

外源性一氧化碳释放分子 2 对脓毒症小鼠血小板活化的影响

孙炳伟 王敏 王波 杨国涛 孙艳 陈曦

脓毒症时凝血系统的过度激活促进病情发展为脓毒性休克,其中血小板起着非常重要的作用^[1-2],表现为血小板过度活化并大量黏附聚集,导致病理性血栓形成。血小板膜糖蛋白 GP II b/III a(即 CD41/CD61)、CD62p 等介导了上述病理过程^[3-4]。造血系细胞特异蛋白 1(HS1)是血小板被活化过程中的关键信号分子,上述血小板重要的膜糖蛋白活化信号均经 HS1 传导^[5]。因此,抑制膜糖蛋白的表达或者阻断 HS1 信号传导,进而抑制血小板的激活,弱化凝血系统的活化,对抑制脓毒症的发生发展具有重要作用^[6]。已有研究证明,外源性一氧化碳释放分子(CORM)可作为外源性一氧化碳的供体,有效抑制脓毒症炎症介质和细胞因子的释放,明显抑制严重烧伤后早期重要脏器的炎症反应,有效保护细胞、维持器官功能^[7-9]。一氧化碳对脓毒症时血小板活化是否具有抑制作用,目前鲜见报道。本研究采用小鼠盲肠结扎和穿孔(CLP)脓毒症模型,以 CORM-2 进行早期干预,观察该分子对血小板活化的作用,旨在研究其对脓毒症时凝血系统的影响,并探讨可能的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

CORM-2 购自美国 Sigma 公司,使用前采用二甲亚砷溶解,同时配制无活性 CORM-2^[10]。羊抗鼠单克隆抗体 CD61-异硫氰酸荧光素(FITC)、CD62p-藻红蛋白(PE)及同型对照 IgG-FITC、IgG-PE 均购自美国 eBioscience 公司。兔抗 HS1 单克隆抗体、兔抗磷酸化 HS1 多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)耦联的山羊抗兔 IgG 及电化学发光(ECL)试剂盒均购自美国 Santa Cruz 公司。FACS Calibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司,VMR 型小动物麻醉机购自美国 Matrix 公司,全自动凝血分析仪购自美国 Beckman Coulter 公司,500CA 型血小板聚集仪购自美国 Chrono-Log 公司,图像分析系统购自瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司。

1.2 动物模型与分组

111 只健康雄性 BALB/c 小鼠(江苏大学实验动物中心),6~8 周龄,体质量(20±3)g,于普通实验室适应性饲养

1 周。按照随机数字表法将小鼠分为正常对照组 30 只(不行任何处理)、CLP 组 30 只、CLP+无活性 CORM-2 组 21 只、CLP+CORM-2 组 30 只。CLP 组小鼠吸入异氟烷麻醉后行 CLP^[11];CLP+CORM-2 组小鼠同 CLP 组处理后,立即经尾静脉注射 CORM-2(8.0 mg/kg)^[7-8]。CLP+无活性 CORM-2 组小鼠除注射无活性 CORM-2(8.0 mg/kg)外,其余处理同 CLP+CORM-2 组。

1.3 检测指标

1.3.1 纤维蛋白原(FIB)、D 二聚体水平 于术后 6、12、24 h 取 CLP 组、CLP+无活性 CORM-2 组、CLP+CORM-2 组小鼠,每组每时相点 4 只。严格无菌心脏采血 1.8 mL,注入含 0.2 mL 38 g/L 枸橼酸钠(体积比 9:1)的真空抗凝管,全自动凝血分析仪检测血浆中凝血因子 FIB、D 二聚体水平。同时取 12 只正常对照组小鼠血液标本同法检测。

1.3.2 血小板膜糖蛋白表达 于术后 6、12、24 h 取 CLP 组、CLP+无活性 CORM-2 组、CLP+CORM-2 组小鼠,每组每时相点 3 只。同前采血、抗凝后于离心半径 6 cm(下同),1000 r/min 离心 8 min,收集富血小板血浆置于 EP 管中,加入 10 g/L 多聚甲醛固定 15 min。将羊抗鼠单克隆抗体 CD61-FITC、CD62p-PE 及其 IgG 同型对照各 10 μL 分别加入对应试管;各试管 1500 r/min 离心 5 min,生理盐水重新悬浮,应用流式细胞仪检测荧光标记阳性膜糖蛋白百分比。同时取 9 只正常对照组小鼠血液标本同法检测。

1.3.3 血小板聚集功能 于术后 6、12、24 h 取 CLP 组、CLP+CORM-2 组小鼠,每组每时相点 3 只。同前采血、抗凝后将 0.5 mL 抗凝血和 0.5 mL 生理盐水加入温育好的反应杯中混合。加入聚集试剂腺苷二磷酸 10 μL(勿触碰电极),运行 6~9 min 至平稳。计算电阻值,其代表血小板聚集程度。同时取 9 只正常对照组小鼠血液标本同法检测。

1.3.4 血小板磷酸化 HS1 蛋白的表达 采用蛋白质印迹法进行检测。按照本实验室常规方法^[9],收集正常对照组、CLP 组、CLP+无活性 CORM-2 组、CLP+CORM-2 组小鼠伤后 24 h 血小板(来源于步骤 1.3.1),提取胞质蛋白,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度(mg/mL),-80℃保存。每个样品取 50 μg 总蛋白,电泳后电转移至聚偏氟乙烯膜,90 V 低温条件下电转移 2 h,封闭后分别加入兔抗 HS1 单克隆抗体、兔抗磷酸化 HS1 多克隆抗体(均为 1:500 稀释),4℃过夜。PBS-吐温 20 漂洗 4 次后,加入 HRP 耦联的山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释),4℃孵育过夜。PBS-吐温 20 漂洗 4 次后,用 ECL 试剂盒显色,蛋白条带用图像分析系统分析,以磷酸化 HS1 表达量与总 HS1 表达量之比表示血小板磷酸化 HS1 相对表达量。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.02.011

基金项目:国家自然科学基金(30772256、81071546);江苏省自然科学基金面上项目(BK2008237);江苏省政府留学基金(2008-K002)

作者单位:212001 江苏镇江,江苏大学附属医院烧伤整形科

通信作者:孙炳伟,Email:sunbinwe@hotmail.com,电话:0511-85082258

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行组间独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 血浆凝血因子 FIB、D 二聚体水平

CLP 组小鼠术后 12、24 h FIB 的水平明显高于正常对照组 (*t* 值分别为 9.768、7.650, *P* 值均小于 0.01), CLP + CORM-2 组小鼠术后 12、24 h FIB 的水平则明显低于 CLP 组 (*t* 值分别为 4.762、4.948, *P* 值均小于 0.05)。CLP 组小鼠术后 6、12 h D 二聚体水平明显高于正常对照组 (*t* 值分别为 6.034、6.154, *P* 值均小于 0.01), CLP + CORM-2 组小鼠术后 6、12 h D 二聚体水平明显低于 CLP 组 (*t* 值分别为 3.668、4.988, *P* 值均小于 0.05)。见表 1。

2.2 血小板膜糖蛋白 CD61、CD62p 表达

CLP 组小鼠术后 6 h CD61 阳性百分比 [(98 ± 9)%] 明显高于正常对照组 [(68 ± 16)%], *t* = 4.028, *P* < 0.01; CLP 组小鼠术后 12、24 h CD61 阳性百分比分别为 (95 ± 11)%、(96 ± 7)% ,均高于正常对照组 (*t* 值分别为 10.448、11.637, *P* 值均小于 0.05)。CLP + 无活性 CORM-2 组小鼠术后 6、12、24 h CD61 阳性百分比分别为 (90 ± 9)%、(87 ± 12)%、(89 ± 10)% ,也明显高于正常对照组 (*t* 值分别为 11.355、9.243、9.298, *P* 值均小于 0.05); CLP + CORM-2 组小鼠术后 6、12、24 h CD61 阳性百分比分别为 (77 ± 8)%、(72 ± 12)%、(74 ± 9)% ,均低于 CLP 组 (*t* 值分别为 8.223、11.554、11.298, *P* 值均小于 0.05)。CLP 组小鼠术后 6、12、24 h CD62p 阳性百分比分别为 (30.7 ± 7.6)%、(34.8 ± 4.8)%、(32.9 ± 6.9)% ,均高于正常对照组 [(13.6 ± 2.7)%], *t* 值分别为 6.238、4.233、4.745, *P* 值均小于 0.01; CLP + 无活性 CORM-2 组小鼠术后 6、12、24 h CD62p 阳性百分比分别为 (31.9 ± 8.4)%、(28.5 ± 3.6)%、(28.7 ± 6.5)% ,也明显高于正常对照组 (*t* 值分别为 10.488、9.143、9.776, *P* 值均小于 0.05); CLP + CORM-2 组小鼠术后 6、12、24 h CD62p 阳性百分比分别为 (18.1 ± 8.3)%、(21.4 ± 1.6)%、(24.6 ± 6.0)% ,明显低于 CLP 组 (*t* 值分别为 9.763、10.365、9.224, *P* 值均小于 0.05)。

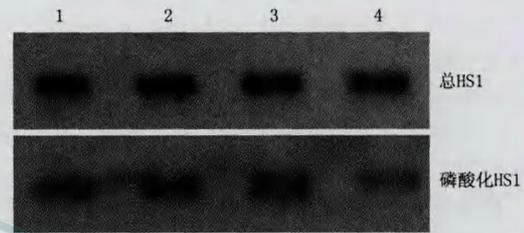
2.3 血小板聚集功能

CLP 组小鼠术后 6、12 h 血小板聚集后电阻值与正常对照组接近, 术后 24 h 血小板聚集增加导致电阻曲线下下降幅度最大, 电阻值为 (36 ± 9)Ω, 明显高于正常对照组 [(15 ± 4)Ω],

t = 7.667, *P* < 0.01]; 术后 24 h CLP + CORM-2 组曲线明显较 CLP 组平滑, 血小板电阻值明显降低 [(29 ± 5)Ω, *t* = 9.642, *P* < 0.01]。

2.4 血小板磷酸化 HS1 蛋白表达

CLP 组、CLP + 无活性 CORM-2 组小鼠血小板磷酸化 HS1 蛋白相对表达量分别为 0.85 ± 0.18、0.93 ± 0.16, 明显高于正常对照组 (0.40 ± 0.07, *t* 值分别为 1.832、2.914, *P* 值均小于 0.01); CLP + CORM-2 组小鼠血小板磷酸化 HS1 蛋白相对表达量 (0.38 ± 0.09) 明显低于 CLP 组 (*t* = 3.312, *P* < 0.05)。见图 1。



注:1. 正常对照组;2. 盲肠结扎和穿孔(CLP)组;3. CLP + 无活性外源性一氧化碳释放分子 2(CORM-2)组;4. CLP + CORM-2 组

图 1 各组小鼠血小板磷酸化造血系细胞特异蛋白 1(HS1) 的表达

3 讨论

本研究中,CLP 小鼠经 CORM-2 干预后,重要的凝血因子 FIB 和 D 二聚体水平普遍明显降低。FIB 是纤维蛋白的前体,可溶性纤维蛋白原转变为不溶性纤维蛋白,使血液凝固。而 D 二聚体是纤溶酶降解纤维蛋白的产物之一,其含量变化可以作为体内高凝状态和纤溶亢进的标志。本研究结果显示,CORM-2 干预可有效改善血液的高凝状态。

目前血小板在脓毒症引起 MODS 中的作用还未被完全阐明。血小板活化包括 3 个方面:黏附、聚集和释放,三者相互促进,且活化反应均通过其表面重要膜糖蛋白的功能实现^[3-4,12]。本研究提示,CORM-2 可以明显抑制血小板膜糖蛋白 CD61、CD62p 的表达,降低血小板活性和聚集率,抑制脓毒症时凝血系统的活化。

HS1 是相对分子质量为 75 × 10³ 的适应性蛋白,特异性表达于造血系细胞。HS1 属亲水性蛋白,含有 6 个磷酸化位点,1 个 HS1 相关蛋白(HAX1)结合位点,1 个富脯氨酸区域和 1 个 SH3 结构域^[13]。在静息血小板中 HS1 位于胞质,血小板活化时其转位至胞膜。目前已证实的主要血小板酪氨

表 1 各组小鼠各时相点血浆纤维蛋白原和 D 二聚体水平($\bar{x} \pm s$)

组别	纤维蛋白原(g/L)			D 二聚体(mg/L)		
	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
CLP 组	2.57 ± 0.54	4.65 ± 0.73 ^a	5.76 ± 0.88 ^a	284 ± 52 ^a	230 ± 63 ^a	183 ± 46
CLP + 无活性 CORM-2 组	2.82 ± 0.34	4.89 ± 0.49 ^a	5.99 ± 0.20 ^a	291 ± 22 ^a	277 ± 64 ^a	199 ± 40
CLP + CORM-2 组	2.49 ± 0.42	3.32 ± 0.42 ^b	3.68 ± 0.46 ^b	170 ± 35 ^b	142 ± 18 ^b	143 ± 40

注:各组各时相点鼠数为 4 只;CLP 为盲肠结扎和穿孔;CORM-2 为外源性一氧化碳释放分子 2;正常对照组纤维蛋白原、D 二聚体水平分别为 (2.53 ± 0.41)g/L、(108 ± 29)mg/L;与正常对照组比较,^a*P* < 0.01;与 CLP 组比较,^b*P* < 0.05

酸激酶是非受体型,主要包括 Src 激酶家族、Syk 等。研究表明,HS1 是血小板受刺激后活化过程中的 1 个关键信号分子,血小板重要的膜糖蛋白(如 PARs、GPVI)活化信号均经 HS1 而得以传导^[14]。我们的初步研究结果提示,CORM-2 能干预 CLP 小鼠,在明显下调血小板膜糖蛋白表达的同时,也抑制了下游关键信号分子 HS1 的磷酸化。由此我们认为,血小板主要的膜糖蛋白受体在脓毒症时被活化并激发信号,导致血小板聚集,在血小板血栓形成中起重要作用。如果对膜糖蛋白受体及其信号转导通路,尤其是关键分子 HS1 的磷酸化进行更深入的研究,进一步明确脓毒症干预的新靶点,将可能为脓毒症患者的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost*, 2004,2(12):2094-2095.
- [2] Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, 2004,109(22):2698-2704.
- [3] 董宁征,崔宇杰,阮长耿. 人源性抗血小板膜糖蛋白 II b/III a Fab 抗体的研制及其对血小板聚集功能的影响. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009,25(1):65-67.
- [4] Covic L, Misra M, Badar J, et al. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med*, 2002,8(10):1161-1165.
- [5] Kahner BN, Dorsam RT, Mada SR, et al. Hematopoietic lineage cell specific protein 1 (HS1) is a functionally important signaling molecule in platelet activation. *Blood*, 2007,110(7):2449-2456.
- [6] Sun BW, Chen X. Carbon monoxide releasing molecules: new insights for anticoagulation strategy in sepsis. *Cell Mol Life Sci*, 2009,66(3):365-369.
- [7] 孙炳伟,陈曦,陈兆永,等. 外源性一氧化碳释放分子 2 对严重烧伤小鼠肝脏炎症性反应的抑制作用. *中华烧伤杂志*, 2007,23(3):179-183.
- [8] 孙炳伟,陈曦,陈兆永,等. 外源途径一氧化碳抑制小鼠严重烧伤后早期肺损伤和炎症反应的分子机制. *中华医学杂志*, 2007,87(44):3148-3151.
- [9] Sun B, Zou X, Chen Y, et al. Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC. *Int J Biol Sci*, 2008,4(5):270-278.
- [10] Sun B, Sun Z, Jin Q, et al. CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice. *Int J Biol Sci*, 2008,4(3):176-183.
- [11] Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock*, 2006,26(6):565-570.
- [12] 沈霖,沈迪,陈瑞,等. 出血性血小板病患者凝血酶受体 GP IIb/IX/V 复合物表达研究. *血栓与止血学*, 2008,14(6):254-256.
- [13] Kahner BN, Dorsam RT, Kim S, et al. Hematopoietic lineage cell-specific protein-1 (HS1) regulates PAR-mediated ERK activation and thromboxane generation in platelets. *Platelets*, 2008,19(8):614-623.
- [14] Kahner BN, Dorsam RT, Mada SR, et al. Hematopoietic lineage cell specific protein 1 (HS1) is a functionally important signaling molecule in platelet activation. *Blood*, 2007,110(7):2449-2456.

(收稿日期:2010-12-15)

(本文编辑:莫愚)

高温环境对烫伤大鼠免疫功能的影响

朱童 詹剑华 游浩元 孙俊锋 罗锦花

我国南方地区夏季漫长,极端气温达 38~40℃甚至更高,在该环境下机体产生一系列不同于常温环境下的改变。目前关于普通环境温度下烧伤免疫的研究报道较多^[1-2],但对高温气候下烧伤免疫的变化了解较少。笔者对此进行动物实验研究,拟为高温气候下烧伤救治提供参考。

1 材料与方

1.1 主要试剂与仪器

CD3、CD4、CD8a、CD25 T 淋巴细胞单克隆抗体均购自美国 eBioscience 公司,自然杀伤(NK)细胞单克隆抗体购自美国 Invitrogen 公司,大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒购自上海森雄科

技实业有限公司,大鼠 IL-10 及 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。FACS Calibur 型流式细胞仪购自美国 BD 公司,RXZ 智能型人工气候箱购自宁波江南仪器厂,蒸气烫伤实验仪由南昌大学第一附属医院烧伤科自制。

1.2 动物模型及分组

健康、成年 Wistar 大鼠(南昌大学医学院动物科学部)72 只,体质量(200 \pm 20)g,雌雄各半,适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法分为 4 组,并根据致伤前后所处环境温度不同,分别命名为:常温-常温组、常温-高温组、高温-常温组和高温-高温组,每组 18 只。前 2 组大鼠于常温下饲养 10 d;将后 2 组大鼠每日置于(38.0 \pm 1.0)℃、相对湿度(55 \pm 5)%的人工气候箱内 1 h,连续 10 d(预实验结果显示:照此处理至第 9 天大鼠直肠温度恢复至基础体温水平,说明此时已习服高温)。第 11 天时 4 组大鼠常规背部脱毛、麻醉,用蒸气烫伤实验仪致 30% TBSA III 度烫伤(病理切片证实)。伤后常温-常温组、高温-常温组置于常温下饲养,常温-高温组、高温-高温组置于人工气候箱内(温、湿度条件同上)饲养。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.02.012

基金项目:国家科技支撑计划(2008BA168B06)

作者单位:252000 山东省聊城市人民医院烧伤整形科(朱童);南昌大学第一附属医院烧伤科(詹剑华、游浩元、孙俊锋、罗锦花)

通信作者:詹剑华,330006,Email:zjhseasky@163.com,电话:0791-8693351