

热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜COX-2的表达

陶梅, 张沥, 张玲霞, 江梅, 曹广周

陶梅, 西安交通大学医学院 陕西省西安市 710061
张沥, 张玲霞, 江梅, 曹广周, 西安市中心医院消化科 陕西省西安市 710003
陶梅, 女, 1970-11-15 生, 陕西省安康市人, 汉族, 1995 年西安交通大学医学院临床医学系学士, 2001 级西安交通大学硕士生。
项目负责人: 张沥, 710003, 陕西省西安市中心医院消化科。
电话: 029-7218916-3061
收稿日期: 2004-03-23 接受日期: 2004-04-16

Expression of COX-2 in gastric mucosa of atrophic gastritis caused by hot high-salt water in rats

Mei Tao, Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao

Mei Tao, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Li Zhang, Ling-Xia Zhang, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao, Department of Gastroenterology, Xian Central Hospital, Xi'an 710003, Shannxi Province, China
Correspondence to: Li Zhang, Department of Gastroenterology, Xian Central Hospital, Xian 710003, Shannxi Province, China. wu-taomei@163.com
Received: 2004-03-23 Accepted: 2004-04-16

Abstract

AIM: To measure the expression of COX-2 in gastric mucosa of chronic atrophic gastritis (CAG) caused by hot high-salt water in rats and to study the pathogenesis of atrophic gastritis caused by hot high-salt diet.

METHODS: The atrophic gastritis rat model was made by hot high-salt water ig perfusion. The expression of COX-2 in gastric mucosa in 4, 8, 12, and 32 wks was detected by immunohistochemical method and the PEG2 levels were tested by ELISA.

RESULTS: All the model group rats formed CAG at the end of 12 weeks with the following pathological changes of CAG under microscope, such as thin mucosa layer, thick muscle layer, decreased glands, and infiltration of inflammatory cells. With the time prolonging, the atrophy of gastric mucosa became more seriously. There was little or no expression of COX-2 in gastric mucosa in normal control group. While in hot high-salt water perfusion group, there was a little expression from the 8th week, and over expression in 12th week. There was a significant difference between the two groups ($4.5 \pm 2.1\%$, vs $14.7 \pm 5.7\%$, $P < 0.05$). The expression of COX-2 increased with the time and it reached the peak value in the 32th week. The PEG2 levels in hot high-salt water perfusion group increased in the 12th week. There was a significant difference between the two groups (125.6 ± 21.2 ng/g vs 188.4 ± 37.6 ng/g, $P < 0.05$), and it reached the peak value in the 32th week.

CONCLUSION: COX-2 plays an important role in the formation of atrophic gastritis and and alteration of diet habitation may help prevent the formation of atrophic gas-

tritis and gastric cancer.

Tao M, Zhang L, Zhang LX, Jiang M, Cao GZ. Expression of COX-2 in gastric mucosa of atrophic gastritis caused by hot high-salt water in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(7):1608-1611

摘要

目的: 检测热盐水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎(CAG)胃黏膜组织COX-2的表达情况, 探讨长期热咸饮食造成萎缩性胃炎的机制。

方法: 用热盐水灌胃建立大鼠萎缩性胃炎动物模型, 用免疫组化方法检测各实验组4, 8, 12, 32 wk胃黏膜组织COX-2的表达情况, 用ELISA方法检测胃黏膜组织PGE2的含量。

结果: 灌胃至12 wk时出现胃黏膜层变薄, 固有层腺体减少, 固有层纤维结缔组织增生, 黏膜肌层明显增生, 慢性炎症细胞浸润等萎缩性胃炎表现。随着热盐水灌胃时间的延长, 32 wk胃黏膜萎缩程度明显加重。正常对照组大鼠胃黏膜组织细胞COX-2蛋白不表达或仅有微量表达; 实验组8 wk开始有少量表达, 12 wk胃黏膜出现萎缩时, COX-2表达明显增加, 与正常组相比具有显著差异($4.5 \pm 2.1\%$ vs $14.7 \pm 5.7\%$, $P < 0.05$)。后随着灌胃时间的延长, COX-2的表达持续性上升, 32 wk达高峰。实验组12 wk PGE2水平升高, 与正常组相比有显著差异(125.6 ± 21.2 ng/g vs 188.4 ± 37.6 ng/g, $P < 0.05$), 32 wk升至最高。

结论: 在热盐水引起的大鼠萎缩性胃炎的形成和发展过程, COX-2扮演了重要角色, 提示热咸饮食可导致萎缩性胃炎的发生, 而改变喜食高盐热烫的饮食习惯将有助于预防萎缩性胃炎及胃癌的发生。

陶梅, 张沥, 张玲霞, 江梅, 曹广周. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜COX-2的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12(7):1608-1611
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1608.asp>

0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是合成前列腺素(PGs)的关键酶。COX有两种, COX-1是结构酶, 其产生的前列腺素与胃肠黏膜的完整性相关。COX-2是诱导型酶, 参与炎症等病理反应过程^[1-2]。最近许多研究表明, COX-2的表达和胃肠道肿瘤发生相关^[3-12]。慢性萎缩性胃炎属癌前状态, 他是胃癌发生的重要环节。为此, 我们对热盐水所致的大鼠萎缩性胃炎胃黏膜COX-2表达进

行动态观察,探讨热咸饮食对胃黏膜COX-2表达的影响及其与萎缩性胃炎形成的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 健康、性成熟7周龄SD大鼠56只,体重170-200 g,由第四军医大学动物实验中心提供;SP即用型试剂盒、生物素化的二抗由北京中山公司提供;COX-2一抗、PGE2 ELISA试剂盒由R & D公司提供;吡哆美辛购自Sigma公司;其余化学试剂均购自第四军医大学;全自动酶联免疫分析仪由Tecan公司提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠萎缩性胃炎动物模型的制作 SD大鼠56只,采用架式笼养,恒温 24 ± 1 ,湿度50-60%。按随机化原则分为2组,正常对照组24只,25 蒸馏水2.5 mL灌胃,1次/d;实验组32只,55 150 g/L盐水2.5 mL灌胃,1次/d进行造模^[13],制模过程中每隔4 wk,处死对照组和模型组大鼠各4只,观察胃黏膜动态变化。制模成功后,处死模型组和对照组各一半大鼠,其余继续按上述方法喂养至32 wk处死。用10 g/L的戊巴比妥钠5 mL/kg腹腔注射麻醉动物,取出鼠胃,沿大弯剪开胃腔,生理盐水冲净,然后沿小弯侧全层切取一段长1 cm宽0.5 cm的胃窦及部分胃体组织,置于40 g/L中性甲醛溶液中固定24 h,石蜡包埋,HE染色,进行病理组织学观察。参照1994年美国休斯顿胃炎诊断分类标准及井冈山会议胃炎诊断分类标准对胃窦、胃体黏膜组织学各项指标进行评定,组织切片由专人采取盲法阅片。部分切片作免疫组化检测,并留取新鲜标本置液氮中保存,待测PGE2。

1.2.2 COX-2蛋白的免疫组织化学检测 采用SP即用

型试剂盒,一抗工作浓度1 300。切片常规脱蜡至水,在pH6.0的枸橼酸缓冲液中热修复抗原10 min,自然冷却,30 mL/L H₂O₂封闭30 min,正常山羊血清37 封闭30 min,滴加一抗4 过夜,次日滴加生物素化羊抗兔IgG,37 ,30 min,滴加SABC复合物,37 ,30 min,DAB显色。以上各步骤除血清孵育后甩干血清直接加一抗外,均以PBS洗涤3次,5 min/次。显微镜观察显色满意后自来水冲洗5 min,苏木精复染,脱水透明封片。实验中以PBS代替一抗作为阴性对照,以人结肠癌细胞COX-2为阳性对照。高倍镜下选取5个有代表性的视野(阳性细胞较多)计数,胞质出现棕黄色颗粒为COX-2阳性细胞,每个视野观察100个细胞,计算阳性细胞的平均表达率。即阳性细胞占总细胞的百分比,未被染色或阳性细胞数<5%的视野视为阴性。

1.2.3 胃黏膜组织PGE2检测 胃黏膜组织置于含有28 mmol/L吡哆美辛(防止试验过程中新生成前列腺素)的Krebs液中,匀浆、离心,取上清,PGE2测定ELISA试剂盒,根据试剂盒提供的标准步骤测定,由ELISA自动读数仪测定及计算,结果以黏膜蛋白中ng/g PGE2表示。

统计学处理 采用t检验,用SPSS统计软件分析。

2 结果

2.1 大鼠萎缩性胃炎模型的建立 灌胃至12 wk时出现胃黏膜层变薄,固有层腺体减少,固有层纤维结缔组织增生,黏膜肌层明显增生,慢性炎细胞浸润等萎缩性胃炎表现,随着热盐水灌胃时间的延长,32 wk胃黏膜萎缩程度明显加重(图1)。

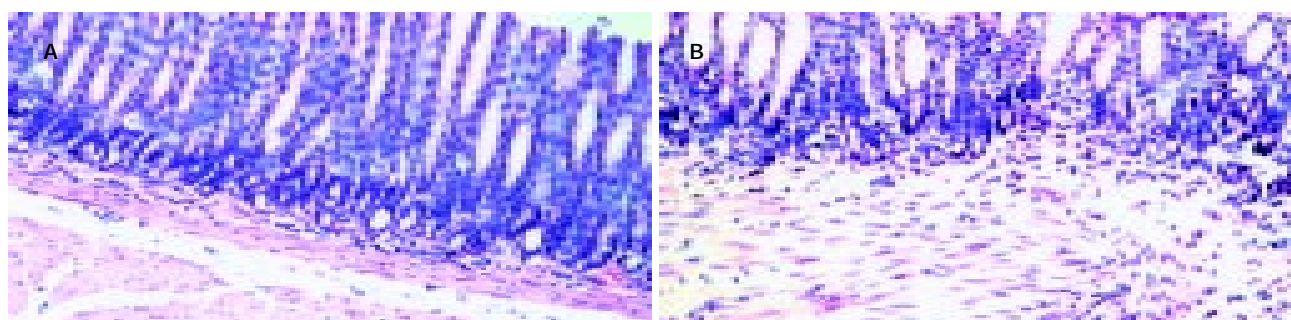


图1 萎缩性胃炎大鼠胃黏膜HE × 200。A: 正常大鼠胃黏膜; B: 实验组12 wk。

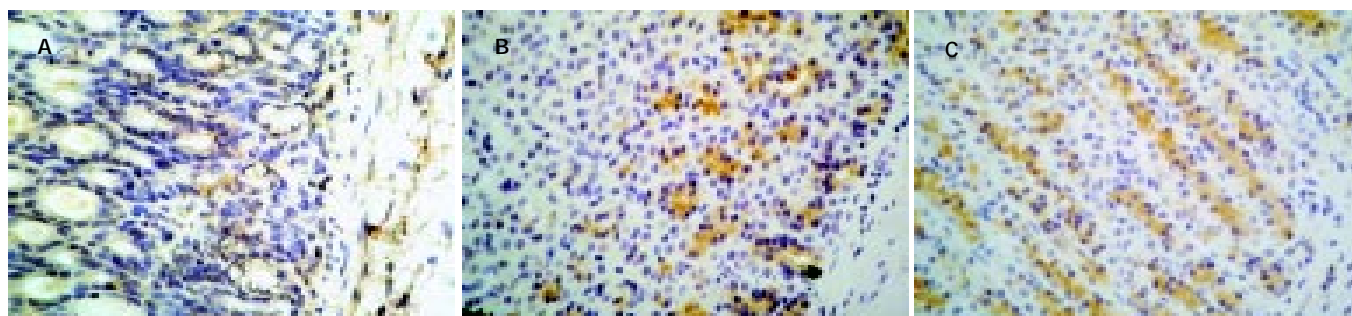


图2 大鼠胃黏膜COX-2蛋白表达SP × 400。A: 正常对照组; B: 实验组12 wk; C: 实验组32 wk。

表1 大鼠胃黏膜 COX-2 的表达和 PGE2 的水平(mean±SD)

指标	分组	4 wk	8 wk	12 wk	32 wk
COX-2	正常对照	4.2 ± 2.6	3.8 ± 2.9	4.5 ± 2.1	5.7 ± 3.7
(%)	实验	5.6 ± 2.3	8.6 ± 4.2	14.7 ± 5.7 ^a	27.6 ± 8.2 ^{bc}
PGE2	正常对照	113.5 ± 11.5	137.1 ± 20.4	125.6 ± 21.2	141.0 ± 33.2
(ng/g)	实验	140.3 ± 20.8	168.1 ± 35.2	188.4 ± 37.6 ^a	266.2 ± 47.5 ^{bc}

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 正常对照组; ^cP < 0.05, vs 12 wk 实验组。

2.2 COX-2 免疫组织化学检测结果 COX-2 蛋白阳性反应物为棕黄色, 主要位于胞质。正常对照组大鼠各周胃黏膜组织细胞 COX-2 蛋白不表达或仅有微量表达, 实验组大鼠在 8 wk 开始有少量表达, 12 wk 胃黏膜出现萎缩时, COX-2 表达明显增加, 主要位于固有层腺体, 胞质出现棕黄色颗粒, 弥漫性分布, 与正常组相比具有显著差异。后随着灌胃时间的延长, COX-2 的表达持续性上升, 32 wk 达高峰(表 1, 图 2)。

2.3 胃黏膜组织 PGE2 检测结果 实验组 12 wk PGE2 水平升高, 与正常对照组相比有显著差异, 32 wk 升至最高, 与 12 wk 相比差异也有显著性(表 1)。

3 讨论

研究表明, 正常胃黏膜无 COX-2 表达, 而肠化生、不典型增生和腺瘤样上皮组织中 COX-2 的表达明显增高, 提示 COX-2 的过表达可能是胃癌的早期事件^[14-15]。本结果表明, 热盐水刺激形成萎缩性胃炎过程中, 胃黏膜中 COX-2 的表达逐渐增强, 并且随萎缩程度加重, COX-2 的表达呈持续性上升, PGE2 的水平也同时升高, 提示在萎缩性胃炎这一胃癌前状态发生过程中, COX-2 呈现了过度表达。COX-2 的过表达诱发肿瘤发生的机制尚不清楚。动物实验发现 COX-2 的表达增加了 PGE2 的合成^[16], 这与本结果一致。PGE2 可诱导细胞增生并刺激 bcl-2 蛋白表达, 后者抑制细胞凋亡, 使细胞增生和细胞凋亡失衡而促进肿瘤发生^[16-17]。张玲霞 et al^[18]研究发现, 在热盐水灌胃引起大鼠萎缩性胃炎过程中, 细胞增生指数和凋亡指数均明显升高, 其调控基因 Bcl-2 和 Fas 也呈现高表达。因此, 热盐水可能通过诱导 COX-2 的高表达而改变细胞某些增生和凋亡基因的表达, 使细胞增生和细胞凋亡失衡, 从而促进胃黏膜上皮细胞的恶性转化。COX-2 的高表达还可通过抑制 NK, LAK, TCL 细胞活性, 使免疫监视功能下降, 导致肿瘤发生。另外, COX-2 有过氧化酶活性, 可使致癌剂发生氧化反应, 从而导致致癌剂激活。

慢性萎缩性胃炎是胃癌前状态, 与胃癌的发生密切相关^[19-34]。流行病学调查显示, 长期高盐饮食可导致萎缩性胃炎, 甚至胃癌的发生^[35]。动物实验也证实长期过热饮食可引起大鼠胃黏膜萎缩^[36]。最近的调查显示, 高盐和热烫饮食是上海市居民胃癌的危险因子^[37]。本结果提示, 热咸饮食在短期内可导致大鼠萎缩性胃炎的发

生, COX-2 呈现了过度表达现象, 同时伴有 PGE2 升高。本研究结果提示, 在萎缩性胃炎这一胃癌前状态发生发展过程中, COX-2 发挥着极其重要的作用, 这为胃癌前状态和胃癌的预防提供了新的思路, 也同时提示改变喜食热烫高盐的饮食习惯有助于预防萎缩性胃炎和胃癌的发生。

4 参考文献

- 1 姚红兵, 吴爱国, 朱卉娟. 环氧化酶-2 与结直肠癌. 世界华人消化杂志 2003;11:1447-1450
- 2 Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;107:1491-1495
- 3 Patrono C, Patrignani P, Garcia Rodrigues LA. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest* 2001; 108:7-13
- 4 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001;76:26-30
- 5 Oshima M, Taketo MM. COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des* 2002;8:1021-1034
- 6 Han SL, Tang HJ, Hua YW, Ji SQ, Lin DX. Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. *Dig Surg* 2003;20:107-114
- 7 Ohno R, Yoshinaga K, Fujita T, Hasegawa K, Iseki H, Tsunozaki H, Ichikawa W, Nihei Z, Sugihara K. Depth of invasion parallels increased cyclooxygenase-2 levels in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 2001;91:1876-1881
- 8 Tsunozaki H, Yoshinaga K, Kumagai J, Sugihara K. Cyclooxygenase-2 overexpression in colorectal cancer is associated with non-poly-poid growth. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:167-171
- 9 Hasegawa K, Ichikawa W, Fujita T, Ohno R, Okusa T, Yoshinaga K, Sugihara K. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA in human colorectal adenomas. *Eur J Cancer* 2001;37:1469-1474
- 10 Chapple KS, Scott N, Guillou PJ, Coletta PL, Hull MA. Interstitial cell cyclooxygenase-2 expression is associated with increased angiogenesis in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol* 2002;198:435-441
- 11 Weaver SA, Russo MP, Wright KL, Kolios G, Jobin C, Robertson DA, Ward SG. Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001;120:1117-1127
- 12 Buttar NS, Wang KK, Leontovich O, Westcott JY, Pacifico RJ, Anderson MA, Krishnadath KK, Lutzke LS, Burgart LJ. Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by COX-2 inhibitors in an animal model of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002;122:1101-1112
- 13 张沛, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 江梅, 张宁霞, 贾长河. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2002;10: 571-574
- 14 宋家锋, 严荣华, 陈振依, 洪瑞香. 环氧化酶-2 表达与幽门螺杆菌相关性胃十二指肠疾病的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003; 12:556-559
- 15 陆红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧化酶-2 表达的影响. 中华消化杂志 2001;21:287-289

- 16 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 17 Xu XC. COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development. *Anticancer Drugs* 2002;13:127-137
- 18 张玲霞, 张沥, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞凋亡及其调控基因蛋白表达影响的实验研究. *陕西医学杂志* 2003;32:210-212
- 19 Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, Kato M, Takeda H, Graham DY. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in Japan: results of a large multicenter study. *Helicobacter* 2001;6:294-299
- 20 El-Zimaity HM, Ota H, Graham DY, Akamatsu T, Katsuyama T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer* 2002;94:1428-1436
- 21 汪波, 石灵春, 张维彬, 肖楚梅, 吴继锋, 董聿明. 胃癌及癌前病变中抑癌基因 p16 表达的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:39-42
- 22 程时丹, 吴云林, 章永平, 乔敏敏, 郭强苏. 胃癌多药耐药细胞药物积累的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:131-134
- 23 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶 C 在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:302-307
- 24 俞丽芬, 吴云林, 章永平. 鸦胆子油乳剂对人胃腺癌长春新碱耐药细胞株 MKN28/VCR 的逆转作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:376-378
- 25 钟慧闽, 宋健, 姚萍, 尹成才. 幽门螺杆菌阳性胃癌 P53 和 Fas 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:456-457
- 26 姚希贤, 尹雷, 张杰英, 白文元, 李英敏, 孙中成. 胃癌及癌前病变 hTERT 的表达与细胞免疫功能. *世界华人消化杂志* 2001;9:508-512
- 27 孔祥东, 张思仲, 胡建坤, 肖翠英, 孙岩, 夏庆杰. 原发胃癌中 p15 基因及蛋白表达的异常. *世界华人消化杂志* 2001;9:513-516
- 28 任娟, 董蕾, 潘伯荣, 徐仓宝, 李明众. 人胃癌细胞与血管内皮细胞间的相互作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:1254-1260
- 29 罗奋, 孙建龙, 任大明, 蔡端, 沈敏. 温热对人胃癌细胞株端粒酶活性及其相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:1261-1264
- 30 冯润华, 李建芳, 刘炳亚, 朱正纲, 尹浩然. 人胃癌细胞端粒酶 RNA 组分 hTR 基因片段的克隆及其正反义真核表达载体的构建. *世界华人消化杂志* 2001;9:1409-1414
- 31 万顺梅, 孙少华, 邓明德, 葛勤利, 杨玉捷. 胃癌组织中转化生长因子和血小板源生长因子表达的意义. *世界华人消化杂志* 2002;10:36-39
- 32 王消冰, 王绪, 张南征. 奥曲肽抑制人胃癌细胞株 MKN45 的生长. *世界华人消化杂志* 2002;10:40-42
- 33 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. hTERT 反义基因对胃癌细胞端粒酶及凋亡相关基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:149-152
- 34 郑志红, 孙秀菊, 邱广蓉, 刘言厚, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前和发展阶段中 E-cadherin 基因的突变. *世界华人消化杂志* 2002;10:153-156
- 35 Fox JG, Dangler CA, Taylor NS, King A, Koh TJ, Wang TC. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999;59:4823-4828
- 36 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 张宁霞, 江梅, 贾长河. 热水致萎缩性胃炎形成的实验. *第四军医大学学报* 2003;24:1355-1355
- 37 鲍萍萍, 高立峰, 刘大可, 陶梦华, 金凡. 上海市居民饮食与胃癌关系的病例对照研究. *中国肿瘤* 2003;12:66-70

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高, 质量较高的论文逐年增加, 来自名牌大学、研究院所, 特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《World Journal of Gastroenterology, WJG》共收到论文 618 篇, 其中国内论文 501 篇(81.06%), 国际论文 117 篇(18.93%). WJG 2003 年 1-10 期共发表论文 521 篇, 其中文献综述 21 篇, 食管癌 27 篇, 胃癌 54 篇, 肝癌 65 篇, 大肠癌 39 篇, 病毒性肝炎 46 篇, 幽门螺杆菌 20 篇, 基础研究 115 篇, 临床研究 62 篇, 研究快报 62 篇, 病例报告 8 篇, 读者来信 2 篇. 发表国内论文 450 篇(86.37%), 发表国际论文 71 篇(13.62%). 作者共 2949 人, 国际作者占 14.41%, 国内作者占 85.90%. 发表论文分布 34 个国家和地区, 包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文 292 篇(56.04%), 各项目基金论文共 440 篇(84.45%), 其中国际基金论文 25 篇(4.79%), 国家 973、863、国家自然科学基金资助论文 180 篇(34.54%), 部、省级基金资助论文 235 篇(45.10%). WJG 2002 年共发表论文 226 篇, 分布为 26 个地区, 国内论文占 93.36%, 国际论文占 6.63%, 基金论文占 60.61%. WJG 2001 年共发表论文 173 篇, 分布 20 个地区, 112 个机构, 国际论文占 35%, 基金论文占 55%. WJG 2000 年共发表论文 205 篇, 基金论文占 50%. WJG 1999 年共发表论文 144 篇, 分布 20 个地区, 100 个机构, 国际论文占 23%, 基金论文占 50%. WJG 1998 年共发表论文 183 篇, 11 个地区分布, 国际论文占 9.84%, 基金论文占 59.56%.