DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.024

胞液型磷脂酶 A_2在大鼠内毒素血症时肾脏中的表达

经验交流

Expression of cytosolic phospholipase A_2 in kidney during endotoxemia in rats

赵树铭* 雷曼平 华 川 胡珍国 (第三军医大学附属西南医院检验科) 重庆, 400038
康格非 蒋纪恺 (重庆医科大学医学检验系) 重庆, 400046

提 要 目的: 探讨胞液型磷脂酶 A_2($cPLA_2$)在大鼠内毒素血症时肾脏中的表达。方法: 选用 Wistar大鼠30只,分为对照组和内毒素致伤组,分别检测血浆肾功能生化指标和前列腺素 E_2(PGE_2)的含量,并观察肾脏组织冰冻切片 $cPLA_2$的免疫组化变化。结果: 内毒素血症大鼠血浆中尿素和肌酐以及血清前列腺素 E_2含量均有升高,肾脏组织 $cPLA_2$表达显著增强。结论: $cPLA_2$可能在内毒素致肾损伤中具有一定的作用。

磷脂酶 A_2(Phospholipase A_2; PLA_2)是特异性水解甘油磷脂骨架上 Sn-2位酰基的脂质水解酶,在哺乳动物中具有多种类型,广泛存在于人及动物的多种细胞和分泌物。胞液型磷脂酶 A_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酶类,参与细胞内信号传递、免疫应答、炎症效应等功能[1,2]。革兰氏阴性细菌感染以及由此引发的内毒毒血症、全身内源性炎症反应综合症、败血症休克及多器官功能障碍综合症,甚至死亡,往往是一个连续的病理发展过程。磷脂酶 A_2在这一病理进程中是一个关键的环节,起着限速酶的作用[3]。由于磷脂酶 A_2的多样性和器官特异性,本研究旨在观察内毒素致大鼠肾损伤时 $cPLA_2$的可能作用。

1 材料和方法

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。$cPLA_2$抗体和标准品由美国 Bolognese博士(Smith Kline Beecham Co.)惠赠。肾功能指标包括尿素(Urea)、尿酸、肌酐(Cr)、钾、钠、氯、二氧化碳、钙和葡萄糖等,试剂购自美国 Beckman公司。

1.2 动物分组和处理

Wistar大鼠,雄性,180~250 g, 30只(第三军医大学实验动物中心提供),分为对照组6只(注入0.85% NaCl 0.8 ml),内毒素致伤组的各时相点各6只,内毒素自尾静脉注入(500 μg/kg),分别于伤后3、6、12、24 h后麻醉动物取血标本,甲醛全身灌注固定后取肾脏标本。

1.3 血清 PGE_2含量

采用 ELISA方法,按试剂盒说明书进行。

1.4 血浆肾功能生化指标测定

采用 Beckman CX-7全自动生化分析仪进行。

1.5 肾脏 $cPLA_2$蛋白的表达

肾组织经冰冻切片后,以 $cPLA_2$特异性抗体行免疫组化检测[4]。

1.6 统计学处理

计算 $\bar{x} \pm s$,用 t检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 大鼠常规肾功能指标的变化,见表1

可见内毒素处理组大鼠血浆尿素和肌酐含量显著升高。其余指标未见异常。

表1 内毒素致伤大鼠常规肾功能指标的变化

	对照组	内毒素致伤组(h)			
		3	6	12	24
Urea(C_B/mmol·L^{-1})	4.25±0.15	5.40±0.12	5.98±0.23	6.85±0.24※	6.25±0.26※
Cr(C_B/μmol·L^{-1})	32.1±2.8	38.6±2.9	44.8±3.5	68.2±4.5※※	46.4±3.8※

※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ 与对照组比较

* 赵树铭,男,33岁,主管技师,硕士

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

2.2 大鼠血清 PGE_2含量的变化,见表 2

可见内毒素处理组大鼠血清中 PGE_2含量升高。

2.3 大鼠肾脏组织 $cPLA_2$表达的变化

正常大鼠肾脏组织中 $cPLA_2$有一定的表达,见图 1 内毒素致伤后可见肾脏中 $cPLA_2$的表达明显增强,尤以 12 h 组为甚,见图 2,主要见于肾小球和肾小管等。

表 2 内毒素致伤大鼠血清中 PGE_2含量的变化

	伤后时间 (h)	PGE_2 (pg/ml)
对照组		280± 80
内毒素组	3	320± 75
	6	350± 86
	12	380± 92
	24	320± 84

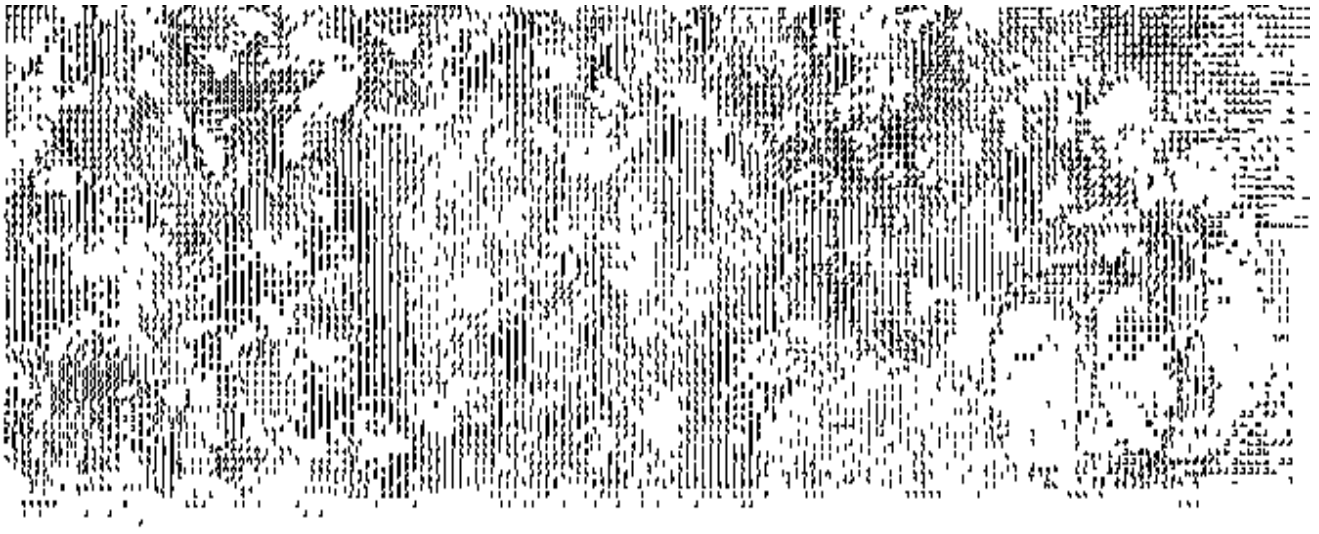


图 1 正常大鼠肾脏组织 **$cPLA_2$**的表达 (呈弱阳性反应) (S-P× 400)

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

3 讨论

哺乳动物体内存在多种类型的磷脂酶 A_2,根据其生物学特性主要可分为两种基本类型: 钙离子依赖性磷脂酶 A_2和钙离子非依赖性磷脂酶 A_2 研究较多的是钙离子依赖性磷脂酶 A_2,主要有胰腺型、滑液型和胞液型 PLA_2 前两种均呈小分子量、分泌型,对胰腺炎和类风湿性关节炎等的发病过程起着重要作用。胞液型磷脂酶 A_2则是大分子量,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、巨嗜样细胞以及肾脏、肝脏和脑组织中检出[1~3,5]。已经证明,$cPLA_2$参与某些培养细胞中 (HL-60)花生四烯酸的释放,因而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强阳性反应,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完全证实该细胞产生 $cPLA_2$,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。Skannal 等[7]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。最近的研究表明癌基因 Ras 参与 $cPLA_2$的激活过程[8]。$cPLA_2$在人和大鼠之间具有很高的同源性 (95%),抗体具有交叉反应能力,我们以此抗体进行大鼠肾脏组织免疫组化检测时效果良好。阴性对照无棕褐色沉淀颗粒出现。本实验表明,内毒素可致大鼠肾功能损害,导致血浆中尿素和肌酐含量升高,同时血清中炎症介质 PGE_2含量也升高,肾脏 $cPLA_2$表达明显增强,主要位于肾小球和肾小管,且与血浆肾功能指标的变化相一致,提示内毒素引起前列腺素类炎症介质的产生过程中 $cPLA_2$具有重要作用。这一结果与已经报道的Ⅱ-PLA_2也在肾脏中表达的结论说明内毒素所致的肾脏损伤病理过程至少有两种类型的 PLA_2参与。这一结论也有助于今后选择用药,因为根据不同类型 PLA_2设计的抗炎抑制剂是不一样的。据推测,内毒素可引起体内促炎症性细胞因子如 TNF-α、白介素-1等增多,这类炎症细胞因子可能诱导和激活 $cPLA_2$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。但有关脂类炎症介质的产生及调控机制是非常复杂的生理或病理

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

过程,PLA_2在炎症介质产生过程中的作用以及调控机理仍不十分明确,有待进一步深入研究。

(致谢:感谢美国 SmithKline的 Bolognese博士提供 $cPLA_2$抗体和标准品及相关资料。)

关键词 内毒素;磷脂酶 A_2;大鼠;肾脏

中图法分类号 Q556.1;R392.11

参考文献

1 杜晓燕,周元聪.磷脂酶 A_2的生理机能新说.生命的化学,1997,17(1):12

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. Infection, 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,王伯 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 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

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 Research, 1994, 637(1-2): 97

7 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

8 Heasley L E, Thaler S, Nicks M, *et al*. Induction of cytosolic phospholipase A_2 by oncogenic Ras in human non-small cell lung cancer. J Biol Chem, 1997, 272(23): 14501

(收稿:1998-02-09;修回:1998-05-15)

(编辑 王 红)

NADase细菌毒素的非放射性测定法*

Non-radioassay of NADase bacterial toxins

金晓琳** 黎 庶 胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室)重庆,430038

提 要 目的:建立一种测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定法。方法:建立一个 NAD(辅酶 I)依赖的显色系统,在该系统中,NAD接受乳酸脱氢酶(LDH)从乳酸脱下来的氢,再通过 PMS(吩嗪二甲酯硫酸盐)传递给 INT(碘化硝基四氮唑蓝),使后者还原而显色。如果 NADase毒素分解 NAD,就会打断递氢链而抑制显色反应。结果:显色系统中,NAD含量与显色有良好线性关系($R=0.9898$)。绿脓杆菌外毒素 A分解 NAD而抑制显色反应。以毒素含量为自变量,以毒素对显色反应的抑制为应变量,建立了对数线性回归方程 $Y=12.5X^{0.26}$,当 $Y=50\%$时[即显色系统中的 NAD有半数(250ng)被分解],$X=207$(ng)。定义分解 1ng NAD的毒素活性为一个单位,则 207ng毒素含有 250个毒素活性单位。该方法的测定敏感性达到"ng"水平。结论:本方法是一种敏感的测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定方法。

NADase细菌毒素是一类由细菌产生的能够分解 NAD(辅酶 I)的毒素[1]。这类毒素包括白喉毒素[2]、霍乱毒素及大肠杆菌不耐热肠毒素[3,4],绿脓杆菌外毒素 A等[5,6]及百日咳毒素[7]。过去测定这类毒素的活性采用的是 ADP核糖基化活性分析(ADP-ribosglation assay)[1~5]。该方法是测定毒素分解 ^{14}C-NAD,并将具有放射性标记的 ADPR转移到延长因子 EF-2上去的能力。但是 ^{14}C是长半衰期(5730年)的同位素,许多实验室都限制使用,使得该方法的使用受到极大限制。本研究建立了一种测定 NADase细菌毒素活性的非放射性测定法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

① 菌株与毒素:菌株为本室保存的国际标准产毒株 PA-103株。纯化后的绿脓杆菌外毒素 A,用 pH 8.0, 10 mmol/L

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39770359

** 金晓琳,女,34岁,实验师

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