

牛磺酸对苯并芘体外诱导血小板聚集活化功能的影响

杨国香, 徐元宏

摘要 取健康志愿者外周静脉血并分离血小板,采用随机分组的方式将血小板分成6组。通过检测血小板最大聚集率、膜表面CD62P及PAC-1阳性表达率,探讨不同浓度的牛磺酸(Tau)对苯并芘(BAP)体外诱导血小板聚集活化功能的影响。结果表明,血小板最大聚集率在二磷酸腺苷(ADP)和胶原诱导下各浓度BAP-Tau组与溶剂对照组之间比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。血小板膜表面CD62P、PAC-1表达率BAP-Tau高浓度组与溶剂对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。不同浓度的Tau均可拮抗BAP致血小板功能损伤的作用,且呈浓度梯度性变化。

关键词 苯并芘;牛磺酸;血小板功能;流式细胞仪

中图分类号 R 446.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)01-0116-03

牛磺酸(taurine, Tau)是人体内一种条件必需氨基酸,具有广泛的生物学作用^[1]。研究^[2]证实Tau在体内能抑制血小板聚集降低血小板活化等作用。苯并芘(benzo pyrene, BAP)广泛存在于香烟等燃烧产生的烟气中,通过增强体内血小板活化促进动脉粥样硬化和血栓的形成^[3-4]。血小板可以被胶原、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)等诱导剂诱发聚集,活化后会释放出特异性的血小板膜表面CD62P和血小板活化复合物PAC-1^[5]。但Tau对BAP在体外保存血小板中致血小板的聚集和活化功能怎样,目前很少有报道。根据研究^[4],BAP选用10 $\mu\text{mol/L}$ 、Tau选用正常成人血浆浓度值上限约5倍值(1、5、25 mmol/L)作为实验浓度梯度,观测Tau对BAP体外诱导血小板功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 FACSCalibur 流式细胞仪和CellQuest 分析软件, FITC 标记的单克隆抗体 PAC-

1-FITC、IgG1-FITC, PE 标记的单克隆抗体 CD62P-PE、IgG1-PE、PerCP 标记的单克隆抗体 CD41a-PerCP(美国 BD 公司); PL-11 血小板分析仪, ADP、胶原诱导剂(江苏英诺华公司); PH-A 型恒温摆动保存箱(潍坊普华公司); Tau、BAP(美国 Sigma 公司)。

1.2 样本制备与处理 用枸橼酸钠抗凝真空采血管采集健康体检志愿者全血 190 份,抗凝剂与全血比例 1:9。志愿者纳入标准包括:① 年龄 18~55 周岁;② 血小板计数 $> 150 \times 10^9/\text{L}$ 或 $< 450 \times 10^9/\text{L}$;③ 无吸烟史;④ 近 2 周末服用抗血小板类药物;⑤ 非月经期。将采集后的血样 1 000 r/min 离心 10 min 即得富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP);再 3 000 r/min 离心 10 min,去除部分上清液得到浓缩血小板血浆。取其中 10 份于采集后 30 min 内用 1% 甲醛固定处理,作为血小板采集和制备过程中导致 CD62P 及 PAC-1 表达阳性率的测定。其余 180 份随机分成 6 组:空白对照组,溶剂对照组(10% DMSO 液)、BAP 组(10 $\mu\text{mol/L}$ BAP 液)、BAP-Tau 低浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$ BAP + 1 mmol/L Tau 液)、BAP-Tau 中浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$ BAP + 5 mmol/L Tau 液)、BAP-Tau 高浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$ BAP + 25 mmol/L Tau 液)。上述操作均在生物安全柜内进行。将制备好的各组血小板样本轻摇混匀后,置血小板振荡保存箱内(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 保存 24 h。

1.3 血小板膜表面 CD62P 和 PAC-1 阳性表达率的测定 采用 FACSCalibur 流式细胞仪进行检测。检测管:在 FCM 专用上样管中依次加入 CD62P-PE、PAC-1-FITC、CD41a-PerCP、血小板悬液;同型对照管:依次加入 IgG1-PE、IgG1-FITC、CD41a-PerCP、血小板悬液;轻轻混匀置室温避光反应 15 min,用 PBS 洗一次,加入 1% 甲醛 1 ml 避光固定 15 min,24 h 内上机检测分析。以 CD41a-PerCP 和侧散射光散点图设血小板门,用同型对照管设定阳性群体,测定血小板膜表面 CD62P 和 PAC-1 阳性表达率(%)。见图 1。

1.4 血小板聚集功能测定 采用 PL-11 血小板分析仪进行检测。将各组浓缩血小板按仪器流程要求

2014-09-12 接收

基金项目:安徽省科技创新公共服务平台项目(编号:PT20081011)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介:杨国香,女,主管检验师,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,主任技师,责任作者, E-mail: xyhong1964@163.com

进行检测,适时加入 40 μ l ADP(20 μ mol/L)或胶原(0.2 mg/ml)诱导剂,记录血小板最大聚集率(%)。

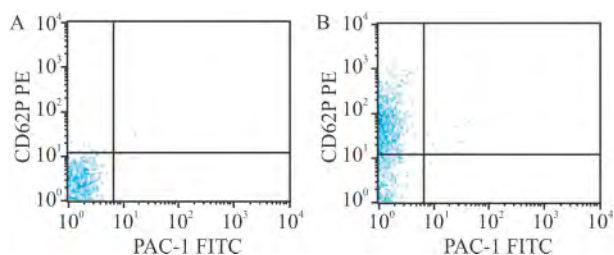


图1 血小板膜表面 CD62P、PAC-1 阳性表达率检测

A: 同型对照管; B: 检测管

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。

2 结果

2.1 血小板膜表面 CD62P 和 PAC-1 表达 采集样本 30 min 内固定的血小板膜表面 CD62P 和 PAC-1 表达阳性率(%)说明血小板在采集和制备过程中并没有过度激活血小板。BAP-Tau 高浓度组与 BAP 组、BAP-Tau 低、中浓度组 CD62P 比较差异有统计学意义($F=9.919$, $P<0.01$); PAC-1 比较差异有统计学意义($F=5.534$, $P<0.01$)。提示不同浓度的 Tau 对体外保存血小板活化均具有抑制作用。见表 1。

表1 不同组别血小板膜表面 CD62P 和 PAC-1 表达测定结果($\bar{x} \pm s$, %)

组别	n	CD62P	PAC-1
30 min 内固定	10	3.96 $\pm$ 0.90	0.88 $\pm$ 0.22
空白对照	30	60.60 $\pm$ 4.09	2.08 $\pm$ 0.47
溶剂对照	30	60.81 $\pm$ 4.04	2.10 $\pm$ 0.48
BAP	30	62.47 $\pm$ 4.14	2.17 $\pm$ 0.39
BAP-Tau 低浓度	30	60.51 $\pm$ 3.87	2.17 $\pm$ 0.48
BAP-Tau 中浓度	30	59.16 $\pm$ 2.83 ^{##}	1.90 $\pm$ 0.34 ^{#Δ}
BAP-Tau 高浓度	30	55.93 $\pm$ 4.04 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}	1.72 $\pm$ 0.36 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}

与溶剂对照组比较: ** $P<0.01$; 与 BAP 组比较: # $P<0.05$,
^{##} $P<0.01$; 与 BAP-Tau 低浓度组比较: $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与
 BAP-Tau 中浓度组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

2.2 血小板最大聚集率情况 胶原诱导的血小板最大聚集率 BAP-Tau 低、中、高浓度组 3 组之间及与其他各组之间比较差异有统计学意义($F=$

3 841.677, $P<0.01$); ADP 诱导的血小板最大聚集率 BAP 组与 BAP-Tau 中、高浓度组之间比较差异有统计学意义($F=514.953$, $P<0.01$)。提示不同浓度的 Tau 均可拮抗 BAP 对血小板的作用,且呈浓度梯度性改变。见表 2。

表2 不同组别血小板最大聚集率测定结果($n=30$, % $\bar{x} \pm s$)

组别	胶原 (0.2 mg/ml)	ADP (20 μ mol/L)
空白对照	4.59 $\pm$ 0.51	7.20 $\pm$ 0.81
溶剂对照	4.56 $\pm$ 0.47	7.17 $\pm$ 0.66
BAP	4.28 $\pm$ 0.45	4.63 $\pm$ 0.85 ^{##}
BAP-Tau 低浓度	6.43 $\pm$ 0.46 ^{***}	4.82 $\pm$ 0.64 ^{##}
BAP-Tau 中浓度	7.12 $\pm$ 0.99 ^{Δ***}	7.31 $\pm$ 0.70 ^{**$\Delta\Delta$}
BAP-Tau 高浓度	23.24 $\pm$ 0.82 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}	13.49 $\pm$ 0.94 ^{***$\Delta\Delta\Delta$}

与溶剂对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与 BAP 组比较: ** $P<0.01$; 与
 BAP-Tau 低浓度组比较: $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; 与 BAP-Tau 中浓度
 组比较: $\Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

目前,体外血小板功能评价还没有一套完整的评价体系^[6],但大多影响血小板功能的因素都可能引起血小板聚集和活化功能改变。Dumont et al^[7]研究认为,CD62P 表达率是有效预测血小板输注体内回收率和存活率的最佳指标。血小板随着体外保存时间的延长,其聚集功能逐渐下降,CD62P 等活化功能指标会逐渐升高^[8]。因此,本研究运用流式细胞术等技术,同时检测血小板各实验组的最大聚集率、膜表面 CD62P、PAC-1 表达率,来判断和评价保存血小板聚集活化功能的变化。

Tau 是一种细胞保护剂,除对外源化合物解毒外,还具有稳定溶酶体膜,调节细胞钙稳态,抗脂质过氧化,调节渗透压以及促进血小板内 NO 合成增加 NOS 活性等作用^[1]。动物实验^[9]显示 BAP 能加速血小板脂质过氧化反应,减少氧自由基的生成,加快血小板膜的破坏。本研究基于 Tau、BAP 和血小板之间的联系,观察 Tau 对 BAP 致体外保存血小板聚集活化功能的影响,以探讨二者在血小板保存质量方面的作用。

结果显示空白对照组测得值与谢作昕等^[10]报道基本一致。BAP 组和溶剂对照组相比,对胶原诱导的保存血小板聚集功能未见影响;对 ADP 诱导的保存血小板聚集功能有明显的抑制作用,对保存血小板功能产生明显损伤。和上述报道^[4]略有不同,

推测是由于血小板体外保存与体内生理环境存有的差异,活化后血小板对聚集诱导剂的致聚反应能力会产生不同的现象。体外血小板会随着保存时间的延长,脂质过氧化的加速,从血小板内部移位到血小板表面的 GP II b/III a 受到保存体系中蛋白酶的降解失去正常聚集功能,且体外血小板内 GP II b/III a 储备有限,导致活化后血小板对聚集诱导剂的致聚反应能力逐渐下降。同时设置 BAP 组、BAP-Tau 低浓度组、BAP-Tau 中浓度组、BAP-Tau 高浓度组,探讨不同浓度 Tau 对 BAP 致血小板损伤的作用。结果表明,高、中、低浓度的 Tau 都可拮抗 BAP 对保存血小板产生的影响,且高浓度的 Tau 作用尤为明显。另外,选用比人体血浆浓度高多倍的 Tau 作为实验终浓度,保障保存血小板回输体内后 Tau 依然能达到实验效果的浓度。

综上所述,本研究可为在血小板捐献者筛选时规避吸烟等不利因素,或在血小板保存液中注入一定浓度的 Tau 保护血小板功能,提高血小板输注效果提供了一种思路。

参考文献

- [1] 宋春梅,马洪波.牛磺酸的生物学作用[J].吉林医药学院学报 2005 26(4):231-3.
- [2] 张丽.牛磺酸对自发性高血压大鼠血小板聚集的影响[J].山西中医学院学报 2010 11(3):20-2.
- [3] Ferguson L R. Role of dietary mutagens in cancer and atherosclerosis[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009 12(4):343-9.
- [4] 唐倩,吴一华,李锋,等.苯并芘对血小板聚集和 P-选择素表达的影响[J].浙江大学学报(医学版) 2011 40(1):51-6.
- [5] Rosenthaler J, Zully S, Varenne O, et al. Acute myocardial infarction secondary to platelet apheresis in a 57-year healthy donor[J]. *Int J Cardiol* 2011 150(3):119-20.
- [6] Picker S M. *In-vitro* assessment of platelet function[J]. *Transfus Apher Sci* 2011 44(3):305-19.
- [7] Dumont L J, AuBuchon J P, Whitley P, et al. Seven-day storage of single-donor platelets: recovery and survival in an autologous transfusion study[J]. *Transfusion* 2002 42(7):847-54.
- [8] 刘景汉,车辑.血小板保存[J].中国输血杂志 2008 21(4):241-2.
- [9] Knaapen A M, Curfs D M, Pachon D M, et al. The environmental carcinogen benzo(a)pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis[J]. *Mutat Res* 2007 621(1-2):31-41.
- [10] 谢作昕,杨丽红,陶志华,等.机采血小板保存期内血小板聚集功能和可溶性 P-选择蛋白的变化[J].中国实验血液学杂志, 2008 16(5):1188-91.

[1] 宋春梅,马洪波.牛磺酸的生物学作用[J].吉林医药学院学

Effects of taurine on platelet aggregation induced by benzo pyrene *in vitro* activation function

Yang Guoxiang, Xu Yuanhong

(Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract The peripheral venous blood which were taken from healthy volunteers and platelet was isolated. Platelet samples were randomly divided into six groups. The effects of different concentration of taurine(Tau) on benzo pyrene(BAP) induced platelet aggregation *in vitro* activation function were investigated by detecting the maximum platelet aggregation rate, the positive expression rates of platelet membrane surface CD62P and PAC-1. The results showed that platelet maximum aggregation rate had significant differences between each concentration of BAP-Tau groups and solvent control group in adenosine diphosphate(ADP) and collagen induced ($P < 0.01$). The positive expression rates of platelet membrane surface CD62P and PAC-1 in BAP-Tau high concentration group had significant differences compared with solvent control group ($P < 0.01$). Different concentration of Tau could antagonize platelet function damage induced by BAP with a concentration gradient change.

Key words benzo pyrene; taurine; platelet function; flow cytometry