DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.030

血小板活化因子在家兔内毒素血症血流动力学紊乱中的作用*

经验交流

Role of platelet activating factor in hemodynamic changes during endotoxemia in rabbits

杜文华** 陈惠孙 胡德耀 陆松敏 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第一研究室) 重庆, 400042

提 要 目的: 观察 PAF在内毒素血症血流动力学改变中的作用及 PAF受体拮抗剂的防治效果。方法: 家兔 45只随机分成 5组,观察平均动脉压 (MAP)、心率 (HR)、呼吸 (RR)及心功能的变化。结果: 内毒素及 PAF均能引起心血管功能的显著抑制,表现为 MAP、LVSP、± dp/dt$_{max}$明显紊乱。心血管功能紊乱与循环 PAF水平是一致的。用 PAF受体拮抗剂可显著逆转由 PAF成内毒素引起的心血管功能紊乱。结论: PAF可能是引起内毒素血症时心功能紊乱的重要介质之一, PAF受体拮抗剂有明显的防治作用。

血小板活化因子 (Platelet activating factor, PAF)是内毒素休克时的重要脂介质之一。内毒素休克时血及组织中的 PAF水平均有明显的增加[1]。外源性 PAF可诱发内毒素休克类似的临床表现,用 PAF受体拮抗剂能有效使其逆转,保护器官组织免受损伤[2]。本研究重点探讨了 PAF在内毒素血症心血管功能紊乱中的作用以及 PAF受体拮抗剂的防治效果。

1 材料与方法

家兔 45只,雌雄不拘,体重 2.4± 0.6 kg, 3%戊巴比妥钠静脉麻醉。左股静脉插管以便取血及给药,右股静脉插管连续监测平均动脉压 (MAP),同时观察心率 (HR)、呼吸 (RR)。右颈总动脉插管至左心室,导管连血流动力学分析系统,测左室收缩压 (Lvsp)、左室压力上升及下降的最大速率 (± dp/dt$_{max}$)。5-HT释放法测血 PAF水平。分组: 生理盐水对照组 (I 组, n = 5);单纯内毒素处理组 (II 组, n = 15),内毒素 200μg/kg· bw· iv (Sigma公司, $O_{555}B_5$);内毒素并 BN52021预处理组 (III组, n = 11),内毒素剂量同前,预先 10 min经腹腔注射 BN52021 5 mg/kg· bw; PAF单纯给药组 (IV组, n = 8), PAF 0.1μg/kg· bw· iv; PAF并 BN52021预处理组 (V 组, n = 6)。

统计学处理: 所得数据均为 $\bar{x}$± s,采用 t检验。

2 结果

2.1 RR, HR的改变

内毒素或 PAF均可引起 RR, HR的明显加快,以 RR变化突出,约 5 h后渐呈平稳。家兔死亡前 RR, HR明显抑制。BN52021可显著改善家兔的呼吸节律,但对心率影响不大。

2.2 MAP的改变

内毒素可显著抑制 MAP水平,约 3 h后抑制作用减弱,但仍明显低于基础值。PAF能迅速降低 MAP水平,约 3~5 min达到最低, 30 min后渐至恢复。BN52021预处理可部分逆转内毒素的作用或完逆转 PAF的影响,见表 1。

表 1 内毒素血症家兔平均动脉压的变化 (ρ/kPa)

分组	基础值	内毒素血症后时间					
		5 min	30 min	2 h	4 h	6 h	8 h
I	12.02± 1.27	11.99± 0.83	11.19± 1.52	12.14± 1.66	11.27± 1.78	11.34± 1.46	10.77± 2.21
II	9.86± 1.52	6.93± 1.74*	5.86± 2.23**	6.93± 2.38**	5.59± 3.32*	6.13± 3.21*	6.92± 3.04**
III	11.46± 1.19	10.10± 0.71#	7.45± 2.92	8.25± 1.74	7.98± 3.13	9.84± 1.52	9.30± 2.66
IV	12.53± 1.19	4.93± 1.29**	8.96± 4.29	9.84± 3.20	9.06± 1.46	9.59± 1.58	8.13± 2.06
V	10.81± 1.03	8.74± 2.33△△	10.75± 2.41	10.96± 2.13	9.98± 2.03	11.29± 1.93	9.38± 2.08

*: P < 0.05, **: P < 0.01与 I 组比较; #: P < 0.05与 II 组比较; △△: P < 0.01与 IV 组比较

2.3 心功能的改变

2.3.1 Lvsp的变化 内毒素和 PAF能显著降低 Lvsp,但 PAF的作用仅持续数分钟,约 30 min后作用明显减弱。BN52021能显著逆转内毒素或 PAF的抑制作用,见表 2。

* 全军"八五"攻关项目

** 杜文华 男, 34岁,助理研究员,博士

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

表 2 内毒素血症家兔 Lvsp± dp/dt$_{max}$的变化

分组		基础值	内毒素血症后时间					
			5 min	30 min	2 h	4 h	6 h	8 h
Lvsp	Ⅰ	15.0± 3.9	10.1± 1.1	12.2± 2.8	12.9± 2.8	12.1± 2.0	13.2± 3.5	12.7± 2.4
(kPa)	Ⅱ	13.7± 3.2	8.0± 3.3*	8.8± 4.8*	10.2± 4.8*	8.3± 3.3*	8.4± 1.6*	9.7± 1.8
	Ⅲ	14.1± 5.1	11.9± 2.1#	13.2± 3.0	13.5± 3.0	12.9± 2.4	12.3± 2.6	12.5± 3.1
	Ⅳ	16.3± 2.3	9.9± 1.4**	12.9± 3.1*	14.9± 3.1	13.8± 1.5	12.7± 2.7*	10.2± 2.3
	Ⅴ	14.1± 3.1	13.8± 2.1△△	13.0± 3.9	12.4± 3.9	12.8± 1.8	13.0± 4.1	13.1± 3.9
+ dp/dt$_{max}$	Ⅰ	1.26± 0.13	1.39± 0.26	1.38± 0.18	1.29± 0.17	1.27± 0.16	10.25± 0.12	1.21± 0.11
(MPa· s^{-1})	Ⅱ	1.16± 0.17	0.73± 0.39**	0.62± 0.34**	0.59± 0.23**	0.53± 0.26**	0.59± 0.28**	0.49± 0.24**
	Ⅲ	1.07± 0.13	0.86± 0.25**	0.76± 0.15**	0.76± 0.37**	0.99± 0.12	0.91± 0.42#	0.85± 0.42#
	Ⅳ	1.35± 2.10	0.45± 0.21**	0.46± 0.21**	0.59± 0.23**	0.99± 0.39	0.99± 0.17	0.86± 0.25
	Ⅴ	1.15± 0.19	0.81± 0.13△	0.95± 0.29△	0.96± 0.15	0.99± 0.40	0.92± 0.24	0.84± 0.14
- dp/dt$_{max}$	Ⅰ	0.79± 0.13	0.88± 0.18	0.87± 0.09	0.72± 0.12	0.80± 0.09	0.82± 0.05	0.97± 0.07
(MPa· s^{-1})	Ⅱ	0.77± 0.11	0.39± 0.16**	0.42± 0.19**	0.46± 0.20	0.38± 0.18*	0.37± 0.22*	0.42± 0.19**
	Ⅲ	0.71± 0.19	0.68± 0.22#	0.64± 0.20#	0.59± 0.32	0.49± 0.24	0.50± 0.15	0.53± 0.19
	Ⅳ	0.94± 0.10	0.37± 0.05**	0.48± 0.23**	0.48± 0.19	0.66± 0.11	0.58± 0.11	0.52± 0.11
	Ⅴ	0.81± 0.16	0.65± 0.08△	0.59± 0.17	0.61± 0.06	0.65± 0.19	0.64± 0.14	0.51± 0.09

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$与Ⅰ组比较;#: $P < 0.05$与Ⅱ组比较;△: $P < 0.05$,△△: $P < 0.01$与Ⅳ组比较

2.3.2 ± dp/dt$_{max}$的变化 内素可使± dp/dt$_{max}$显著而持久地降低,PAF的作用短暂,给药后 3~ 5 min达到最大抑制,约 1 h以后消失。BN5202可使内毒素或 PAF的作用逆转,见表 2

2.3.3 PAF水平的变化 内毒素能引起血 PAF水平显著升高,至给药后 8 h未见回落。BN52021预处理对血 PAF水平没有影响,见表 3

表 3 内毒素血症家兔血 PAF水平的变化

分组	基础值	内毒素血症后时间					
		5 min	30 min	2 h	4 h	6 h	8 h
Ⅰ	2.73± 1.25	2.17± 1.26	1.95± 0.56	2.38± 0.91	2.56± 0.67	2.19± 0.52	2.62± 0.92
Ⅱ	2.84± 0.92	5.67± 1.13**	7.92± 1.30**	10.67± 2.41**	9.85± 2.09**	11.97± 2.89**	16.32± 3.16**
Ⅲ	2.59± 0.78	5.13± 1.02**	6.55± 2.10**	7.49± 2.30**	9.37± 2.85**	10.85± 3.10**	12.61± 3.25**

**: $P < 0.01$与Ⅰ组比较

3 讨论

本研究发现,内毒素注射后 5 min即可出现 MAP、Lvsp、± dp/dt$_{max}$的显著抑制,其作用表现为持续时间较久并呈渐进加重的趋势。PAF对 MAP、Lvsp、± dp/dt$_{max}$的最大抑制作用主要在给药后 5~ 30 min,其特点为作用短暂而强烈,持续不足 1 h。此外,内毒素可使血 PAF水平明显升高,8 h未见回落。用 PAF受体拮抗剂 BN52021预处理后能显著逆转内毒素或 PAF引起的血流动力学紊乱,但对 PAF水平没有明显的影响。

文献报道,PAF可使动物产生剂量依赖性的低血压,严重的低血压是导致动物死亡的直接原因之一[3]。我们也观察到,PAF给药组死亡的 3只家兔均有严重心血管功能紊乱,MAP约 1 kPa,Lvsp < 4 kPa,+ dp/dt$_{max}$ < 200 kPa,存活时间不足 1 h,呼吸由急促迅速转为抑制并伴有心率缓慢。有研究证实,外源性的 PAF可明显抑制± dp/dt$_{max}$,降低 MAP,升高全身血管阻力(SVR)及肺血管阻力(PVR)。认为 PAF除直接的负性心力作用外,主要通过增加心脏后负荷,降低前负荷使心输出量减少[4,5]。

内毒素血症时心血管功能紊乱与血 PAF水平一致,用 PAF受体拮抗剂 BN5202能有效逆转心血管功能的紊乱,提示,PAF在内毒素血症早期的心血管血流动力学紊乱中可能具有主要的作用。

关键词 血小板活化因子;内毒素血症;血流动力学
中图法分类号 R631.1

参考文献

1 Terashita Z, Imura Y, Nishikawa K *et al*. Is platelet activating factor a mediator of endotoxic shock? Eur J Pharmacol, 1995, 109(2): 257

2 Toth P D. The biological effects of PAF antagonists on endotoxemia. In: Handley D A Eds. Platelet activating factor in endotxin and immune diseases. New York: Marcell Deker Inc, 1990. 589~ 608

3 Du W H, Li Z, Lu S M *et al*. The regulatory role of phos-

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

pholipase A_2 inhibitors on platelet activating factor activity in rabbits with endotoxic shock. J Med Coll PLA, 1996, 18(2): 28

4 Qian C, Guo Z M, Peter C J *et al*. Platelet activating factor induced cardiopulmonary dysfunctions and their reversal with a PAF antagonist(BN52021) in 13 guinea pigs. J Lipid Mediat, 1993, 7(3): 223

5 Gulpta J B, Prased M, Kalra J *et al*. Platelet activating factor induced changes in cardiovascular fuction and oxyradical status of myocardium in presence of the PAF antagonist CV-6209. Angiology, 1994, 45(1): 25

(收稿: 1996-09-18;修回: 1997-05-20)

(编辑 冷怀明)

新生大鼠皮质-基底节神经细胞的分散培养观察

Culture of neuronal cells from cortices and striata of newborn rats

郑 健* 董为伟** (第三军医大学附属新桥医院神经内科) 重庆, 400037

提 要 目的: 建立一种简易且能满足神经细胞基本研究需要的原代分散培养方法。方法: 取新生大鼠(出生24 h以内)皮质和基底节,用胰肽酶消化和吸管吹打相结合的方法分离组织成细胞悬液,种植细胞于含10%小牛血清的DMEM中进行培养,加入阿糖胞苷抑制胶质细胞增殖,免疫细胞化学法检测培养细胞神经微丝蛋白(神经元特异性标志物)表达情况。结果: 培养细胞呈分散状态生长,形态发育符合正常规律变化,存活细胞92%以上为神经细胞。结论: 本方法适于细胞形态学观察和电生理学研究。

神经细胞原代培养是研究神经细胞形态和功能以及神经系统疾病病理机理的重要方法之一。尽管已有诸多关于神经细胞培养方法的报道[1,2],但并无一种方法能满足各方面的研究需要。已报道的方法各有其优缺点。本研究旨在探索建立一种简单易行且能满足神经细胞基本研究需要的原代分散培养方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生Wistar大鼠(出生24 h以内)。

1.2 器皿处理

1.2.1 培养板 6孔培养板置70%乙醇内消毒2 h以上,超净台内风干,孔内加入多聚赖氨酸(MW 144000, 5 mg%, pH8.4),置CO_2培养箱内24 h,取出后吸尽孔内液体,以PBS(-)洗涤2次,吸尽残液后加入完全培养基(DMEM,含青霉素100 u/ml,链霉素100 μg/ml和10%小牛血清, pH7.1),置CO_2培养箱内,于24 h以内使用。

1.2.2 盖玻片 浓盐酸内过夜,去离子水洗涤3次。无水乙醇内3 h以上,去离子水洗涤3次。烘干。180℃高热灭菌2 h以上。置培养板孔底。此后培养板处理同前述。培养的神经细胞将用于染色观察时,种植于盖玻片上。

1.3 细胞分离

以70%乙醇浸泡消毒新生鼠(3 min),断头取脑置于盛有孵化液(葡萄糖加入Dulbecco's PBS(-)液中,浓度0.35 g%)的培养皿中。于冰盘上、体视显微镜下分离出皮质和基底节。轻切成碎片。转移至离心管中。加入10~15 ml胰蛋白酶液(0.25 g%)和200 μl DNase I液(0.2 g%)。37℃消化5~10 min,以吸管吹打分散细胞。加入200 μl DNase I液。1000 r/min离心5 min,去上清液。加入15 ml含20%小牛血清的培养基,吹打混匀。离心后去上清液。加入完全培养基15 ml,吹打混匀制成细胞悬液。

1.4 细胞培养

将制备的细胞悬液接种于培养板内,置CO_2培养箱内培养(5% CO_2, 37℃,饱和湿度)。种植密度: 1×10^5/ml。种植次日更换培养基。以后每3天换培养基。种植后第3、5、7日,加入阿糖胞苷(终浓度30 μmol/L)抑制胶质细胞增殖。

1.5 细胞生长的动态观察

种植后每日在倒置显微镜下观察活细胞生长情况,并计数细胞。分别于种植后1、3、5、7、9、14、21 d,取出生长有细胞的盖玻片,行甲酚固紫(Cresyl violet, CV)和还原银染色[3]观察。

1.6 培养细胞的鉴定

分别于种植后7 d和14 d,取出生长有细胞的盖玻片,以抗神经微丝蛋白(Neurofilament protein, NF)单克隆抗体行免疫细胞化学染色,3-氨基-9-乙基咔唑显色,苏木素复染。

2 结果

2.1 形态观察

在光镜下,对活细胞和CV、还原银染的细胞进行观察。

* 郑 健,男,37岁,副教授,博士

** 重庆医科大学神经病学研究所 重庆, 400042

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