临床研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0110-03

骨髓细胞动员增强趋化因子活性对静脉血栓溶解吸收的影响

孙 浩

(重庆市肿瘤研究所普通外科,重庆 400030)

【摘 要】目的:探讨骨髓细胞动员对巨噬细胞聚集静脉血栓趋化作用的影响。方法:SD 成年大鼠随机分为正常组、假手术组、血栓组和 rhG-CSF 组。术前 0.5 h、术后 7 d 和 14 d 采集外周血,用 ELISA 法检测外周血 MCP-3 水平。术后 7 d、14 d 取血栓组和 rhG-CSF 组下腔静脉标本,用 RT-PCR 法检测血栓中 MCP-3mRNA 的表达情况。结果:术后 14 d rhG-CSF 组外周血 MCP-3 水平明显高于术前,且高于假手术组和血栓组术后 14 d 外周血 MCP-3 水平,分别与术前、假手术组和血栓组比较 $P<0.05$,差异有统计学意义。术后 7 d 和 14 d,rhG-CSF 组 MCP-3 mRNA 表达较血栓组显著升高,两组间比较有显著差异 $P<0.01$。结论:骨髓细胞动员增强了 MCP-3 对巨噬细胞的趋化作用。

【关键词】骨髓细胞动员;单核细胞趋化因子 -3;巨噬细胞

【中国图书分类法分类号】R331.2+2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-11

Effect of chemokines, activity enhanced by mobilization of bone marrow cells on solution and absorption of venous thrombosis

SUN Hao

(*Department of General Surgery, Chongqing Cancer Institute*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the effect of bone marrow mobilization on chemotaxis of aggregation of macrophages in venous thrombosis. *Methods*: SD adult rats were divided randomly into normal group, sham operation group, thrombus group and rhG-CSF group. Peripheral blood was harvested at 30min before operation and on the 7th and 14th day after operation. Level of MCP-3 in peripheral blood was detected by ELISA. Inferior vena cava specimens of thromus group and rhG-CSF group were collected at postoperative 7th and 14th day. With the application of RT-PCR, expression of MCP-3mRNA in thrombus was detected. *Results*: The level of MCP-3 in peripheral blood of rhG-CSF group was significantly higher than that before operation and also higher than the levels of MCP-3 in peripheral blood of sham operation group and thrombus group on the 14th day after operation ($P<0.05$), and the difference was significant. On the 7th and 14th day after operation, compared with thrombus group, the expression of MCP-3 mRNA in rhG-CSF group remarkablely increased, and the difference was significant beween these two groups ($P<0.01$). *Conclusion*: Brone marrow cell mobilization enhances the chemotaxis of MCP-3 on macrophages.

【Key words】Bone marrow cell mobilization; MCP-3; Macrophage

近年来,在腹部、骨科手术、产后和创伤后,深静脉血栓形成(Deep vein thrombosis, DVT)的发病率日益增高,DVT 发病后未经治疗 90%病人将演变成血栓形成后综合症[1],临床上对深静脉血栓形成的处理以及防治备受重视。深静脉血栓形成后经历闭塞、部分再通、完全再通的演变过程,其间巨噬细胞在血栓溶解和再通的过程中发挥着重要作用,有研究发现[2]血栓中的新生血管主要出现在巨噬细胞集中的区域,单核细胞趋化因子 -3(Monocyte chemoattractant protein-3, MCP-3)对单核 - 巨噬细胞的动员和靶器官的归巢[3]极为重要。而作为 MCP-3 受体 -CCR2 基因敲除能抑制单核 - 巨噬细胞在血栓中的聚集和血栓的溶解。因此,本实验拟通过骨髓细胞动员,探讨 MCP-3 对巨噬细胞聚集静脉血栓的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用清洁级雄性 SD 成年大鼠 48 只,8 周龄,体重(250 ± 10)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 大鼠 MCP-3 ELISA 试剂盒(ADL 公司,美国);Catrimox-14TM RNA Isolation Kit Ver.2.11 总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa,大连宝生物);DNA Marker DL2000(TaKaRa 公司,大连宝生物);TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0 RT-PCR

作者介绍:孙 浩(1968-),男,副主任医师,硕士,研究方向:血管外科。

基金项目:四川省江油市卫生局科研项目(编号:09025)。

试剂盒(TaKaRa 公司,大连宝生物);rhG-CSF(京北医联合药业有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 下腔静脉血栓模型的建立 参照 Modarai[4]方法加以改进。SD 大鼠在新环境下适应性喂养 1 周后,采用 10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔内麻醉,取仰卧位,四肢外展固定,腹部皮肤消毒,正中切口进腹。显露左肾静脉以下下腔静脉并结扎其属支,用神经血管钳阻断下腔静脉 1 min,松开 30 s,再阻断 1 min,顺下腔静脉放置注射针头 1 根,以 4-0 丝线于左肾静脉下方结扎下腔静脉和针头,取出针头,缝合腹壁。术后动物自由饮水,正常饲养,不用抗生素,大鼠均成活。

1.2.2 动物分组 大鼠随机分为正常组、假手术组、血栓组和 rhG-CSF 组。正常组和假手术组各 8 只,血栓组和rhG-CSF 组各 16 只。正常组未给予任何处理,假手术组大鼠下腔静脉未行缩窄及阻断,余处理同血栓组。rhG-CSF 组为模型鼠术后连续 7 d 在腹部皮下注射重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF 25 μg/kg),正常组、假手术组和血栓组同时在腹部皮下注射等量生理盐水。

1.2.3 标本获取 大鼠乙醚吸入麻醉后,术前 0.5 h、术后 7 d 和 14 d 各采血 1 ml,用于检测外周血 MCP-3 水平。术后 7 d、14 d 取血栓组和 rhG-CSF 组下腔静脉标本。方法:水合氯醛腹腔内麻醉,经原腹部切口打开腹腔,解剖左肾静脉以下下腔静脉至左右髂总静脉汇合处,切取左肾静脉以下下腔静脉及其内部的血栓放于液氮中保存,液氮中保存的血栓匀浆后用于总 RNA 提取。

1.2.4 ELISA 法检测外周血 MCP-3 水平 将术前 0.5 h、术后 7 d 和 14 d 抗凝血离心。按双抗体夹心法 ELISA 检测试剂盒说明书进行。主要步骤为:使用前 5~10 min 准备试剂,建立标准曲线。设标准孔 8 孔倍比稀释,加样,100 μl/孔,37℃,120 min,洗板 5 次,加一抗工作液,37℃,60 min。洗板 5 次,酶标抗体工作液,37℃,60 min。洗板 5 次,底物工作液,37℃暗处反应 10 min。加终止液,测吸光值,计算出相应大鼠 MCP-3 含量。

1.2.5 RT-PCR 方法检测血栓中 MCP-3mRNA 的表达 引物设计:根据 PubMed 基因库查询 Rattus norvegicusMCP-3 mRNA 原始序列,由大连宝生物工程有限公司设计合成目的基因大鼠 MCP-3 引物序列,内参照 β-actin 引物序列直接由大连宝生物工程有限公司设计合成。

大鼠 MCP-3 引物序列:

上游引物:5'-AGAGCTACAGAAGGATCACCAGTA-3';

下游引物:5'-CAAATCACACCAAAGTACATGG-3'。扩增产物大小为 362 bp。

大鼠内参照 β-actin 引物序列:

上游引物:5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3';

下游引物:5'-GCAGTAATCTCCTTCTGCATCC-3'。扩增产物大小为 600 bp。所有引物使用前离心,用消毒双蒸水充分溶解,调节浓度至 25 μmol/L,分装,-20℃保存备用。

取术后 7、14 d 液氮中保存的血栓组织匀浆后离心,取 100 μl 上清液,按 Catrimox-14TM RNA Isolation Kit Ver. 2.11 总 RNA 提取的说明步骤进行总 RNA 提取。再参照 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 试剂盒操作说明书进行逆转录-多聚酶链聚合物反应(RT-PCR)。取 PCR 扩增产物 10 ml,加入 10×核酸上样缓冲液 1 ml,DNA Marker 5 ml 分别在 2%的琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/ml)上点样。应用 1×TAE 缓冲液,80 V 电压电泳 30 min,凝胶成像仪下观察结果,与核酸分子标准物对照,鉴定有无目的基因条带,确认 PCR 反应产物。MCP-3 和 β-actin 的基因扩增片段分别为 362 bp 和 600 bp。利用凝胶成像分析系统进行成像和图形分析,测出各条带的 OD 值。结果以 MCP-3 条带的 OD 值/β-actin 条带的 OD 值表示。

1.2.6 统计学方法 采用 SPSS10.0 统计软件对数据资料进行分析。所有数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 t 检验、方差分析、Fishers 精确概率法进行统计分析。以 P 值≤0.05 为差异有统计学意义。

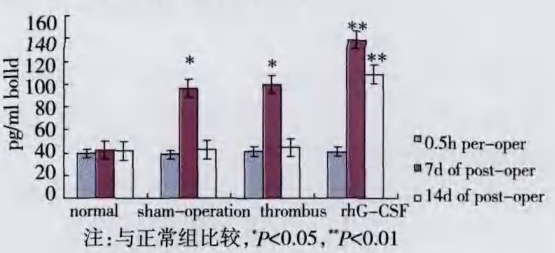
2 结 果

2.1 外周血 MCP-3 水平

正常组、假手术组、血栓组和 rhG-CSF 组术前 0.5h 外周血 MCP-3 水平(39.48±0.32,38.54±0.43,41.21±0.21,40.62±0.28)无显著差异(图 1)。术后 7 d 假手术组、血栓组和 rhG-CSF 组外周血 MCP-3 水平明显升高(96.53±8.21,99.81±7.96,138.44±10.01)各组内分别与术前比较,(t=1.82,P<0.05),(t=2.26,P<0.05),(t=4.82,P<0.01),差异均有统计学意义。术后 14 d 假手术组、血栓组外周血中 MCP-3 水平(42.68±0.56,44.82±0.68)较术后 7 d 显著下降,虽较术前稍有升高,与术前比较无统计学意义;术后 14 d rhG-CSF 组外周血 MCP-3 水平虽有下降(108.8±9.26),但仍明显高于术前水平,且高于假手术组和血栓组术后 14 d 外周血 MCP-3 水平,分别与术前、假手术组和血栓组比较(t=2.16,P<0.05),(t=1.24,P<0.05)(t=2.68,P<0.05),差异统计学意义。

2.2 血栓中 MCP-3mRNA 的表达

血栓组、rhG-CSF 组血栓中 MCP-3mRNA 表达的结果显示,在 362 bp 左右的位置处有 1 条明显的 DNA 条带,与 MCP-3 的编码基因大小一致;在 600 bp 左右有另一条明显的 DNA 带,与 β-actin 的编码基因大小一致,无非特异性电泳带(图 2、3)。术后 7 和 14 d,rhG-CSF 组 MCP-3 mRNA 表达较血栓组显著升高(t=4.64,P<0.01),(t=4.96,P<0.01);术后 14 d 血栓组 MCP-3 mRNA 表达与术后 7 d 比较,显著下降,而 rhG-CSF 组无显著性变化(图 4)。



注:与正常组比较,*P<0.05,**P<0.01

图 1 外周血 MCP-3 水平

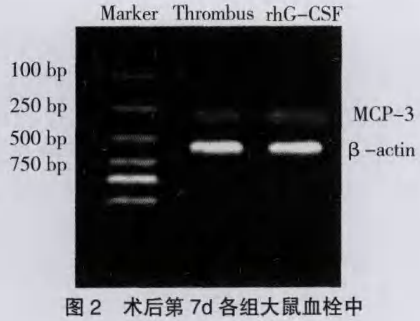


图 2　术后第 7d 各组大鼠血栓中 MCP-3 mRNA 的表达

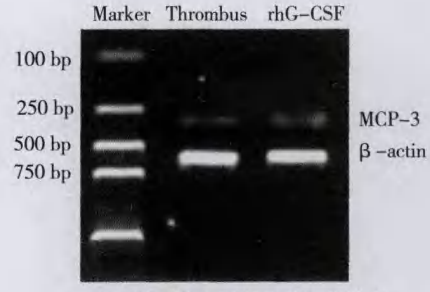
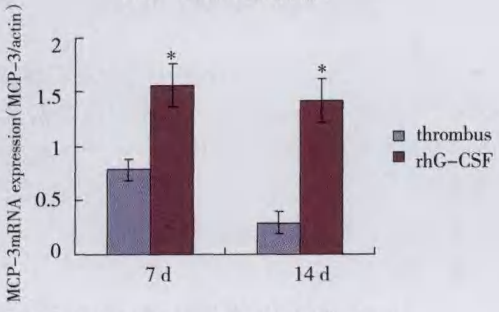


图 3　术后第 14d 各组大鼠血栓中 MCP-3mRNA 的表达



注：分别与术后 7 d 和 14 d 血栓组间比较，$P<0.01$

图 4　大鼠血栓中 MCP-3 mRNA 的表达

3　讨　论

机体对静脉血栓的最终吸收和溶解主要依赖于机体本身的慢性自然溶解机制，即是血栓的机化过程。血栓的机化过程有别于创伤的机化，表现为：中性粒细胞、单核－巨噬细胞细胞和内皮细胞进入血栓中，血栓中的新生血管主要出现在巨噬细胞集中的区域。血栓中的巨噬细胞主要来源于骨髓。聚集在血栓中的巨噬细胞可以通过调节基质上的细胞增殖、迁移以及重塑，并分泌巨噬细胞源性生长因子，促使内皮细胞分泌组织因子、胶原酶等，进而改变内皮细胞的细胞外基质，增加基质蛋白水解酶、基质分子和基质受体的表达，刺激内皮细胞及血管内皮平滑肌细胞增殖，促进血管生成。目前研究认为单核－巨噬细胞系统在血栓的自然溶解中发挥着重要作用[2,5]。

血栓内的血管新生过程相当复杂，需要多种因子协调有序的相互作用，选择自然产生多种生长因子和趋化因子相互协调促进血管再生的方法可能更为理想，骨髓作为多种血管生长因子和趋化因子的自然来源，将可能成为在缺血条件下促进血管新生的有效材料。国内有研究报道，应用骨髓动员剂可以将包括单核祖细胞在内的骨髓干祖细胞动员进入外周血循环，动员组术后 2 周血栓内新生、再通血管增多，相互吻合沟通，形成较大的再通血管，血栓颜色变浅，机化范围更加广泛[6]；我们的前期实验证实应用骨髓动员剂以后，rhG-CSF 组术后 2 周大鼠深静脉血栓中巨噬细胞密度增加、功能增强，从而加快了血栓内的血管新生和血栓的再管化，促进了血栓的溶解和吸收过程[7]。

存在于外周血循环中的单核－巨噬细胞，其招募、分化、存活和增殖与多种趋化因子有关，趋化因子是一类对白细胞具有化学趋化作用等多种生物学效应的小分子蛋白，趋化因子介导白细胞的迁移是通过与靶细胞上相应受体有规律相互作用而完成的。如：MCP-3、MCP-1、MCP-2、MCP-5、CSF-1 等，它们主要起着激活、趋化单核细胞和巨噬细胞的作用。其中 MCP-3 对于单核－巨噬细胞的动员极为重要，是对单核－巨噬细胞引起趋化的一种 CC 型趋化因子，具有更为广泛的生物效应。

CC 型趋化因子出现在溶解的血栓中，给予外源性的 CC 趋化因子可增加实验动物血栓的溶解。单核－巨噬细胞从周围血中进入血栓同样受趋化因子的调控。Tsou 研究发现 MCP-2 和 MCP-5 在趋化单核－巨噬细胞从血液归巢入炎性组织中的作用并不重要，而 MCP-3 和 MCP-1 却发挥关键性作用[3]，MCP-3/MCP-1 在单核细胞的骨髓动员和靶器官的归巢中发挥着重要的作用，MCP-3 对各种白细胞的激活都有作用，是趋化单核－巨噬细胞游走和聚集的重要细胞因子。

实验发现，术前正常组、假手术组、血栓组和 rhG-CSF 组外周血中 MCP-3 水平无显著差异；术后 7 d 假手术组、血栓组外周血中 MCP-3 水平较术前明显升高，与术前比较，有显著差异性；术后 14 d 两组外周血 MCP-3 水平均有下降，虽较术前略有升高，但无统计学差异。说明手术创伤和急性炎症反应后，许多炎性因子是趋化因子的诱导物，促使外周血中趋化因子的水平有所升高，但随着炎性反应的消退这种作用减弱，外周血中趋化因子 MCP-3 的水平会逐渐恢复并趋向正常。而应用骨髓动员剂术后 7 d rhG-CSF 组外周血中 MCP-3 水平较术前增加更为明显，与术前比较，差异极其显著；术后 14 d 虽略有下降，但仍保持一定水平，与术前、术后 14 d 假手术组和血栓组相比较，差异具有显著性，提示 rhG-CSF 可增加外周血中 MCP-3 水平，这与骨髓细胞动员后，造血干/祖细胞（HSPC）仍保持具有分泌生长因子和趋化因子的特性，通过一种类似旁分泌的方式，分泌一些生长因子和趋化因子，如 VEGF 和趋化因子 MCP-1、MCP-3 等[8]，从而增加了外周血 MCP-3 水平，进而增强 MCP-3 对巨噬细胞的趋化活性，导致血栓中巨噬细胞聚集增多，这与术后 2 周血栓的形态学变化相一致。

MCP-3 为具有重要生理病理作用的化学趋化因子，也是一个高亲和力的配体，当它与其相应受体结合后具有促血管生成、炎性细胞浸润（如单核细胞、巨噬细胞等）等作用。实验中发现 rhG-CSF 动员骨髓后，血栓中 MCP-3 mRNA 表达显著增强，无论术后第 7 d 还是 14 d，rhG-CSF 组与血栓组相比，差异具有显著性，说明 rhG-CSF 还能通过上调表达

临床研究 文章编号:0253-3626(2010)01-0113-03

2 型糖尿病患者血清糖化白蛋白水平与糖尿病肾病的相关性分析

张 晋

(四川省乐山市人民医院内分泌科,乐山 614000)

【摘 要】目的:探讨 2 型糖尿病患者血清糖化白蛋白与糖尿病肾病的相关性。方法:2006 年 1 月至 2009 年 6 月入我院治疗的 2 型糖尿病患者 78 例采用液态酶法检测血清糖化白蛋白,并与同期 50 例健康对照组比较。结果:健康对照组和 2 型糖尿病患者的糖尿病肾病组之间血清糖化白蛋白均有差异(F=8.953,P=0.0001)。糖尿病各组血清糖化白蛋白高于健康对照组;糖尿病肾病各组高于非糖尿病肾病组;终末期糖尿病肾病组糖化白蛋白高于其余各组。并且糖尿病肾病的严重程度和糖化白蛋白水平相关,r_s 为 0.754(t=6.547,P=0.008)。有序 Logistic 回归分析显示,糖化白蛋白是影响糖尿病肾病发病及病情严重程度的独立危险因素,多因素调整后的 OR 值为 2.326,95%CI 为 2.114~2.538。结论:糖化白蛋白在糖尿病肾病发病中起重要作用,并且和糖尿病肾病的分期密切相关。

【关键词】2 型糖尿病;血清糖化白蛋白;糖尿病肾病;危险因素;发病机制

【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-07-29

Relationship between glycated albumin levels and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus

ZHANG Jin

(*Department of Endocrinology, the People's Hospital of Leshan*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship between glycated albumin levels and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Methods*: From January 2006 to June 2009, 78 patients with type 2 diabetes mellitus in our hospital were enrolled in the study. We used liquid enzymatic to detect glycated albumin, and compare with 50 cases of healthy in the same period as the control

作者介绍:张 晋(1966-),女,副主任医师,
研究方向:内分泌内科。

MCP-3 发挥作用的靶位,增加血栓中 MCP-3mRNA 的表达,进一步增强 MCP-3 对单核 - 巨噬细胞的趋化活性,使单核 - 巨噬细胞迁移进入血栓这一特定的靶环境。Kinnaird[9]等也曾报道肌肉注射含有骨髓细胞衍生的生长因子和细胞因子的骨髓细胞培养液能显著改善缺血肢体的侧支循环及肢体功能。因此 rhG-CSF 动员骨髓细胞后血栓中巨噬细胞聚集增多可能与 rhG-CSF 增加了 MCP-3 在外周血中的水平和增强了血栓中 MCP-3 mRNA 的表达有关,从而进一步增强了 MCP-3 对单核 - 巨噬细胞的趋化活性,再发挥巨噬细胞的作用,促进血栓的溶解、吸收过程。

参 考 文 献

[1] 赖俊谕,代远斌,范 颖.下肢深静脉血栓形成的临床治疗[J].重庆医科大学学报,2007,32(10):1087-1090.

[2] Ali T, Humphries J, Burnand K, et al. Monocyte recruitment in venous thrombus resolution[J]. J Vasc Surg, 2006, 43(5): 601-608.

[3] Tsou C L, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites[J]. J Clin Invest, 2007, 117(4): 902-909.

[4] Modarai B, Burnand K G, Sawyer B, et al. Endothelial progenitor cells are recruited into resolving venous thrombi[J]. Circulaton, 2005, 111(20): 2645-2653.

[5] McGuinness C L, Humphries J, Waltham M, et al. Recruitment of labelled monocytes by experimental venous thrombi[J]. Thromb Haemost, 2001, 85(6): 1018 - 1024.

[6] 陈以宽,龚建平,罗文军,等.骨髓干细胞动员在深静脉血栓中的作用[J].重庆医科大学学报,2007,32(6):626-628.

[7] 孙 浩,陈以宽.巨噬细胞在骨髓干细胞动员促深静脉血栓溶中的作用[J].中国现代普通外科进展,2009,12(3):194-196.

[8] Rehman J, Li J, Orschell C M, et al. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from monocyte/mscrophages and secrete angiogenic growth factors[J]. Circulation, 2003, 107(8): 1164-1169.

[9] Kinnaird T, Stabile E, Burneti M S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenesis cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanism[J]. Circ Res, 2004, 94(5): 678-685.

(责任编辑:冉明会)