

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.003

文章编号: 1005-8982 (2019) 11-0014-05

帕瑞昔布对缺血再灌注后肺组织血红素加氧酶-1 表达水平及凋亡程度的影响*

吕强, 刘宇, 胡云霞, 李美亭

(四川省医学科学院·四川省人民医院 麻醉科, 四川 成都 610072)

摘要: **目的** 探讨不同剂量帕瑞昔布对大鼠肺缺血再灌注(IR)后肺组织内血红素加氧酶-1(HO-1)表达水平及凋亡程度的影响。**方法** 随机将40只雄性SD大鼠(280~300g)分为5组:对照组(C组)、缺血再灌注组(IR组)、帕瑞昔布低剂量组(L组,2mg/kg)、帕瑞昔布中剂量组(M组,10mg/kg)及帕瑞昔布高剂量组(H组,20mg/kg)。复制单侧肺IR模型,检测肺内丙二醛(MDA)和髓过氧化物酶(MPO)含量、肺组织湿重/干重,观察肺组织病理改变及凋亡情况,检测肺内HO-1表达。**结果** 与C组比较,其他4组肺内MDA和MPO含量、肺组织湿重/干重、肺内凋亡细胞均增加($P < 0.05$),IR组增加最多,L组次之,M组和H组增加最少,且M组和H组差异无统计学意义($P > 0.05$)。肺IR后,IR组肺损伤最严重,不同剂量帕瑞昔布处理后,肺损伤均减轻,M组和H组较L组减轻更明显。C组内HO-1表达低,其余4组均升高($P < 0.05$),其中L组较IR组升高,M组和H组较L组进一步升高,M组和H组差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 帕瑞昔布可减轻肺IR损伤,在一定程度呈剂量依赖性,其机制可能与增加肺组织中HO-1表达有关。

关键词: 再灌注损伤;细胞凋亡;帕瑞昔布;血红色加氧酶-1

中图分类号: R563.9

文献标识码: A

Effect of Parecoxib on heme oxygenase-1 and apoptosis after lung ischemia/reperfusion in rats*

Qiang Lü, Yu Liu, Yun-xia Hu, Mei-ting Li

(Department of Anesthesiology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

Abstract: Objective To explore the effect of different doses of Parecoxib on expression of HO-1 and apoptosis in rat model of lung ischemia-reperfusion (IR). **Methods** Totally 40 male adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: control group (group C), ischemia reperfusion group (group I/R), Parecoxib group (2 mg/kg, group L), parecoxib group (10 mg/kg, group M), and parecoxib group (20 mg/kg, group H). Pulmonary ischemia-reperfusion injury model was established by blocking the left hilum of lungs. The wet/dry weight ratio (W/D), MDA and MPO of lung tissues were measured. Apoptosis, histological morphology of lung tissue as well as the expression of HO-1 in lung were detected. **Results** MDA, MPO, W/D and apoptosis rate were increased significantly in group I/R when compared with those in normal group, which was attenuated by treatment of Parecoxib ($P < 0.05$). There was no significant difference in MDA, MPO, W/D and apoptosis rate between group M and group H ($P > 0.05$). Pulmonary injury was the most severe in group I/R, which was attenuated by different doses of Parecoxib in dose dependent manner. HO-1 was only slightly expressed in group C, while significant upregulation of HO-1 was detected in group I/R ($P < 0.05$) and was further elevated with treatment of Parecoxib. There was no

收稿日期: 2018-11-03

* 基金项目: 四川省卫生厅科研项目 (No: 110233)

statistical significant difference in HO-1 between group M and H ($P > 0.05$) **Conclusions** Parecoxib attenuates lung ischemia-reperfusion injury dose-dependently probably through increased expression of HO-1.

Keywords: reperfusion injury; apoptosis; Parecoxib; heme oxygenase-1

肺缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 时, 中性粒细胞在肺内聚集, 炎症介质释放, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加, 引起细胞和组织损伤, 甚至发生肺衰竭。

血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 表达增加是细胞应激过程中最重要的保护机制之一。研究显示, HO-1 表达增加可减轻肺 IR 损伤及内毒素诱发的急性肺损伤^[1-2]。HO-1 的保护作用与其抗氧化、维持微环境稳定、抗炎症反应和抗凋亡有关^[3]。

帕瑞昔布为特异性环氧合酶-2 (Cyclooxygenase 2, COX-2) 抑制剂。ZHANG 等^[4]在大鼠肝 IR 时发现, 帕瑞昔布预处理可抑制炎症反应及氧化应激而减轻肝脏损伤。抑制 COX-2 也可减轻脑、肾 IR 损伤, 以及骨骼肌 IR 引起的肺损伤^[5-7]。另外, COX-2 特异性抑制剂还可经过 ROS 途径诱导血管平滑肌细胞和巨噬细胞表达 HO-1^[8]。帕瑞昔布能否减轻肺 IR 损伤; 是否与肺组织内 HO-1 表达变化有关还不清楚。本研究用不同剂量帕瑞昔布处理肺 IR, 检测肺内丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和髓过氧化物酶 (Myeloperoxidase, MPO)、肺组织病理改变、凋亡程度及 HO-1 表达情况, 探讨帕瑞昔布对肺 IR 损伤的影响机制, 以及是否与剂量相关。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

40 只无特定病原体 (SPF) 级健康雄性成年 SD 大鼠 (280 ~ 300 g), 购于四川省人民医院实验动物研究所, 动物许可证号: SCXKU1172013-15。MDA 和 MPO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), TUNEL 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (德国 Qiagen 公司), HO-1 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与模型复制 将大鼠随机分为 5 组 (每组 8 只): 对照组 (C 组)、缺血再灌注组 (IR 组)、帕瑞昔布低剂量组 (L 组, 2 mg/kg)、帕瑞昔布中剂量组 (M 组, 10 mg/kg) 及帕瑞昔布高剂量组 (H 组, 20 mg/kg)。C 组仅游离出左侧肺门, 其余各组根据文献 [9], 复制

大鼠单侧肺 IR 模型, IR 组单纯阻断左侧肺门; L 组、M 组和 H 组分别在阻断左侧肺门前 15 min, 经股静脉注射帕瑞昔布 2、10 及 20 mg/kg。实验过程中, 经股静脉给予 C 组和 IR 组大鼠等体积生理盐水。

1.2.2 标本收集 左肺缺血 60 min, 再灌注 120 min 后, 放血处死大鼠, 立即取出左肺, 剪为上、中、下 3 部分。

1.2.3 肺组织湿重 / 干重计算 取出左肺上段组织后, 立即称量湿重, 随后放入 80℃ 烘箱内干燥 48 h, 称量干重, 并计算湿重 / 干重。

1.2.4 MDA 及 MPO 检测 取部分左肺中段组织匀浆, 离心后吸取上清液, 根据试剂盒操作指南分别检测肺内 MDA 和 MPO 含量。

1.2.5 观察肺病理改变 取左肺下段组织, 用 4% 多聚甲醛固定 3 d。然后用石蜡包埋并切片, 厚度 10 μm。经 HE 染色, 并用光学显微镜观察肺泡形态、结构改变及肺间质水肿等变化。

1.2.6 肺组织凋亡细胞检测 根据 TUNEL 凋亡试剂盒说明书操作完成后, 在光学显微镜下随机读取每张切片中的 5 个视野, 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100% 即为凋亡指数 (apoptotic index, AI)。

1.2.7 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肺内 HO-1 mRNA 表达 取左肺中段组织, 用 Trizol 试剂抽提总 RNA, 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA, 以 β-actin 为内参照, 引物序列见表 1。反应条件为: 95℃ 预变性 60 s, 95℃ 变性 15 s, 54℃ 退火 20 s, 70℃ 延伸 40 s, 40 个循环后, 70℃ 延伸 5 min。根据每组 RT-PCR 的 Ct 值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

表 1 HO-1 及 β-actin 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
β-actin	正向: 5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT-3'	111
	反向: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'	
HO-1	正向: 5'-CGACAGCATGTCCCAGGATT-3'	136
	反向: 5'-CATCACCAGCTTAAAGCCTT-3'	

1.2.8 肺内 HO-1 蛋白检测 使用 Western blotting 检测 HO-1 蛋白质含量。经电泳、转膜、封闭后,加入 HO-1 抗体 (1 : 1 000 稀释),置于 4℃ 冰箱 16 h。漂洗后,加入 β -actin 抗体 (1 : 10 000 稀释),室温孵育 1 h。滴加显影液,采集图像。图像用 Image J 软件进行分析,相对定量 HO-1 蛋白表达丰度。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,经正态性检验,计量资料符合正态分布,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐时,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验,方差不齐时采用 Games-Howell 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织湿重 / 干重

各组湿重 / 干重值比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 C 组比较,其余 4 组湿重 / 干重值均升高 ($P < 0.05$),其中 IR 组升高最明显,其次为 L 组,而 M 组和 H 组升高最少 ($P < 0.05$),且 M 组和 H 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 MDA 含量及 MPO 活性

各组 MDA 含量及 MPO 活性比较,差异有统计学

意义 ($P < 0.05$)。与 C 组比较,其余 4 组肺内 MDA 含量升高, MPO 活性增强; IR 组 MDA 含量及 MPO 活性增加最多, L 组次之, M 组和 H 组增加较少。除 M 组和 H 组组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外,其余各组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 肺组织 AI 情况

各组 AI 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。C 组肺组织中仅可见少量凋亡细胞, IR 组凋亡细胞增加, L 组肺组织中凋亡细胞也增加,但较 IR 组减少 ($P < 0.05$), M 组和 H 组凋亡细胞也增加,但较 IR 组和 L 组进一步减少 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 1。

2.4 肺组织病理改变

C 组肺泡结构基本完整; IR 组肺泡破坏严重,肺泡壁增厚明显,伴有大量炎症细胞浸润; L 组肺损伤较 IR 组减轻, M 和 H 组肺损伤较 L 组进一步改善,肺泡较完整,炎症细胞浸润减少。见图 2。

2.5 肺组织 HO-1 表达水平

各组 HO-1 mRNA 和蛋白表达比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。C 组肺组织中 HO-1 mRNA 和蛋白仅有少量表达, IR 组和 L 组较 C 组高 ($P < 0.05$), M 组和 H 组较 L 组进一步增加 ($P < 0.05$)。H 组较 M 组 HO-1 mRNA 表达增加 ($P < 0.05$),但 HO-1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 2 各组湿重 / 干重、MDA、MPO 及 AI 比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	湿重 / 干重	MDA / (nmol/mg)	MPO / (u/g)	AI/%
C 组	4.29 \pm 0.40	1.60 \pm 0.15	1.71 \pm 0.16	2.14 \pm 0.60
IR 组	5.81 \pm 0.63 ¹⁾	3.65 \pm 0.35 ¹⁾	3.55 \pm 0.32 ¹⁾	31.17 \pm 3.58 ¹⁾
L 组	5.41 \pm 0.32 ¹⁾²⁾	3.21 \pm 0.30 ¹⁾²⁾	2.98 \pm 0.25 ¹⁾²⁾	26.89 \pm 3.89 ¹⁾²⁾
M 组	4.93 \pm 0.42 ¹⁾²⁾³⁾	2.39 \pm 0.28 ¹⁾²⁾³⁾	2.45 \pm 0.16 ¹⁾²⁾³⁾	18.16 \pm 3.64 ¹⁾²⁾³⁾
H 组	4.84 \pm 0.29 ¹⁾²⁾³⁾	2.24 \pm 0.23 ¹⁾²⁾³⁾	2.30 \pm 0.25 ¹⁾²⁾³⁾	17.34 \pm 2.76 ¹⁾²⁾³⁾
F 值	14.558	72.471	69.892	63.322
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 IR 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 L 组比较, $P < 0.05$

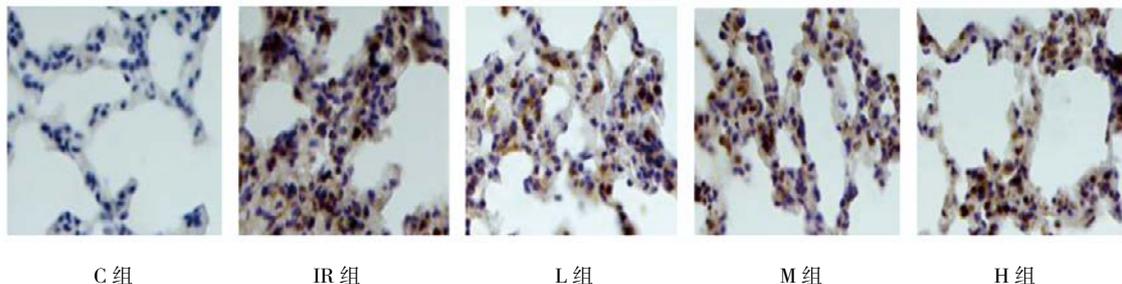


图 1 各组肺组织凋亡细胞 (TUNEL \times 400)

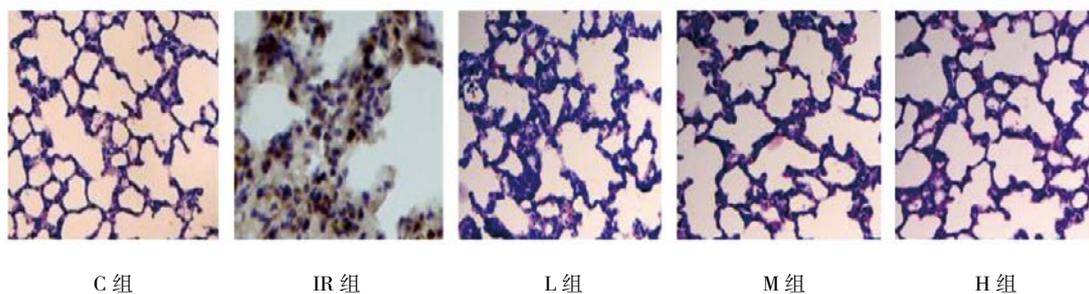


图 2 各组肺组织病理改变 (HE × 200)

表 3 各组肺组织 HO-1 mRNA 和蛋白表达比较

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	HO-1 mRNA	HO-1 蛋白
C 组	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01
IR 组	0.33 ± 0.03 ¹⁾	0.31 ± 0.03 ¹⁾
L 组	0.37 ± 0.03 ¹⁾²⁾	0.38 ± 0.04 ¹⁾²⁾
M 组	0.63 ± 0.03 ¹⁾²⁾³⁾	0.47 ± 0.03 ¹⁾²⁾³⁾
H 组	0.68 ± 0.05 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	0.52 ± 0.04 ¹⁾²⁾³⁾
F 值	380.270	71.731
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 C 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 IR 组比较, $P < 0.05$; 3) 与 L 组比较, $P < 0.05$; 4) 与 M 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

肺 IR 时, 中性粒细胞在肺内聚集、活化, 引起肺组织炎性损伤; 另外, ROS 生成增加, 还可引起肺组织氧化损伤。该因素均可导致肺血管内皮屏障受损, 通透性升高, 因此, 肺 IR 后, 使得大量血浆成分渗出, 容易出现肺间质水肿。肺组织湿重/干重值可以间接反映液体渗出程度。MDA 为脂质过氧化反应的终末产物, 肺 IR 时, 肺组织中 MDA 含量与氧自由基生成呈正相关^[10]。在 IR 肝损伤研究中发现, 选择性 COX-2 抑制剂可降低 MDA、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 等氧化应激产物的生成^[11]。MPO 主要存储于中性粒细胞的嗜天青颗粒内, 因此, 肺组织中 MPO 活性可间接反映肺组织中中性粒细胞浸润程度。

本研究发现, 肺 IR 后, 肺组织湿重/干重值增加; MDA 含量和 MPO 活性均升高。给予帕瑞昔布 2 mg/kg 可降低湿重/干重值, 降低 MDA 含量和 MPO 活性; 给予帕瑞昔布 10 mg/kg, 以上指标降低更多; 给予帕瑞昔布 20 mg/kg, 并未进一步改善, 表明帕瑞昔布可减轻 IR 引起的肺间质水肿, 减少中性粒细胞在肺内聚集, 抑制脂质过氧化反应, 在一定程度上呈剂量依赖性。

本研究结果显示, 不同剂量帕瑞昔布预处理均可减轻 IR 肺损伤, 减少肺组织内细胞凋亡。在 IR 损伤、炎症、应激等情况下, 多种因素促进 COX-2 表达增加, 并在组织损伤过程中发挥作用, 因此, 阻断 COX-2 而具有抗炎特性^[12]。同样, 在肺 IR 时, 肺内 COX-2 表达水平也上升^[13]。在呼吸机诱导的肺损伤时, 帕瑞昔布可减轻局部及全身炎症反应, 降低肺泡上皮通透性、减轻肺间质水肿; 还可减少细胞凋亡^[14]。所以, 帕瑞昔布可能从多个环节减轻 IR 肺损伤。

本研究还发现, 帕瑞昔布增加 IR 肺组织内 HO-1 表达; 随着帕瑞昔布剂量增加, HO-1 mRNA 逐渐增加, 然而帕瑞昔布 10 mg/kg 和帕瑞昔布 20 mg/kg 处理后 HO-1 蛋白并无变化。有研究显示, 使用高浓度特异性 COX-2 抑制剂时, 可能会失去选择性, 而同时抑制 COX-1^[15]。因此, 大剂量帕瑞昔布, 是否会通过 COX-1 途径在转录水平影响 HO-1 表达还需进一步研究。

HO-1 具有抗炎、抗凋亡和抗氧化等特性。肺缺血后处理可通过增加 HO-1 表达, 而减轻肺 IR 损伤^[16]。HO-1 还能增强血管内皮对抗补体介导的损伤而发挥肺保护作用^[17]。另外, HO-1 的肺保护功能可能还与其催化代谢产物一氧化碳和胆绿素有关。大鼠肺缺血损伤时, 一氧化碳既可减少白细胞瘀滞、纤维蛋白聚集、改善气体交换, 提高存活率, 又抑制肺内胞外信号调节激酶 (ERK) 活化、早期反应蛋白-1 表达。因此减少组织因子、Serpine-1、白细胞介素-1 和 TNF- α 表达^[18]。一氧化碳还可诱导抗凋亡蛋白表达, 减少 Caspase-3 活化, 同时激活应激反应转录因子^[19]。胆绿素同样也可以通过抗炎、抗凋亡和抗氧化作用保护缺血再灌注肺损伤^[20]。

COX-2 抑制剂诱导 HO-1 表达可能是通过抑制 COX-2 产生的。但在硝普钠介导的细胞毒性研究中发现, COX-2 抑制剂诱导 HO-1 表达并不依赖于抑制 COX-2^[21]。因此, 帕瑞昔布的具体机制介导缺血再灌

注肺组织内 HO-1 的表达, 还需要进一步研究。

帕瑞昔布可减轻大鼠肺 IR 后肺组织水肿程度, 抑制脂质过氧化; 减轻 IR 肺损伤, 减少肺组织内细胞凋亡, 上述效应在一定程度上呈剂量依赖性, 并且可能与帕瑞昔布增加 IR 肺组织中 HO-1 表达有关。

参 考 文 献:

- [1] SUN Q, WU Y, ZHAO F, et al. Maresin 1 ameliorates lung ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress via activation of the Nrf-2-mediated HO-1 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 9634803.
- [2] WU D, WANG Y, ZHANG H, et al. Acacetin attenuates mice endotoxin-induced acute lung injury via augmentation of heme oxygenase-1 activity[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(2): 635-643.
- [3] RAVAL C M. Heme oxygenase-1 in lung disease[J]. *Current Drug Targets*, 2010, 11(12): 1532-1540.
- [4] ZHANG T, MA Y, XU K Q, et al. Pretreatment of parecoxib attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *BMC Anesthesiol*, 2015, 15(1): 165.
- [5] WANG L, SHAN, YE Y, et al. COX-2 inhibition attenuates lung injury induced by skeletal muscle ischemia reperfusion in rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 116-122.
- [6] SULEYMAN B, ALBAYRAK A, KURT N, et al. The effect of etoricoxib on kidney ischemia-reperfusion injury in rats: a biochemical and immunohistochemical assessment[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 179-185.
- [7] WANG N, GUO Q L, YE Z, et al. Preconditioning of intravenous parecoxib attenuates focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(13): 2004-2008.
- [8] WANG J S, HO F M, KANG H C, et al. Celecoxib induces heme oxygenase-1 expression in macrophages and vascular smooth muscle cells via ROS-dependent signaling pathway[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2011, 383(2): 159-168.
- [9] ZHAO Q F, WU J, LIN Z Y, et al. Resolvin D1 alleviates the lung ischemia reperfusion injury via complement, immunoglobulin, TLR4, and inflammatory factors in rats[J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1319-1333.
- [10] FU Z, LIU X, GENG B, et al. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury[J]. *Life Sciences*, 2008, 82(23/24): 1196-1202.
- [11] ABDEL-GABER S A, IBRAHIM M A, AMIN E F, et al. Effect of selective versus non-selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia-reperfusion-induced hepatic injury in rats[J]. *Life Sci*, 2015, 134: 42-48.
- [12] TOLBA R H, FET N, YONEZAWA K, et al. Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver[J]. *Eur Surg Res*, 2014, 53(1/2/3/4): 11-24.
- [13] DOLKART O, E A, S S, et al. Temporal determination of lung NO system and COX-2 upregulation following ischemia-reperfusion injury[J]. *Exp Lung Res*, 2014, 40(1): 22-29.
- [14] MENG F Y, GAO W, JU Y N. Parecoxib reduced ventilation induced lung injury in acute respiratory distress syndrome[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2017, 18(1): 25.
- [15] HAMDULAY S S, WANG B, BIRDSEY G M, et al. Celecoxib activates PI-3K/Akt and mitochondrial redox signaling to enhance heme oxygenase-1-mediated anti-inflammatory activity in vascular endothelium[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(8): 1013-1023.
- [16] XIA Z Y, GAO J, ANCHARAZ A K, et al. Ischaemic post-conditioning protects lung from ischaemia-reperfusion injury by up-regulation of haeme oxygenase-1[J]. *Injury*, 2010, 41(5): 510-516.
- [17] KINDERLERER A R, POMBO-GREGOIRE I, HAMDULAY S S, et al. Heme oxygenase-1 expression enhances vascular endothelial resistance to complement-mediated injury through induction of decay-accelerating factor: a role for increased bilirubin and ferritin[J]. *Blood*, 2009, 113(7): 1598-1607.
- [18] MISHRA S, FUJITA T, LAMA V N, et al. Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(13): 5191-5196.
- [19] STEIN A B, BOLLI R, DAWN B, et al. Carbon monoxide induces a late preconditioning-mimetic cardioprotective and antiapoptotic milieu in the myocardium[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1): 228-236.
- [20] TIAN W F, WENG P, SHENG Q, et al. Biliverdin protects the isolated rat lungs from ischemia-reperfusion injury via antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(7): 859-865.
- [21] NIZAMUTDINOVA I T, LEE J H, SEO H G, et al. NS398 protects cells from sodium nitroprusside-mediated cytotoxicity through enhancing HO-1 induction independent of COX-2 inhibition[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(1): 99-107.

(王荣兵 编辑)