

# 抗霉素 A 诱导血小板凋亡的分子机制研究

胡 萍<sup>1</sup>, 朱永明<sup>1,2</sup>, 谢如锋<sup>2</sup>, 王志成<sup>3</sup>

**摘要** 目的 探讨抗霉素 A (AMA) 诱导血小板凋亡及其分子机制。方法 取健康志愿者单采血小板,离心洗涤得到洗涤血小板,将洗涤血小板与不同浓度的 AMA 孵育后,流式细胞术检测线粒体跨膜电位 ( $\Delta\Psi_m$ ) 去极化、磷脂酰丝氨酸 (PS) 暴露、细胞内活性氧 (ROS)、线粒体 ROS、P-选择素表达和整合素  $\alpha IIb\beta3$  活化; Western blot 法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3) 的活化。在抑制试验中,先将洗涤血小板与线粒体靶向的 ROS 拮抗剂 Mito-TEMPO 预孵育,然后再与 AMA 孵育,流式细胞术检测相关凋亡指标。结果 AMA 剂量依赖性诱导血小板  $\Delta\Psi_m$  去极化、PS 暴露、细胞内 ROS 和线粒体 ROS 升高以及 Caspase-3 活化;但是 AMA 不能诱导血小板活化。线粒体靶向的 ROS 拮抗剂抑制 AMA 诱导的血小板  $\Delta\Psi_m$  去极化、PS 暴露、Caspase-3 活化以及线粒体 ROS 的生成。结论 AMA 能够诱导血小板发生凋亡,线粒体 ROS 可能在 AMA 诱导的血小板凋亡过程中起重要作用。

**关键词** 血小板; 凋亡; 抗霉素 A; 线粒体; 活性氧

中图分类号 R 331.1+43

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1588-06

抗霉素 A (Antimycin A, AMA) 是一类由链霉菌产生的大环内脂类天然抗生素,是一种线粒体抑制剂,能够抑制线粒体电子传递链细胞色素 b 和细胞色素 c 之间的电子传递,从而导致线粒体内膜质子梯度的崩溃,破坏线粒体跨膜电位 (mitochondrial transmembrane potential  $\Delta\Psi_m$ )。同时,这种抑制作用也会引起细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的积累<sup>[1]</sup>。有证据<sup>[2-3]</sup>表明 ROS 的存在和  $\Delta\Psi_m$  的去极化都可以使线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放,

这与类似细胞色素 c 等凋亡前分子释放到胞质从而发生一系列凋亡事件相关。现已发现 AMA 可以诱导肺癌细胞、内皮细胞、近肾小球细胞、HeLa 细胞等多种细胞<sup>[1-4]</sup>发生凋亡,并且伴随胞内 ROS 浓度的升高。生理诱导剂和化学化合物都可以引起血小板的凋亡<sup>[5-6]</sup>,并且在体外血小板保存中,血小板会发生凋亡,这是血小板储存损伤 (PSL) 重要原因之一<sup>[7]</sup>,也是当今血小板保存面临的一个科学难题。在生理状态下,在控制循环血小板的数量和功能以及血小板相关性出血疾病中,血小板的凋亡可能发挥了至关重要的作用。该实验主要研究 AMA 是否能诱导人类血小板凋亡,并探究线粒体 ROS 在 AMA 诱导的血小板凋亡过程中的作用,从而进一步了解血小板的凋亡机制,为改善血小板的质量、延缓血小板凋亡的发生提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要抗体和试剂** AMA、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、四甲基罗丹明乙酯 (tetramethylrhodamine methyl ester, TMRE)、N-乙酰基半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC) 购自美国 Sigma 公司; 细胞内 ROS 荧光染料 CellROX Deep Red 购自美国 Life technologies 公司; 线粒体 ROS 荧光染料 MitoSOXTM Red 购自美国 Invitrogen 公司; 线粒体 ROS 拮抗剂 Mito-TEMPO 购自瑞士 Enzo Life Sciences 公司; 抗体 PE-CD62P、抗体 FITC PAC-1、FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; Caspase-3 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

**1.2 洗涤血小板制备** 新鲜健康献血者单采血小板以 2 950 r/min 离心 20 min 后弃上清液,用 CGS 缓冲液 (123 mmol/L 氯化钠, 33 mmol/L D-葡萄糖, 13 mmol/L 枸橼酸钠, pH = 6.5) 洗涤血小板 2 次, 2 950 r/min 离心 20 min,再用改良的台氏缓冲液 (modified tyrode buffer, MTB) (2.5 mmol/L HEPES, 150 mmol/L 氯化钠, 2.5 mmol/L 氯化钾, 12 mmol/L 碳酸氢钠, 1 mmol/L 氯化钙, 1 mmol/L 氯化镁, 5.5 mmol/L D-葡萄糖, pH = 7.4) 重悬,根据血小板计数情况,调整血小板浓度为  $3 \times 10^8$  个/ml。洗涤的血小板在室温静置 1~2 h,恢复到静息状态备用。

2015-06-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81270650); 上海市自然科学基金资助项目 (编号: 12ZR1429900)

作者单位: <sup>1</sup>华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

<sup>2</sup>上海市血液中心血液工程研究室, 上海 200051

<sup>3</sup>复旦大学附属华山医院检验科, 上海 200040

作者简介: 胡 萍, 女, 硕士研究生;

朱永明, 男, 研究员, 责任作者, E-mail: zhuyongming@sbc.org.cn;

王志成, 男, 助理研究员, 责任作者, E-mail: ahwzc@126.com

**1.3 线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )去极化检测** 洗涤血小板( $3 \times 10^8$ 个/ml)与不同浓度的 AMA(5、20、80  $\mu\text{mol/L}$ )混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光预处理30 min,DMSO作为AMA的溶液对照组。然后将 TMRE 加入到预处理的血小板中,使终浓度为100 nmol/L,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光反应20 min,用流式细胞术检测。

**1.4 磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine,PS)暴露检测** 洗涤血小板( $3 \times 10^8$ 个/ml)与不同浓度的 AMA(20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光预处理30 min,DMSO作为AMA的溶液对照组。将预处理后血小板稀释至终浓度为 $5 \times 10^7$ 个/ml,按 Annexin V 结合缓冲液:处理血小板:Annexin V-FITC 的浓度为50:10:2比例混匀,室温避光反应15 min,用流式细胞术检测。

**1.5 细胞内 ROS 和线粒体 ROS 的检测** 洗涤血小板( $3 \times 10^8$ 个/ml)分别装载 CellROX Deep Red (10  $\mu\text{mol/L}$ )和 MitoSOX<sup>TM</sup> Red(10  $\mu\text{mol/L}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min和15 min,用MTB液洗3次。预装载的血小板与不同浓度的 AMA(20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )混匀,DMSO作为AMA的溶液对照组。37  $^{\circ}\text{C}$ 避光预处理30 min后,用流式细胞术检测。

**1.6 血小板表面活化指标检测** 洗涤血小板( $3 \times 10^8$ 个/ml)与不同浓度的 AMA(20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )混匀,DMSO作为AMA的溶液对照组,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光预

处理30 min。P-选择素表达的检测:将 PE-CD62P 及同型对照 PE-IgG1 分别加入到预处理的血小板中;整合蛋白  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  的活化形式检测:将 FITC-PAC-1 及同型对照 FITC-IGM  $\kappa$  分别加入到预处理的血小板中,常温避光反应20 min,用流式细胞术检测。

**1.7 抑制试验** 洗涤血小板( $3 \times 10^8$ 个/ml)先与 Mito-TEMPO(10  $\mu\text{mol/L}$ )或溶剂对照37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min,然后再用 AMA 处理血小板,用流式细胞术检测相关指标。

**1.8 Western blot 法检测** 洗涤血小板( $3 \times 10^8$ 个/ml)与不同浓度的 AMA(20、40、80  $\mu\text{mol/L}$ )混匀,DMSO作为AMA的溶液对照组,37  $^{\circ}\text{C}$ 避光预处理30 min。然后加入等体积的裂解液(含8% 2-巯基乙醇)在冰上吹打抽提蛋白,煮沸5 min,离心取上清液。样品进行 SDS-PAGE,转移至硝酸纤维素滤膜,用抗 Caspase-3 单克隆抗体进行处理,胶片 X 光曝光显色。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间的比较采用配对  $t$  检验,多组均数的比较采用方差分析。

## 2 结果

**2.1 AMA 对血小板  $\Delta\Psi_m$  的影响** AMA 剂量依赖性诱导血小板  $\Delta\Psi_m$  去极化,见图1。

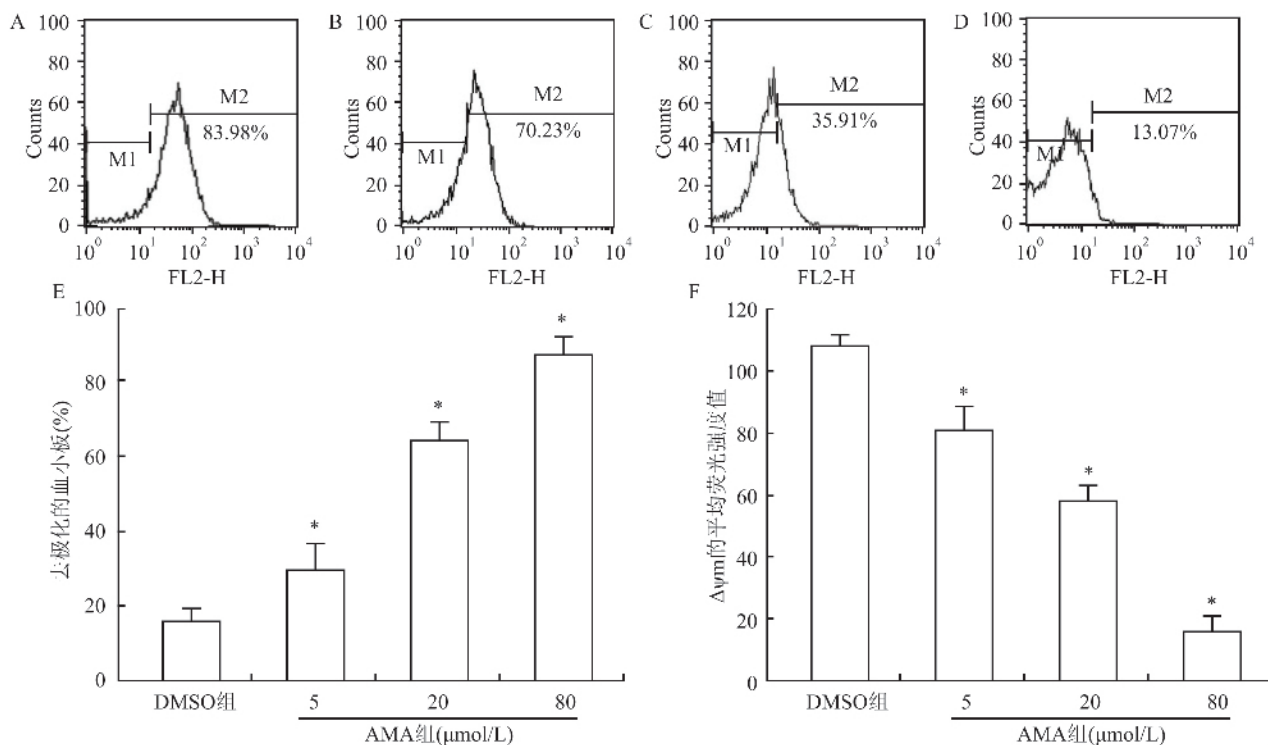


图1 AMA 诱导血小板  $\Delta\Psi_m$  去极化

A: DMSO 组; B: AMA(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; C: AMA(20  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; D: AMA(80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; E: 血小板去极化百分比(%); F: 血小板  $\Delta\Psi_m$  的平均荧光强度;与 DMSO 组比较: \*  $P < 0.05$

## 2.2 AMA 对血小板 PS 暴露的影响 AMA 剂量依赖性诱导血小板 PS 暴露, 见图 2。

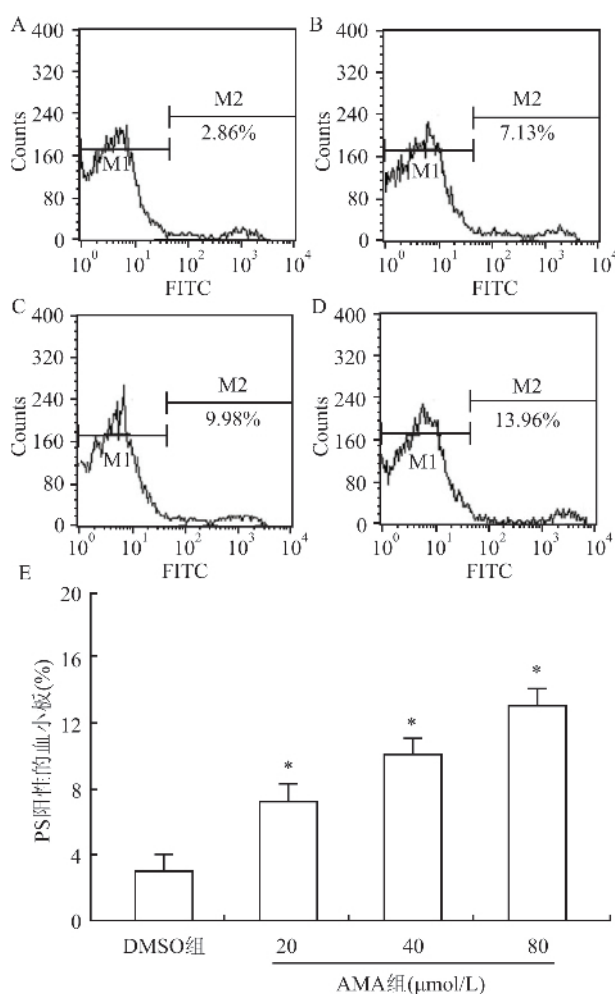


图2 AMA 诱导血小板 PS 暴露

A: DMSO 组; B: AMA (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; C: AMA (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; D: AMA (80  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; E: 血小板 PS 暴露阳性百分比 (%) ; 与 DMSO 组比较: \*  $P < 0.05$

## 2.3 AMA 对血小板细胞内 ROS 和线粒体 ROS 的影响 AMA 剂量依赖性诱导血小板细胞内 ROS 和线粒体 ROS 的生成, 见图 3。

## 2.4 AMA 诱导 Caspase-3 活化 AMA 浓度依赖地诱导 Caspase-3 产生 17 ku 活化片段, 见图 4。

## 2.5 AMA 对血小板活化的影响 与 DMSO 组相比, AMA 并不能明显引起血小板表面 P-选择素的表达和整合素 $\alpha\text{IIb}\beta3$ 活化, 见图 5。

## 2.6 抑制线粒体 ROS 对 AMA 诱导的血小板凋亡的影响 Mito-TEMPO 可以有效降低血小板线粒体 ROS 的水平(图 6A)。对于 $\Delta\Psi\text{m}$ 的去极化(图 6B)和 PS 暴露(图 6C)也具有明显抑制作用。

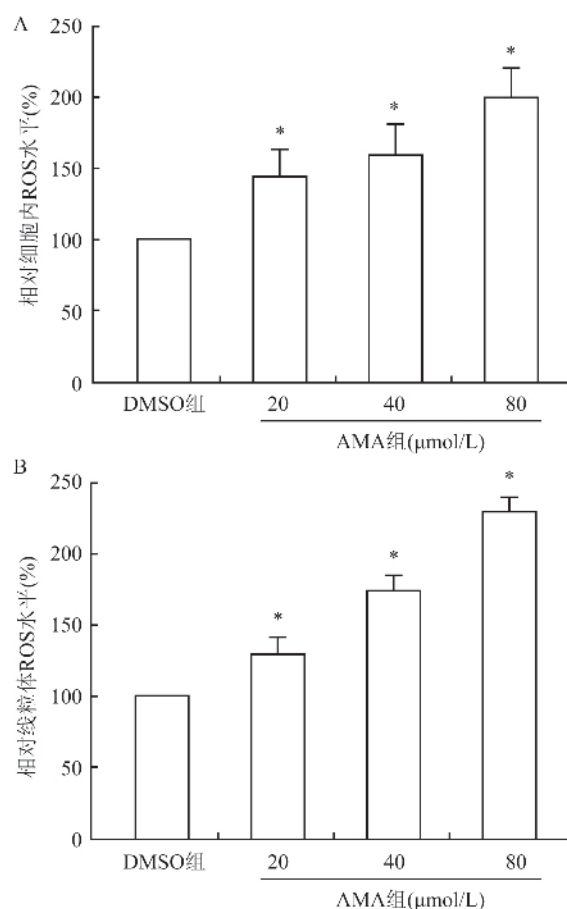


图3 AMA 对血小板细胞 ROS 和线粒体 ROS 水平的影响

A: 血小板细胞内 ROS 相对水平(除以 DMSO 组得到的百分比); B: 血小板线粒体 ROS 相对水平(除以 DMSO 组得到的百分比); 与 DMSO 组比较: \*  $P < 0.05$

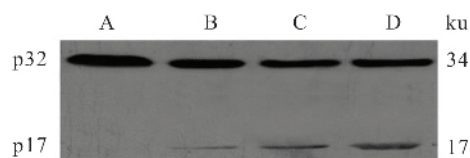


图4 AMA 诱导 Caspase-3 活化

A: DMSO 组; B: AMA (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 实验组; C: AMA (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 实验组; D: AMA (80  $\mu\text{mol/L}$ ) 实验组

## 3 讨论

研究<sup>[8]</sup>显示血小板和有核细胞一样,其凋亡也可分为外源途径及线粒体介导的内源途径,其中线粒体途径在血小板凋亡中起主要调控作用。血小板在不同诱导剂的作用下发生凋亡主要是通过线粒体途径,其凋亡的早期表现即  $\Delta\Psi\text{m}$  的去极化, Caspase-3 活化是线粒体凋亡途径的最终通路, Caspase-3 通常以 32 ku 的酶原形式存在于胞质,当被激活时会产生 17 ku 的活化片段<sup>[9]</sup>。本研究证实,

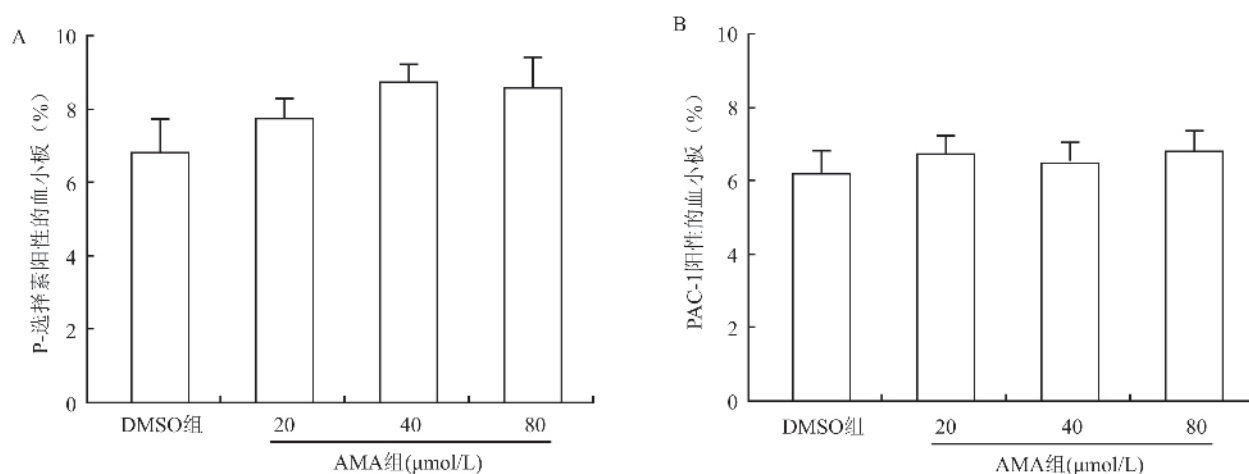
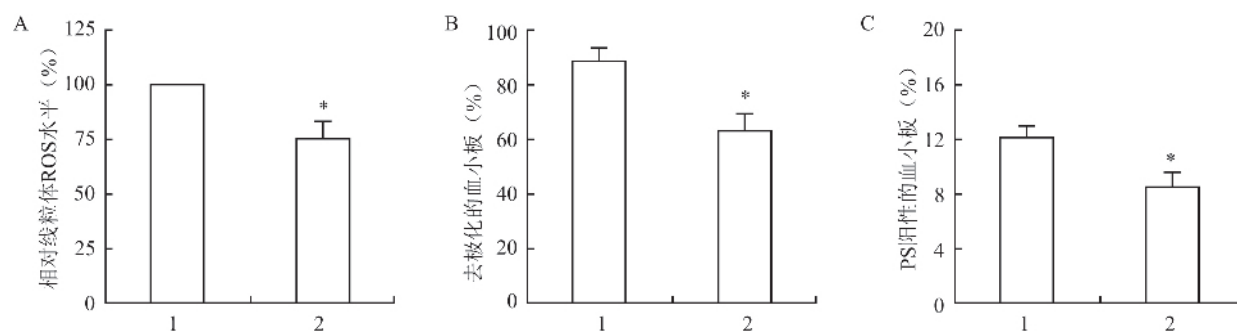
图5 血小板表面P-选择素的表达和整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 的活化A: 血小板表面P-选择素表达水平; B: 血小板表面整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 活化水平

图6 Mito-TEMPO对AMA诱导的血小板凋亡的影响

A: 线粒体ROS的相对水平(除以DMSO组得到的百分比); B: 血小板 $\Delta\Psi_m$ 去极化百分比; C: 血小板PS暴露阳性血小板百分比; 1: DMSO组; 2: Mito-TEMPO处理实验组; 与DMSO组比较: \*  $P < 0.05$ 

AMA存在剂量依赖诱导血小板 $\Delta\Psi_m$ 去极化和Caspase-3活化,这表明AMA诱导血小板凋亡主要是通过线粒体途径。血小板在强和弱诱导剂的作用下发生凋亡的共同特点是 $\Delta\Psi_m$ 的去极化和Caspase-3的活化,但是只有在强诱导剂的作用下血小板才会发生PS暴露<sup>[10]</sup>。本研究证实,AMA存在剂量依赖诱导血小板PS暴露,表明AMA是血小板强诱导剂。血小板凋亡和血小板活化都可以引起血小板表面PS暴露<sup>[6,10]</sup>。为了排除AMA诱导血小板活化的可能性,从而检测AMA对血小板的活化作用。血小板表面P-选择素的表达率和整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 活化率是血小板活化的显著表现之一,通过检测AMA处理后的血小板表面P-选择素的表达和PAC-1的结合,排除了AMA诱导血小板活化的可能。

ROS包括超氧阴离子、羟自由基和 $H_2O_2$ 等,细胞内ROS的产生与清除之间保持动态平衡<sup>[11]</sup>。AMA主要是抑制线粒体电子传递链的作用,这种抑

制作用可以破坏 $\Delta\Psi_m$ ,从而打破细胞内氧化还原平衡<sup>[1]</sup>。已有报道<sup>[14,12]</sup>AMA诱导肝脏细胞和人类肺癌细胞A549凋亡中细胞内 $H_2O_2$ 的积累发挥重要作用,另外,在人类肺上皮细胞中,AMA可以引起超氧阴离子的升高。为了验证线粒体ROS在AMA诱导的血小板凋亡过程中作用,分别检测AMA处理后的血小板细胞内和线粒体内的ROS水平变化,结果显示AMA剂量依赖地诱导血小板细胞内和线粒体ROS浓度升高。为了进一步证实ROS在AMA诱导血小板凋亡中的作用,用线粒体ROS靶向拮抗剂Mito-TEMPO和抗氧化剂NAC对血小板进行预处理,结果显示Mito-TEMPO可以明显抑制其诱导的凋亡,NAC也有部分抑制作用,但是效果并不十分明显(结果未显示)。抑制试验进一步证实线粒体ROS参与了AMA诱导血小板凋亡的调控。

在有核细胞中,线粒体凋亡通路是最普遍的凋亡机制,MPTP贯穿线粒体内膜和外膜,MPTP的开放是启动线粒体凋亡通路的重要步骤<sup>[2]</sup>。MPTP的

形成和开放与 ROS 有着密切的关系: 在人乳腺癌细胞中, MPTP 形成的决定性因素包括线粒体钙离子浓度和 ROS 的生成<sup>[12]</sup>, 但是在缺血性再灌注肌细胞中, 仅仅 ROS 浓度升高便可启动 MPTP 的形成<sup>[13]</sup>。血小板线粒体中也存在 MPTP, 并控制着凋亡的发生。受到强烈刺激的血小板的胞外钙离子的浓度的升高可以诱导 ROS 的生成, 从而增强 MPTP 的形成和 PS 的外翻<sup>[14-15]</sup>。本研究证实 AMA 能够剂量依赖性地诱导血小板线粒体 ROS 浓度升高, 提示 AMA 诱导血小板凋亡可能是通过引起线粒体 ROS 浓度的增加, 并在很大程度上影响 MPTP 不可逆性开放, 从而调控着血小板凋亡的发生。

血小板凋亡与机体的多种生理功能及病理过程密切相关, 凋亡可能是血小板在体内清除的重要途径之一。本研究显示 AMA 作为一种线粒体 ROS 促进剂可以有效地诱导血小板凋亡, 并且本研究结果表明线粒体 ROS 可能在血小板凋亡中起着至关重要的作用。这不仅有助于进一步了解血小板的凋亡机制、明确 MPTP 在血小板凋亡中起的作用, 而且在今后的研究中可以把 AMA 作为一种 ROS 促进剂从血小板代谢、形态、活化和凋亡以及功能等方面, 深入研究线粒体 ROS 在血小板储存损伤中发挥的重要作用, 进一步认识储存血小板发生凋亡的分子机制, 为延长血小板保存时间、提高血小板质量提供理论依据。

### 参考文献

- [1] Han Y H, Park W H. Tiron, a ROS scavenger, protects human lung cancer Calu-6 cells against antimycin A-induced cell death [J]. *Oncology Reports* 2009 21(1): 253-61.
- [2] Chen Y, Liu J, Zheng Y, et al. Uncoupling protein 3 mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> preconditioning-afforded cardioprotection through the inhibition of MPTP opening [J]. *Cardiovasc Res* 2015 105(2): 192-202.
- [3] Girish K S, Paul M, Thushara R M, et al. Melatonin elevates apoptosis in human platelets via ROS mediated mitochondrial damage [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 438(1): 198-204.
- [4] You B R, Park W H. The effects of antimycin A on endothelial cells in cell death, reactive oxygen species and GSH levels [J]. *Toxicology In Vitro* 2010 24(4): 1111-8.
- [5] Zhao L, Zhang W, Chen M, et al. Aspirin Induces platelet apoptosis [J]. *Platelets* 2013 24(8): 637-42.
- [6] Kumari S, Chaurasia S N, Kumar K, et al. Anti-apoptotic role of sonic hedgehog on blood platelets [J]. *Thromb Res* 2014 134(6): 1311-5.
- [7] Albanyan A M, Harrison P, Murphy M F. Markers of platelet activation and apoptosis during storage of apheresis-and buffy coat-derived platelet concentrates for 7 days [J]. *Transfusion* 2009 49(1): 108-17.
- [8] Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet [J]. *Blood Rev* 2012 26(2): 51-63.
- [9] 王志成, 谢如锋, 张晓峰. 钙调蛋白抑制剂诱导血小板 GP I b $\alpha$  酶切的分子机制研究 [J]. *中国输血杂志*, 2012 25(12): 1253-6.
- [10] Leytin V, Allen D J, Mykhaylov S, et al. Thrombin triggered platelet apoptosis [J]. *Thromb Haemost* 2006 86(12): 2656-63.
- [11] Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases [J]. *Free Radic Biol Med* 2011 51(7): 1289-301.
- [12] Cao X H, Zhao S S, Liu D Y, et al. ROS-Ca<sup>2+</sup> is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis [J]. *Chem Biol Interact* 2011 190(1): 16-27.
- [13] Kim J S, Jin Y, Lemasters J J. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 290(5): H2024-34.
- [14] Choo H J, Saafir T B, Mkumba L, et al. Mitochondrial calcium and reactive oxygen species regulate agonist-initiated platelet phosphatidylserine exposure [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 32(12): 2946-55.
- [15] Thushara R M, Hemshekhar M, Sunitha K, et al. Sesamol induces apoptosis in human platelets via reactive oxygen species-mediated mitochondrial damage [J]. *Biochimie* 2013 95(11): 2060-8.

## Study of molecular mechanisms on platelet apoptosis induced by antimycin A

Hu Ping<sup>1</sup>, Zhu Yongming<sup>1,2</sup>, Xie Rufeng<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Institute of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062;

<sup>2</sup>Shanghai Blood Center Engineering Laboratory, Shanghai 200051)

**Abstract Objective** To investigate the effects and molecular mechanism of platelet apoptosis induced by Antimycin A (AMA). **Methods** Washed healthy volunteers platelets were pre-incubated with different concentration AMA, and then depolarization of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), phosphatidylserine (PS) externalization assay, the surface expression of P-selectin, the activation of integrin  $\alpha IIb\beta 3$  and the production of intracellular

# RunX2 的真核表达载体的构建及其对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响

赵 明 范楚玲 郭 强 汪思应 李菲菲

**摘要** 目的 构建人 RunX2 真核表达载体,观察 RunX2 对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响。方法 运用逆转录 PCR (RT-PCR) 扩增、酶切、连接等基因重组技术将人 RunX2 基因插入 pcDNA3.1 真核表达载体中;并经酶切、PCR、测序鉴定;将构建的 RunX2 真核表达载体瞬时转染 MCF-7 细胞,利用 Western blot 法检测 RunX2 蛋白表达,用 MTT 实验和细胞划痕实验检测其对乳腺癌细胞的生物学影响。结果 构建的 RunX2 真核表达载体在 MCF-7 细胞中高表达 RunX2 蛋白;发现高表达 RunX2 的 MCF-7 细胞活力增加,移动能力增强。结论 构建的 RunX2 真核表达载体能促进乳腺癌细胞的增殖和迁移。

**关键词** RunX2; 乳腺癌

**中图分类号** R 349.5

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2015)11-1593-04

RunX2 是一种参与成骨分化和骨发育的重要转录因子<sup>[1]</sup>。在乳腺组织中,RunX2 也参与某些基因的表达调控,在乳腺上皮细胞分化中发挥重要作用,并与乳腺肿瘤细胞株的侵袭性密切相关<sup>[2]</sup>。本课题组研究显示 RunX2 通过调节血管生成相关基因的表达促发乳腺癌细胞发生骨转移(待发表)。

2015-07-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81302319)

作者单位: 安徽医科大学病理生理学教研室,合肥 230032

作者简介: 赵 明,男,硕士研究生;

汪思应,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sywang@ahmu.edu.cn;

李菲菲,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 349711832@qq.com

这一结果提示 RunX2 可能成为乳腺癌骨转移的一个标志物。为进一步探讨 RunX2 与乳腺癌侵袭转移的关系,该研究利用亚克隆技术构建人 RunX2 真核表达载体,并通过瞬时转染至乳腺癌细胞 MCF-7 中,以探讨 RunX2 对乳腺癌细胞的影响,初步了解其在乳腺癌侵袭转移中的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系** 人乳腺癌细胞系 MCF-7、MB-231 细胞由本室长期保存。培养条件: 配制含有 DMEM、10% 胎牛血清(FBS)、1% 双抗(青霉素-链霉素)的完全培养基,将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。

**1.2 主要试剂和仪器** 根据 NCBI Reference Sequence 软件分析设计 RunX2 引物,引物由 Invitrogen 公司合成,PCR 反应试剂、DNA 限制性内切酶及 DNA Marker 购于 TaKaRa 公司,DMEM、胰酶、FBS 均购于 Gibco 公司,Western blot 相关试剂购于上海生物工程有限公司,RunX2 抗体购于美国 Abcam 公司,PVDF 膜购于 Millipore 公司。PCR 仪为 BIO-RAD 公司产品。

**1.3 PCR 扩增** 提取人乳腺癌细胞 MB-231 的总 RNA,以此为模板行 RT-PCR 扩增 RunX2 片段。引物: 上游 3'-CCG CTC GAG ATG GCA TCA AAC AGC CTC-5'; 下游 3'-TCC CCG CGG ATA TGG TCG CCA AAC AGA-5' (下划线部分为酶切位点)。PCR 反应体系: 25 μl,变性温度 98℃ 10 s,退火温度 55℃ 5 s,延伸温度 72℃ 10 s,反应 35 个循环。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳发现一条 1 kb 左右的片段。回收

reactive oxygen species (ROS), mitochondrial ROS were detected by flow cytometry. The activation of Caspase-3 was analyzed by Western blot. In inhibition experiment, washed platelets were pre-incubated mitochondrial ROS targeted antagonists Mito-TEMPO, and then stimulated with different concentration AMA. The apoptosis associated indicators were detected by flow cytometry. **Results** AMA dose-dependently induces depolarization of  $\Delta\Psi_m$ , PS exposure, Caspase-3 activation, and the production of intracellular ROS and mitochondrial ROS, but AMA does not induce platelet activation. Mito-TEMPO effectively reduces the depolarization of  $\Delta\Psi_m$ , PS exposure and the production of mitochondrial ROS which induced by the AMA. **Conclusion** AMA can induce platelet apoptosis, and mitochondria ROS may play an important role in the platelets apoptosis induced by the AMA.

**Key words** platelets; apoptosis; antimycin A; mitochondria; reactive oxygen species