DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.017

血小板活化因子拮抗剂 BN50739对内毒素损伤肝脏的保护作用

张继航* 胡友梅 (第三军医大学基础医学部药理学教研室)重庆, 400038

提 要 目的: 观察内毒素(LPS)与血小板活化因子(PAF)对 Wistar大鼠肝脏的损伤作用及 PAF拮抗剂 BN50739的预防保护作用。方法: 用生化法测定血清天门冬酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)和组织丙二醛(MDA),组化染色积分光密度法测定线粒体 SDH酶活性并观察肝组织形态学改变,观察体外培养肝细胞存活率和所释放 LDH,并应用 DPH探针测定细胞膜流动性的变化。结果:① BN50739可不同程度地降低 LPS和 PAF致血清 AST、ALT、LDH及组织 MDA升高($P<0.05$~0.01),并明显减轻线粒体标志酶 SDH所受 LPS和 PAF的损害($P<0.05$)。② LPS和 PAF在体内都可使肝组织发生充血、肝血窦扩张、炎细胞浸润等炎性改变, LPS还可使肝脏产生明显的局灶性坏死, BN50739(10 mg/kg)可使肝脏损害有一定程度的减轻;③ 肝细胞分别与 LPS或 PAF孵育,其培养上清 LDH无明显升高,但 LPS和 PAF均可使肝细胞膜流动性降低($P<0.01$),而 BN50739(50 ng/ml)可减轻 PAF导致膜的流动性降低($P<0.05$)。结论: BN50739对 LPS和 PAF所致的肝脏损害起一定的保护作用。

关键词 BN50739;内毒素;血小板活化因子;肝损害
中图法分类号 R996

血小板活化因子(Platelet activating factor, PAF)是近年来在炎症和过敏反应中具有广泛生物学活性的脂质介质[1]。众多的研究表明,内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)与 PAF有着极为密切的关系。BN50739是近年来根据 PAF拮抗剂的结构特点新合成的活性很强的一种 PAF特异性受体拮抗剂,也是至今所发现的活性最强的新型拮抗剂[2]。本研究从整体与离体两方面研究了 LPS及 PAF对肝脏的损害作用以及 PAF拮抗剂 BN50739对肝损害的影响,以求进一步探讨 PAF拮抗剂保护肝脏的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar大鼠,体重 180 g~ 200 g,雌雄不拘,由本校动物实验中心提供。整体实验分 5组(剂量经预实验确定): 损伤组(BD组),分别给予 PAF(50μg/kg)和 LPS(5 mg/kg), iv; 预处理组(GE组),损伤前 15 min给予 BN50739 10 mg/kg, ip; 对照组给生理盐水。各药体积均为 0.2 ml,肝细胞膜流动性实验也分 5组: 损伤组(Ⅱ、Ⅳ),分别给予 PAF(0.01μg/ml)和 LPS(0.1μg/ml); 预处理组(Ⅲ、Ⅴ),根据 BN50739与其它 PAF拮抗剂的活性比较[3],经预试后选择较大剂量 50 ng/ml,在损伤前 5 min加入细胞悬液中; Ⅰ为对照组。

1.2 观察指标与方法

1.2.1 整体实验

1.2.1.1 血液生化测定 损伤后 8 h,乙醚麻醉动物,心脏穿刺取血,分离血清用自动生化分析仪测天门冬酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)。

1.2.1.2 组织中丙二醛(MDA)的测定 损伤 8 h后活杀动物,称取肝组织 0.5 g,滤纸吸干组织血后,常规法以荧光分光光度计测定组织 MDA[4]。

1.2.1.3 组织形态学及琥珀酸脱氢酶(SDH)组织化学染色 动物在给药后 8 h活杀,取肝组织经 10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋;切片,作 HE染色。并采用陈啸梅[5]方法,作 SDH染色,将每组 8张切片用图像分析系统测定积分光密度值(每张测 10个点),所得数据作统计分析。

1.2.2 体外实验

1.2.2.1 肝细胞的分离、纯化与培养 参照王宇明[6]方法,分离培养肝细胞。苔盼蓝染色存活率在 90%以上用于实验。置 37℃ 5% CO_2培养箱中孵育 4 h后更换培养液,弃去未贴壁细胞加入不同浓度的 PAF或 LPS分别继续培养,在不同时相取样观察直至 20 h。每份标本用苔盼蓝排斥法测 10个视野(放大 100倍)的肝细胞存活率。收集上清,测 LDH。

1.2.2.2 肝细胞膜流动性的测定[7] 将分离肝细跑悬于 0.01 mol/L磷酸缓冲液中,调整细胞密度为 5×10^6个/ml。每份取细胞悬液 2 ml,分别加入 LPS、PAF和 BN50739; DPH液 2 ml(终浓度为 2×10^{-6} mol/L); 25℃温育 30 min, 500× g离心 5 min,弃上清、沉淀用 PBS洗涤两次后;荧光分光光度计测荧光偏振度(P),并按 Pertrin公式计算平均微粘度。在 25℃室温时,平均微粘度(η)= $2P/(0.46-P)$。

1.3 统计学处理

用 Student's t检验进行组间比较,结果以 $\bar{x}\pm s$表示。

* 张继航,男,29岁,助教,硕士,现在第二军医大学基础医学部 523药物研究室 上海, 200433

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

2 结果

2.1 整体实验

2.1.1 BN50739对 LPS、PAF损伤肝脏时血生化的影响　注射 PAF或 LPS后 8 h的大鼠,血清 AST、ALT、LDH均较对照组明显升高($P<0.01$)。预先给予 PAF拮抗剂 BN50739(5 mg/kg)后,可明显减轻 LPS和 PAF所致 AST、ALT、LDH的升高($P<0.05$~0.01),见表 1。

2.1.2 BN50739对 LPS、PAF损伤肝脏后 MDA的影响　动物在注射 PAF或 LPS后 8 h,肝组织 MDA较对照组明显增加($P<0.01$)。预先给予 PAF拮抗剂 BN50739(5 mg/kg)后,可明显减轻 LPS和 PAF所致动物肝组织 MDA的升高($P<0.05$~0.01),尤以对 PAF的作用更为明显($P<0.01$),见表 1。

2.1.3 BN50739对 LPS、PAF损伤肝脏后 SDH酶活性的影响　酶阳性呈深蓝色细颗粒弥漫均匀分布于肝细胞浆中。对照组染色深的部位主要集中在汇管区周围,近中央静脉处染色稍浅淡。LPS及 PAF组在给药后 8 h肝组织的 SDH酶染色比对照组明显下降,积分光密度值 D_A(OD)降低,相差非常显著($P<0.01$)。预先给予 BN50739可使 D_A值较损伤组(LPS及 PAF)明显减少($P<0.05$),但与对照组比仍有降低($P<0.05$~0.01),表明损伤仅有一定程度的减轻,见表 1。

表 1　BN50739对 LPS及 PAF损伤大鼠的血清 AST、ALT、LDH,组织 MDA和 SDH染色 D_A值的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The effects of BN50739 on serum AST, ALT and LDH of rats, tissue MDA and D_A of SDH staining of rat injuried by LPS and PAF($\bar{x}\pm s$)

Group	AST(IU/L)	ALT(IU/L)	LDH(IU/L)	MDA(nmol/g)	D_A
A(Control)	109.8± 34.1	70.4± 15.4	141.8± 51.2	76.9± 11.5	290.1± 30.5
B(PAF)	327.2± 84.0*	197.4± 38.7*	834.2± 129.1*	134.0± 32.7*	226.9± 44.2*
C(PAF+ BN)	191.2± 42.9*##	117.6± 32.0*##	277.2± 93.1##	83.3± 21.3##	261.9± 42.5#
D(LPS)	657.8± 150.0*	408.8± 93.1*	1715.8± 285.6*	144.5± 29.5*	217.0± 41.5*
E(LPS+ BN)	452.2± 84.3*#	291.4± 49.6*#	1155.8± 292.4*##	110.8± 27.2#	252.6± 33.8*#

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* control;#: $P<0.05$,##: $P<0.01$ *vs* the group without BN50739 pretreatment

2.1.4 组织形态学观察　给 PAF后 8 h,肝组织可见明显的中央静脉扩张、充血,肝血窦亦见轻度扩张,小叶间静脉淤血,门脉区炎性细胞浸润,附近肝细胞胞浆结构疏松,但未见明显坏死病灶。BN50739可明显改善 PAF所引起上述肝组织损伤,组织结构基本正常。给内毒素后 8 h肝组织除上述变化外,尚可见较多明显的小叶内局灶性肝细胞坏死,伴有中性粒细胞浸润、变性、坏死,约 2~4个小叶可见 1个微脓肿。BN50739可使肝组织损伤明显减轻,肝血窦扩张,炎性反应减轻,肝索结构基本正常。坏死灶明显缩小并减少,约 6~8个肝小叶才见一个。

2.2 体外实验

2.2.1 LPS、PAF对体外培养肝细胞的作用　LPS(10 ng/ml~100 μg/ml)及 PAF(10 pg/ml~200 ng/ml)各种浓度分别与肝细胞共同孵育 20 h(不含换液前 4 h),各组不同时相的培养上清其 LDH值间差异均不明显(具体数据从略),用苔盼蓝染色排除法计存活率,细胞活力差异也不明显。

2.2.2 BN50739对 LPS、PAF损伤肝脏膜流动性的影响　LPS及 PAF均可使肝细胞膜偏振度(P)和膜微粘度(η)明显升高,即肝细胞膜流动性明显降低。预先给予 BN59739(50 ng/ml)可在一定程度上减轻 PAF引起的膜流动性降低($P<0.05$),但对 LPS则无明显的防止作用($P>0.05$),见表 2。

表 2　BN50739对 LPS及 PAF损伤大鼠肝细胞膜荧光偏振度及膜微粘度的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The effects of BN50739 on fluorescence polarization and microviscosity of hepatocyte membrane of rat injuried LPS and PAF ($\bar{x}\pm s$)

Group	P	η(Po)
Ⅰ (Control)	0.186± 0.004	1.361± 0.047
Ⅱ (PAF)	0.210± 0.004**	1.685± 0.062**
Ⅲ (PAF+ BN)	0.202± 0.007**#	1.565± 0.098**#
Ⅳ (LPS)	0.221± 0.014**	1.863± 0.229*
Ⅴ (LPS+ BN)	0.214± 0.009**	1.751± 0.141*

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* control;#: $P<0.05$,##: $P<0.01$ *vs* the group without BN50739 pretreatment

3 讨论

3.1 BN50739保护 LPS及 PAF对细胞膜的损伤　膜结构及功能的损伤可表现在膜的流动性的改变和细胞内酶(AST、ALT、LDH等)的外溢。在内毒素血症的过程中细胞膜是氧自由基、溶酶体酶、细胞因子

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

及补体的首要攻击位点,使细胞膜受损。文献报道,给鼠 PAF后,分离其枯否细胞及中性粒细胞,在有或无多种刺激因素作用下均见超氧化物含量增加,尤以巨噬细胞为甚[8]。PAF受体拮抗剂 BN50739可减少在体 PAF及 LPS引起 AST、ALT和 LDH的释放和 MDA的生成,减轻膜流动性的降低,以及改善组织形态的改变,而以对 PAF的拮抗更为明显。说明 BN50739对内毒素所致的肝损伤具有一定保护作用,因而,减轻膜损害是其保护机制之一。

3.2 LPS、PAF直接和间接对肝细胞的作用及二者间的关系

目前 LPS在体外对培养肝细胞的直接毒性作用意见还不一致,有人认为 LPS有肝细胞毒作用,可在 ng水平引起肝细胞培养上清的 MDA LDH升高,提示可通过脂质过氧化直接损害肝细胞[9]。但相反意见则认为 LPS在体外并无直接损伤肝细胞的作用,不能使培养上清的 LDH明显增高及肝细胞^{3}H亮氨酸的整合降低,而需要巨噬细胞或枯否细胞的共同作用[10]。本实验也证实单独 LPS及 PAF与肝实质细胞共同培养时无明显的损害作用,仅表现为膜流动性降低。众所周知,在肝细胞膜上不存在 LPS的特异性受体,肝细胞膜与 LPS的结合主要为一种非特异性的结合。膜流动性的降低可能归因于 LPS疏水区与膜磷脂成分的非特异性结合。此外,Wistar大鼠可能对 LPS有一定的耐受力,而 LPS对小鼠体外培养的肝细胞则有直接毒性作用,表现为细胞存活率明显下降,培养上清的转氨酶升高[11]。

单独 PAF对体外肝细胞的毒性作用一直未见报道,本实验发现 PAF对肝细胞直接毒性作用并不明显,仅膜流动性降低,表明细胞膜有一定的损害。PAF受体在肝脏主要存在于枯否细胞和内皮细胞中,在肝细胞上很少。在整体实验 PAF可损伤肝脏,因此可设想 LPS、PAF等损伤肝脏首先活化中性粒细胞及巨噬细胞(包括枯否细胞),粘附于肝血管内皮,然后两者被激活,释放氧自由基及其它炎性介质,如肿瘤坏死因子(TNF)、IL-1、IL-6、LTs和补体系统等,形成一个复杂的网络,产生"瀑布"效应,从而对肝实质细胞产生损伤。

PAF拮抗剂 BN50739并不能完全防止 LPS的损伤作用,仅能对 LPS诱导 PAF产生的后续效应起到抑制作用,也说明 LPS对肝的损害不仅通过 PAF,还通过其它途径。尽管如此,PAF拮抗剂对预防治疗内毒素血症和内毒素休克还是不失为一较有希望的药物。目前,PAF拮抗剂应用于临床治疗严重的菌血症及内毒素休克患者已收到了较好的临床治疗效果[12]。

参考文献

1 Braquet P, Touqui L, Shen T Y *et al*. Perspectives in PAF Research. Pharmacol Rev, 1987; 9: 97

2 Yue T L, Rabinovici R, Farhat M *et al*. Pharmacologic profile of BN50739, a new PAF antagonist *in vitro* and *in vivo*. Prostaglandins, 1990; 39: 469

3 Yue T L, Gleason M M, Gu J L *et al*. Platelet-activating factor (PAF) receptor-mediated calcium mobilization and phosphoinositide turnover in neurohybride NG 108-15 cells: studies with BN50739, a new PAF antagonist. J Pharmacol Exp Ther. 1991; 257(1): 374

4 Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979; 95: 351

5 陈啸梅.脱氢酶及四唑还原酶.见:陈啸梅,周文郁,彭俊云等编.组织化学手册.北京:人民卫生出版社,1982: 64~87

6 王宇明,陈国致,董家鸿等.分离肝细胞的一种体外灌流法.中华消化杂志,1994; 14(3): 175

7 林克椿,聂松青,薄惠卿等.用荧光探针 DPH研究腹水癌细胞膜脂流动性.生物化学与生物物理学进展,1981; 6(1): 32

8 Gardner C R, Laskin J D. Platelet activating factor induced calcium mobilization and oxidative metabolism in hepatic macrophages and endothelial cells. J Leukoc Biol, 1993; 53: 190

9 王 涛,陈惠荪,汪江淮等.内毒素对体外培养肝细胞脂质过氧化损伤的作用.第三军医大学学报,1992; 14(1): 18

10 王宇明,丁 健,顾长海等. LPS/TNF所致肝细胞损害机理的体外研究.中华传染病杂志,1996; 14(1): 1

11 王宇明,大西弘生,武藤泰敏等.肝非实质细胞在内毒素所致肝细胞损害中的作用.中华消化杂志,1994; 14(5): 277

12 Dhainaut J F A, Tenaillon A, Tulzo Y L *et al*. Platelet-activating factor receptor antagonist BN52021 in the treatment of severe sepsis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter clinical trial. Cri Care Med, 1994; 22(11): 1720

(收稿: 1997-09-15;修回: 1998-01-11)

(编辑 冷怀明)

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

Protective effects of platelet-activating factor antagonist BN50739 on lipopolysaccharide-induced hepatic injury in rats

Zhang Jihang, Hu Youmei (Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the injurious effects of endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) and platelet-activating factor (PAF) on the liver and the protective effects of PAF antagonist BN50739 in rats. Methods: The changes of AST, ALT, LDH and tissue MDA were measured and mitochondrial SDH activity and the morphology of hepatic tissue observed *in vivo*. Meanwhile, the survival rate of hepatocytes, supernatant LDH of cultured hepatocytes and hepatocytic membrane fluidity were also detected. Results: ① The marked increase in serum AST, ALT and LDH and tissue MDA induced by LPS and PAF were significantly reduced by pretreatment with BN50739 ($P < 0.05$). ② The decrease of SDH in the liver by LPS and PAF was also significantly improved by BN50739 ($P < 0.05$). ③ BN50739 could partially attenuate such morphological changes induced by LPS and PAF in the liver as central vein hyperemia, hepatic sinusoid dilation and inflammatory infiltration. Multifocal necrosis was observed only in the case of LPS. ④ There was no marked increase of the supernatant LDH of cultured hepatocytes but the membrane fluidity was markedly decreased by LPS and PAF. Conclusion: BN50739 has some protective effects on hepatic injury induced by LPS and PAF via suppressing peroxidation and protecting hepatic energy metabolism pathway.

Key words BN50739; endotoxin; platelet-activating factor; liver injury; rat

舌腹涎腺肌上皮瘤一例报告

A case report of salivary glands myoepithelioma at the ventral surface the tongue

陈 泽* 李慧增 (第三军医大学附属西南医院口腔科) 重庆, 400038

涎腺肌上皮瘤是颌面部少见肿瘤,发生于舌部组织更为罕见,现将我们遇到的1例报告如下。

患者黄某,男, 59岁,因左舌胜利部无痛性包块2月入院。检查:舌腹左侧部触及一约3.5 cm×3.0 cm×3.0 cm大小突起包块,质硬,不活动,界线清楚,包块中央有一纵行糜烂,有白色分泌物覆盖,全身检查未见异常。在局麻下行左舌腹部包块切除术,术中见瘤体组织内、上、外侧有肌肉包裹,包块有包膜、质硬。

病理检查示:送检舌腹部肿块见瘤组织,瘤细胞呈梭形,圆形,卵圆形,深染,部分胞浆空,部分嗜酸性,瘤细胞呈巢团状,梁索状分布,间质纤维组织增生,较多淋巴细胞浸润,血管扩张充血。免疫组化染色:肿瘤细胞 Actin(肌动 Pr)阳性,细胞角 Pr阳性, S-100蛋白阳性。病理诊断:(舌腹)涎腺肌上皮瘤。

关于肌上皮瘤的系统报告较少,根据 Sciubba等的统计资料,肌上皮瘤约占所有涎腺肿瘤的1%,发生部位以腮腺居多,颌下腺次之,小涎腺以腭部居多[1]。肌上皮瘤在临床上表现为良性过程,但缺乏更多的临床特点,故其确切诊断依赖于病理检查。肌上皮瘤的生物学行为与多形性腺瘤基本相似,故治疗原则也相同。本例术后6月随访无复发。

关键词 舌部;涎腺;肌上皮瘤

中图法分类号 R739.86

参考文献

1 俞光岩.涎腺疾病.北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1994. 132~134

(收稿: 1997-04-18;修回: 1998-05-25)

(编辑 王 红)

* 陈 泽,男,35岁,住院医师,学士,进修生,攀枝花市第二人民医院口腔科,攀枝花, 617000

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