

# TRALI 相关致病因子在输血患者中的表达分析\*

俞露<sup>1</sup> 许德义<sup>1</sup> 贺云蕾<sup>1</sup> 邓刚<sup>1</sup> 陆少燕<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:观察多次输血患者、输血相关性急性肺损伤(TRALI)疑似患者和健康献血者3个队列的TRALI相关致病因子,探讨TRALI的发病机制。方法:选取54例输血患者(多次输血患者27例,TRALI疑似患者27例)的外周血标本,另选36例正常献血者的外周血作为对照。用流式细胞仪检测多形核中性粒细胞(PMN)表面CD11a与CD11b抗原的分布与表达,用ELISA法检测外周血细胞间黏附分子-1(ICAM-1)蛋白含量。结果:与TRALI疑似患者、多次输血患者相比,献血者(97.50%±1.68%)PMN含CD11a和CD11b抗原的阳性率均显著高于TRALI疑似患者(79.37%±18.57%)和多次输血患者(87.93%±8.91%),差异有统计学意义( $P=0.0036$ ,  $P=0.0022$ )。与献血者(64.39±21.08 ng/mL)比较,TRALI疑似患者血浆中ICAM-1蛋白含量(99.69±28.10 ng/mL)相对较高,差异有统计学意义( $P=0.0024$ );而多次输血患者(85.41±35.54 ng/mL)与献血者比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:本研究发现献血者人群PMN细胞的CD11b激活状态比例较高,而多次输血患者和TRALI疑似患者的PMN细胞可能由于炎症因子等因素干扰逐渐丧失CD11a和CD11b抗原活性。此外,PMN的致敏黏附聚集和ICAM-1参与的炎症反应有关。

**[关键词]** 输血相关性急性肺损伤;中性粒细胞;细胞间黏附分子-1

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2021.08.003

**[中图分类号]** R563.1 **[文献标志码]** A

## Analysis of TRALI related pathogenic factors expression in patients with blood transfusion

YU Lu<sup>1</sup> XU Deyi<sup>1</sup> HE Yunlei<sup>1</sup> DENG Gang<sup>1</sup> LU Shaoyan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Blood Transfusion, the Ningbo Central Blood Station, Ningbo, 315000, China; <sup>2</sup> Ningbo Yinzhou People's Hospital)

Corresponding author: DENG Gang, E-mail: 80625346@qq.com

**Abstract Objective:** To investigate the pathogenesis of transfused acute lung injury (TRALI) by observing the TRALI-related pathogenic factors in three groups among patients with multiple blood transfusions, TRALI suspect patients and healthy blood donors. **Methods:** The distribution and expression of CD11a and CD11b antigens on PMN were detected by flow cytometry. The content of ICAM-1 protein in plasma was determined by ELISA. **Results:** The positive rates of CD11a and CD11b antigens in PMN of blood donors (97.50%±1.68%) were significantly higher ( $P=0.0036$ ,  $P=0.0022$ ) than those of TRALI suspect patients (79.37%±18.57%) and multiple transfusions patients (87.93%±8.91%). Compared with the blood donors (64.39±21.08 ng/mL), the ICAM-1 protein content of the TRALI suspect patients (99.69±28.10 ng/mL) was relatively high ( $P=0.0024$ ). However, there was no significant difference between multiple transfusion patients (85.41±35.54 ng/mL) and blood donors ( $P>0.05$ ). **Conclusion:** In this study, CD11b activation rate of PMN cells in blood donors was higher, while PMN cells in multiple transfusions patients and TRALI suspected patients may gradually lose their CD11a and CD11b antigens due to inflammatory factors. In addition, the sensitized, adhesion and aggregation of PMN may be related to the inflammatory reaction involving ICAM-1.

**Key words** transfusion-related acute lung injury; neutrophils; intercellular adhesion molecule-1

输血相关性急性肺损伤(transfusion-related acute lung injury, TRALI)一般指在输注血液制剂后6h内出现,以急性非心源性肺水肿、低氧血症为主要临床表现的急性呼吸窘迫综合征,是导致输血相关性死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。在国内,TRA-

LI由于其诊断标准尚未确定、流行病学资料不完善等原因,尚未引起广泛关注,对其报道和临床研究较少,故临床误诊、漏诊率较高。目前关于TRALI确切的发病机制尚不十分清楚。

因为TRALI是急性肺损伤的一种形式,并且在临床上与急性呼吸窘迫综合征相似,推断其有相似的发病机制,同时TRALI一般是由输血导致的,其外周血临床指标与多次输血的患者也应有一定相关性。本研究结合多次输血患者、TRALI疑似患者和健康献血者3个队列的外周血多形核中

\*基金项目:浙江省血液安全研究重点实验室开放基金(No: 2018KF03);宁波市医学科技计划项目(No: 2018A15)

<sup>1</sup>宁波市中心血站输血研究所(浙江宁波,315000)

<sup>2</sup>宁波市鄞州人民医院

通信作者:邓刚, E-mail: 80625346@qq.com

性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophils, PMN) 表面 CD11a、CD11b 抗原分布和细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 蛋白含量等 TRALI 相关致病因子探讨 TRALI 的发病机制, 现报告如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 对象

随机选取 2020 年 1 月—6 月在我站多次申请血小板 (5 次以上) 的患者 27 例, 在宁波市鄞州人民医院呼吸科就诊的 TRALI 疑似患者 27 例, 以及我站 36 例献血者作为正常对照, 年龄 18~55 岁。采用流式细胞检测其外周血标本: 多次输血患者 14 例 (男 7 例, 女 7 例); TRALI 疑似患者 14 例 (男 7 例, 女 7 例); 献血者 25 例 (男 12 例, 女 13 例)。采用 ICAM-1 蛋白含量检测外周血标本: 多次输血患者 13 例 (男 7 例, 女 6 例); TRALI 疑似患者 13 例 (男 7 例, 女 6 例); 献血者 11 例 (男 6 例, 女 5 例)。文中 TRALI 疑似患者的定义为: 在输血过程中或输血后 6 h 内发生呼吸困难等疑似 TRALI 症状, 需排除心源性肺水肿及容量过负荷。抽取患者和献血者 EDTA 抗凝全血标本 5 mL/人份, 血细胞 3 d 内用于流式细胞分析, 剩下的标本经离心分离血浆于 -20℃ 冻存备用。

#### 1.2 试剂与仪器

Sunrise 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。人 ICAM-1 蛋白 ELISA 试剂盒 (美国 R&D 公司, LOT: P210639), CD11a-FITC (美国 BD 公司, LOT: 9070768), CD11b-PE (美国 BD 公司, LOT: 9204345)。

#### 1.3 流式细胞仪检测表面 CD11a 与 CD11b 抗原的分布与表达

取抗凝全血 100  $\mu$ L 加入 FITC 标记的抗 CD11a 单抗 5  $\mu$ L 和 PE 标记的抗 CD11b 单抗 5  $\mu$ L 混匀后室温避光反应 15 min, 进行直接免

疫荧光染色。然后加红细胞裂解液 1 mL, 涡旋混匀后置室温避光反应 10 min, 以裂解红细胞。再离心 (1500 r/min, 5 min), 弃上清液, PBS 洗 2 次。最后, 弃上清后加入 400  $\mu$ L PBS 悬浮细胞, 上机测定 CD11a 与 CD11b 的表达量。在 FSC-SSC 散点图上, 设门于 PMN 区, 每个样本计数 10 000 个 PMN 细胞, 并分析其 CD11a 与 CD11b 的表达。结果用 % 表示 CD11a 与 CD11b 均阳性的细胞。

#### 1.4 ELISA 检测外周血 ICAM-1 蛋白

按试剂盒说明书操作, 简单步骤如下: 将标准品倍比稀释后与待检样品分别加入酶标板的孔中, 另外设空白孔 1 孔, 37℃ 孵育 30 min, 洗涤后加入酶标试剂 (空白孔不加), 37℃ 孵育 30 min, 洗涤后加入显色剂 A 和 B, 37℃ 避光显色 15 min 后加终止液终止反应, 最后以空白调零, 450 nm 波长检测各孔吸光度。先制作标准曲线, 然后根据标准曲线公式, 推算样品的原始浓度。

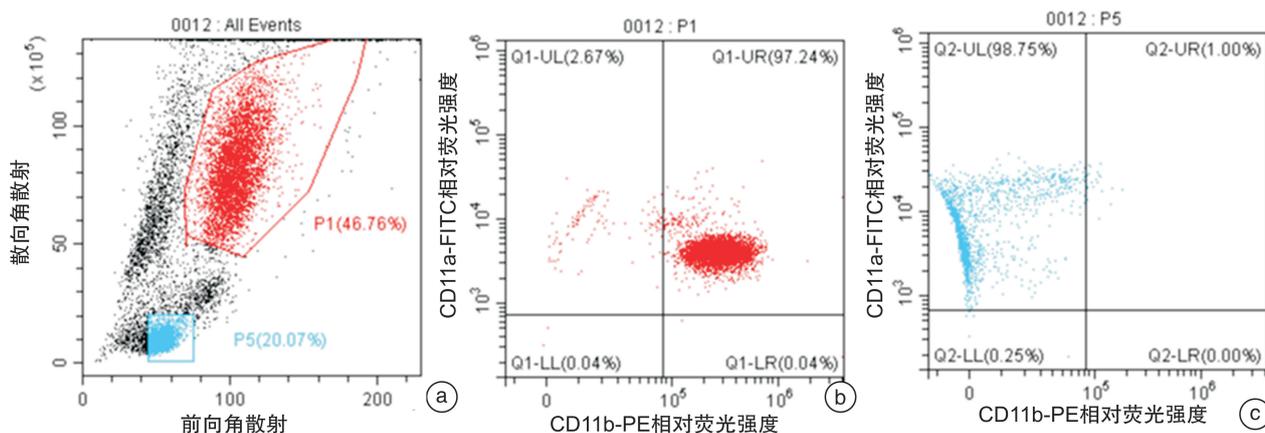
#### 1.5 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并使用 Graphpad prism6 软件进行统计分析和制图。使用独立样本 *t* 检验分别比较 3 者之间的差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 中性粒细胞表面 CD11a 与 CD11b 抗原分布

在 FSC-SSC 散点图上, 将 PMN 区设为门 P1, 淋巴细胞区设为门 P5 (图 1a), 分析 P1 门中的细胞分布, 横纵坐标轴分别为 CD11a-FITC 和 CD11b-PE, 另设只加入单一荧光抗体的细胞为补偿管, 调整电压和补偿后, 调整十字门的位置如图 1b 所示, 将细胞来源改为 P5, 则可分析 P5 门中的细胞分布, 如图 1c 所示。符合在通常情形下, CD11a 几乎所有白细胞中表达, 而 CD11b 则主要在单核细胞、粒细胞表面表达, 而淋巴细胞表面几乎不存在。



a: 外周血细胞前向角与侧向角散射分布; b: P1 门内细胞 CD11a、CD11b 相对荧光强度分布; c: P5 门内细胞 CD11a、CD11b 相对荧光强度分布。

图 1 流式细胞仪分析图

分析 25 例献血者、14 例 TRALI 疑似患者和 14 例多次输血患者的 PMN 含 CD11a 和 CD11b 抗原的阳性率,其中献血者 ( $97.50\% \pm 1.68\%$ ) 与 TRALI 疑似患者 ( $79.37\% \pm 18.57\%$ )、多次输血患者 ( $87.93\% \pm 8.91\%$ ) 比较,PMN 含 CD11a 和 CD11b 抗原的阳性率均显著高于 TRALI 疑似患者和多次输血患者,差异有统计学意义 ( $P=0.0036, P=0.0022$ ),见图 2。

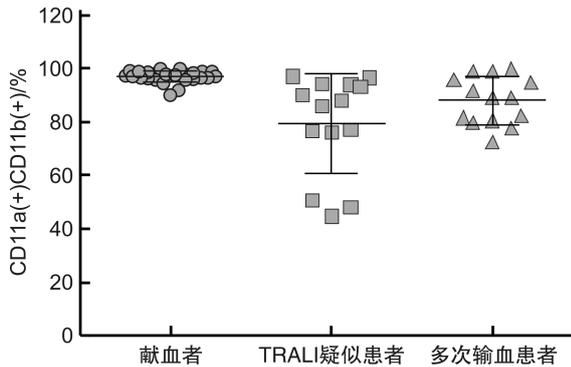


图 2 输血患者 PMN 中 CD11a 与 CD11b 抗原阳性率分布

## 2.2 血浆中 ICAM-1 蛋白含量

分析了 11 例献血者、13 例 TRALI 疑似患者和 13 例多次输血患者血浆中的 ICAM-1 蛋白含量,与献血者 ( $64.39 \pm 21.08$  ng/mL) 相比,TRALI 疑似患者 ( $99.69 \pm 28.10$  ng/mL) 相对较高,差异有统计学意义 ( $P=0.0024$ );而多次输血患者 ( $85.41 \pm 35.54$  ng/mL) 与献血者比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见图 3。

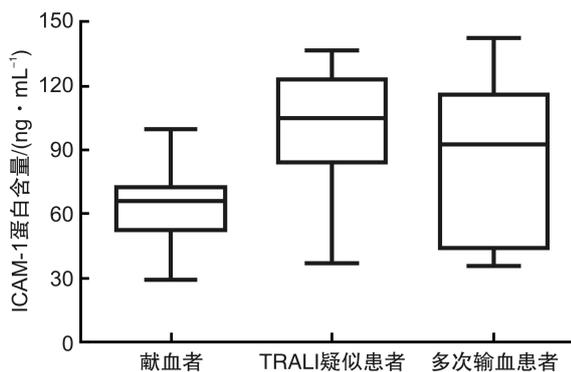


图 3 输血患者血浆中 ICAM-1 蛋白含量分布

## 3 讨论

TRALI 是输血反应常见的致死原因之一,死亡率  $5\% \sim 8\%$ <sup>[2]</sup>,主要分为抗体介导的和非抗体介导的 TRALI。对于抗体介导的 TRALI,其免疫机制比较认可的是“抗原-抗体”学说,输血后不同的抗体通过不同的途径激活内皮细胞、单核细胞、血小板和淋巴细胞诱发 TRALI。而对于非抗体介

导 TRALI 的发病机制主要包括:供体血液制品中细胞衍生物质积累<sup>[3]</sup>和血液制剂本身的贮存损伤,此外还有二次打击模型和阈值模型<sup>[4]</sup>。

PMN 致敏在 TRALI 中的重要作用已得到证实<sup>[5]</sup>,原先能诱导 TRALI 发生的动物模型在无菌饲养下不能诱导产生 TRALI,可能就是因为 PMN 数量明显减少,加用 LPS 诱导可使 PMN 增加及致敏,随之恢复诱导 TRALI<sup>[6]</sup>。TRALI 中另一个重要的因素是血小板,而中性粒细胞胞外阻滞 (neutrophil extracellular traps, NETs) 可能是 PMN 和血小板依赖性肺损伤的潜在解释<sup>[7]</sup>。

细胞黏附分子参与了细胞的多种功能,参与细胞黏附过程的黏附分子主要包括选择素、整合素和免疫球蛋白超家族成员。其中 CD11b 属于  $\beta 2$  整合素家族,是一种表达于 PMN 表面的受体。当细胞处于静息状态时,CD11b 储存于细胞质内的三级颗粒中,在细胞表面只呈基础性低表达;而在激活状态下,CD11b 的活性和表达均会增加。本研究结果发现献血者人群中 PMN 表面含 CD11a 和 CD11b 抗原的阳性率相对较高,而多次输血患者和 TRALI 疑似患者 PMN 表面 CD11a 和 CD11b 抗原的阳性比率比献血者低很多。这似乎与之前的理论相悖,超微结构证据证明在 TRALI 患者外周血中由于 CD11b/CD18 区域的极化导致血小板在 PMN 表面聚集<sup>[8]</sup>,通过血小板消耗或者阿司匹林阻断血小板激活能改善小鼠的肺损伤<sup>[6]</sup>,由此推论献血者人群 PMN 细胞 CD11b 的激活状态比例较高,可能是血小板聚集导致,这有待进一步实验支持。

ICAM-1 又称 CD54,主要表达于内皮细胞表面,是细胞黏附分子中免疫球蛋白超家族的一员。ICAM-1 蛋白是白细胞 CD11/CD18 系统的配体,ICAM-1 的受体有 CD11a/CD18 和 CD11b/CD18。正常情况下,ICAM-1 在大多数组织内不表达或低水平表达,当其表达升高时,可与 PMN 表面的整合素相互作用,是介导 PMN 活化及与血管壁紧密黏附等炎症反应的关键分子<sup>[9]</sup>,从而促使 PMN 通过血管内皮屏障迁移至炎症区域,引起组织的过度炎症反应。ICAM-1 分为 sICAM-1 (可溶型) 和 mICAM-1 (膜型) 2 种,ICAM-1 在细胞外以可溶性细胞间黏附分子 (sICAM-1) 形式存在,sICAM-1 是由 mICAM-1 经蛋白酶裂解使细胞外成分脱落进入血液而来,检测血清中 sICAM-1 水平可反映局部 ICAM-1 的表达状况。本研究结果显示,TRALI 疑似患者组血浆 ICAM-1 含量明显比献血者组高,表明肺组织损伤会导致 ICAM-1 表达增强,而输血或多次输血与 ICAM-1 表达上调关联甚微,提示在急性肺损伤发病过程中 PMN 的致敏黏附聚集和 ICAM-1 参与的炎症反应有关。饶群等<sup>[10]</sup>通

过大鼠实验证实 TRALI 大鼠 ICAM-1 蛋白高表达可能与促进炎症因子释放,引起肺损伤有关。梁颖红等<sup>[11]</sup>研究证明 ICAM-1 和 CINC-1 参与了 TRALI 模型大鼠肺组织 PMN 与内皮细胞的黏附和聚集,可能在 TRALI 发病过程中起重要作用。

CD11a 和 CD11b 与内皮细胞上的 ICAM-1 相互作用可导致白细胞与内皮细胞的黏附并介导白细胞的移行<sup>[12]</sup>。PMN 与内皮细胞表面表达的炎症因子相接触,是否会使得 PMN 表面  $\beta 2$  整合素的表达上调,并增加其与内皮细胞配体 ICAM-1 的亲合力呢?大多数文献认为 CD11b 表达及功能对炎症早期宿主非特异性免疫功能的发挥起关键作用,CD11b 表达上调被认为是 PMN 被激活的标志。也有文献指出 CD11b 上调是炎症因子诱发的,但是这个过程在体内存在时间很短,当诱发因素没有得到有效控制,PMN 会转变为脓细胞从而失去生物学活性<sup>[13]</sup>。本研究结果中多次输血患者和 TRALI 疑似患者 CD11a 和 CD11b 抗原的阳性比率较献血者下调,提示一方面可能由于炎症因子等因素干扰,使其 PMN 细胞逐渐丧失 CD11a 和 CD11b 抗原活性;另一方面可能因为多次输血患者和 TRALI 疑似患者其本身在发病前的 CD11a 和 CD11b 抗原表达水平并不高,由于疾病导致了 CD11a 和 CD11b 抗原表达上调。

本研究结合多次输血患者、TRALI 疑似患者和健康献血者 3 个队列的 TRALI 相关致病因子探讨 TRALI 的发病机制,研究发现献血者人群 PMN 细胞的 CD11b 激活状态比例较高,而多次输血患者和 TRALI 疑似患者的 PMN 细胞可能由于炎症因子等因素干扰逐渐丧失 CD11a 和 CD11b 抗原活性。此外,ICAM-1 实验结果提示 PMN 的致敏黏附聚集和 ICAM-1 参与的炎症反应有关。

#### 参考文献

- [1] 朱傲雪. 中国献血人群中 TRALI 相关危险性分析 [D]. 华东师范大学,2013.
- [2] Ware LB,Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1334-

1349.

- [3] Babaev A,Pozzi F,Hare G, et al. Storage of Red Blood Cells and Transfusion-Related Acute Lung Injury[J]. J Anesth Crit Care,2014,1(1):00002.
- [4] 刘丽,郭建荣,金孝岷. 输血相关性急性肺损伤发病机制的研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志,2017, 38(3):253-258.
- [5] Rebetz J, Semple JW, Kapur R. The Pathogenic Involvement of Neutrophils in Acute Respiratory Distress Syndrome and Transfusion-Related Acute Lung Injury[J]. Transfus Med Hemother,2018,45(5):290-298.
- [6] Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, et al. Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury[J]. J Clin Invest,2009,119(11):3450-3461.
- [7] Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. J Clin Invest,2012, 122(7):2661-2671.
- [8] Hidalgo A, Chang J, Jang JE, et al. Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury[J]. Nat Med, 2009,15(4):384-391.
- [9] 毛景东,刘金华,丁宁,等. CD11b/CD18 对中性粒细胞功能的调控研究进展[J]. 动物医学进展,2014, 35(1):106-110.
- [10] 饶群,朱宇芳,黄华. TRALI 大鼠肺泡活化巨噬细胞及共刺激分子 CD40、ICAM-1 的表达变化分析[J]. 临床肺科杂志,2017,22(8):1407-1411.
- [11] 梁颖红,龚艳杰,刘佳,等. 输血相关急性肺损伤大鼠肺组织细胞因子诱导的中性粒细胞趋化因子的表达[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2016,15(4):379-383.
- [12] 静雅杰,宋宝辉,陈志鸿.  $\beta 2$ -整合素与白细胞黏附[J]. 牡丹江医学院学报,2009,30(6):53-55.
- [13] 杨立娜. 巨细胞病毒性肺炎儿童体内中性粒细胞表面黏附分子 CD11b 表达及临床意义[J]. 临床荟萃, 2017,32(8):703-706.

(收稿日期:2020-11-25)