

# 炎症介质 (PAF)致变应性鼻炎血小板聚集的研究

## Study of Platelet Aggregation Induced by Inflammatory Mediator (PAF) in Allergic Rhinitis

曾 钢            黄光武            农辉图            小杉忠诚\*            余奇松  
Zeng Gang        Huang Guangwu    Nong Huitu        Tadayoshi Kosugi    Yu Qisong

(广西医科大学第一附属医院耳鼻喉科 南宁市滨湖路6号 530021)

(Department of Otorhinolaryngology, First Affiliated Hospital,  
Guangxi Medical University, 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021)

**摘要** 为了解变应性鼻炎患者血小板活化程度及与血清免疫球蛋白的关系,我们测定了变应性鼻炎患者(56例)、正常人(50例)的血小板活化因子(PAF)、ADP致血小板聚集率及血清IgE、IgG、IgA、IgM水平,结果显示,变应性鼻炎患者PAF致血小板聚集率为 $54.34 \pm 23.18$ ,正常人为 $39.72 \pm 18.03$ ,变应性鼻炎组较正常人明显增高( $P < 0.01$ ),且与血清IgE水平呈正相关( $P < 0.05$ )。表明变应性鼻炎患者血小板活化程度增加,与PAF及血清IgE水平增高有关。提示应用PAF拮抗剂、血小板活化抑制剂可能是治疗变应性鼻炎的新途径。

**关键词** 变应性鼻炎 血小板活化因子 血小板聚集 IgE

中图法分类号 R 765.21

**Abstract** The purpose of this study was to investigate the degree of platelet activating and its relation with serum immunoglobulin. The platelet aggregation rates induced by Platelet activating factor(PAF) and ADP and the concentrations of serums IgE, IgG, IgA, IgM from allergic rhinitis ( $n = 56$ ) and normal subjects ( $n = 50$ ) were detected. The platelet aggregation rates in allergic rhinitis subjects were significantly increased  $54.34 \pm 23.18$  versus  $39.72 \pm 18.03$  ( $P < 0.01$ ) and were positive correlation with the serum IgE levels ( $P < 0.05$ ). These data implicate that the increase of platelet activating degree in allergic rhinitis subjects involved with the increase of PAF and serum IgE levels. It suggests that platelet activating antagonist and platelet aggregating inhibitor will be a new approach in treat for allergic rhinitis.

**Key words** allergic rhinitis, platelet activating factor, platelet aggregation, IgE

血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)<sup>[1]</sup>是近十余年才被认识的一种重要的炎性介质,是目前已知最强的血小板致聚剂和嗜酸性粒细胞趋化因子<sup>[2]</sup>。通过活化血小板和趋化白细胞等作用参与免疫和炎症反应。国内外的研究已证实,PAF血小板的活化聚集与支气管哮喘发作关系十分密切。变应性鼻炎是常见病、多发病,近年来的研究发现PAF参与了变应性鼻炎的病理过程。目前国内未见变应性鼻炎与PAF关系的文章报道。我们以PAF为血小板致聚剂,研究变应性鼻炎患者的血小板活化、聚集,

并测定血清中的IgE、IgG、IgA、IgM水平,初步探讨变应性鼻炎的发作与PAF诱导血小板活化、聚集的关系和机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象

1.1.1 正常对照组:50位无过敏疾患病史的健康者,其中女性28例,男性22例,年龄组分布如图1。

1.1.2 实验组:选取在广西医科大学一附院耳鼻喉科门诊就诊且皮肤过敏原皮试至少有一种阳性的变应性鼻炎患者5例,其中女性3例,男性2例,年龄10~6岁,以20~40岁居多,年龄组分布如图1。患者病程最长者10余年,近一周有发作病史,有连续性打

喷嚏、清涕、鼻塞等症状,检查可见鼻粘膜苍白、水肿,个别患者有过敏性疾病家族史,多数病例在病史中能追问到明确的致敏病因,如粉尘、油烟、油漆、木屑、花粉等。变应性鼻炎的诊断按顾之燕整理的变应性鼻炎记分诊断标准<sup>[3]</sup>。

## 1.2 材料

1.2.1 PAF,日本ヌフナコシ株式会社;ADP,日本二光生物科学公司。此两种试剂由日本小杉忠诚教授赠与。

1.2.2 人总 IgE酶联免疫(BA)测定试剂盒,粉尘螨特异性 IgE酶联免疫(BA)测定试剂盒,由上海江南生物技术工程有限公司提供

1.2.3 血小板聚集仪(NKK Hematracer I),日本二光生物科学公司

1.2.4 QM300特定蛋白分析仪,法国 Pasteur公司制造

1.2.5 DG5030型酶标仪,南京华东电子集团股份有限公司。

腹抽血,用一次性塑料注射器,以3.8%枸橼酸钠抗凝。室温下离心800 r/min,10 min,取PRP(platelet rich plasma,富血小板血浆),然后于4℃下再离心3000 r/min,15 min,取PPP(platelet poor plasma,贫血小板血浆)按草酸铵法作血小板直接计数并用PPP调至 $250 \times 10^9/L \sim 300 \times 10^9/L$ 按Born's氏比浊法<sup>[5]</sup>,用日本二光生物科学公司的血小板聚集仪自动测定记录血小板最大聚集率(Maximum aggregation rate,简称MAR),测定于抽血后3 h内完成。用微量采样器分别汲取PPP和PRP 250 μL,注入硼玻小管,PRP管加小磁棒搅拌。置聚集仪的恒温(37℃)预温3 min,校正记录仪,然后将PRP管插入测试孔,调记录仪的描计笔到0%为聚集前的浊度,取出PRP管,将PPP管插入测试孔,调记录仪的描计笔到100%作对比浊度,取出PPP管再插PRP管,如果描计笔位于0%则启动记录仪,否则再按上法校对。致聚剂为① PAF,② ADP PAF用生理盐水溶解稀释成 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ,分装成2 mL瓶,置-20℃保存,使用时在室温自然解冻。ADP用生理盐水溶解稀释为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ,分装于小瓶置-20℃保存,使用时在室温自然解冻,稀释为 $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 用微量注射器给PRP管加25 μL PAF ADP,每管加一种,观察记录仪的聚集曲线波形,记录5 min~10 min,以出现MAR为止,记录纸速为10 mm/min<sup>[6]</sup>。

1.3.3 总IgE测定:采用双抗体夹心法。将兔抗人IgE抗体固相化后,加待测血清和IgE标准液,再加入兔抗人IgE抗体-酶结合物,在酶标仪492 nm波长处测OD值。再根据IgE标准液绘制的曲线,查出相应的样品IgE含量。

1.3.4 特异性IgE测定:采用酶标间接法测定。特异性粉尘螨浸液包被,加入待测血清和阴性对照,再加入生物素-亲和素系统抗体。用酶标仪在492 nm波长处测OD值。被测血清OD值与阴性血清OD值相差2倍者为阳性。

1.3.5 血清IgG IgA IgM由QM300特定蛋白分析仪自动检测。

1.3.6 用t检验、直线相关分析进行统计学处理

## 2 结果

### 2.1 正常人和患者的血小板聚集率

患者的PAF致聚率较正常人明显增高( $P < 0.01$ ),患者的ADP致聚率虽较正常人增高,但在统计学上无显著性差别( $P > 0.05$ )

### 2.2 血清总IgE测定结果

血清总IgE正常值 $< 400 \text{ U/mL}$ ,50位正常人血

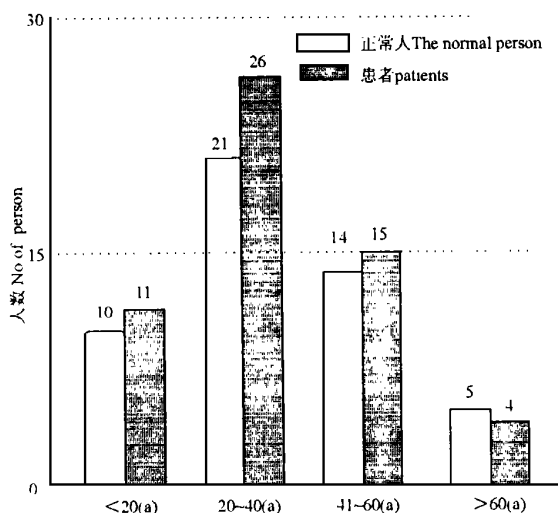


图1 正常人及患者年龄组分布

Fig. 1 The age-distribution of patients and the normal

## 1.3 方法

1.3.1 过敏原皮试:依据广西地区的具体情况,选20种抗原注入皮内,注射量为0.02 mL~0.03 mL,生理盐水注射液作为阴性对照注入。在注入15 min后,若注射部位出现圆形隆起,边缘潮红,直径大于阴性对照者,为阳性反应。判定按北京协和医院标准<sup>[4]</sup>。选取皮肤过敏原皮试至少有一种阳性的变应性鼻炎患者56例,进行以下指标的检测

1.3.2 血小板聚集率检测:受检者抽血前3 d停用影响血小板聚集的药物(如阿司匹林、潘生丁等),空

清总 IgE 值为  $288 \pm 91$  U/mL, 56 例变应性鼻炎血清总 IgE 为  $1158 \pm 956$  U/mL, 与正常值比较  $P < 0.01$ , 两者间有显著差别。

### 2.3 血清特异性 IgE 测定结果

表 1 正常人和患者的血小板聚集率

Table 1 Platelet aggregation in normal subjects and allergic rhinitis

	ADP 致聚率 Platelet aggregation by ADP (%) ( $\bar{x} \pm s$ )	PAF 致聚率 Platelet aggregation by PAF (%) ( $\bar{x} \pm s$ )
正常人 (50 例) Normal subject (50 cases)	$61.24 \pm 15.50$	$39.72 \pm 18.03$
患者 (56 例) Patient (56 cases)	$65.96 \pm 16.38$	$54.34 \pm 23.18$
P 值	$P > 0.05$	$P < 0.01$

表 2 血清总 IgE 测定结果

Table 2 Total serum IgE levels

总 IgE Total serum IgE (U/mL)	正常人 No. normal subjects	患者 No. patients
0~200	31	0
201~400	17	4
401~600	2	15
601~1000		19
>1000		18

表 3 血清特异性 IgE 测定结果

Table 3 Special serum IgE levels

特异性 IgE Special IgE	正常人 No. normal subjects	患者 No. patients
1. 0~2.0	48	9
2. 1~3.0	2	19
3. 1~4.0	0	22
>4.0	0	6

56 例患者中, 有 47 例 (83.93%) 特异性 IgE  $\geq 2.1$ , 9 例 (16.07%)  $\leq 2.1$ , 这些病例与过敏原皮试结果相比较, 结果相符。

### 2.4 血清 IgG IgA IgM 测定结果

表 4 血清 IgG IgA IgM 测定结果

Table 4 Serum IgG, IgA, IgM levels

	IgG ( $\bar{x} \pm s$ )	IgA ( $\bar{x} \pm s$ )	IgM ( $\bar{x} \pm s$ )
正常人 (50 例) Normal subject (50 cases)	$13.93 \pm 2.63$	$2.25 \pm 0.77$	$1.50 \pm 0.57$
患者 (56 例) patient (56 cases)	$14.25 \pm 2.51$	$2.14 \pm 0.59$	$1.56 \pm 0.59$
P 值	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

正常人与患者的血清 IgG IgA IgM 浓度在统计学上无明显差别 ( $P > 0.05$ )

### 2.5 血清 IgG IgA IgM 总 IgE 与血小板聚集率的相关性分析

在变应性鼻炎患者和正常人共 106 例受检者中, 血清 IgG IgA IgM 与 PAF 致血小板聚集率无明显相关性, 总 IgE 水平与 PAF 致血小板聚集率的相关系数  $r = 0.215$ , 两者呈一定相关性 ( $P < 0.05$ ), 而在粉尘螨特异性 IgE 阳性的患者中, 特异性 IgE 水平与 PAF 致血小板聚集率的相关系数  $r = 0.442$ , 两者呈一定相关性 ( $P < 0.05$ ), 在这些受检者中, 血清 IgG IgA IgM 总 IgE 与 ADP 致血小板聚集率无明显相关性。

### 3 讨论

近年来的研究认为, 血小板活化因子 (PAF) 是变应性鼻炎发病过程中的另一重要炎症介质<sup>[7]</sup>。目前已证实, 在 I 型变态反应性疾病中, 抗原致敏后, 肥大细胞、巨噬细胞、嗜碱细胞可释放出 PAF<sup>[1,8]</sup>, 引起这些炎症细胞的浸润、聚集, 释放出更多种的炎症介质, 如组胺、白三烯 (LTs)、前列腺素 (PGs)、氧自由基、主要碱性蛋白 (MBP)、嗜酸性细胞过氧化物酶 (EPO)、嗜酸性细胞阳离子蛋白 (ECP)、嗜酸性细胞衍生神经毒 (EDN) 等炎症介质, 从而产生一系列生物学作用。

血小板不仅在止血和血栓形成过程中起重要作用, 而且参与了炎症和免疫反应等多种病理过程<sup>[9]</sup>。目前在对哮喘的研究中发现, 在哮喘患者中, 血小板活化、PAF 致血小板聚集率升高, 且血小板的活化与 PAF 的产生有直接关系, PAF 致喘作用有赖于血小板的活化和参与<sup>[10-12]</sup>。

本研究中, 我们发现, 变应性鼻炎患者的血小板对 PAF 的聚集率较正常人明显增高 ( $P < 0.01$ ), 对 ADP 的聚集率较正常人有增高但在统计学上无显著差别 ( $P > 0.05$ ) 提示: 在变应性鼻炎的病人中, PAF 作为一种炎性介质使血小板活化程度增高、聚集率增强, 从而能释放其内的炎性介质, 在一定程度上参与了变应性鼻炎发作的病理过程。在变应性鼻炎的病人中, 由于长期有变应原的刺激, 炎性细胞分泌 PAF 增多, 一方面使鼻分泌物中 PAF 及溶血 PAF (Lyso-PAF) 增多且 PAF 活性明显增高<sup>[7, 13, 14]</sup>, 另一方面使血中的 PAF 浓度增高。PAF 本身对其受体具有调节作用, 呈剂量依赖关系<sup>[15]</sup>, 从而使血小板膜上的 PAF 受体数量上升, PAF 与血小板膜上的受体结合是 PAF 致血小板聚集的关键。因此当有 PAF 出现时, PAF 与血小板结合增强, 血小板活化程度增强, 聚集率升高。PAF 通过与血小板膜上的受体与

血小板结合,降低血小板内的 cAMP/cGMP 比值和激发钙离子进入血小板内,使血小板活化,引起血小板的聚集和释放反应<sup>[16]</sup>,释放其内含的炎性介质,因此而产生了一系列的炎症反应和免疫反应。与 ADP 相比,PAF 对血小板致聚机理不同,PAF 对血小板的聚集作用不依赖 ADP 通路,被认为是 ADP 花生四烯酸(AA)致聚途径以外的第三通路<sup>[17]</sup>,PAF 能引起 ADP 已耗竭以及环氧酶抑制剂处理过的血小板聚集。日本的小杉忠诚教授在变应性鼻炎血小板机能的研究中发现,在用花生四烯酸的代谢物脂氧合酶的抑制剂 Azeptin 治疗变应性鼻炎时,治疗后的 PAF 致血小板聚集率较治疗前明显低下,而 ADP 胶原作为致聚剂的血小板聚集率在治疗前后则无明显变化,纤维蛋白原的含量亦无变化,说明变应性鼻炎患者 PAF 所致的血小板聚集率增高,是因为 PAF 作为变应性疾病的一种重要炎性介质刺激血小板活化程度增高的结果,而不是因为血小板凝集功能亢进<sup>[18]</sup>。陈伊宁等的研究亦提示,用 ADP 胶原作为致聚剂时,变应性鼻炎组和正常对照组的血小板聚集率无明显差别<sup>[19]</sup>。

血清 IgE 水平增高是 I 型变态反应性疾病的基本特点,本研究亦提示变应性鼻炎患者的血清总 IgE 水平较正常对照组明显增高,且与 PAF 致血小板聚集率有一定的相关关系 ( $P < 0.05$ )。既往的理论认为,在变应原作用下,特异性机体能产生 IgE, IgE 与嗜碱细胞和肥大细胞等介质细胞膜上的 IgE 受体结合,使机体致敏,当变应原再次进入鼻腔,与介质细胞膜表面的 IgE 桥连,激发细胞膜发生一系列生化反应,结果使介质细胞脱颗粒释放出大量生物活性介质,如组胺、激肽、白三烯、前列腺素等,这些炎症介质与鼻粘膜发生反应,产生鼻粘膜水肿、鼻塞、喷嚏、鼻涕增多等临床症状。近来研究发现,无论在体外或体内,人血小板膜表面有特异性的 IgE 受体,血小板通过其膜表面的特异性 IgE 受体与 IgE 结合。正常人中只有 10%~20% 的血小板上结合有 IgE,而在 IgE 依赖的过敏性疾病中上升到 50%。血小板表面桥连的 IgE 能与变应原及抗 IgE 结合,从而诱导血小板发生聚集和释放炎症介质的反应, IgE 敏感的血小板所产生的聚集、释放反应要比非 IgE 敏感的血小板更强<sup>[8, 20]</sup>。Astafieva 等<sup>[21]</sup>的研究亦提示,在特异性体质的患者中,血小板聚集率升高与 IgE 水平和靶细胞的炎症介质释放有关。因此,我们认为,在变应性鼻炎的病人中,血清 IgE 水平增高,可使血小板活化、聚集增加,释放炎性介质,如 PAF、组胺、TXA<sub>2</sub>等,其中的 PAF、TXA<sub>2</sub>又进一步增强了血小板的活化、聚

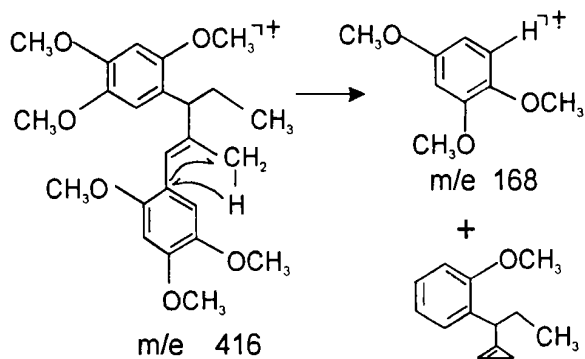
集。综上所述,在变应性鼻炎患者中,血小板活化程度增加,血小板聚集率升高,血小板活化、聚集、释放反应在变应性鼻炎的发病过程中起了一定的作用。变应性鼻炎患者的 PAF 致血小板聚集率升高可能是因为两方面原因造成的,一是血清中 PAF 升高,高浓度的 PAF 刺激血小板膜上的 PAF 受体数量增多,PAF 活化血小板增强、血小板聚集增高。另一是血清 IgE 水平增高, IgE 与血小板结合而发生了聚集、释放反应,其释放的炎性介质又进一步加剧了血小板的活化、聚集。这二者的共同作用可使血小板活化程度增强、聚集增高。

### 参考文献

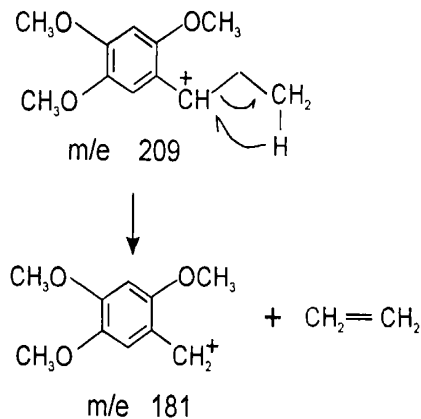
- 1 Benveniste J, Henson P M, Cochrane C G. Leukocyte dependent histamine release from rabbit platelets: the role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J Exp Med*, 1972, 136: 1356~1377.
- 2 Vargaftig B B, Chignard M, Benveniste J et al. . Background and present status of research on platelet activating factor (PAF-acether). *Ann NY Acad Sci*, 1981, 370: 119~137.
- 3 顾之燕整理. 变应性鼻炎诊断和疗效评定标准. *中华耳鼻喉科杂志*, 1991, 26: 134.
- 4 叶世泰. 内科讲座 13. 北京: 北京人民卫生出版社, 1983, 23~24.
- 5 寺田秀夫. 血小板凝集能. *日本临床 (秋季临时增刊号)*, 1985, 43: 680.
- 6 农辉图, 黄光武, 小杉忠诚等. 喉癌患者的血小板聚集功能检测. *中华耳鼻喉科杂志*, 1993, 6: 364~366.
- 7 Miadonna A, Tedeschi A, Arnoux B et al. . Evidence of PAF-acether metabolic pathway activation in antigen challenge of upper respiratory airway. *Am Res Respir Dis*, 1989, 140: 142~147.
- 8 Yasaka T, Boxer L A, Baehner R L et al. . Monocyte aggregation and superoxide anion release in response to Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (FMLP) and platelet-activating factor (PAF). *J Immunol*, 1982, 128: 139.
- 9 Capron A, Ameisen J C, Joseph M. New function for platelets and their pathological implications. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1985, 77: 107~114.
- 10 于化鹏, 府军, 李平升等. 活化血小板在过敏性哮喘中的作用. *中华内科杂志*, 1991, 30: 546~549.
- 11 Denjean A, Arnoux B, Masse R et al. . Acute effects of intracheal administration of platelet-activating factor in baboons. *J Appl Physiol*, 1983, 55: 799~804.
- 12 Morley J, Page C P, Sanjar S. Platelets in asthma. *Lancet*, 1985, 2: 726~727.

(下转第 106 页 Continue on page 106)

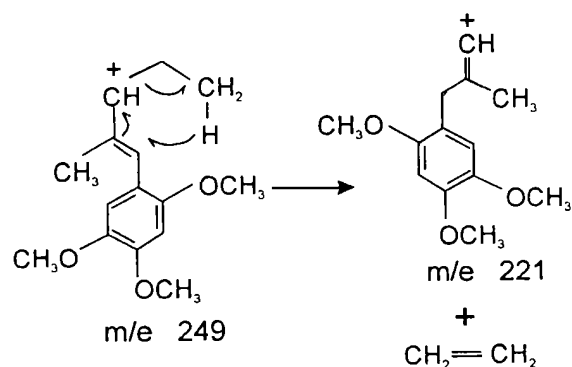
m/e 168则为:



m/e 209离子经过重排成 m/e 181 离子,



m/e 249离子经过 McLafferty 重排成 m/e 221 离子,



致谢

广西中医药研究所蔡全玲实验师, 广西化工研究院李少燕工程师测 MS, 特此致谢

### 参考文献

- 1 刘布鸣, 叶超, 姜惟恒. 异二聚细辛醚的化学结构研究. 分析化学, 1994, 22 (4): 355-358.
- 2 丛浦珠. 质谱学在天然有机化学中的应用. 北京: 科学出版社, 1987.
- 3 王宪楷. 天然药物化学. 北京: 人民卫生出版社, 1988.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 10 页 Continue from page 101)

- 13 白崎英明, 朝仓光司. 鼻アレルギーにおける鼻腔洗浄液中の血小板活性化因子 (PAF) の検出. 日本耳鼻咽喉科学会報, 1990, 93 (3): 420-427.
- 14 Meslier N, Braunstein G, Lacroix J et al. Local cellular and humoral responses to antigenic and distilled water challenge in subjects with allergic rhinitis. Am Res Respir Dis, 1988, 137: 617-624.
- 15 Nakamura M, Honda Z, Izumi T et al. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. J Biol Chem, 1991, 266: 20400-20405.
- 16 Lee T C, Blank M B, Snyder F. 1-Alkyl-2-Acetyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (platelet activating factor) stimulates calcium influx in rabbit platelets. Biochem Biophys Res Commun, 1981, 102: 1262-1268.

- 17 Vargaftig B B. Carrageenan and thrombin trigger prostaglandin synthetase independent aggregation of rabbit platelets inhibition by phospholipase A2 inhibitors. J Pharm Pharmacol, 1977, 29: 222.
- 18 小杉忠诚, 中村真理子, 仲吉博彦等. 鼻アレルギーにおける血小板機能の意義. 1. アレルギー-性鼻炎患者における Azeptin 投与前后的血液凝固纤溶血小板機能の推移. 耳鼻, 1987, 33: 852-858.
- 19 陈伊宁, 黄光武, 农辉图等. 大佛水与变应性鼻炎病人血小板聚集关系的研究. 广西医学, 1995, 17: 263-265.
- 20 Gnes D B, Vander K H, Levinson A I. In vitro binding of an Ig E protein to human platelets. J Immunol, 1986, 136: 3433-3440.
- 21 Astafieva N G. Platelet role in pathogenesis of atopic and nonimmunologic asthma. Allergol Immunopathol Madr, 1990, 18: 19-26.

(责任编辑: 蒋汉明)