DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.038
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
838 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0838-03

NAC对体外循环血清诱导的多形核粒细胞与血管内皮细胞粘附的影响

曾祥君,肖颖彬,王学锋,陈 林,钟前进 (第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)对体外循环(CPB)血清诱导的培养血管内皮细胞细胞间粘附分子1(ICAM-1)的表达及对多形核粒细胞(PMN)粘附的影响,探讨NAC对体外循环后全身炎症反应的作用及机制。方法 以CPB血清加NAC处理培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),采用中性粒细胞-血管内皮细胞粘附模型研究HUVEC对PMN的粘附作用,以免疫组化方法观察培养血管内皮细胞表面ICAM-1的表达。结果 NAC加入CPB血清共同处理HUVEC,能抑制CPB血清诱导的HUVEC对PMN的粘附增加,下调CPB血清诱导的HUVEC表面ICAM-1表达的增高。结论 NAC通过抑制内皮细胞表面ICAM-1的表达,可抑制体外循环诱导的PMN与血管内皮细胞的粘附,从而可能在体外循环后全身炎症反应的防治中发挥作用。

关键词:细胞粘附;内皮细胞;体外循环;N-乙酰-L-半胱氨酸
中图法分类号:R329.25;R654.1;R977.4 文献标识码:A

Effects of N-acetyl-L-cysteine on adherence of polymorphonuclear cells to cultured endothelial cells induced by cardiopulmonary bypass serum

ZENG Xiang-jun, XIAO Ying-bin, WANG Xue-feng, CHEN Lin, ZHONG Qian-jin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and the adhesion of polymorphonuclear (PMN) cells to the cultured endothelial cells induced by cardiopulmonary bypass (CPB) serum. Methods The PMN-endothelium adhesion model was employed to study the adhesion of PMN to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultivated with CPB serum containing NAC. The expression of ICAM-1 in endothelial cells was detected with immunohistochemical methods. Results NAC inhibited CPB serum-induced HUVEC adhesion to PMN and down-regulated the ICAM-1 expression which had been increased by CPB serum on HUVEC surface. Conclusion These data indicate that NAC could inhibit PMN-endothelium adhesion by down-regulating ICAM-1 expression on endothelial cells induced by CPB serum.

Key words: cell adhesion; endothelial cells; cardiopulmonary bypass; N-acetyl-L-cysteine

体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB)诱致的全身炎症反应综合征是心内直视术后并发症和导致病人术后死亡的原因之一,多形核粒细胞与血管内皮细胞的粘附是引起全身炎症反应综合征的关键环节。内皮细胞细胞间粘附分子1(Intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)在形成粘附的过程中起重要作用[1]。N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)作为谷胱甘肽(GSH)合成前体,有抗氧自由基、稳定细胞膜的作用,对体外循环后血管内皮细胞对中性粒细胞的粘附能力、血管内皮细胞ICAM-1表达的影响尚未见报道。本实验以CPB血清致伤培养血管内皮细胞及NAC处理,观察NAC对CPB血清作用后血管内皮细胞对多形核粒细胞的粘附能力、血管内皮细胞ICAM-1表达的影响,探讨NAC对体外循环后全身炎症反应的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

NAC(Sigma公司),Percoll分离液(Sigma公司),ICAM-1抗人单克隆抗体(中山生物公司),兔SAP免疫组化试剂盒(中山生物公司),真彩色医学图像分析仪。

1.2 血清来源

10例先天性心脏病患儿,于体外循环前及体外循环结束时无菌分离血浆,离心,去纤维蛋白,-20 ℃冷冻贮存备用。

1.3 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养及鉴定

采用安静等[2]的血管内皮细胞培养法。实验用融合后1~2 d的脐静脉内皮细胞。内皮细胞的鉴定采用辣根过氧化物酶(PAP)法,检测Ⅷ因子抗原。

1.4 制备人外周血多形核粒细胞(PMN)

参考文献[3],制成(1~2)×10^6/ml细胞悬液,台盼蓝染色查细胞活力>92%,HE染色中性粒细胞纯度>97%。

1.5 实验分组

①胎牛血清组(Control);②CPB前血清组(Pre-CPB);③CPB血清组(CPB);④10 mmol/L NAC的CPB血清组;⑤1 mmol/L NAC的CPB血清组;⑥0.1 mmol/L NAC的CPB血清组。

1.6 PMN与HUVEC粘附实验

胰酶消化培养的内皮细胞,加入20%胎牛血清RPMI1640混匀,细胞密度为(1~2)×10^6/ml,培养于96孔板中。按20%的比例将人血清与无血清的1640基础培养液混合成人血清培养基。待内皮细胞呈现单细胞层,以无血清的细胞培养液清洗2次,每孔分别加入上述各组培养基200 μl,孵育4 h。清洗2

作者简介:曾祥君(1970-),男,四川省新都县人,硕士,医师,主要从事心血管外科方面的研究。电话:(023)65210281
收稿日期:2001-02-15;修回日期:2001-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

次, 10%卵白蛋白封闭板孔。每孔加入白细胞悬液 100 μl, 在 4 ℃粘附 12 h, 无血清的细胞培养液小心洗 3 次。0.5%龙胆紫染色 1 min。计数每个高倍镜视野内皮细胞数及粘附于内皮细胞上的多形核粒细胞数, 从而得出内皮细胞粘附率[4]。

1.7　HUVEC 表面 ICAM-1 表达的检测

胰酶消化的内皮细胞, 加入 20%胎牛血清 RPMI1640, 细胞密度为(1～2)× 10^6/ml。37 ℃, 5% CO_2 培养于六孔培养板中, 内放盖玻片。按 20%的比例将体外循环血清与无血清的 RPMI 1640 基础培养液混合成人血清培养基。待内皮细胞呈现单细胞层, 以无血清的细胞培养液清洗 2 次, 每孔分别加入各组血清 2.0 ml。37 ℃, 5% CO_2 孵育 4 h。免疫组化染色方法参照试剂盒说明进行。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.8　图像分析

每张免疫组化玻片在显微镜下随机取 3 个视野, 用真彩色医学图像分析系统分别求出其每个细胞单位面积的平均光密度, 取其平均值为该标本免疫组化染色的深度, 即表示平均每个内皮细胞 ICAM-1 的表达量。

1.9　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用第三军医大学数理统计程序包分析。

2　结果

2.1　NAC 对体外循环血清诱导的多形核粒细胞-培养血管内皮细胞粘附的影响

体外循环血清明显诱导培养血管内皮细胞对多形核粒细胞的粘附增强, N-乙酰-L-半胱氨酸可抑制体外循环血清的增强作用, 剂量越高, 抑制越明显, 见表 1。

2.2　NAC 对体外循环血清诱导的培养血管内皮细胞表面 ICAM-1 表达的影响

体外循环血清能诱导培养血管内皮细胞表面 ICAM-1 表达增加, N-乙酰-L-半胱氨酸可抑制体外循环血清的增强作用, 剂量越高, 抑制越明显, 见表 1。

表 1　NAC 对 CPB 血清诱导的 PMN-HUVEC 粘附及 HUVEC 表面 ICAM-1 表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 1　Effect of NAC on PMN adherence to HUVECs and ICAM-1 expression of HUVECs induced by CPB serum($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

	Control	Pre-CPB	CPB	NAC(mmol/L)		
				0.1	1	10
Adhesion rate (%)	8.4±2.3	8.9±1.9	32.4±4.25[a]	29.3±2.6[a]	21.6±3.7[ab]	13±1.8[ab]
ICAM-1(D_λ)	0.429±0.02	0.43±0.01	0.62±0.03[a]	0.56±0.02[ab]	0.48±0.01[ab]	0.44±0.02[b]

a: $P<0.01$ *vs* Pre-CPB; b: $P<0.01$ *vs* CPB

2.3　培养血管内皮细胞表面 ICAM-1 表达与 PMN-EC 粘附的关系

取小牛血清组, CPB 前血清组, 10、1、0.1 mmol/L NAC 组, CPB 血清组行相关性检验: $r=0.92$, 线性相关显著($P<0.01$), 说明培养内皮细胞 ICAM-1 表达增加是 PMN-EC 粘附增加的主要因素。

3　讨论

炎症过程的重要环节是白细胞粘附于血管内皮细胞, 继而穿越内皮细胞向炎症部位移行聚集。细胞间粘附的分子基础是细胞表面众多粘附分子的相互作用。体外循环后, 体内产生大量 IL-1、TNF 等细胞因子, 上调细胞表面粘附分子的表达, 白细胞与血管内皮细胞粘附增加[5], 炎症反应加重。本研究以体外循环血清诱导培养血管内皮细胞与 PMN 的粘附, 模拟体外循环后体内炎症反应时内皮细胞状态。结果显示, N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)能抑制体外循环血清诱导的培养血管内皮细胞对 PMN 的粘附增强, 提示 NAC 可通过抑制内皮细胞对 PMN 的粘附缓解体外循环后全身炎症反应。

内皮细胞 ICAM-1 与白细胞 CD_{11}/CD_{18} 的相互作用在白细胞与内皮细胞稳定粘附中起主要作用。本研究以免疫组织化学方法检测了体外循环血清作用后培养血管内皮细胞 ICAM-1 的表达。结果表明 NAC 可下调由体外循环血清诱导的血管内皮细胞 ICAM-1 的高表达。内皮细胞 ICAM-1 表达与其对 PMN 的粘附线性相关显著, 有研究报道, CD_{18} 单抗和 ICAM-1 单抗几乎可以完全阻断激活的中性粒细胞与内皮细胞的粘附[6], 说明抑制内皮细胞 ICAM-1 的表达是 NAC 抑制 PMN 与内皮细胞粘附的分子机制之一。

NAC 是含巯基化合物, 分子量为 163.2, 易于进入细胞内作为谷胱甘肽(GSH)合成前体, 增加细胞内 GSH 的含量, 起抗氧化剂的作用。本实验证明 NAC 还可通过抑制血管内皮细胞表面 ICAM-1 的表达抑制 PMN 与内皮细胞粘附, 从而可能缓和体外循环后全身炎症反应。NAC 这种抗炎机制尚不清楚, 近年来, 核转录因子 NF-κB(Nuclear factor kappa B)因广泛参与多种细胞因子和炎症介质的基因转录, 在炎症反应中的作用日益受到重视。核转录因子 NF-κB 能被多种因素激活, 活化的 NF-κB 快速易位至细胞核, 与靶基因启动子和增强子中的 κB 序列结合, 增强 ICAM-1、TNFα 等基因转录和蛋白质合成, 参与炎症反应[7]。大量实验观察到, 几乎所有刺激因素引起的核转录因子 NF-κB 活化, 均可被 NAC 所抑制[8], 此可能是 NAC 抗炎作用的主要机制之一。

参考文献:

[1] Verrier E D, Morgan E N. Endothelial response to cardiopulmonary bypass surgery[J]. Ann Thorac Surg, 1998, 66(5 Suppl): S17－19.

[2] 安　静, 黎　鳌. 胎儿脐静脉内皮细胞的培养[J]. 第三军医大学学报, 1990, 12(3): 105－108.

[3] 杨景山. 中性粒细胞的分离[A]. 见: 杨景山 主编. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

版社, 1990. 17－18.
[4] Beekhuizen H, Cors van Tilburg A J, van Furth R. Characterization of monocyte adherence to human macrovascular and microvascular endothelial cells[J]. J Immunol, 1990, 145(2): 510－518.
[5] Hill G E. Cardiopulmonary bypass-induced inflammation: is it important [J]? J Cardiothorac Vasc Anesth, 1998, 12(2 Suppl 1): 21－25.
[6] Boehme M V V, Raeth U, Scherbaum W A, *et al*. Interaction of endothelial cells and neutrophils *in vitro*: kinetics of thrombomodulin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1): implications for the relevance as serological disease activity markers in vasculitides[J]. Clin Exp Immunol, 2000, 119(1): 250－254.
[7] Merci P, Eigneur M, Bilhour-Nabera C, *et al*. Nuclear transcription factor kappa B (NF-kappa B)[J]. Rev Med Interne, 1998, 19(12): 945－947.
[8] Piette J, Piret B, Bonizzi G, *et al*. Multiple redox regulation in NF-kappa B transcription factor activation[J]. Biol Chem, 1997, 378(11): 1 237－1 245.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)07-0840-02

机器单采血小板与手工法制备血小板临床应用的比较观察

Comparative observation on the clinical application of platelets collected by machine and by manual collection

刘 林, 陈方祥 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所输血科, 重庆 400042）

输注血小板可以预防和治疗因血小板减少而引起的出血, 降低放、化疗后血小板减少导致的出血病死率, 以往临床多使用传统的手工法制备血小板制剂, 随着血小板分离技术的进步, 高纯度、高浓度、高质量的机器单采血小板制剂应用于临床, 怎样合理应用, 进一步提高临床疗效成为关注的焦点[1]。本研究就手工法制备的血小板与机器单采血小板制剂的临床应用情况分析如下。

1 资料和方法

1.1 临床资料

1995年5月至1999年4月在我院门诊或住院期间输注血小板制剂的病人共计89例, 输注血小板制剂后出血征象有不同程度改善。查阅病历实验室数据记录比较齐全的有47例, 其中手工法制备血小板制剂输注组有26例(组1), 机器单采血小板制剂输注组有21例(组2)。

1.1.1 手工法制备血小板制剂输注组(组1)病人26例, 男17例, 女9例, 年龄17～51岁, 其中白血病14例, 再生障碍性贫血4例, 其他8例。

1.1.2 机器单采血小板制剂输注组(组2)病人21例, 男13例, 女8例, 年龄10～56岁, 其中白血病9例, 再障3例, 其他9例。

1.1.3 输注指征 有紫癜、鼻衄、消化道出血等征象, 血小板计数$<50\times10^9$/L。

1.2 材料和方法

1.2.1 血小板来源 血小板制剂均由重庆市血液中心提供。手工法制备血小板每袋2单位, 机器单采血小板每袋200 ml(一袋为一个治疗量)。

1.2.2 剂量 手工法制备血小板一次输8～10单位, 机器单采血小板一次输200 ml。

1.2.3 输血前受者做ABO血型鉴定, 同型输注, 采集后6 h内输完。

1.2.4 外周血血小板计数 均由检验科检测。

1.2.5 判定输注效果的指标 CCI=(输注后血小板计数－输注前血小板计数)×体表面积(m^2)/输入血小板总数。计算标准以输血小板后1 h CCI$<7.5\times10^9$/L或24 h CCI$<4.5\times10^9$/L为输注无效[2]。

1.2.6 统计学方法 采用t检验。

2 结果

2.1 输注后外周血血小板计数情况

输入血小板制剂后1 h, 外周血血小板计数组1较组2低, 二者差异显著; 输入血小板制剂24 h, 外周血血小板计数两组相差非常显著, 见表1。

表1 输注血小板制剂前后血小板计数比较($\times10^9$/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	输前	输后	
			1 h	24 h
组1	26	33.6±14.2	116.3±30.8	51.5±18.2
组2	21	32.3±11.9	139.8±47.1*	73.7±22.4**

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ 与组1比较

2.2 输注次数对输注血小板效果的影响

随着输注次数的增加, 输注有效率降低, 无效率升高。2次以内, 组Ⅰ有效率为81.29%(13/16), 组Ⅱ有效率为93.33%(14/15); 5次以下, 组Ⅰ有效率为55.56%(5/9), 组Ⅱ有效率为66.67%(4/6), 组Ⅰ总有效率为69.23%(18/26), 无效率30.77%(8/26); 组2总有效率为85.71%(18/21), 无效率为14.29%(3/21)。

3 讨论

3.1 输注机采血小板可降低血小板输注无效率

反复输注来源于随机供血者的血液常常引起血小板同种免疫反应的发生, 使血小板表面非特异性抗原致敏产生同种抗体而破坏血小板, 影响血小板的功能。其主要表现为临床常见

(下转843页)

作者简介: 刘 林(1963－), 女, 北京市人, 主管技师, 主要从事血液临床应用及质量控制方面的研究, 发表论文11篇。电话: (023)68757781

收稿日期: 2000-12-25; 修回日期: 2001-04-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net