DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.026
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1576 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)17-1576-04

应用Fura-2/AM荧光双波长法研究抑肽酶对血小板活化的保护作用

陈 杰[1],陶国才[1],刘怀琼[2] (第三军医大学:[1]西南医院麻醉科,重庆 400038;[2]大坪医院野战外科研究所麻醉科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨抑肽酶对血小板活化的保护机制。方法 用钙荧光指示剂Fura-2/AM负载人洗涤血小板,用荧光双波长分光光度计比值法测定静息血小板胞浆游离钙浓度([Ca^{2+}]$_i$)及凝血酶、抑肽酶对[Ca^{2+}]$_i$的影响。结果 在生理胞外Ca^{2+}浓度时,正常人血小板[Ca^{2+}]$_i$静息水平为(151.840±28.719)nmol/L,凝血酶可引起血小板[Ca^{2+}]$_i$的明显增加($P<0.01$),抑肽酶呈剂量依赖性地抑制由凝血酶引起的[Ca^{2+}]$_i$的增加($P<0.01$)。结论 抑肽酶的保护血小板机制与其抑制血小板内[Ca^{2+}]$_i$动员等信息传递过程有关。

关键词:抑肽酶;血小板;钙指示剂;胞浆游离钙
中图法分类号:R331.143;R446.9;R977.3 文献标识码:A

Protective mechanism of aprotinin in platelet activation by Fura-2/AM dual-wavelength method

CHEN Jie[1], TAO Guo-cai[1], LIU Huai-qiong[2] ([1]Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Anesthesiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the possible mechanisms of aprotinin in the protection of platelets. Methods Cytosolic free calcium concentration ([Ca^{2+}]i) was determined in calcium fluorescent indicator Fura-2/AM loaded washed human platelets by using dual-wavelength spectrofluorophotometer. The mean value of resting [Ca^{2+}]i and the changes of [Ca^{2+}]i response to thrombin and aprotinin were observed. Results In the presence of extracellular Ca^{2+} at the dose of 1 mmol/L, the resting level of [Ca^{2+}]i in platelets of human was (151.840±28.719) nmol/L. Thrombin stimulated the rise in [Ca^{2+}]i in the presence of Ca^{2+} at the dose of 1 mmol/L, and the effects were inhibited by aprotinin in a concentration-dependent manner ($P<0.01$). Conclusion Aprotinin is an anti-platelet agent and may exert its action through inhibiting the [Ca^{2+}]i mobilization in platelets.

Key words: aprotinin; platelet; calcium indicator; cytosolic free calcium

抑肽酶作为一个“广谱”的丝氨酸蛋白酶抑制剂,自20世纪80年代后期,被发现具有保护血小板功能,减少术后出血及输血的作用后[1,2],在体外循环(CPB)及各种复杂的大手术中的应用已日益增多。但是抑肽酶对血小板的保护机制,尤其是对血小板信号转导通路的影响尚未完全澄清。而Ca^{2+}作为细胞内重要的第二信使物质,是许多激素、细胞因子、药物作用的胞内信使。血小板胞浆游离钙浓度([Ca^{2+}]$_i$)升高在血小板激活中起重要作用,并最终调节血小板变形、分泌、聚集等过程[3]。因此,作者采用Fura-2/AM双波长荧光比值法观察抑肽酶对凝血酶激活的血小板胞浆游离钙动员的影响,探讨其保护血小板的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Fura-2/AM:购自Sigma公司,以二甲基亚砜(Sigma产品)配成1 mmol/L的贮备液,分装后-70 ℃避光保存;Tyrodes缓冲液:葡萄糖10 mmol/L,$MgCl_2$ 1 mmol/L,KCl 3 mmol/L,NaCl 140 mmol/L,Hepes 10 mmol/L,pH 7.4;凝血酶、牛血清白蛋白(BSA)、抑肽酶、Triton X-100和EGTA均为Sigma产品,其它为国产分析纯试剂。

1.2 洗涤血小板悬液制备

25~45岁的健康男性献血员(采血前两周未服用任何药物)肘静脉取血,ACD抗凝(全血∶ACD=9∶1)。按文献[4]方法制备人洗涤血小板悬液,血小板混悬液为无钙Tyrodes缓冲液,血小板计数为2×10^8个/ml。

作者简介:陈 杰(1971-),男,四川省自贡市人,硕士,主治医师,主要从事出凝血机制方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68765372
通信作者:陶国才,电话:(023)68754179
收稿日期:2003-08-29;修回日期:2004-03-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　Fura-2/AM 负载及荧光测定

在上述制备的血小板悬液中加入 Fura-2/AM 和 BSA, 终浓度为 5 μmol/L 和 0.3%(w/v), 37 ℃恒温避光振荡 45 min, 负载中通以 95%O_2+5%CO_2 混合气, 离心洗涤后用无钙 Tyrodes 缓冲液混悬(2×10^8 个/ml)。台盼蓝排斥试验检测血小板存活率, 活细胞率需> 95%。应用 Hitachi F-2500 型荧光双波长分光光度仪作波长扫描, 发射波长(Em)于 500 nm, 扫描负载血小板悬液的激发波长, 如激发波(Ex)波峰由 380 nm 移至 340 nm, 表明 Fura-2/AM 已负载酯解进入细胞内, 可做$[Ca^{2+}]_i$荧光测定。测定时 Em 为 500 nm(波宽 10 nm), Ex 分别为 340 nm 和 380 nm(波宽 5nm), 波长变换间隔为 1 s, 应用荧光比值法连续描记静息状态及加入药物后的荧光强度比值(F340/F380)变化以及最大荧光强度比值(R_{max})、最小荧光强度比值(R_{min})。根据下面公式可算出$[Ca^{2+}]_i$[5]:

$$[Ca^{2+}]_i = KD\left(\frac{R-R_{min}}{R_{max}-R}\right)\left(\frac{S1}{S2}\right)(nmol/L)$$

R 是各测定点的荧光强度比值(F_{340}/F_{380}); KD 是 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, 37 ℃时为 224 nmol/L; R_{max}是胞外游离钙为 1 mmol/L 时, 加入 Triton X-100(1%)破膜, 使 Fura-2 被 Ca^{2+} 全部饱和时所测得的荧光比值; R_{min}是 Fura-2 所结合 Ca^{2+} 被 EGTA 全部螯合时的荧光比值。S1 和 S2 分别为零 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 饱和时, 在 Ex 380 nm 测得的荧光强度。实际计算由仪器的钙测定系统钙定量软件自动求出。

1.4　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　Fura-2/AM 负载

2.1.1　血小板 Fura-2/AM 负载率　　在 37 ℃, Fura-2/AM 终浓度为 5 μmol/L 的条件下, 负载不同时间后在 Ex 340 nm 处测定负载血小板的荧光强度。结果发现, 随负载时间增加, 酯解进入细胞内的 Fura-2 增加, 40～50 min 后血小板已达到较好的负载效果, 继续延长负载时间至 60 min, 荧光强度增幅较少(图 1)。提示洗涤血小板负载时间以 40～50 min 为宜。

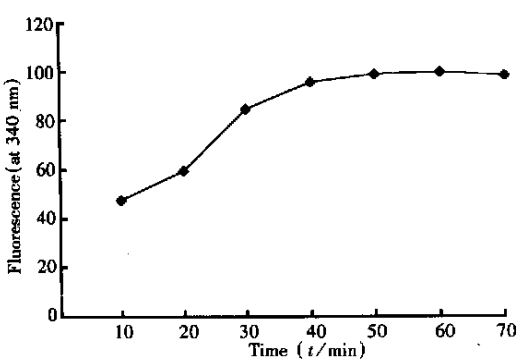


图 1　**Fura-2/AM** 在人洗涤血小板上的负载率 (n=3)

Fig 1　Time response effect of loading Fura-2/AM (5 μmol/L) in platelet suspension (n=3)

2.1.2　负载后血小板内 Fura-2 漏出率　　根据 Mn^{2+} 对 Fura-2 漏出荧光的猝灭原理[6], 在负载后的血小板悬液中加入 200 μmol/L 的 $MnCl_2$, 观察不同时间内 Ex 340 nm 处荧光强度的变化。按以下公式计算: 漏出率=(A－B)/A×100%, A 为无 $MnCl_2$ 的荧光强度, B 为加入 $MnCl_2$ 后的荧光强度。结果在室温下, 当细胞膜结构没有明显受损时, Fura-2 即有一定的漏出, 且随时间延长, 漏出逐渐增加, 40 min 漏出率为 5.1%, 3 h 高达 36%(图 2)。提示血小板$[Ca^{2+}]_i$测定最好在 Fura-2 负载后 40 min 内完成。

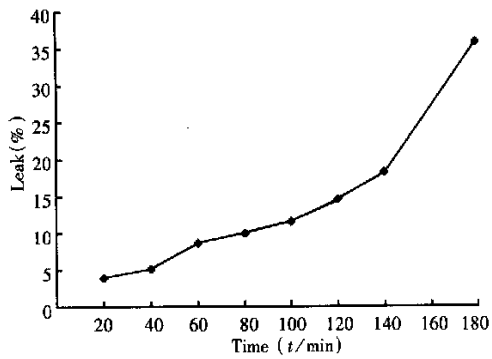
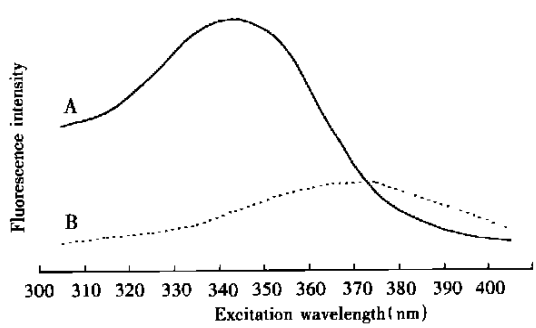


图 2　负载血小板内 **Fura-2** 的漏出率 (n=3)

Fig 2　Fura-2 leakage from loaded platelet suspension (n=3)

2.1.3　负载 Fura-2 后血小板波峰移动特征　　固定负载血小板悬液 Em 为 500 nm, 扫描 Ex 波峰。当胞外 Ca^{2+} 为 1 mmol/L, Ex 波峰位于 340 nm; 当 Triton X-100 破膜, 并加入 EGTA(终浓度为 Ca^{2+} 浓度的 3 倍, pH> 8.5)后, 由于 EGTA 的钙螯合性, 又使 Fura-2 游离出来, Ex 波峰后移至 380 nm 左右(图 3)。出现波峰移动特征说明 Fura-2/AM 已进入细胞内, 并被胞内非特异性酯酶水解良好, 可在此基础上进行$[Ca^{2+}]_i$的测定。



A: Measured results in platelet suspension-containing 1 mmol/L Ca^{2+};
B: After addition of Triton X-100 and EGTA

图 3　**Fura-2/AM** 负载血小板的荧光激发光谱

Fig 3　Excitation spectra of Fura-2/AM loaded platelet suspension

2.2　制备血小板的存活程度

以台盼蓝排斥反应检测负载血小板悬液中血小板存活程

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

度,5 次实验拒染细胞率分别为 94.5%、94%、95.5%、96.5% 和 95%,平均为 95.1%。

2.3 血小板静息状态下 $[Ca^{2+}]_i$

在胞外 Ca^{2+} 为 1 mmol/L 的情况下,应用 Fura-2/AM 双波长荧光比值法测得的正常人血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 静息水平为(151.840±28.719) nmol/L(n=24)。

2.4 凝血酶对 $[Ca^{2+}]_i$ 的动员及抑肽酶的抑制作用

凝血酶(thrombin, Thr)呈剂量依赖性引起 $[Ca^{2+}]_i$ 增加。当胞外 Ca^{2+} 为 1 mmol/L 时,0.05 U/ml 和 Thr 使 $[Ca^{2+}]_i$ 增加至(525.801±100.735) nmol/L(n=6);0.1 U/ml 的 Thr 使 $[Ca^{2+}]_i$ 增加至(899.579±140.674) nmol/L(n=6),两组 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值与静息状态组 $[Ca^{2+}]_i$ 值比较有统计学意义(P<0.01)。而抑肽酶可明显抑制 Thr(0.05 U/ml)引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加作用,并呈剂量依赖关系(图 4),其与对照组比较有统计学意义(P<0.01)。

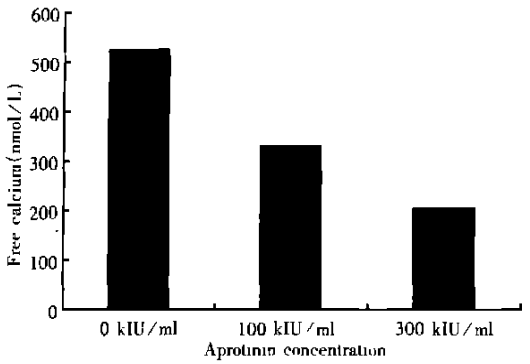


图 4 抑肽酶对凝血酶引起的人血小板胞浆游离钙浓度升高的抑制作用(n=6)

Fig 4 Inhibitive effect of aprotinin on increased concentration of cytosolic free calcium induced by thrombin (n=6)

3 讨论

Fura-2 是一种新型钙荧光指示剂,能特异性地与 Ca^{2+} 结合,由于极性大,难以进入细胞,故在其负性基团结合上亲脂的乙酰氧甲脂成为 Fura-2/AM。Fura-2/AM 很容易透过细胞膜,在细胞内非特异性脂酶的作用下转化为 Fura-2,后者与胞内游离 Ca^{2+} 结合形成 Fura-2-Ca^{2+} 复合物。Fura-2 及 Fura-2-Ca^{2+} 复合物的最大激发波长分别为 380 nm 和 340 nm,其发射光的强度与 Ca^{2+} 浓度呈正比,据此可测定 $[Ca^{2+}]_i$。目前,国内大部分实验均采用 Fura-2 单波长荧光法,本研究采用双波长比值法测定 $[Ca^{2+}]_i$,可减少由于仪器波动,被测细胞密度不同,以及由于淬灭或漏出使细胞内 Fura-2 含量改变等因素造成的实验误差,提高测量的准确性。

研究结果表明,静息状态下正常人血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 为(151.840±28.719) nmol/L,与文献[7,8]报道基本一致。负载后的血小板 Fura-2 易漏出,Fura-2 的漏出存在一种和膜损伤无关的独特机制[9],其机制可能是通过细胞膜上亲水阴离子通道外排,利用阴离子转运抑制剂可减少 Fura-2 外排。当 Fura-2 漏出率超过 5%,即可使背景荧光大幅度增加,造成测量误差[10]。利用 Mn^{2+} 可猝灭漏出 Fura-2 的荧光这一原理,本实验测定了 Fura-2 负载不同时间后的漏出率,证实 Fura-2 的漏出随时间延长而逐渐增加,在 1 h 即可达 8.7%。结果提示为了减少 Fura-2 外排引起的实验误差,试验应在 Fura-2 负载后 40 min 内完成。

血小板内游离 Ca^{2+} 参与了血小板活化的各个环节。Rink 等[11]报道,当应用 ionomycin 为刺激剂使血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 达一定阈值时,血小板即可发生变形及可逆性聚集;再升至另一阈值时,血小板即发生释放反应和不可逆性聚集,可见 Ca^{2+} 的变化与血小板的功能有密切关系。

抑肽酶对血小板的保护作用已被大量实验及临床所证实[1,2]。但抑肽酶对在血小板信号传导通路起第二信使作用的钙离子的影响尚未完全澄清。本实验显示,凝血酶作为血小板致聚剂,可引起血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的明显增加。一般认为,凝血酶通过与血小板膜上特异性受体结合,经 Gp 蛋白耦联,激活磷脂酶 C(PLC)将胞膜上磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2)水解产生三磷酸肌醇(IP_3),IP_3 可促使 Ca^{2+} 从致密颗粒和致密管道系统中释放,导致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高[3]。作者进一步观察了抑肽酶对凝血酶诱导的血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 动员的影响。结果表明,抑肽酶可显著抑制凝血酶诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,在 0.05 U/ml 凝血酶引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化中,100 kIU/ml 和 300 kIU/ml 的抑肽酶组均明显低于对照组,其 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值仅达到了引起血小板变形及可复性聚集的阈值(100 kIU/ml 的抑肽酶)[11],甚至更低(300 kIU/ml 的抑肽酶),这提示抑肽酶可能通过抑制凝血酶诱导的内钙释放和外钙内流,使血小板胞浆钙离子浓度下降,从而抑制凝血酶诱导的血小板活化反应,达到保护血小板的目的。以上实验结果提示,抑制血小板内游离钙离子的动员在抑肽酶的血小板保护机制中起着重要的作用。

参考文献:

[1] Santamaria A, Mateo J, Oliver A, *et al*. The effect of two different doses of aprotinin on hemostasis in cardiopulmonary bypass surgery: similar transfusion requirements and blood loss[J]. Haematologica, 2000, 85(12): 1277-1284.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[2] Porte R J, Molenaar I Q, Begliomini B, *et al*. Aprotinin and transfusion requirement in orthotopic liver transplantation: a multicentre randomized double-blind study. EMSALT Study Group [J]. Lancet, 2000, 355 (9212): 1303—1309.

[3] Coles B, Bloodsworth A, Eiserich J P, *et al*. Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP[J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 5832—5840.

[4] Volf I, Roth A, Moeslinger T, *et al*. Stimulating effect of biologically modified low density lipoproteins on ADP-induced aggregation of washed platelets persists in absence of specific binding[J]. Thromb Res, 2000, 97(6): 441—449.

[5] Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. J Biol Chem, 1985, 260 (6): 3440—3450.

[6] McDonough P M, Button D C. Measurement of cytoplasmic calcium concentration in cell suspensions: correction for extracellular Fura-2 through use of Mn^{2+} and probenecid[J]. Cell Calcium, 1989, 10(3): 171—180.

[7] 蔡德鸿, 刘 宏, 陈 浩. NIDDM 患者血小板 Ca^{2+} 转运及其与聚集功能的关系[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(3): 210—212.

[8] Galeazzi L, Casoli T, Giunta S, *et al*. Beta-Amyloid fragment 25-35 induces changes in cytosolic free calcium in human platelets[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 903: 451—456.

[9] Di-Virgilio F, Fasolato C, Steinberg T H. Inhibitors of membrane transport system for organic anions block Fura-2 excretion from PC12 and N2A cells [J]. Biochem J, 1988, 256(3): 959—963.

[10] Berts A, Minneman K P. Tyrosine kinase inhibitors and Ca^{2+} signaling: direct interactions with fura-2[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 389(1): 35—40.

[11] Rink T J, Smith S W, Tsien R Y. Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion[J]. FEBS Lett, 1982, 148(1): 21—26.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2004)17-1579-02

个案与短篇

冷冻加点式大隐静脉剥脱术治疗大隐静脉曲张的疗效观察

Evaluation of cryostripping plus dot stripping of great saphenous vein in the treatment of varicosis of great saphenous vein

马小干, 秦 荣, 范 宇, 葛海燕, 罗云生, 唐开业, 马 丹, 陈祖林, 张朝军 (第三军医大学新桥医院普通外科, 重庆 400037)

2000-01—2003-10 对我科就诊的单纯大隐静脉曲张患者施行大隐静脉手术 65 例共 77 条肢体, 其中 2002 年 5 月后采用冷冻+点式剥脱术治疗 30 例 37 条肢体, 显示较传统术式有一定的优越性, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例资料

治疗组 30 例 37 条肢体, 男 18 例 22 条肢体, 女 12 例 15 条肢体; 年龄 46~71(55.3±7.6)岁, 采用冷冻+点式剥脱术治疗。对照组 35 例 40 条肢体, 男 21 例 24 条肢体, 女 14 例 16 条肢体, 年龄 34~76(54.7±10.6)岁, 采用传统的高位结扎剥脱术。主要临床表现: 病程 4~30 年, 所有病例均有大隐静脉曲张, Perthes 试验深静脉均通畅, 大隐静脉瓣膜功能试验阳性, 4 例下肢轻度水肿, 酸胀 47 例, 皮肤搔痒、色素沉着 42 例, 溃疡 13 例, 两组年龄、临床表现无明显差别($P>0.05$)。

1.2 冷冻治疗仪

ERBE 公司生产的 Erbekryo CA 多功能冷冻治疗仪, 工作气体为 CO_2, 工作温度—80 ℃, 血管探针长 550 mm, 直径 3.5 mm。

1.3 方法

冷冻+点式剥脱术手术方法: 术前标记曲张静脉, 持续硬膜外麻醉或腰麻, 从足端开始驱血(若浅静脉扪及血栓, 则高位切断大隐静脉后再驱血), 大腿中部上止血带阻断动、静脉血流, 高位结扎切断大隐静脉分支及主干同传统术式[1], 自大隐静脉远断端插入血管探针, 尽可能向远端插入, 一般可达膝下, 接通冷冻开关, 血管探针头端降至—80 ℃, 迅速结成冰球并与血管壁粘结, 经冷冻 5 s 之后, 轻轻短促抽拉, 探针头端静脉断裂, 接着以 2 cm/s 的速度拉出探针, 剥脱大隐静脉主干, 若拉断静脉, 则在断裂处重新冷冻粘结, 再行剥脱, 直至完全抽出曲张静脉主干。小腿部曲张成团静脉手工点式抽剥, 作 0.5~1 cm 小切口, 用血管钳抽剥切口四周曲张静脉团, 切口缝 1 针或不缝, 以小块凡士林纱布覆盖, 术毕弹力绷带加压包扎。

(下转 1583 页)

作者简介: 马小干(1963—), 男, 北京市人, 博士, 副主任医师, 副教授 主要从事普通外科临床及基础方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68774605

收稿日期: 2003-11-27; 修回日期: 2004-04-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net