维普资讯 http://www.cqvip.com

101~104

血小板活化因子受体拮抗剂对内毒素所致红细胞膜损伤的保护作用

检验系临床生化教研究室 吕礼应* 康格非 Q545

提 要 本文研究了血小板活化因子(PAF)受体拮抗剂BN52021及BN50739对内毒素所致的红细胞膜损伤的保护作用。结果表明，PAF受体拮抗剂能显著改善内毒素所致的红细胞膜磷脂降解及溶血磷脂的聚集，明显降低红细胞膜损伤过程中脂质过氧化产物的堆积及稳定膜Na^+—K^-—ATPase活力。提示PAF可能是通过活化磷脂酶A$_2$引起红细胞膜磷脂降解及促进氧自由基的释放而发挥作用，从而在内毒素所致细胞损伤的病理生理过程中起到重要作用。

关键词 血小板活化因子; 内毒素; 红细胞膜; 磷脂; 脂质过氧化
中图分类号 Q545; Q241

血小板活化因子(Platelet activating factor, PAF)是近年来在炎症和过敏反应中发现的一种炎性脂类介质，且与花生四烯酸的代谢密切相关，它主要由受损的细胞膜所释放。多种细胞可合成和释放PAF，如内皮细胞、中性粒细胞、单核巨噬细胞和血小板等。它具有引起血小板聚集、激活中性粒细胞及单核—巨噬细胞，抑制心肌收缩力和增强血管通透性等生物活性，在内毒素血症及休克的病理发展过程中起到重要作用[1,2]。Braquet等试将PAF受体拮抗剂应用于内毒素的抗损伤治疗，引起了对这些抑制剂应用前景的关注[3]，本研究应用两种强有效的PAF受体拮抗剂BN52021、BN50739以探讨其对内毒素所致红细胞膜损伤的保护机制，论证PAF在内毒素所致红细胞膜损伤中的作用。

材料和方法

1.材料

Wistar雄性大白鼠48只，体重180—220g。内毒素时间进程组：内毒素组按2mg/kg剂量腹腔注射，分别于注射后4、8、14h将动物断头处死，取血于去热原处理的干净带塞刻度试管中(肝素抗凝)。正常对照组为腹腔内注射等量消毒生理盐水。PAF受体拮抗剂保护组在内毒素注射前30分钟分别注射BN52021(25mg/kg)及BN50739(25mg/kg)，8.5h后处死动物，方法同上。

---

* 本校临床生化研究生，现在安徽医科大学。本工作为四川省卫生厅资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

BN52021及BN50739由法国IHB研究所Dr.Braquet提供，内毒素及磷脂标准品购自Sigma公司，蛋试剂盒(Ⅱ)购自上海医化所。

Shimadzu的LC-6A高效液相色谱仪及Bakman 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等渗Tris-HCL缓冲液(PH7.4)洗涤，低渗10mmol/L Tris-HCl缓冲液(PH7.4)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J.A.-Higgins的方法，提取液为氯仿：甲醇:HCL(200：100：1，v/v)高效液相层析分离红细胞膜磷脂参照M.P George[4]的方法而作适当修改。流动相为正己烷:异丙醇:乙醇:25mM K_2HPO_4:冰醋酸(376：485：100：56：0.1，v/v)，洗脱过程0.5ml/分30分钟后改1ml/分至80分钟，检测波长210nm，色谱柱为正相硅胶柱。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常试剂盒(Ⅱ)的方法进行。红细胞膜Na^+-K^+-ATPase活力分析用微量孔雀绿法，红细胞膜MDA类过氧化脂质测定选用Yagi的荧光法[5]。

结 果

1.内毒素作用时间进程

表1显示，大鼠腹腔注射内毒素后4、8、14hr与正常对照组相比，红细胞膜磷脂PE、PI、PS、PC、SM均有不同程度的下降，LPC则相应升高，Na^+-K^+-ATPase活性下降，LPO水平增高，且以8h最为明显，14h后有所恢复。结果提示，内毒素能激活膜磷脂酶A_2(PLA_2)，引起膜磷脂降解，同时脂质过氧化反应增强，离子转运功能受损、使得红细胞膜结构和功能损伤。

2.PAF受体拮抗剂对内毒素所诱发的红细胞膜损伤的保护作用(表2)

表2显示PAF受体拮抗剂BN52021及BN50739对内毒素所诱发的红细胞膜磷脂降解，膜脂质过氧化反应的增强及对膜Na^+-K^+-ATPase活力的降低具有明显的保护作用，提示PAF受体拮抗剂BN52021及BN50739具有抑制PLA_2活力、抗脂质过氧化及稳定膜Na+-K^+-ATPase活力的作用。

讨 论

本文以红细胞为重点观察外周血红细胞膜在内毒素作用下的病理变化。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Na^+-K^+-ATPase活性的明显下降及膜脂质过氧化产物的堆积，应用PAF受体拮抗剂BN52021及BN50739对内毒素所引起的上述膜损伤具有明显的保护作用，提示PLA_2的活化、脂类介质特别是PAF的释放及氧自由基的产生在内毒素所致红细胞损伤中具有重要作用。

PAF是一种血管活性磷脂，与PLA_2的激活及花生四烯酸的代谢密切相关，在内毒素血症及休克等病理生理发展过程中起到重要作用，其作用机制可能是通过与PAF特异受体相偶联的G蛋白结合，激活GTPase及磷酸肌醇(PI)特异的磷脂酶C，导致细胞内Ca^{++}及二酰基甘油(DG)水平增高，从而使得蛋白激酶C(pkc)激活，促进靶蛋白磷酸化及磷脂酰碱降解，引起膜结构改变及跨膜信息传递紊乱[6][7]。PAF作为一种炎症反应的起始介质还可促进肿瘤坏死因子(TNF)，氧自由基及花生四烯酸类脂类介质的生成与释放及调节免疫反应等。而PAF受体拮抗剂能明显改善内毒素或PAF所致的血流动力学改变及组织器官的损伤[8]。并抑制花生四烯酸类炎症介质的释放及氧自由基的产生[9][10]。本文结果也表明PAF受体拮抗剂BN52021、BN50739能显

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 内毒素作用时间进程

	contr($n=8$)	4h($n=8$)	8h($n=8$)	14h($n=8$)
PE	47.91±2.63	47.24±3.41	39.85±4.13$^{\times\times}$	47.62±1.20
PI	7.06±0.52	6.93±0.33	5.89±0.56$^{\times\times}$	6.74±0.19
PS	17.01±0.74	17.16±0.62	13.34±0.55$^{\times\times}$	16.07±1.24
PC	11.50±0.64	10.38±1.12	9.05±1.22$^{\times\times}$	10.94±1.41
SM	0.62±0.04	0.60±0.02	0.56±0.03$^{\times}$	0.58±0.02
LPC	0.27±0.02	0.25±0.02	0.33±0.02$^{\times\times}$	0.30±0.02
ETx	0.09±0.002	0.22±0.014$^{\times\times}$	0.16±0.070$^{\times\times}$	0.13±0.023$^{\times\times}$
NKA	243.7±48.1	211.1±49.5	148.8±53.2$^{\times\times}$	196.9±36.3
LPO	2.73±0.38	3.86±0.21$^{\times\times}$	5.23±0.32$^{\times\times}$	3.40±0.40$^{\times}$

PE=phosphatidylethanolamine (磷脂酰胆胺) PC=phosphatidylcholine (磷脂酰胆碱)
PI=phosphatidylinositol (磷脂酰肌醇) PS=phosphatidylserine (磷脂酰丝氨酸)
SM=sphingomyelin (鞘磷脂) LPC=lysophosphatidylcholine (溶血磷脂酰胆碱)

注:(1) 磷脂单位: $\times10^7$峰面积积分值/mg红细胞膜蛋白
(2) ETX:内毒素水平,其单位为Eu/ml血浆
(3) NKA: Na^+—K^+—ATPase,其单位为释放的无机磷的nmols/mg红细胞膜蛋白/5分钟
(4) LPO: 脂质过氧化产物,其单位为nmols TEP/mg红细胞膜蛋白
(5) X:$P<0.05$,$\times\times P<0.01$,与正常对照组相比.

表2 PAF受体拮抗剂的抗损伤作用

	Normal contr($n=8$)	ETx($n=8$)	BN52021	BN50739
PE	47.91±2.63	39.85±4.13	46.24±4.01$^{\times}$	47.25±2.64$^{\times\times}$
PI	7.06±0.52	5.89±0.56	6.86±0.37$^{\times\times}$	6.50±0.36$^{\times}$
PS	17.01±0.74	13.34±0.55	16.62±0.71$^{\times\times}$	15.70±1.65$^{\times}$
PC	11.50±0.64	9.05±1.22	10.30±1.30	9.51±1.12
SM	0.62±0.04	0.56±0.03	0.62±0.40$^{\times}$	0.59±0.03
LPC	0.27±0.02	0.33±0.02	0.29±0.02$^{\times}$	0.28±0.03$^{\times\times}$
ETx	0.09±0.02	0.16±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01
NKA	243.7±48.1	148.8±53.2	248.8±36.6$^{\times\times}$	252.6±21.4$^{\times\times}$
LPO	2.73±0.38	5.23±0.32	3.22±0.28$^{\times\times}$	3.33±0.55$^{\times\times}$

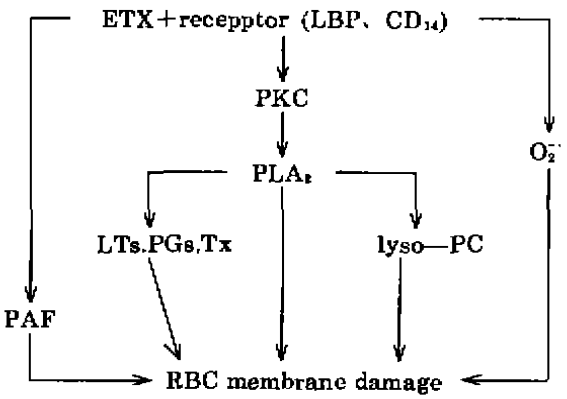
注:(1)$\times P<0.05$, $\times\times P<0.01$,与ETX Contr组比.
(2)其它同表1.

著改善内毒素所引起的红细胞膜磷脂降解,脂质过氧化及膜Na^+-K^+-ATPase活性的降低。其作用机制可能与下述三个因素有关:(1)PAF受体拮抗剂能竞争细胞表面PAF受体从而抑制PAF的生物学反应。(2)抑制膜PLA_2活力,阻止膜磷脂降解,维持膜脂类微环境的完整性。(3)防止氧自由基的产生。

总之,PLA_2的活化,氧自由基及PAF的产生与释放在内毒素所致红细胞膜损伤过程中具有重要作用,其相互关系可总结于图1。 注: LBP:脂多糖结合蛋白, CD_{14}:内毒素受体, PKC:蛋白激酶C, LTs:白三烯, PGs:前列腺

维普资讯 http://www.cqvip.com

素，Tx:血栓素，ETx:内毒素



参 考 文 献

1 Gamuss G, et al. Clin.Immunol. Immunopathl.1990, 57;331.

2 Suyder F, et al, Am.J. Physiol, 1990, 259(28); C697—708.

3 Braquet MP, et al, From ginkgolides to N-substituted piperidinotheno-deazepines, a new series of highly potent dual antago nists. In;Advances in prostaglandin, thromboxane and leuehtriene research. Volume 21, eds by Sameu lsson, Raven press, Ltd, New Your, 1990, 929.

4 George MP, et al, J.lipid.Res.1982, 23 : 190—196.

5 Yagi K;Assay of serum lipid peroxide level and its clinical significance.In;lipid peroxide, in biology and medicine.eds by Yagi K et al, New York Academic press Inc.1982, 223.

6 Gandhi GR, et al.J.Biol.Chem.1990, 265(30):18234.

7 Schulam PG, J.Immumol.1990, 146(5):1642.

8 Qi M, et al. Circ.Shock.1990, 32:153—163.

9 Fletcher JR. Ann.Surg. 1990, 211(3): 312—316.

10 Floch A, et al. J.Pharmacol.Exp.Ther. 1991, 258(2)567—575.

(收稿日期 1994—01—20)

STUDIES ON THE PROTECTIVE EFFECTS OF PAF RECEPTOR ANTAGONISTS ON THE RED BLOOD CELL MEMBRANE INJURY INDUCED BY ENDOTOXIN ADMINISTRATION IN WISTAR RATS

Lu Liying, et al

Dept. of Clincial Biochemistry

The protective effects of platelet activating factor(PAF)receptor antagonists, BN52021 and BN50739, on the red blood cell membrane injuries induced by E.coli endotoxin administration were studied on Wistar male rats.The results showed that BN52021 and Bn50739 significantly prevented the membrane phospholipids strucrure from Phospholipase A2 involved degradation and the overproduction of lyso—PC, and significantly reduced the accumulation of ilpid peroxidation (MDA), and stabilize the Na^+-K^+-ATPase activities of red blood cell membrane.These findings suggest that PAF may act through the membrane phospholipids degradation induced by phospholipase A2 activation and the release of oxygen free radicals.Therefore, PAF may plays a critical role in the process of red blood cell membrane damage induced by endotoxin administration.

KEY WORDS Platlet activating factor; endotoxin; Red blood Cell membrane; phospholipids; lipid peroxidation