

◇技术与方法◇

血小板的软 X 射线谱学显微成像研究

周 铭¹ 唐海沁¹ 蒋诗平² 张 勇¹

摘要 探索性地应用软 X 射线谱学显微技术研究血小板的结构及钙元素成像的变化,采用谱学显微术对制取的 SD 大鼠血小板形态扫描透射成像并对血小板作钙元素双能对比衬度成像。血小板成像可看到血小板大小不等,有的伸出伪足;钙元素分布成像血小板在静息状态时胞内钙元素主要分布于质膜侧凹陷的钙池,诱导聚集后则扩散分布于胞质。软 X 射线谱学显微成像能反应血小板钙元素分布,为钙的探测提供一种新方法。

关键词 血小板;钙分布;软 X 射线成像;谱学显微术

中图分类号 R 319

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)06-0855-03

血小板是哺乳动物体内最小的血细胞,其活化与临床许多疾病密切相关。冠心病患者中,反应血小板活化的标志物 CD62p、PAC-1 表达率明显高于正常组,而血小板活化与胞内钙有密切关系,文献^[1]证实,钙拮抗剂降低血小板胞内 Ca^{2+} 的同时可抑制血小板聚集。糖尿病患者血小板也处于过度活化状态,表达 GP II b/III a 和 P 选择素并增加胞质 Ca^{2+} 的释放^[2]。同样地,恶性肿瘤的发生和发展伴有血小板数量的增多和活性的明显升高,两者呈显著正相关性^[3]。 Ca^{2+} 作为第二信使,通过钙信号通路参与血小板收缩变形、分泌、活化、聚集等功能的调节^[4]。目前,细胞内钙主要是利用指示剂与其作用通过荧光法来间接测定,而软 X 射线谱学显微技术可直接显示元素空间分布并可计算出含量。该研究探索性地将软 X 射线谱学显微技术应用于血小板内钙的检测。

1 材料与方法

1.1 材料 雌性 SPF 级的 7 周龄 SD 大鼠 2 只(安

徽医科大学动物实验中心);离心机(德国 Eppendorf 5415R);大鼠灌胃针;加样器(Eppendorf);毛细玻璃管;EP 管;二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)(美国 Sigma 公司 A2754-400 mg);氯吡格雷(杭州赛诺菲安万特制药公司); CaCO_3 (国产分析纯); Si_3N_4 膜窗(上海纳腾仪器公司)。

1.2 血小板的制备 将实验大鼠随机分为服药组和对照组,服药组以氯吡格雷 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃,对照组用同等量的生理盐水。分别喂养大鼠 1 周后剪去大鼠胡须,用毛细玻璃管取眼内静脉丛血 1.8 ml,滴于预先已加好 0.2 ml 3.8% 枸橼酸钠的 EP 管内并及时混匀。EP 管置入离心机,采用 Agahaloo 二次离心法制取血小板。第 1 次 $1790 \text{ r}/\text{min}$ 离心 10 min,取上清液(不可取到红细胞)均分在 2 个空 EP 管内:一份空白,一份加 ADP(终浓度 $20 \times 10^{-6} \text{ mol}/\text{L}$)反应 10 min。然后将两组 4 个 EP 管标本以 $586 \text{ r}/\text{min}$ 二次离心 10 min,弃上清液得血小板沉淀后加入 200 μl 生理盐水稀释混匀。

1.3 软 X 射线谱学显微成像

1.3.1 制样 取上述稀释后的血小板约 1 μl 均匀涂于氮化硅膜窗上,置于培养皿中室温风干(约 4 h)后固定于样品架;另以蒸馏水配制 CaCO_3 混悬液,均匀涂于铜纸包被的样品架并烘干。

1.3.2 成像 实验在上海光源软 X 射线谱学显微束站(BL08U1A)进行。首先利用 CaCO_3 样品来标定钙元素的 X 射线特征谱,选取钙元素 L 吸收边上 X 射线能量 E_1 (352.3 eV) 及近吸收边的能量 E_2 (351.5 eV)。随后,采用双能吸收对比衬度成像方法对血小板进行成像,其成像原理光路见图 1。

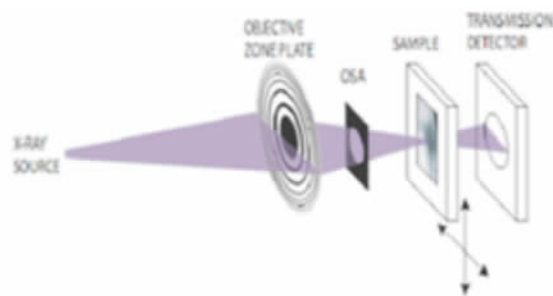


图 1 成像原理光路图

2015-04-14 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:12010402116)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院老年心内科,合肥 230022

²中国科学技术大学国家同步辐射实验室,合肥 230029

作者简介:周 铭,男,硕士研究生;

唐海沁,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-

mail:tanghq898@sina.com

2 结果

实验成像结果如图 2 所示。血小板成像(图 A1、B1)可见血小板呈圆形或椭圆形的小体,大小不均一,有的表面伸出伪足。从血小板钙元素分布图像可以看出,在未加诱导剂时(图 A2),钙集中分布于血小板的质膜一侧,也有少量散在分布于血小板胞质内;加诱导剂后(图 B2)钙主要分布于整个血小板胞质内,范围大,而且分布密度增高,甚至出现高亮影。血小板的活化聚集伴随着细胞形态变化及血小板内钙浓度的升高,甚至显示钙浓度的颜色条标尺出现高亮的红色。

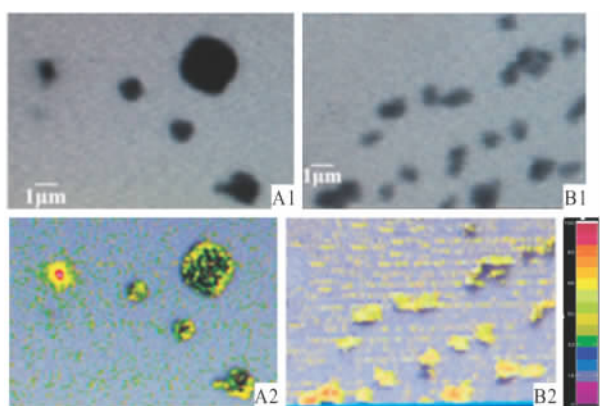


图 2 血小板软 X 射线及钙元素空间分布成像

A: 未加诱导剂; B: 加诱导剂; 1: 血小板成像; 2: Ca 空间分布; 软 X 射线显微成像(STXM)空间分辨率为 40 nm; 钙元素为双能对比(E1/E2)成像, 未加诱导剂(A2 组)示聚集前, 通过计算最高 Ca 浓度为 1.26 ng/cm^3 , 诱导聚集后(B2 组)最高 Ca 浓度 1.58 ng/cm^3 ; 右边颜色条显示钙浓度大小

3 讨论

在血小板内存在致密系统和溶酶体样酸性细胞器两种钙池, 血小板活化后能够通过 IP₃ 和 NAADP 信号途径以及胞外 Ca²⁺ 的内流增加胞内钙浓度^[5], 所以静息状态时(图 A2)钙分布成像显示主要在血小板质膜侧呈高信号, 而在诱导剂活化后(图 B2)胞质内钙元素分布范围扩大。说明软 X 射线显微技术能够用于血小板钙元素的检测并可显示其分布情况。

目前定向测定胞内 Ca²⁺ 的方法主要是利用 Ca²⁺ 特异性结合的荧光染料(Fura-2、新一代的 Fluo-3 等)或者生物发光蛋白特异性地结合胞内的 Ca²⁺, 产生荧光。以此为基础, 通过紫外光、激光等

不同方式激发后再利用流式细胞仪、荧光分光光度计、荧光显微镜及双光子激光扫描共聚焦显微镜等设备^[6]来测定荧光的强度及变化, 从而间接反应胞内 Ca²⁺ 的浓度及动态变化; 应用于胞内 Ca²⁺ 检测的微流控芯片技术^[7]也是基于 Ca²⁺ 受激发后荧光强度的差异。再者可采用非光学的核磁共振法, 利用含氟指示剂(5F-BAPTA)与 Ca²⁺ 结合形成螯合物 Ca²⁺-5F-BAPTA 在 19F 核磁共振波谱图上的化学位移来显示 Ca²⁺ 浓度^[8]。指示剂和荧光染料都是以 Ca²⁺ 的化学结合为基础, 一定程度上能反应胞内 Ca²⁺ 的浓度及动态变化, 但灵敏度、专一性受到限制。

此外, 不基于特异性钙指示剂的检测, Ca²⁺ 选择性微电极法, 可利用细胞质膜两侧的膜电势来测定钙浓度, 但穿刺引起钙的渗漏不适合较小的血小板^[6]; 同位素 ⁴¹Ca²⁺ 示踪法借助于加速质谱技术检测灵敏度可达 10^{-14} , 不过同位素静态效果差, 本身的同位素效应也会对生物体的活动产生影响^[9]。而软 X 射线谱学显微成像避免了这些缺点, 利用钙元素特征性的标识谱直接成像, 能够准确反应钙的空间分布信息。

上海光源软 X 射线谱学显微光束线站(BL08U1A)采用同步辐射软 X 射线谱学技术与扫描透射显微成像(STXM)结合, 有数十纳米空间高分辨率和近边吸收精细结构谱学的高化学态分辨能力, 可以分辨出元素及其化学态^[10]。

基于此实验线站利用双能吸收对比衬度成像技术研究 SD 大鼠血小板内钙元素分布, 精准地将大鼠血小板内微量钙元素分布与空间成像相结合, 显示出血小板聚集前后钙元素的空间分布, 并证实血小板聚集活化后细胞内钙元素分布更密集($[\text{Ca}]_{\text{max}}$ 后 $1.58 \text{ ng/cm}^3 > [\text{Ca}]_{\text{max}}$ 前 1.26 ng/cm^3), Wu et al^[5] 的文章亦综述了研究实验显示活化的血小板内钙浓度增加。这为标识样品中钙元素的分析提供了一种新型手段。研究^[11]成功利用软 X 射线谱学显微技术研究聚球藻细菌不同离子价态 Ca²⁺ 分布, 本实验首次将该技术应用于大鼠自然状态血小板内钙元素的研究。研究^[12]实验中 STXM 主体显微镜成像是自然状态血小板成像, 并显示出不同形态血小板, 因其利用的是“水窗”波段的软 X 射线(波长 2.3 ~ 4.4 nm), 对水具有高穿透性, 亦可穿透几微米厚的生物样品, 对样品制备要求简单, 可以对含水

样品直接成像,无需对生物样品染色,而且空间分辨率最高可达到 30 nm,这些优点也使之成为一类与电子显微镜成像和光学成像互补的新型成像技术。

钙信号涉及基因表达调控、细胞凋亡各生命活动中,软 X 射线谱学显微技术为其提供一种新型、特异、精确灵敏、简便的检测方法。而元素特征性的软 X 射线吸收与生物探针技术结合,可实现对细胞大分子蛋白质的空间定位及其功能的研究,目前已可初步利用纳米二氧化钛与细胞内微观蛋白抗体连接作为标记对微观蛋白束成像^[13]。可见将谱学显微技术用于临床各种病理状态细胞的研究,有着广泛的应用前景和重大意义。

参考文献

- [1] Shih C Y, Lin I H, Ding J C, et al. Antiplatelet activity of nifedipine is mediated by inhibition of NF- κ B activation caused by enhancement of PPAR- β / γ activity [J]. *Br J Pharmacol* 2014, 171 (6):1490–500.
- [2] Tang W H, Stithan J, Gleim S, et al. Glucose and collagen regulate human platelet activity through aldose reductase induction of thromboxane [J]. *J Clin Invest* 2011, 121(11):4462–76.
- [3] Gay L J, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis [J]. *Nat Rev Cancer* 2011, 11(2):123–34.
- [4] Li Z, Delaney M K, O'Brien K A, et al. Signaling during platelet adhesion and activation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 2010, 30(12):2341–9.
- [5] 吴 鸿. 血小板活化过程中的钙离子信号 [J]. *生理科学进展杂志* 2012, 43(6):417–21.
- [6] Bruton J D, Cheng A J, Westerblad H. Methods to detect Ca(2+) in living cells [J]. *Adv Exp Med Biol* 2012, 740:27–43.
- [7] 柳 葆. 用于细胞内钙离子检测的微流控芯片关键技术与实验研究 [D]. 河北工业大学 2012.
- [8] Bar-Shir A, Gilad A A, Chan K W, et al. Metal ion sensing using ion chemical exchange saturation transfer 19F magnetic resonance imaging [J]. *J Am Chem Soc* 2013, 135(33):12164–7.
- [9] 陆丽燕, 何 明, 王 伟, 等. 41Ca-AMS – 生物示踪的有力工具 [J]. *生命科学* 2010, 2(22):197–201.
- [10] 张祥志, 许子健, 甄香君, 等. 基于软 X 射线谱学显微双能衬度图像的元素空间分布研究 [J]. *物理学报* 2010, 59(7):4535–41.
- [11] Obst M, Wang J, Hitchcock A P. Soft X-ray spectro-tomography study of cyanobacterial biomineral nucleation [J]. *Geobiology*, 2009, 7(5):577–91.
- [12] 张 一, 张继超, 诸 颖, 等. 同步辐射 X 射线显微成像技术在细胞生物学中的应用 [J]. *生命科学* 2013, 25(25):754–61.
- [13] Ashcroft J M, Gu W, Zhang T, et al. TiO₂ nanoparticles as a soft X-ray molecular probe [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2008(21):2471–3.

Microspectroscopic soft X-ray imaging analysis of platelet

Zhou Ming¹, Tang Haiqin¹, Jiang Shiping², et al

(¹Dept of Cadre Cardiovascular, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²National Synchrotron Radiation Laboratory of China University of Science and Technology, Hefei 230029)

Abstract To test the transformation of intracellular calcium in platelet initially applying microspectroscopy soft X-ray for imaging based on the truth the platelets were at the status of activation in a variety of illness. Normal adult SD rats were enrolled in the trial and finally the rat platelets were extracted for platelet scanning transmission and dual-energy calcium contrast imaging. From the morphology and distribution of calcium of platelet, a various type of platelet morphology pictures were observed, of which the cell deformed and the parapodium stretched out; while calcium mainly distributed in the calcium pool near plasmalemma under quiescent condition but scattered across the cytoplasm in activated condition induced by adenosine diphosphate. In conclusion, the microspectroscopy soft X-ray imaging was capable of reflecting the distribution of calcium in the platelet and provides a practicable new method for the measure of intracellular calcium.

Key words blood platelet; calcium distribution; soft X-ray imaging; microspectroscopy