

大肠杆菌脂多糖体外诱导小鼠血小板凋亡的研究

吉祥 姚芳超 王兵 王勇强 曹书华 王玉亮

【摘要】 目的 观察大肠杆菌脂多糖(LPS)是否可在体外诱导小鼠血小板凋亡的发生。**方法** 制备洗涤血小板悬液,调整血小板终浓度至 $3 \times 10^8/\text{mL}$ 。根据刺激剂不同分为对照组[无钙台式缓冲液(TB)]、凝血酶处理组(终浓度 1 U/mL ,无钙TB制备)和不同浓度LPS处理组(终浓度 1 、 10 、 $100 \mu\text{g/mL}$,无钙TB制备)。各组加入相应刺激剂后室温孵育 30 min 。应用化学发光法检测三磷酸腺苷(ATP)含量及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活性;用流式细胞仪检测血小板膜联蛋白V(Annexin V)阳性率以反映磷脂酰丝氨酸(PS)暴露水平;用流式细胞仪测定血小板平均通道荧光强度(MCF)以反映线粒体内膜电位($\Delta \Psi_{\text{m}}$)去极化。**结果** 与对照组比较,凝血酶处理组血小板ATP水平明显降低[相对荧光强度(RLU): $(5.46 \pm 0.14) \times 10^5$ 比 $(6.25 \pm 0.26) \times 10^5$, $P < 0.05$], Annexin V阳性率 $[(50.43 \pm 2.45) \%$ 比 $(1.58 \pm 0.25) \%$, $P < 0.05$]和 caspase-3活性[RLU: $(26.92 \pm 1.60) \times 10^3$ 比 $(1.30 \pm 0.10) \times 10^3$, $P < 0.05$]均明显升高,血小板MCF明显降低 $[(8.32 \pm 0.58) \times 10^4$ 比 $(13.05 \pm 1.10) \times 10^4$, $P < 0.05$],说明 $\Delta \Psi_{\text{m}}$ 去极化增加。给予不同浓度LPS处理后,血小板ATP水平、Annexin V阳性率和caspase-3活性均明显升高,血小板MCF明显降低,说明 $\Delta \Psi_{\text{m}}$ 去极化增加,且呈浓度依赖性。与对照组比较, $1 \mu\text{g/mL}$ LPS即可使Annexin V阳性率增加 $[(10.45 \pm 1.08) \%$ 比 $(1.58 \pm 0.25) \%$, $P < 0.05$], caspase-3活性升高[RLU: $(14.06 \pm 0.61) \times 10^3$ 比 $(1.30 \pm 0.10) \times 10^3$, $P < 0.05$], MCF明显降低 $[(9.48 \pm 0.50) \times 10^4$ 比 $(13.05 \pm 1.10) \times 10^4$, $P < 0.05$]。经 $100 \mu\text{g/mL}$ LPS处理后血小板ATP水平、Annexin V阳性率和caspase-3活性最高,且均明显高于对照组[ATP(RLU): $(7.00 \pm 0.03) \times 10^5$ 比 $(6.25 \pm 0.26) \times 10^5$, Annexin V阳性率: $(55.35 \pm 2.42) \%$ 比 $(1.58 \pm 0.25) \%$, caspase-3(RLU): $(32.00 \pm 3.75) \times 10^3$ 比 $(1.30 \pm 0.10) \times 10^3$, 均 $P < 0.05$];血小板MCF最低,且明显低于对照组 $[(4.69 \pm 0.55) \times 10^4$ 比 $(13.05 \pm 1.10) \times 10^4$, $P < 0.05$]。**结论** 大肠杆菌LPS可体外诱导小鼠血小板ATP升高、PS暴露、 $\Delta \Psi_{\text{m}}$ 去极化及caspase-3活性增加,说明LPS可诱导血小板凋亡,且呈浓度依赖性。

【关键词】 脂多糖; 脓毒症; 血小板; 凋亡; 血小板减少症

A study of apoptosis of murine platelet induced by lipopolysaccharide derived from *Escherichia coli* in vitro Ji Xiang*, Yao Fangchao, Wang Bing, Wang Yongqiang, Cao Shuhua, Wang Yuliang. *First Center Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Wang Yongqiang, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China, Email: yongqiangwang1962@sina.com

【Abstract】 Objective To observe whether lipopolysaccharide (LPS) derived from *Escherichia coli* (*E.coli*) can induce apoptosis of murine platelets in vitro. **Methods** Washed platelet suspension was prepared and adjusted to the final concentration of $3 \times 10^8/\text{mL}$. According to the difference in stimulants, samples were divided into control group (non-calcium Tyrode buffer), thrombin-treated group (1 U/mL final concentration and non-calcium TB) and LPS in different concentrations treated groups (1 , 10 and $100 \mu\text{g/mL}$ final concentration respectively and non-calcium TB). To each specimental group corresponding stimulus was added and incubated 30 minutes at room temperature. Chemiluminescence was adopted to determine the concentration of adenosine triphosphate (ATP) and the activity of cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (caspase-3). The percentage of Annexin V positive platelets was determined by flow cytometry to reflect the level of phosphatidylserine (PS) exposure. Mean channel fluorescence (MCF) of platelets was determined by flow cytometry for reflecting the level of mitochondrial inner transmembrane potential ($\Delta \Psi_{\text{m}}$) depolarization. **Results** Compared with control group, the ATP concentration in thrombin-treated group was decreased

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.08.012

基金项目:天津市卫计委攻关课题(14KG101);国家临床重点专科建设项目(2011-873)

作者单位:300192 天津医科大学一中心临床学院(吉祥);300192 天津市第一中心医院急救医学研究所(姚芳超、王兵、王勇强、曹书华);300384 卫生部危重病急救医学重点实验室(王玉亮)

通讯作者:王勇强, Email: yongqiangwang1962@sina.com

obviously [relative light unit (RLU): $(5.46 \pm 0.14) \times 10^5$ vs. $(6.25 \pm 0.26) \times 10^5$, $P < 0.05$], Annexin V positive ratio [$(50.43 \pm 2.45)\%$ vs. $(1.58 \pm 0.25)\%$, $P < 0.05$] and caspase-3 activity [RLU: $(26.92 \pm 1.60) \times 10^3$ vs. $(1.30 \pm 0.10) \times 10^3$, $P < 0.05$] were increased obviously, and platelets MCF was lowered significantly [$(8.32 \pm 0.58) \times 10^4$ vs. $(13.05 \pm 1.10) \times 10^4$, $P < 0.05$], suggesting an increase in $\Delta \Psi_m$ depolarization. After being treated with different concentrations of LPS, ATP concentration, Annexin V positive ratio and caspase-3 activity were increased obviously, platelet MCF was decreased obviously, suggesting $\Delta \Psi_m$ depolarization was increased in a concentration-dependent manner. Compared with control group, 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS could increase Annexin V positive ratio [$(10.45 \pm 1.08)\%$ vs. $(1.58 \pm 0.25)\%$, $P < 0.05$], elevate caspase-3 activity [RLU: $(14.06 \pm 0.61) \times 10^3$ vs. $(1.30 \pm 0.10) \times 10^3$, $P < 0.05$], and decrease MCF significantly [$(9.48 \pm 0.50) \times 10^4$ vs. $(13.05 \pm 1.10) \times 10^4$, $P < 0.05$]. The ATP concentration, Annexin V positive ratio and caspase-3 activity reached maximum levels after the treatment with 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS, and they were higher obviously than those of the control group [ATP (RLU): $(7.00 \pm 0.03) \times 10^5$ vs. $(6.25 \pm 0.26) \times 10^5$, Annexin V positive ratio: $(55.35 \pm 2.42)\%$ vs. $(1.58 \pm 0.25)\%$, caspase-3 (RLU): $(32.00 \pm 3.75) \times 10^3$ vs. $(1.30 \pm 0.10) \times 10^3$, all $P < 0.05$], and platelets MCF reached trough levels, and they were obviously lower than those of the control group [$(4.69 \pm 0.55) \times 10^4$ vs. $(13.05 \pm 1.10) \times 10^4$, $P < 0.05$]. **Conclusion** *E.coli* LPS can induce an increase in ATP, PS exposure, $\Delta \Psi_m$ depolarization and activity increase of caspase-3 on mouse platelet in vitro, which indicate that LPS can induce apoptosis of platelets in a concentration-dependent manner.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Sepsis; Platelet; Apoptosis; Thrombocytopenia

血小板减少症 (TCP) 是脓毒症的重要表现之一^[1-2], 在脓毒症患者中发生率可达 47.6%^[3]。TCP 可增加脓毒症患者严重出血及急性肾损伤 (AKI) 的发生率, 并延长重症加强治疗病房 (ICU) 住院时间^[3], 但其确切发病机制目前并不明确。尽管已经证实炎症、凝血等多种机制参与了 TCP 的发生, 但也有研究表明, 脓毒症时 TCP 是可以不依赖凝血及炎症机制而独立发生的^[4-8]。血小板可表达功能性 Toll 样受体 (TLR)^[9], 其中 TLR4 在介导血小板参与炎症反应中发挥了重要作用, 同时脂多糖 (LPS) 可通过 TLR4 直接诱导小鼠 TCP 的发生, 但不能诱导 TLR4 基因缺陷或敲除小鼠发生 TCP^[10]。临床研究也证实, 脓毒症相关性 TCP 与血小板 TLR4 的表达量具有相关性^[11-12]。因此, LPS 通过 TLR4 对血小板生存周期的影响可能是 TCP 发生的重要机制。凋亡是机体调节有核细胞数量的重要方式之一, 虽然血小板没有细胞核, 但已发现血小板可表达多种凋亡相关蛋白, 并含有丰富的线粒体及内质网, 具备执行程序化死亡的物质基础, 在多种凋亡诱导剂的作用下也可发生凋亡^[13-15]。本实验通过体外条件下观察不同浓度 LPS 对血小板凋亡相关指标的影响, 探讨 LPS 是否可诱发血小板凋亡。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器: LPS、凝血酶 (美国 Sigma 公司), 荧光素酶试剂盒 (CellTiter-Glo) 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase)-Glo3/7 检测试剂盒 (美国 Promega 公司), 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC, 美国 BD 公司), 碘代

3,3'-二乙氧基羰花青 (DiOC6, 美国 Invitrogen 公司); L420 台式低速自动平衡离心机 (长沙湘仪离心机仪器有限公司), Microfuge 22R 离心机 (美国 Beckman Coulter 公司), Infinite M200 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司), Accuri C6 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 96 孔不透明白板 (美国 Corning 公司)。

1.2 洗涤血小板的制备: 6~8 周龄雄性 C57/BL 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心, 动物合格证号: SCXK-2007-004。腹腔注射 10% 水合氯醛 300 mg/kg 麻醉小鼠, 经腹主动脉采血, 以枸橼酸葡萄糖保存液 (ACD) 抗凝, 离心收集富血小板血浆; 再离心, 采用枸橼酸-葡萄糖-氯化钠缓冲液 (CGS) 洗涤 2 次, 离心弃上清; 1 mL 无钙台式缓冲液 (TB) 洗涤 1 次, 离心弃上清; 1 mL 无钙 TB 重悬血小板, 调整至终浓度为 $3 \times 10^8/\text{mL}$, 室温静置 1 h 恢复至静息状态。

1.3 分组及处理: 按加入刺激剂不同分为对照组 (无钙 TB)、凝血酶处理组 (无钙 TB 制备的终浓度 1 U/mL 凝血酶, 作为阳性对照) 和不同浓度 LPS 处理组 (无钙 TB 制备的终浓度 1、10、100 $\mu\text{g/mL}$ LPS), 每组 6 个样本。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 化学发光法测定血小板三磷酸腺苷 (ATP) 水平和 caspase-3 活性: 按照试剂盒说明书分别制备 CellTiter-Glo 检测试剂和 caspase-Glo3/7 反应试剂, 避光保存。血小板悬液中加入氯化钙 (CaCl_2) 和氯化镁 (MgCl_2) 使其终浓度为 1 mmol/L。应用壁不透明的 96 孔板上样, 待测样本每孔 100 μL ,

加入相应刺激剂后室温平衡 30 min, 向每孔中加入 100 μ L CellTiter-Glo 检测试剂或与上样量等体积的 caspase-Glo3/7 反应试剂, 微量板振荡仪上振荡 2 min, 室温孵育 10 min, 全程避光操作。上机检测并记录相对荧光强度 (RLU)。

1.4.2 Annexin V-FITC 单染法测定血小板磷脂酰丝氨酸 (PS) 暴露水平: 3×10^8 /mL 洗涤血小板中加入 CaCl_2 、 MgCl_2 使其终浓度为 1 mmol/L, 按照分组加入无钙 TB 溶液、凝血酶或不同浓度 LPS, 达目标终浓度后室温孵育 30 min。取样本 100 μ L, 加入 Annexin V-FITC 1 μ L, 室温下避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测, 记录 Annexin V 阳性细胞率。

1.4.3 DiOC6 染色测定血小板线粒体内膜电位 ($\Delta \Psi_m$) 变化: 参照 1.4.2 的步骤分组建立反应体系, 室温孵育 30 min, 取样本 200 μ L 移入流式试管, 加入 50 μ mol/L DiOC6 工作液 0.5 μ L, 室温下避光孵育 10 min 后上机, 应用 Accuri C6 流式细胞仪检测血小板平均通道荧光强度 (MCF), 对 $\Delta \Psi_m$ 去极化进行量化分析。

1.5 统计学处理: 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, Levene 检验, 满足方差齐性时组间两两比较采用 LSD 法, 不满足方差齐性时用 Welch 法, 组间两两比较应用 Dunnett T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

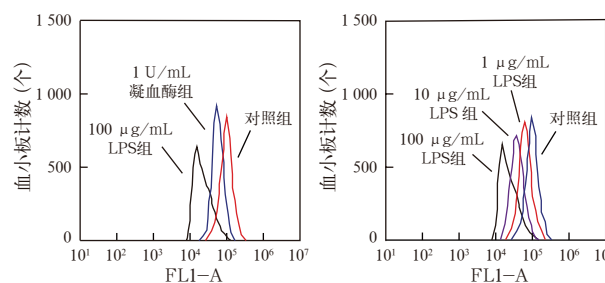
2 结果

2.1 LPS 对血小板 ATP 水平的影响 (表 1): 与对照组相比, 凝血酶处理组血小板 ATP 水平明显下降 ($P < 0.05$)。给予 LPS 处理后, ATP 水平升高, 且随 LPS 浓度升高呈逐渐上升趋势。1 μ g/mL LPS 处理组 ATP 水平较对照组升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 10 μ g/mL 和 100 μ g/mL LPS 处理组均较对照组显著增高, 且以 100 μ g/mL LPS 处理组升高更为明显 (均 $P < 0.05$)。

2.2 LPS 对血小板 PS 暴露水平的影响 (表 1): 与对照组比较, 凝血酶处理组反映血小板 PS 暴露水平的 Annexin V 阳性率明显升高 ($P < 0.05$)。给予 LPS 处理后, Annexin V 阳性率也均明显高于对照组

(均 $P < 0.05$), 且随 LPS 浓度升高呈递增趋势。其中 1 μ g/mL 和 10 μ g/mL LPS 处理组 Annexin V 阳性率均明显低于凝血酶处理组 (均 $P < 0.05$); 100 μ g/mL LPS 处理组则较凝血酶处理组明显升高 ($P < 0.05$)。说明 LPS 可诱导血小板发生 PS 暴露的改变, 且呈浓度依赖性。

2.3 LPS 对血小板 $\Delta \Psi_m$ 的影响 (表 1; 图 1): 凝血酶处理组及 1、10、100 μ g/mL LPS 处理组血小板 MCF 分别降至对照组的 63.7%、72.6%、50.8% 和 35.9% (均 $P < 0.05$), 提示 $\Delta \Psi_m$ 发生去极化增加。



注: LPS 为脂多糖, $\Delta \Psi_m$ 为线粒体内膜电位

图 1 不同浓度 LPS 对外诱导小鼠血小板 $\Delta \Psi_m$ 的影响

2.4 LPS 对血小板 caspase-3 活性的影响 (表 1): 与对照组比较, 凝血酶处理组及不同浓度 LPS 处理组 caspase-3 活性均明显增加 (均 $P < 0.05$); 且随 LPS 浓度升高, caspase-3 活性呈逐渐升高趋势 (均 $P < 0.05$), 具有浓度依赖性。

3 讨论

脓毒症是感染引起的全身炎症反应综合征 (SIRS), 常导致凝血系统功能异常, 从单独的血小板减少和 (或) 亚临床表现的凝血系统活化, 到持续的全身性凝血活化, 伴随大量凝血酶和纤维素的形成以及继发性血小板及凝血因子消耗, 即弥散性血管内凝血 (DIC) [16-18]。脓毒症相关性 DIC 最常见

表 1 不同浓度 LPS 对外诱导小鼠血小板 ATP、PS 暴露水平、 $\Delta \Psi_m$ 及 caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	ATP (RLU, $\times 10^5$)	Annexin V 阳性率 (%)	$\Delta \Psi_m$ (MCF, $\times 10^4$)	caspase-3 (RLU, $\times 10^3$)
对照组	6	6.25 $\pm$ 0.26	1.58 $\pm$ 0.25	13.05 $\pm$ 1.10	1.30 $\pm$ 0.10
凝血酶处理组	6	5.46 $\pm$ 0.14 ^a	50.43 $\pm$ 2.45 ^a	8.32 $\pm$ 0.58 ^a	26.92 $\pm$ 1.60 ^a
1 μ g/mL LPS 处理组	6	6.38 $\pm$ 0.12 ^b	10.45 $\pm$ 1.08 ^{ab}	9.48 $\pm$ 0.50 ^{ab}	14.06 $\pm$ 0.61 ^{ab}
10 μ g/mL LPS 处理组	6	6.76 $\pm$ 0.12 ^{abc}	19.20 $\pm$ 1.52 ^{abc}	6.63 $\pm$ 0.60 ^{abc}	21.55 $\pm$ 1.90 ^{abc}
100 μ g/mL LPS 处理组	6	7.00 $\pm$ 0.03 ^{abcd}	55.35 $\pm$ 2.42 ^{abcd}	4.69 $\pm$ 0.55 ^{abcd}	32.00 $\pm$ 3.75 ^{acd}

注: LPS 为脂多糖, ATP 为三磷酸腺苷, PS 为磷脂酰丝氨酸, $\Delta \Psi_m$ 为线粒体内膜电位, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, Annexin V 为膜联蛋白 V, RLU 为相对荧光强度, MCF 为平均通道荧光强度; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与凝血酶处理组比较, ^b $P < 0.05$; 与 1 μ g/mL LPS 处理组比较, ^c $P < 0.05$; 与 10 μ g/mL LPS 处理组比较, ^d $P < 0.05$

的特征性临床表现是不同器官广泛血栓形成,最终导致单个或多个器官功能障碍。弥散性微血栓形成导致凝血因子和血小板大量消耗,使患者处于出血性合并症的高危状态^[19]。从这个意义上来说,脓毒症也是一种由感染引起的消耗性凝血病^[20],而 TCP 是内毒素诱导的 DIC 相关性消耗性凝血病的一部分。尽管如此,越来越多的研究表明, DIC 不能作为脓毒症相关性 TCP 的唯一原因。早在 1976 年, Oppenheimer 等^[21]就发现,在成人和儿童脓毒症患者,早期即可频繁发生血小板减少,但没有明确的 DIC 表现。François 等^[22]观察了 50 例发生 TCP 的脓毒症患者,研究对象均无明确的 DIC、近期输血史、肝素治疗或任何其他可识别的原因,血小板计数并不伴随凝血因子的减少而减少,这表明 TCP 可通过 DIC 以外的其他机制发生。

尽管内毒素血症可诱导凝血系统过度活化,但凝血系统过度活化与血小板减少的关系也存在争议。Camerer 等^[23]采用给基因缺陷小鼠腹腔注射 LPS 的方法研究了凝血酶受体、胶原受体和纤维蛋白原受体在内毒素血症及其相关 TCP 发病机制中的作用,结果发现, LPS 诱导的 TCP 与凝血系统活化无关。从而进一步证实存在非 DIC 依赖的脓毒症相关性 TCP 的机制,而血小板表面多种分子可能参与其中。LPS 是革兰阴性 (G^-) 菌细胞壁的主要结构成分,也是人体免疫系统识别外源性致病微生物的重要物质,在 G^- 菌引起的脓毒症发生发展中具有重要作用。血小板可表达 LPS 受体信号复合物^[24],其中 TLR4 是 LPS 的天然配体, LPS 可通过 TLR4 依赖的途径介导 TCP 的发生^[10]。

凝血酶是血小板的强活化剂,也是血小板凋亡的诱导剂。关于凝血酶对血小板凋亡的影响, Leytin 等^[14,25]曾进行了深入的研究,结果表明,凝血酶可引起血小板凋亡性改变,包括 PS 暴露、 $\Delta\Psi_m$ 去极化、Bcl-2 家族蛋白表达增加及 caspase-3 活性增高,且凝血酶对血小板的促凋亡作用具有剂量依赖性。本实验观察到用 1 U/mL 凝血酶刺激血小板后,血小板总 ATP 水平下降、PS 暴露增加、 $\Delta\Psi_m$ 去极化增加、caspase-3 活性增高,均为血小板凋亡的表现。因此,本实验应用凝血酶作为阳性对照,观察体外条件下 LPS 对血小板凋亡指标的影响。

ATP 常作为评价细胞代谢水平的重要指标,其含量升高提示细胞代谢水平增强,反之细胞代谢水平降低。本研究显示,凝血酶可使血小板总 ATP 水

平下降,与 Leytin 等^[25]的研究结果一致;但 LPS 作用于血小板后对代谢的影响表现为刺激效应。

PS 暴露是有核细胞凋亡时细胞膜的重要改变,同时也是网状内皮系统清除凋亡细胞的识别分子。Kile^[26]研究发现,用凋亡诱导剂 ABT737 处理 Bak 和 Bax 缺陷的血小板只引起很少的 PS 暴露,这表明 PS 暴露是血小板凋亡的重要表现。本实验中用不同浓度 LPS 刺激血小板后,血小板 Annexin V 阳性率均明显增加,提示血小板 PS 暴露比例增加,并且随着 LPS 浓度的增加而增加,这说明 LPS 可诱导血小板 PS 暴露,且具有浓度依赖性。因血小板活化也可表现为 PS 暴露增加,因此仅从 PS 暴露并不能判断 LPS 对血小板的效应是活化或是凋亡,仍需结合其他凋亡指标。

线粒体在启动内源性细胞凋亡途径中具有重要的作用。同样,在血小板生命周期调节中线粒体也发挥了重要的作用^[26]。细胞凋亡过程中会发生 $\Delta\Psi_m$ 去极化。本研究结果显示,凝血酶与不同浓度 LPS 刺激血小板均导致以 MCF 下降为特点的血小板 $\Delta\Psi_m$ 的改变, $\Delta\Psi_m$ 去极化是线粒体功能下降的表现,也是线粒体特征性凋亡改变,这提示 LPS 可使血小板线粒体功能发生障碍,导致血小板凋亡发生。

caspase-3 是凋亡执行蛋白,也是内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径共同的交汇点,不管是内源性途径还是外源性途径,均可体现在 caspase-3 活性的变化上。本实验应用化学发光法测定了凝血酶和不同浓度 LPS 对血小板 caspase-3 活性的影响,结果表明,凝血酶和 LPS 均可引起 caspase-3 活性增高,且具有 LPS 浓度依赖性,其中以 100 $\mu\text{g/mL}$ LPS 引起 caspase3 活性升高最为明显。

结合 $\Delta\Psi_m$ 去极化增加及 caspase-3 活性升高的表现可以认为, PS 暴露增加为血小板凋亡的膜变化,而这种凋亡性改变所伴随的 ATP 水平变化并不能简单解释血小板凋亡的能量代谢状态,因为细胞 ATP 代谢途径可能涉及 ADP-ATP 间的动态转化。

综上所述,本实验观察到,在体外条件下大肠杆菌 LPS 可诱导小鼠血小板发生凋亡性改变,表现为血小板膜 PS 暴露增加、 $\Delta\Psi_m$ 去极化增加和 caspase-3 激活,而这一过程中伴随的血小板 ATP 变化在血小板凋亡中的作用机制仍有待进一步研究。LPS 诱导血小板凋亡可能是脓毒症相关性 TCP 发生的重要机制之一。

参考文献

- [1] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16 (6): 321-324.
- [2] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远. 2001 年国际脓毒症定义会议关于脓毒症诊断的新标准[J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18 (11): 645.
- [3] Venkata C, Kashyap R, Farmer JC, et al. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome [J]. J Intensive Care, 2013, 1 (1): 9.
- [4] Riedler GF, Straub PW, Frick PG. Thrombocytopenia in septicemia. A clinical study for the evaluation of its incidence and diagnostic value [J]. Helv Med Acta, 1971, 36 (1): 23-38.
- [5] Corrigan JJ Jr. Thrombocytopenia: a laboratory sign of septicemia in infants and children [J]. J Pediatr, 1974, 85 (2): 219-221.
- [6] Oppenheimer L, Hryniuk WM, Bishop AJ. Thrombocytopenia in severe bacterial infections [J]. J Surg Res, 1976, 20 (3): 211-214.
- [7] Neame PB, Kelton JG, Walker IR, et al. Thrombocytopenia in septicemia; the role of disseminated intravascular coagulation [J]. Blood, 1980, 56 (1): 88-92.
- [8] Yang HL, Jiang XC, Zhang XY, et al. Thrombocytopenia in the experimental leptospirosis of guinea pig is not related to disseminated intravascular coagulation [J]. BMC Infect Dis, 2006, 6: 19.
- [9] Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, et al. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets [J]. Immunol Cell Biol, 2005, 83 (2): 196-198.
- [10] Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4 [J]. Blood, 2005, 106 (7): 2417-2423.
- [11] 王勇强, 王兵, 梁勇, 等. 血小板 TLR4 表达在脓毒症血小板减少症发病中的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20 (1): 56-59.
- [12] 王兵, 王勇强, 曹书华, 等. 脓毒症患者血小板参数与 Toll 样受体 4 表达的关系及中西医结合治疗研究[J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23 (10): 616-620.
- [13] Wang Z, Li S, Shi Q, et al. Calmodulin antagonists induce platelet apoptosis [J]. Thromb Res, 2010, 125 (4): 340-350.
- [14] Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, et al. Thrombin-triggered platelet apoptosis [J]. J Thromb Haemost, 2006, 4 (12): 2656-2663.
- [15] Yeh JJ, Tsai S, Wu DC, et al. P-selectin-dependent platelet aggregation and apoptosis may explain the decrease in platelet count during Helicobacter pylori infection [J]. Blood, 2010, 115 (21): 4247-4253.
- [16] 李银平, 郑贵军, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠活化蛋白 C 及凝血功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (6): 361-364.
- [17] 唐丽群, 彭娜, 潘志国, 等. 血必净注射液对严重脓毒症患者凝血指标及预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (3): 132-136.
- [18] 曾文美, 毛璞, 黄勇波, 等. 脓毒症预后影响因素分析及预后价值评估[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (2): 118-123.
- [19] Kitchens CS. Thrombocytopenia and thrombosis in disseminated intravascular coagulation (DIC) [J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: 240-246.
- [20] Li Z, Yang F, Dunn S, et al. Platelets as immune mediators: their role in host defense responses and sepsis [J]. Thromb Res, 2011, 127 (3): 184-188.
- [21] Oppenheimer L, Hryniuk WM, Bishop AJ. Thrombocytopenia in severe bacterial infections [J]. J Surg Res, 1976, 20 (3): 211-214.
- [22] François B, Trimoreau F, Vignon P, et al. Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor [J]. Am J Med, 1997, 103 (2): 114-120.
- [23] Camerer E, Cornelissen I, Kataoka H, et al. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia [J]. Blood, 2006, 107 (10): 3912-3921.
- [24] Zhang G, Han J, Welch EJ, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway [J]. J Immunol, 2009, 182 (12): 7997-8004.
- [25] Leytin V, Allen DJ, Lyubimov E, et al. Higher thrombin concentrations are required to induce platelet apoptosis than to induce platelet activation [J]. Br J Haematol, 2007, 136 (5): 762-764.
- [26] Kile BT. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7 Suppl 1: 214-217.

(收稿日期: 2015-05-20)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

冷水浸泡对穿着美式足球制服中暑高热球员的降温效果

对中暑的美式足球球员, 目前治疗推荐除去其身上的衣物和装备, 将身体浸泡在冷水中进行降温, 但穿着全套的美式足球制服是否会影响冷水浸泡 (CWI) 过程中直肠温度 (Tr) 的降温效果或体温下降后是否加剧低体温尚不清楚。因此美国学者进行了一项交叉设计试验研究, 比较穿着全套美式足球制服或普通制服的中暑者分别接受 CWI 后 Tr 从 39.5 °C 降至 38.0 °C 所需时间及 CWI 后身着制服对 Tr 的降温效果。共纳入 18 位男性参与者, 平均年龄 (22±3) 岁, 身高 (178.8±6.8) cm, 体重 (82.3±12.6) kg, 体脂 (13±4) %, 体表面积 (2.0±0.2) m²。他们分别穿着普通制服 (内衣、短裤、船员袜子、网球鞋) 或全套美式足球服 (控制 T 恤, 网球鞋, 泽西、足球裤子, 覆盖膝盖、大腿和尾骨的衬垫, 头盔, 肩垫)。参与者在约 40 °C、35% 相对湿度的环境中运动, 直到 Tr 达到 39.5 °C 后, 脱掉他们的 T 恤和鞋子, 各自穿着制服浸泡在冷水 (约 10 °C) 中, 记录 Tr 降至 38.0 °C 的时间, 并在浸泡 30 min 后每 5 min 测量 1 次 Tr。结果显示, 身着全套美式足球服组 Tr 降至 38.0 °C 所需时间为 (6.19±2.02) min, 身着普通制服组为 (8.49±4.78) min (效应量=0.48, P=0.03), 降温速度分别为 (0.28±0.12) °C/min 和 (0.23±0.11) °C/min (效应量=0.44, P=0.07)。随着时间的推移, 两组 CWI 后 Tr 没有显著差异 (P=0.59)。据此研究者推测, 身着全套美式足球服者降温更快的原因可能是由于他们 CWI 前皮肤温度更高、较少发抖、以及热传导更快。降温速度在身着美式足球制服者进行 CWI 被认为是理想的, 并且穿着制服没有造成更严重的降温后低体温发生。因此临床医生可能不必关注身体核心温度降低带来的负面影响, 可直接对身着全套美式足球服的运动员进行 CWI 降温治疗。

喻文, 罗红敏, 编译自《Athl Train》, 2015-06-19 (电子版)