

• 论 著 •

低氧血症新生儿循环内皮细胞数量的变化及其临床意义*

龙海锋¹, 梁肖云¹, 顾晓琼^{1△}, 张 喆¹, 张 媛¹, 尹玉萍²

(1. 广州市妇女儿童医疗中心临床检验部, 广东 510623; 2. 广州医科大学, 广东广州 510182)

摘要:目的 探讨低氧血症新生儿外周血循环内皮细胞(CECs)水平变化及其临床意义。方法 采用 Hladovec 计数法测定 40 例不同程度缺氧的低氧血症患儿(低氧血症组)及 20 例血氧分压正常的健康新生儿(对照组)外周血 CECs 数量。结果 低氧血症组 CECs 为 $(0.910 \pm 0.422) \times 10^6/L$ 与对照组比较, 高于对照组的 $(0.180 \pm 0.100) \times 10^6/L$, 差异有统计学意义($t=7.539, P<0.05$); 中度低氧血症组 CECs 为 $(1.140 \pm 0.135) \times 10^6/L$, 高于轻度低氧血症组的 $(0.540 \pm 0.127) \times 10^6/L$, 差异有统计学意义($t=13.43, P<0.05$); 重度低氧血症组 CECs 为 $(1.660 \pm 0.114) \times 10^6/L$, 高于中度低氧血症组的 $(1.140 \pm 0.135) \times 10^6/L$, 差异有统计学意义($t=7.698, P<0.05$)。结论 外周血 CECs 数量可反映低氧血症患儿缺氧严重程度, 可作为低氧血症的早期诊断指标, 为临床早期诊断、病情判断及疗效评估提供新的判断依据。

关键词: 循环内皮细胞; 低氧血症; 新生儿

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)03-0294-02

Number changes of circulating endothelial cells in neonatal hypoxemia and its clinical significance*

Long Hai Feng¹, Liang Xiaoyun¹, Gu Xiaojiong^{1△}, Zhang Zhe¹, Zhang Yuan¹, Yin Yeping²

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China; 2. Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510182, China)

Abstract: Objective To explore changes in circulating endothelial cells(CECs) numbers in neonatal hypoxemia and its clinical significance. Methods Hladovec method was used to measure the quantity of CECs in 40 cases of neonatus with different degree of hypoxemia(hypoxemia group), and 20 matched healthy newborns were enrolled as control group. Results The numbers of CECs in hypoxemia group were much more than those in control group, and the difference was statistically significant. Meanwhile, there were significant differences in CECs numbers between moderate group and mild group($t=13.43, P<0.05$), as well as moderate group and severe group($t=7.698, P<0.05$). Conclusion The quantity of circulating ECEs in hypoxic neonatus is correlated with the hypoxic severity, which may be used as early diagnostic indicator for hypoxemia, and could provide new scientific evidences for early diagnosis, illness judgment and curative effect evaluation.

Key words: circulating endothelial cells; hypoxemia; neonatus

新生儿期是指自胎儿娩出后脐带结扎时开始至出生后 28 d 之前。在此期间, 胎儿身体各器官发育尚不成熟, 适应外界环境能力差, 极易患各种疾病, 病死率高; 低氧血症则是其中最常见病理表现之一。低氧血症是指由于中枢神经系统疾患及支气管、肺病变等通气和(或)换气功能障碍, 而引起的血液中含氧不足, 动脉血氧分压(PaO₂)低于同龄人正常下限时的病理状态, 主要表现为血氧分压与血氧饱和度下降。由于脑细胞对缺氧极其敏感, 持续的缺氧可对大脑产生不可逆损伤, 因此早期诊断低氧血症, 对于临床抢救危重症患儿, 尤其是早产儿、极低出生体质量儿具有重要意义^[1]。本研究旨在通过计数 40 例不同缺氧程度的低氧血症患儿外周血中循环内皮细胞(CECs)数量, 初步探讨低氧血症新生儿外周血中 CECs 水平与缺氧程度的联系及其临床意义, 从而为新生儿缺氧的有效诊断、治疗及预后判断提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 7~10 月于广州市妇女儿童医疗中心珠江新城院区新生儿科就诊的低氧血症新生儿 40 例, 其中男 24 例, 女 16 例, 年龄为 1~25 d。参考急性呼吸窘迫综合征(ARDS)柏林定义, 将患儿按氧合指数(PaO₂/FiO₂)分轻度低氧血症组(轻度组, $n=20$)、中度低氧血症组(中度组, $n=15$)和重度低氧血症组(重度组, $n=5$), 各组 PaO₂/FiO₂ 水平

分别为 200~300 mm Hg、100~<200 mm Hg、<100 mm Hg^[2]。另外选取本院同期血氧分压正常(PaO₂/FiO₂>300 mm Hg)的健康新生儿 20 例作为对照组, 其中男 11 例, 女 9 例, 年龄为 1~23 d。低氧血症组与对照组在年龄及性别方面的差异无统计学意义($P>0.05$)。用紫头采血管(含 EDTA-K₂)采集各受试者静脉血 5 mL, 排除存在溶血、浑浊等影响因素的标本。

1.2 主要试剂 二磷酸腺苷(ADP)购自普利生公司, 山羊血清购自北京鼎国生物技术有限责任公司, 兔抗人 CD34 抗体购自上海沪尚生物科技有限公司。

1.3 方法 Hladovec 计数法计数外周血 CECs。(1)内皮细胞的分离: 将采集的抗凝血标本离心 20 min(3 150 r/min), 收集上清液; 将 0.1% ADP 溶液 0.2 mL 加入上清液中, 振荡 2 min; 离心 20 min(3 150 r/min), 将离心后所获之上清液以 4 450 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集的沉淀物即为 CECs; 将 0.1 mL 生理盐水加入沉淀物中, 振荡重悬后备检^[3]。(2)计数 CECs: 将重悬液充分混匀, 取 1 滴加入血细胞计数池内, 光学显微镜下计数 9 个大方格中的 CECs 数量。同一标本计数 4 次, 取其平均值作为 CECs 检测结果, $CECs=9$ 个大方格的细胞数/0.9 μL ^[3]。(3)内皮细胞的鉴定: 采用免疫组化的方法检测 CD34 抗体相关抗原^[4]。将分离好的内皮细胞均匀涂布于

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目资助(S2013010012520)。

作者简介: 龙海锋, 男, 检验技师, 主要从事临床检验基础的研究。

△ 通讯作者, E-mail: guxiaojiong@163.com。

一洁净玻片上,用 95%酒精固定 15 min,晾干待检。PBS 漂洗 3 次,经 0.1% Triton 破膜 10 min,用 PBS 洗 3 次,浓度为 50 mmol/L 甘氨酸淬灭 20 min; PBS 洗 3 次,山羊血清封闭 1 h, PBS 洗 3 次,然后加入稀释(1:200)CD34 抗体,4℃湿盒过夜;用 PBS 洗 3 次。滴加二抗,室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次。加入 DAPI,反应 15~20 min; PBS 洗 3 次。在荧光显微镜下观察并拍照。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Pearson 相关分析进行相关性分析。

2 结 果

2.1 CECs 免疫荧光染色鉴定结果 免疫荧光染色结果显示,未加一抗的实验对照组未发现荧光染色细胞;荧光染色实验组镜下可见荧光染色细胞,内皮细胞 CD34 抗体相关抗原呈阳性反应,细胞胞浆中有黄绿色的荧光着色,整个细胞轮廓清楚。确定分离得到的细胞为 CECs,见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 低氧血症组与对照组 CECs 比较 统计学分析显示,低氧血症组 CECs 数量多于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 低氧血症组和对照组 CECs 数量比较

分组	<i>n</i>	CECs($\times 10^6/L$)
低氧血症组	40	0.91 ± 0.422
对照组	20	0.18 ± 0.100

2.3 各低氧血症亚组 CECs 数量的比较 中度低氧血症组 CECs 数量多于轻度低氧血症组,重度低氧血症组多于中度低氧血症组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。Pearson 相关分析显示,低氧血症患儿 CECs 数量与缺氧程度呈正相关 ($r = 0.954, P < 0.05$)。

表 2 重度低氧血症组、中度低氧血症组与轻度低氧血症组 CECs 比较

分组	<i>n</i>	CECs($\times 10^6/L$)
轻度低氧血症组	20	0.54 ± 0.127
中度低氧血症组	15	1.14 ± 0.135
重度低氧血症组	5	1.66 ± 0.114

3 讨 论

目前临床上用于评价血管损伤的方法主要分为有创和无创两大类,有创的检测方法包括冠状动脉造影,即观察冠状动脉对乙酰胆碱所诱发的内径变化,这种方法创伤性大,不适于疾病早期阶段观察,且仪器要求较高。无创的检测方法包括血管超声检测肱动脉血流介导的内皮依赖性血管舒张功能(FMD)、颈动脉中膜厚度(IMT)、臂踝脉搏波传导速度(baPWV)、踝臂指数(ABI)、中心动脉压(CAP)、增强指数(AI)、大动脉弹性指数(C1)和小动脉弹性指数(C2)等。这些方法虽具有安全、实时、无创等优点,但对设备要求高。因此,探寻一种新的无创性血管损伤评价标志物迫在眉睫^[5]。本课题采用的外周血 CECs 计数具有无创性、取材方便、操作简便、灵敏度高、结果直观等特点,为病理情况下非创伤性评价血管内皮情况开辟了新的路径。

CECs 由受损的血管内皮细胞脱落于外周血形成,在健康人外周血中数量极少。当机体发生缺氧时,血流动力学会发生明显变化,使得机体某些脏器出现相应病理改变,导致血管内皮受损,进而引起一系列级联反应,如组织因子表达增加,上调内皮细胞黏附分子,白细胞黏附、移行,血管内皮细胞变性、坏

死,并脱落进入血循环,进而形成 CECs^[6]。多项研究表明,在炎症、免疫应答、心血管疾病等情况下,CECs 数量明显增加,且由于决定 CECs 水平的因素较为单一,基本只受血管内皮损伤的影响^[5],因此可作为敏感、特异的指标直接反映血管内皮的损伤程度^[7]。目前,CECs 被认为是唯一一种直接研究活体血管内皮损伤的非创伤性指标,其在探索活体血管内皮的特性和功能、协助诊断相关疾病、判断病情以及疗效评估等方面的应用受到越来越广泛的关注。

本研究采用了 Hladovec 法对血浆中的 CECs 进行分离,其原理是利用血液中各细胞成分的不同比重,用不同的离心力从血浆中分离出 CECs。本法的优势在于对实验室条件要求简单,仅需离心机、血细胞计数板、ADP 等简单的器材和试剂,在一般实验室均可完成,从某种程度上极大地促进和推动了 CECs 研究在临床上的应用。

免疫荧光检测是鉴定 CECs 的最可靠的方法^[8]。CECs 表现为 CD34⁺^[9]。实验中为证实本研究检测到的是 CECs。本研究对涂片中的细胞进行了间接免疫荧光检测,荧光染色结果显示内皮细胞的黄绿色特异性荧光位于细胞的膜和胞浆,表明所观察到的免疫荧光细胞是 CECs。

本研究通过计数 40 例不同缺氧程度的低氧血症新生儿外周血 CECs 数量发现,健康新生儿外周血中仅存在极少量 CECs,而低氧血症患儿外周血 CECs 水平显著高于健康新生儿,且 CECs 水平随缺氧程度的加重而显著增加,表明外周血 CECs 增多可作为血管内皮损伤的重要病理学特征。本研究结果提示,新生儿外周血 CECs 检测可能作为低氧血症的早期诊断指标,为临床早期诊断、病情判断及疗效评估提供新的科学依据。

本次研究收集的重度低氧血症患儿样本数较少,下一步本课题组将扩大样本量,针对低氧血症患儿进行跟踪随访,对 CECs 与缺氧程度的相关性进行更深入的研究。随着对 CECs 研究的逐渐深入,它在内皮损伤的非侵袭性研究及临床应用方面将会显现出更大的价值。

参考文献

- [1] 张伟群. 新生儿缺氧缺血性脑病多器官损伤及预后影响因素分析[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(2): 89-90.
- [2] Ferguson ND, Fan E, Camporota L, et al. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material[J]. Intensive Care Med, 2012, 38(10): 1573-1582.
- [3] 周雅娟. 川崎病外周血循环内皮细胞水平变化与冠状动脉损伤关系的探讨[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010: 7-8.
- [4] 李宏伟, 王春玲, 修瑞娟. 人循环内皮细胞的分离和鉴定[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(6): 640-643.
- [5] 关键, 王国干. 内皮功能检测及临床意义[J]. 医学综述, 2007, 13(15): 1197-1199.
- [6] Hunting CB, Noort WA, Zwavinga JJ. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization [J]. Vox Sang, 2005, 88(1): 1-9.
- [7] Segal MS, Bihorac A, Koç M. Circulating endothelial cells: tea leaves for renal disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(1): F11-F19.
- [8] 常永超, 王清江, 刘素琴, 等. 新生猪缺氧模型中循环内皮细胞观察[J]. 洛阳医学专报, 2001, 19(3): 186-187.
- [9] 王春玲, 张琦, 李俊秋, 等. 循环内皮细胞的研究及进展[J]. 中国医药导刊, 2009, 12(2): 195-196.