DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.04.004

急性胆道感染时肝细胞膜β-肾上腺素能受体结合容量变化的实验研究*

程绍钧 董家鸿** 张广运 (第三军医大学检验系核医学教研室) 630038
潘 峰 段恒春** 韩本立** 黄志强** (第三军医大学基础部中心实验室) 630038

提 要 在兔急性胆道感染症的模型上,观察了梗阻肝叶(OL)与非梗阻肝叶(NOL)、原发感染肝叶(PIL)与继发感染肝叶(SIL)的细胞膜β-肾上腺素能受体(βAR)最大结合容量(B_{max})的动态变化,结果显示:PIL βAR B_{max}于病程早期即开始进行性显著减少,SIL在病程48 h始见显著减低;OL与NOL的βAR B_{max}自始至终无明显改变。上述结果提示:急性胆道感染的早期肝细胞膜βAR密度降低与肝脏所受脓毒攻击强度及进程有直接关系。肝细胞膜βAR密度降低,可能与急性胆道感染时肝细胞代谢紊乱有关。

关键词 急性胆道感染*;β受体,肾上腺素能;受体结合容量*;肝脏;细胞膜
中图法分类号 R575.7

在急性胆道感染的实验性研究中,我们已观察宿主在出现早期高血糖后,发生持续的低血糖症。本实验对胆道梗阻肝叶(OL)与非梗阻肝叶(NOL),原发感染肝叶(PIL)与继发感染肝叶(SIL)的肝细胞膜β-肾上腺素能受体(βAR)与其特异配基的最大结合容量(B_{max})作了动态观察,旨在为了逐步探讨急性胆道感染时肝细胞糖代谢失常的发生机理。

1 材料与方法

1.1 动物分组与急性胆道感染模型复制

日本杂交大耳白兔56只,3~4月龄,体重2.0~3.0 kg,雌雄各半,随机均分为7组:胆道梗阻(BO)与胆道感染(BS)各3组,设12 h、24 h、48 h三个时相点;余1组为正常对照(N)。除N组禁食24 h后直接用于实验外,其余各组[1]作以下处理:戊巴比妥钠(30 mg/kg体重)麻醉后无菌条件下作上腹正中切口,暴露肝脏和肝外胆道。缝扎胆囊管,在右侧叶肝管口上方游离并结扎胆总管。其中BS组在结扎胆总管的结扎点近端穿刺胆管,注入0.2 ml大肠[illegible]悬液(1×10^9 CFU/ml),并在穿刺点近端再次结扎,以防菌液渗漏。梗阻部位近端肝管引流的肝叶为原发感染肝叶;肝管开口位于梗阻远端的右侧叶为继发感染肝叶。各组动物术后向腹腔注入40 ml无菌生理盐水,以补充术中失水,再分两层缝闭腹腔。单笼饲养,自由饮水,禁食12 h后用于实验。

1.2 肝细胞膜βAR的B_{max}测定

1.2.1 膜受体样品制备:各组动物于预定时相终点静脉注射戊巴比妥(15 mg/kg体重),于浅麻醉下剖腹;切取小块右侧叶和左侧叶肝组织,立即放入液氮内速冻保存。

膜受体样品制作参考有关资料于0~4℃冰浴条件下进行:取出液氮速冻的肝组织约1~2 g,丢入有3~5倍体积预冷的50 mmol/L Tris-HCl pH7.5的缓冲液(内含10 mmol/L $MgCl_2$,25 mmol/L蔗糖,0.05%维生素C)的玻璃匀浆器内作电动中速匀浆约2 min。匀浆低温冷冻离心(1 000×g,10 min;05PR-22冷冻离心机,日本),上清液超速离心(45 000×g,15 min;J2-21M,Beckman,美国)。沉淀用缓冲液悬浮洗涤后重复超速离心(条件同上)。最后所得沉淀(膜受体样品)用6 ml缓冲液悬浮,立即作受体的放射配体结合分析(RBA),多余样品用Lowry法测定蛋白质含量。

1.2.2 RBA饱和曲线法测定B_{max}:24支塑料反应管分为两组:总结合(TB)组16支,设8个^{3}H-DHA(1.665 TBq/mmol,中国原子能研究院)剂量点,非特异结合(NSB)组8支,设4个^{3}H-DHA剂量点,梯度终浓度为0.4~4 nmol/L。NSB各管含消旋心得安(Sigma公司)的终浓度为1.93 μmol/L(100 μl)。各管的膜受体样品200 μl,反应总体积0.4 ml。加样在冰浴内完成,继而移置37℃恒温水浴保温30 min后在多头细胞收集器上立即加入冰冷淋洗液(3倍稀释的缓冲液)终止反应。抽滤结合物至三层玻璃纤维滤纸上(69型,上海红光造纸厂),淋洗液20 ml洗涤两次。滤纸经80℃烘烤20 min,移入盛5 ml闪烁液(0.4% PPO,0.02% POPOP的二甲苯液)的闪烁瓶内暗适应6~8 h后,用自动液体闪烁计数器(LKB-1217,瑞典)测量放射性。

测量数据经微机用Goldstein模式软件(上海第二医科大学核医学教研室编制)作RBA饱和结合曲线拟合,寻求饱和结合区后以单点法获取βAR的B_{max}(fmol/mg蛋白)。

1.2.3 统计学分析:结果以$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$表示,采用医用统计程序包(第三军医大学数学教研室编制)作方差分析。

2 结果

BO组的NOL和OL在术后各时相的B_{max}均接近N组($P>0.05$)。BS组的SIL在术后12及24 h仍与N组相当($P>0.05$),48 h时始见显著减少,分别是N组的58.1%,为BO组各时相均值的59.8%($P<0.05$);而PIL术后各时相均显著低于N组和BO组($P<0.05$),且呈现进行性减少:3个时相分别是N组的67.2%、37.7%和35.2%;为BO组OL的64.5%、37.2%和38.3%,详见附表)。

---

* 全军青年自然科学基金资助项目分题
** 第三军医大学西南医院肝胆外科中心,630038

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

附表　兔肝细胞膜βAR对^{3}H-DHA的B_{max}（$\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$，fmol/mg蛋白）

Table　The maximum ^{3}H-DHA binding capacity of β-adrenergic receptor in rabbit liver cell membranes ($\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$, fmol/mg protein)

		n		time (h)		
				12	24	48
N		8	311.2±15.4			
BO	NOL	8		319.2±22.1	272.8±16.6	298.0±20.7
	OL	8		324.1±17.5	315.3±24.3	285.7±18.4
BS	SIL	8		290.3±17.5	317.0±19.4	180.9±11.8※
	PIL	8		209.0±11.2※	117.2±11.1※	109.4±5.1※

※: compared with control (N), $P<0.05$

3　讨论

本实验资料表明，急性胆道感染动物的原发感染肝叶细胞膜βAR的B_{max}进行性显著降低，继发感染肝叶至伤后48 h才见显著降低；而单纯胆道梗阻的动物肝叶细胞膜βAR的B_{max}在伤后始终未见降低。这就说明在本研究采取自身对照的实验条件下，这种改变与脓毒攻击的强度及进程有直接关系。

近年来的资料报道，靶细胞在激素的持续作用下，其特异性受体数目减少并逐渐丧失对该激素的反应性，这种细胞受体下调(down regulation)被认为是普遍存在的生理和病理情况下的适应性反应[1,2]。在各种类型脓毒症时，体内儿茶酚胺释放持续显著增加，在高水平儿茶酚胺作用下细胞表面βAR下调可能与细胞膜受体密度降低有关[3,4]。但在本实验中，同宿主的原发感染肝叶与继发感染肝叶处在完全相同的激素环境中，却出现了细胞膜βAR的B_{max}降低的速率和幅度存在显著差异。这就提示急性胆道感染时肝细胞膜受体密度降低并非是肝细胞受体下调的主要机制。

儿茶酚胺对肝脏糖代谢的调控作用是籍肝细胞膜上β-和α-肾上腺素能受体机制而实现的，两种受体在调节糖代谢稳态中的作用大小存在种属差异。现已明确，在人类，兔、狗和猫等动物肝脏中βAR起主要作用[5]。因此，急性胆道感染时，原发和继发感染肝叶细胞膜βAR密度先后降低，是否能使儿茶酚胺刺激肝脏糖异生作用进行性减弱，这个在糖稳态改变中有一定病理意义的问题待进一步研究。

参考文献

1 Ying-Fu S, Harder TK, Perkins JP. Catacholamine-induced desensitization of adenylate cyclase. J Biol Chem, 1980, 255: 7410

2 Harden TK. Agonist-induced desensitization of the β-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. Pharmacol Rev, 1983, 35: 5

3 Kovarik MF, Jones SB, Romano FD. Plasma catecholamines following cecal ligation and puncture in the rat. Circ Shock, 1987, 22: 281

4 Jones SB, Romano FD. Dose-and time-dependent changes in plasma catacholamines in response to endotoxin in conscious rats. Circ Shock, 1989, 28: 59

5 Exton JH. Mechamisms involved in effects of catecholamines on liver carbohydrate metabolism. Biochem Pharmacol, 1979, 28: 2237

（收稿：1993-12-23；修回：1994-06-01）

Experimental study of the changes of the maximal binding capacity of β-adrenoceptors on the hepatocytic membrane in acute biliary infection

Cheng Shaojun, Pan Feng, Dong Jiahong, Zhang Guangyun, Duan Henchun, Han Benli, Huang Zhiqiang

(Department of Nuclear Medicine, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract　The changes of the maximal binding capacity of β-adrenoceptors (B_{max}) on the cell membrane of hepatocytes in acute biliary infection were observed in the liver lobe with obstruction (OL) and without ob-

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

struction (NOL) and in the liver lobe with primary infection (PIL) and with secondary infection (SIL). It was found that B_{max} was progressively decreased in the early stage of PIL but it began to decrease in the 48th hour after the onset of SIL. No change of B_{max} was found in both OL and NOL in the 48 hours of observation. These findings suggest that the reduction of β-adrenoceptors on the cell membrane of hepatocytes is related to the intensity and progression of biliary sepsis and to the metabolic disorder of hepatocytes after biliary sepsis.

Key words acute biliary infection*; receptors, adrenergic, beta; binding capacity*; liver; cell membrane

血小板活化因子在烧伤后肠粘膜损害中的作用及其机理研究

The effect and its mechanisms of platelet-activating factor (PAF) in intestinal mucosal injury after burn

余佩武 肖光夏 (第三军医大学西南医院烧伤研究所) 630038

肠源性感染已被认为是导致严重烧伤后顽固性休克、全身严重感染、超高代谢以及多器官功能衰竭的潜在原因。肠粘膜屏障功能损害是肠源性感染发生的关键因素，因此，已成为目前研究的焦点。有关严重烧伤后肠粘膜屏障功能损害的病理过程及其机理尚不完全清楚。本实验采用定量肠粘膜通透性测定和电生理方法，结合病理形态学和细菌学观察对烧伤后肠粘膜机械性屏障功能的变化进行了深入研究；同时采用免疫组织化学方法测定肠粘膜T淋巴细胞亚群、白介素2受体(IL-2R)表达及放免法检测粪便分泌型免疫球蛋白A(SIgA)，对烧伤后肠粘膜局部免疫屏障功能变化进行初步研究；并且采用内源和外源性PAF以及PAF拮抗剂应用相结合，从正反两方面重点探讨了PAF在严重烧伤后粘膜屏障功能损害中的作用及其机理，以及用PAF拮抗剂防治的作用。主要结果如下：

1. 严重烧伤后粘膜通透性显著增高，肠粘膜电位明显降低，与之相伴出现血浆内毒素水平和肠系膜淋巴结、肝、肺组织细菌检出数均显著升高。肠组织含水量亦明显增加。光镜下见回肠绒毛中央乳糜管明显扩张、肠上皮细胞变性坏死脱落；扫描电镜下见回肠绒毛变扁平、排列紊乱，部分缺损；透射电镜下见肠上皮细胞间隙呈束状扩张、微绒毛坏死脱落；线粒体空化、嵴断裂，核周间隙扩大。肠粘膜通透性变化与肠粘膜病理损害程度相一致，且与血浆内毒水平呈非常显著正相关。PAF拮抗剂治疗组肠粘膜通透性较烧伤组明显降低，肠粘膜电位明显升高；血浆内毒素水平、肠系膜淋巴结、肝、肺组织细菌检出数显著降低，肠组织含量水量亦减少。因肠粘膜病理改变明显减轻。

2. 严重烧伤后肠粘膜CD_8细胞仅24 h轻度减少，而肠粘膜CD_4细胞于伤后12 h即开始明显减少，CD_8细胞显著增多，CD_4/CD_8比值显著降低。肠粘膜IL-2R表达亦呈同步降低。粪便SIgA含量于伤后6 h即开始持续降低，且与血浆内毒素水平升高呈显著负相关。PAF拮抗剂对烧伤后肠粘膜免疫功能降低有一定保护作用。

3. 严重烧伤后血和肠组织PAF水平均明显升高，而肠粘膜血流和粘膜内pH均显著降低，肠组织PLA_2活性、Ca^{2+}、MPO和MDA水平均显著升高；肠组织SOD呈显著降低。血浆TNF和IL-8水平亦显著各项高。PAF拮抗剂治疗后使血和肠组织PAF水平显著降低。与烧伤组相比，肠粘膜血流和粘膜内pH显著增加。肠组织PLA_2、Ca^{2+}、MPO和MDA水平呈不同程度降低；肠组织SOD含量显著升高；血浆TNF和IL-8水平亦呈显著降低。

4. 静脉注射不同剂量外源性PAF，可引起肠粘膜通透性升高，肠粘膜电位和血流降低，血浆内毒素和荧光标记大肠杆菌移位率显著升高，肠组织PLA_2、Ca^{2+}和MPO水平亦显著升高，而肠组织SOD含量显著降低。上述变化与注射PAF剂呈显著依赖关系。PAF拮抗剂可完全或部分阻滞PAF的作用。

综上所述，严重烧伤后肠粘膜机械性屏障和免疫屏障均相继受损，其中肠粘膜通透性增高在肠源性天津发生中起重要作用，而肠道SIgA分泌减少和T淋巴细胞功能低下对肠源性感染可能具有促进作用。PAF是导致烧伤后肠粘膜屏障损害的一重要因素，其作用机理包括降低肠粘膜血流、激活中性白细胞、促进氧自由基产生、增加肠组织钙负荷以及与细胞因子TNF和IL-8的协同作用等。PAF拮抗剂治疗对肠粘膜具有保护作用，从而对防治肠源性感染有助。

关键词 灼伤；感染；血小板激活因子；肠粘膜

中图法分类号 R973.1；R644

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