

体外循环血浆对类中性粒细胞趋化和CXCR4表达的影响

彭艳华 涂 然 杨陶波 王寿勇*

(重庆医科大学附属儿童医院麻醉科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 为研究体外循环血浆对类中性粒细胞趋化功能和CXCR4表达的影响, 选择体外循环下心内直视手术(CPB组)和超声引导下外科微创室间隔缺损封堵术(N-CPB组)的患儿各12例, 收集手术前后血浆, 采用Transwell细胞培养系统测定其对体外培养的类中性粒细胞的趋化效应, 并采用流式细胞术和Western blot测定经血浆刺激后类中性粒细胞表面趋化因子受体4[chemokine (C-X-C motif) receptor 4, CXCR4]蛋白质及其磷酸化水平的变化, 运用RT-qPCR检测CXCR4 mRNA水平。结果表明, CPB血浆对类中性粒细胞趋化效应明显增强, T1和T2时刻趋化指数分别为 3.89 ± 0.77 和 7.68 ± 1.55 , CXCR4特异性拮抗剂AMD3100对这一增强效应有抑制作用; CPB血浆刺激后, 类中性粒细胞表面CXCR4蛋白质及其磷酸化水平均明显升高, 但其mRNA水平未发生明显变化。体外循环血浆可激活类中性粒细胞CXCR4信号通路, 其机制与增加细胞表面CXCR4蛋白质及其磷酸化水平有关, 但与其mRNA水平无关, 这一机制可能与体外循环过程中中性粒细胞向肺部和其他血管外组织浸润有关。

关键词 趋化因子受体4; 类中性粒细胞; 体外循环; 趋化效应

Effects of Plasma Extracted from Cardiopulmonary Bypass on the Chemotaxis and CXCR4 Expression in Neutrophil-Like Cells

Peng Yanhua, Tu Ran, Yang Taobo, Wang Shouyong*

(Department of Anesthesiology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of this paper was to study the effects of plasma extracted from cardiopulmonary bypass children on the chemotaxis and CXCR4 expression in neutrophil-like cells *in vitro*. 12 children scheduled to receive ventricular septal defect (VSD) closure under cardiopulmonary bypass (CPB) (CPB group) and 12 children scheduled to receive minimally invasive closure of ventricular septal defect (VSD) with ultrasound guidance (N-CPB group) were enrolled. The blood was sampled and plasma were collected at before and after surgery. The chemotaxis of neutrophil-like cells (NLC) to the N-CPB or CPB plasma was evaluated using a Transwell culture system, and the levels of surface CXCR4 protein, phosphorylated CXCR4 and CXCR4 mRNA in the NLC were

收稿日期: 2017-09-27 接受日期: 2017-12-08

重庆市卫生计生委医学科研项目(批准号: 2015MSXMO40)和国家自然科学基金(批准号: 30700785)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63632143, E-mail: saulwang@126.com

Received: September 27, 2017 Accepted: December 8, 2017

This work was supported by the Project of Chongqing Medical and Health Program Medical Research Commission (Grant No.2015MSXMO40) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30700785)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63632143, E-mail: saulwang@126.com

网络出版时间: 2018-03-09 15:23:31 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1523.002.html>

also evaluated by flow cytometry, Western blot and RT-qPCR, respectively. The NLC chemotaxis index to the plasma in CPB group was increased significantly, which were 3.89 ± 0.77 vs 7.68 ± 1.55 at T1 and T2, respectively. And this increased chemotaxis could be inhibited by CXCR4 specific antagonist AMD3100. Simultaneously, as well as the levels of surface CXCR4 protein and phosphorylated CXCR4 of the NLC were increased significantly in the CPB group but not in N-CPB group. However, there were no significant differences between the N-CPB and CPB group in CXCR4 mRNA level. Cardiopulmonary bypass children derived plasma can activate the CXCR4 signal pathway in neutrophil-like cells *in vitro*, and its mechanism may relate to the increased surface protein and its phosphorylation levels, not relate to the mRNA level. These mechanisms might be involved in the neutrophils infiltration into pulmonary and other extravascular tissues during CPB.

Keywords CXCR4; neutrophil-like cells; cardiopulmonary bypass; chemotaxis

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)难以完全避免的并发症,早期表现为肺部氧合交换功能下降,晚期或重症者可表现为急性呼吸窘迫综合征或呼吸功能衰竭^[1-3]。中性粒细胞在肺部的大量积聚和隔离,是CPB诱发ALI的关键因素^[4-5],但引起中性粒细胞向肺部集聚的具体机制尚不完全清楚。趋化因子受体4[chemokine (C-X-C motif) receptor 4, CXCR4]是趋化因子受体家族的重要成员,骨髓基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)是其体内主要配体,二者构成SDF-1/CXCR4信号通路,在多种细胞的定向迁移过程中起着极其重要的调控作用^[6-7]。动物实验已经证实,CPB可以显著激活SDF-1/CXCR4信号通路^[8]。本研究拟以先天性心脏病患儿体外循环前后血浆为刺激因素,研究其对体外培养的类中性粒细胞(neutrophil-like cells, NLC)趋化功能和CXCR4表达的影响,以侧面探讨CPB引起中性粒细胞迁移的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

HL-60细胞购自中国科学院细胞库; AMD3100购自美国Selleck公司; RT-qPCR试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; CD11b-PE、CXCR4-APC抗体及同型对照抗体均购自美国eBioscience公司; CXCR4抗体购自Abcam公司; 磷酸化CXCR4抗体购自北京博奥森生物有限公司; 羊抗小鼠IgG、GAPDH抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 羊抗兔IgG购自北京义翘神州生物技术有限公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 病例选择 CPB组: 择期行体外循环下心内

直视手术的患儿12例(CPB组), 患病种类为单纯性室间隔缺损(VSD); 非CPB组(N-CPB组): 择期行超声引导下外科微创室间隔缺损封堵术患儿12例。所有患儿均为初次接受心脏手术。两组患儿年龄均为1~5周岁之间。病例排除标准包括: (1)近期有上呼吸道感染; (2)正在接受免疫抑制疗法; (3)严重心功能不全, 心功能III级及以上; (4)其他重要脏器功能不全。本研究获得重庆医科大学附属儿童医院伦理委员会批准, 并经中国临床试验中心注册, 注册号为: ChiCTR-BOh-17011331, 入选患儿家属术前均出具书面同意书。

1.2.2 麻醉方法 两组患儿麻醉方案一致, 麻醉诱导采用舒芬太尼 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、咪达唑仑 $0.05 \text{ mg}/\text{kg}$, 顺苯磺酸阿曲库铵 $0.2 \text{ mg}/\text{kg}$ 静脉注射。麻醉维持采用舒芬太尼 $2\sim 3 \mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 静脉泵注, 肌松维持采用顺苯磺酸阿曲库铵 $0.2\sim 0.4 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 静脉泵注。麻醉后持续监测肛温和鼻咽温, 并行有创动脉血压及中心静脉压监测, 以美国Detax-Ohmeda S/5麻醉机控制呼吸, 调节通气参数使呼吸末二氧化碳分压(PetCO_2)维持于 $35\sim 45 \text{ mmHg}$ 。

1.2.3 CPB方法 经正中劈开胸骨, 切除胸腺及部分心包, 显露心脏及大血管。分别行上下腔静脉及升主动脉插管, 建立体外循环。肝素化剂量为 $400 \text{ IU}/\text{kg}$, 转流前要求全血激活凝血时间大于 480 s , 必要时追加给予肝素 $100 \text{ IU}/\text{kg}$ 。主动脉阻断后根部灌注预冷心脏停搏液, 采用中度低温体外循环, 维持鼻咽温 $28\sim 32 \text{ }^\circ\text{C}$, 采用STOCKERT-SC型人工心肺机(德国)转流, 灌注流量维持于 $120\sim 150 \text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 。主动脉阻断期间维持平均动脉压于 $35\sim 45 \text{ mmHg}$, 血压过高或过低时, 采用梳理循环管道、适当调整灌注流量和给予血管活性药物等措施处理。血气管理

采用 α 稳态, 维持全血pH值于7.35~7.45, 动脉血CO₂分压于30~40 mmHg。心内手术操作结束后逐渐复温, 排气并仔细缝合心脏切口, 同时给予多巴胺5~10 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 、米力农0.5 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 持续泵注, 回输部分机血, 维持Hct于25%~35%, 血红蛋白浓度于90~120 g/L。按照1.2:1的比例用鱼精蛋白中和肝素, 撤除体外循环。手术结束患儿送ICU监护治疗。

1.2.4 VSD外科微创封堵方法 取胸骨下端切口, 上至乳头水平, 下至剑突, 锯开胸骨后切开、悬吊心包, 给予肝素钠100 IU/kg。在保持心脏正常搏动状态下用4/0 Prolene线带垫在右心室表面行褥式缝合, 经右心室穿刺依次植入导丝、扩张器和鞘管, 食道超声(TEE)引导鞘管经VSD进入左心室。经鞘管通道送入封堵器, 在TEE引导下释放封堵器, 超声检查显示无移位、残余分流和瓣膜反流, 心电图排除传导阻滞后退推出推送螺杆和鞘管, 放置心包引流管后结束手术, 患儿送ICU监护治疗。

1.2.5 标本采集 两组病人分别在手术开始前(T1)和手术结束后(T2)经中心静脉导管采集血液标本5 mL, 肝素抗凝, 1 000 $\times g$ 离心15 min, 分离血浆备用。

1.2.6 类中性粒细胞(neutrophil-like cells, NLC)培养与鉴定 本研究以CD11b为分子标记来鉴定NLC诱导培养成功, 取对数生长期的HL-60细胞, 以 2×10^6 /瓶接种于T75细胞培养瓶中, 加入二甲亚砜(DMSO)至终浓度为1.2%, 持续培养5天, 即得NLC用于实验。取聚丙烯流式细胞上机管, 每管加入经PBS洗涤、重悬的NLC或者HL-60细胞约 1×10^6 个, 室温封闭20 min, 然后分别加入免疫荧光单克隆抗体CD11b-PE, 加入同型IgG-PE为同型对照管, 室温、暗室孵育30 min, PBS洗涤2次后, 200 μL 磷酸盐缓冲液重悬, 采用FACSCalibur流式细胞仪在488 nm波长下进行荧光检测, 每份标本至少检测5 000个细胞。

1.2.7 趋化实验 NLC采用预热至37 $^{\circ}\text{C}$ 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤2次, 再用无血清1640培养液重悬, 调整密度至 5×10^6 /mL, 分为空白对照组(BC组)、N-CPB组和CPB组, 采用Transwell细胞培养系统进行趋化实验。其中, CPB组根据两个时点是否给予CXCR4特异性拮抗剂AMD3100又分为4个亚组, 拮抗剂亚组在趋化实验开始前, 先给予终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的AMD3100处理NLC, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂平衡的恒温箱孵育30 min。无拮抗剂亚组以同体积1640培养液代替。Transwell

细胞培养系统下室分别给予CPB组T1、T2时刻血浆; N-CPB组处理与CPB组相同, 但Transwell细胞培养系统下室分别给予N-CPB组T1、T2时刻血浆; 空白对照组(BC组)与CPB组完全平行, Transwell细胞培养系统下室仅给予1640培养液。在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂平衡的恒温箱内孵育1 h, 移去Transwell上室, 室温静置30 min, 待细胞充分沉降, 200倍显微镜下随机选择16个视野拍照计数, 按照下述公式计算趋化指数(CI), $\text{CI}=\text{各观察组趋化至下室的细胞总数}/\text{空白对照组趋化至下室的细胞总数}$ 。

1.2.8 流式细胞术检测NLC表面CXCR4水平 取聚丙烯流式细胞上机管, 每管加入经PBS洗涤、重悬的NLC约 1×10^6 个, 分为CPB组和N-CPB组, 分别加入T1、T2时刻的血浆1 mL, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂平衡的恒温箱内孵育1 h, 离心弃上清, 人血清封闭20 min, 然后分别加入免疫荧光单克隆抗体CD11b-PE、CXCR4-APC, 对照管加入同型IgG-APC, 室温、暗室孵育30 min, PBS洗涤2次后, 200 μL 磷酸盐缓冲液重悬, 采用FACSCalibur流式细胞仪在488 nm波长下进行荧光检测, 每份标本至少检测5 000个细胞, 以CXCR4的平均荧光强度/同型对照IgG的平均荧光强度的比值比表示中性粒细胞CXCR4的蛋白表达水平。

1.2.9 RT-qPCR检测类中性粒细胞CXCR4 mRNA的变化 NLC经PBS洗涤、重悬, 分为CPB组和N-CPB组, 分别加入T1、T2时刻的血浆1 mL, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂平衡的恒温箱内孵育1 h, 提取总RNA, 纯化并反转录为cDNA。参照GenBank设计并合成引物, 上游: 5'-TCA GTG GCT GAC CTC CTC TT-3', 下游: 5'-CTT GGC CTT TGA CTG TTG GT-3'。以 β -actin为内参照, 上游: 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3', 下游: 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3'。反应体系共25 μL , 包含 cDNA模板2 μL 、SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μL , 上下游引物各1 μL , 双蒸水8.5 μL 。反应条件设置为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共40个循环。CXCR4水平使用周期阈值($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)法分析。

1.2.10 类中性粒细胞CXCR4磷酸化水平测定 NLC经PBS洗涤、重悬, 分为CPB组和N-CPB组, 并根据进一步处理因素的不同又分为四个亚组, 分别给予相应组别的T1血浆、T1血浆+AMD3100、T2血浆和T2血浆+AMD3100处理。其中涉及AMD3100的各亚组在加入血浆前, 先使AMD3100终浓度为

5 $\mu\text{g/mL}$, 其余各管以等体积PBS补足。各亚组经37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 平衡的恒温箱内孵育30 min后, 再加入血浆各1 mL。充分混匀后在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 平衡的恒温箱内孵育1 h, 离心收集细胞, 冰PBS溶液洗涤2次后提取细胞全蛋白, 采用Western blot检测CXCR4蛋白质及其磷酸化水平: 煮沸5 min变性, 以20 μg 蛋白质加样行SDA-PAGE, 然后以100 V 90 min转PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h后, 一抗孵育4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST洗涤3次, 每次10 min。后加入二抗, 室温孵育1 h, TBST洗涤3次, 每次10 min。以GAPDH为内参照, ECL曝光显影。然后进行数据化处理, 结果进行统计学分析。

1.3 统计学分析

数据处理采用SPSS 17.0完成, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组内不同时刻比较采用配对样本 t 检验, 组间同一时刻比较采用独立样本 t 检验, 构成

比资料采用卡方检验, 偏态分布资料用中位数表示, 采用秩和检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 麻醉手术经过

患者一般资料情况见表1, 年龄、体质量、性别比例、术前红细胞压积、白细胞计数等比较, 组间差异无统计学意义。所有患儿手术进行顺利, 术中循环功能维持良好, 未发生严重心律失常等并发症。所有患儿术后恢复平稳, 未发生全身感染或其他严重并发症, 均按计划顺利出院。

2.2 DMSO诱导HL-60细胞分化为类中性粒细胞

DMSO持续诱导培养HL-60细胞5天后, 流式细胞术鉴定CD11b表达。诱导前HL-60细胞几乎不表达CD11b, 与DMSO诱导前相比较, 诱导后CD11b表达呈强阳性(图1), 表明DMSO诱导HL-60细胞分化

表1 患者一般情况($n=12, \bar{x}\pm s$)

Table 1 The clinical characteristic of the patient ($n=12, \bar{x}\pm s$)

一般情况 Clinical characteristic	N-CPB组($n=12$) N-CPB group ($n=12$)	CPB组($n=12$) CPB group ($n=12$)
Sex (male/female)	6/6	5/7
Age (years)	1.90 \pm 0.72	2.45 \pm 1.20
Weight (kg)	11.86 \pm 3.35	11.42 \pm 3.65
Red blood cell ($10^{12}/\text{L}$)	4.46 \pm 0.53	4.57 \pm 0.47
White blood cell ($10^9/\text{L}$)	7.80 \pm 2.24	7.10 \pm 2.47
Time of aortic cross-clamping (min)	-	36.07 \pm 12.60
Duration of CPB (min)	-	70.42 \pm 9.60
Duration of surgical (min)	109.73 \pm 22.02	120.67 \pm 15.79

-: N-CPB组无CPB过程, 无主动脉阻断时间和CPB。

-: No CPB process in N-CPB group, no time of aortic cross-clamping and duration of CPB.

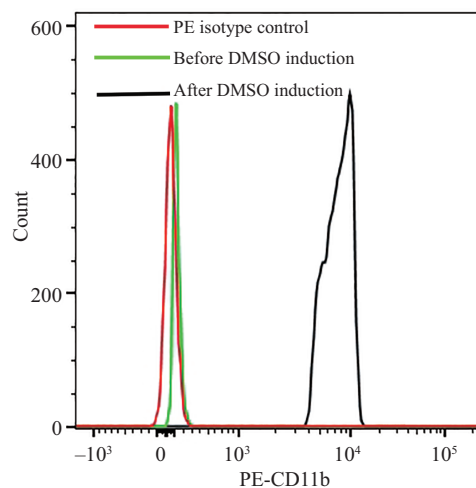


图1 DMSO诱导前后CD11b平均荧光强度

Fig.1 The mean of fluorescence intensity of CD11b before and after DMSO induction

为类中性粒细胞。

2.3 趋化实验结果

与空白对照组(BC组)比较, N-CPB与CPB组血浆处理对体外培养的NLC均显示出了明显的趋化效应, T1时两组趋化指数分别为 3.49 ± 1.10 和 3.94 ± 0.75 , T2时两组趋化指数分别为 4.52 ± 1.12 和 7.82 ± 1.40 。与T1比较, T2时CPB组血浆处理对NLC的趋化指数升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 但N-CPB组变化无统计学差别; 与N-CPB组比较, T1时两组(N-CPB与CPB组)血浆处理对NLC趋化效应差异无统计学意义, 但T2时CPB组显著高于N-CPB组($P < 0.05$)。经

AMD3100处理后, T1时两组NLC趋化指数无显著变化, 但T2时趋化指数均明显下降, 且CPB组仍高于N-CPB组, 也高于其术前值(T1)(表2)。

2.4 类中性粒细胞CXCR4蛋白质及mRNA水平

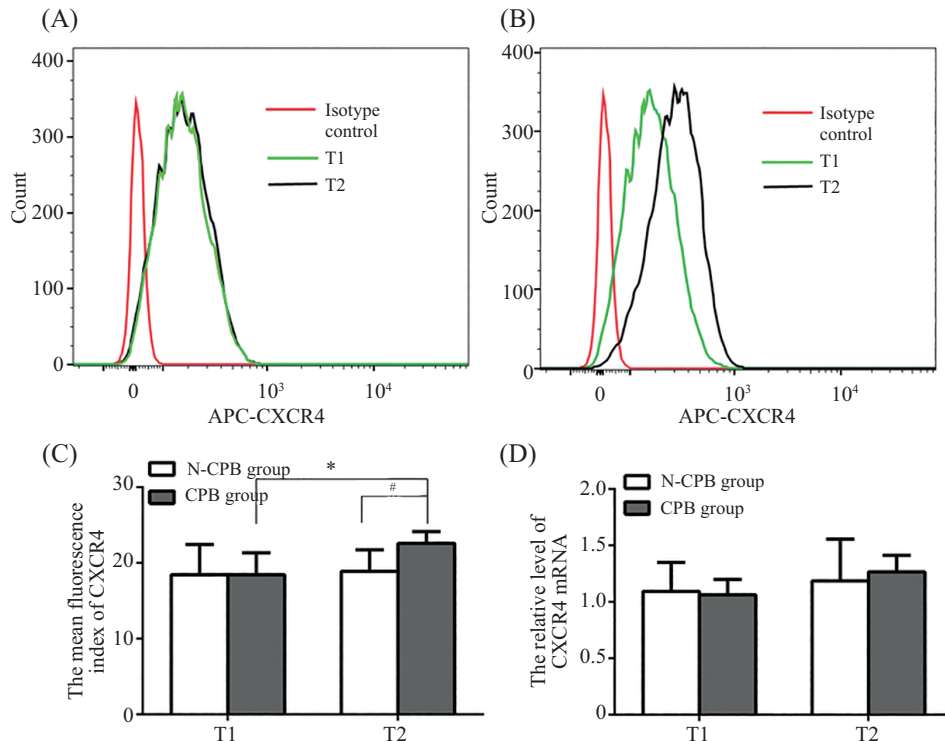
与T1比较, T2时CPB组NLC表面CXCR4相对荧光指数升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 但N-CPB组差异不明显; 与N-CPB组比较, T1时组间差异不明显, T2时CPB组NLC表面CXCR4相对荧光指数升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图2)。两组CXCR4 mRNA水平在T1、T2时组间与组内比较差异均无统计学意义。

表2 两组血浆处理对类中性粒细胞趋化功能的影响($n=12, \bar{x} \pm s$)

分组 Groups	T1		T2	
	血浆处理 Plasma treatment	血浆+AMD3100 Plasma+AMD3100	血浆处理 Plasma treatment	血浆+AMD3100 Plasma+AMD3100
BC	1	1	1	1
N-CPB	3.66 ± 1.07	3.16 ± 0.45	4.49 ± 1.20	$3.32 \pm 0.46^{\&}$
CPB	3.89 ± 0.77	3.55 ± 0.84	$7.68 \pm 1.55^{*\#}$	$4.49 \pm 0.71^{*\&}$

* $P < 0.05$, 与T1比较; # $P < 0.05$, 与N-CPB组比较; & $P < 0.05$, 与未给予AMD3100比较。

* $P < 0.05$ vs T1; # $P < 0.05$ vs N-CPB group; & $P < 0.05$ vs without AMD3100.

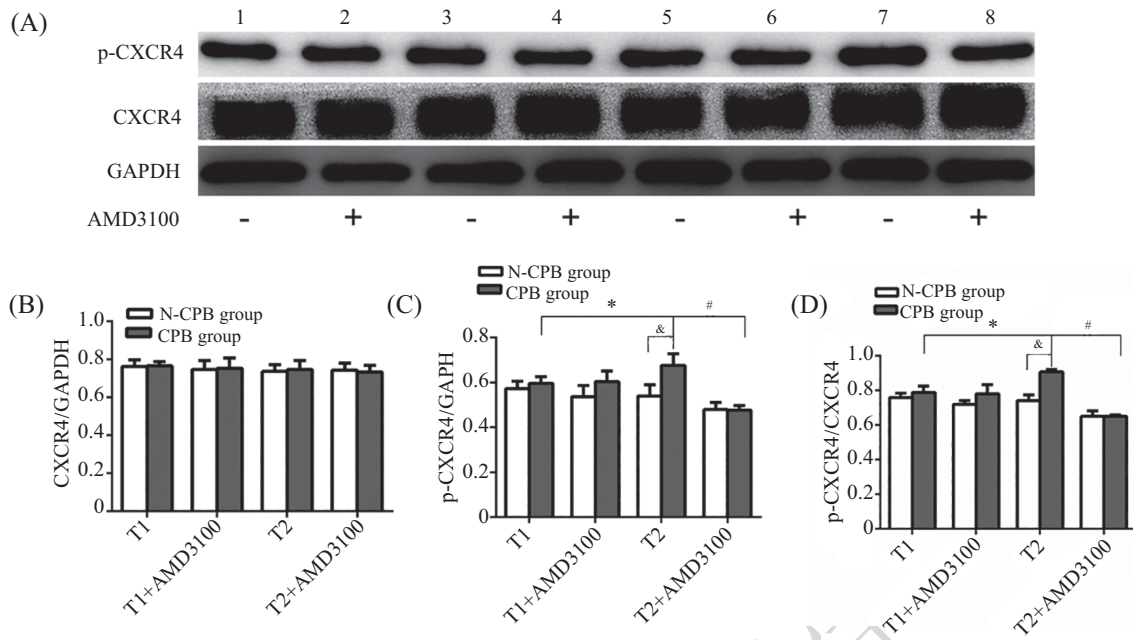


A: N-CPB组CXCR4平均荧光强度; B: CPB组CXCR4平均荧光强度; C: NLC表面CXCR4相对荧光指数; D: CXCR4 mRNA相对水平。 $n=12, \bar{x} \pm s$ 。
* $P < 0.05$, 与T1比较; # $P < 0.05$, 与N-CPB组比较。

A: the mean of fluorescence intensity of N-CPB group; B: the mean of fluorescence intensity of CPB group; C: the mean of fluorescence index of NLC;
D: the relative level of CXCR4 mRNA. $n=12, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs T1; # $P < 0.05$ vs N-CPB group.

图2 血浆处理对类中性粒细胞CXCR4蛋白质和mRNA水平的影响

Fig.2 The effects of plasma treatment on the CXCR4 protein and mRNA levels in NLC



A: Western blot检测结果; B: 半定量分析CXCR4水平; C、D: 半定量分析磷酸化CXCR4水平。1、2为N-CPB组T1血浆; 3、4为N-CPB组T2血浆; 5、6为CPB组T1血浆; 7、8为CPB组T2血浆; AMD3100-: 未经AMD3100处理; AMD3100+: 经AMD3100处理; $n=12$, $\bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$, 与T1比较; & $P<0.05$, 与N-CPB组比较; # $P<0.05$, 与经AMD3100处理组比较。

A: Western blot analysis of CXCR4 and p-CXCR4 protein levels; B: semi-quantitative analysis of CXCR4 levels; C,D: semi-quantitative analysis of phosphorylated CXCR4 levels. Band 1 and 2: N-CPB group at T1; band 3 and 4: N-CPB group at T2; band 5 and 6: CPB group at T1; band 7 and 8: CPB group at T2; AMD3100-: treated without AMD3100; AMD3100+: treated with AMD3100; $n=12$, $\bar{x}\pm s$ 。* $P<0.05$ vs T1; & $P<0.05$ vs N-CPB group; # $P<0.05$ vs group treated with AMD3100.

图3 血浆处理对类中性粒细胞CXCR4磷酸化水平的影响

Fig.3 The effects of plasma treatment on the level of CXCR4 phosphorylation in NLC

2.5 CXCR4磷酸化水平

两组类中性粒细胞CXCR4蛋白质水平比较, 组间与组内差异均无统计学意义(图3A和图3B)。与T1比较, T2时CPB组NLC表面磷酸化CXCR4水平升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 但N-CPB组差异不明显; 与N-CPB组比较, T1时组间差异不明显, T2时CPB组NLC表面磷酸化CXCR4水平高于N-CPB组, 差异具有统计学意义($P<0.05$, 图3C和图3D)。经AMD3100处理后, CPB组T2时磷酸化CXCR4水平降低($P<0.05$), 与其T1比较时差异无统计学意义, 与N-CPB组比较时差异也无统计学意义(图3C和图3D)。

3 讨论

本研究发现, CPB后血浆处理对体外培养的类中性粒细胞(NLC)趋化效应增强, CXCR4特异性拮抗剂AMD3100对此具有抑制作用。与此同时, 还发现经CPB血浆刺激的NLC表面CXCR4蛋白质增加, 其磷酸化水平升高, 但mRNA检测表明其基因表达水平并无显著变化。这些现象提示, CPB后血浆对

NLC的CXCR4信号通路具有明确的激活效应, 但其与基因表达水平无关。

人类和哺乳动物的中性粒细胞是一种终末细胞, 无法在体外进行长时间培养和实验。人早幼粒白血病细胞(HL-60)在DMSO诱导下, 可以分化为NLC, 其具有大部分中性粒细胞的分子标志和生物学行为, 被广泛作为中性粒细胞的替代研究模型^[9-10]。本研究发现, HL-60细胞本身几乎不表达CD11b, 经过DMSO诱导5 d后, 其表面出现 10^4 量级的CD11b分子表达, 表明HL-60细胞已被成功诱导为NLC。同时, 本研究发现, NLC表面CXCR4有着较高的基础表达水平, 这可能是由于CXCR4本身与细胞的生长、分裂和分化密切相关所致^[10-11]。

VSD外科微创封堵术借助超声影像定位和引导, 在搏动心脏表面进行穿刺, 通过特殊装置将封堵器放置于VSD部位, 达到纠正心内畸形的治疗目的。它使得一部分不能依靠传统股动脉入路进行封堵器植入(内科介入)的患者避免了体外循环^[12]。但是, 在手术创伤方面(开胸、暴露和刺激心脏、抗凝

等), 与体外循环心脏直视手术十分接近, 因而是临床研究中作为CPB对照的最佳选择。本研究发现, CPB组术后血浆(T2)对NLC的趋化效应显著增强, 而N-CPB组则未出现这一现象, 表明这种增强的趋化效应主要是由CPB所引起的。

本研究还发现, 预先给予CXCR4特异性拮抗剂AMD3100处理, 可以显著抑制CPB血浆对NLC的趋化效应, 提示这一增强的趋化效应可能与CXCR4信号通路激活有关。流式细胞检测结果发现, CPB后血浆可导致NLC表面CXCR4蛋白质水平显著上升, 这为CPB激活CXCR4信号通路提供了进一步的支持证据。但是, mRNA检测结果发现, 经血浆刺激后两组CXCR4基因表达均未出现显著改变, 这似乎提示在当前实验条件下, CXCR4的mRNA和蛋白质水平存在不同步的现象。有研究认为, 生理状态下, 中性粒细胞表面CXCR4水平较低, 但其在胞内水平较高^[13], 在某些刺激下, 胞内CXCR4可通过胞内转运机制易位至细胞表面参与信号转导^[14-15]。因此, 本研究中CPB血浆引起的NLC表面CXCR4水平增高也可能是通过“易位”方式完成, 而并非通过启动基因表达所致, 但这尚需进一步研究来证实。与此同时, 本研究中还观察到AMD3100对N-CPB组术后血浆引起的NLC趋化效应也有明显抑制作用, 这提示一些非CPB因素, 如手术创伤、应激、抗凝和心脏暴露等, 也可能在一定程度上激活CXCR4信号转导。此外, AMD3100处理并未能将CPB组术后血浆对NLC的趋化作用完全恢复至术前水平, 提示CPB血浆对NLC的趋化效应增强, 可能还涉及CXCR4以外的信号通路。

CXCR4属于典型的具有七次跨膜区段的G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCR), 其本身并不具有内在激酶活性, 但拥有多位点丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化潜能。在经典的SDF-1/CXCR4信号通路转导过程中, 丝氨酸磷酸化起着关键作用, 其导致CXCR4受体向胞内移位并触发下游信号转导过程^[16], 在调节干细胞定向迁移等过程中发挥着至关重要的作用^[17]。研究发现, CXCR4胞内C-端多个丝氨酸位点磷酸化过程参与CXCR4信号转导^[18], 其中339位点的丝氨酸磷酸化更是直接参与心肌梗死后心肌祖细胞向梗死部位的定向迁移过程^[17]。本研究中, CPB血浆可引起类中性粒细胞CXCR4磷酸化水平显著升高, 而N-CPB血浆则不具有这一效应。结合CXCR4蛋白质与mRNA水平的

变化规律, 表明CPB血浆引起NLC趋化能力的增强, 主要是通过受体的胞内易位和磷酸化水平升高引起, 与基因表达水平变化关系并不密切。动物实验发现, CPB模型鼠血浆、肺组织以及肺泡灌洗液中SDF-1和CXCR4水平均出现显著升高^[8], 这与本研究的结果可以相互印证。虽然, 传统观点认为SDF-1与CXCR4在多数情况下具有特异性的配体与受体关系, 因而构成SDF-1/CXCR4信号通路。但是, 也有研究证实, CXCR4还可能存在其他非特异性配体, 如巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)、CXC趋化因子配体14(CXC chemokine ligand 14, CXCL14)等^[19-20]。因此, CPB血浆引起的CXCR4信号通路激活进而介导NLC趋化效应增强, 究竟是仅通过SDF-1/CXCR4信号通路, 还是有其他配体共同参与激活CXCR4信号通路, 以及各自作用的大小, 有待于进一步研究。

目前已经公认, 体外循环引起中性粒细胞在肺部的大量聚集和隔离, 是CPB后急性肺损伤的关键因素^[5]。本研究结果提示, 这一过程与CXCR4信号通路激活有关。通过干预CXCR4信号通路的激活或阻断其下游信号转导来调控中性粒细胞的运动, 有可能成为处理CPB所致急性肺损伤的潜在策略。

但是, 本研究重点关注CXCR4蛋白质及其磷酸化水平的改变, 尚不能清楚解释CXCR4参与体外循环条件下中性粒细胞迁移的具体调节过程和信号转导机制, 也未关注CXCR4上游或下游信号通路的变化情况。基于本研究的临床血液样本量受限, 本课题组计划设计CPB动物实验模型来全面探讨这一信号转导过程及其机制。

综上所述, 体外循环血浆可以通过增加类中性粒细胞CXCR4蛋白质和其磷酸化水平, 激活CXCR4信号通路, 导致类中性粒细胞趋化能力增强。这一机制可能与体外循环中中性粒细胞向肺部或其他血管外组织浸润有关。

参考文献 (References)

- 1 de Mendonça-Filho HT, Pereira KC, Fontes M, Vieira DA, de Mendonça ML, Campos LA, *et al.* Circulating inflammatory mediators and organ dysfunction after cardiovascular surgery with cardiopulmonary bypass: a prospective observational study. *Crit Care* 2006; 10(2): R46.
- 2 Shi S, Chen C, Zhao D, Liu X, Cheng B, Wu S, *et al.* The role of plasma gelsolin in cardiopulmonary bypass induced acute lung injury in infants and young children: a pilot study. *BMC*

- Anesthesiol 2014; 14: 67.
- 3 Rong LQ, Di FA, Gaudino M. Acute respiratory distress syndrome after cardiac surgery. *J Thorac Dis* 2016; 8(10): E1177-86.
 - 4 Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 2003; 24(6): 327-34.
 - 5 Al Jaaly E, Zakkar M, Fiorentino F, Angelini GD. Pulmonary protection strategies in cardiac surgery: are we making any progress? *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 416235.
 - 6 Xinwei S, Huaqi Y, Huicheng X. 17 β -estradiol promotes chemotaxis migration of bone mesenchymal stem cells by up-regulating CXCR4. *J Third Mil Med Univ* 2014; 36(7): 664-8.
 - 7 Pawig L, Klasen C, Weber C, Bernhagen J, Noels H. Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives. *Front Immunol* 2015; 6: 429.
 - 8 Shi H, Lu R, Wang S, Chen H, Wang F, Liu K. Effects of SDF-1/CXCR4 on acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass. *Inflammation* 2017; 40(3): 937-45.
 - 9 Carrigan SO, Wepler AL, Issekutz AC, Stadnyk AW. Neutrophil differentiated HL-60 cells model Mac-1 (CD11b/CD18)-independent neutrophil transepithelial migration. *Immunology* 2005; 115(1): 108-17.
 - 10 Koyama S, Narita E, Suzuki Y, Taki M, Shinohara N, Miyakoshi J. Effect of a 2.45-GHz radiofrequency electromagnetic field on neutrophil chemotaxis and phagocytosis in differentiated human HL-60 cells. *J Radiat Res* 2015; 56(1): 30-6.
 - 11 Sheng X, Zhong H, Wan H, Zhong J, Chen F. Granulocyte colony-stimulating factor inhibits CXCR4/SDF-1 α signaling and overcomes stromal-mediated drug resistance in the HL-60 cell line. *Exp Ther Med* 2016; 12(1): 396-404.
 - 12 Sun Y, Zhu P, Zhou P, Guo Y, Zheng SY. Intra-operative device closure of perimembranous ventricular septal defect without cardiopulmonary bypass under guidance of trans-epicardial echocardiography: a single center experience. *J Cardiothorac Surg* 2016; 11(1): 83-7.
 - 13 Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 2003; 19(4): 583-93.
 - 14 Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, He M, Suzuki T, *et al.* The increase in surface CXCR4 expression on lung extravascular neutrophils and its effects on neutrophils during endotoxin-induced lung injury. *Cell Mol Immunol* 2011; 8(4): 305-14.
 - 15 Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, *et al.* Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997; 3(12): 1369-75.
 - 16 Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, *et al.* Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood* 2003; 101(2): 399-406.
 - 17 Zuo K, Kuang D, Wang Y, Xia Y, Tong W, Wang X, *et al.* SCF/c-kit transactivates CXCR4-serine 339 phosphorylation through G protein-coupled receptor kinase 6 and regulates cardiac stem cell migration. *Sci Rep* 2016; 6: 26812.
 - 18 Mueller W, Schütz D, Nagel F, Schulz S, Stumm R. Hierarchical organization of multi-site phosphorylation at the CXCR4 C terminus. *PLoS One* 2013; 8(5): e64975.
 - 19 van der Vorst EP, Döring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in cardiovascular diseases: functional differences and similarities. *Front Immunol* 2015; 6: 373.
 - 20 Collins PJ, McCully ML, Martínez-Muñoz L, Santiago C, Wheeldon J, Caucheteux S, *et al.* Epithelial chemokine CXCL14 synergizes with CXCL12 via allosteric modulation of CXCR4. *FASEB J* 2017; 31(7): 3084-97.