论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0754-05

融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板与粒细胞结合的影响

龚丽莎,房兆飞,胡厚源,刘成海,孟 璟 (400038 重庆,第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所)

[摘要] **目的** 探讨融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板与粒细胞结合作用的影响。**方法** 采用 CCK-8 试剂盒检测 TAP-SSL5 对细胞活力的影响;流式细胞仪检测 THP-1 细胞表面 CD162(PSGL-1)的表达,及 TAP-SSL5 对小鼠抗人 CD162 单抗 KPL-1 与 THP-1 细胞结合的抑制作用。以 20 μmol/L ADP 激活人血小板,采用流式细胞仪、瑞氏-姬姆萨染色检测血小板与 THP-1 细胞或人中性粒细胞的结合情况,并研究 TAP-SSL5 的干预作用。**结果** TAP-SSL5 浓度在 30 mg/L 或以下时对 THP-1 细胞或中性粒细胞的活力无明显影响。流式细胞仪检测显示,TAP-SSL5(终浓度 10 mg/L)能显著抑制 KPL-1 与 THP-1 细胞的结合;20 μmol/L ADP 激活的血小板与 THP-1 细胞或中性粒细胞的结合率分别为(31.3±8.4)%和(35.6±5.9)%;细胞经 10 mg/L TAP-SSL5 预先处理后,其结合率分别降至(13.4±6.7)%和(10.4±6.4)% ($P<0.01$)。瑞氏-姬姆萨染色的结果表明,TAP-SSL5 和 SSL5 均可抑制激活的血小板与中性粒细胞的结合($P<0.05$)。**结论** TAP-SSL5 可通过与 PSGL-1 的结合,而直接抑制激活的血小板与粒细胞的结合。

[关键词] 金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5;蜱抗凝血肽;融合蛋白;血小板;中性粒细胞;P-选择素糖蛋白配体-1
[中图法分类号] R331.143;R392.12;R392.3 [文献标志码] A

Effect of TAP-SSL5 fusion protein on binding of human platelets to neutrophils

Gong Lisha, Fang Zhaofei, Hu Houyuan, Liu Chenghai, Meng Jing (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of anti-inflammatory and anticoagulant tick anticoagulant peptide (TAP)-staphylococcal superantigen like protein-5 (SSL5) fusion protein on the binding of human platelets to neutrophils. **Methods** Cell viability was assessed by colorimetric cell counting kit-8 (CCK-8). Flow cytometry (FCM) was applied to detect the expression of CD162 (PSGL-1) on THP-1 cells as well as the inhibitory effect of TAP-SSL5 on the binding of mouse anti-human CD162 monoclonal antibody (KPL-1) to THP-1 cells. Platelets were activated by 20 μmol/L of ADP, and the binding rates of the activated platelets to THP-1 cells and neutrophils were assayed by FCM and Wright-Giemsa staining, respectively. **Results** TAP-SSL5 ≤30 mg/L did not affect the viability of THP-1 cells or human neutrophils, and the TAP-SSL5 at 10 mg/L competitively inhibited KPL-1 binding to THP-1 cells. The binding rates of activated platelets (by 20 μmol/L ADP) to THP-1 cells or neutrophils were (31.3±8.4)% and (35.6±5.9)%, respectively, which decreased to (13.4±6.7)% and (10.4±6.4)% after the THP-1 cells and neutrophils were pre-incubated with 10 mg/L TAP-SSL5 ($P<0.01$). The results of Wright-Giemsa staining showed that both TAP-SSL5 and SSL5 could inhibit the binding of activated platelets to neutrophils ($P<0.05$). **Conclusion** TAP-SSL5 can directly inhibit the platelet-neutrophil binding.

[**Key words**] staphylococcal superantigen like protein-5; tick anticoagulant peptide; fusion protein; platelet; neutrophil; P-selectin glycoprotein ligand-1

Supported by the National High Technology and Development Program of China (863 Program, 2009AA02Z115), the National Natural Science Foundation of China (30871059) and the Major Project for New Drugs Creation and Development (2013ZX09103003-001). Corresponding author: Hu Houyuan, Tel: 86-23-68765167, E-mail: houyuanhu@hotmail.com

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2009AA02Z115);国家自然科学基金(30871059);国家重大新药创制课题(2013ZX09103003-001)
[通信作者] 胡厚源,电话:(023) 68765167,E-mail:houyuanhu@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130228.1714.006.html(2013-02-28)

动脉粥样硬化(atherosclerosis)是一个慢性炎症过程。P-选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)广泛存在于单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞表面。PSGL-1 可与激活的内皮或血小板表面的 P-/E-选择素结合,导致粒细胞在内皮或血小板表面的黏附,进而激活粒细胞,诱发血管壁的炎症反应。金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5(staphylococcal superantigen like protein-5, SSL5)为金黄色葡萄球菌(staphylococcus aureus)的分泌型蛋白,有研究显示,SSL5 可通过与 PSGL-1 结合,抑制粒细胞在激活内皮细胞表面的黏附,并可抑制细胞因子对粒细胞的激活作用[1-2]。在前期研究中,我们已将 SSL5 与凝血因子 Xa(FXa)的强效抑制剂蜱抗凝血肽(tick anticoagulant peptide, TAP)联合,成功构建了融合蛋白 TAP-SSL5。并且体外研究显示,TAP-SSL5 可抑制粒细胞在 P-选择素表面黏附,还可直接抑制 FXa 的活性[3]。此外,TAP-SSL5 还可与血小板表面糖蛋白 GPⅠbα 结合,从而抑制 GPⅠbα 与血管性假性血友病因子(von Willebrand Factor, vWF)的相互作用,这将有可能进一步提高 TAP-SSL5 的抗血栓作用[4]。在各种血管损伤性疾病,如急性冠脉综合征、高血压以及糖尿病患者的循环血液中,可以检测到血小板的激活以及血小板-粒细胞聚集体(platelet-leukocyte aggregates)[5-6]。其中,血小板与单核细胞聚集体的增加不仅是体内血小板被激活的标志,目前也被认为是心血管病的危险因素之一[7-8]。因此,本研究进一步观察融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板与粒细胞结合的影响,旨在进一步探讨融合蛋白 TAP-SSL5 抗炎作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RPMI1640 购自 HyClone 公司;胎牛血清购自 PAA 公司;Percoll 液购自 Phamacia 公司;牛血清白蛋白(BSA)、ADP 购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo 公司;瑞氏-姬姆萨染色液(Wright-Giemsa)(珠海贝索生物技术有限公司);PE 标记的小鼠抗人 CD162(PSGL-1)单克隆抗体(KPL-1)、PE 标记的小鼠抗人 CD62P 单克隆抗体(AC1.2)、PE 标记的小鼠 IgG1(mIgG1-PE)均购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 人单核细胞株 THP-1 细胞的培养 人单核细胞株 THP-1(西南医院病理科赠送,购自 ATCC),采用 RPMI1640 完全培养基(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素),于 37 ℃、5% CO_2 恒温箱培养,每隔 2 ~ 3 天换新鲜培养液。

1.2.2 Percoll 液非连续密度梯度离心法分离人外周血中性粒细胞

1.2.2.1 中性粒细胞分离液的配制 将 Percoll 液与 90 g/L 氯化钠溶液和去离子水分别按体积比 5.5∶1∶3.5 或 6.9∶1∶2.1 混合,得到 55% 及 69% 的 Percoll 分离液。

1.2.2.2 中性粒细胞分离和纯化 健康成人枸橼酸钠抗凝白膜 2 mL(取自西南医院输血科),490 × *g* 水平离心 15 min,弃上层血浆,再吸取白细胞层,以 2 mL 含 1% BSA 的 PBS 重悬。在另一离心管中,由管底依次加入 69% 和 55% 的 Percoll 分离液各 2 mL、细胞悬液 1 mL,490 × *g* 离心 20 min。吸取 2 层 Percoll 分离液界面间的中性粒细胞,加入 3 倍体积的红细胞裂解液(150 mmol/L NH_4Cl、10 mmol/L $KHCO_3$、1 mmol/L Na_2EDTA, pH = 7.4),混匀后室温静置 5 min,200 × *g* 离心5 min。用含 1% BSA 的 PBS 充分洗涤细胞 2 次。台盼蓝染色鉴定中性粒细胞活力 >95%,瑞氏-姬姆萨染色检测分离所得中性粒细胞纯度 >95%。以改良 Tyrode's 缓冲液(150 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L KCl、12 mmol/L $NaHCO_3$、2 mmol/L $CaCl_2$、2 mmol/L $MgCl_2$、1 mg/mL BSA、1 mg/mL D-glucose, pH = 7.4)调整细胞浓度。

1.2.3 细胞活力的检测 调整 THP-1 细胞悬液浓度为 1×10^5/mL(人外周血中性粒细胞 3×10^5/mL)接种于 96 孔板,100 μL/孔,设空白组和阴性对照组,每个剂量和对照组均设 3 个复孔。THP-1 细胞在 37 ℃,5% CO_2 恒孵箱培养 24 h(粒细胞培养 2 h)后,分别加入含 TAP-SSL5 及 SSL5 的培养基处理细胞(终浓度为 3、10、30 mg/L);空白组只含培养基,不加细胞;阴性对照组以等量的 PBS 代替重组蛋白;继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK8,继续在 37 ℃、5% CO_2 恒温箱培养 3.5 h。酶标仪(thermo variockan)测定 450 nm 波长处的光密度值[*D*(450)]。细胞存活率根据公式计算:细胞存活率 = [*D*(450)实验组 − *D*(450)空白组]/[*D*(450)阴性对照组 − *D*(450)空白组] × 100%。实验共重复 3 次。

1.2.4 THP-1 细胞表面 PSGL-1 的检测及 TAP-SSL5 对 KPL-1 结合作用的影响 融合蛋白 TAP-SSL5 及重组 SSL5 蛋白的表达与纯化采用曲小龙等[3]介绍的方法,TAP-SSL5 其化学纯度为 98%,相对分子质量为 31.913×10^3,重组 SSL5 蛋白其纯度 >90%,相对分子质量为 27×10^3。取 THP-1 细胞,加入 TAP-SSL5 融合蛋白(终浓度 10 mg/L)及 SSL5(终浓度 10 mg/L),冰上孵育 20 min 后,0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次,再加入 PE 标记的抗 CD162(CD162 即 PSGL-1)单克隆抗体,冰上孵育 30 min,同时设同型抗体阴性对照,0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次,200 μL 0.01 mol/L PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测 TAP-SSL5 对抗 CD162 单抗(KPL-1)在 THP-1 细胞表面结合的影响。实验共重复 3 次。

1.2.5 血小板与 THP-1 细胞或中性粒细胞的结合

1.2.5.1 细胞和血小板的准备 取适量的 THP-1 细胞或中性粒细胞,调整细胞浓度至 5×10^6/mL,干预组分别加入 10 mg/L TAP-SSL5 或 10 mg/L SSL5,冰上孵育 20 min,0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次,以改良 Tyrode's 缓冲液调整细胞浓度为 5×10^6/mL,作为经预处理的细胞用于后续实验。健康成人枸橼酸钠抗凝的富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)(取自西南医院输血科),450 × *g* 离心 15 min,弃上层血浆,沉淀的血小板以 CGS 缓冲液(120 mmol/L NaCl、12.9 mmol/L trisodium citrate、30 mmol/L D-glucose, pH 6.5)洗涤 1 次,以 SysmexKX-21N(日本)血细胞自动分析仪计数血小板,用改良 Tyrode's 缓冲液调整血小板浓度至 250×10^6/mL。

1.2.5.2 实验分组 未激活血小板-粒细胞结合组(Baseline组)、ADP激活血小板-粒细胞结合组(Control组)、ADP激活血小板-经TAP-SSL5预处理的粒细胞结合组(TAP-SSL5组)、ADP激活血小板-经SSL5预处理的粒细胞结合组(SSL5组)。

1.2.5.3 实验步骤 取部分上述血小板悬液(250×10^6/mL),加入终浓度为20 μmol/L ADP,以激活血小板,5 min后将其与THP-1细胞或中性粒细胞(5×10^6/mL)按等体积比例混合,室温下孵育5 min,每管加入10 μL抗CD62P-PE抗体以标记血小板,并以mIgG1-PE作为同型对照,室温下于暗处孵育15 min,1%多聚甲醛固定后,采用流式细胞仪(FCM)检测。FCM检测时,先确认THP-1细胞或中性粒细胞群,然后在FL2通道检测细胞表面的血小板结合情况,进一步分析出结合有血小板的细胞占所检测细胞总数的百分比。实验共重复5~6次。

1.2.5.4 瑞氏-姬姆萨染色 上述各组血小板与中性粒细胞混合后的样本置于载玻片上,37 ℃孵箱内干燥固定30 min;滴加瑞氏-姬姆萨染色液3~5滴以覆盖细胞1 min,以流水轻轻洗脱多余的染色液,室温下自然干燥,每个样本于显微镜下随机计数100个中性粒细胞表面血小板的结合量。实验共重复3次。

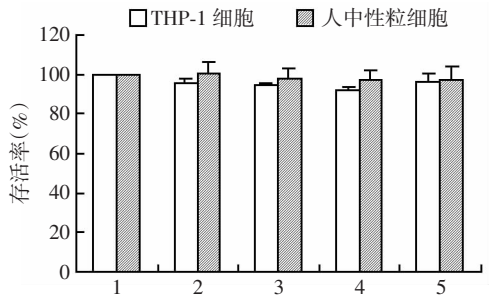
1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用GraphPad Prism 5.0软件,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 融合蛋白TAP-SSL5对THP-1细胞和人中性粒细胞活力的影响

TAP-SSL5融合蛋白作用于THP-1细胞或人中性粒细胞24 h后,采用CCK-8试剂盒检测细胞活力的结果表明,终浓度在30 mg/L或以下的TAP-SSL5或SSL5对粒细胞活力均无明显影响(图1)。



1:对照组;2:TAP-SSL5(3 mg/L);3:TAP-SSL5(10 mg/L);4:TAP-SSL5(30 mg/L);5:SSL5(10 mg/L)

图1 不同浓度TAP-SSL5融合蛋白和SSL5对粒细胞活力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

2.2 TAP-SSL5抑制KPL-1与THP-1细胞的结合

从流式细胞仪检测结果显示,THP-1细胞表面有丰富的PSGL-1(CD162)表达,KPL-1(抗CD162)的结合阳性率为90%;10 mg/L TAP-SSL5以及10 mg/L SSL5能显著抑制KPL-1与THP-1细胞的结合。

2.3 TAP-SSL5抑制ADP激活血小板与THP-1细胞的结合

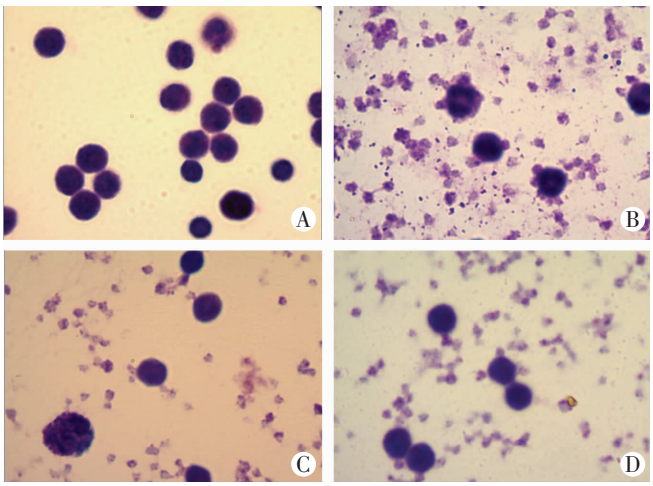
流式细胞仪检测结果显示,在Baseline组,未激活血小板与THP-1细胞的结合率较低,仅为(16.1±10.7)%;在Control组,20 μmol/L ADP激活血小板与THP-1细胞的结合率显著增加至(31.3±8.4)%,与Baseline组比较差异有统计学意义($P<0.05$);经10 mg/L TAP-SSL5或10 mg/L SSL5预处理THP-1细胞后,其与ADP激活血小板的结合百分率分别为(13.4±6.7)%和(13.9±6.7)%,与Control组比较均有非常显著的降低($P<0.01$);说明TAP-SSL5和SSL5均可显著抑制血小板与THP-1细胞的结合。

2.4 TAP-SSL5抑制ADP激活血小板与中性粒细胞的结合

流式细胞仪检测结果显示,在Baseline组,未激活血小板与中性粒细胞的结合率较低,仅为(17.7±14.4)%;在Control组,20 μmol/L ADP激活血小板与中性粒细胞的结合率显著增加至(35.6±5.9)%,与Baseline组比较差异有统计学意义($P<0.05$);经10 mg/L TAP-SSL5或10 mg/L SSL5预处理中性粒细胞后,其与ADP激活血小板的结合百分率分别为(10.4±6.4)%和(10.0±6.6)%,与Control组比较均有非常显著的降低($P<0.01$);说明TAP-SSL5和SSL5均可显著抑制血小板与中性粒细胞的结合。

2.5 血小板与中性粒细胞结合的瑞氏-姬姆萨染色检测结果

瑞氏-姬姆萨染色能够从形态学上较好的显示血小板与中性粒细胞的结合情况,中性粒细胞为圆形的多核细胞,核深染呈紫蓝色,聚集在细胞周围的血小板呈粉红色。每100个中性粒细胞所结合的血小板数量如下:Control组(20 μmol/L ADP激活血小板与中性粒细胞的结合)为(364.3±79.1)个;TAP-SSL5干预组为(189.3±53.9)个,与Control组比较差异有统计学意义($P<0.05$);SSL5干预组为(183.0±34.7)个,与Control组比较差异有统计学意义($P<0.05$);从而进一步直观的证实了TAP-SSL5和SSL5对血小板与中性粒细胞结合的抑制作用(图2)。



A:人外周血中性粒细胞;B:Control组;C:10 mg/L TAP-SSL5干预组;D:10 mg/L SSL5干预组

图2 瑞氏-姬姆萨染色检测激活的血小板与中性粒细胞结合及TAP-SSL5的干预作用 (×1 000)

3 讨论

血小板在体内血栓形成过程中具有重要作用,血小板激活可释放大量的炎症因子,并可通过与单核细胞结合而促进其在血管损伤部位的黏附和向内皮下迁移,进而演变为巨噬细胞,可最终导致泡沫细胞和动脉粥样硬化病变的形成[9]。体内能激活血小板的因素主要包括二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)、凝血酶、胶原和血栓素A2(thromboxane A2,TXA2)等;血小板激活后,其表面有丰富的P-选择素(P-selectin)表达,以及糖蛋白GPⅡb/Ⅲa的构象发生改变而活化[10]。因此,激活后的血小板可通过其表面的P-selectin与白细胞表面的PSGL-1结合,形成血小板-粒细胞聚集体,从而激活白细胞,产生更为广泛的致炎效应,包括上调白细胞表面CD11b/CD18(Mac-1)的表达,以及组织因子(tissue factor,TF)、CXCL8(interleukin-8,IL-8)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1,MCP-1)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)等炎症因子的释放增加[11-12]。因此,特异性针对血小板-白细胞相互作用环节的干预方向,将有望为动脉粥样硬化病变的防治提供新的措施[13]。

Bestebroer等[1-2]的研究发现,SSL5可与白细胞表面的PSGL-1和G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors,GPCRs)结合,从而抑制细胞因子(CXCL8等)和过敏毒素(C3a、C5a等)对白细胞的激活作用;SSL5已被证实系通过与PSGL-1或GPCRs分子糖链中的sialyl Lewis X(sLeX)基团结合而发挥作用[2,14]。鉴于动脉粥样硬化基础之上的血栓形成是心脑血管急症(如急性冠状动脉综合征、缺血性中风等)发生的重要原因,因此,抑制血管壁的炎症反应和血栓形成是同等重要的两个方面。我们在前期研究中,将直接的FXa抑制剂TAP与SSL5联合,构建了具有抗炎和抗凝双效功能的融合蛋白TAP-SSL5,并发现TAP-SSL5可抑制粒细胞在P-selectin表面的黏附;因此,本实验进一步研究了TAP-SSL5对血小板-白细胞相互作用的影响。

细胞毒性实验结果显示,TAP-SSL5或SSL5蛋白的终浓度在30 mg/L或以下时,对THP-1细胞和中性粒细胞的存活率无明显影响,因此,30 mg/L及以下的TAP-SSL5或SSL5蛋白终浓度适合于体外细胞实验研究,这和我们前期研究中所采用的蛋白浓度相一致[3]。曲小龙等[3]的研究表明,TAP-SSL5可直接与PSGL-1结合,并可竞争性抑制PSGL-1单抗(KPL-1)与HL-60或中性粒细胞的结合。本研究结果显示,PSGL-1在THP-1细胞表面存在较丰富的表达,TAP-SSL5同样抑制了KPL-1与THP-1细胞的结合,而激活的血小板表面有大量的P-selectin存在。由此,本研究以人单核细胞株THP-1细胞和人外周血中性粒细胞为对象,通过流式细胞仪和瑞氏-姬姆萨染色分别检测了ADP激活的人血小板与上述两种细胞的结合情况,血小板与细胞的数量比为50∶1,与生理情况下全血中血小板与粒细胞的比例基本一致,因此能更好的模拟在体环境。结果显示,ADP激活的血小板与粒细胞有较高的结合率,TAP-SSL5和SSL5均可显著抑制这一结合作用;这主要是因为TAP-SSL5和SSL5与粒细胞表面的PSGL-1结合后,抑制了激活后的血小板通过"P-selectin-PSGL-1"作用途径与粒细胞的结合。另外,研究[4,15]还发现,SSL5和TAP-SSL5还可与血小板糖蛋白GPⅠbα结合,因此TAP-SSL5还可能通过抑制血小板GPⅠbα与vWF的相互作用,而延长小鼠尾部出血时间,以及抑制氯化铁($FeCl_3$)诱导的大鼠下腔静脉血栓形成。血小板GPⅠbα可与粒细胞表面的Mac-1结合,因此TAP-SSL5还可能通过与GPⅠbα的结合,而抑制"血小板-粒细胞聚集体"的形成[9,16]。

目前临床广泛应用的抗血小板药物ADP受体(P2Y12)拮抗剂,就具有抑制"血小板-粒细胞聚集体"形成的作用。氯吡格雷在降低血小板表面P-selectin表达的同时,可显著减少动脉粥样硬化疾病患者血液中"血小板-粒细胞聚集体"的形成[17]。有研究显示,在小鼠内毒素休克模型中,新一代的ADP受体(P2Y12)拮抗剂普拉格雷可抑制血小板与粒细胞的相互作用,并减低炎性标志物的产生[18]。因此,抑制体内"血小板-粒细胞聚集体"的形成,将可有效减轻炎症反应,对于动脉粥样硬化或血管损伤性病变部位的炎症反应都将产生一定的抑制效应。本研究初步证实了,融合蛋白TAP-SSL5作为抗炎抗凝双效分子,在抑制"血小板-粒细胞聚集体"形成方面的作用;但其后续对粒细胞功能(如炎症因子的表达和释放)的影响尚有待进一步研究。

参考文献:

[1] Bestebroer J, Poppelier M J, Ulfman L H, *et al*. Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling[J]. Blood, 2007, 109(7): 2936-2943.

[2] Bestebroer J, van-Kessel K P, Azouagh H, *et al*. Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins[J]. Blood, 2009, 113(2): 328-337.

[3] 曲小龙, 胡厚源, 李敏, 等. 抗炎、抗凝双效融合蛋白TAP-SSL5表达载体的构建及其功能研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 5-8.

[4] 程彦, 房兆飞, 曲小龙, 等. 融合蛋白TAP-SSL5对人血小板功能

的影响[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(6): 477-480.
[5] Elalamy I, Chakroun T, Gerotziafas G T, *et al*. Circulating platelet-leukocyte aggregates: a marker of microvascular injury in diabetic patients[J]. Thromb Res, 2008, 121(6): 843-848.
[6] Nomura S, Kanazawa S, Fukuhara S. Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus[J]. J Hum Hypertens, 2002, 16(8): 539-547.
[7] Lippi G, Montagnana M, Salvagno G L, *et al*. Risk stratification of patients with acute myocardial infarction by quantification of circulating monocyte-platelet aggregates. [J]. Int J Cardiol , 2007, 115(1): 101-102.
[8] Gkaliagkousi E, Passacquale G, Douma S, *et al*. Platelet activation in essential hypertension: implications for antiplatelet treatment[J]. Am J Hypertens, 2010, 23(3): 229-236.
[9] van-Gils J M, Zwaginga J J, Hordijk P L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(2): 195-204.
[10] Myers R I. The variability of platelet response to aspirin and clopidogrel: revisiting the Caprie, Cure, Credo, and Match trials[J]. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2005, 18(4): 331-336.
[11] Di-Santo A, Amore C, Dell'Elba G, *et al*. Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates tissue factor expression in monocytes interacting with activated platelets[J]. J Thromb Haemost, 2011, 9(5): 1029-1039.
[12] Bournazos S, Rennie J, Hart S P, *et al*. Monocyte functional responsiveness after PSGL-1-mediated platelet adhesion is dependent on platelet activation status[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(8): 1491-1498.
[13] Seizer P, May A E. Therapeutic potential and strategies against leukocyte-platelet interaction in atherosclerosis[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(5): 550-554.
[14] Baker H M, Basu I, Chung M C, *et al*. Crystal structures of the staphylococcal toxin SSL5 in complex with sialyl Lewis X reveal a conserved binding site that shares common features with viral and bacterial sialic acid binding proteins[J]. J Mol Biol, 2007, 374(5): 1298-1308.
[15] Hu H, Armstrong P C, Khalil E, *et al*. GPVI and GPIbalpha mediate staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) induced platelet activation and direct toward glycans as potential inhibitors[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19190.
[16] Andrews R K, Berndt M C. Microparticles facilitate neutrophil/platelet crosstalk [J]. Blood, 2008, 112(6): 2174-2175.
[17] Cao Y J, Wang Y M, Zhang J, *et al*. The effects of antiplatelet agents on platelet-leukocyte aggregations in patients with acute cerebral infarction[J]. J Thromb Thrombolysis, 2009, 27(2): 233-238.
[18] Totani L, Dell'Elba G, Martelli N, *et al*. Prasugrel inhibits platelet-leukocyte interaction and reduces inflammatory markers in a model of endotoxic shock in the mouse[J]. Thromb Haemost, 2012, 107(6): 1130-1140.

(**收稿**:2012-12-21;**修回**:2013-01-29)
(编辑 栗 嘉)

(上接753页)

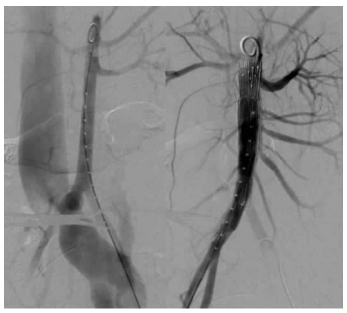


图3 腹主动脉DSA造影表现 大量造影剂进入下腔静脉和左侧髂总静脉(左),带膜支架植入腹主动脉及右侧髂总动脉后造影剂未再进入下腔静脉(右)

2 讨论

动静脉瘘是动静脉血管之间形成的异常交通,高压动脉血直接进入静脉血管导致一系列的临床病理变化[1]。创伤性动脉瘤合并动静脉瘘是动脉或静脉损伤后的后期表现,属少见的外伤性血管异常病[2]。常见原因有贯通伤、挤压伤、介入术后等。目前诊断动静脉瘘的方法有血管造影术(DSA)、多普勒超声成像、MRI、CTA等[3-4]。多普勒超声诊断动静脉瘘具有无创、简便易行,准确率较高的优点[4]。而DSA被认为是诊断本病的"金标准",但在造影中可能发生瘤体破裂或血栓脱落栓塞,风险较大,与DSA相比,CTA不仅可以了解病变的范围、形态、部位、瘘口的大小、瘤腔的显影情况、有无附壁血栓、是否合并其他血管病变等,还可清晰显示病变与周围组织和血管的关系,对于手术方案的制定以及手术风险的评估都非常重要[2]。

本例患者为刀刺伤右髂总动脉,形成动脉瘤。动脉瘤突入下腔静脉并破裂,形成动静脉瘘。动脉血直接流入下腔静脉,使之压力增大、扩张,右心逐渐衰竭,伴随胸腔和腹腔积液的产生。如遇类似患者,临床医师应该对患者的病史,如外伤史、手术史等进行较为详细的描述。患者接受检查前,放射科技术员应仔细阅读申请单,采取针对性的检查方式,在常规横断位、冠状位重建的基础上,对可疑病灶增加MIP、MPR、VR重建,这样才能及时发现问题和明确诊断,为临床提供帮助。

参考文献:

[1] 张培华, 蒋米尔. 临床血管外科学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2006: 483-499.
[2] Robbs J V, Carrim A A, Kadwa A M, *et al*. Traumatic arteriovenous fistula: experience with 202 patients[J]. Br J Surg, 1994, 81(9): 1296-1299.
[3] Chen J K, Johnson P T, Fishman E K. Diagnosis of Clinically Unsuspected Posttraumatic Arteriovenous Fistulas of the Pelvis Using CT Angiography[J]. AJR Am J Roentgenol, 2007, 188(3): W269-W273.
[4] Li Y Y, Duan Y Y, Yan G Z, *et al*. Application of ultrasonography in the diagnosis and treatment tracing of hepatocellular carcinoma- associated arteriovenous fistulas[J]. Liver Int, 2007, 27(6): 869-875.

(**收稿**:2013-02-04;**修回**:2013-03-05)
(编辑 汪勤俭)