE2 抗体的包 被微孔中,依次加入标本、标准品、标记的检测抗 体,经过温育并彻底洗涤。用底物显色,在过氧化 物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成 最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 PGE2 呈正相 关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),先作出标准曲线,然后再计算出样品浓度。

统计分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学 分析。正态分布的计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较 采用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

干预后第 1、3 天 S 组 COX-2 mRNA 和蛋白表 达明显高于 C 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),并于干预 后第 7 天恢复正常。干预后第 1 天 P 组 COX-2 mRNA 和蛋白表达明显高于 C 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),于干预后第 3 天恢复正常。干预后第 1、3 天 P 组 COX-2 mRNA 和蛋白表达明显低于 S 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图 1,2)。

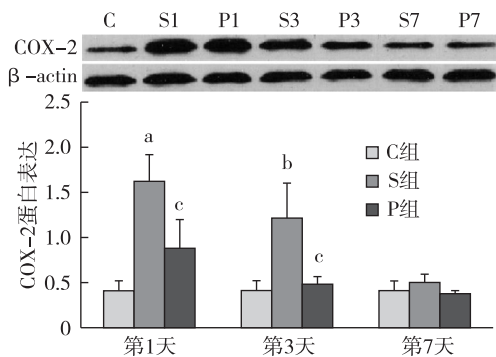


注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 大鼠海马不同时点 COX-2 mRNA 表达的比较

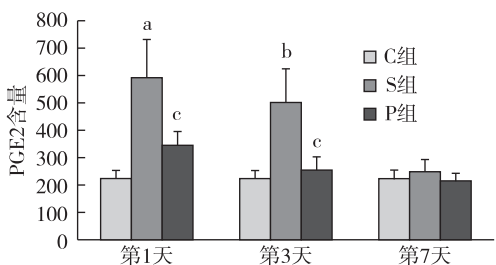
干预后第 1、3 天 S 组和 P 组 PGE2 含量明显高 于 C 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。干预后第 1、3 天 P 组 PGE2 含量明显低于 S 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。干预后第 7 天各组大鼠 PGE2 含量差异无 统计学意义(图 3)。

干预后第 1、3 天 S 组和 P 组 caspase-3 蛋白表 达明显高于 C 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。干预后 第 1、3 天 P 组 caspase-3 蛋白表达明显低于 S 组(P



注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$

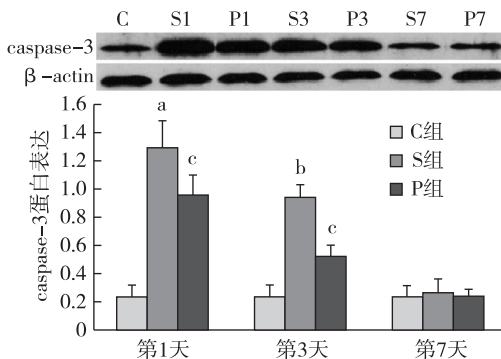
图 2 大鼠海马不同时间点 COX-2 蛋白表达的比较



注:与 C 组比较^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 大鼠海马不同时间点 PGE2 含量的比较

< 0.05 或 $P < 0.01$)。干预后第 7 天各组大鼠 caspase-3 蛋白表达差异无统计学意义(图 4)。



注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 S 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 大鼠海马不同时间点 caspase-3 蛋白表达的比较

讨 论

在动物模型中,IL-1 β 和其上游标记物 TNF- α 可介导海马炎症反应,破坏记忆和学习功能可能与认知功能障碍相关^[2]。

COX 是前列腺素合成的限速酶,也是非甾体抗炎药(NSAIDs)主要的作用靶点。COX-2 是中枢

神经系统炎症反应的重要介质,许多神经系统疾病的病理过程中的炎症及神经元凋亡与中枢 COX-2 表达上调有关^[4]。有证据显示,在各种神经系统疾病,包括脑卒中,老年痴呆症,癫痫等,COX-2 的上调表现得尤为突出^[5]。已证实,在癫痫模型中脑组织诱导型 COX-2 的表达可导致神经细胞的损伤,从而促进癫痫的发生^[6]。据报道,一种具有高度选择性的 COX-2 抑制剂的运用对癫痫有显著的治疗作用^[3]。综上所述,COX-2 不仅是中枢炎症反应的重要标志物之一,且其高表达可促进神经细胞损伤的发生,使用 COX-2 抑制剂对神经细胞损伤有治疗作用。但 COX-2 上调所致神经损伤的机制尚不清楚。据报道,在癫痫模型中神经细胞 COX-2 表达上调,与之相应的带来 PGE2 的含量增多,而 COX-2 抑制剂的运用可以预防海马神经元细胞的迟发型凋亡,而在运用 COX-2 抑制剂的动物实验组别中 PGE2 的浓度明显下降^[7]。因此,可以推测,COX-2 的反应产物 PGE2 可能直接诱导海马神经元细胞的凋亡。caspase 在神经细胞的凋亡中发挥着至关重要的作用。海马组织中 caspase-3 的激活可导致神经元细胞的凋亡^[8]。一项研究发现,PGE2 的含量增多可对海马神经元产生直接毒性作用并伴随着海马组织中 caspase-3 激活^[9,10]。帕瑞昔布是目前临床上广泛应用的特异性 COX-2 抑制剂之一。动物腹腔注射帕瑞昔布后,药物可迅速吸收入血,并能快速通过血脑屏障发挥其药理学作用。本研究采用肝部分切除术建立手术创伤导致海马炎症反应的模型,并观察围术期使用特异性 COX-2 抑制剂帕瑞昔布对海马炎症反应的影响。

肝部分切除术是一种研究海马炎症反应发生机制及病理变化的有效动物模型。近期研究发现,肝部分切除术后急性期(一般为术后 7 d 内)和一定的时间范围内(术后 30 d),动物海马发生与认知功能减退相应的炎症反应。在海马组织中可检测到炎症因子如 TNF- α , IL-1 β 等表达显著上调的炎症表现,并有相应的形态学证据证明海马炎症反应的存在^[11]。

本研究显示,术后第 1、3 天大鼠海马 COX-2 的 mRNA 和蛋白表达,PGE2 含量,caspase-3 的蛋白表达均有不同程度的上调,且药物干预即帕瑞昔布的应用可显著下调 COX-2 在基因水平和蛋白质水平上的表达并通过调控其下游因子从而达到减轻海马炎症反应的作用。随时间推移,各组大鼠海马 COX-2 的 mRNA 和蛋白的表达趋于恢复正常。表

明肝部分切除术后海马 COX-2 mRNA 表达和蛋白表达在没有药物干预的情况下在术后第 1 天达到高峰,于术后第 7 天恢复。而帕瑞昔布干预后于术后第 3 天或者更早的时间恢复。

此外,本研究还显示大鼠海马 COX-2 mRNA 和蛋白表达水平在运用帕瑞昔布干预后于术后第 3 天或者更早的时间恢复,而 PGE2 含量, caspase-3 的蛋白表达则在术后第 3 天并未恢复正常。他们之间存在着一个时间上的延迟,显示 PGE2、caspase-3 可能是 COX-2 的下游因子。

综上所述,肝部分切除术可导致海马炎症反应,帕瑞昔布可显著抑制此种炎症反应,其机制可能与下调海马 COX-2 mRNA 和蛋白表达,降低 PGE2 含量和 caspase-3 蛋白表达有关。

参 考 文 献

- [1] Reksidler AB, Lima MM, Zanata SM, et al. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol*, 2007, 560(2-3): 163-175.
- [2] Zhang Z, Li X, Li F, et al. Berberine alleviates postoperative cognitive dysfunction by suppressing neuroinflammation in aged mice. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 426-433.
- [3] Trandafir CC, Pouliot WA, Dudek FE, et al. Co-administration of subtherapeutic diazepam enhances neuroprotective effect of COX-2 inhibitor, NS-398, after lithium pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience*, 2015, 284: 601-610.
- [4] Cheng O, Li Z, Han Y, et al. Baicalin improved the spatial learning ability of global ischemia/reperfusion rats by reducing hippocampal apoptosis. *Brain Res*, 2012, 1470: 111-118.
- [5] Hsieh HL, Yang CM. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 484613.
- [6] Barbalho PG, Lopes-Cendes I, Maurer-Morelli CV. Indomethacin treatment prior to pentylentetrazole-induced seizures downregulates the expression of il1b and COX-2 and decreases seizure-like behavior in zebrafish larvae. *BMC Neurosci*, 2016, 17: 12.
- [7] Dey A, Kang X, Qiu J, et al. Anti-inflammatory small molecules to treat seizures and epilepsy: from bench to bedside. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(6): 463-484.
- [8] Li J, Zhang G, Meng Z, et al. Neuroprotective effect of acute melatonin treatment on hippocampal neurons against irradiation by inhibition of caspase-3. *Exp Ther Med*, 2016, 11(6): 2385-2390.
- [9] Takadera T, Shiraishi Y, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 induced caspase-dependent apoptosis possibly through activation of EP2 receptors in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int*, 2004, 45(5): 713-719.
- [10] 贾敏, 刘文学, 杨娇娇, 等. 术后认知功能障碍老年小鼠海马内组蛋白乙酰化含量的变化. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(10): 1018-1021.
- [11] Zhang XY, Cao JB, Zhang LM, et al. Deferoxamine attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment in mice. *J Neuroinflamm*, 2015, 12: 20.

(收稿日期:2016-08-02)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》对来稿署名的要求

作者姓名在文题下方按序排列,一般不宜超过 6 位。排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更换,如欲更换第一作者,需出具单位证明和由全体作者签名的申请。作者单位的邮编、所在城市、单位名称的全称和科室在首页脚注中说明。若其他作者不属同一单位,需写出各自单位,并在单位后用括号列出作者的姓名。作者应具备的条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析和解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。以上 3 条均需具备。“通信作者”系指研究生课题论文的导师或直接指导者、相关科研项目课题负责人及该文的主要责任者和联系者。“通信作者”对论文应具有与第一作者同等的权利和义务。