

血浆可溶性 Sema4D 在体外循环手术过程中的含量变化

李玲¹, 丁英龙^{2,3}, 王玉欣⁴, 徐林茹¹, 易文秀¹, 沈振亚^{2,3}, 朱力¹, 卢穹宇¹

(1. 苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏省苏州市 215123; 2. 苏州大学附属第一医院, 江苏省苏州市 215006;

3. 苏州大学心血管病研究所, 江苏省苏州市 215006; 4. 中国武警吉林总队医院, 吉林省长春市 130000)

[关键词] 体外循环; Sema4D; ELISA; T 细胞; 血小板

[摘要] **目的** 利用 ELISA 动态检测血浆可溶性 Sema4D 在体外循环(CPB)手术过程中的含量变化, 并初步分析其可能的原因。**方法** 以重组人 Sema4D 细胞外段作为抗原, 制备 Sema4D 抗体, 建立检测人血浆中可溶性 Sema4D 水平的 ELISA 方法。收集体外循环患者手术前、肝素化后 10 min 以及中和肝素后 10 min 3 个时间点的血浆样本, ELISA 检测可溶性 Sema4D 水平在体外循环手术过程中的动态变化。取 3 个时间点的血液样本, 流式检测 T 细胞和血小板表面 Sema4D 表达的动态变化。**结果** 建立了适用于检测人外周血血浆可溶性 Sema4D 水平的夹心 ELISA 方法。体外循环手术患者血浆中可溶性 Sema4D 水平在手术开始后显著增加 ($P < 0.01$), 并持续到手术结束后。肝素化后 10 min, 75% 患者 Sema4D 高表达的血小板比术前明显增加 ($P < 0.05$), 而 Sema4D 高表达的 T 细胞无明显变化。**结论** 血小板活化释放 Sema4D 可能是体外循环过程中血浆可溶性 Sema4D 增加的原因之一。因此血浆可溶性 Sema4D 水平的变化可能成为体外循环预后的判断指标。

[中图分类号] R654.1

[文献标识码] A

Changes of plasma soluble Sema4D levels during cardiopulmonary bypass

LI Ling¹, DING Yinglong^{2,3}, WANG Yuxin⁴, XU Linru¹, YI Wenxiu¹, SHEN Zhenya^{2,3}, ZHU Li¹, LU Qiongyu¹

(1. Cyrus Tang Hematology Center of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 3. Institute for Cardiovascular Science of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 4. Jilin Hospital of Chinese Armed Police Force, Changchun, Jilin 130000, China)

[KEY WORDS] cardiopulmonary bypass; Sema4D; ELISA; T cell; platelet

[ABSTRACT] **Aim** To measure and analyze the changes of plasma soluble Sema4D levels during cardiopulmonary bypass(CPB) with ELISA, and analyze possible mechanisms. **Methods** Recombinant extracellular Sema4D was used as antigen, and antibodies against Sema4D were used to establish ELISA method. Samples from patients during CPB were collected at three time points: before surgery, 10 min after heparinization, and 10 min after neutralization after the surgery. Soluble Sema4D levels in the plasma were measured in these samples with ELISA. Sema4D expression on the surface of T cells and platelets were detected by flow cytometry. **Results** Sandwich ELISA method was established to detect soluble Sema4D levels in human plasma. Soluble Sema4D levels increased during CPB and remained at high levels until the end of the surgery ($P < 0.01$). Compared with before surgery, percentage of Sema4D high platelets increased 10 min after heparinization in 75% patients ($P < 0.05$). There is no significant change of Sema4D expression on the surface of T cells during CPB.

Conclusions Platelets activation and release of Sema4D may be one source of the increases of plasma soluble Sema4D during CPB. The change of plasma soluble Sema4D levels may become a prognostic indicator of CPB.

体外循环手术(cardiopulmonary bypass, CPB)是指应用人工管道将人体大血管与人工心肺机连接, 从静脉系统引出静脉血, 并在体外氧合, 再经血

泵将氧合血输回动脉系统的全过程, 又称心肺循环, 主要应用于心脏手术和大血管手术等。然而在手术过程中由于血液与体外循环管道接触、外科创

[收稿日期] 2019-04-15

[修回日期] 2020-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81500653)

[作者简介] 李玲, 硕士研究生, 研究方向为血栓与血管生物学, E-mail 为 ingliling@163.com。通信作者卢穹宇, 博士, 助理研究员, 研究方向为心血管与代谢疾病, E-mail 为 luqiongyu1984@163.com。

伤及缺血再灌注损伤等原因极易诱发炎症反应,从而引起各种炎症介质释放增加,导致组织器官功能障碍。因此加强机体抗炎能力是减少体外循环手术术后各种危险发生的重要保护措施^[1]。

Sema4D, 又称 CD100, 是轴突导向分子 Sema-phorin 家族的成员, 首先发现于 T 细胞表面^[2], 并广泛表达于各种免疫细胞和血小板等^[3]。Sema4D 作为单次跨膜蛋白, 其结构主要由细胞内段、跨膜区和细胞外段组成。目前研究已发现 Sema4D 在免疫细胞功能调节、多种自身免疫性疾病以及炎症反应中发挥重要作用^[4-6]。敲除小鼠体内 Sema4D 可以改善实验性急性和慢性哮喘^[7]、类风湿性关节炎^[8]以及延缓动脉粥样硬化斑块的形成^[9], 但却会加重实验性结肠炎^[10]、脉管炎^[11]及皮肤损伤^[12]等病理过程。这些研究提示 Sema4D 作为一种重要的炎症调节因子参与多种疾病的病理过程。

当细胞活化后 Sema4D 细胞外段可被基质金属蛋白酶 ADAM17 切割, 释放出约 120 kDa 的可溶性片段到血浆中, 与其受体 PlexinB1、PlexinB2 和 CD72 结合发挥生物学作用^[13]。研究发现, 在冠状动脉狭窄患者中可溶性 Sema4D 表达上调^[14]; 在关节炎患者中, Sema4D 含量与血浆 CRP 表达呈正相关^[15]; 但其在体外循环过程中的变化及对炎症反应

的作用目前尚无报道。本文建立了用于检测可溶性 Sema4D 的 ELISA 方法, 并动态检测了体外循环手术过程中血浆可溶性 Sema4D 的含量变化, 以及 T 细胞和血小板表面 Sema4D 的表达情况, 为更好地了解和控制体外循环手术过程中的炎症反应提供了新的理论思路 and 方向引导。

1 资料和方法

1.1 血液样本的收集

收集 2011 年至 2012 年苏州大学附属第一医院进行瓣膜置换或房间隔和室间隔修补等心脏手术患者在体外循环过程中的血液样本, 即患者手术前、肝素化后 10 min、中和肝素后 10 min 3 个时间点的全血(图 1), 其中 7 例患者样本用于检测血浆中 Sema4D 含量变化, 16 例患者样本用于检测血小板(16 例)与 T 细胞(11 例, 5 例该数据不完整) Sema4D 表达变化。其中女性占比 56.5%, 男性占比 43.5%, 平均年龄(47±19)岁。患者全血 EDTA 抗凝, 2 000 r/min 离心 20 min, 取上层血浆, 分装后于 -80 ℃ 保存备用。该研究得到苏州大学附属第一医院伦理委员会的批准, 并经患者知情同意。

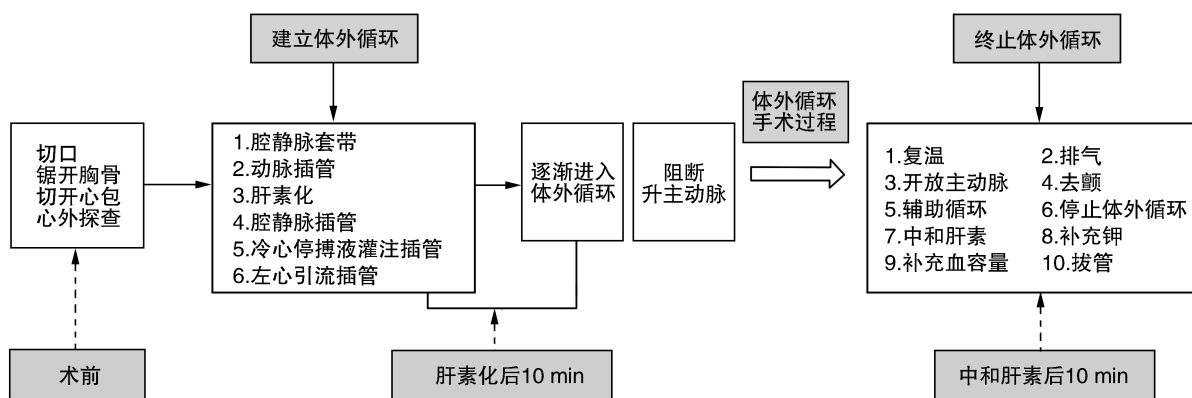


图 1. 体外循环的基本过程和取样时间点

Figure 1. The basic process of CPB and sampling time points

1.2 重组 Sema4D 蛋白的制备和 Western blot 鉴定

将表达融合 His-tag 的人 Sema4D 细胞外段质粒转染至 HEK 293T 细胞, 收集细胞培养上清, 与钴结合树脂 (Clontech) 结合后转移至色谱柱, 用含有 200 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱, 收集第 1、2、3 管洗脱液, 采用 Sema4D 抗体 Western blot 验证。

1.3 夹心 ELISA 方法的建立

ELISA 建立参考文献^[16]方法。重组 Sema4D 蛋

白免疫小鼠, 获得 10 株单克隆抗体, 并从中筛选出亲和力和特异性较高且作用于 Sema4D 不同位点的两株抗体, 分别作为包被抗体和检测抗体, 构建夹心 ELISA 方法。将包被抗体 (10 mg/L) 包被于 96 孔板, 孵育过夜, 洗板, 加入人外周血血浆样本和梯度标准品, 室温孵育 1 h。洗去未结合的蛋白, 加入 0.1 mg/L 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记检测抗体, 室温孵育 1 h。洗去未结合抗

体,加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)底物显色液,室温孵育 30 min,加入终止液,450 nm 酶标仪处进行吸光度检测,根据 Sema4D 标准品吸光度绘制标准曲线,计算血浆中 Sema4D 的含量($\mu\text{g/L}$)。采用该夹心 ELISA 方法检测体外循环病人手术过程中各个时间点血浆中可溶性 Sema4D 的含量。

1.4 流式细胞检测 Sema4D 高表达情况

1.4.1 Sema4D 高表达血小板的检测 取体外循环患者手术前、肝素化后 10 min、中和肝素后 10 min 3 个时间点全血,900 r/min 离心 10 min,取富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP),1:100 稀释,加入 FITC-CD41 和 PE-Sema4D 抗体,流式细胞仪(BD FACS Calibur)检测 Sema4D 高表达血小板百分比。

1.4.2 Sema4D 高表达 T 细胞的检测 取体外循环患者手术前、肝素化后 10 min、中和肝素后 10 min 3 个时间点全血,1:1 加入单核细胞分离液(Sigma 公司),400 g 离心 30 min,取中间单核细胞层,加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)稀释,1 500 r/min 离心 10 min,100 μL PBS 重悬沉淀并加入抗体 FITC-CD3 和 PE-Sema4D,流式细胞仪检测 Sema4D 高表达 T 细胞百分比。

1.5 统计学处理

为避免患者间个体差异,将把患者最初记录数值标准化为 100%,之后各时间点均与其进行比较。采用 Graphad Prism 5 软件进行统计学处理。数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,并进行 One-way ANOVA 统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 体外循环过程中可溶性 Sema4D 表达增加

Western blot 验证重组人 Sema4D 蛋白,结果显示第 1、2、3 管收集液中均含有相对分子质量 120 kDa 左右的可溶性 Sema4D 蛋白,其中第 1 管中浓度最高(图 2)。建立了检测血浆中可溶性 Sema4D 的 ELISA 方法,线性检测范围在 1 ~ 30 $\mu\text{g/L}$ ($R^2 = 0.996$)。

肝素化后 10 min 时患者血浆 Sema4D 水平较术前显著增加($P < 0.01$;表 1)。中和肝素后 10 min 即手术将结束时 Sema4D 水平虽然较手术刚开始时(肝素化后 10 min)略有下降的趋势,但和术前相比,仍有显著增加($P < 0.05$)。将患者手术前血浆 Sema4D 含量标准化为 100%,将后两个时间点的 Sema4D 与手术前相比,结果发现后两个时间点血

浆 Sema4D 均维持在较高水平($P < 0.05$)。提示在体外循环刚开始时(肝素化后 10 min),机体的一些损伤或处理已经导致 Sema4D 激活,并释放可溶性片段到血浆中,直至手术结束。

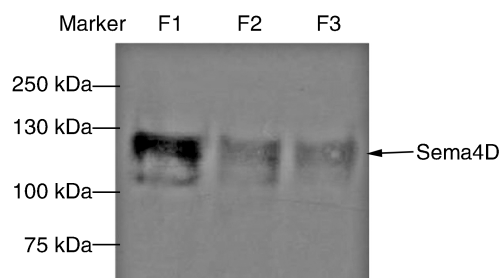


图 2. Western blot 验证重组 Sema4D 蛋白 用 Sema4D 抗体检测不同批次纯化的重组 Sema4D 蛋白。F1、F2、F3 分别为蛋白分离纯化时得到的第 1、2、3 管收集液。

Figure 2. Purification of recombinant human Sema4D protein

表 1. 体外循环过程中血浆可溶性 Sema4D 水平变化($n=7$)
Table 1. Changes of plasma soluble Sema4D levels during CPB($n=7$)

分组	Sema4D($\mu\text{g/L}$)	与术前比值(%)
术前	11.81 \pm 3.93	100 \pm 0
肝素化后 10 min	15.86 \pm 4.35 ^a	152.2 \pm 40.86 ^a
中和肝素后 10 min	14.31 \pm 3.25 ^b	138.6 \pm 39.04 ^b

a 为 $P < 0.01$,与术前比较;b 为 $P < 0.05$,与术前比较。

在不影响患者恢复的情况下,对两位体外循环患者术后 4 天血浆 Sema4D 水平进行了监测。以手术结束时(中和肝素后 10 min)的浓度作为初始浓度,发现在体外循环术后 0 ~ 4 天,Sema4D 水平呈现持续升高(表 2)。提示术后持续的应激反应会诱导可溶性 Sema4D 的释放,并可能在之后的炎症调节过程中发挥一定作用。

2.2 体外循环中 75% 患者 Sema4D 高表达血小板增加

图 3 和表 3 显示,肝素化后 10 min 时, Sema4D 高表达血小板与手术前相比略有增加的趋势,但差异无显著性($P > 0.05$),中和肝素后 10 min,其表达出现下降趋势,但仍差异无显著性($P > 0.05$)。可能由于术前 Sema4D 高表达血小板含量差异较大,且个别初始 Sema4D 含量较高的血小板处于轻度活化状态,不会进一步活化而增加表面 Sema4D 的表达。另外 75% 的患者(12/16)在肝素化后 10 min 时 Sema4D 高表达血小板较术前增加($P < 0.05$)。提示体外循环手术中出现的血浆可溶性 Sema4D 水平增

加可能部分源于血小板活化诱导的 Sema4D 释放。

表 2. 体外循环术后 0 ~ 4 天患者血浆中可溶性 Sema4D 的含量及与初始 Sema4D 含量的比值变化

Table 2. Soluble Sema4D levels and percentage of original Sema4D levels in the plasma of patients 0 ~ 4 days after CPB

指标	患者	手术结束时	术后 1 天	术后 2 天	术后 3 天	术后 4 天
Sema4D(μg/L)	1	11.34	18.12	16.97	18.91	21.09
	2	10.02	10.69	15.75	17.17	18.27
与手术结束时比值(%)	1	100	159.85	149.71	166.80	186.06
	2	100	106.64	157.16	171.23	182.25

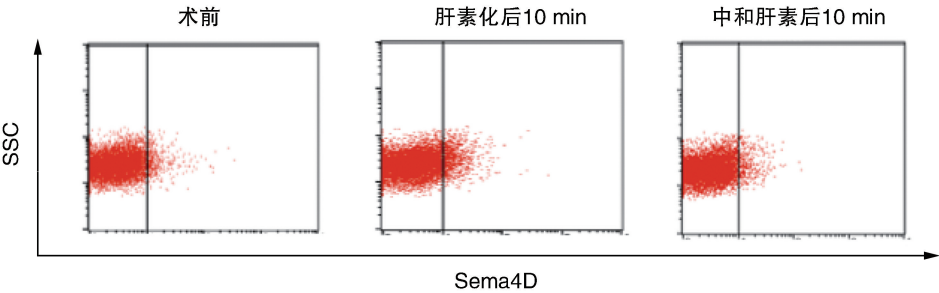


图 3. 流式检测不同时间点下 Sema4D 高表达血小板变化 图中右侧门区域代表高表达 Sema4D 血小板。

Figure 3. Detection of Sema4D high platelets at different time points with flow cytometry

表 3. Sema4D 高表达血小板在体外循环过程中的变化 (n=16)

Table 3. Changes of surface Sema4D on platelet during CPB (n=16)

指标	术前	肝素化后 10 min	中和肝素后 10 min
高表达血小板(%)	23.39±22.89	25.48±20.84	22.42±18.22
与术前比值(%)	100±0	134.80±56.65 ^a	116.61±39.90

a 为 $P<0.05$, 与术前比较。

2.3 体外循环中 Sema4D 高表达 T 细胞百分比无显著变化

图 4 与表 4 分析显示,与术前相比,肝素化后 10 min 时 Sema4D 在 CD3 阳性 T 细胞中的表达无显

著变化($P>0.05$)。肝素化后 10 min 时,约一半患者(6/11) Sema4D 高表达的 T 细胞增加,其余患者(5/11) Sema4D 高表达的 T 细胞则减少,因此与术前相比,两者差异无显著性($P>0.05$)。

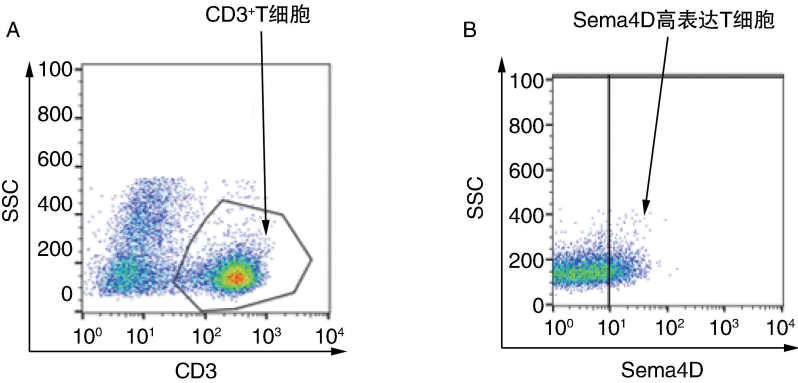


图 4. 流式筛选 Sema4D 高表达 T 细胞 A 为 CD3 抗体标记 T 细胞;B 为右侧门区域表示 Sema4D 高表达 T 细胞。

Figure 4. Detection of Sema4D high T cells with flow cytometry

表 4. Sema4D 高表达 T 细胞在体外循环过程中的变化($n=11$)

Table 4. Changes of surface Sema4D on T cell during CPB($n=11$)

指标	术前	肝素化后 10 min	中和肝素后 10 min
高表达 T 细胞(%)	15.06±12.07	16.04±11.82	12.06±12.15
与术前比值(%)	100±0	158.45±115.37	114.10±118.91

3 讨论

Sema4D 是轴突导向分子 Semaphorin 第Ⅳ家族的成员之一,在免疫调控和炎症疾病中发挥重要作用,可以促进 T 细胞活化、内皮细胞损伤和血管通透性等。免疫细胞活化时,表面的 Sema4D 受基质金属蛋白酶的调控切割,释放出可溶性细胞外段到血浆中单独发挥作用。体外循环是进行心脏、血管等大手术时利用人工心肺机代替心脏和肺进行泵血和呼吸作用的手术。在体外循环过程中会因为外源刺激或缺血再灌注刺激导致炎症因子分泌增加以及炎症反应的发生,从而对患者机体造成损伤。

本文通过建立可溶性 Sema4D 的 ELISA 检测方法检测了体外循环过程中不同时间点血浆可溶性 Sema4D 水平的变化。发现在进入体外循环后(肝素化后 10 min),患者血浆中 Sema4D 水平显著增加,在体外循环将结束时(中和肝素后 10 min)仍然保持较高水平。表明 Sema4D 在体外循环过程中可以被活化、切割,释放出可溶性 Sema4D 片段。由于可溶性 Sema4D 参与调控内皮细胞功能,因此在 CPB 过程中 Sema4D 可能通过损伤血管内皮从而加重术后损伤。本文进一步追踪了两位患者术后持续 4 天血浆中可溶性 Sema4D 的水平,发现 Sema4D 水平持续增加,但由于样本量的限制,还不能确定其他患者是否也存在类似情况。

为了分析体外循环患者血浆中可溶性 Sema4D 的来源,本文通过流式细胞术分析 T 细胞和血小板表面 Sema4D 在体外循环过程中的表达变化,结果发现:血小板表面 Sema4D 的表达虽略有增加,但差异无显著性。但考虑到不同患者之间的初始 Sema4D 水平相差很大,于是本文针对同一患者不同时间点时 Sema4D 高表达血小板的含量变化进行统计,结果发现 75% 的患者在肝素化后 10 min 时 Sema4D 高表达的血小板增加。提示血小板可能是血浆 Sema4D 的来源之一,而 Sema4D 高表达的 T 细胞则未发现明显变化。由于血小板表面 Sema4D 会被基质金属蛋白酶 ADAM17 切割,释放出可溶性片

段^[3],而之前有研究报道体外循环过程中血小板表面 ADMA17 的表达会增加^[17],提示可能由于血小板的快速激活效应,导致 Sema4D 在到达细胞膜表面后即被切割,于是便很难捕捉到细胞表面 Sema4D 的表达变化。中性粒细胞也是免疫过程的重要参与者,并在体外循环过程早期即被激活。文献^[11]发现 Sema4D 在活化的中性粒细胞表面也有表达,并在刺激下会被切割释放出可溶性片段,提示中性粒细胞也可能是 CPB 过程中血浆可溶性 Sema4D 的来源之一。

本研究对于发现新的临床预测指标和干预靶点有一定的启发意义。但目前由于样本量较少,缺乏足够的预后随访数据,因此对 Sema4D 在体外循环过程中水平变化的具体原因和预后价值还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 钟河江, 杨天德. 右美托咪定在体外循环心脏手术中的应用研究进展[J]. 中国当代医药, 2018, 25(9): 25-28.

[2] Bougeret C, Mansur IG, Dastot H, et al. Increased surface expression of a newly identified 150 kDa dimer early after human T lymphocyte activation[J]. J Immunol, 1992, 148(2): 318-323.

[3] Zhu L, Bergmeier W, Wu J, et al. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(5): 1621-1626.

[4] Maleki KT, Cornillet M, Bjorkstrom NK. Soluble sema4D/CD100: A novel immunoregulator in infectious and inflammatory diseases[J]. Clin Immunol, 2016, 163: 52-59.

[5] Zhu Z, Luo Y, Yu J, et al. Sema4D is required in both the adaptive and innate immune responses of contact hypersensitivity[J]. Mol Immunol, 2016, 78: 98-104.

[6] Kuklina EM, Baidina TV, Danchenko IY, et al. Semaphorin sema4D in the immune system in multiple sclerosis[J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 157: 234-237.

[7] Shanks K, Nkyimbeng-Takwi EH, Smith E, et al. Neuro-immune semaphorin 4D is necessary for optimal lung

- allergic inflammation [J]. *Mol Immunol*, 2013, 56 (4): 480-487.
- [8] Yoshida Y, Ogata A, Kang S, et al. Semaphorin 4D contributes to rheumatoid arthritis by inducing inflammatory cytokine production: pathogenic and therapeutic implications [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(6): 1481-1490.
- [9] Zhu L, Stalker TJ, Fong KP, et al. Disruption of SEMA4D ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 (7): 1039-1045.
- [10] Meehan TF, Witherden DA, Kim CH, et al. Protection against colitis by CD100-dependent modulation of intraepithelial gamma delta T lymphocyte function [J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7: 134-142.
- [11] Nishide M, Nojima S, Ito D, et al. Semaphorin 4D inhibits neutrophil activation and is involved in the pathogenesis of neutrophil-mediated autoimmune vasculitis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76: 1440-1448.
- [12] Witherden DA, Watanabe M, Garijo O, et al. The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal gamma delta T cell function [J]. *Immunity*, 2012, 37: 314-325.
- [13] Wang X, Kumanogoh A, Watanabe C, et al. Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses [J]. *Blood*, 2001, 97(11): 3498-3504.
- [14] Gong H, Lyu X, Li S, et al. Sema4D levels are increased in coronary heart disease and associated with the extent of coronary artery stenosis [J]. *Life Sci*, 2019, 219: 329-335.
- [15] Ha YJ, Han DW, Kim JH, et al. Circulating semaphorin 4D as a marker for predicting radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Dis Markers*, 2018, 2018: 2318386.
- [16] Lu Q, Dong N, Wang Q, et al. Increased levels of plasma soluble Sema4D in patients with heart failure [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64265.
- [17] Murase M, Nakayama Y, Sessler DI, et al. Changes in platelet Bax levels contribute to impaired platelet response to thrombin after cardiopulmonary bypass: prospective observational clinical and laboratory investigations [J]. *Br J Anaesth*, 2017, 119(6): 1118-1126.
- (此文编辑 朱雯霞)