

血小板激活因子和抗氧剂对内皮细胞粘附、通透性的影响

陶志华 姜远英¹ 曾华武 蔡定国(上海 200434 海军 411 医院药物研究中心;¹ 上海 200434 第二军医大学药学院)

血小板激活因子具有极强的致炎作用,内皮细胞在体内和体外,受到各种刺激后均能产生 PAF,PAF 不但能直接作用于内皮细胞,还能促进 PMN 释放超氧阴离子和羟自由基,间接作用于内皮细胞。为进一步了解 PAF 对内皮细胞作用以及该作用同氧化的关系,我们研究 PAF 对内皮细胞粘附、通透性的促进作用,并观察了抗氧剂对 PAF 效应的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM(GIBCO 美国),PAF(1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, Sigma, 美国),硝酸纤维素微孔滤膜(上海医药工业研究所),SD 大鼠(第二军医大学实验动物中心)。

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞及白细胞的制备:SD 大鼠(150~250g)经腹腔乌拉坦麻醉(2g/kg)肝素化(1000u/只),处死动物,取肺,按文献方法^[1]制备内皮细胞,通过倒置相差显微镜下细胞形态学鉴定为肺微血管内皮细胞。

SD 大鼠 ip 0.4% 4℃明胶(4~5ml/只)。4h 后,击头处死大鼠,用无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS 缓冲液(NaCl 128mmol/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5mmol/L, KCl 2.7mmol/L,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8.1mmol/L,葡萄糖 1g/L, pH = 7.4)冲洗腹腔(15~20ml/只,得率 $5 \sim 6 \times 10^7$ cells/只,洗出液 3500r/min 离心 15min。沉淀即中性白细胞(用含 0.75% NH_4Cl)的 PBS 悬浮并破坏红细胞,4000r/min 离心 5min, PBS 洗涤一次,红细胞不多可省略该步骤)。重新用 PBS 悬浮,显微镜下计数,调整为 1.0×10^7 cells/ml。

1.2.2 内皮细胞单层的制备及其通透性的测定:按文献方法^[2]在微孔滤膜(0.8 μm 孔径,1.2cm 内径)上接种肺微血管内皮细胞,将长有肺微血管内皮细胞的滤膜分组处理,37℃温孵 4h,测定微血管内皮细胞单层通透性,据收集的滤过肺微血管单层的液体量和白蛋白浓度(荧光比色法测定)计算通过肺微血管的液体系数(Kf)和蛋白清除率(ACR)计算公式: $\text{Kf} = \text{滤过液体量} \times \text{灌注压/滤器的有效面积} \times \text{灌注时间}$ 。

$\text{ACR} = \text{滤过液 FITC} - \text{白蛋白浓度} \times \text{滤过系数}$

1.2.3 内皮细胞同白细胞粘附的测定:用 PAF 和抗氧剂同内皮细胞单层或白细胞预温 4h。随即,在培养的内皮细胞单层加入白细胞悬液(2×10^5 cells/cm² 内皮细胞单层),置于二氧化碳孵箱中,37℃培养 30min,取出

内皮细胞单层,用 PBS 缓冲液轻轻冲洗。细胞计数。计算加入和未粘附的白细胞之差即可得 PMN-EC 率。

2 结果

2.1 PAF 和抗氧剂对 PMN-EC 粘附的影响:用 PAF (10nmol/L)激活的 PMN-EC 粘附率的显著增加 ($P < 0.05$),合用抗氧剂 EB 及衍生物 ES 能完全抑制 PAF 反应,用 PAF (10nmol/L)激活肺微血管内皮细胞同样也能显著增加 PMN-EC 的吸附率 ($P < 0.05$),抗氧剂 EB 与 ES 能显著减低 PMN-EC 吸附率。

2.2 PAF 抗氧剂对内皮细胞单层通透性的影响:肺微血管单层细胞用 PAF (10nmol/L)处理后, Kf 值上升 23.5% ($P < 0.05$),内皮细胞单层对液体的通透性显著增加,同时流出液的蛋白量也增加,抗氧剂 EB、ES (10 μ mol/L)能取消 PAF 增加内皮细胞单层对液体和蛋白量通透的作用。

3 讨论

大鼠静脉注射 PAF 可引起动脉血压下降,肺血管壁通透性升高^[3],在内毒素导致的肺损伤 PAF 的含量明显增加,肺组织匀浆内观察到氧自由基 MDA 升高^[4],PAF 能够激活内皮细胞,促进内皮细胞释放 MDA^[5]。我们的结果表明,PAF 不但能直接作用于内皮细胞,还能产生对 PMN-EC 刺激促进 PMN-EC 的

吸附,能显著增加肺微血管单层内皮细胞对液和蛋白通透性,而且该作用与氧化有密切的关系,用抗氧剂能完全阻断 PAF 作用,同时表明抗氧剂对 PAF 的作用是非特异的,因为合用抗氧剂组粘附率不但低于 PAF 激活组,还低于对照组,且有统计学差异,总之我们的结果提示,在 PAF 对内皮细胞的作用中,氧化起着重要的作用,合用抗氧剂能减轻 PAF 对内皮细胞的损伤。

参考文献

- 1 丁自强,李少华,费侠.血小板激活因子对肺动脉内皮细胞的直接作用.中国病理生理杂志,1992,8(5):458.
- 2 陈思峰,季晓峰,姜远英,等.无创性微血管内皮细胞分离法.第二军医大学学报,1996,17(6):578.
- 3 李少华,费侠,吴中立,等.海风藤提取物对大鼠内毒素性低血压和肺损伤的拮抗作用.中国中药杂志,1989,14(11):683.
- 4 李少华,陈思峰,费侠,等.血小板激活因子在内毒素致狗急性肺损伤中的作用及机理.第二军医大学学报,1992,13(2):111.
- 5 Li S, Zhang HH, Cheng SF, et al. Platelet-activating factor mediate endotoxin-induced canine lung injury and mechanisms. J Med Coll PLA, 1992, 7(4):374.

收稿日期:1998-05-31