

# 库存全血血浆中性粒细胞肽和弹性蛋白酶含量的动态观察

王永杰, 李晓洲, 骆晓梅, 徐 涛, 陶征中, 周 军, 张育才

(解放军第97医院, 江苏徐州 221004)

**[摘要]** 目的 观察血库常规保存的全血不同保存时间血浆中性粒细胞肽(HNP)和中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)含量的动态变化, 探讨不同保存时间对多形核中性粒细胞(PMN)稳定性的影响。方法 使用ELISA夹心法, 对36名健康献血者新鲜血浆和血库常规保存的9份全血不同保存时间血浆HNP和NE含量进行了定量测定。结果 36名健康献血者血浆HNP和NE含量分别为 $(46 \pm 48)$  ng/ml和 $(35 \pm 28)$  ng/ml; 常规保存的9份全血随保存时间的延长血浆HNP和NE含量逐渐升高, 保存到10天时的全血血浆HNP浓度和保存到15天时的全血血浆NE浓度 $(77 \pm 43)$  ng/ml与第1天相比升高显著( $P < 0.01$ ), 且HNP和NE之间的含量变化呈正相关( $r = 0.96, P < 0.01$ )。结论 库存全血血浆中HNP和NE随保存时间延长含量增加, 可能是PMN胞浆成分逐渐进入血浆所致。

**[关键词]** 中性粒细胞肽; 弹性蛋白酶; 全血

中图分类号: R457 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)01-0007-03

## Dynamic observation of human neutrophil peptide and neutrophil elastase contents of preserved whole plasma

WANG Yong-jie, LI Xiao-zhou, LUO Xiao-mei, XU Tao, TAO Zheng-zhong, ZHOU Jun, ZHANG Yu-cai (The 97th Hospital of PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu, China)

**[Abstract]** **Objective** To dynamic observe plasma human neutrophil peptide(HNP) and neutrophil elastase(NE) content and stability of PMN in different time of preservation. **Methods** According to the ELISA method, the HNP and NE content of 36 healthy plasma and 9 plasma of the blood bank conventional preservation were determined. **Results** The HNP contents of 36 healthy plasma were  $(46 \pm 48)$  ng/ml. The NE contents of 36 healthy plasma were  $(35 \pm 28)$  ng/ml. The HNP and NE contents of 9 plasma were increase along with the increased storage time for the blood bank conventional preservation. When saving to 10 days, there was significant difference in HNP content between the first day $[(45 \pm 42)$  ng/ml] and the 10th day $[(98 \pm 61)$  ng/ml] ( $P < 0.01$ ). When saving to 15 days, there was significant difference in NE content between the first day $[(34 \pm 27)$  ng/ml] and the 15th day $[(77 \pm 43)$  ng/ml] ( $P < 0.01$ ). HNP presented positive related to the NE( $r = 0.96, P < 0.01$ ). **Conclusion** For reason that the PMN cytoplasmic components soak into plasma gradually, the plasma HNP and NE content is increase along with the increased storage time for the blood bank conventional preservation.

**[Key words]** Neutrophil peptide; Elastase; Blood bank conventional preservation

人中性粒细胞肽(human neutrophil peptide, HNP)和中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是存在于多形核中性粒细胞(PMN)胞浆嗜天青颗粒中的主要杀菌成分。正常情况下, 血

浆中HNP和NE的浓度很低, 当PMN受到细菌或炎症因子的刺激时, HNP和NE被释放进入细胞外液, 参与机体免疫防御、炎症和病理损伤过程<sup>[1-3]</sup>。体液中HNP和NE的动态变化是临床细菌感染和炎症早期诊断的重要指标<sup>[4-6]</sup>。本文采用血库常规血液保养液在4℃条件下保存的全血, 通过ELISA法对不同保存时间内血浆中HNP和NE含量进行定量

基金项目: 江苏省高校自然科学基金研究计划项目(03KJD310237)

作者简介: 王永杰(1956-), 男, 江苏南通人, 本科, 副主任医师, 从事检验医学专业。

测定,探讨不同保存时间对PMN稳定性的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 标本采集** 从血库常规采集的新鲜全血中随机提取A、B、O血型共9袋(O型4袋,A型和B型各2袋,AB型1袋),献血者均为男性,年龄在20~25岁之间,白细胞总数等各项指标正常,使用常规血液保存液(枸橼酸盐葡萄糖聚氯乙烯塑料采血袋),每袋200 ml,在4℃条件下保存,每5天在无菌条件下从各袋中取出混合全血2 ml,4℃条件下3 000 r/min离心15 min,吸取无细胞血浆至塑料管中,-30℃冰冻保存。正常对照组36例血浆标本均来自健康献血者,每份取新鲜全血2 ml分离血浆,方法同上。

**1.2 试剂和仪器** HNP ELISA 夹心法检测试剂盒由本室研制<sup>[7]</sup>。NE ELISA 试剂盒(Bender Med Systems 公司)。全自动酶联仪(CODA 公司)。

**1.3 HNP 测定** HNP 测定方法参见文献<sup>[7]</sup>。取出已包被的反应板、待测血浆标本和HNP标准(浓度8,4,2,1,0.5,0.25,0.125 ng/ml)恢复到室温,血浆用含0.01%阳离子去垢剂(CETAB)的TBS作1:1 000倍稀释,室温放置1 h待用。除空白孔外,每

孔加入已稀释的标准或待测样本100 μl(均做复孔),反应板置37℃温育2 h,PBS-T洗4次,加入生物素化的抗HNP-单抗(0.01% CETAB的TBS稀释到0.5 μg/ml)每孔100 μl,37℃温育1 h,PBS-T洗4次,加入用含10 g/L明胶的TBS 1:4 000稀释的亲合素-HRP每孔100 μl,37℃孵育1 h,PBS-T洗4次,加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB溶液每孔100 μl,(10 mmol/L枸橼酸盐缓冲液,pH 4.7,每ml含0.25 μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和0.2 mg TMB),37℃孵育15 min,加入2.5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 μl终止反应,测定波长450 nm,参考波长600 nm,结果乘以稀释倍数。

**1.4 NE 测定** 按Systems公司提供的ELISA试剂盒说明书对标本中NE进行定量测定。

**1.5 统计学处理** 计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析法进行检验。

## 2 结果

36例健康献血者新鲜血浆HNP和NE水平分别为(46±48) ng/ml和(32±28) ng/ml。经4℃保存1~25天的9份库存全血血浆HNP和NE含量的动态变化(两次测定均值)见表1。

表1 库存全血不同保存期血浆HNP和NE含量变化( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

项目	例数	1d	5d	10d	15d	20d	25d
HNP	9	45±42	59±38	98±61*	205±82*	540±210*	783±325*
NE	9	34±27	43±32	51±31	77±43*	172±70*	279±112*

注: HNP和NE含量与第1d比较,\* $P < 0.01$

## 3 讨论

HNP是Lehrer等首先从人PMN的嗜天青颗粒中分离出来的一族具有广谱抗微生物和细胞毒活性的小分子阳离子多肽,并命名为防御素(defensins)。NE是丝氨酸蛋白酶家族的重要成员,是高效的蛋白水解酶,能降解弹性蛋白、纤维蛋白原、蛋白多糖及胶原等多种细胞外基质蛋白。HNP和NE存在于PMN胞浆嗜天青颗粒中,血浆中HNP和NE含量很低。本实验测定了36名健康献血者新鲜血浆HNP水平为(46±48) ng/ml,与Panyutich等<sup>[8]</sup>用ELISA法检测24名健康人血浆HNP水平(42±53) ng/ml基本一致;血浆NE为(32±28) ng/ml,也与本试剂盒提供的参考范围(57名健康献血者血浆NE平均值35 ng/ml)基本一致。然而,血库4℃保存1~25天的9份全血,随保存时间延长血浆HNP和NE含量逐渐升高,10天时血浆中HNP

浓度(98±61) ng/ml与第1天(45±42) ng/ml相比升高显著( $P < 0.01$ );15天时血浆中NE浓度(77±43) ng/ml与第1天(34±27) ng/ml相比升高显著( $P < 0.01$ ),且HNP和NE之间的含量变化呈正相关( $r = 0.96, P < 0.01$ )。保存25天的血浆HNP和NE平均含量分别为783 ng/ml和279 ng/ml。全血随保存时间延长血浆中HNP和NE含量逐渐升高,应是PMN胞浆成分逐渐被释放进入血浆所致。

Christopher等<sup>[9]</sup>研究了不同保存时间对血小板的影响,他们测定了61份不同保存时间(1~5天)血小板单位的血浆标本PMN激发活性发现,新鲜血浆和保存1天的(WB-PLT)血浆与对照缓冲液一样不能测出PMN激发活性,而保存2~5天的血浆标本与对照缓冲液或保存1天的血浆相比,PMN激发活性显著增加( $P < 0.05$ ),血小板保存时间与生物反应因子产生的量成正比,与输血相关急性肺损伤的发生率显著相关。

Nishiyama 等<sup>[10]</sup>应用抗- $\alpha_1$ -蛋白酶抑制剂抗体 ELISA 法测定了保存浓缩红细胞和胃切除患者输血后血浆中中性粒细胞弹性蛋白酶- $\alpha_1$ -蛋白酶抑制剂复合物浓度。保存 13 天的浓缩红细胞中 NE 含量约为 1 500  $\mu\text{g/L}$ ;胃切除患者输血组血浆 NE 含量比未输血的对照组显著升高,输入 3 个单位浓缩红细胞(200 ml/单位)可使患者血浆 NE 浓度升高约 200  $\mu\text{g/L}$ ,保存血制品中的 NE 来自裂解的 PMN。

血液保存与 HNP 的相关研究目前尚未见报道。然而,HNP 与 NE 具有三个基本的共性:它们都是存在于 PMN 胞浆嗜天青颗粒中的主要杀菌成分。PMN 通过脱颗粒或裂解被释放进入细胞外液;它们都具有很强的生物学活性,且主要通过  $\alpha_1$ -蛋白酶抑制物质形成复合物失去活性;它们都与 PMN 为主的肺部炎症密切相关。因此,我们在探讨不同保存时间对 PMN 稳定性影响的过程中,同时对血浆 HNP 和 NE 进行了定量测定。结果显示,全血在保存期间随保存时间延长血浆 HNP 含量也逐渐升高,且与 NE 含量变化成正相关。

大量的研究资料表明,HNP、NE 浓度和酶活性与临床上急性肺损伤的发生密切相关。Lee 等<sup>[11]</sup>观测 23 例成人呼吸窘迫综合征(ARDS)患者和 55 例非 ARDS 患者,发现 ARDS 患者的支气管肺泡灌洗液(BALF)中 NE 的活性明显增加。给仓鼠气管内滴注 NE 可引起出血性肺水肿伴有 PMN 浸润进而发展为肺气肿<sup>[2]</sup>。给动物应用 NE 引起急性肺损伤的病理生理学改变,包括肺间质和肺泡水肿、肺泡内出血和 PMN 浸润等<sup>[12]</sup>。相似的研究发现,ARDS 患者的 BALF 中 HNP 均高于健康志愿者。向小鼠气管内滴入高浓度的中性粒细胞防御素(5~30 mg/kg),可引起小鼠肺内渗透性增加,PMN 聚集等急性肺炎炎症及功能紊乱表现<sup>[1]</sup>。因此,HNP、NE 浓度和酶活性增加被认为是引起急性肺损伤的病理生理学改变的重要机制,是脓毒血症、ARDS 等疾病重要诱因之一。

总之,本研究结果表明,血库常规保存的全血血浆中 HNP 和 NE 随保存时间的延长而增加,且可能对受血者产生不良反应。由此认为,血液的保存应尽

量去除血制品中的 PMN 和缩短保存时间,以减少输血不良反应的发生。

## 参考文献

- [1] Zhang H, Porro G, Orzech N, et al. Neutrophil defensins mediate acute inflammatory response and lung dysfunction in dose-related fashion[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(5): 947-954.
- [2] 王殿华, 刘旭. 中性粒细胞弹性蛋白酶与急性肺损伤[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2004, 24(6): 368-370.
- [3] 沈乐武. 人类生物防御素与肺部炎症性疾病[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2002, 22(4): 197-200.
- [4] Spencer LT, Paone G, Kerin PM, et al. Role of human neutrophil peptides in lung inflammation associated with  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(3): 514-520.
- [5] Frass O M, Bühlhng F, Täger M, et al. Antioxidant and antiprotease status in peripheral blood and BAL fluid after cardiopulmonary bypass[J]. *Chest*, 2001, 120(5): 1599-1608.
- [6] 王永杰, 张育才, 巩新建, 等. 体外循环围手术期患者血浆中性粒细胞肽和弹性蛋白酶的动态观察 [J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(6): 422-424.
- [7] 王永杰, 骆晓梅, 李晓洲, 等. 检测人中性粒细胞防御素 ELISA 法的建立及初步应用 [J]. *临床检验杂志*, 2005, 23(6): 421-422.
- [8] Panyutich AV, panyutich EA, Krapivin VA, et al. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis [J]. *J Lab Clin Med*, 1993, 122(2): 202-207.
- [9] Christopher CS, Lynn KB, Zahra M, et al. Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors [J]. *Blood*, 2003, 101(2): 454-462.
- [10] Nishiyama T, Hanaoka K. Do the effects of a protease inhibitor, ulinastatin, on elastase release by blood transfusion depend on interleukin 6 [J]? *Crit Care Med*, 2001, 29(11): 2106-2110.
- [11] Lee CT, Fein AM, Lippmann M, et al. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 1981, 304(4): 192-196.
- [12] Tomashefski Jr JF. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome [J]. *Clin Chest Med*, 2000, 21(3): 435-466.

(收稿日期: 2007-09-20; 修回日期: 2007-12-17)

(本文编辑 潘雪飞)