维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.19 No.2
1994 ACTA UNIVERSITATS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1994

94~96

磷脂酶A_2抑制剂及抗氧化剂对内毒素所致生物膜损伤的保护作用研究

检验系临床生化教研室 吕礼应* 康格非 Q545

提 要 本文研究了磷脂酶A_2抑制剂(氯丙嗪、地塞米松)及抗氧化剂(维生素E)对内毒素所致红细胞膜损伤的保护作用。结果表明:上述两种磷脂酶A_2抑制剂均能明显改善内毒素所致红细胞膜磷脂降解及脂质过氧化反应的增强,维生素E则具有明显的抗脂质过氧化作用。提示,由磷脂酶A_2激活所介导的膜磷脂降解及脂质过氧化在内毒素所致生物膜损伤中具有重要意义。

关键词 磷脂酶A_2; 脂质过氧化; 内毒素生物膜; 磷脂 过氧化脂质
中图分类号 Q545; Q554.6

近年来众多资料表明[1][2],内毒素(endo—toxin,ETX)能激活生物膜磷脂酶A_2(phospholipase,PLA_2)及促进氧自由基的产生,引起生物膜磷脂组分降解及脂质过氧化,导致生物膜脂质微环境改变乃至结构和功能损伤。迄今为止,已有不少PLA_2抑制剂[3]及抗氧化剂[4]的实验研究,引起了对相关拮抗剂应用前景的关注。故本研究选用红细胞膜为材料,应用PLA_2抑制剂氯丙嗪(chloropromazine,CPz)及地塞米松(Dexame—thasone,DMS)及抗氧化剂维生素E(Vitamine E,VitE),以观察其对内毒素所致生物膜损伤的保护效应,为抗内毒素所致生物膜损伤筛选有效方案,提供理论和实验依据。

材料和方法

1.材料 Wistar雄性大白鼠40只,体重180—220克,随机分为以下五组,每组8只:Ⅰ:正常对照组(腹腔内注射等量消毒生理盐水),Ⅱ:内毒素对照组(按2mg/kg剂量进行腹腔内注射)Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组在内毒素(2mg/kg)注射的同时分别注射氯丙嗪(10mg/kg)、地塞米松(4mg/kg)和维生素E(20mg/kg)。各组分别在注射后8小时断头处理,取血于去热原处理的干净带塞刻度试管中(肝素抗凝)、迅速分离红细胞。

维生素E购自Merck公司,内毒素及磷脂标准品购自Sigma公司,鲨试剂(Ⅱ)盒购自上海医化所。

Shimadzu LC—6A高效液相色谱仪及Backman L8—60M型全自动超速冷冻离心机。

2.方 法

(1)红细胞膜样品制备采用低渗破膜法。以等渗50mMPH7.4Tris—HCl缓冲液洗涤、PH7.410mM低渗Tris—HCl缓冲液破膜,离心分离得到乳白色红细胞膜样品。

(2)红细胞膜磷脂的提取采用氯仿:甲醇:HCl(200:100:0.1,v/v),红细胞膜磷脂的分析参照M.P.George[4]的高效液相色谱法,流动相为正己烷:异丙醇:乙醇:25mMR_2HPO_4:冰醋酸(376:485:100:56:0.1,v/v),检测波长210nM,色谱柱为正相硅胶柱(SPHSlO$_2$,5u,0.5×200mm,中科院大连物化所)。

本研究为四川省卫生厅资助项目 * 本系硕士研究生,现安徽医科大学附一院检验科

维普资讯 http://www.cqvip.com

以磷脂标准品定性，积分面积定量。

(3)血浆内毒素水平测定根据上海医化所鲎试剂盒(Ⅱ)的方法进行，红细胞膜Na^+-K^+-ATPase活力分析采用微量孔雀绿法，红细胞膜MDA类过氧化脂质测定选用Yagi的荧光法。

结　果

1.红细胞膜磷脂分析(表1)

表1显示CPZ和DMS均能使ETx所诱发的红细胞膜磷脂组分降解得到不同程度的恢复，表明CPZ和DMS为两种较为有效的PLA_2抑制剂，VitE虽具有一定的保护作用，但尚无统计学意义，其部分保护作用可能归功于其抗氧化能力。

表1　红细胞膜磷脂分析

	Normal contr	ETx Contr	ETx+CPZ	ETx+DMS	ETx+VitE
PE	47.9±2.63	39.85±4.13△△	47.35±4.13××	46.74±2.98××	38.47±4.31
PI	7.06±0.52	5.89±0.56△△	6.86±0.33××	6.76±0.34××	6.19±0.34
PS	17.01±0.74	13.34±0.55△△	16.51±1.15××	17.26±2.37××	15.28±1.54
PC	11.50±0.64	9.05±1.22△△	10.67±0.92	10.85±0.94×	9.47±0.95
SM	0.62±0.04	0.56±0.03△	0.61±0.04	0.60±0.05	0.55±0.04
LPC	0.27±0.02	0.33±0.22△△	0.29±0.02×	0.30±0.03	0.30±0.01

PE:磷脂酰胆胺　PC:磷脂酰胆碱　PI:磷脂酰肌醇
PS:磷脂酰丝氨酸　SM:鞘磷脂　LPC:溶血磷脂酰胆碱
注:(1)×:$P<0.05$，××:$P<0.01$，CPZ,DMS,VitE 组与ETx组相比
(2)磷脂单位:$\times 10^7$峰面积积分值/mg红细胞膜蛋白
(3)△:$P<0.05$，△△:$P<0.01$，Normal cortr与ETX cortr组相比。

2.血浆ETX水平，红细胞膜LPO及Na^+-K^+-ATPase分析(表2)

表2显示CPZ、DMS及VitE均能稳定红细胞膜Na^+-K^+-ATPase 活性，降低膜脂质过氧化产物水平，提示PLA_2抑制剂CPZ和DMS除了抗膜磷脂降解作用外，还具有抗脂质过氧化及保护膜Na^+-K^+-ATPase的作用，而VitE则具有明显抗脂质过氧化作用，且明显优于CPZ($P<0.01$)、DMS($P<0.05$)。

讨　论

本文以红细胞膜为重点观察生物膜在内毒素血症下的病理变化。在内毒素作用下，红细胞膜出现了由PLA_2激活所引起的几种膜磷脂降解并伴有膜Na^+-K^+-ATPase活性的明显下降及膜脂质过氧化产物(LPO)的堆积。应用PLA_2抑制剂CPZ和DMS及抗氧化剂VitE分别对内毒素所引起的上述膜损伤具有不同程度明显的保护作用。实验结果提示PLA_2的活化及氧自由基的产生在内毒素所

表2　ETx、Lpo、Na^+—k^+—ATPase　分析

	Normal contr	ETx contr	ETx+CPZ	ETx+DMS	ETx+VitE
ETx	0.09±0.015	0.16±0.007△△	0.168±0.010	0.16±0.011	0.16±0.014
LPO	2.73±0.38	5.23±0.32△△	4.00±0.87××	3.18±0.32××	2.79±0.54××
Na^+-K^+-ATPase	243.7±48.1	148.8±53.2△△	191.7±24.2×	203.5±26.7×	190.2±10.6×

注:(1)×:$P<0.05$　××:$P<0.01$为CPZ、DMS、VitE 组与ETx组相比
(2)ETx单位:Eu/ml血浆
(3)LPO单位:相当于nMTEP/mg红细胞膜蛋白
(4)Na^+-K^+-ATPase单位:释放的无机磷的nM/mg红细胞膜蛋白
(5)△:$P<0.05$，△△:$P<0.01$，Normal与ETX组相比

维普资讯 http://www.cqvip.com

致生物膜损伤中具有重要作用。

1.内毒素激活膜磷脂酶A_2所介导的膜磷脂降解

磷脂是生物膜脂类的主要组成成份，作为膜的结构物质与功能单位与生物膜的物质转运，细胞识别与清除等密切相关。本文结果表明，内毒素作用后，红细胞膜磷脂PE、PI、PS、PC、SM含量均有明显下降，而LPO则明显升高，提示膜PLA_2被激活。溶血磷脂是膜磷脂降解的重要组分，特别是lyso—PC可充当一种表面活性剂，伸入膜脂类基质中，干扰膜脂类双层结构，使得膜负电表面及膜内嵌蛋白拓扑形态学重新分布。改变膜相关酶活性、膜通透性及膜流动性，导致跨膜信息传递紊乱，功能失调[5]。内毒素血症时，大鼠红细胞膜Na^+-K^+-ATPase活性明显降低可能与PLA_2的激活所引起的lyso—PC生成及游离脂肪酸的释放增加有关[6]。内毒素激活PLA_2引起生物膜损伤的另一重要通路可能与花生四烯酸的生成与释放有关[7]。花生四烯酸在体内代谢十分活跃，其代谢产物(如:前列腺素、白三烯等)统称为脂类介质，可参与诱导组织细胞的炎症与坏死。本研究采用PLA_2抑制剂氯丙嗪及地塞米松能明显改善内毒素所引起的膜磷脂降解及lyso—PC的聚集，同时Na^+-K^+-ATPase活性明显回升。地塞米松抑制PLA_2活性可能与其诱导组织细胞合成分泌的一类PLA_2特异抑制蛋白—Lipocortin有关[8]，而氯丙嗪的作用机制则可能是由于氯丙嗪可与磷脂结合以降低酶(PLA_2)和底物的亲和力[9]。

2.内毒素所引起的红细胞膜脂质过氧化

内毒素血症时，氧自由基生成增加，诱发生物膜不饱和脂肪酸过氧化，LPO堆积，生物膜不饱和脂肪酸/蛋白质比例失调，膜受体，蛋白酶、离子通道及膜脂质微环境改变，使得膜完整性遭到破坏。本研究结果也表明，内毒素作用后，红细胞膜脂质过氧化反应增强，同时Na^+-K^+-ATPase活性下降，而VitE则对上述膜损伤具有显著的保护作用。其作用机理可能与下述因素有关:(1)VitE可与生物膜磷脂发生特异的物理化学作用而稳定生物膜的脂质双分子层，以抵御自由基的侵袭。(2)清除自由基，抑制脂质过氧化物的形成。

总之，PLA_2的激活及脂质过氧化产物的堆积在内毒素所致生物膜损伤中具有重要作用。而且，本文结果还提示其间可能存在一定的内在联系。有资料表明[10][11]:脂质过氧化可激活膜PLA_2，而活化的PLA_2对氧化的磷脂底物具有高度的亲和力和选择性水解作用，且水解后的脂肪酸更易被自由基氧化。因此，脂质过氧化是内毒素引起膜PLA_2激活的因素之一，而脂质过氧化的连锁反应又在一定程度上依赖于PLA_2的激活，其中存在着相互促进的网络机制，其详细关系还有待于进一步阐明。

参 考 文 献

1 Kang GF, et al.J Surg Res1988;45：472
2 Sugino K9, et al.Surgery 1989;105：200
3 Blackwell GJ, et al.Br J Pharmacol 1978;62：79
4 George MP, et al.J Lipid Res 1982;23：190
5 Weltzien HU.Biochim Biophys Acta 1979;559：259
6 Oishi K, et al.J Biol Chem 1990; 265：70
7 Chang SM, et al.J Appl Physiol 1989;66(5)：2407
8 Flower RJ.Br J Pharmacol 1988;94：987
9 Vados P, et al.Agents and action 1985;19：194
10 Beckman Jk, et al.J Biol Chem 1987;262(4)：1479
11 Sevanian A, et al.J Biol Chem 1983;223(2)：441

(收稿日期 1994—01—20)

(下转93页)