

低渗对比剂碘克酸和等渗对比剂碘克沙醇对血小板和白细胞活化的影响

纪求尚¹, 李奈林², 张运¹, 刘淼¹

(1. 教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室, 山东大学齐鲁医院心内科
济南, 250012 2. 卡罗林斯卡大学医院内科临床药理实验室, 瑞典斯德哥尔摩, SE-17176)

[关键词] 全血流式细胞技术; 血小板激活; 白细胞激活; 血小板-白细胞聚集; 碘对比剂; 碘克酸; 碘克沙醇

[摘要] 目的 探讨低渗对比剂碘克酸和等渗对比剂碘克沙醇对血小板和白细胞活化的影响。方法 将水蛭素抗凝的全血分别与 0%、2%、5%、10% 不同浓度的等渗对比剂碘克沙醇和低渗对比剂碘克酸在 37℃ 温度下抚育 5 min, 用全血流式细胞技术测定血小板活化指标 P 选择素、白细胞活化指标 CD11b 以及血小板-白细胞聚集体。结果 2%、5%、10% 3 种不同浓度的碘克酸对自发的血小板 P 选择素的表达没有影响 ($P = 0.237$), 而碘克沙醇轻度增加其表达 ($P < 0.01$); 两者均显著降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 二磷酸腺苷诱导的 P 选择素表达 ($P < 0.001$), 同时也降低二磷酸腺苷刺激的血小板-白细胞聚集 ($P < 0.001$), 这一作用不受对比剂浓度的影响。无论是自发状态下, 还是在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ N-甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸刺激下, 碘克酸对白细胞活化指标 CD11b 的表达没有影响, 而碘克沙醇在两种状态下均轻度增加 CD11b 的表达 ($P < 0.05$)。碘克酸对胶原刺激血小板后诱导的 CD11b 的表达有抑制作用 ($P < 0.05$), 而碘克沙醇对此无影响; 但两者对胶原刺激的血小板-白细胞聚集体形成均有明显抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 对比剂碘克沙醇和碘克酸均能降低二磷酸腺苷刺激的血小板活化和血小板-白细胞聚集。碘克酸不影响自发的 P 选择素表达和白细胞活化, 而碘克沙醇轻度增加自发的血小板和白细胞活化。就对血小板和白细胞影响方面而言, 低渗对比剂碘克酸比等渗对比剂碘克沙醇应用更为安全。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Low Osmotic Contrast Medium Ioxaglate and Iso-osmotic Contrast Medium Iodixanol Show Different Influence on Platelet and Leukocyte Activation

Ji Qiu-Shang¹, Lin Nai-Lin², Zhang Yun¹, and Liu Miao¹

(1. Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research, Chinese Ministry of Education and Chinese Ministry of Public Health, Department of Cardiology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Department of Medicine, Clinical Pharmacology Unit, Karolinska University Hospital, SE-171 76 Stockholm, Sweden)

[KEY WORDS] Whole-Blood Flow Cytometry; Platelet Activation; Leukocyte Activation; Platelet-Leukocyte Aggregation; Contrast Medium; Ioxaglate; Iodixanol

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the effect of low osmotic contrast medium ioxaglate and iso-osmotic contrast medium iodixanol on platelet and leukocyte activation. **Methods** Heparinized whole blood was incubated with 0%, 2%, 5% and 10% concentrations of ioxaglate or iodixanol at 37°C for 5 min. Whole blood flow cytometric method was used to measure P-selectin, marker of platelet activation, CD11b, marker of leukocyte activation, and platelet-leukocyte aggregates. Blood samples were also incubated with collagen with stirring to investigate the impact of contrast medium (5% of ioxaglate or iodixanol) on platelet-leukocyte cross-talk. **Results** Ioxaglate had no effect on P-selectin expression of un-stimulated samples ($P = 0.237$), whilst iodixanol markedly increased P-selectin expression ($P < 0.01$); However, both contrast media remarkably decreased 1 $\mu\text{mol/L}$ adenosine diphosphate (ADP)-induced P-selectin expression ($P < 0.001$), and ADP-stimulated platelet-leukocyte aggregates ($P < 0.001$). Ioxaglate had effect on neither resting nor 0.1 $\mu\text{mol/L}$ N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (MLP)-stimulated CD11b expression, whilst iodixanol markedly increased both resting and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ MLP-stimulated CD11b expression ($P < 0.05$). Ioxaglate inhibited collagen-stimulated platelet-induced CD11b expression ($P < 0.05$), whilst iodixanol had no impact on platelet-leukocyte cross-talk. Both ioxaglate and iodixanol markedly reduced collagen-stimulated platelet-leukocyte aggregates ($P < 0.01$). **Conclusion** Both ioxaglate and iodixanol can reduce ADP-stimulated P-selectin expression and platelet-leukocyte aggregates. Yet, iodixanol slightly increases resting P-selectin expression, and both resting and MLP-stimulated CD11b expression. As far as the influence

[收稿日期] 2010-05-14 [修回日期] 2010-08-04

[基金项目] 瑞典心肺基金会, 瑞典研究理事会 (5930)

[作者简介] 纪求尚, 博士, 教授, 研究方向为冠心病的基础与临床研究, E-mail为 jiqiushang@yahoo.com.cn; 李奈林, 博士, 副教授, 研究方向为流式细胞技术应用, E-mail为 Nailin.L@mediska.se; 张运, 博士, 中国工程院院士, 研究方向为心血管重构和功能研究, 联系电话为 0531-82169139; E-mail为 zhangyun@sdu.edu.cn

on platelet and leukocyte activation is concerned, ioxaglate is safer than iohexanol when used clinically.

碘对比剂广泛应用于各个领域的疾病的影像学诊断和介入治疗, 其对人体健康的危害日益受到重视, 如诱发室颤、对比剂肾病 (contrast-induced nephropathy, CN)、促血栓形成等^[1-3], 尤其是对比剂肾病, 是近几年关注的重点。目前认为等渗对比剂碘克沙醇导致 CN 的风险与其它各类对比剂相当^[4-5], 但不同对比剂对人体凝血功能和炎症反应的影响, 一直存在争议^[6]。因此, 作者设计本体外试验, 探讨等渗和低渗对比剂对血小板活化、白细胞活化、血小板-白细胞聚集等方面的影响。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

21份血标本来自 21例健康人 (男 9例, 女 12例, 年龄为 22~55岁)。均签署了参加本研究的书同意书。

1.2 试剂

血小板激动剂胶原购自 Nycmed GmbH。白细胞特异激动剂 N-甲酰-甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸 (N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, MLP) 购自 Sigma 公司。对比剂碘克酸 (Hexabrix R) 和碘克沙醇 (Visipaque 320) 均受赠于 Amersham Health AB。与荧光素 FITC 共轭的抗 CD42a (GPIX) 单克隆抗体 Bebl (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 用于识别血小板。用于识别白细胞的为与荧光素 RPE 共轭的抗 CD45 单克隆抗体 T29/33 (Dakopatts AB)。血小板 P 选择素的表达是用与荧光素 RPE 共轭的抗 P 选择素单克隆抗体 AC1.2 (Becton Dickinson) 来测定, 白细胞 CD11b 的表达是用与 FITC 共轭的单克隆抗体 BEAR 1 (Immunotech) 来测定。

1.3 血样本采集和准备

采集肘静脉血 5 mL, 采血后 3 min 内置于含有 1/10 容积、200 mg/L 浓度的重组水蛭素抗凝的硅化管中。各取 200 μ L, 分别与碘克沙醇和碘克酸配成

0%、2%、5%、10% 的浓度, 在 37℃ 温度下孵育 5 min。各取 5 μ L 放到 45 μ L 包含不同荧光抗体的 HEPES 缓冲液中。样本在室温下孵育 20 min。然后稀释, 并用 0.5% 容积浓度的福尔马林液固定, 用 Coulter EPICS XL-MCL 流式细胞仪进行分析。

1.4 流式细胞仪分析

用全血流式细胞技术检测血小板和白细胞方法在以前的研究中已详细报道^[7-8]。血小板激活指标检测的是血小板表面 P 选择素, 表示为 P 选择素阳性的血小板所占百分数。白细胞 CD11b 的表达用来作为白细胞激活的指标, 表示为平均荧光强度。血小板-白细胞聚集检测方法见文献 [9]。抗凝的全血与 RPE-CD45 (白细胞标志) 单克隆抗体和 FITC-CD42a (GPIX) (血小板标志) 单克隆抗体共同孵育。首先将所有 RPE-CD45 阳性的细胞设入门内 (为所有白细胞), 再从中将 RPE-CD45 和 FITC-CD42a 同时阳性的细胞设入门内, 即为血小板-白细胞聚集体, 表示为血小板-白细胞异型结合体占总白细胞的比例。根据中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的光散射特性, 可进一步检测血小板-中性粒细胞、血小板-单核细胞和血小板-淋巴细胞聚集体。

1.5 统计学分析

资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组及以上组间比较用重复测量方差分析, 两组间比较用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 碘克沙醇和碘克酸对血小板活化的影响

碘克酸对自发的血小板 P 选择素的表达没有影响 ($P = 0.237$); 而碘克沙醇轻度增加血小板 P 选择素的表达 ($P < 0.01$)。用 1 μ mol/L 二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 刺激后, 两种对比剂均显著降低 ADP 刺激的 P 选择素表达 ($P < 0.01$)。这一作用不受对比剂浓度的影响 (表 1)。

表 1. 不同浓度碘克酸和碘克沙醇对 P 选择素表达的影响

对比剂	0%	2%	5%	10%
碘克酸	2.8% \pm 0.4%	2.7% \pm 0.3%	2.8% \pm 0.5%	2.7% \pm 0.4%
ADP+ 碘克酸	39.0% \pm 4.2% ^b	29.2% \pm 4.0% ^a	31.5% \pm 4.5% ^a	30.5% \pm 4.0% ^a
碘克沙醇	2.8% \pm 0.4%	3.4% \pm 0.5% ^a	3.3% \pm 0.4% ^a	3.4% \pm 0.3% ^a
ADP+ 碘克沙醇	39.0% \pm 4.2% ^b	28.8% \pm 3.6% ^a	29.9% \pm 3.9% ^a	30.5% \pm 4.4% ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照 (0%) 比较; b 为 $P < 0.001$, 与未加 ADP 比较。

2 2 碘克沙醇和碘克酸对白细胞活化的影响

无论是自发状态下, 还是加入 $0.1 \mu\text{mol/L}$ MLP刺激后, 碘克酸在任何浓度下对白细胞 CD11b 表达均没有影响 (P 分别为 0.18 和 0.67); 10% 浓

度的碘克沙醇轻度增加自发的白细胞 CD11b 表达 (2.3 ± 0.6 比 1.7 ± 0.4 $P < 0.05$); 加入 MLP 刺激后, 三种浓度的碘克沙醇均增加 CD11b 表达 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 不同浓度碘克酸和碘克沙醇对 CD11b 表达的影响

对比剂	0%	2%	5%	10%
碘克酸	$1.7\% \pm 0.4\%$	$1.7\% \pm 0.3\%$	$1.6\% \pm 0.5\%$	$1.8\% \pm 0.4\%$
MLP+ 碘克酸	$3.2\% \pm 0.5\%$ ^b	$3.3\% \pm 0.4\%$	$3.2\% \pm 0.5\%$	$3.3\% \pm 0.4\%$
碘克沙醇	$1.7\% \pm 0.4\%$	$1.9\% \pm 0.5\%$	$2.0\% \pm 0.4\%$	$2.3\% \pm 0.6\%$ ^a
MLP+ 碘克沙醇	$3.2\% \pm 0.5\%$ ^b	$4.0\% \pm 0.6\%$ ^a	$4.0\% \pm 0.6\%$ ^a	$4.1\% \pm 0.7\%$ ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照 (0%) 比较; b 为 $P < 0.001$, 与未加 MLP 比较。

2 3 碘克沙醇和碘克酸对血小板-白细胞聚集体形成的影响

血循环中血小板和白细胞 (各种亚型) 可形成异型聚集体。同时将标有荧光素 RPE 的 CD45 单克隆抗体和标有荧光素 FITC 的 CD42a 单克隆抗体与血标本孵育, 血小板-白细胞聚集体便同时显示两种

荧光颜色, 从而可被流式细胞仪检测。碘克酸和碘克沙醇对自发的血小板-白细胞聚集体 (platelet-leukocyte aggregates, PLA) 形成均无影响 (P 分别为 0.574 和 0.379), 但是显著降低 $1 \mu\text{mol/L}$ ADP 诱导的 PLA 形成 ($P < 0.01$; 表 3)。两种对比剂对血小板-中性粒细胞聚集体的影响与 PLA 相似。

表 3 不同浓度碘克酸和碘克沙醇对血小板-白细胞聚集体的影响

对比剂	0%	2%	5%	10%
碘克酸	$4.7\% \pm 0.7\%$	$4.6\% \pm 0.6\%$	$4.5\% \pm 0.5\%$	$4.5\% \pm 0.8\%$
ADP+ 碘克酸	$13.0\% \pm 1.4\%$ ^b	$9.9\% \pm 0.7\%$ ^a	$9.0\% \pm 0.8\%$ ^a	$10.0\% \pm 1.5\%$ ^a
碘克沙醇	$4.7\% \pm 0.7\%$	$4.7\% \pm 0.5\%$	$4.8\% \pm 0.7\%$	$4.9\% \pm 0.6\%$
ADP+ 碘克沙醇	$13.0\% \pm 1.4\%$ ^b	$9.1\% \pm 0.9\%$ ^a	$9.9\% \pm 1.1\%$ ^a	$8.9\% \pm 1.2\%$ ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照 (0%) 比较; b 为 $P < 0.001$, 与未加 ADP 比较。

2 4 碘克酸和碘克沙醇对血小板-白细胞活化的影响

血样本与 5% 的碘克酸和碘克沙醇孵育 5 min , 加入 1 mg/L 胶原刺激, 轻微晃动样本以增加细胞间的接触。血小板特异激动剂胶原显著引起血小板激活, 激活的血小板又随之增加白细胞 CD11b 的表达。碘克沙醇能够抑制这种血小板诱导的白细胞激活 ($5.1\% \pm 0.6\%$ 比 $3.7\% \pm 0.6\%$; $P < 0.05$); 而碘克沙醇对此无作用 ($5.6\% \pm 1.0\%$ 比 $5.1\% \pm 0.8\%$; $P = 0.13$)。加入胶原后 PLA 从 $13.5\% \pm 1.5\%$ 升至 $32.4\% \pm 3.9\%$, 碘克酸使胶原刺激的 PLA 降至 $26.3\% \pm 2.5\%$ ($P < 0.01$); 碘克沙醇使胶原刺激的 PLA 降至 $28.4\% \pm 2.9\%$ ($P < 0.01$)。

3 讨论

碘对比剂按照其理化性质, 大致分为离子型高

渗对比剂, 离子型低渗对比剂, 非离子型低渗对比剂和非离子型等渗对比剂。碘克沙醇是等渗非离子型二聚体对比剂, 渗透压为 290 mOsmol/kg 。碘克酸是唯一被 FDA 批准应用于临床的离子型低渗二聚体对比剂, 渗透压为 610 mOsmol/kg 。本研究中, 我们用水蛭素作为抗凝剂, 抽取血样时不用止血带, 样本在 37°C 孵育 5 min , 使试验条件尽可能接近生理状态, 探讨不同浓度的碘克酸和碘克沙醇对血小板和白细胞活化的影响。 2% 的浓度大致相当于冠状动脉造影时对比剂在体循环中的浓度; 5% 大致相当于正常情况下的 PCI 时碘对比剂在体内的浓度; 而 10% 大致相当于复杂病变的 PCI 时偶尔出现的体内浓度。本体外实验证实, 碘对比剂对血小板和白细胞的功能有影响, 且不同的对比剂其作用有所不同。碘克沙醇对血小板 P 选择素和白细胞 CD11b 的表达有轻微的升高作用; 而碘克酸对此无影响。然而两者均显著降低 ADP 刺激的血小板 P 选择素表达,

也显著降低 ADP 刺激的 PLA 形成。碘克酸能够抑制胶原刺激血小板后诱导的白细胞激活, 而碘克沙醇对此无作用; 两者均显著降低胶原刺激后引起的 PLA 形成。P 选择素是血小板激活的标志物之一, 代表血小板脱颗粒, 其它标志物还包括 CD63 纤维蛋白原结合受体, 血小板形态改变, 血小板衍生的微粒形成, 以及血浆或尿液中可溶性 P 选择素、 β -血小板球蛋白、血栓素 A₂、血清素等浓度增高。中性粒细胞和单核细胞激活时 CD11b 表达增加, 因此常用来作为白细胞活化的标志物。白细胞激活时会发生复杂的功能反应^[10]。超氧自由基由活化的白细胞释放, 对心肌细胞有损害, 而且可能诱发血小板聚集。血小板能与白细胞形成异型共轭体, 即血小板-白细胞聚集体。主要是由血小板表达的 P 选择素和白细胞表达的 P 选择素糖蛋白配体 1 连接而成。这种细胞-细胞间的连接能够相互促进白细胞和血小板的功能, 如血小板增强白细胞粘附分子的表达、超氧阴离子的形成和组织因子的表达等; 同样, 白细胞增强血小板粘附于血管内皮细胞。

有关碘对比剂对白细胞活化的作用报道很少, 而且相互矛盾^[11, 12]。Laskey 等^[12]观察到, 无论是冠状动脉造影后, 还是冠状动脉介入治疗后, 也无论是应用离子型、低渗对比剂, 还是非离子型、等渗对比剂, 或者是非离子型、低渗对比剂, 炎症因子白介素 6 均升高; 而成威等^[11]在冠脉造影后患者未发现血浆白介素 6 水平较造影前有任何变化。Vemeiren 等^[13]报道 CD11b 在冠脉造影使用非离子型对比剂患者中升高, 而在使用离子型对比剂患者中无变化。我们的研究发现碘克酸对自发的 CD11b 表达无影响, 而碘克沙醇高浓度时引起 CD11b 表达轻度增高。碘克酸能够抑制胶原刺激血小板后诱导的白细胞 CD11b 表达, 而碘克沙醇对此无作用。关于不同对比剂对炎症究竟有什么样的影响, 还需要更多的研究。

血小板激活在 PCI 后急性血栓形成中起有关键作用。碘克沙醇对 P 选择素表达轻度增加这一作用是否具有临床意义, 本研究不能确定。Le Feuvre 等^[14]研究表明, PCI 应用碘克沙醇患者临床不良事件发生率明显高于碘克酸, 并且主要为与血栓相关的临床事件增加。也有两者临床事件无差别的报道^[15, 16]。本研究认为碘克酸在抗血小板活性和抗炎方面的作用稍优于碘克沙醇, 并且这一差别有可能在心血管事件方面产生不同影响。研发新型的对

加安全。

[参考文献]

- [1] Chronos NA, Goodall AH, Wilson DJ, et al. Profound platelet degranulation is an important side effect of some types of contrast media used in interventional cardiology [J]. *Circulation*, 1993, **88**(5 Pt 1): 2 035-044
- [2] Rudnick MR, Goldfarb S. Pathogenesis of contrast-induced nephropathy: experimental and clinical observations with an emphasis on the role of osmolality [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2003, **4**(Suppl 5): S28-33
- [3] Misumi K, Tateno O, Fujiki M, et al. The risk of contrast media-induced ventricular fibrillation is low in canine coronary arteriography with ioxilan [J]. *J Vet Med Sci*, 2000, **62**(4): 421-426
- [4] Mehran R, Nikolsky E, Kirtane AJ, et al. Ionic low-osmolar versus nonionic iso-osmolar contrast media to obviate worsening nephropathy after angioplasty in chronic renal failure patients: the ICON (Ionic versus non-ionic Contrast to Obviate worsening Nephropathy after angioplasty in chronic renal failure patients) study [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2009, **2**(5): 415-421
- [5] Wessely R, Koppa T, Bradaric C, et al. Contrast Media and Nephrotoxicity Following Coronary Revascularization by Angioplasty Trial Investigators. Choice of contrast medium in patients with impaired renal function undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2009, **2**(5): 430-437
- [6] Reiner JS. Contrast media and clotting: what is the evidence [J]? *Catheter Cardiovasc Interv*, 2010, **75**(Suppl 1): S35-38
- [7] Li N, Halkin G, Hjemdahl P. A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte CD11b expression using fluorescence signal triggering [J]. *Eur J Haematol*, 2000, **65**(1): 57-65
- [8] Li N, Wallin NH, Ladjevardi M, et al. Effects of serotonin on platelet activation in whole blood [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1997, **8**(8): 517-523
- [9] Li N, Goodall AH, Hjemdahl P. Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering [J]. *Cytometry*, 1999, **35**(2): 154-161
- [10] 刘瑞, 马爱群, 白玲, 等. 单核细胞与内皮细胞的相互作用及其促细胞因子分泌的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11**(5): 405-407
- [11] 成威, 周胜华, 沈向前, 等. 经皮冠状动脉介入治疗对稳定型心绞痛患者外周血单核细胞活性和炎症的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14**(5): 430-433
- [12] Laskey WK, Gelman J. Inflammatory markers increase following exposure to radiographic contrast media [J]. *Acta Radiol*, 2003, **44**(5): 498-503
- [13] Vemeiren GL, Willems R, Claeyss M J, et al. Influence of ionic and non-ionic radiographic contrast media on leukocyte adhesion molecules [J]. *Mediators Inflamm*, 2003, **12**(5): 269-275
- [14] Le Feuvre C, Batisse A, Collet JP, et al. Cardiac events after low osmolar ionic or iso-osmolar nonionic contrast media utilization in the current era of coronary angioplasty [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2006, **67**(6): 852-858
- [15] Bertrand ME, Espinosa E, Piessens J, et al. Influence of a nonionic, iso-osmolar contrast medium (iodixanol) versus an ionic, low-osmolar contrast medium (ioxaglate) on major adverse cardiac events in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty: A multicenter randomized double-blind study: V isipaque in Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty [VIP] Trial Investigators [J]. *Circulation*, 2000, **101**(2): 131-136
- [16] Juergens CP, Khaing AM, McIntyre G J, et al. Adverse reactions of low osmolar non-ionic and ionic contrast media when used together or separately during percutaneous coronary intervention [J]. *Heart Lung Circ*, 2005, **14**(3): 172-177

(此文编辑 李玲玲)