

甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体 COX-2、PGE₂、EP₂ 受体及小胶质细胞表达的研究*

张 岩¹ 周志全^{1,2} 刘晓昂¹ 李艳明¹ 赵永和¹ 王尚文¹ 李 桢^{1△} 曾晓锋^{1△}

(1 昆明医学院法医学院 云南 昆明 650500 2 杭州市公安局 浙江 杭州 310002)

摘要 目的 通过研究 COX-2、PGE₂、EP₂ 受体及小胶质细胞在甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体内的表达变化探讨甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体中 COX-2/PGE₂ 系统与小胶质细胞活化之间的关系。方法 将 40 只健康成年雄性 SD 大鼠 随机分成对照组 10 只和实验组 30 只(实验组分成三个亚组 分为末次给药后 1 天组、2 天组和 3 天组 $n=10$)。实验组给予 10mg/kg 的 MA 腹腔注射 对照组给予同样剂量的生理盐水 每天注射两次 注射时间为 8:00、20:00 连续注射 4 天。分别于末次给药后的第 1 天、第 2 天、第 3 天处杀。用免疫组化技术对中毒大鼠纹状体(CPU)中 COX-2、EP₂ 受体及 Iba1(钙离子接头蛋白 小胶质细胞内一种特异性标记物)的表达进行检测 并进行图像分析。另外 取大鼠的纹状体运用酶联免疫法检测 PGE₂ 的含量。结果 COX-2、PGE₂、EP₂ 受体及小胶质细胞在各组均有表达。与对照组相比 实验组中 COX-2、PGE₂、EP₂ 受体的 1 天组表达均不同程度下降; 2 天组中 COX-2 表达水平大幅度上升 PGE₂、EP₂ 受体表达仍低于正常水平 3 天组 COX-2 表达水平继续升高 而 PGE₂、EP₂ 受体表达趋于正常组水平。而小胶质细胞表达水平则是三个实验组均高于正常组 且 3 天组高于 2 天组 2 天组高于 1 天组。对照组与实验组有显著性差异($P<0.05$)。结论 COX-2/PGE₂ 系统与甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体内小胶质细胞活化无明显相关性 COX-2 与甲基苯丙胺的神经毒性有关。

关键词 甲基苯丙胺 环氧合酶 2 前列腺素 E₂ EP₂ 受体 小胶质细胞活化

中图分类号 Q95-3 R971 R994.39 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)17-3212-04

The Expression of COX-2, PGE₂, EP₂ Receptor and Microglia in Rats' Striatum of Methamphetamine Intoxication*

ZHANG Yan¹, ZHOU Zhi-quan^{1,2}, LIU Xiao-ang¹, LI Yan-ming¹, ZHAO Yong-he¹, WANG Shang-wen¹, LI Zhen^{1△}, ZENG Xiao-feng^{1△}

(1 School of Forensic Medicine, Kunming Medical College, Kunming 650500, China

2 Public Security Bureau of Hangzhou, Zhejiang Hangzhou 310002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship of COX-2/PGE₂ system and the microglia activation in the methamphetamine intoxication rats by investigating the expression of COX-2, PGE₂, EP₂ receptor and microglia in rats' striatum of methamphetamine intoxication. **Methods:** 40 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group($n=10$) and experimental group (dividing it into the first, second and third group after the last injection, $n=10$). Rats in the experimental group were intraperitoneal injected with methamphetamine hydrochloride (10mg/kg), while those in the control group were injected with saline with the same volume (twice a day at 8:00 and 20:00 respectively for 4 continuous days). Then the protein expression of COX-2, EP₂ receptor and Iba1 of intoxication rats in striatum was detected by immunohistochemistry technique and the test results were analyzed by image; PGE₂ was examined by ELISA. **Results:** There was the expression of COX-2, PGE₂, EP₂ receptor and microglia in each group. The expression of COX-2, PGE₂ and EP₂ receptor reduced by varying degree at the first day compared with that in the control group. The expression of COX-2 began to rise and the expression of PGE₂ and EP₂ receptor still stay a low level at the second day. At the third day, the expression of COX-2 was higher than that in the control group and the expression of PGE₂ and EP₂ receptor became close to the control group. The expression of microglia was higher than that in the control group in the 3 experimental group, and the 3d group was higher than the 2d group, the 2d group was higher than the 1d group. **Conclusion:** There was no relationship between the COX-2/PGE₂ system and the microglia activation; There was a close relationship between COX-2 and MA neurotoxicity.

Key words: Methamphetamine; COX-2; PGE₂; EP₂ receptor; Microglia activation

Chinese Library Classification: Q95-3, R971, R994.39 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)17-3212-04

* 基金项目 国家自然科学基金项目(NO30660202) 教育部春晖项目(NOZ2006-1-65003) 云南省科技厅项目(NO2006GH22);

昆明医学院研究生创新基金(NO2009J01) 2010 年昆明医学院大学生创新性实验计划项目。

作者简介 张岩(1983-) 男 硕士研究生 研究方向 毒品滥用的研究。E-mail:zy7240@qq.com

△通讯作者 李桢(1959-) 女 E-mail:lizhenlaura@126.com; 曾晓锋(1977-) 男 E-mail:zxf2004033@163.com

张岩 周志全 同为第一作者 对本文皆有同等贡献。

(收稿日期 2011-03-25 接受日期 2011-04-18)

前言

甲基苯丙胺(Methamphetamine, MA)属苯丙胺类兴奋剂。长期滥用甲基苯丙胺可以引起中枢神经系统神经化学、神经病理和行为的改变。David M 通过基因分析提出 COX-2 参与了甲基苯丙胺的神经毒性作用^[1]。Hastings TG^[2]、Zhang X 等^[3]也认为 COX-2 参与了甲基苯丙胺的神经毒性机制。高俊鹏等指出,在帕金森疾病(PD)时,COX-2 的催化产物 PGE₂ 释放到细胞外间隙后,可通过 EP₂ 受体激活小胶质细胞^[4]。乔东访等报道 MA 能刺激纹状体小胶质细胞的明显激活^[5]。但是国内外文献对于甲基苯丙胺中毒机制中 COX-2/PGE₂ 系统是否参与小胶质细胞活化均未阐述,故本文针对 COX-2/PGE₂ 系统在其中的具体作用机制做进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物、给药方法及分组

健康成年 SD 雄性大鼠 40 只,体重 180±10g,由昆明医学院实验动物中心提供。随机分成对照组 10 只和实验组 30 只(实验组分成三个亚组,分为末次给药后 1 天组、2 天组和 3 天组, n=10)。实验组 MA10mg/kg 腹腔注射;阴性对照组 0.9% NaCl10mg/kg 腹腔注射,注射时间为每天 8:00、20:00,连续四天。末次给药后的 1 天、2 天、3 天处杀大鼠。大鼠实验前在安静环境下适应性饲养 7 天,(室温 22±2℃,湿度 55±5%),并保持 12 小时明暗交替光照,供应充足的食物和水,每天抓取两次。

1.2 试验仪器及试剂

兔抗环氧合酶-2 多克隆抗体(北京博奥森生物技术公司);兔抗前列腺素 E₂ 受体多克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公司);羊抗钙离子接头蛋白多克隆抗体(美国 SANTA CRUZ 公

司);UltraSentine™ S-P 超敏试剂盒(福州迈新生物技术公司);病理图像分析处理系统 LEICA 1150 IM50 系统(德国莱卡公司);全自动多功能酶标仪 MULTISKAN MK3(美国 Thermo 公司);HPIAS-1000 高清晰彩色病理图文报告分析系统(同济医科大学千屏影像工程公司);其它试剂为国产分析纯。

1.3 免疫组化法分别检测 COX-2、EP₂ 受体及 Iba1

各组动物按既定处杀时间麻醉,行心脏灌注。取出全脑后用 4%多聚甲醛缓冲液继续固定 48 小时(中间需要换液一次)。石蜡包埋,作冠状切片,二甲苯脱蜡,抗原修复,滴加正常二抗血清封闭,滴加生物素标记的二抗、滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,采用 DAB 显色,脱水,中性树胶封片。片中出现棕黄色颗粒为阳性结果。用 HPIAS-1000 高清晰图文分析系统测量纹状体 COX-2、EP₂ 受体及 Iba1 平均光密度值。

1.4 ELISA 法测定 PGE₂ 浓度

快速断头、取脑,放入预先冰冷的生理盐水中,去除脑膜和血管(用冰生理盐水冲洗),分出纹状体,滤纸吸干水分,称重,冰上匀浆,4℃15 000 r/min 离心 30 min,取上清用 ELISA 法测定 PGE₂ 浓度。

1.5 统计学处理

数据均采用均数+标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 11.5 软件包对实验结果进行单因素方差分析,凡 P<0.05,差异被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠纹状体 COX-2 免疫组织化学染色结果

2.1.1 大鼠纹状体 COX-2 免疫组织化学染色 各组均可见阳性信号,呈棕黄色,多位于胞浆内,细胞核也可见。与对照组(图 1A)比较,MA 一天组(图 1B)阳性信号减弱,两天组(图 1C)及三天组(图 1D)比对照组相比信号增强(见图 1)。

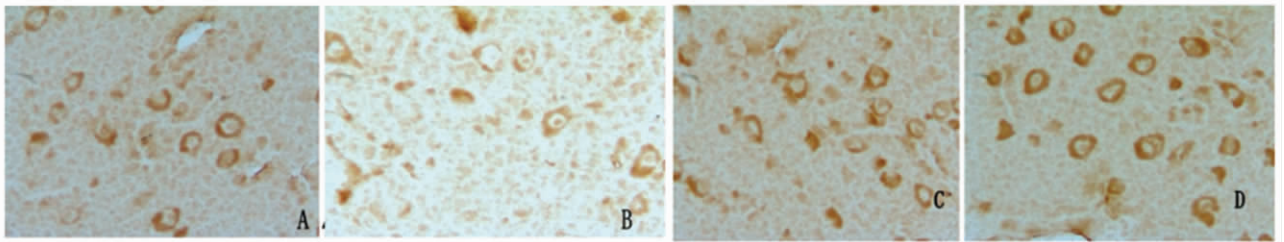


图 1 COX-2 阳性表达×400 A 为对照组 B 为一天组 C 为两天组 D 为三天组

Fig.1 COX-2-positive cell in each groups

2.2 大鼠纹状体 EP₂ 受体免疫组织化学染色结果

2.2.1 大鼠纹状体 EP₂ 受体免疫组织化学染色 各组均可见阳性信号,呈棕黄色,位于胞浆内。与对照组(图 2A)比较,MA 一天组(图 2B)阳性信号减弱,两天组(图 2C)及三天组(图 2D)信号逐渐增强,接近正常组(图 2)。

2.3 大鼠纹状体小胶质细胞免疫组织化学染色结果

2.3.1 大鼠纹状体小胶质细胞免疫组织化学染色 各组均可见阳性信号,呈棕黄色,位于胞浆内,细胞核也可见。与对照组(图 3A)比较,一天组(图 3B),两天组(图 3C)、三天组(图 3D)阳性信号逐渐增强(图 3)。

2.4 免疫组化 COX-2、EP₂ 受体及小胶质细胞阳性细胞平均光密度值

COX-2 阳性细胞平均光密度值是先下降后上升,各实验组与对照组比较有显著性差异(P<0.05);EP₂ 受体阳性细胞平均光密度值中一天组、两天组与对照组比较有显著性差异(P<0.01),三天组数值与对照组比较接近,没有显著差异(P>0.05)且各实验组数值均低于对照组,活化的小胶质细胞阳性细胞平均光密度值则一直上升,各实验组与与对照组比较有显著性差异(P<0.01)(见表 1)。

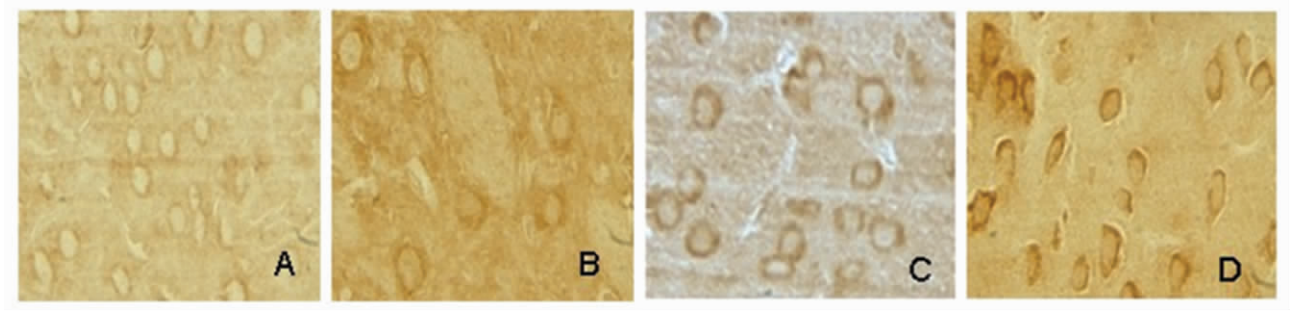


图 2 EP2 受体阳性表达× 400 ,A 为对照组 ;B 为一天组 ;C 为两天组 ;D 为三天组

Fig.2 EP2 receptor -positive cell in each groups

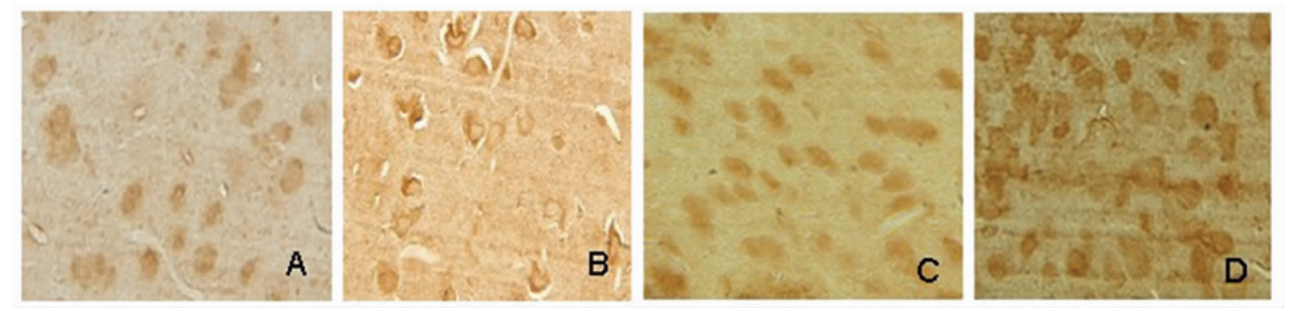


图 3 小胶质细胞阳性表达× 400 ,A 为对照组 ;B 为一天组 ;C 为两天组 ;D 为三天组

Fig.3 Microglia-positive cell in Control groups

表 1 各组 COX-2、EP₂ 受体及小胶质细胞阳性细胞平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the mean density of COX-2、EP₂ receptor and Microglia -positive cell

Group	N	COX-2	EP2	Microglia
Control group	5	0.214± 0.015	0.290± 0.023	0.157± 0.017
1 d group	5	0.169± 0.014**	0.179± 0.016**	0.226± 0.016 **
2 d group	5	0.243± 0.017*	0.215± 0.020**	0.252± 0.021 **
3 d group	5	0.289± 0.022**	0.280± 0.018	0.332± 0.028 **

** p<0.01, compared with the control * p<0.05, compared with the control

2.5 ELISA 法 PGE₂ 浓度检测结果

一天组 PGE₂ 含量降低 ,两天组及三天组含量上升 ,但仍

低于对照组。各组的 PGE₂ 浓度与对照组比较有显著性差异 (P<0.05)。(见表 2)

表 2 各组 PGE₂ 含量的变化($\bar{x} \pm s$)

Table2 The variation of PGE₂ levels -

Group	N	PGE ₂
Control group	5	108.30± 3.52
1 d group	5	91.84± 1.94**
2 d group	5	100.89± 2.41*
3 d group	5	104.45± 2.84*

** p<0.01, compared with the control * p<0.05, compared with the control

3 讨论

研究证实 MA 属于阳离子脂溶性分子 ,很容易通过血脑屏障直接作用于脑细胞 ,产生神经毒性 ,其毒性机制有多巴胺信号转导的影响和 DA 氧化作用、谷氨酸介导的兴奋毒性作用、氧化应激和细胞因子的形成、线粒体功能紊乱、神经胶质细胞的活化及高热^[6]。研究表明,COX-2 在神经系统中的持续的组成

性表达,是维持其正常生理功能所必需的酶类^[7],COX 即环氧合酶 ,是 PGE₂ 合成的关键酶。MA 中毒大鼠中 COX-2 基因缺陷均能够对神经毒性有抵抗作用^[1]。从本实验中纹状体 COX-2、PGE₂ 及 EP₂ 受体的表达变化来看 ,COX-2、PGE₂、EP₂ 受体的 1 天组表达均不同程度下降 ;2 天组中 COX-2 表达水平大幅度上升 ,PGE₂、EP₂ 受体表达仍低于正常水平 ;3 天组 COX-2 表达水平继续升高 ,而 PGE₂、EP₂ 受体表达趋于正常组水平。其原因

可能为第一天 MA 通过氧化应激、化学损伤破坏的 COX-2 的基础水平大于其产生 COX-2, 导致 MA1 天组 COX-2 水平降低; 随着注射 MA 作用时间的延长, 其产生的 COX-2 水平增高, 因此 COX-2 水平也增高。而 COX-2 有两种活性^[9] 过氧化物酶和环氧合酶, 合成 PGE₂ 主要依靠环氧合酶活性, 根据 MA2 天组、MA3 天组 PGE₂、EP₂ 受体表达水平没有随 COX-2 水平增高而增高推测 MA 主要是激活了 COX-2 的过氧化物酶活性而导致上述结果。

在 MPTP 的 PD 模型中, COX-2 水平和小胶质细胞数目呈明显的正相关关系, 和多巴胺能神经元数目呈负相关, 抑制 COX-2 或 COX-2 基因缺陷能明显减少小胶质细胞激活, 保护多巴胺能神经元免受神经毒素的损伤^[8], 且有学者提出 PD 中小胶质细胞活化机制是通过 COX-2 → PGE₂ → EP₂ 受体 → 小胶质细胞激活这个途径进行的^[4]。本研究发现小胶质细胞表达水平三个实验组均高于正常组, 且 3 天组高于 2 天组, 2 天组高于 1 天组, 可以推出 MA 可以引起小胶质细胞活化, 但与上述 PD 的活化途径不同。小胶质细胞可能与 COX-2 的过氧化物酶活性有关, 但肯定还有其他因素参与其中并起主要作用, 有待进一步研究。

基于 COX-2、PGE₂ 和 EP₂ 受体在神经系统中的构成性表达这一前提, 结合 COX-2、PGE₂、EP₂ 受体及小胶质细胞在 MA 中毒大鼠中的表达异常与产生的相应的神经生物学功能的改变, 可以提出 COX-2 与甲基苯丙胺的神经毒性有关, 而 COX-2/PGE₂ 系统与甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体内小胶质细胞活化无明显相关性, MA 中毒大鼠导致小胶质细胞活化的机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] David M. Thomas and Donald M.Kuhn. Cyclooxygenase-2 is an obligatory factor in methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 313: 870-876
- [2] Hastings TG. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase [J]. Journal of Neurochemistry, 1995, 64: 919-924
- [3] Zhang X, Dong F, Mayer GE, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 exacerbates methamphetamine-induced dopamine depletion in the striatum in rats [J]. Neuroscience, 2007, 150: 950-958
- [4] 高俊鹏, 孙珊, 李文伟等. 环氧合酶在神经变性疾病神经元进行性损伤中起的作用 [J]. 生理科学进展, 2008, 39(3): 214-220
- [5] 乔东访, 李艳红, 谭晓辉等. 甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体小胶质细胞的激活特性 [J]. 法医学杂志, 2009, 25(5): 321-325
- [6] Zeng XF, Lu G, Li Z. Progress in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity [J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2010, 25(1): 33-36
- [7] Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition [J]. Med Chem, 2007, 50: 1425-1441
- [8] Vijit ruth R, Liu M, Choi DY, et al. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease [J]. J Neuroinflammation, 2006, 3: 6-6
- [9] Xie W L, Chipman JG, Roberts on DL. Expression of a outogenous gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci USA [J]. 1991, 88: 2692-2696
- [4] Campbell AK, Naseem R, Holland IB, et al. Methylglyoxal and other carbohydrate metabolites induce lanthanum-sensitive Ca²⁺ transients and inhibit growth in E. coli [J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 468(1): 107-113
- [5] 隋龙, 郭奇桑, 张箴波, 等. 乙二醛酶在子宫内膜癌组织和细胞中的表达及其对细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2010, 45(6): 429-433
Sui Long, Guo Qi-sang, Zhang Zhen-bo, et al. Expression of glyoxalase and its effect on cell proliferation and apoptosis in endometrial carcinoma [J]. Chin J Obstet Gynecol, 2010, 45(6): 429-433
- [6] Mearini E, Romani R, Mearini L, et al. Differing expression of enzymes of the glyoxalase system in superficial and invasive bladder carcinomas [J]. Europ J Cancer, 2002, 38(14): 1946-1950
- [7] Thornalley PJ. Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31(6): 1372-1377
- [8] 王超, 胡丽娜. 子宫内膜癌发病的相关因素 [J]. 实用妇产科杂志, 2008, 24(5): 257-259
Wang Chao, Hu Li-na. Pathogenic factors in relation to endometrial cancer [J]. J Practical Obstetrics Gynecol, 2008, 24(5): 257-259
- [9] Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms [J]. Arch Physiol Biochem, 2008, 114(1): 71-83
- [10] Brennan P, McKay J, Moore L, et al. Obesity and cancer: Mendelian randomization approach utilizing the FTO genotype [J]. Int J Epidemiol, 2009, 38(4): 971-975
- [11] Kelsey JL, Livolsi VA, Holford TR, et al. A case-control study of cancer of the endometrium [J]. Am J Epidemiol, 1982, 116(2): 333-342
- [12] La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, et al. Risk factors for endometrial cancer at different ages [J]. J Natl Cancer Inst, 1984, 73(3): 667-671
- [13] Rulli A, Antognelli C, Prezzi E, et al. A possible regulatory role of 17 beta-estradiol and tamoxifen on glyoxalase and glyoxalase genes expression in MCF7 and BT20 human breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 96(2): 187-196
- [14] Lawlor MA, Alessi DR. PKB/AKT: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? [J]. Cell Sci, 2001, 114(16): 2903-2910