DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.023

文章编号:1000-5404(1999)10-0753-03

内毒素对大鼠肝脏中胞液型磷脂酶 A_2 表达的影响

赵树铭* 康格非** 华 川 雷曼苹 胡珍国 (第三军医大学附属西南医院检验科)重庆,400038

提 要 **目的**:探讨内毒素血症时胞液型磷脂酶 A_2($cPLA_2$)对大鼠肝脏损伤的影响。**方法**:选用 Wistar 大鼠30只,分为对照组和内毒素组,分别检测血清常规肝功能生化指标和前列腺素 E_2(PGE_2)的含量,同时观察肝脏组织冰冻切片 $cPLA_2$ 的免疫组化变化。**结果**:内毒素血症大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)和谷氨酰氨基肽酶(GGT)活性及前列腺素 E_2 含量均有升高,肝脏 $cPLA_2$ 表达显著增强。**结论**:$cPLA_2$ 可能参与内毒素致肝脏损伤,并介导炎症介质 PGE_2 的产生。

关键词 内毒素;肝脏;磷脂酶 A_2;大鼠
中图法分类号 R333.4 **文献标识码**:A

内毒素是革兰氏阴性细菌产生的一类毒性物质,可刺激机体产生一系列细胞因子,特别是一些炎症性细胞因子(Proinflamatory cytokine),如肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等,可进一步调节磷脂酶 A_2(Phospholipase A_2,PLA_2)的表达和活化,从而产生一系列重要炎症介质[1]。由于这一过程往往是一个连续发展的病理过程,磷脂酶 A_2 在启动炎症介质产生的花生四烯酸级联放大系统中起着限速酶的作用,因而具有非常重要的意义[2]。哺乳动物中有多种 PLA_2,根据它们的生物学特性可初步分为钙离子依赖性 PLA_2 和钙离子非依赖性 PLA_2,前者又可分为胰腺型 PLA_2、滑液型 PLA_2 和胞液型 PLA_2(Cytosolic phospholipase A_2, $cPLA_2$)。$cPLA_2$ 是近年来发现的一种对含花生四烯酸磷脂特异水解的高分子 PLA_2,参与细胞内信号传递、免疫应答和炎症效应等多种功能[3]。本研究的目的是观察内毒素致大鼠肝损伤时 $cPLA_2$ 的可能作用,初步探讨 $cPLA_2$ 在内毒素血症时的变化机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌内毒素(LPS,*E. Coli* 026:136)购自 Sigma 公司。前列腺素 E_2 试剂盒购自苏州医学院止血与血栓研究室。$cPLA_2$ 抗体由美国 Bolognese 博士(Smith Kline Beecham Co.)惠赠,S-P 免疫组化试剂盒购自华美公司。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和谷氨酰氨基肽酶(GGT)等试剂盒购自美国 Beckman 公司。

1.2 动物分组和处理

Wistar 大鼠,雄性,180~250 g,30只,分为对照组6只(注入生理盐水 0.8 ml),内毒素致伤组的各时相点6只,自尾静脉注入 LPS(500 μg/kg),分别于伤后 3、6、12 h 和 24 h 麻醉动物取血标本,甲醛全身灌注固定后取肝脏标本。

1.3 血清前列腺素 E_2 含量

采用 ELISA 方法,按试剂盒说明书进行。

1.4 血清 AST、ALT、ALP、GGT 等肝功能生化指标测定

采用 Beckman CX-7 全自动生化分析仪进行。

1.5 肝脏 $cPLA_2$ 蛋白的表达

肝组织经冰冻切片后,用 $cPLA_2$ 特异性抗体行免疫组化检测[4]。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并作 t 检验。

2 结果

2.1 内毒素致伤大鼠常规肝功能指标的变化

可见内毒素血症大鼠血清中 ALP 活性显著升高,ALT 也有升高,以伤后 12 h 为甚。AST 和 GGT 未见明显变化,结果见表1。

表1 内毒素致伤大鼠常规肝功能指标的变化(IU/L,$\bar{x}\pm s$,$n=6$)

Tab 1 Changes of indicators liver function in LPS-induced endotoxemia in rats(IU/L,$\bar{x}\pm s$,$n=6$)

	ALP	GGT	ALT	AST
LPS(3 h)	280±30	2.03±0.07	45±15	178±30
LPS(6 h)	320±30	2.01±0.05	49±13	185±25
LPS(12 h)	425±120**	2.02±0.06	68±14*	189±36
LPS(24 h)	350±80**	2.00±0.08	50±14	182±42
Control	210±26	2.00±0.04	40±12	170±26

*:$P<0.05$, **:$P<0.01$ *vs* control

* 赵树铭,男,34岁,主管技师,博士
** 重庆医科大学医学检验系 重庆,400046

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

2.2 内毒素致伤大鼠血清 PGE_2 含量的变化

PGE_2 作为一种代表性的炎症介质，在内毒素处理后可见其在血中含量升高，见表2。

2.3 内毒素致伤大鼠肝脏组织 $cPLA_2$ 表达的变化

对照组肝脏中 $cPLA_2$ 有一定的表达，见图1。内毒素致伤组可肝脏中 $cPLA_2$ 的表达明显增强，尤以12 h组为甚，见图2，主要见于肝窦、Kupffer's 细胞、汇管区和肝实质性细胞等。

表2 内毒素致伤大鼠血清 PGE_2 含量的变化（pg/ml，$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Tab 2 Change of serum PGE_2 level in LPS-induced endotoxemia in rats（pg/ml，$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

	PGE_2
LPS (3 h)	320±75
LPS (6 h)	350±85
LPS (12 h)	380±92*
LPS (24 h)	320±84
Control	280±80

*：$P<0.05$ vs control

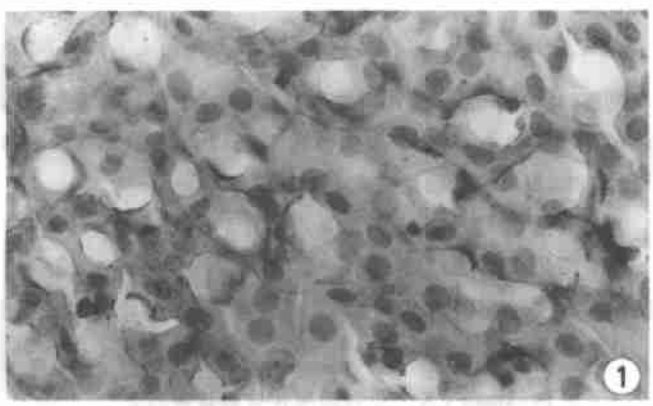


图1 正常大鼠肝脏组织 $cPLA_2$ 的表达 呈弱阳性反应 (S-P×400)

Fig 1 Expression of $cPLA_2$ in liver tissue of normal rats Weak positive reaction (S-P×400)

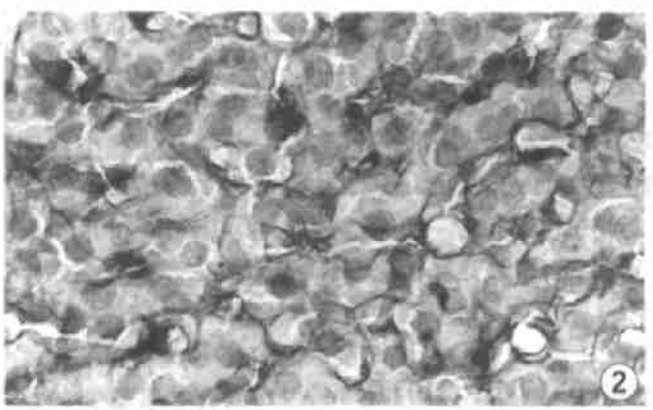


图2 内毒素致伤大鼠(12 h)肝脏组织 $cPLA_2$ 的表达 呈强阳性反应 (S-P×400)

Fig 2 Expression of $cPLA_2$ in liver tissue of LPS-induced endotoxemia in rats (12h) Strong positive reaction (S-P×400)

3 讨论

胞液型磷脂酶 A_2 广泛存在于多种动物组织和细胞中，用免疫学方法可在血小板、中性粒细胞、肾小球系膜细胞、巨噬样细胞以及肾脏、肝脏和脑组织等中检出[1~3,5]。已经证明，$cPLA_2$ 参与某些培养细胞中（如HL-60）花生四烯酸的释放，可能参与内毒素引发的炎症病理进程。Stephenson 等[6]用免疫组化方法检查 $cPLA_2$ 在人脑组织中的蛋白表达时发现脑灰质星形细胞呈阳性反应，而白质中则无，提示灰质星形细胞是脑组织 $cPLA_2$ 的主要产生细胞。虽然 $cPLA_2$ 的免疫组化阳性细胞并不能证实该细胞产生 $cPLA_2$，但至少可以证实这些细胞含有 $cPLA_2$，是 $cPLA_2$ 产生或存在的部位。在后来的研究中[7]，他们发现在阿尔采默氏病（Alzheimer，老年性痴呆）和神经系统正常的疾病患者脑中星形细胞呈 $cPLA_2$ 阳性反应（免疫组化），但前者脑组织中 $cPLA_2$ 阳性细胞数量和染色反应强度均大于后者，结果支持阿尔采默氏病患者脑中存在活动性炎症损伤的假说。Skannal 等[8]观察了妊娠妇女体内 $cPLA_2$ 的免疫组化变化，表明 $cPLA_2$ 主要位于子宫肌层血管的内皮细胞，而纤维层则较弱，其显色强度在妇女的妊娠与分娩时均无明显变化。本实验采用免疫组化技术研究大鼠内毒素血症时 $cPLA_2$ 在肝中的表达变化，结果表明，内毒素可致大鼠肝功能异常（ALP 和 ALT 均升高），血清中 PGE_2 含量升高，肝脏组织，尤以肝窦、Kupffer's 细胞、汇管区和肝实质性细胞等 $cPLA_2$ 的免疫反应性明显增强，且与血清肝功能指标（ALP 和 ALT）的时相变化相一致，提示内毒素诱发前列腺素类炎症介质产生过程中 $cPLA_2$ 具有重要作用。内毒素可诱发体内炎症性细胞因子如 TNF-α、白介素-1 等产生增多，这类炎症细胞因子可诱导和激活 $cPLA_2$ 的表达和产生，从而参与花生四烯酸瀑布系统，导致大量炎症介质的产生。由于 $cPLA_2$ 的器官分布广泛性，提示其在各种全身炎症性疾病（如多脏器功能衰竭综合症）中具有重要作用。

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

参考文献

1 Borsch-Haubold A G, Kramer R M, Watson S P. Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A_2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen stimulated human platelets. Eur J Biochem, 1997, 245(3): 751

2 Guidet B, Piot O, Masliah J, *et al*. Secretory non-pancreatic phospholipase A_2 in severe sepsis: Relation to endotoxin, cytokines and thromboxane B_2. Infect, 1996, 24(2): 103

3 Ackermann E J, Dennis E A. Mammalian calcium-independent phospholipase A_2. Biochim Biophy Acta, 1995, 1259(2): 125

4 蔡文琴 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 406～435

5 Cirino G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A_2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. Biochem Pharmacol, 1998, 55(2): 105

6 Stephenson D T, Manetta J V, White D C, *et al*. Calcium-sensitive cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) is expressed in human brain astrocytes. Brain Res, 1994, 637(1～2): 97

7 Stephenson D T, Lemere C A, Selkoe D J, *et al*. Cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain. Neurobiol Dis, 1996, 3(1): 51

8 Skannal D G, Eis A L, Brockman D, *et al*. Immunohistochemical localization of phospholipase A_2 isoforms in human myometrium during pregnancy and parturition. Am J Obstet Gynecol, 1997, 176(4): 878

(收稿: 1998-09-07; 修回: 1999-08-11)
(编辑 张大春)

Effects of lipopolysaccharide on expression of cytosolic phospholipase A_2 in hepatic tissues after endotoxemia in rats

Zhao Shuming, Kang Gefei, Hua Chuan, Lei Manping, Hu Zhenguo (Central Clinical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstrac **Objective**: To study the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of cytosolic phospholipase A_2 ($cPLA_2$) in the hepatic tissues during endotoxemia in rats. **Methods**: 30 Wistar rats were randomized into the control and LPS-treated groups. The indicators of liver functions and the level of prostaglandin E_2 (PGE_2) in the serum of all the experimental animals were determined. The frozen sections of the liver tissues, after incubation and immunostaining, were studied with SP method to look for the expression of $cPLA_2$. **Results**: The activity of ALP and ALT and PGE_2 level were higher in the serum of LPS-treated group than in the control and $cPLA_2$ expression was also significantly higher in the LPS-treated group. **Conclusion**: $cPLA_2$ may contribute to elevate the serum level of PGE_2 during endotoxemia in rats.

Key words lipopolysaccharide; liver; phospholipase A_2; rat

文章编号: 1000-5404(1999)10-0755-02

Natacyn 眼液治疗真菌性角膜溃疡 9 例临床报告

Report of 9 cases of keratomycosis treated with Natacyn

黄小勇* 贺翔鸽 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所眼科) 重庆, 400042

真菌性角膜溃疡在我国有增多趋势[1], 但国内用来局部治疗该病的药物尚不够理想。本院近来用 5% Natacyn 眼液(ALCON 公司)治疗 9 例真菌性角膜溃疡取得较好结果, 报告如下。

1 临床资料

9 例患者, 男性 8 例, 女性 1 例。年龄 10～65 岁, 平均年龄 41.5岁。右眼 3 例, 左眼 6 例, 以上病例均经刮片查出霉菌菌丝及孢子。确诊后根据病情轻重程度用 5% Natacyn 眼液滴患眼 1 次/2 h, 并常规用 1%阿托品眼液散瞳。结果 8 例治愈, 1 例有效, 痊愈 8 例的疗效最短为 8 d, 疗效最长为 31 d, 平均 20.6 d。

典型病例: 男, 10 岁。左眼红痛、异物感伴视力下降 15 d。患儿 15 d 前因腐烂枝叶刺伤左眼后发病, 曾在当地医院给予抗生素眼液无效, 后疼痛逐渐加重, 遂来我院。眼部检查: 左眼视力光感, 角膜中央 7 mm×6 mm 浸润, 偏下方 6 mm×4 mm 乳白

(下转 759 页)

* 黄小勇, 男, 26 岁, 住院医师, 硕士研究生

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