DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.019

哮喘豚鼠磷脂酶 A_2 的变化及其抑制剂的作用

洪 新 杨肇亨 陆松敏* (第三军医大学附属大坪医院呼吸内科) 重庆, 630042

提 要 目的: 探讨磷脂酶 A_2 (PLA_2)在哮喘和气道高反应发生中的作用及机理。方法: 采用卵蛋白致敏豚鼠哮喘模型,观察支气管肺泡灌洗液(BALF)中 PLA_2 活性变化及与气管平滑肌条最大收缩反应性(E-max)的关系,以及 BALF中细胞数、LPO 蛋白质含量的变化及 PLA_2 抑制剂的防治作用。结果: 哮喘组 BALF中 PLA_2 活性及 Emax 显著增高, BALF中细胞计数及 LPO 蛋白质含量也显著升高; BALF中 PLA_2 活性与 Emax 显著相关,也与细胞总数和 LPO 含量显著相关。氯喹及地塞米松防治组 Emax 及 BALF中 PLA_2 活性、细胞计数和 LPO 含量显著降低。结论: PLA_2 在哮喘豚鼠的气道炎细胞浸润和气道高反应性发生中有重要作用。

关键词 磷脂酶 A_2;哮喘;气道高反应性;氯喹;地塞米松

中图法分类号 Q556.1

磷脂酶 A_2 (PLA_2)与支气管哮喘和气道高反应性发生的关系已逐步受到重视,为探讨 PLA_2 在支气管哮喘和气道高反应发生中的作用和机理,本实验采用卵蛋白致敏豚鼠哮喘模型,在哮喘发作 24小时后检测支气管肺泡灌洗液(BALF)和血浆中 PLA_2 活性变化,检测 BALF中各种细胞计数、脂质过氧化物(LPO)、蛋白质的含量及气管平滑肌条对组织胺的最大收缩反应(Emax)。观察 PLA_2 抑制剂磷酸氯喹以臁地过时米松预先腹腔用药两天的防治效果,从而探寻哮喘治疗的新思路。

1 材料与方法

体重 250 g~300 g雄性豚鼠,随机分 4组,每组 9~10只。哮喘组:参照 Hutson[1]法于 1、4、7 d面罩雾化吸入 1%卵蛋白致敏,3周后诱发哮喘。诱发前 2 d用 0.9% NaCl 0.5 ml腹腔注射,每日 2次,诱发前 30 min再注射 1次,同时加用苯海拉明 10 $mg\cdot kg^{-1}$,诱发用 2%卵蛋白吸入 5 min,使动物出现典型哮喘发作;正常对照组:除致敏用 0.9%的 NaCl外,其余均同哮喘组;氯喹及地塞米松防治组:除腹腔注射分别用氯喹 10 $mg\cdot kg^{-1}$及地塞米松 1 $mg\cdot kg^{-1}$外,其余各步均同哮喘组。诱发哮喘 24 h后,清醒动物四肢固定,剪开股动脉取血 6 ml~7 ml,分离血浆,-20℃保存,盐酸微量滴定法[2]测量 PLA_2 活性。放血毕行气管插管,37℃生理盐水支气管肺泡灌洗两次,每次 5 ml(剔除回收率<50%者),合并两次 BALF,取 1 ml作细胞分类计数,余 BALF离心,分取 1.0、0.5、0.5 ml上清液用于检测 PLA_2 活性及 LPO、蛋白质含量。取 3 mm宽的中段气管一段,前正中剪开其长度约 10 mm,一端固定于装有 10 ml Kreb's缓冲液的浴怀底部,另一端接张力传感器,浴液 37℃恒温,持续通 95% O_2+5% CO_2混合气,调整肌条被动张力并稳定于 1 g后,间隔 2 min~3 min依次加入(10^{-8}~10^{-3}) mol/L组织胺进行刺激,连续记录肌条的张力变化,以肌条对组织胺的最大收缩作为判定气道反应性的指标[3]。

为了解氯喹及地塞米松对气道平滑肌有否直接作用,在肌条处于基础张力或被组织胺收缩并达到稳定后在缓冲液中分别加入终浓度为 62.5、100、100 μg/ml 的氨茶碱、地塞米松及氯喹与肌条共同孵育 10 min,记录每一种药物对肌条张力的影响。

LPO含量测定用硫代巴比妥酸荧光微量法,蛋白质含量测定用 Lowry法。BALF中细胞分类计数采用血细胞分类计数法。

统计学处理: 采用非配对计量资料 t 检验和直线相关分析。

2 结果

2.1 一般情况

用过敏原激发,正常对照组无哮喘发作;致敏豚鼠均在 5 min内出现典型哮喘发作;氯喹、地塞米松防治组诱发时只有半数(8/15)的动物出现哮喘发作,且症状出现时间晚于哮喘组,喘息症状也轻。

2.2 BALF中 PLA_2 活性、细胞计数和气管平滑肌的反应性及氯喹,地塞米松的防治作用见表 1

表 1 哮喘豚鼠 BALF、血浆中 PLA_2 活性和气管平滑肌条反应性及氯喹、地塞米松的防治作用 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The changes of PLA_2 activity in BALF and plasma and Emax of trachea smooth muscle strips and the effects of chloroquine and dexamethasone on asthmatic guinea pigs ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	PLA_2(u)		Emax(mg)
		BALF	Plasma	
Control	8	4.17± 1.72	1.57± 0.70	1600± 95
Asthmatic	8	6.46± 1.88*	2.19± 0.62	2006± 211**
Chloroquine	8	4.06± 1.44	1.36± 0.88	1735± 187+
Dexamethasone	8	4.27± 1.80+	1.55± 0.75	1673± 128++

1 u= 1 $nmol\cdot ml^{-1}\cdot min^{-1}$;

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

+: $P<0.05$, ++: $P<0.01$ *vs* asthmatic group

* 附属大坪医院野战外科研究所第二研究室

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

从表 1可见,与对照组比,哮喘组 BALF中 PLA_2活性显著增高,血浆中 PLA_2活性也增高,但未达显著水平。哮喘组气管平滑肌条对组织胺的反应性显著增高;将两组中 Emax与 BALF中 PLA_2活性进行相关分析,结果二者相关显著(r= 0.517, P < 0.05)。

氯喹及地塞米松防治组 BALF中 PLA_2活性及气管平滑肌条对组织胺的反应性显著降低。

从表 2可见,哮喘组 BALF中细胞总数、嗜酸细胞、中性白细胞及上皮细胞数较对照组分别升高 1.1、10.1、2.3、1.9倍,差别显著;单核细胞增加 25%,但无显著差别。进行相关分析发现,BALF中 PLA_2活性与细胞总数显著相关(r = 0.614, P < 0.05)。

与哮喘组比较,氯喹地塞米松治疗组治疗组细胞总数、嗜酸细胞数均显著减少。

表 2 哮喘豚鼠 BALF中细胞计数(10^8/L)及氯喹,地塞米松的防治作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Number of cells(10^8/L) in BALF and effects of chloroquine and dexamethasone on asthmatic guinea pigs($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Total number	Eosinophil	Neutrophil	Monophage	Epithelial cells
Control	8	9.4± 1.74	0.55± 0.29	0.88± 0.63	7.46± 1.57	0.286± 0.156
Asthmatic	8	19.84± 3.02**	6.13± 1.95**	2.92± 1.52**	9.32± 2.46	0.822± 0.620*
Chloroquine	8	13.34± 1.84**++	3.05± 1.40**++	2.19± 1.06	7.58± 1.19	0.372± 0.273
Dexamethasone	7	11.07± 1.96+	1.80± 0.67**++	2.40± 2.22	6.27± 0.84	0.307± 0.316

*: P < 0.05;**: P < 0.01 *vs* control; +: P < 0.05,++: P < 0.01 *vs* asthmatic group

从表 3可见,哮喘组 BALF中 LPO及蛋白质含量与正常对照组相比显著增加;氯喹及地塞米松防治疗组 LPO含量较哮喘组显著减少。相关分析 BALF中 PLA_2活性与 LPO含量显著相关(r = 0.560, P < 0.05)。

表 3 哮喘豚鼠 BALF中 LPO蛋白质含量及氯喹、地塞米松的防治作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 The contents of LPO and protein in BALF and effects of chloroquine and dexamethasone on asthmatic guinea pigs($\bar{x}\pm s$)

Group	n	LPO(C_B/lnmol·ml^{-1})	Protein(P_B/lg·L^{-1})
Control	8	0.465± 0.056	0.670± 0.142
Asthmatic	8	0.681± 0.198*	0.926± 0.256*
Chloroquine	8	0.469± 0.094+	0.665± 0.401
Dexamethasone	7	0.503± 0.051+	0.674± 0.236

*: P < 0.05 *vs* control;
+: P < 0.05 *vs* asthmatic group

2.3 氯喹、地塞米松对离体气管肌条的作用

氨茶碱在 0.5 min内使肌条张力迅速下降,3 min后达到最大舒张并稳定在该水平;地塞米松在 5 min内使肌条逐渐舒张;作用明显弱于氨茶碱;而氯喹 10 min内对肌条无舒张作用,见表 4。

表 4 氯喹、地塞米松及氨茶碱对气管平滑肌条张力的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 The effect of chloroquine, dethamethasone and aminophylline to the tension of trachea smooth muscle strips($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Before challenge	After challenge
Control	5	1670± 154	1667± 153
Aminophyllin challenge	7	1630± 145	652± 112**
Chloroquine challenge	6	1503± 141	1520± 141
Dexamethasone challenge	6	1556± 151	1408± 127*

*: P < 0.05,**: P < 0.01 *vs* before challenge

3 讨论

PLA_2是特异性水解甘油磷脂 2酰基位上脂肪酸的磷脂水解酶,是一种重要的炎症因子和启动脂介质合成的关键酶。有文献报告哮喘患者 BALF、血清、白细胞、以及哮喘豚鼠肺组织中 PLA_2活性升高[4-6],伴花生四烯酸、LTD$_4$、PGF$_{2\alpha}$和 TXB$_2$水平增高,糖皮质激素受体、组织胺 H$_2$受体及β2受体下调,组织胺 H$_1$受体含量增加[7],哮喘患者白细胞 PLA_2活性与气道反应性相关[4],均提示 PLA_2与支气管哮喘和气道高反应性的发生有密切关系。本实验结果表明 BGALF中 PLA_2活性显著增加,并与气管平滑肌条的反应性及炎症细胞数量增加显著相关,用 PLA_2抑制剂磷酸氯喹和地塞米松防治不仅显著抑制 PLA_2的活性,同

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

时降低气管平滑肌的最大收缩反应性,减少 BALF中炎细胞数,气道粘膜损伤和嗜酸细胞浸润减轻,证实 PLA_2在哮喘豚鼠气道炎症和高反应性的发生中确实起着重要的作用。

本研究血浆中 PLA_2活性也有所升高,但未达到显著水平,可能与支气管哮主要是气道炎症,机体能代偿性分解入血的 PLA_2,以及动物模型与临床实际可能有一定差距等有关。

本研究还发现 BALF中 PLA_2活性与细胞总数及 LPO含量显著相关;其他学者也发现在体外 PLA_2与狗的白细胞共同孵育后其粘附、聚集、趋化和游走功能增加,LPO生成增多[8]。这表明 PLA_2与炎症组织中的炎细胞的聚集、激活及脂质过氧化损伤也有密切关系。

作为非特异性 PLA_2拮抗剂,糖皮质激素的作用有两个方面,一是抑制 PLA_2的 mRNA表达;二是诱导脂皮素(Lipocortin)生成。氯喹是常用的抗疟药,也是较强的 PLA_2抑制剂。本实验中氯喹对气管平滑肌无直接舒张作用,提示其药理效应可能主要通过抑制 PLA_2活性实现。本文的结果表明 PLA_2抑制剂对豚鼠过敏性哮喘确有疗效,也提示抑制 PLA_2活性可能是糖皮质激素治疗哮喘的重要机理之一。深入探讨 PLA_2在支气管哮喘发病中的作用及机理,可能对支气管哮喘的防治有重要意义。

参考文献

1 Hutson P A, Church M K, Clay T P *et al*. Early and late-phase bronchoconstriction after allergen challenge of nonanesthetized guinea pigs. Am Rev Respir Dis, 1988; 137(3): 548

2 陈思锋,吴中立.体液和组织磷脂酶 A2简便快速测定法.第二军医大学学报, 1989; 10(3): 254

3 Goldie R G, Papadimitriou J M, Peterson J W *et al*. Influence of the epithelium on responsiveness of guinea-pig isolated trachea to contractile and relaxant agonists. Br J Pharmac, 1986; 87(1): 5

4 Kashima N, Nakajima H, Katsura T *et al*. Study of serum phospholipase A_2 activity in bronchial asthmatic patients. Arerugi, 1993; 42(4): 723

5 Mehta D, Gupta S, Shailendra N *et al*. Increased leukocyte phospholipase A_2 activity and plasma lysophosphatidylcholine levels in asthma and rhinitis and their relationship to airway sensitivity to histamine. Am Rev Respir Dis, 1990; 142(1): 157

6 颜光涛,李振甲,吕宝璋.哮喘豚鼠肺组织磷脂酶 A2活性变化及其代谢产物前列腺素的变化.中华结核和呼吸杂志, 1992; 15(2): 89

7 吕宝璋.受体失衡和磷脂酶 A2激活与哮喘的关系.中华结核和呼吸杂志, 1993; 16(哮喘增刊): 13

8 陈思锋,张红红,李少华等.磷脂酶 A2与白细胞活性的关系.基础医学和临床, 1992; 12(5): 24

(收稿: 1996-03-20;修回: 1997-01-15)

(编辑　张大春)

Changes of phospholipase A_2 activity and effects of its inhibitors in asthmatic guinea pigs

Hong Xin, Yang Zhaoheng, Lu Songmin (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract **Objective**: To explore the role of phospholipase A_2 (PLA_2) in the occurrence of asthma and airway hyperresponsiveness and its mechanism. **Methods**: After the asthmatic model was established with ovalbumin aerosol in guinea pigs, the changes of PLA_2 activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and their relation with the responsiveness of strips of tracheal smooth muscle (Emax) were observed. Meanwhile, the changes of cell count and contents of lipid peroxide (LPO) and protein in BALF and the effects of PLA_2 inhibitors on asthma were also observed. **Results**: In asthma group, the PLA_2 activity, Emax, cell count and contents of LPO and protein were significantly increased ($P < 0.05$) and the first index was remarkably correlated with the others ($r = 0.517$, $P < 0.05$). In chloroquine-pretreated and dexamethasone-pretreated groups, all the five indices were significantly decreased. **Conclusion**: PLA_2 play an important role in the infiltration of inflammatory cells into airway and occurrence of airway hyperresponsiveness in the asthmatic guinea pigs.

Key words: phospholipase A_2; asthma; airway hyperresponsiveness; choroquine; dexamethasone; guinea pig

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