

- [5] 郑玉娜,李玉玲,季成叶,等. 3~6岁双生子体型遗传分析[J]. 中国公共卫生,2012,28(11):1433-1435.
- [6] 孔庆胜,李晶,王文军,等. 济宁市双生子心理行为发育状况及遗传度分析[J]. 中国公共卫生,2009,25(3):274-275.
- [7] 汪向东,王希林,马弘,等. 心理卫生评定手册(增订版)[M]. 北京:中国心理卫生杂志社,1999:65-68.
- [8] 季成叶. 现代儿童少年卫生学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2010:158.
- [9] Neale MC, Boker SM, Xie G, et al. Mx: statistical modeling [CP]. 6th ed, Richmond, VA: Department of Psychiatry, Virginia Institute for Psychiatric and Behavioral Genetics, Virginia Commonwealth University, 2002.
- [10] Cyphers LH, Phillips K, Fulker DW, et al. Twin temperament during the transition from infancy to early childhood[J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 1990, 29: 392-397.
- [11] Isen JD, Baker LA, Raine A, et al. Genetic and environmental influences on the junior temperament and character inventory in a preadolescent twin sample[J]. Behav Genet, 2009, 39: 36-47.
- [12] Krueger RF, Johnson W. Behavioral genetics and personality [M]//Pervin LA, John OP, Robins RW. (Eds.), Handbook of personality: theory and research, 3rd ed. New York: Guilford, 2008: 287-310.
- [13] Krueger RF, South S, Johnson W, et al. The heritability of personality is not always 50%: gene-environment interactions and correlations between personality and parenting[J]. Journal of Personality, 2008, 76(6): 1485-1521.

收稿日期:2013-04-09

(张翠编辑 韩仰欢校对)

· 实验研究 ·

植物花色苷对血小板凋亡通路中 BCL2 家族影响*

陈礼仪¹, 田金举¹, 任婧¹, 邓秀娟¹, 陈曦翌², 谢瑾¹, 丁焱¹, 杨燕¹

摘要:目的 探讨花色苷矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3-g)对血小板凋亡通路中 BCL2 家族影响。方法 采集健康志愿者外周静脉血,制备纯化血小板悬液;纯化后的血小板与终浓度为 0.5、5、50 μmol/L 花色苷 Cy-3-g 孵育,胶原作为凋亡诱导剂诱导血小板凋亡后,采用流式细胞仪测定血小板凋亡率,提取总蛋白用 western blot 检测抗凋亡蛋白 BCL-XL,促凋亡蛋白 BAK、BAX、BID 及 cleaved BID 蛋白表达量。结果 与对照组比较,5 μmol/L 花色苷能够明显增加血小板凋亡率;与对照组比较,5、50 μmol/L 花色苷组 BCL-XL 蛋白表达水平[分别为(0.739±0.047)、(0.884±0.004)]明显下调,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与对照组比较,5、50 μmol/L 花色苷组 BAK、BAX、BID 蛋白表达水平[分别为 BAK:(1.667±0.063)、(1.531±0.039), BAX:(2.271±0.165)、(1.895±0.018), BID:(1.861±0.231)、(1.311±0.121)]明显上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 花色苷能够通过调控 BCL2 家族蛋白的表达水平促进血小板凋亡。

关键词:花色苷;血小板凋亡;BCL2 家族

中图分类号:R 151.4⁺1 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)01-0067-03 DOI:10.11847/zgggws2014-30-01-20

Effects of anthocyanin on BCL2 family of platelet apoptosis pathway

CHEN Li-yi*, TIAN Jin-ju, REN Jing, et al (* Department of Nutrition, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province 510080, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of anthocyanin cyanidin-3-glucoside (Cy-3-g) on BCL2 family of platelet apoptosis pathway. **Methods** Peripheral venous blood samples of healthy volunteers were collected and purified platelet suspension was prepared. Gel-filtered platelets were pre-incubated with 0.5, 5, and 50 μmol/L Cy-3-g and induced by collagen. Flow cytometry was used to measure platelet apoptosis rate and total platelet proteins were extracted; the expressions of anti-apoptotic proteins BCL-XL and pro-apoptotic proteins BAK, BAX, BID and cleaved BID were quantified with western blot. **Results** Compared with the control group, 5 μmol/L Cy-3-g significantly increased the rate of platelet apoptosis and 5 μmol/L (0.739±0.047), 50 μmol/L (0.884±0.004) Cy-3-g effectively reduced expression of anti-apoptotic protein BCL-XL in platelets ($P < 0.01$). Compared with the control group, 5, 50 μmol/L Cy-3-g significantly promoted the expressions of pro-apoptotic proteins BAK, BAX, BID and the differences were of statistic significance at concentrations of 5 μmol/L (1.667±0.063, 2.271±0.165, 1.861±0.231) and 50 μmol/L (1.531±0.039, 1.895±0.018, 1.311±0.121), respectively (all $P < 0.05$). **Conclusion** Cy-3-g effectively promotes platelet apoptosis by affecting the proteins expression of BCL2 family.

Key words: anthocyanins; platelet apoptosis; BCL2 family

* 基金项目:国家自然科学基金(81372978);国家大学生创新项目(201210558086);2013年广东省医学科学技术研究基金;高校基本科研业务费中山大学,青年教师培育项目(12ykpy12);中山大学实验室开放基金(KF201213);中山大学医科2012年第一批学生业务科研立项项目

作者单位:1. 中山大学公共卫生学院营养系 广东省营养膳食与健康重点实验室,广东广州 510080; 2. 中山大学中山医学院

作者简介:陈礼仪(1987-),男,广东韶关人,硕士在读,研究方向:营养与慢性非传染性疾病的预防。

通讯作者:杨燕, E-mail: yangyan3@mail.sysu.edu.cn

数字出版日期:2013-12-23 11:13

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20131223.1113.002.html

多项研究证实血小板凋亡作为血小板体内清除的重要途径之一^[1],在动脉粥样硬化等疾病的发生发展过程中发挥着重要作用^[2]。血小板凋亡分为内源性和外源性途径,其中内源性途径在血小板凋亡中起主要调控作用^[3],而 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, BCL2) 家族中各种蛋白的表达调控在内源性途径中又具有重要作用。因此,有效干预 BCL2 家族有可能成为治疗和预防动脉粥样硬化的一个重要途径。花色苷良好的调控凋亡的作用已被广泛证实^[4],本研究采用花色苷纯品矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyaniding-3-glucoside, Cy-3-g)为受试物,以胶原作为凋亡诱导剂,探讨花色苷对健康人血小板 BCL2 家族的影响及可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器 Cy-3-g (挪威 Polyphenol AS 公司),牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(美国 AMRESCO 公司),哌嗪-1,4-二乙磺酸(piperazine-1,4-bisethanesulfonic acid, PIPES)、Collagen(美国 CHRONO-LOG 公司),抗兔单克隆抗体 B 细胞淋巴瘤/白血病-XL(B cell lymphoma/leukemia-XL Rabbit mAb, BCL-XL)、抗兔多克隆抗体 BCL-2 相关 X 蛋白(BCL-2 associated X protein rabbit mAb, BAX)、K 蛋白(BAK)、抗兔多克隆抗体 BH3 相互作用基团死亡促进因子(BH3 interacting domain death agonist rabbit mAb, BID)(美国 Cell Signaling 公司)。Annexin V-FITC 流式抗体、FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司),荧光酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

1.2 指标与方法

1.2.1 富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)制备 肘静脉穿刺术采取健康志愿者(至少 2 周内未服用抗血小板或阿司匹林类药物)静脉血 10 mL(禁用止血带),加入枸橼酸-枸橼酸盐葡萄糖抗凝剂(1:9)并轻轻摇匀,1 000 r/min 离心 7 min 后分离出 PRP,将剩余的单核细胞层和下层部分细胞收集,1:1 加入等体积缓冲液,1 000 r/min 离心 5 min,再次收集上清和单核细胞层,2 次合并为 PRP。采用 Sepharose 2B 凝胶过滤系统分离 PRP,过滤出来的即为纯化血小板,用缓冲液调节血小板的浓度至 $(2 \sim 3) \times 10^8 / \text{mL}$ 。

1.2.2 血小板凋亡率检测 将纯化血小板分为 4 组,分别为对照组及花色苷低、中、高剂量组(Cy-3-g 终浓度分别为 0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 40 min,加入终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的胶原孵育 10 min,各组血小板与 Annexin V-FITC 常温避光孵育

15 min 后加入胶原,用流式细胞仪检测血小板凋亡率。

1.2.3 血小板抗凋亡蛋白 BCL-XL 表达 分组同 1.2.2,按常规方法提取总蛋白,制备蛋白样品。聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹(Western blot)法测定蛋白表达水平。

1.2.4 血小板促凋亡蛋白 BAX、BAK、BID 及 cleaved BID 表达 分组同 1.2.2,按照美国 Cell Signaling 公司抗体试剂盒说明书操作,检测 BAX、BAK、BID 及 cleaved BID 蛋白的表达水平。

1.3 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,各组间比较采用单因素方差分析与 Dunnett-t 检验, $P < 0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 花色苷对血小板凋亡率影响 对照组、0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组血小板凋亡率分别为 $(6.115 \pm 0.805)\%$ 、 $(6.020 \pm 1.502)\%$ 、 $(10.50 \pm 3.569)\%$ 、 $(4.713 \pm 0.349)\%$;与对照组比较,5 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组血小板凋亡率明显升高($P < 0.01$)。

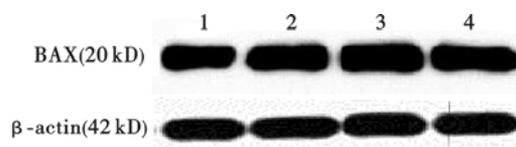
2.2 花色苷对血小板抗凋亡蛋白 BCL-XL 表达影响(图 1) 对照组、0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组血小板 BCL-XL 表达水平分别为 (1.000 ± 0.001) 、 (0.972 ± 0.028) 、 (0.739 ± 0.047) 、 (0.884 ± 0.004) ;与对照组比较,5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组 BCL-XL 表达水平下调,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中以 5 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组下调效果最明显。



注:1:对照组;2,3,4:0.5,5,50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组。

图 1 花色苷抑制胶原诱导的血小板凋亡中 BCL-XL 蛋白的表达

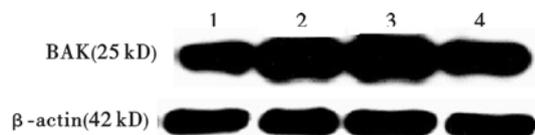
2.3 花色苷对血小板促凋亡蛋白 BAX 表达影响(图 2) 对照组、0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组血小板 BAX 蛋白表达分别为 (1.000 ± 0.010) 、 (1.665 ± 0.255) 、 (2.271 ± 0.165) 、 (1.895 ± 0.018) ;与对照组比较,花色苷各组 BAX 蛋白表达水平均上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中以 5 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组上调效果最明显。



注:1:对照组;2,3,4:0.5,5,50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组。

图 2 花色苷促进胶原诱导的血小板凋亡中 BAX 蛋白的表达

2.4 花色苷对血小板促凋亡蛋白 BAK 表达影响 (图 3) 对照组、0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组血小板 BAK 蛋白表达水平分别为 (1.000 ± 0.087) 、 (1.715 ± 0.055) 、 (1.667 ± 0.063) 、 (1.531 ± 0.039) ;与对照组比较,花色苷各组 BAK 蛋白表达水平均上调,差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中以 0.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷效果较好。



注:1:对照组;2、3、4:0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组。

图 3 花色苷促进胶原诱导的血小板凋亡中 BAK 蛋白的表达

2.5 花色苷对血小板促凋亡蛋白 BID 及 cleaved BID 表达影响 (图 4) 对照组、0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组血小板 BID 及 cleaved BID 蛋白表达水平分别为 $[(1.000 \pm 0.010)$ 、 $(1.000 \pm 0.040)]$ 、 $[(1.657 \pm 0.145)$ 、 $(1.510 \pm 0.020)]$ 、 $[(1.861 \pm 0.231)$ 、 $(1.587 \pm 0.025)]$ 、 $[(1.311 \pm 0.121)$ 、 $(1.141 \pm 0.020)]$;与对照组比较,花色苷各组 BID 及 cleaved BID 蛋白表达水平均上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中以 0.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷效果较好。



注:1:对照组;2、3、4:0.5、5、50 $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组。

图 4 花色苷促进胶原诱导的血小板凋亡中 BID 及 cleaved BID 蛋白的表达

3 讨论

细胞凋亡是细胞在正常生长发育过程中或病理条件下的一种主动性死亡^[5],目前已知能诱导血小板凋亡的刺激有:钙离子载体、凝血酶、二磷酸腺苷、胶原等,其中胶原诱导的血小板凋亡主要是通过诱导线粒体凋亡通路,因此本研究采用胶原作为诱导血小板凋亡的诱导剂,结果表明胶原能够诱导血小板凋亡的发生,与以往的研究结果一致^[3]。

胶原诱导的血小板凋亡主要通过线粒体凋亡通路发挥作用,而 BCL2 家族在线粒体凋亡通路的调控中具有重要地位。BCL2 家族分为促凋亡蛋白 (BAX、BAK、BID 等) 和抗凋亡蛋白 (BCL2、BCL-XL 等) 2 类。BCL2 和 BCL-XL 是 BCL2 家族中主要的抗凋亡蛋白^[6-7],通过其同源结构域 3 与

BCL2 家族的促凋亡蛋白形成异二聚体,从而维持促凋亡成员在胞内的定位分布,保护细胞不进入凋亡程序^[8]。有研究报道 BCL2 家族中抗凋亡蛋白 BCL-XL 是血小板存活的关键调控蛋白。BCL-XL 和血小板内促凋亡蛋白 BAX/BAK 以类似于“开关”的方式调控血小板的存活:当 BCL-XL 降解、胞内含量下降时,血小板会通过 BAX/BAK 的作用而凋亡,最后被清除^[9-10]。本研究结果表明,花色苷孵育纯化血小板 40 min 后,可以促进血小板凋亡;BCL-XL 的表达明显下调,BAX、BAK、BID 和 cleaved BID 的表达明显上调。提示花色苷对血小板凋亡 BCL2 家族的蛋白表达有明显的调控作用,BCL2 家族蛋白尤其是抗凋亡蛋白 BCL-XL 可能是花色苷促进血小板凋亡的调控机制之一。本研究结果显示,在 BCL-XL 表达下降同时,BAX/BAK 表达明显上升,但 50 $\mu\text{mol/L}$ 组的花色苷对血小板 BCL-XL 的抑制效果相对 5 $\mu\text{mol/L}$ 组较弱,在花色苷促血小板凋亡率中也出现相似情况,因此,花色苷通过对 BCL2 家族的调控促进血小板凋亡的剂量效应关系仍需进一步研究探讨。

参考文献

- [1] 赵丽丽,阮长耿,戴克胜,等.血小板凋亡的最新研究进展[J].中华血液学杂志,2012,33(8):687-689.
- [2] Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2011, 2011(1):51-61.
- [3] Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet [J]. Blood Reviews, 2012, 26(2):51-63.
- [4] Xia M, Ling W, Zhu H, et al. Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation [J]. Atherosclerosis, 2009, 202(1):41-47.
- [5] 白剑英,孟紫强.细胞凋亡抑制蛋白的研究进展[J].中国公共卫生,2003,19(6):761-763.
- [6] Vogler M, Hamali HA, Sun XM, et al. BCL2/BCL-X(L) inhibition induces apoptosis, disrupts cellular calcium homeostasis, and prevents platelet activation [J]. Blood, 2011, 117(26):7145-7154.
- [7] Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(1):61-66.
- [8] Degterev A, Lugovskoy A, Cardone M, et al. Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL [J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(2):173-182.
- [9] Gyulkhandanyan AV, Mutlu A, Freedman J, et al. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications [J]. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2012, 33(4):397-411.
- [10] Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span [J]. Cell, 2007, 128(6):1173-1186.