

• 临床检验研究论著 •

中性粒细胞 VCS 参数在心肌再灌注损伤中的意义

陈彤¹, 吴俊渊¹, 万洋洋¹, 仲崇俊^{2△}, 许一鸣²

(南通大学附属第二医院:1. 检验科, 2. 胸外科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨中性粒细胞 VCS 参数在心肌缺血再灌注损伤中的意义。方法 采用 Beckman-Coulter LH750 全自动血液分析仪检测 155 例接受体外循环下心脏手术患者的血常规, 记录中性粒细胞 VCS 参数, 并计算手术前、后 VCS 的变化幅度(Δ VCS), 然后进行指标间的相关性分析。结果 中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)与中性粒细胞 Δ VCS(Δ NEV、 Δ NEC、 Δ NES)参数间存在良好的相关性(r 分别为 0.86、0.66、0.70, $P < 0.05$), 且 6 h 的肌钙蛋白 I(TnI)浓度与 1 h 的中性粒细胞 Δ NEV、 Δ NEC、 Δ NES 参数间也存在良好的相关性(r 分别为 0.74、0.67、0.69, $P < 0.05$)。结论 中性粒细胞 Δ VCS 参数与 NE、TnI 浓度明显相关, 有助于心肌缺血再灌注损伤的诊断。

关键词: 心肌缺血; 再灌注损伤; 肌钙蛋白 I; 中性粒细胞弹性蛋白酶; VCS 参数

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.09.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)09-1099-02

Significance of neutrophil VCS parameters in myocardial ischemia and reperfusion injury

Chen Tong¹, Wu Junyuan¹, Wan Yangyang¹, Zhong Chongjun^{2△}, Xu Yiming²

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To explore the significance of neutrophil VCS parameters in myocardial ischemia and reperfusion injury.

Methods Beckman-Coulter LH750 automated hematology analyzer was employed to detect complete blood counts of 155 patients undergoing cardiac surgery under cardiopulmonary bypass. Neutrophil VCS parameters were recorded, VCS variations(Δ VCS) before and after surgery were calculated, and then correlation analysis was conducted among the indicators. **Results** Good correlation existed between neutrophil elastase (NE) and neutrophil Δ VCS(Δ NEV, Δ NEC, Δ NES) parameters(r values were 0.86, 0.66, 0.70, respectively, $P < 0.05$). Concentration of troponin I(TnI) at 6 hour also showed high correlations with neutrophil Δ VCS at 1 hour(r values were 0.74, 0.67, 0.69, respectively, $P < 0.05$). **Conclusion** Neutrophil Δ VCS parameters correlates significantly with NE and TnI, and is contribute to myocardial ischemia and reperfusion injury diagnosis.

Key words: myocardial ischemia; reperfusion injury; troponin I; neutrophil elastase; VCS parameters

体外循环下心脏手术可导致广泛的心肌损害, 包括手术操作的直接损伤和体外循环所致缺血再灌注损伤, 尤其是后者可导致术后发生多种并发症。早期监测、预测损害程度对防止和最大限度减轻并发症的发生具有重要意义^[1]。其中, 中性粒细胞激活在缺血再灌注损伤的发生、发展中起着重要作用, 并且可能是多种损伤机制的共同途径^[2]。活化的中性粒细胞释放大量氧自由基损伤细胞膜和细胞器, 中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是一种相对分子质量为 30 000, 由 218 个氨基酸组成的单链糖蛋白, 属于丝氨酸蛋白酶家族, 是活化的中性粒细胞释放的蛋白酶中的主要成分, 是其激活释放的标志性生物活性物质^[3-4]。本研究旨在观察体外循环下主动脉瓣置换手术中, NE 与中性粒细胞 VCS 参数的相关性, 及 VCS 参数改变与血清肌钙蛋白 I(troponin I, TnI)浓度的关系, 为监测体外循环的炎症反应提供方便、有效的指标。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 3 月至 2012 年 8 月在南通大学附属第二医院行主动脉瓣置换术的 155 患者, 其中, 男 83 例, 女 72 例; 年龄 17~61 岁, 平均 42 岁; 体质量 (51.80 ± 7.45) kg。入选标准: 心功能 II~III 级, 射血分数大于 (59.10 ± 3.54)%; 肝功能、肾功能、出凝血功能及电解质正常; 均接受体外循环下心脏手术, 术前血常规白细胞分析结果正常; 无心肌梗死病史, 无过敏体质者。所有入选患者均排除肿瘤、中毒、血液系统疾病及术后感染等; 为减小术前感染对结果的影响, 排除术前血常规白细胞检验结果超过 $\bar{x} \pm 3s$ 的患者。

1.2 主要仪器与试剂 美国 Beckman-Coulter LH750 全自动血液分析仪及其原装配套试剂及质控品, 奥地利 Vacuette 真空采血管; NE 试剂由上海研域生物科技有限公司提供, TnI 检测用法国生物梅里埃公司的 VIDAS 全自动免疫分析仪及配套试剂及质控品。

1.3 方法 分别于体外循环前、体外循环 30 min 时、主动脉开放后 1、6、12、24 h 从颈内静脉置管中抽血, 进行血常规分析, 测定血浆 NE 和 TnI 浓度。操作均严格按照操作规程进行, 仪器定期进行规范的校正、保养、维护及质控, 并在控。检测后记录项目包括中性粒细胞体积 (neutrophil volume, NEV)、中性粒细胞电导率 (neutrophil conductivity, NEC)、中性粒细胞平均激光率 (neutrophil light scatter, NES), 并计算术后各次 VCS 参数与术前的变化幅度 (Δ NEV、 Δ NEC、 Δ NES) 以及 NE、TnI 浓度检测结果。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 先进行数据的正态性分析, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。相关分析采用 Pearson 相关系数法, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NE 与中性粒细胞 Δ VCS 参数的相关性分析 活化的中性粒细胞分泌 NE, 细胞质内出现多种炎症介质和趋化因子的分泌泡, 体积增加, 胞内颗粒增加, 光散射增强; 1 h 结果相关性分析显示 (图 1): NE 与中性粒细胞 Δ VCS 参数间存在良好的相关性, NE [(145.70 ± 12.16) ng/mL] 与 Δ NEV [(6.07 ±

1.40)fL]、 Δ NEC(-2.96±0.81)、 Δ NES(4.08±1.11)间的相关系数 r 分别为 0.86、0.66、0.70, 直线回归方程分别为: $Y=0.099X-8.361$ 、 $Y=-0.044X+3.486$ 、 $Y=0.064X-5.230$ 。

2.2 主动脉瓣术后患者 Δ VCS、TnI 在手术前、后的变化趋势及其相关性分析 患者 Δ VCS 参数在术后 1 h 达到高峰, TnI

在体外循环后 6~12 h 出现峰值。6 h 的 TnI[(0.41±0.29) μ g/mL] 与 1 h 的中性粒细胞 Δ VCS(Δ NEV、 Δ NEC、 Δ NES) 参数间存在良好的相关性, 其相关系数 r 值分别为 0.74、0.67、0.69, 回归方程分别为: $Y=0.015X^{1.76}$ 、 $Y=-0.241X-0.301$ 、 $Y=0.049X^{1.42}$ 。见图 2。

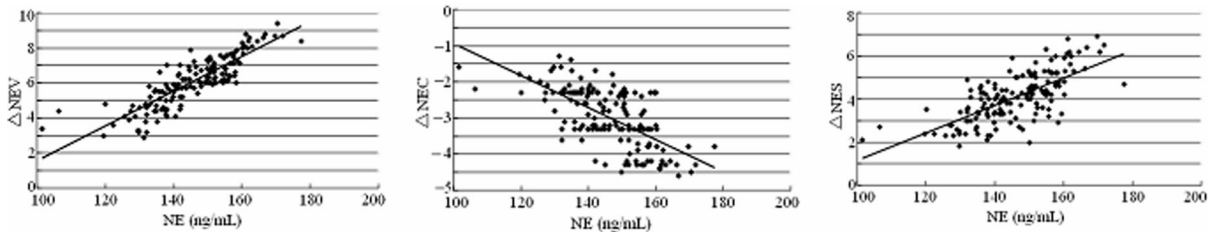


图 1 NE 与 Δ NEV(左)、 Δ NEC(中)、 Δ NES(右)的相关散点图

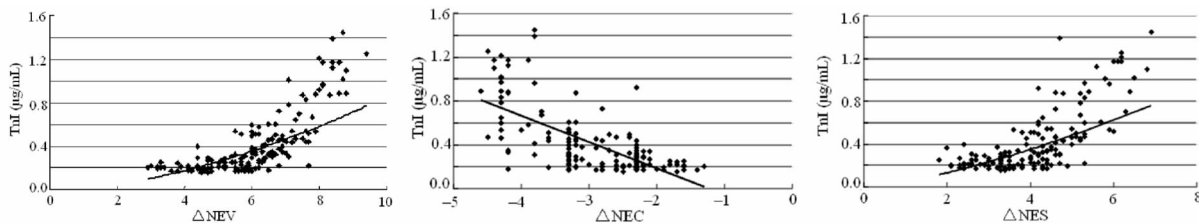


图 2 TnI 与 Δ NEV(左)、 Δ NEC(中)、 Δ NES(右)的相关散点图

3 讨论

Beckman-Coulter LH750 全自动血液分析仪采用 VCS 技术在 20 s 时间分析了 8 192 个白细胞, 其测得白细胞的各项参数较精确, 其中 V 代表体积, 是采用电阻法将体积大小差异显著的淋巴细胞和粒细胞分开; C 代表射频电导性, 可直接测量细胞内部结构间的差异, 了解细胞内部核质比例和细胞内化学成分, 可辨别细胞体积相同而内部性质不同的细胞, 可将体积相近的淋巴细胞和嗜碱性粒细胞区分开(因为他们的核质比例明显不同); S 代表激光散射, 可穿透细胞, 探测细胞内核分叶状况和胞质颗粒情况, 通过分析光散射信息对胞内颗粒性进行分析, 细胞内颗粒粗的光反射强, 因此, 可以用于单核细胞和 3 种粒细胞的区分^[5-6]。通过综合处理这 3 个参数的特性, 可对白细胞的各种特征进行综合评价分析。

在心肌缺血再灌注损伤中, 中性粒细胞的黏附及浸润是心肌缺血再灌注后冠状动脉的主要病理改变。冠状动脉内皮细胞在心肌缺血再灌注损伤中既是受损的主要靶器官, 更是活跃的炎症和效应细胞。心肌缺血再灌注损伤时, 中性粒细胞在冠状动脉聚集、黏附, 释放大量活性氧和蛋白酶, 从而损伤组织和冠状动脉内皮细胞。NE 作用于细胞壁弹性蛋白及其他组织结构蛋白而造成组织损伤^[7-10]。有研究表明, 体外循环期及术后患者血浆 NE 显著升高, 提示 NE 可作为炎症反应进展的一个标志^[11-12]。本研究结果显示, 患者 NE 在体外循环期间开始升高, 于主动脉开放后 1 h 达高峰, 主动脉开放后 6 h 开始下降, 至主动脉开放后 24 h 仍明显高于术前水平, 与 Bakhtiyar 等^[13]及 Butler 等^[14]的研究结果相符。体外循环后 1 h 血浆的 NE 浓度与 6 h 后 TnI 之间呈显著正相关, 提示活化的中性粒细胞参与心肌缺血再灌注损伤。

活化的中性粒细胞细胞质内出现多种炎症介质、趋化因子及分泌 NE 的分泌泡, 体积增加, 胞内颗粒增加, 光散射增强, 故 NE 浓度越高, 中性粒细胞活化程度越大, 细胞形态改变越大。本研究针对中性粒细胞 VCS 参数在该并发症中的变化幅度(Δ VCS)进行分析, 有效排除了术前中性粒细胞 VCS 参数的个体差异。 Δ VCS 参数能定量反映细胞形态变化, 本研究

表明 NE 浓度与 Δ VCS 参数存在良好的相关性。

有研究发现, 应用 NE 选择性抑制剂 SSR69071 治疗, 能减少缺血再灌注损伤后的心肌梗死面积^[15]。由此, 根据体外循环中 NE 的释放规律, 参照简便、有效的 Δ VCS 参数适时使用 NE 选择性抑制剂, 可防治体外循环中由活化的中性粒细胞所介导的心肌缺血再灌注损伤。

参考文献

- [1] 陆升. 体外循环心肌损伤机制及其保护的研究进展[J]. 右江医学, 2011, 39(5): 638-641.
- [2] 朱晓红, 吴延庆, 陈受琳, 等. 体外循环下心内直视手术患者血浆中 NE 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2010, 50(2): 87-88.
- [3] 高从荣, 祝会斌, 刘卫萍, 等. 体外循环对血管内皮细胞及中性粒细胞弹性蛋白酶影响[J]. 安徽医学, 2009, 30(9): 1065-1067.
- [4] 冯丽, 李医明. 中性粒细胞弹性蛋白酶天然抑制剂及其筛选方法的研究进展[J]. 中成药, 2012, 34(5): 914-918.
- [5] Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer; new and reliable indicators for acute bacterial infection[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(3): 440-444.
- [6] Zhu Y, Cao X, Chen Y, et al. Neutrophil cell population data: useful indicators for postsurgical bacterial infection[J]. Int J Lab Hematol, 2012, 34(3): 295-299.
- [7] 刘军锋, 贾克刚, 郑大勇, 等. 心肌缺血再灌注损伤实验指标的研究现状[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(23): 3607-3609.
- [8] 王翠梅, 曹红. 冠脉内皮细胞与心肌缺血再灌注损伤[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2004, 25(2): 171-174.
- [9] 文富强, 申永春. 祛痰治疗在慢性阻塞性肺疾病中临床应用[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2010, 3(4): 236-238.
- [10] 张伟, 蔡映云. 中性粒细胞弹性蛋白酶与炎症性肺部疾病[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2002, 22(4): 114-117.
- [11] Bingyang J, Jinping L, Mingzheng L, et al. Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2007, (下转第 1102 页)

肝病组与对照组比较,患者血清 TK1、AFP、CEA 阳性结果的差异无统计学意义($P>0.05$);原发性肝癌组患者血清 TK1、AFP、CEA 的阳性率显著高于良性肝病组与对照组($P<0.01$),见表 2。

2.3 血清 TK1 单项及联合检测在原发性肝癌诊断中的评价

TK1 与 AFP、CEA 联合检测对原发性肝癌的诊断敏感性显著高于无 TK1 的检测组($P<0.01$),见表 3。

表 2 各组患者血清 TK1、AFP、CEA 阳性率结果比较

组别	n	TK1[n(%)]	AFP[n(%)]	CEA[n(%)]
原发性肝癌组	50	43(86.00) ^a	17(34.00) ^a	26(52.00) ^a
良性肝病组	50	8(16.00) ^b	3(6.00) ^b	4(8.00) ^b
对照组	50	4(8.00)	2(4.00)	3(6.00)

^a: $P<0.01$,与良性肝病、对照组比较;^b: $P>0.05$,与对照组比较。

表 3 血清 TK1 单项及联合检测在原发性肝癌诊断中的评价 [% (n/n)]

检测项目	敏感性	特异性	准确性	阳性预期值	阴性预期值
TK1	86.00(43/50) ^a	88.00(88/100)	87.30(131/150)	78.20(43/55)	92.60(88/95)
AFP	34.00(17/50)	95.00(95/100)	74.70(112/150)	77.30(17/22)	74.20(95/128)
CEA	52.00(26/50)	93.00(93/100)	79.30(119/150)	78.80(26/33)	79.50(93/117)
AFP+CEA	54.00(27/50)	90.00(90/100)	78.00(117/150)	73.00(27/37)	79.60(90/113)
TK1+AFP+CEA	92.00(46/50) ^a	83.00(83/100)	86.00(129/150)	73.00(46/63)	95.40(83/87)

^a: $P<0.01$,与 AFP、CEA、AFP+CEA 组相同项目比较。

3 讨 论

原发性肝癌的早期诊断与治疗是提高患者 5 年生存率的关键。目前临床上常用的血清学筛查手段主要有 AFP 和 CEA 的检测。AFP 是诊断原发性肝癌的首选肿瘤标志物,但 AFP 敏感性(70.00%)与特异性(64.00%)均较低^[1],胆管细胞癌患者血清 AFP 水平大多正常^[2]。本组实验中,AFP 在原发性肝癌诊断中的敏感性仅为 34.00%,远低于雷光文等^[3]报道的其在原发性肝细胞性肝癌的敏感性(64.56%),分析原因,这除了与肝癌类型有关外,还可能与肿瘤的大小、生长速度及恶性程度的不同有关。

CEA 是一种糖蛋白,体内 CEA 水平受年龄,饮酒、吸烟习惯的影响。高浓度 CEA 主要见于结直肠癌及其肝转移癌^[4],在其他肿瘤患者中也可检出 CEA 升高。本研究,原发性肝癌组患者血清 CEA 水平显著高于良性肝病组与对照组;但良性肝病组与对照组患者血清 CEA 水平也有显著差异,因此,CEA 只能作为肝脏肿瘤鉴别诊断的辅助指标。

TK1 是 DNA 合成的关键酶,与细胞增殖有密切关系。异常增殖类病变由于病变细胞缺失了凋亡调控,DNA 合成剧增导致 TK1 水平异常升高。正常人体内 TK1 水平极微量或无^[5],因此,血清 TK1 检测目前被广泛用于恶性增殖性病变的筛查和治疗后的跟踪监测。由表 2 可见,原发性肝癌组患者血清 TK1、AFP 及 CEA 的阳性率均显著高于良性肝病组与对照组,其中 TK1 阳性率最高,且在肝良性疾病中表达较低,显示 TK1 是一种极具潜力的肿瘤筛查标志物。

但是,TK1 的临床应用也有一定的局限性,妊娠期、月经期的细胞处于增殖阶段,使 TK1 水平升高而造成假阳性;患有异常增殖性疾病的患者存在个体差异,部分患者细胞增殖速率较低,使 TK1 水平始终处于低增殖状态,从而造成假阴性;另

外,人们发现 TK1 至少在 10 种不同的恶性肿瘤中呈高表达^[6],因此,单独检测 TK1 虽在原发性肝癌患者中有 86.00% 的敏感性,但其不足以成为原发性肝癌的首选诊断指标,需要联合其他特异性较高的肿瘤标志物才能解决 TK1 涉及癌谱较广的问题。由表 3 可见,联合检测 TK1、AFP 及 CEA 可使诊断敏感性提高到 92.00%,特异性达 83.00%,准确性较 AFP、CEA 单项及两项联合检测高;阳性预期值与 AFP、CEA 联合检测相似,而阴性预期值大幅提高,这提示 TK1、AFP 及 CEA 的联合检测可作为早期诊断原发性肝癌的一种有价值的方法。

参考文献

- [1] Soresi M, Magliariis C, Campagna P, et al. Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(2C): 1747-1753.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2011, 16(10): 929-946.
- [3] 雷光文, 衡爱萍, 史锋庆, 等. 原发性肝癌患者血清 AFP、VEGF、IGF-Ⅱ 联检的临床价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(1): 83-84.
- [4] 胡敏华, 陈燕, 黄建英. 肝癌患者癌胚抗原检测的临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(1): 10-11.
- [5] Wu C, Yang R, Zhou J, et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1[J]. *J Immunol Methods*, 2003, 277(1/2): 157-169.
- [6] 李清茹, 桑士标, 袁航, 等. 血清胸苷激酶 1 检测对恶性肿瘤诊断及疗效评估的意义[J]. *中华核医学杂志*, 2009, 29(4): 271-273.

(收稿日期: 2012-12-26)

(上接第 1100 页)

48(4): 497-503.

- [12] Boeken U, Feindt P, Schulte HD, et al. Elastase release following myocardial ischemia during extracorporeal circulation (ECC)——marker of ongoing systemic inflammation[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 50(3): 136-140.
- [13] Bakhtiyari F, Moritz A, Kleine P, et al. Leukocyte depletion during cardiac surgery with extracorporeal circulation in high risk patients[J]. *Inflamm Res*, 2008, 57(12): 577-585.

- [14] Butler J, Parker D, Pillai R, et al. Effect of cardiopulmonary bypass on systemic release of neutrophil elastase and tumor necrosis factor[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1993, 105(1): 25-30.
- [15] Bidouard JP, Duval N, Kapui Z, et al. SSR69071, an elastase inhibitor, reduces myocardial infarct size following ischemia-reperfusion injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 461(1): 49-52.

(收稿日期: 2012-12-05)