

SIRS 与 MODS 患者外周血单核细胞环氧化酶与血小板活化因子的关系研究

唐皓 熊艳 李玉杰 詹红 彭延文 荆小莉 梁艳冰 叶海宁 马中富

【摘要】 目的 了解环氧化酶(COX)和血小板活化因子(PAF)在全身炎症反应综合征(SIRS)与多器官功能障碍综合征(MODS)患者发病机制中的作用。**方法** 选择 28 例符合美国胸科医师协会/危重病医学会(ACCP/SCCM)提出的 SIRS 和 MODS 诊断标准患者,其中 SIRS 组 13 例,MODS 组 15 例,另以与患者年龄、性别相匹配的 11 名健康体检者作为正常对照组。采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离外周血单核细胞(PBMCs);用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 PBMCs 中 COX-2 含量与血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)活性;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 的 mRNA 表达。**结果** MODS 组患者 PBMCs 中 COX-2 含量、PAF-AH 活性及两者的 mRNA 表达均显著高于正常对照组和 SIRS 组(P 均 <0.05),正常对照组与 SIRS 组间差异无显著性,死亡患者高于存活患者(P 均 <0.05);3 组 PBMCs 中 COX-2 含量与 PAF-AH 活性间呈正相关关系($r=0.329, P<0.05$)。死亡患者的外周血白细胞计数、淋巴细胞计数、氧合指数与存活患者比较差异均无显著性,血糖、血肌酐则明显高于存活患者($P<0.05$ 和 $P<0.01$), CO_2 总含量(TCO_2)、动脉血 pH 值均明显低于存活患者(P 均 <0.01)。**结论** COX-2 与 PAF-AH 参与了 MODS 的发病过程,而且可作为判断 SIRS 与 MODS 预后的参考指标;血糖、肌酐、 TCO_2 、pH 可作为判断病情及预后的其他参考指标。

【关键词】 全身炎症反应综合征; 多器官功能障碍综合征; 环氧化酶-2; 血小板活化因子-抗透明质酸酶

Study of relationship between cyclooxygenase and platelet-activating factor on peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome

TANG Hao*, XIONG Yan, LI Yu-jie, ZHAN Hong, PENG Yan-wen, JING Xiao-li, LIANG Yan-bing, YE Hai-ning, MA Zhong-fu. * Department of General Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Sun Yan-sen University, Sun Yan-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China
Corresponding author: MA Zhong-fu (Email: ma_zf@tom.com)

【Abstract】 Objective To study the role of cyclooxygenase (COX) and platelet-activating factor (PAF) in pathophysiologic mechanisms of patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods** Twenty-eight adult patients whose diagnosis met American college of chest physicians/society of critical care medicine (ACCP/SCCM) criteria for SIRS and MODS were enrolled for study including 13 cases for SIRS group and 15 cases for MODS group. The normal control group consisted of 11 healthy volunteers who matched with study subjects for age and gender. Enzyme linked immunoadsorbent assay (ELISA) was used to measure the content of COX-2 and the activity of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure the COX-2 mRNA and PAF-AH mRNA expression of PBMCs. **Results** The content of COX-2 and the activity of PAF-AH of PBMCs and the expression of their mRNA in MODS group were higher than those in SIRS group and control group (all $P<0.05$). There was no significant difference between SIRS group and control group. The content of COX-2 and the activity of PAF-AH and the expression of their mRNA of PBMCs in non-survivors were higher than those in survived patients (all $P<0.05$). In 3 groups, positive correlation was found between the COX-2 content and PAF-AH activity ($r=0.329, P<0.05$). The leukocyte count, lymphocyte count, and PaO_2/FiO_2 of peripheral blood in non-survivors showed no significant difference with those of survived patients (all $P>0.05$). The blood glucose and creatinine of non-survivors were higher than those of survived patients ($P<0.05$ and $P<0.01$). The total CO_2 content (TCO_2) and pH value of non-survivors were lower than those of survived patients (both $P<0.01$). **Conclusion** This study shows that COX-2 and PAF-AH play a role in the occurrence of MODS, and they can be used as indexes to judge the prognosis of SIRS and MODS. Blood glucose, creatinine, TCO_2 and pH value of blood can be used as other indexes for judging the state and the prognosis of the illness.

【Key words】 systemic inflammatory response syndrome; multiple organ dysfunction syndrome; cyclooxygenase-2; platelet-activating factor acetylhydrolase

研究显示,外周血单核细胞(PBMCs)是参与全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)发生、发展的重要细胞之一,在创伤、感染等致病因素作用下,PBMCs 被活化,将大量的炎症介质释放入血,引起组织、器官的损害^[1]。本研究拟通过测定 SIRS 与 MODS 患者 PBMCs 中环氧化酶-2(COX-2)含量、血小板活化因子-乙酰水解酶(PAF-AH)活性及其 mRNA 表达,以期进一步探讨这两种酶在 SIRS 与 MODS 发病过程中的作用及其相互关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象:2004 年 6 月—2005 年 6 月本院急诊重症监护室(EICU)、外科重症监护室(SICU)与急诊观察区的患者 28 例,SIRS 和 MODS 的诊断符合 1991 年美国胸科医师协会/危重病医学会(ACCP/SCCM)联合倡议提出的诊断标准^[2]。SIRS 患者 13 例,男 8 例,女 5 例;年龄 21~79 岁,平均(62.77±6.22)岁;呼吸道感染 7 例,急性胃肠炎 2 例,急性胰腺炎 1 例,系统性红斑狼疮 1 例,急性心肌梗死 2 例。MODS 患者 15 例,男 8 例,女 7 例;年龄 26~90 岁,平均(61.40±5.42)岁;严重感染脓毒症 4 例,失血性休克 2 例,心肺复苏后 2 例,手术创伤后 3 例,糖尿病肾病 4 例。所有患者均没有接受抗肿瘤药物、放射和免疫抑制剂治疗,均为非移植患者、人类免疫缺陷病毒感染(艾滋病)患者、粒细胞缺乏者。MODS 患者采集外周静脉血时,按照 1995 年全国危重病急救医学学术会议制定的 MODS 病情分期诊断标准及严重程度评分标准^[3]评分。正常对照组 11 名为健康体检者,男 6 名,女 5 名;年龄 23~72 岁,平均(44.91±4.58)岁。3 组间一般情况比较差异均无显著性(P 均 >0.05),有可比性。

1.2 研究方法

1.2.1 标本采集:健康体检者晨起空腹采静脉血,SIRS 与 MODS 患者于确诊 48 h 内采血,每次采血 10 ml,立即注入含 0.05 ml 肝素的无菌离心管中,所有过程均严格无菌操作。血常规检测结果见表 1。

1.2.2 PBMCs 的分离及 PBMCs 中 COX-2、

基金项目:广州市科委重点攻关课题(2001-Z-130-02);广东省医学科研基金资助项目(A2003176)

作者单位:510080 广州,中山大学附属第一医院普内科(唐皓,梁艳冰,叶海宁,马中富),急诊科(熊艳,李玉杰,詹红,荆小莉);中山大学免疫教研室(彭延文)

通讯作者:马中富,教授,博士生导师(E-mail:ma_zf@tom.com)

作者简介:唐皓(1973-),女(汉族),四川荣县人,医学硕士,主治医师,主要从事危重病的基础和临床研究,已发表论文 10 余篇。

表 1 3 组血常规比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of blood routine examination

		in three groups($\bar{x}\pm s$)			$\times 10^9/L$
组别	例数(例)	白细胞计数	中性粒细胞计数	淋巴细胞计数	
正常对照组	11	6.87±1.27	4.12±0.57	2.19±0.47	
SIRS 组	13	13.29±7.27 [#]	10.84±6.61 [#]	1.34±0.23	
MODS 组	15	11.94±5.02 [#]	9.47±4.88 [#]	1.52±0.22	

注:与正常对照组比较:[#] $P<0.05$

PAF-AH 检测:采用淋巴细胞分离液密度梯度离心法^[4]。以 COX-2 标准品平均吸光度(A)值减去空白值做“浓度-吸光度”标准曲线,依据样本的平均 A 值和标准曲线计算样本浓度。PAF-AH 活性按试剂盒说明书公式计算。

PAF-AH 活性= $\Delta A_{405}/\text{min} \times 10.66 \text{ mmol/L} \times$

$$\frac{0.225 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \times \text{样品稀释度}$$

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 PBMCs 中 COX-2 和 PAF-AH 的 mRNA 表达: PBMCs 总 RNA 提取以及浓度、纯度的检测按文献^[4]方法。cDNA 的 PCR 扩增及检测:①引物设计和合成人的 COX-2、PAF-AH 及内参照 β -肌动蛋白(β -actin)引物序列查阅国外文献^[5-8]获得,并与基因文库进行对照,全部引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。②PCR 扩增方法:取 2 μl cDNA, 2 μl 10 $\times$ PCR 缓冲液(buffer), 2 μl 10 mmol/L dNTP, 引物上、下游各 0.2 μl , 0.5 μl Taq 酶, 1.8 μl 2.5 mmol/L MgCl_2 , 加纯净水调至 20 μl , 放入 PCR 仪:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 其后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 将产物贮存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。③PCR 产物的检测:取 10 μl PCR 扩增产物, 置于质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(70 V, 45 min), 完毕后置于 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 溴化乙锭(EB)染液染色 10 min, 采用凝胶成像和化学发光图像分析系统, 测定电泳条带 A 值。以 β -actin 为内参照, 计算 COX-2 和 PAF-AH 条带 A 值与 β -actin 条带 A 值的比值, 即为扩增产物相对定量值。

1.3 统计学分析:所有资料用 SPSS 11.0 统计软件包处理, 数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较用方差分析(ANOVA)和 t 检验, 相关分析用简单相关分析法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 PBMCs 中 COX-2 含量与 PAF-AH 活性比较(表 2):3 组间 PBMCs 中 COX-2 含量与 PAF-AH 活性比较差异均有显著性($F_{\text{COX-2}} =$

38.89, $P < 0.01$; $F_{\text{PAF-AH}} = 3.82$, $P < 0.05$)。MODS 组 COX-2 含量和 PAF-AH 活性显著高于正常对照组和 SIRS 组。3 组间 COX-2 含量与 PAF-AH 活性呈显著正相关 ($r = 0.329$, $P < 0.05$)。

表 2 3 组 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of COX-2 and PAF-AH of PBMCs in three groups ($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	COX-2 ($\mu\text{g/L}$)	PAF-AH ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$)	
正常对照组	11	31.52 $\pm$ 2.73	4.30 $\pm$ 1.36	
SIRS 组	13	30.34 $\pm$ 3.10	3.22 $\pm$ 1.27	
MODS 组	15	54.32 $\pm$ 0.42 [△]	10.37 $\pm$ 2.68 [△]	

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.05$;与 SIRS 组比较,[△] $P < 0.05$

2.2 存活与死亡患者 PBMCs 中 COX-2 含量与 PAF-AH 活性比较(表 3);以采集血标本后 1 个月内死亡为死亡的标志。正常对照组无死亡;SIRS 组死亡 1 例,占 7.7%;MODS 组死亡 9 例,占 60.0%。死亡患者的 PBMCs 中 COX-2 含量与 PAF-AH 活性均显著高于存活患者(P 均 < 0.05)。

表 3 存活组和死亡组 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of COX-2 and PAF-AH of PBMCs in surviving and dead groups ($\bar{x} \pm s$)				
组别	例数	COX-2 ($\mu\text{g/L}$)	PAF-AH ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$)	
存活组	18	38.63 $\pm$ 3.55	6.55 $\pm$ 2.27	
死亡组	10	51.38 $\pm$ 2.64 [△]	8.84 $\pm$ 2.24 [△]	

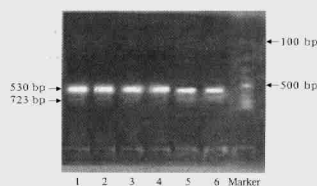
注:与存活组比较,[△] $P < 0.05$

2.3 3 组 PBMCs 中 COX-2 mRNA 与 PAF-AH mRNA 表达(表 4, 图 1, 图 2);正常对照组与 SIRS 组 PBMCs 中 COX-2 mRNA 与 PAF-AH mRNA 表达水平差异均无显著性(P 均 > 0.05);MODS 组 COX-2 mRNA 与 PAF-AH mRNA 表达水平均显著高于正常对照组与 SIRS 组(P 均 < 0.05)。相关分析显示:3 组 PBMCs 中 COX-2 含量和 PAF-AH 活性与其 mRNA 表达均呈显著正相关($r_1 = 0.725$, $P_1 < 0.01$; $r_2 = 0.364$, $P_2 < 0.05$)。

表 4 3 组 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of COX-2 and PAF-AH mRNA expression of PBMCs in three groups ($\bar{x} \pm s$) A 值				
组别	例数(例)	COX-2 mRNA	PAF-AH mRNA	
正常对照组	11	0.309 $\pm$ 0.014	0.280 $\pm$ 0.016	
SIRS 组	13	0.309 $\pm$ 0.011	0.270 $\pm$ 0.011	
MODS 组	15	0.460 $\pm$ 0.014 [△]	0.430 $\pm$ 0.010 [△]	

注:与正常对照组比较,[△] $P < 0.05$;与 SIRS 组比较,[△] $P < 0.05$



1,2 为正常对照组;3,4 为 SIRS 组;5,6 为 MODS 组
图 1 PBMCs 中 COX-2 mRNA 表达

Figure 1 Expression of COX-2 mRNA of PBMCs



1,2 为 MODS 组;3,4 为 SIRS 组;5,6 为正常对照组
图 2 PBMCs 中 PAF-AH mRNA 表达

Figure 2 Expression of PAF-AH mRNA of PBMCs

2.4 存活患者与死亡患者 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 的 mRNA 表达(表 5);死亡患者 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 的 mRNA 表达明显高于存活患者(P 均 < 0.05)。

表 5 存活组和死亡组 PBMCs 中 COX-2 与 PAF-AH 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of COX-2 and PAF-AH mRNA expression of PBMCs in surviving and dead groups ($\bar{x} \pm s$) A 值				
组别	例数(例)	COX-2 mRNA	PAF-AH mRNA	
存活组	18	0.350 $\pm$ 0.014	0.320 $\pm$ 0.018	
死亡组	10	0.460 $\pm$ 0.033 [△]	0.430 $\pm$ 0.020 [△]	

注:与存活组比较,[△] $P < 0.05$

2.5 MODS 患者中存活与死亡患者的 MODS 评分比较;MODS 患者 MODS 评分为 9~18 分,15 例 MODS 患者中存活 6 例,死亡 9 例,病死率 60%;存活患者的 MODS 评分[(12.00 $\pm$ 0.63)分]明显低于死亡患者[(15.44 $\pm$ 0.67)分, $P < 0.01$]。

2.6 存活与死亡患者外周白细胞计数、淋巴细胞计数、血糖(BG)、CO₂ 总含量(TCO₂)、动脉血 pH 值、肌酐(Scr)、氧合指数(PaO₂/FiO₂)的比较(表 6);存活组患者白细胞计数、淋巴细胞计数、PaO₂/FiO₂ 与死亡组比较差异均无显著性;血糖、Scr 均明显低于死亡组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),TCO₂, pH 明显高于死亡组(P 均 < 0.01)。

表 6 存活和死亡组外周血白细胞计数、淋巴细胞计数、血糖、TCO₂、pH 值、SCr、PaO₂/FiO₂ 的比较($\bar{x} \pm s$)Table 6 Comparison of WBC, lymphocyte, BG, TCO₂, pH, SCr, PaO₂/FiO₂ between surviving and dead groups($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	淋巴细胞计数 ($\times 10^9/L$)	BG (mmol/L)	TCO ₂ (mmol/L)	pH 值	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	PaO ₂ /FiO ₂ (mm Hg)
存活组	18	13.40 $\pm$ 1.54	1.49 $\pm$ 0.20	7.67 $\pm$ 0.85	26.33 $\pm$ 1.14	7.42 $\pm$ 0.02	129.83 $\pm$ 18.39	262.40 $\pm$ 23.86
死亡组	10	11.08 $\pm$ 1.63	1.34 $\pm$ 0.25	12.94 $\pm$ 2.94 [#]	17.90 $\pm$ 1.08 [△]	7.29 $\pm$ 0.03 [△]	328.60 $\pm$ 81.27 [△]	234.22 $\pm$ 47.05

注:与存活组比较:[#] $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$;1 mm Hg=0.133 kPa

3 讨论

研究证实,COX-2 在炎症过程中被大量诱导和表达,致使炎症反应放大和增强^[9,10]。在本研究中,正常对照组与 SIRS 患者 PBMCs 中 COX-2 含量及其 mRNA 表达均明显低于 MODS 患者,而且存活患者明显低于死亡患者,说明细胞内 COX-2 含量与病情严重程度及预后有密切关系。正常对照组与 SIRS 组 PBMCs 中 COX-2 含量及其 mRNA 表达差异无显著性,可能与样本例数较少、SIRS 诊断标准过于宽松及入选患者病情较轻有关。

在内毒素血症大鼠及人与兔的急性炎症反应阶段模型中,都证实了血浆型 PAF-AH 活性下降呈时间依赖性,不同炎症中 PAF-AH 活性在时间点上也有差异^[11,12]。本研究中,MODS 组 PBMCs 中 PAF-AH 活性及其 mRNA 表达均明显高于正常对照组和 SIRS 组,死亡组高于存活组,可能系疾病时机体自身调节,升高 PAF-AH 以减轻 PAF 和氧化磷脂的炎症介质反应。而正常对照组与 SIRS 组之间的 PAF-AH 差异无显著性,可能与样本数少或 SIRS 组患者病情较轻有关。Schaloske 等^[13]发现,在 PAF 和酵母多糖的刺激下,P388D₁ 细胞释放游离花生四烯酸(AA)和前列腺素 E₂(PGE₂),在 LPS 和酵母多糖刺激下,COX-2 表达增多,所以依赖于脂多糖(LPS)/PAF 诱导的 PGE₂ 基因表达归因于 COX-2 的生成。本研究结果显示,SIRS 与 MODS 患者 PBMCs 中 COX-2 含量与 PAF-AH 活性变化呈正相关,推测致病因素作用下,COX-2 与 PAF-AH 的表达均增加,而 PAF 本身又可诱导 COX-2 表达增加,并激活上游物质 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)所致。

同时,本组 MODS 存活患者 MODS 评分明显低于死亡者,说明 MODS 评分与病情严重程度及预后相关。SIRS 组和 MODS 组死亡者与存活者间白细胞计数、淋巴细胞计数及 PaO₂/FiO₂ 差异均无显著性,而血糖、SCr 明显高于存活者,TCO₂、血 pH 值明显低于存活者。说明患者的器官功能已受到严重破坏,可作参考指标。

参考文献:

- 梁艳冰,陈娟,马中富,等.多器官功能障碍综合征患者外周血单核细胞凋亡的研究[J].中国危重病急救医学,2006,18:101-104.
- 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J].Crit Care Med,2003,31:1250-1256.
- 王今达,王宝恩.多脏器功能失常综合征(MODS)病情分期诊断及严重程度评分标准[J].中国危重病急救医学,1995,7:346-347.
- 孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2000:143-144.
- Sorli C H,Zhang H J,Armstrong M B,et al. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin-1 in the pancreatic islet[J].Proc Natl Acad Sci USA,1998,95:1788-1793.
- Rangel E B,Moura L A,Franco M F,et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 during acute human renal allograft rejection[J].Clin Transplant,2005,19:543-550.
- Inoue T,Sugimoto A,Suzuki Y,et al. Type II platelet-activating factor-acetylhydrolase is essential for epithelial morphogenesis in Caenorhabditis elegans[J].Proc Natl Acad Sci USA,2004,101:13233-13238.
- Osoegawa M,Niino M,Ochi H,et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene polymorphism and its activity in Japanese patients with multiple sclerosis[J].J Neuroimmunol,2004,150:150-156.
- Martey C A,Pollock S J,Turner C K,et al. Cigarette smoke induces cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E₂ synthase in human lung fibroblasts: implications for lung inflammation and cancer[J].Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2004,287:L981-991.
- Sadikot R T,Christman J W,Blakwell T S. Molecular targets for modulating lung inflammation and injury[J].Curr Drug Targets,2004,5:581-588.
- Svetlov S I,Sturm E,Olson M S,et al. Hepatic regulation of platelet-activating factor acetylhydrolase and lecithin:cholesterol acyltransferase biliary and plasma output in rats exposed to bacterial lipopolysaccharide[J].Hepatology,1999,30:128-136.
- Van Lenten B J,Hama S Y,de Beer F C,et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response; loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures[J].J Clin Invest,1995,96:2758-2767.
- Schaloske R H,Provins J W,Kessen U A,et al. Molecular characterization of the lipopolysaccharide/platelet activating factor- and zymosan-induced pathways leading to prostaglandin production in p388D₁ macrophages[J].Biochim Biophys Acta,2005,1687:64-75.

(收稿日期:2006-02-22 修回日期:2006-10-28)

(本文编辑:李银平)