

PGD₂、CPA3和PAF在过敏性休克死亡豚鼠体内含量变化

杨凯¹, 郭相杰¹, 闫学斌², 高彩荣¹

(1.山西医科大学 法医学院法医病理学教研室, 山西 太原 030001;

2.太原市清徐县公安局技术科, 山西 太原 030012)

摘要: 目的 观察白三烯E₄ (leukotriene E₄, LTE₄)、前列腺素D₂ (prostaglandin D₂, PGD₂)、羧肽酶A3 (carboxypeptidase A3, CPA3) 和血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 在过敏性休克死亡豚鼠体内的变化规律, 进一步探讨过敏性休克死亡法医学诊断的生物学检测指标。**方法** 建立豚鼠过敏性休克的动物模型; ELISA方法检测过敏性休克死亡豚鼠尿液中的LTE₄、血浆中的PGD₂和CPA3、脑组织中的PAF的含量, 与对照组比较筛选出有差别的指标; 观察比较PGD₂、CPA3和PAF在豚鼠过敏性休克0 h、12 h、24 h的变化规律; 观察比较血小板活化因子乙酰水解酶 (platelet activating factor acetylhydrolase, PAF-AH) 对豚鼠脑组织中PAF的影响。**结果** LTE₄的含量在实验组和对照组豚鼠体内无明显差异, 过敏性休克死亡豚鼠体内PGD₂、CPA3、PAF含量较对照组豚鼠体内含量明显升高; 过敏性休克死亡豚鼠体内PAF含量死后12 h、24 h组与对照组比较明显升高; PGD₂和CPA3含量在死后12 h内与对照组相比明显升高; 过敏性休克豚鼠脑组织内的PAF在给予PAF-AH组明显低于实验组。**结论** 尿液中的LTE₄不适宜作为过敏性休克死亡的诊断指标; 血浆中CPA3、PGD₂及脑组织中PAF有望作为过敏性休克死亡的法医学生物诊断指标; PAF-AH有望在临床上用于过敏性休克的治疗。

关键词: 法医病理学; 过敏性休克; 白三烯 E₄; 前列腺素 D₂; 羧肽酶 A3; 血小板活化因子

Change Law of PGD₂, CPA3 and PAF in the Guinea Pig of Anaphylactic Shock

Yang Kai, Guo Xiang-jie, Yan Xue-bin, Gao Cai-rong

Abstract: Objective TO assess the change of LTE₄, PGD₂, CPA3 and PAF in the guinea pig death of anaphylactic shock, and look for biomarkers to diagnose the anaphylactic shock. **Methods** ①Guinea pigs of either sex were used to establish anaphylactic shock models. ②The contents of LTE₄, PGD₂ and CPA3, and PAF were detected respectively in urine, plasma and brain tissues with ELISA kit. The significant biomarkers were selected. ③Based on the tests of the elected biomarkers, to observe the change law of PGD₂, CPA3 and PAF in the guinea pig respectively in 0 h, 12 h and 24 h after died of anaphylactic shock. ④ To observe the effect of PAF-AH in reducing the contents of PAF. **Results** ① There were no difference of the level of LTE₄ in urine between experimental group and control group, The contents of CPA3, PGD₂ and PAF in experimental group were significantly higher than control group. ②The level of PAF in 12 h and 24 h after anaphylactic shock were significantly higher than control group, and The level of CPA3 and PGD₂ in 12 h after anaphylactic shock were significantly higher than control group. ③ The level of PAF treated with PAF-AH in advance were significantly lower than treated with normal saline. **Conclusion** ①The LTE₄ in urine cannot be selected as biomarkers to diagnose the anaphylactic shock. ②The PGD₂ and CPA3, and PAF respectively in plasma and brain tissues maybe used as biomarkers to diagnose the anaphylactic shock. ③The PAF-AH maybe used for clinical treatment. [Key words] anaphylactic shock; 1eukotriene E₄; prostaglandin D₂; carboxypeptidase A3; platelet activating factor

严重过敏反应 (anaphylaxis) 是一种严重的、危及生命的全身超敏反应。过敏性休克死亡在临床医学和法医学实践中较为常见, 它是由于特异性过敏原作用于致敏病人而引起的以循环衰竭为主的速发型超敏反应。过敏性休克发病急剧, 难以预见, 不仅是临床医学的一大难点, 也常常引起医疗纠纷等一系列法律问题。而过敏性休克死亡者一般常规尸检无特异性病理变化, 所以过敏性休克的死后诊断一直是法医学鉴定中的一大难题。有研究表明, 前列腺素D₂ (prostaglandin D₂, PGD₂)^[1]、白三烯E₄ (leukotriene E₄, LTE₄)^[2]、羧肽酶A3 (carboxypeptidase A3, CPA3)^[3]、血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)^[4-5]都参与了过敏性休克死亡的发生、发展, 但是其化学稳定性和在过敏性休克死亡后的变化规律还不清楚。本实验以卵蛋白腹腔注射诱导的豚鼠过敏性休克模型为研究对象, 分别检测LTE₄、PGD₂、CPA3、PAF在豚鼠过敏性休克死亡后体内尿液、血浆、脑组织中的含量, 进而观察其在过敏性休克死后0 h、12 h、24 h内的变化规律, 试图为过敏性休克的法医学鉴定提供准确的生物学指标和诊断依据。另外, 由于PAF-AH的脱乙酰基作用可以使PAF迅速失活, 本实验应用这一特征研究PAF-AH对脑组织内PAF的影响, 试图应用于临床实践。

1 材料与方法

1.1 材料

健康豚鼠 36 只，雌雄不限，体质量 250-350g，由山西医科大学实验动物中心提供。卵蛋白（Grade II）、弗氏完全佐剂（CAS 9007-81-2）、PAF-AH（SRP3136）均由 SIGMA 公司提供。MODEL680 酶标仪，为美国 bio-RAD 生产。ELISA 试剂盒由上海索莱宝公司提供。

1.2 方法

1.2.1 过敏性休克豚鼠模型的建立及实验动物分组

健康豚鼠 36 只。实验组 30 只，将卵蛋白和生理盐水配制成 2% 的卵蛋白溶液，将卵蛋白溶液与等量弗氏完全佐剂充分混合成乳剂；在豚鼠左右后足掌内皮下各注射 0.2 ml 乳剂。豚鼠致敏后 2 周腹腔注射 2% 的卵蛋白溶液 2 ml，建立豚鼠过敏性休克动物模型。随机将实验组分为：（1）过敏性休克死亡 0 h 组，在过敏性休克死亡后立即取尿、血浆、脑组织；（2）过敏性休克死亡 12 h 组，在过敏性休克死亡后 4℃条件下放置 12 h 取尿、血浆、脑组织；（3）过敏性休克死亡 24 h 组，在过敏性休克死亡后 4℃条件下放置 24 h 取尿、血浆、脑组织；（4）PAF-AH 预处理组，过敏性休克激发前趾静脉注射 0.5 μg 的 PAF-AH，过敏性休克死亡后立即取脑组织；（5）生理盐水预处理组，过敏性休克激发前趾静脉注射 0.3 ml 生理盐水，过敏性休克死亡后立即取脑组织。空白对照组 6 只，由生理盐水代替致敏原，行颈椎脱臼处死后立即取尿、血浆、脑组织。以上各组，每组豚鼠 6 只。

1.2.2 ELISA 检测

按照上海索莱宝生物科技公司 ELISA 试剂盒操作步骤说明书进行检测。使用双抗体夹心法测定实验标本中 LTE₄、PGD₂、CPA3、PAF 的水平。用纯化的抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入样品再与 HRP 标记的羊抗鼠抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度（OD 值），通过标准曲线计算样品中各生物学指标的浓度。

1.2.3 统计方法

所有测定结果均采用 $\bar{X} \pm S$ 表示,用 SPSS11.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 过敏休克动物模型的观察

豚鼠在腹腔注射卵蛋白数分钟后活动减少，逐渐四肢松软，然后趴伏，呼吸困难加重，个别可闻及喘鸣音。在 24~50 min 内，实验动物出现剧烈抽搐，并且全部在抽搐后 20 min 内死亡。动物死亡后解剖可见喉头水肿、肺淤血及其它各器官组织淤血改变。

2.2 筛选指标

我们首先对尿液中的 LTE₄，血浆中的 PGD₂ 和 CPA3，脑组织中的 PAF 四种生物学指标进行检测，筛选出过敏性休克死亡 0 h 组和空白对照组差别显著的指标（见表 1）。

表 1. 四种生物学指标的筛选结果 (n=6, $\bar{X} \pm S$, ng/L)

组别	LTE ₄	CPA3	PGD ₂	PAF
实验组	318.94±8.27	118.33±4.31 ¹⁾	437.23±28.10 ¹⁾	55.68±3.65 ¹⁾
对照组	314.29±33.06	93.26±2.27	357.19±26.99	49.28±2.61

注：1)表示死亡 0 h 组与空白对照组相比，P<0.05，差别具有显著性。

经统计学分析，发现 PGD₂、CPA3、PAF 含量在实验组与对照组间差别显著。说明过敏性休克发生后 PGD₂、CPA3、PAF 在豚鼠体内含量升高。

2.3 过敏性休克死亡豚鼠血浆中 CPA3 含量变化规律

豚鼠过敏性休克死亡 0 h 组、12 h 组、24 h 组血浆中 CPA3 含量变化（见表 2）。

表 2. 豚鼠过敏休克死亡后血浆中 CPA3 含量 (n=6, $\bar{X} \pm S$, ng/L)

组别	CPA3 含量
空白对照组	93.26±2.77 ¹⁾
死亡 0 h 组	118.33±4.31
死亡 12 h 组	96.36±2.72 ¹⁾

死亡 24 h 组	94.77±2.52 ¹⁾
-----------	--------------------------

注：1)表示与死亡 0 h 组比较，*P*<0.05，其差别具有显著性。

统计学分析结果说明，死亡 12 h 组、死亡 24 h 组与死亡 0 h 组比较，差别具有统计学意义。即随着死后经过时间的延长，过敏性休克死亡豚鼠血浆中 CPA3 的水平呈下降趋势。

2.4 过敏性休克死亡豚鼠血浆中 PGD₂ 含量变化规律

豚鼠过敏休克死亡 0 h 组、12 h 组、24 h 组血浆中 PGD₂ 含量变化（见表 3）。

表 3. 豚鼠过敏休克死亡后血浆中 PGD₂ 含量（n=6, ,X±S, ng/L）

组别	PGD ₂ 含量
空白对照组	357.19±26.99 ¹⁾
死亡 0 h 组	437.23±28.10
死亡 12 h 组	348.93±32.00 ¹⁾
死亡 24 h 组	302.14±18.60 ¹⁾²⁾

注：1)表示与死亡 0 h 组比较，*P*<0.05，其差别具有显著性；

2)表示与死亡 12 h 组比较，*P*<0.05，其差别具有显著性。

统计学分析结果表明，死亡 12 h 组与死亡 0 h 组比较、死亡 24 h 组与死亡 12 h 组比较，其差别具有统计学意义。即随着死后经过时间的延长，过敏性休克死亡豚鼠血浆中 PGD₂ 含量呈下降趋势。

2.5 过敏性休克死亡豚鼠脑组织中 PAF 含量变化规律及 PAF-AH 对 PAF 的作用

豚鼠过敏休克死亡 0 h 组、12 h 组、24 h 组中脑组织中 PAF 含量变化（见表 4）。

表 4. 豚鼠过敏休克死亡后脑组织中 PAF 含量（n=6, ,X±S, ng/L）

组别	PAF 含量
空白对照组	49.28±2.60
死亡 0 h 组	55.68±3.65 ¹⁾
死亡 12 h 组	58.25±2.63 ¹⁾
死亡 24 h 组	53.20±2.33 ¹⁾
生理盐水预处理组	57.64±4.90
PAF-AH 预处理组	48.94±4.08 ²⁾

注：1)表示与对照组比较 *P*<0.05，差异具有显著性；

2)表示与生理盐水预处理组比较，*P*<0.05，其差别具有显著性。

结果说明，豚鼠过敏性休克时豚鼠脑组织内 PAF 水平升高，并且在死亡后 24 h 时与空白对照组比较仍有统计学意义。结果还表明，PAF-AH 预处理能显著降低豚鼠脑组织内 PAF 水平。

3 讨论

过敏性休克死亡的法医学诊断由于缺乏特异性生物学指标而一直困扰着法医学工作者，随着过敏性休克死亡案例发生的不断增加^[6]，寻找过敏性休克死亡法医学诊断的生物学指标已迫在眉睫。

本实验研究了 PGD₂、LTE₄、CPA3、PAF 四种生物学指标在过敏性休克死亡后 0 h、12 h、24 h 的豚鼠体内的变化规律。

PGD₂是免疫刺激肥大细胞产生的主要的环氧合酶代谢物，由于其广泛的炎症作用而被认为是过敏性疾病的促成者^[1]。目前已证明了PGD₂在肥大细胞、树突细胞、Th₂淋巴细胞亚群上有丰富的合成，通过免疫刺激淋巴细胞和肥大细胞释放，导致外周血中前列腺素代谢产物水平增加^[7]。活体内PGD₂从两种途径在尿液中代谢^[8]，因此在活体内可以根据尿液中的代谢产物9 α ,11 β -PGF₂、2,3-dinor-9 α 和11 β -PGF₂推断机体内PGD₂水平。然而，由于死后血液中的PGD₂不可能在尿液中代谢，另外豚鼠死亡过程长短和有无排尿对尿中代谢产物的水平也影响颇大。因此只有通过检测过敏性休克死亡豚鼠血浆中的PGD₂探求其死后变化规律，才能更好地了解过敏性休克死亡时血浆中的PGD₂水平。本实验使用双抗体夹心法测定过敏性休克豚鼠血浆中PGD₂的水平，结果表明PGD₂在过敏性休克死亡0 h组豚鼠体内显著升高，并在死亡后12 h左右降低至正常水平，12 h后继续下降。说明豚鼠血浆PGD₂水平随死后经过时间的延长呈下降趋势。因此检测PGD₂含量还不能做为过敏性休克的诊断依据。

CPA3 是肥大细胞预先形成的蛋白酶类介质，过敏反应发生时肥大细胞激活和脱颗粒，CPA3 被释放。在临床诊断为过敏症的个体中，血清羧肽酶 A3 的水平升高(>14ng/mL)^[3]，而同时 CPA3 mRNA 可很好地代表肥大细

胞组织标记^[9]，因此有人认为可以通过检测 CPA3 水平来达到辅助诊断过敏性休克死亡的目的。本实验结果表明，与对照组相比，CPA3 在过敏性休克死亡时浓度升高，但在死亡 12 h 组其水平下降至与对照组相比无明显差异。因此本实验结果说明在死后 12 h 后检测血浆 CPA3 的含量作为过敏性休克死亡法医学诊断的生物学指标已经没有什么意义。我们将进一步研究其在豚鼠体内 12 h 内各时间段血浆 CPA3 含量，试图发现其作为法医学诊断的生物学指标的具体时间段。

PAF 是一种强效生物活性磷脂，化学组成为 1-氧-烷基-2-乙酰基-Sn-甘油-3-磷酸胆碱，不仅可以由嗜碱性粒细胞产生，也能由包括神经细胞在内的多种细胞产生。过敏反应、炎症反应及氧化应激时，PAF 与细胞膜表面的 PAF-R 结合，由 G 蛋白介导，通过与 G 蛋白耦联，激活磷脂酶 C 91 引起一系列病理反应而造成机体和脑组织的损害，过敏性休克死亡中有着至关重要的作用。PAF 通过胞质内的 PAF-AH 的催化作用而分解。本实验检测了过敏性休克死亡豚鼠脑组织内 PAF 的水平，结果表明其含量显著升高，与对照组相比升高具有显著差异，这与 Arias^[10] 的实验结果相一致。本实验同时研究了其在过敏性休克豚鼠脑组织中的死后变化规律，发现在死后 24 h 时与对照组相比差别仍具有显著性，表明其在死亡豚鼠脑组织的死后变化较为缓慢，有望作为过敏性休克死亡法医学诊断的生物学参考指标。

近年来临床上应用 PAF 抑制剂和受体拮抗剂这两类药物以减轻过敏性休克情况下 PAF 对机体特别是对大脑的损害。本实验在过敏性休克激发前趾静脉注射 0.5 μg 的 PAF-AH，过敏性休克死亡后立即取脑组织，结果发现 PAF-AH 可以明显降低过敏性休克脑组织中的 PAF 含量，说明 PAF-AH 的脱乙酰基作用可以使 PAF 迅速失活。这为 PAF-AH 将来应用于临床提供了新的见解。

参考文献：

- [1] Arimura A, Yasui K, Kishino J, *et al.* Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(2):411-419.
- [2] Kaneko I, Suzuki K, Matsuo K, *et al.* Cysteinyl leukotrienes enhance the degranulation of bone marrow-derived mast cells through the autocrine mechanism[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 217(3):185-191.
- [3] Simons FE, Frew AJ, Ansotegui IJ, *et al.* Risk assessment in anaphylaxis: Current and future approaches[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(1):S2-S24.
- [4] Joshua A. Boyce, Fred Finkelman, William T. Shearer. Anaphylaxis: Lessons from mouse models[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 120(3):506-515.
- [5] Vadas P, Gold M, Perelman B, *et al.* Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(1):28-35.
- [6] Simons FE. Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(4):625-636.
- [7] Tanaka K, Ogawa K, Sugamura K, *et al.* Cutting edge: differential production of prostaglandin D₂ by human helper T cell subsets[J]. *J Immunol*, 2000, 164(5):2277-2280.
- [8] Higashi N, Mita H, Ono E, *et al.* Profile of eicosanoid generation in aspirin-intolerant asthma and anaphylaxis assessed by new biomarkers[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(5):1084-1091.
- [9] Kumlin M. Measurements of leukotrienes in the urine: strategies and applications[J]. *Allergy*, 1997, 52(2):124-135.
- [10] Arias K, Baig M, Colangelo M, *et al.* Concurrent blockade of platelet-activating factor and histamine prevents life-threatening peanut-induced anaphylactic reactions[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124(2):307-314.

基金项目：1.山西省回国留学人员科研资助项目（2009-51）；2.山西省国际科技合作项目（2010081063）

作者简介：杨凯（1985- ），男（汉族），山西临汾人，硕士研究生，主要从事法医病理学研究工作。Tel: 13453109441, E-mail: mryangk@163.com

通讯作者：高彩荣（1960- ），女（汉族），山西夏县人。教授，医学博士，博士生导师，主要从事法医病理学的教学、研究和检案工作。Tel: 0351-4135175, E-mail: Gaocairong5175@163.com