DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.006

文章编号:1000-5404(2001)08-0889-02

论著

血小板活化因子及其拮抗剂在大鼠严重腹腔感染中的作用

曾冬竹,余佩武,马宏敏 (第三军医大学附属西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨血小板活化因子(PAF)及其拮抗剂在大鼠严重腹腔感染中的作用,及与肿瘤坏死因子(TNF)和IL-8的关系。**方法** 应用大鼠盲肠结扎加穿孔模型,在不同时相点观察大鼠死亡率并检测其血PAF、血清TNF及IL-8的水平。**结果** ①严重腹腔感染后,血PAF、血清TNF及IL-8水平均明显升高,且前者与后两者呈显著正相关。②应用PAF拮抗剂WEB2170治疗后,血PAF、血清TNF及IL-8水平可显著降低。③WEB2170能明显降低严重腹腔感染大鼠的死亡率。**结论** 严重腹腔感染早期应用PAF拮抗剂可阻挡PAF与TNF和IL-8的网络联系,对防治多器官功能衰竭具有重要意义。

关键词:腹腔感染;血小板活化因子;肿瘤坏死因子;IL-8
中图法分类号:R392.11;R63;R656 **文献标识码**:A

Role of platelet activating-factor and its antagonist in serious intra-abdominal infection of the rats

ZENG Dong-zhu, YU Pei-wu, MA Hong-min (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of platelet activating-factor (PAF) and its antagonist in serious intra-abdominal infection (SIAI) of rats, and the relationship between PAF and TNF or IL-8. **Methods** In a ligated and perforated cecum model of septic rat. The mortality and the level of blood PAF, serum TNF, IL-8 at different time points were observed. **Results** ①The level of blood PAF, serum TNF and IL-8 increased with a significant correlation between PAF and TNF/IL-8. ②After treated with PAF antagonist WEB2170, the level of blood PAF, serum TNF and IL-8 decreased with a reduced mortality rate. **Conclusion** The PAF antagonist WEB2170 can block the communication network of PAF with TNF or IL-8 and plays an important role in preventing MOF.

Key words: SIAI; PAF; TNF; IL-8

严重腹腔感染是一个常见的临床问题,易引起多器官功能衰竭,其发病机制不详,有人认为与多种细胞因子如血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)、IL-6、IL-8及白三烯等关系密切。本研究采用大鼠盲肠结扎加穿孔并严重腹腔感染、继而引起脓毒血症、多器官功能衰竭模型[1],探讨PAF及其拮抗剂的作用,以及与TNF及IL-8的联系,为临床防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备

取Wistar大鼠99只,体重180~230 g,禁食24 h,自由饮水。用1%戊巴比妥钠腹腔内注射(15 mg/kg),消毒后开腹,结扎盲肠并用9号针头贯穿后放回腹腔内,关腹。

1.2 动物分组

99只大鼠,随机分为3组:①正常对照组8只。②腹膜炎组50只,仅行盲肠结扎加穿孔。③PAF拮抗剂WEB2170(德国Boehringer Ingelheim公司产品)治疗组41只,在模型制成后立即腹腔内注射WEB2170(5 mg/kg),以后每8 h重复注射1次。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 各时相点变化 在模型制成后6、12、24及48 h观察各项指标及动物死亡率。

1.3.2 血PAF的检测 在上述各时相点抽腔静脉血1 ml,加甲醇5 ml,使血中蛋白变性沉淀。2 000 r/min离心10 min后取上清液,加氯仿2 ml和双蒸水1 ml剧烈混合以成相。取出氯仿层,氮气吹干,以50 μl氯仿重溶后和PAF标准品(sigma公司产品)置同一硅胶G板上点样,用氯仿:甲醇:水(65:35:6)为展开剂,展开后用磷钼酸染色,刮下与PAF标准品同一比移值(Rf值)的区域,用氯仿、甲醇及水重新提取。取氯仿层氮气吹干后,加入少量含牛血清蛋白(5 mg/ml)的磷酸缓冲液待测。离心分离兔血小板,加保存液调整血小板数目至30万~40万/mm^3,在自动平衡血小板聚集仪上测定标准品及样品对血小板的聚集能力,根据标准品PAF所致血小板聚集程度的标准曲线算出样品中PAF含量。

1.3.3 血清TNF的检测 在各时相点抽腔静脉血1 ml于干燥管中,取血清,采用双抗体夹心法检测。逐次经过包被,封闭,加标准品及待测品,加酶标抗体及显色等步骤,再测其D_A值。然后从同时绘制的标准曲线上求出待测品中TNF的含量。试剂盒由军事医学科学院提供。

1.3.4 血清IL-8的检测 于各时相点抽腔静脉血1 ml于干燥管中,取血清。具体操作步骤同TNF。试剂盒由第四军医大学免疫教研室提供。

1.3.5 统计学处理 采用第三军医大学数学教研室医用统计程序包对数据进行统计学处理。各项指标均用$\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 动物死亡率

在本次实验中,腹膜炎组及治疗组在模型制成后6 h及12 h动物数均为8只,无死亡。24 h腹膜炎组与治疗组动物死亡率无明显差别,但在48 h死亡率明显高于治疗组($P<0.05$)。

作者简介:曾冬竹(1965-),男,湖南省新化县人,硕士,主治医师,主要从事胃肠道外科方面的研究。电话:(023)65387301

收稿日期:2000-08-11;修回日期:2001-03-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 血液 PAF 水平的变化

严重感染后 6 h 血 PAF 水平较正常对照组显著升高，在以后的各时相点其 PAF 水平有呈进行性升高的趋势。PAF 拮抗剂治疗组各时相点明显低于相应的腹膜炎组，但仍显著高于正常对照组（$P<0.01$），见表 1。

表 1 血 PAF 水平的变化（$\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$）

Tab 1 Changes of blood PAF（$\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$）

Group	n	6 h	12 h	24 h	48 h
Peritonitis	8	$1.72\pm0.21^{**}$	$1.90\pm0.24^{**}$	$2.70\pm0.20^{**}$	$3.01\pm0.24^{**}$
Treatment	8	$0.85\pm0.18^{\#\#**}$	$1.38\pm0.21^{\#\#**}$	$1.65\pm0.14^{\#\#**}$	$1.78\pm0.20^{\#\#**}$
Control	8	0.57 ± 0.09			

##：$P<0.01$ *vs* peritonitis；**：$P<0.01$ *vs* control

2.3 血清 TNF 水平的变化

模型制成后 6 h，血清 TNF 水平较正常对照组显著升高，24 h 达高峰，48 h 略有降低，但仍高于 12 h。PAF 拮抗剂治疗组各时相点均较腹膜炎组明显降低，但仍显著高于正常对照组（$P<0.01$），见表 2。

表 2 血清 TNF 水平的变化（$\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$）

Tab 2 Changes of serum TNF（$\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$）

Group	n	6 h	12 h	24 h	48 h
Peritonitis	8	$2.29\pm0.21^{**}$	$2.31\pm0.16^{**}$	$3.01\pm0.35^{**}$	$2.78\pm0.34^{**}$
Treatment	8	$1.95\pm0.20^{\#\#**}$	$2.01\pm0.29^{\#\#**}$	$2.13\pm0.23^{\#\#**}$	$2.07\pm0.25^{\#\#**}$
Control	8	1.55 ± 0.02			

##：$P<0.01$ *vs* peritonitis；**：$P<0.01$ *vs* control

2.4 血清 IL-8 水平的变化

模型制成后 6 h 血清 IL-8 水平明显增高，并在以后的各时相点呈进行性升高。PAF 拮抗剂治疗组各时相点均较腹膜炎组明显降低。但仍显著高于正常对照组（$P<0.01$），见表 3。

表 3 血清 IL-8 水平的变化（$\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$）

Tab 3 Changes of serum IL-8（$\rho_B/\mu g\cdot L^{-1}$）

Group	n	6 h	12 h	24 h	48 h
Peritonitis	8	$0.60\pm0.11^{**}$	$0.61\pm0.06^{**}$	$0.63\pm0.08^{**}$	$0.74\pm0.10^{**}$
Treatment	8	$0.47\pm0.11^{\#\#**}$	$0.52\pm0.06^{\#\#**}$	$0.54\pm0.06^{\#\#**}$	$0.58\pm0.09^{\#\#**}$
Control	8	0.34 ± 0.05			

##：$P<0.01$ *vs* peritonitis；**：$P<0.01$ *vs* control

2.5 血清 PAF、TNF、IL-8 的相关性分析结果

腹膜炎组血 PAF 水平与血清 TNF 水平呈显著正相关（$r=0.965$，$P<0.01$），与血清 IL-8 亦呈明显正相关（$r=0.945$，$P<0.05$）。

3 讨论

PAF 是一种内源性脂质介质，目前被认为是一种独特的细胞因子，具有广泛的生物学特性。它作用于多种细胞、组织与器官；在内毒素休克、急性炎症、过敏性哮喘等多种疾病的病理生理过程中起着重要作用。实验证明，在内毒素休克中，血液 PAF 水平可明显升高，并与病情的严重程度显著正相关[2]；应用 PAF 拮抗剂可明显改善由内毒素所致的动物低血压，抑制外周血管扩张并减轻多器官功能损伤[3]。在本动物实验中，观察到血液 PAF 内水平随着病情进展呈进行性升高，严重感染后 6、12、24 及 48 h 血中 PAF 水平分别增至正常的 3、3.3、4.7 及 5.3 倍。应用 PAF 拮抗剂 WEB 2170 可明显降低血液内 PAF 水平，其降低幅度分别为上述各时相点的 51%、27%、39% 及 41%。

应用 PAF 拮抗剂可延长毒血症动物的生存时间，降低其死亡率，即使在注射内毒素后几小时使用 PAF 拮抗剂也能降低死亡率[4]。本结果表明：应用 PAF 拮抗剂 WEB2170 降低了实验大鼠死亡率，腹膜炎组与治疗组相比较，大鼠 24 h 死亡率死亡率由 28% 降为 20%（$P>0.05$），48 h 死亡率由 65% 降至 47%（$P<0.05$）。

PAF 本身不但具有广泛的生物学活性，且与多种细胞因子如 TNF、IL-8、IL-1、IL-6 等相互诱导合成，释放，协同参与作用，共同形成一反馈网络系统。而这个反馈网络系统目前被认为在休克，缺血，炎症及移植物排斥反应等过程中起着重要作用，其中 PAF 与 TNF 在这个反馈网络系统的开始阶段起着关键性的作用[5]。在体外细胞培养中，PAF 可刺激人单核细胞，巨噬细胞及内皮细胞等释放大量的 TNF、IL-6、IL-2 及 IL-1，这种作用与 PAF 剂量呈明显正相关，并可被 PAF 拮抗剂所抑制[6]。反过来，多种细胞因子如 TNF、IL-8、IL-1 及 INF-α 亦可促进人中性粒细胞，内皮细胞合成与释放 PAF，并可加强 PAF 的作用[7]。本实验中发现，严重感染后 6 h，血清 TNF 水平明显升高，24 h 达高峰，48 h 略有下降；而血清 IL-8 水平则呈持续增高的趋势，两者均与血 PAF 水平的升高呈显著正相关。应用 PAF 拮抗剂 WEB2170 治疗后，在血 PAF 水平降低的同时，血清 TNF 及 IL-8 水平亦显著下降[8]。由此可见，血 PAF 水平的高低对血清 TNF、IL-8 水平有明显影响。在脓毒血症早期应用 PAF 拮抗剂可阻断 PAF 与其它细胞因子的网络联系，对多器官功能衰竭的防治具有一定的意义。

参考文献：

[1] 金惠铭. 盲肠结扎穿刺后大鼠败血症模型[J]. 中国病理生理学杂志，1990，6(2)：126－127.

[2] Rabinovici R, Esser K M, Lysko P G, *et al*. Priming by PAF of endotoxin-induced lung and cardiac vascular shock[J]. Cire Res, 1991, 69(1): 12－25.

[3] Yamanaka S, Miura K, Yukimura T, *et al*. Putative mechanism of hypotensive action of PAF in dog[J]. Cire Res, 1992, 70(5): 893－901.

[4] Chang S W, Fernyak S, Voelkel N F. Beneficial effect of a PAF anatagonist, WEB2086 on endotoxin induced lung injury[J]. Am J Physiol, 1990, 258(1 Pt 2): H153－158.

[5] Koltai M, Hosford D, Braquet P. Role of PAF and cytokines in microvascular tissue injury[J]. J Lab Clin Med, 1992, 119(5): 461－466.

[6] Valon F H, Ruis N M. Stimulation of TNF release by cytotoxin analogues of PAF[J]. Immunology 1992, 76(1): 24－29.

[7] Beutler B, Grau G E. Tumor necrosis factor im the pathogenesis of infectious diseases[J]. Crit Care Med, 1993, 21(10 Suppl): S423－435.

[8] Bussolino F, Sironi M, Bocchietto E, *et al*. Synthesis of PAF by polymorphonuclear neutrophils stimulated with IL-8[J]. J Biol Chem, 1992, 267(21): 14 598－14 603.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net