

外源性一氧化碳分子对脓毒症时血小板膜糖蛋白过度表达和血小板活化的抑制作用及机制

孙炳伟 仇雪枫 王敏 王波 杨国涛 孙艳 陈曦

【摘要】 目的 探讨外源性一氧化碳释放分子(CORM-2)对脓毒症时血小板膜糖蛋白表达和血小板活化的抑制作用。**方法** 将120只雄性BALB/c小鼠按随机数字表法分为正常对照组、盲肠结扎+穿孔术(CLP)组、CLP+无活性CORM-2(iCORM-2)组和CLP+CORM-2组。CLP+CORM-2组除伤后使用CORM-2外,其他处理同CLP组。于伤后6h、12h、24h分别检测小鼠血浆纤维蛋白原(FIB)、D-二聚体(D-D)的水平;全血电阻法检测血小板聚集功能;用流式细胞术检测血小板膜糖蛋白CD61和CD62p的表达水平;同时Western Blot检测造血系细胞特异蛋白-1(HS1)分子磷酸化水平。**结果** 与假手术组比较,12h、24hCLP组血浆FIB、D-D的水平明显增加[分别为 (4.65 ± 0.73) g/L, (5.76 ± 0.88) g/L和 (229.93 ± 62.91) mg/L, (182.96 ± 46.32) mg/L, $P < 0.01$],血小板聚集率明显增高,血小板膜糖蛋白CD61和CD62p的表达增加[分别为 $(94.87 \pm 11.22)\%$, $(95.93 \pm 7.43)\%$ 和 $(34.81 \pm 4.76)\%$, $(32.88 \pm 6.94)\%$, $P < 0.05$]。HS1分子磷酸化水平增加;CLP+CORM-2组血浆FIB、D-D的水平均显著降低[分别为 (3.32 ± 0.42) g/L, (3.68 ± 0.46) g/L和 (169.57 ± 35.14) mg/L, (141.82 ± 18.46) mg/L, $P < 0.05$],血小板聚集率下降明显,膜糖蛋白CD61和CD62p的表达也得到有效下调[分别为 $(72.12 \pm 11.67)\%$, $(73.68 \pm 8.76)\%$ 和 $(21.38 \pm 1.61)\%$, $(24.65 \pm 5.96)\%$, $P < 0.05$],HS1分子磷酸化水平得到有效抑制。**结论** 外源性CORM-2能明显下调脓毒症时血小板膜糖蛋白CD61和CD62p的表达以及HS1分子磷酸化水平,并抑制血浆FIB、D-D的升高,继而降低血小板黏附及聚集率,有效抑制脓毒症时血小板的过度活化。

【关键词】 脓毒症; 一氧化碳; 血小板; 膜糖蛋白类; 造血系细胞特异蛋白-1

Inhibitive effect of carbon monoxide-releasing molecules 2 on the expression of glycoproteins and activation of platelets in sepsis SUN Bing-wei, QIU Xue-feng, WANG Min, WANG Bo, YANG Guo-tao, SUN Yan, CHEN Xi. Department of Burns and Plastic Surgery, The Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

Corresponding author: SUN Bing-wei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the inhibitive effects and potential mechanisms of carbon monoxide-releasing molecules II on the activation of platelets in sepsis. **Methods** One hundred and twenty BALB/c male mice were randomly divided into sham, CLP, CLP + iCORM-2 and CLP + CORM-2 (with 8 mg/kg CORM-2) group. The serum samples from each group were collected at 6 h, 12 h and 24 h post CLP. The serum levels of FIB and D-D were examined. Expression of platelet glycoproteins (CD61, CD62p) in platelet-rich plasma were examined using flow cytometry. Platelet aggregation were examined using platelet-aggregation meter. Also, the phosphorylation levels of HS1 in platelets were examined. **Results** The serum levels of FIB and D-D [(4.65 ± 0.73) g/L, (5.76 ± 0.88) g/L and (229.93 ± 62.91) mg/L, (182.96 ± 46.32) mg/L], expression of CD61, CD62p [$(94.87 \pm 11.22)\%$, $(95.93 \pm 7.43)\%$ and $(34.81 \pm$

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.12.029

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); 江苏省“333工程”科研基金(2010-75)

作者单位: 212001 江苏镇江, 江苏大学附属医院烧伤整形科

通讯作者: 孙炳伟, Email: sunbinwe@hotmail.com

4.76%)、(32.88 ± 6.94)%] and platelet aggregations in CLP mice increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with those of CLP group, the above index were decreased in CLP + CORM-2 group ($P < 0.05$). In parallel, the phosphorylation levels of HS1 in platelets were significantly downregulated in CLP mice treated with CORM-2 ($P < 0.05$). **Conclusions** Taken together these findings indicate that CORM-released CO downregulates the expression of platelet glycoproteins and inhibits activation of HS1 pathway in sepsis. The ability of CORM to inhibit the phosphorylation of HS1 might be one underlying mechanism explaining its inhibition of platelets activation and efficacy in the treatment of sepsis.

【Key words】 Platelet; Carbon monoxide; Sepsis; Membrane glycoproteins; HS1

脓毒症时由于炎性细胞因子的瀑布样释放,激活了凝血系统,同时纤溶系统及生理性的抗凝系统受到不同程度的抑制,血液处于高凝状态,微血管内微血栓广泛形成,导致微循环障碍,脓毒症进一步发展为严重脓毒症及脓毒症休克。血小板在此复杂的相互作用过程中起着非常重要的作用^[1-2],主要体现在血小板过度活化,发生大量的黏附与聚集,导致病理性血栓形成。研究表明,炎症反应和凝血系统改变与疾病的严重程度和死亡率密切相关。凝血系统的活化,促进炎症反应的进一步发展;炎症也可引起凝血系统活化,两者相互影响,共同促进脓毒症的恶化。可见,凝血系统异常在脓毒症发生、发展过程中具有重要作用,是脓毒症、MODS 发生的重要机制之一。主要的小血小板膜糖蛋白 GP II b/III a(即 CD41/CD61)、CD62p 和造血系细胞特异蛋白-1(HS1)等介导了上述病理过程^[3-5]。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]。我们的前期研究证明,外源性一氧化碳(CO)对脓毒症时严重炎症反应具有有效的抑制作用^[7-8],但对脓毒症时血小板活化的抑制作用未见报道。本研究采用小鼠盲肠结扎和穿孔术(CLP)脓毒症模型,以外源性一氧化碳释放分子 2(CORM-2)进行早期干预,观察它对血小板和凝血系统过度活化的抑制作用,旨在研究其对脓毒症时凝血系统的调节作用。

材料与方法

一、主要试剂与仪器

CORM-2 购自美国 Sigma 公司,使用前用二甲基亚砜(DMSO)溶解,同时配制无活性 CORM-2^[9]。羊抗鼠单抗 CD61-FITC、CD62P-PE,同型对照 IgG-FITC、IgG1-PE 均购自美国 Ebioscience 公司。兔抗 HS1 单克隆抗体、兔抗磷酸化-HS1(p-HS1)(Tyr)多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)偶联的山羊抗兔 IgG 及化学发光(ECL)试剂盒均购自英国 Santa Cruz Biotechnology 公司。FACSCalibur BD 流式细胞仪(美国 Becton Dickison 公司),二氧化碳培养箱(Napco 5400),高速低温台式离心机(美国 Beckman 公司),VMR 型小动物麻醉机(美国 Matrx 公司),全自动凝血分析仪(美国 Beckman Coulter 公司),500CA 型血细胞聚集仪(美国 Chrono-Log 公司)。

二、方法

1. 动物模型与分组:120 只雄性 BALB/c 小鼠(江苏大学实验动物中心),6~8 周龄,体质量(20 ± 2)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:对照组 30 只、CLP 组 30 只、CLP + iCORM-2 组 30 只、CLP + CORM-2 组 30 只,每组均设 6 h、12 h、24 h 三个时间点。CLP 组小鼠吸入异氟烷麻醉后行 CLP^[10];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 + iCORM-2 组小鼠除注射无活性的 CORM-2 外,处理同 CLP + CORM-2 组。

2. 小鼠血浆纤维蛋白原(FIB)、D-二聚体(D-D)的检测:伤后 6 h、12 h、24 h 各组小鼠分别严格无菌心脏采血 1.8 ml 注入 3.8% 柠檬酸钠(1:9)真空抗凝管(管内共抗凝血 2 ml),立即送检,全自动凝血分析仪检测全血中凝血因子 FIB、D-D 水平。

3. 血小板膜糖蛋白测定:伤后 6 h、12 h、24 h 各组小鼠异氟烷麻醉满意后,心脏采血,用 3.8% 柠檬酸钠抗凝后离心 1000 r/min,8 min,收集上清为富血小板血浆(PRP)于 EP 管中,加入 1% 多聚甲醛(终浓度)固定 15 min。每只小鼠 PRP 分装于 6 支 BD 试管,每管 50 μl;将羊抗鼠 CD61、CD62-p 及 IgG 对照各 10 μl 分别加

入对应的6支BD试管中;各BD试管置于微型涡旋混合器上混匀0.5 s后,室温、避光20 min;各BD试管中加2 ml生理盐水,涡旋混合器上混匀0.5 s后,1500 r/min,5 min离心,弃上清;各BD试管中加250 μ l生理盐水,488 nm氩离子激光灯下流式细胞仪检测荧光标记阳性的血小板百分数(%)。

4. 全血电阻法检测血小板聚集功能:带有磁棒的反应杯插入温育孔,温育10 min,设置磁棒旋转速度1200 r/min。加入0.5 ml抗凝血和0.5 ml生理盐水到温育好的反应杯中混合。加入聚集试剂ADP 10 μ l(注意不触碰电极),运行6~9 min至平稳。在血细胞聚集仪菜单中选择comput,计算聚集率和坡度(坡度代表单位时间内聚集率的变化)。

5. 蛋白质印迹法(Western blot)检测总HS1和p-HS1:按本实验室常规方法^[11],收集24 h各组小鼠血小板经裂解后冰浴静置1 h,然后4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min(离心半径为6.0 cm)离心25 min,提取各组胞质蛋白,采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度(mg/mL),-80 $^{\circ}$ C保存。每个样品取50 μ g总蛋白,电泳后电转移至PVDF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p-HS1多克隆抗体,抗体均1:500稀释,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST漂洗4次后,加入HRP耦联的山羊抗兔IgG(1:5000稀释),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBST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,数据以均数 \pm 标准差表示。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件分析。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用重复测量设计的方差分析和2组独立样本间的t检验。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1. CORM-2对CLP小鼠血浆凝血因子FIB、D-D水平的影响(表1):血浆凝血因子FIB 6 h时间段各组间无显著性差异;12 h、24 h时间段CLP组小鼠FIB的含量较假手术组明显增加($P < 0.01$),CLP+CORM-2组表达则明显低于CLP组($P < 0.05$)。6 h、12 h时间段CLP组小鼠全血中D-D的水平较假手术组明显增加($P < 0.01$),CLP+CORM-2组水平明显低于CLP组($P < 0.01$);24 h组各组间虽有变化趋势,但差异无统计学意义。

表1 各组小鼠各时间点血浆FIB和D-D水平($\bar{x} \pm s$)

组别	FIB(g/L)			D-D(mg/L)		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	2.53 \pm 0.41	2.53 \pm 0.41	2.53 \pm 0.41	107.57 \pm 28.86	107.57 \pm 28.86	107.57 \pm 28.86
CLP组	2.57 \pm 0.54	4.65 \pm 0.73 ^a	5.76 \pm 0.88 ^a	284.20 \pm 51.84 ^a	229.93 \pm 62.91 ^a	182.96 \pm 46.32
CLP+iCORM-2组	3.09 \pm 0.18 ^a	5.99 \pm 0.20 ^a	4.89 \pm 0.49 ^a	277.47 \pm 63.92 ^a	199.45 \pm 40.34	199.45 \pm 40.34
CLP+CORM-2组	2.49 \pm 0.42	3.32 \pm 0.42 ^b	3.68 \pm 0.46 ^b	169.57 \pm 35.14 ^b	141.82 \pm 18.46 ^b	143.26 \pm 40.39

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与CLP组比较,^b $P < 0.05$

2. CORM-2对CLP小鼠血小板膜糖蛋白CD61、CD62p表达的影响:CLP组小鼠CD61阳性的血小板百分比在6 h组中较假手术组[(68.34 \pm 15.64)%]明显增加[(98.49 \pm 9.28)%, $P < 0.01$],12 h、24 h组依然差异显著[分别为(94.87 \pm 11.22)%,(95.93 \pm 7.43)%, $P < 0.05$];在各时间段中CLP+CORM-2组表达同样低于CLP组[分别为(77.23 \pm 7.53)%,(72.12 \pm 11.67)%,(73.68 \pm 8.76)%, $P < 0.05$](图1)。同样,6 h、12 h和24 h各时间段中CLP组小鼠血浆中CD62p阳性的血小板百分比比较假手术组[(13.58 \pm 2.68)%]明显增加[分别为(30.66 \pm 7.62)%,(34.81 \pm 4.76)%,(32.88 \pm 6.94)%, $P < 0.01$];CLP+CORM-2组表达也明显低于CLP组[分别为(18.12 \pm 8.32)%,(21.38 \pm 1.61)%,(24.65 \pm 5.96)%, $P < 0.05$]。CORM-2对CLP小鼠血小板聚集功能的影响6 h、12 h组CLP组小鼠血小板聚集后电阻值与假手术组无统计学差异,但在24 h CLP组小鼠血小板聚集增加导致电阻曲线下降幅度最大,斜率最大,较假手术组明显增加($P < 0.01$)(图2a)。CLP+CORM-2组曲线变化明显较CLP组平滑,血小板电阻值明显降低,即血小板聚集率明显低于CLP组($P < 0.01$)(图2b)。

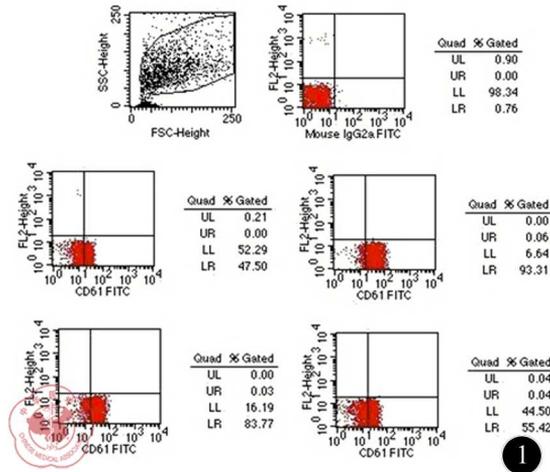


图1 各组小鼠血小板膜糖蛋白CD61阳性百分比 1.假手术组 (47.50%) ; 2.CLP组 (93.31%) ; 3.CLP+iCORM-2组 (83.77%) ; 4.CLP+CORM-2组 (55.42%)

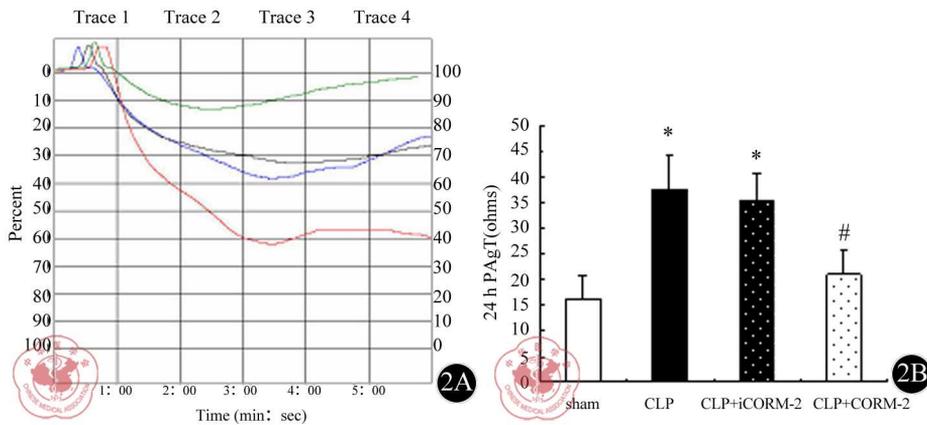


图2 各组小鼠血小板聚集率变化 2A: 24 h时间点CLP组小鼠血小板聚集增加导致电阻曲线下降幅度最大, 斜率最大 (红色线条), CORM干预组电阻下降明显 (黑色线条); 2B: 各组血小板电阻值, 与sham组比较, * $P < 0.01$; 与CLP组比较, # $P < 0.05$ 。CORM2为外源性一氧化碳释放分子2, iCORM-2为无活性

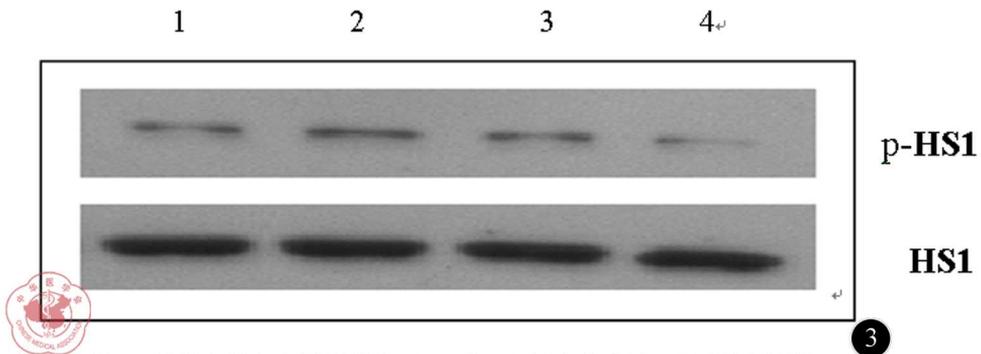


图3 各组小鼠血小板磷酸化HS1、总HS1蛋白的表达 1.正常对照组, 2.CLP组, 3. CLP+iCORM-2组, 4.CLP+CORM-2组

3. CORM-2 对 CLP 小鼠血小板 HS1 蛋白磷酸化的影响:CLP 组、CLP + iCORM 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)]较正常对照组(0.40 ± 0.07)增加($P < 0.01$);CLP + CORM-2 组小鼠血小板磷酸化 HS1 蛋白相对表达量(0.38 ± 0.09)下降($P < 0.05$)(图3)。

讨 论

凝血系统的异常在脓毒症的发生、发展过程中具有重要作用。脓毒症时机体的大量凝血因子被激活,凝血系统活化,使其功能紊乱,并促进炎症反应的进一步发展,后者亦可引起前者的活化,两者相互影响,共同促进脓毒症的恶化。血小板在炎症和凝血之间复杂的相互作用中占据着非常重要的介导位置^[1-2]。本研究是我们在前期研究^[7-8]的基础上,使用了外源性 CO 分子对脓毒症进行干预,探讨了其对凝血系统,尤其是血小板活化的影响。

CO 是机体内一种重要的化学气体信使,参与了炎症反应引起的氧化应激反应、缺血再灌注损伤、内毒素休克^[12-13]等病理过程,发挥着重要的抗炎、抗凋亡和细胞保护作用。因此 CO 作为炎症反应一系列生理反应中的一种新的内源性介质和干预因子开始受到重视。既往常采用吸入 CO 作为外源性 CO 的来源,它的弊端较多:装置复杂、吸入浓度较难控制和维持、难以在实验需要时追加剂量、易导致碳氧血红蛋白(HbCO)血症等^[14]。近年合成的 CORM,可以通过溶解后释放 CO 发挥生理作用,在一定生理剂量时并不提高动物体内 HbCO 的浓度。我们既往的研究已经证实,这组物质可以作为外源性 CO 的供体,对严重烧伤后早期重要脏器的炎症反应具有明显的抑制作用。

本研究中,CLP 小鼠经 CORM-2 干预后,重要的凝血因子 FIB 和 D-D 水平均明显降低。FIB 是纤维蛋白的前体,可溶性纤维蛋白原转变成不溶性纤维蛋白,使血液凝固。D-D 是纤溶酶对纤维蛋白降解的产物之一,其含量变化可以作为体内高凝状态和纤溶亢进的标注。本研究结果显示 CORM-2 干预后可有效改善血液的高凝状态。

血小板活化是凝血系统激活过程中的重要事件,在脓毒症的早期阶段,即可发生血小板激活和聚集。血小板在脓毒症所致的多器官功能障碍综合征中扮演了重要角色,在脓毒症的发生、发展和转归中具有重要作用。但血小板在这一综合征中的特殊角色还没有被完全阐明。血小板活化包括 3 个方面:黏附、聚集和释放,三者相互促进。研究表明,血小板活化反应都是通过其表面重要的膜糖蛋白(GP II b/III a,即 CD41/CD61、P-选择素,即 CD62p 等)的功能实现的^[3,4,15]。因此,研究血小板重要的膜糖蛋白及其调节因子的功能,是探索血小板活化干预措施、有效阻断脓毒症时凝血系统活化的重要环节。本研究提示,外源性 CO 可以明显抑制血小板膜糖蛋白 CD61、CD62p 的表达,这与 CO 干预后血小板聚集率明显下降的结果高度一致,说明血小板的活化被一定程度抑制,从另一个方面抑制了脓毒症时凝血系统的活化。

HS1 是一种分子量为 75 kDa 的适应性蛋白,特异性地表达在造血系细胞。HS1 是属亲水性蛋白,含有 6 个磷酸化位点,一个 HS1 相关蛋白(HAX1)结合位点,一个富脯氨酸区域和一个 SH3 结构域^[16]。在静息血小板,HS1 位于胞质中,血小板活化过程中转位至胞膜。目前已证实的主要血小板酪氨酸激酶是非受体型的,主要有包括 Src 激酶家族、Syk 等。最新的研究表明,HS1 是血小板受刺激后活化过程中的一个关键信号分子,血小板重要的膜糖蛋白(如 PARs、GPVI)的活化信号均经 HS1 而得以传导,我们的初步研究结果首次提示,CORM-2 分子干预 CLP 小鼠,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,在脓毒症时血小板的活化,诱发一系列血小板由外到内和由内到外的信号转导,导致血小板聚集和血小板血栓形成的过程中起着极其重要的作用。对膜糖蛋白受体及其信号传导通路,尤其是关键分子 SH1 的磷酸化,进行更深入的研究,进一步发现脓毒症干预的新靶位,可能为临床脓毒症的治疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Tynl K. Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis. *Microcirculation*, 2011, 18: 152-162.

- [2] Durila M, Kalinčík T, Jurčenko S, et al. Arteriovenous differences of hematological and coagulation parameters in patients with sepsis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2010, 21:770-774.
- [3] 董宁征, 崔宇杰, 阮长耿. 人源性抗血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 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, 25:65-68.
- [4] Covic L, Misra M, Badar J, et al. Pepsducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med*, 2002, 8:1161-1165.
- [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, 110:2449-2456.
- [6] Sun BW, Chen X. Carbon monoxide releasing molecules: New insights for anticoagulation strategy in sepsis. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66:365-369.
- [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反应的抑制作用. *中华烧伤杂志*, 2007, 23:179-184.
- [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, 87:3148-3151.
- [9] Sun B, Sun Z, Jin Q, et al. CO-releasing molecules (CORM-2)-liberated CO attenuates leukocytes infiltration of in the renal tissue of thermally injured mice. *Int J Biol Sci*, 2008, 4:176-183.
- [10] Muenzer JT, Davis CG, Dunne BS, et al. Pneumonia after cecal ligation and puncture; a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. *Shock*, 2006, 26:565-570.
- [11] Sun B, Zou XQ, Chen YL, et al. Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC. *Int J Biol Sci*, 2008, 4:270-278.
- [12] Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, et al. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB J*, 2004, 18:854-856.
- [13] Nakao A, Moore BA, Murase N, et al. Immunomodulatory effects of inhaled carbon monoxide on rat syngeneic small bowel graft motility. *Gut*, 2003, 52:1278-1285.
- [14] Motterlini R, Mann BE, Johnson TR, et al. Bioactivity and pharmacological actions of carbon monoxide-releasing molecules. *Curr Pharm Des*, 2003, 9:2525-2539.
- [15] 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, 14:254-256.
- [16] 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, 19:614-623.

(收稿日期:2011-04-02)

(本文编辑:吴莹)

孙炳伟, 仇雪枫, 王敏, 等. 外源性一氧化碳分子对脓毒症时血小板膜糖蛋白过度表达和血小板活化的抑制作用及机制[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(12):3532-3537.