

SNARE/Munc18b 复合体介导脓毒症血小板 α 颗粒释放及 CORM-2 的干预机制

庄明峰 孙炳伟 刘大东 石源

214400 江苏江阴, 江阴市人民医院重症医学科(庄明峰, 石源); 212000 江苏镇江, 江苏大学附属医院烧伤整形科(孙炳伟), 重症医学科(刘大东)

通讯作者: 石源, Email: shiyuan66098@163.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2017.02.012

【摘要】 目的 探讨可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体及其调节因子突触融合蛋白结合蛋白 b(SNARE/Munc18b) 复合体介导的脓毒症血小板 α 颗粒释放及一氧化碳释放分子 II (CORM-2) 的干预机制。**方法** 采集健康成人肘静脉血, 差速离心法分离出富含血小板血浆 (PRP), 并随机分为对照组、脂多糖 (LPS) 组 (10 mg/L)、LPS+iCORM-2 组 (10 mg/L LPS + 50 μ mol/L 无活性 CORM-2), LPS+L-CORM-2 组 (10 mg/L LPS + 10 μ mol/L CORM-2)、LPS + H-CORM-2 组 (10 mg/L LPS + 50 μ mol/L CORM-2)。各组于 37 $^{\circ}$ C、湿度 95%、5% CO_2 培养箱孵育 30 min 取上清液, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血小板 α 颗粒释放物质血小板因子 4 (PF4)、血小板源性生长因子 BB (PDGF-BB) 和基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 含量; 流式细胞仪检测血小板 P-选择素的表达; 透射电镜和激光共聚焦显微镜下观察血小板 α 颗粒的分布; 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测血小板关键膜融合分子 Munc18b 及相关 SNARE 蛋白囊泡相关膜蛋白 -8 (VAMP-8)、突出相关蛋白 -23 (SNAP-23)、突出融合蛋白 -11 (STX-11) 的表达; 免疫沉淀法检测 SNARE/Munc18b 复合体的形成。**结果** 与对照组比较, LPS 组血小板 α 颗粒释放 PF4、PDGF-BB、MMP-2、P-选择素的量明显升高; 而低、高浓度 CORM-2 能有效抑制 LPS 刺激后血小板 α 颗粒的释放 [PF4 (μ g/L): 7.69 ± 0.58 、 6.03 ± 0.71 比 10.13 ± 0.82 , PDGF-BB (μ g/L): 112.71 ± 1.79 、 102.91 ± 5.86 比 128.78 ± 1.39 , MMP-2 (ng/L): 32.94 ± 2.73 、 27.58 ± 3.36 比 53.26 ± 1.21 , P-选择素: (17.14 ± 0.57)%、(15.35 ± 0.68)% 比 (23.78 ± 0.62)%, 均 $P < 0.01$], 且呈剂量依赖趋势。透射电镜和激光共聚焦显微镜下观察, CORM-2 能减少 LPS 刺激后血小板 α 颗粒向血小板膜周围分布, 并可抑制与包膜融合。与对照组比较, LPS 刺激后血小板 Munc18b 和相关 SNARE 蛋白表达, 以及 SNARE/Munc18b 复合体形成均显著增加; 而低、高浓度 CORM-2 能有效抑制 LPS 刺激后血小板 Munc18b 和 SNARE 蛋白表达以及 SNARE/Munc18b 复合体形成 (Munc18b/GAPDH: 0.80 ± 0.08 、 0.69 ± 0.01 比 0.99 ± 0.09 , VAMP-8/GAPDH: 0.72 ± 0.09 、 0.50 ± 0.12 比 1.18 ± 0.14 , SNAP-23/GAPDH: 1.18 ± 0.22 、 0.63 ± 0.10 比 1.90 ± 0.08 , STX-11/GAPDH: 0.76 ± 0.02 、 0.57 ± 0.08 比 1.16 ± 0.23 , VAMP-8/Munc18b: 0.65 ± 0.09 、 0.53 ± 0.07 比 1.21 ± 0.20 , SNAP-23/Munc18b: 0.85 ± 0.07 、 0.55 ± 0.09 比 1.26 ± 0.08 , STX-11/Munc18b: 0.78 ± 0.05 、 0.61 ± 0.10 比 1.39 ± 0.16 , 均 $P < 0.01$), 且呈剂量依赖趋势。iCORM-2 则无此作用。**结论** CORM-2 干预能够有效抑制脓毒症时血小板 α 颗粒的异常释放, 并呈剂量依赖趋势, 其作用机制可能涉及 SNARE/Munc18b 复合体的形成。

【关键词】 脓毒症; 血小板 α 颗粒; 可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体; 突触融合蛋白结合蛋白 b; 一氧化碳释放分子 II

基金项目: 国家自然科学基金 (81071546, 81272148); 江苏省自然科学基金 (BK2012703)

Suppressive effect of CORM-2 on platelet α -granule exocytosis in sepsis via SNARE/Munc18b complex formation Zhuang Mingfeng, Sun Bingwei, Liu Dadong, Shi Yuan

Department of Critical Care Medicine, Jiangyin People's Hospital, Jiangyin 214400, Jiangsu, China (Zhuang MF, Shi Y); Department of Burn and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu, China (Sun BW); Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, Jiangsu, China (Liu DD)

Corresponding author: Shi Yuan, Email: shiyuan66098@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the suppressive effect of carbon monoxide-releasing molecule II (CORM-2) on LPS induced platelet α -granule exocytosis in sepsis via soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attached protein receptor/mammalian uncoordinated 18b (SNARE/Munc18b) complex formation. **Methods** Blood was collected from healthy volunteers' cubital vein, then platelets were isolated by differential centrifugation. Platelets were randomly divided into 5 groups. The control group did not undergo any treatment, the LPS group received 10 mg/L LPS simulation, the CORM-2 group and iCORM-2 group underwent LPS simulation and immediate administration of CORM-2 (10 μ mol/L and 50 μ mol/L) or iCORM-2 (50 μ mol/L), respectively. Samples were incubated in a CO_2 -incubator

at 37 °C, 95% humidity, and 5% CO₂. Platelet α -granule contents were detected by using standard enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), including platelet factor 4 (PF4), platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB), and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). The expression of P-selectin was detected by flow cytometer. Transmission electron microscope and immunofluorescence microscope was used to assess platelet α -granules distribution. Expressions of Munc18b and SNARE proteins including vesicle-associated membrane protein-8 (VAMP-8), synaptosomal-associated protein-23 (SNAP-23) and syntaxin-11 (STX-11) were detected by Western Bolt. The SNARE/Munc18b complex formation was detected by immunoprecipitation. **Results** Compared with the control group, levels of PF4, PDGF-BB, MMP-2 and P-selectin in LPS-induced platelets were found to markedly elevated, while CORM-2 (10 μ mol/L and 50 μ mol/L) could decrease platelet α -granule contents exocytosis: [PF4 (μ g/L): 7.69 $\pm$ 0.58, 6.03 $\pm$ 0.71 vs. 10.13 $\pm$ 0.82; PDGF-BB (μ g/L): 112.71 $\pm$ 1.79, 102.91 $\pm$ 5.86 vs. 128.78 $\pm$ 1.39; MMP-2 (ng/L): 32.94 $\pm$ 2.73, 27.58 $\pm$ 3.36 vs. 53.26 $\pm$ 1.21; P-selectin: (17.14 $\pm$ 0.57)%, (15.35 $\pm$ 0.68)% vs. (23.78 $\pm$ 0.62)%; all P < 0.01]. Transmission electron microscope and immunofluorescence microscope showed that the extent of platelet α -granules assembled to platelet plasma membrane was significantly decreased following CORM-2 treatment. Compared with the control group, the expressions of Munc18b and SNARE proteins and SNARE/Munc18b complex formation in LPS-stimulated platelets were significantly increased, while CORM-2 (10 μ mol/L and 50 μ mol/L) inhibited these elevations (Munc18b/GAPDH: 0.80 $\pm$ 0.08, 0.69 $\pm$ 0.01 vs. 0.99 $\pm$ 0.09; VAMP-8/GAPDH: 0.72 $\pm$ 0.09, 0.50 $\pm$ 0.12 vs. 1.18 $\pm$ 0.14; SNAP-23/GAPDH: 1.18 $\pm$ 0.22, 0.63 $\pm$ 0.10 vs. 1.90 $\pm$ 0.08; STX-11/GAPDH: 0.76 $\pm$ 0.02, 0.57 $\pm$ 0.08 vs. 1.16 $\pm$ 0.23; VAMP-8/Munc18b: 0.65 $\pm$ 0.09, 0.53 $\pm$ 0.07 vs. 1.21 $\pm$ 0.20; SNAP-23/Munc18b: 0.85 $\pm$ 0.07, 0.55 $\pm$ 0.09 vs. 1.26 $\pm$ 0.08; STX-11/Munc18b: 0.78 $\pm$ 0.05, 0.61 $\pm$ 0.10 vs. 1.39 $\pm$ 0.16; all P < 0.01). Above all, the data showed a dose dependent change. **Conclusion** We could suggest that CORM-2 suppressed α -granule exocytosis in LPS-stimulated platelets and the potential mechanisms might involve SNARE/Munc18b complex formation.

[Key words] Sepsis; Platelet α -granule; Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; Mammalian uncoordinated 18b; Carbon monoxide-releasing molecule II

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81071546, 81272148); Natural Science Foundation of Jiangsu Province of China (BK2012703)

脓毒症是机体对感染失控反应所导致的危及生命的器官功能障碍^[1-3]。即使新型抗菌药物和复苏技术广泛应用于临床,脓毒症仍然是急危重症患者的主要死亡原因之一^[4-5]。凝血功能紊乱在脓毒症病理生理过程中发挥了关键作用^[6-7]。血小板是凝血系统的重要组成部分,脓毒症时血小板 α 颗粒释放大量功能性蛋白分子,可进一步促进凝血功能紊乱及炎症反应,加重脓毒症损伤^[8-11]。研究证实,可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (SNARE) 及其调节因子突触融合蛋白结合蛋白 b (Munc18b) 形成的复合体与脓毒症时血小板 α 颗粒释放密切相关^[12]。外源性一氧化碳释放分子 II (CORM-2) 是一种新型金属碳基化合物,能抑制机体炎症反应,有细胞保护功能^[13]。本研究用脂多糖 (LPS) 体外刺激血小板建立脓毒症血小板模型^[14],并用 CORM-2 进行干预,探讨 CORM-2 对血小板 α 颗粒释放及 SNARE/Munc18b 复合体形成的影响。

1 材料与方法

1.1 实验主要试剂: LPS、CORM-2、二甲基亚砷 (DMSO)、蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液、兔抗人囊泡相关膜蛋白 -8 (VAMP-8) 单克隆抗体 (单抗) 和羊抗兔 IgG-Alexa Fluor[®]594 荧光染料均购自美国 Sigma 公司。CORM-2 使用前溶于 DMSO,同时配制无活性 CORM-2 (iCORM-2)。磷酸酶抑制剂、羊抗人 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 单抗、鼠抗人异

硫氰酸荧光素 (FITC)-CD41 单抗、鼠抗人藻红蛋白 (PE)-P-选择素单抗和羊抗人 Munc18b 多克隆抗体 (多抗) 购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗人突触相关蛋白 -23 (SNAP-23) 多抗和兔抗人突触融合蛋白 -11 (STX-11) 多抗购自美国 Abcam 公司。血小板源性生长因子 BB (PDGF-BB) 和基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自上海乔伊公司,血小板因子 4 (PF4) ELISA 试剂盒及其他试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 脓毒症血小板模型建立与分组: 取采血前 2 周内未服用过阿司匹林等影响血小板功能药物的健康者肘静脉血, 3.8% 柠檬酸钠抗凝,离心取上层富含血小板血浆 (PRP),并随机分为 5 组。对照组不予任何处理; LPS 组给予 10 mg/L LPS 刺激; LPS+L-CORM-2 组和 LPS+H-CORM-2 组在 LPS 刺激的同时分别给予 10 μ mol/L、50 μ mol/L 的 CORM-2 干预; LPS+iCORM-2 组在 LPS 刺激的同时给予 50 μ mol/L iCORM-2 干预。各组置于 37 °C、湿度 95%、5% CO₂ 培养箱孵育 30 min,收集上清液备检。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 ELISA 检测 PF4、PDGF-BB 和 MMP-2 含量: 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测上清液中 PF4、PDGF-BB 和 MMP-2 含量。用酶标仪在波长 450 nm 处测定细胞因子吸光度 (A) 值,应用 Gen5 CHS 2.01 分析软件计算其含量。

1.3.2 流式细胞仪检测血小板 P-选择素表达:收集上清液于 BD 试管中, 1% 多聚甲醛溶液固定; 依次加入鼠抗人 FITC-CD41 单抗、鼠抗人 PE-P-选择素单抗, 室温避光孵育 15 min, 于流式细胞仪检测荧光标记阳性的血小板百分数。

1.3.3 透射电镜下观察血小板 α 颗粒的分布:收集上清液, 常温下与等体积 3% 戊二醛磷酸缓冲液混匀固定 1.5 h, 再用 2% 四氧化锇磷酸缓冲液混匀固定 30 min, 浓度梯度乙醇溶液脱水, 环氧树脂浸润包埋, 制作超薄切片, 0.5% 水铀酰乙酸染色, 于透射电镜下观察。

1.3.4 激光共聚焦显微镜下观察血小板 α 颗粒的分布:收集上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入 4% 多聚甲醛溶液室温固定 20 min。4 °C 离心 5 min 去上清液, 加入 0.3% 曲拉通于冰上通透 20 min, 用 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 2 h, 与兔抗人 VAMP-8 多抗 4 °C 孵育过夜。次日复温 1 h, 与羊抗兔 IgG-Alexa Fluor[®]594 荧光染料室温避光孵育 2 h, 于激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.5 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测血小板 Munc18b 和相关 SNARE 蛋白的表达:收集样本, 离心弃上清液得血小板, 加 300 μ L 含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 1 h; 离心去上清液得血小板总蛋白, 以 Barford 法测量蛋白浓度; 加入上样缓冲液, 100 °C 煮沸 5 ~ 7 min; 经电泳、转膜、室温封闭 2 h, 加入羊抗人 Munc18b 多抗、兔抗人 VAMP-8 单抗、兔抗人 SNAP-23 多抗和兔抗人 STX-11 多抗, 4 °C 过夜; 加入 IgG-辣根过氧化物酶 (HRP) 二抗, 室温孵育 2 h; 免疫印迹化学发光法 (ECL) 曝光, 测定灰度值, 以目的蛋白与内参照 GAPDH 的灰度比值表示。

1.3.6 免疫共沉淀法检测血小板 Munc18b 和相关 SNARE 蛋白之间的相互作用:收集样本, 同法获得细胞裂解物; 加入鼠抗人 Munc18b 单抗于 4 °C 摇床上孵育过夜; 加入琼脂糖珠 A, 于 4 °C 摇床上孵育 4 h, 沉淀用 500 μ L 细胞裂解液洗涤 2 次, 取沉淀加入相应的抗体进行 Western Blot 分析。

1.4 统计学分析:采用 SPSS 16.0 软件处理数据, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CORM-2 对血小板 α 颗粒释放功能的影响 (表 1; 图 1):与对照组比较, LPS 组血小板 α 颗粒释放 PF4、PDGF-BB、MMP-2、P-选择素的量明显升高 (均 $P < 0.01$)。低、高浓度 CORM-2 干预后血小板 α 颗粒释放功能较 LPS 组明显下降 (均 $P < 0.01$), 并呈剂量依赖趋势; 而 iCORM-2 无此作用。

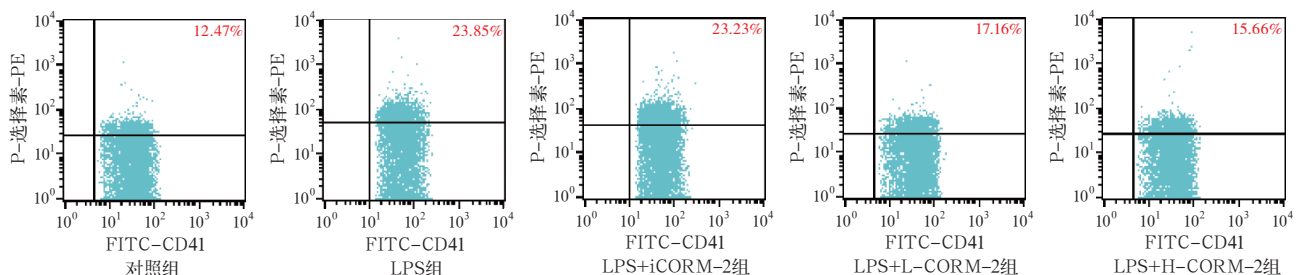
2.2 CORM-2 对血小板 α 颗粒分布的影响

2.2.1 透射电镜下观察 (图 2A):对照组血小板表面光滑, 无伪足形成, 直径约 2 μ m, 血小板胞质中 α 颗粒分布均匀; LPS 刺激后血小板表面有不规则伪足形成, α 颗粒向血小板膜移动, 并可见 α 颗粒与血小板膜融合释放; LPS+iCORM-2 组血小板 α 颗粒形态分布与 LPS 组相似; 不同浓度 CORM-2 组血小板外形亦有少量伪足形成, α 颗粒向血小板膜移动倾向不明显, 呈较均匀的分布。

表 1 CORM-2 对血小板 α 颗粒释放 PF4、PDGF-BB、MMP-2 和 P-选择素的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	PF4 (μ g/L)	PDGF-BB (μ g/L)	MMP-2 (ng/L)	P-选择素 (%)
对照组	12	4.75 $\pm$ 0.30	90.23 $\pm$ 3.61	34.16 $\pm$ 1.60	12.35 $\pm$ 0.40
LPS 组	12	10.13 $\pm$ 0.82 ^a	128.78 $\pm$ 1.39 ^a	53.26 $\pm$ 1.21 ^a	23.78 $\pm$ 0.62 ^a
LPS+iCORM-2 组	12	10.14 $\pm$ 0.24 ^a	126.59 $\pm$ 4.87 ^a	49.71 $\pm$ 2.73 ^a	23.48 $\pm$ 0.87 ^a
LPS+L-CORM-2 组	12	7.69 $\pm$ 0.58 ^b	112.71 $\pm$ 1.79 ^b	32.94 $\pm$ 2.73 ^b	17.14 $\pm$ 0.57 ^b
LPS+H-CORM-2 组	12	6.03 $\pm$ 0.71 ^b	102.91 $\pm$ 5.86 ^b	27.58 $\pm$ 3.36 ^b	15.35 $\pm$ 0.68 ^b
F 值		52.516	51.769	63.036	183.654
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: CORM-2 为一氧化碳释放分子 II, PF4 为血小板因子 4, PDGF-BB 为血小板源性生长因子 BB, MMP-2 为基质金属蛋白酶 2, LPS 为脂多糖, iCORM-2 为无活性 CORM-2, L-CORM-2、H-CORM-2 分别为低、高浓度 CORM-2; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.01$



注: LPS 为脂多糖, iCORM-2 为无活性一氧化碳释放分子 II (CORM-2), L-CORM-2、H-CORM-2 分别为低、高浓度 CORM-2, FITC 为异硫氰酸荧光素, PE 为藻红蛋白

图 1 流式细胞仪检测各组血小板 P-选择素阳性表达

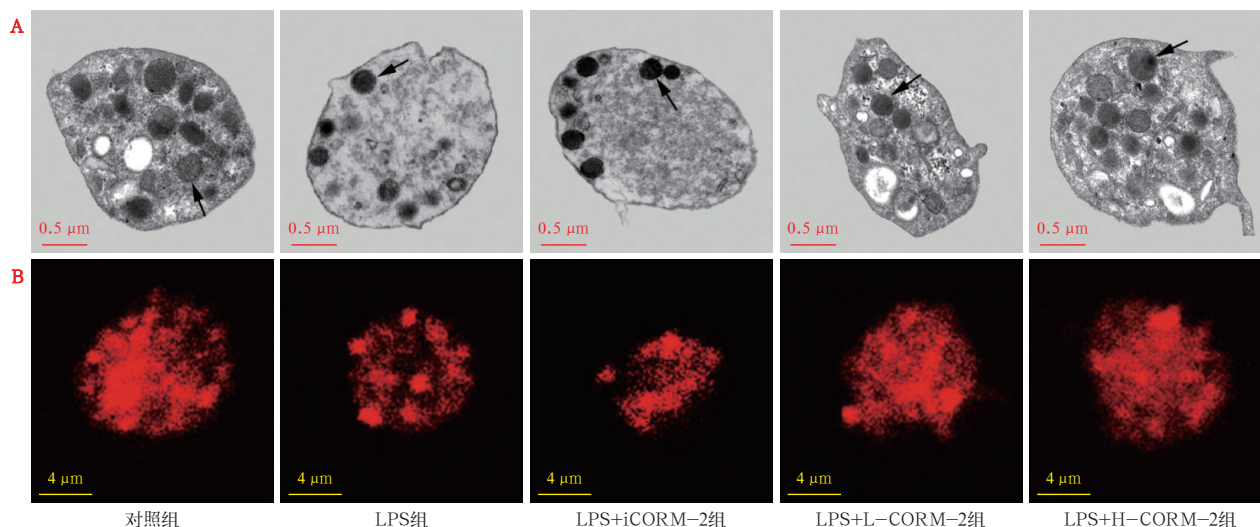


图2 各组血小板 α 颗粒释放形态分布 A为透射电镜图像($\times 8000$),箭头所示血小板 α 颗粒;B为激光共聚焦显微镜图像($\times 1600$),血小板 α 颗粒被囊泡相关膜蛋白-8(VAMP-8)抗体标记及 Alexa Fluor[®]594 染色。对照组血小板 α 颗粒在血小板中均匀分布;脂多糖(LPS)组和 LPS+ 无活性一氧化氮释放分子 II (iCORM)组血小板 α 颗粒分布趋向血小板膜周围,并有部分与包膜融合释放;低、高浓度一氧化氮释放分子 II (LPS+L-CORM-2、LPS+H-CORM-2)组血小板 α 颗粒在血小板中分布较均匀,少有与包膜融合

表2 不同浓度 CORM-2 对血小板 Munc18b、相关 SNARE 蛋白表达及 SNARE/Munc18b 复合体形成的影响($\bar{x} \pm s$)

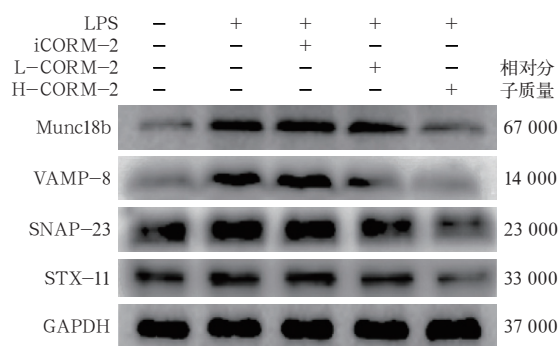
组别	样本数	Munc18b 蛋白 (%)	VAMP-8 蛋白 (%)	SNAP-23 蛋白 (%)	STX-11 蛋白 (%)	VAMP-8/ Munc18b (%)	SNAP-23/ Munc18b (%)	STX-11/ Munc18b (%)
对照组	8	0.62 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.09	0.95 $\pm$ 0.19	0.67 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.08	0.70 $\pm$ 0.07
LPS 组	8	0.99 $\pm$ 0.09 ^a	1.18 $\pm$ 0.14 ^a	1.90 $\pm$ 0.08 ^a	1.16 $\pm$ 0.23 ^a	1.21 $\pm$ 0.20 ^a	1.26 $\pm$ 0.08 ^a	1.39 $\pm$ 0.16 ^a
LPS+iCORM-2 组	8	1.06 $\pm$ 0.06 ^a	1.52 $\pm$ 0.15 ^a	1.76 $\pm$ 0.15 ^a	1.19 $\pm$ 0.27 ^a	1.32 $\pm$ 0.15 ^a	1.29 $\pm$ 0.18 ^a	1.36 $\pm$ 0.07 ^a
LPS+L-CORM-2 组	8	0.80 $\pm$ 0.08 ^b	0.72 $\pm$ 0.09 ^b	1.18 $\pm$ 0.22 ^b	0.76 $\pm$ 0.02 ^b	0.65 $\pm$ 0.09 ^b	0.85 $\pm$ 0.07 ^b	0.78 $\pm$ 0.05 ^b
LPS+H-CORM-2 组	8	0.69 $\pm$ 0.01 ^b	0.50 $\pm$ 0.12 ^b	0.63 $\pm$ 0.10 ^b	0.57 $\pm$ 0.08 ^b	0.53 $\pm$ 0.07 ^b	0.55 $\pm$ 0.09 ^b	0.61 $\pm$ 0.10 ^b
F 值		19.121	42.882	36.007	9.215	25.166	36.455	45.913
P 值		0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000

注:CORM-2 为一氧化氮释放分子 II, Munc18b 为突触融合蛋白结合蛋白 b, SNARE 为可溶性 N- 乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体, VAMP-8 为囊泡相关膜蛋白-8, SNAP-23 为突触相关蛋白-23, STX-11 为突触融合蛋白-11, LPS 为脂多糖, iCORM-2 为无活性 CORM-2, L-CORM-2、H-CORM-2 分别为低、高浓度 CORM-2; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.01$

2.2.2 激光共聚焦显微镜下观察(图 2B): 对照组血小板外形呈圆盘状,直径约 2 μ m,血小板 α 颗粒均匀弥散分布;LPS 刺激后血小板 α 颗粒明显向血小板膜周边聚集释放;LPS+iCORM-2 组血小板 α 颗粒形态分布与 LPS 组相似;不同浓度 CORM-2 组血小板 α 颗粒向血小板膜聚集倾向不明显,呈较均匀的分布。

2.3 CORM-2 对血小板 Munc18b 和相关 SNARE 蛋白表达的影响(表 2; 图 3): 与对照组比较, LPS 刺激后血小板 Munc18b 及相关 SNARE 蛋白 VAMP-8、SNAP-23 和 STX-11 表达均显著增加(均 $P < 0.01$)。与 LPS 组比较,不同浓度 CORM-2 能有效抑制血小板 Munc18b 及相关 SNARE 蛋白表达(均 $P < 0.01$),并呈剂量依赖趋势。

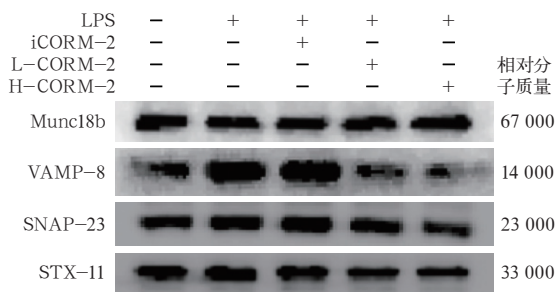
2.4 CORM-2 对血小板 SNARE/Munc18b 复合体形成的影响(表 2; 图 4): 与对照组比较, LPS 刺激后血小板 Munc18b 与相关 SNARE 蛋白 VAMP-8、SNAP-23、STX-11 复合体形成显著增加(均 $P < 0.01$);



LPS 为脂多糖, iCORM-2 为无活性一氧化氮释放分子 II, L-CORM-2、H-CORM-2 为低、高浓度一氧化氮释放分子 II, Munc18b 为突触融合蛋白结合蛋白 b, SNARE 为可溶性 N- 乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体, VAMP-8 为囊泡相关膜蛋白-8, SNAP-23 为突触相关蛋白-23, STX-11 为突触融合蛋白-11, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶

图3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组血小板 Munc18b 和 SNARE 相关蛋白表达

而给予 CORM-2 干预后能有效抑制其间的相互作用, SNARE/Munc18b 复合体形成减少(均 $P < 0.01$),并呈剂量依赖趋势。



LPS 为脂多糖, iCORM-2 为无活性一氧化氮释放分子 II, L-CORM-2、H-CORM-2 为低、高浓度一氧化氮释放分子 II, SNARE 为可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体, Munc18b 为突触融合蛋白结合蛋白 b, VAMP-8 为囊泡相关膜蛋白-8, SNAP-23 为突触相关蛋白-23, STX-11 为突触融合蛋白-11, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组血小板 SNARE/Munc18b 复合体蛋白表达

3 讨论

脓毒症时大量细菌成分及炎性介质释放入血致血小板异常活化,活化后的血小板黏附、聚集可形成病理性血栓^[15-17]。同时伴有血小板 α 颗粒功能性蛋白分子的释放,如 PF4、PDGF、P-选择素等,进一步活化并促进血小板与内皮细胞及中性粒细胞的相互作用,参与脓毒症时炎症反应^[18-21]。前期研究已证实, CORM-2 释放一氧化氮 (CO) 能抑制 LPS 刺激后血小板膜糖蛋白的表达及其功能,包括抑制血小板的黏附、聚集和释放反应^[22-23]。本研究采用 LPS 体外刺激血小板模型来模拟脓毒症时血小板的异常活化,用 CORM-2 对其进行干预,结果显示, LPS 刺激后血小板 α 颗粒内容物 PF4、PDGF-BB、MMP-2 和 P-选择素的释放显著增加,而 CORM-2 干预后能有效抑制 α 颗粒内容物的释放;透射电镜和激光共聚焦显微镜下观察显示, LPS 刺激后血小板 α 颗粒由胞质中均匀分布向血小板膜周围聚集,并与膜融合,释放至胞质外,而 CORM-2 干预后可使血小板 α 颗粒向血小板膜周围聚集的倾向明显减少。初步证实, LPS 刺激后血小板 α 颗粒释放增加, CORM-2 能够有效抑制血小板 α 颗粒的释放,但其作用机制仍需进一步阐明。

研究发现, SNARE 及其调节因子 Sec/Munc18 (SM) 蛋白是参与调控血小板 α 颗粒释放反应的重要环节^[24-25]。SNARE 家族蛋白可分为囊泡-耦联膜蛋白亚型 (VAMPs)、突触小体-耦联蛋白亚型 (SNAPs) 和突触融合蛋白 (STXs) 三类。VAMPs 仅分布于颗粒膜,又称为囊泡 (v)-SNAREs; 而 SNAPs 和 STXs 主要分布于血小板膜表面,又称为靶向 (t)-SNAREs^[26-27]。血小板活化后,通过一系列信号传递,在 SM 蛋白的参与下,血小板膜上相关 t-SNAREs 聚集形成接纳复合体,随后与 α 颗粒膜上 v-SNAREs

相连,形成紧密的 SNAREs 四聚体,促进膜融合孔道的形成,导致血小板 α 颗粒内容物释放^[28]。血小板内存在 VAMP-2、-3、-4、-5、-7、-8,有研究发现 VAMP-8^{-/-} 小鼠血小板 α 颗粒释放缺失,血栓形成障碍,提示 VAMP-8 是参与血小板 α 颗粒释放过程的主要 v-SNAREs 蛋白^[29]。SNAP-23 是血小板中主要的 SNAP 蛋白, SNAP-23 基因敲除小鼠死于胚胎期,并有研究发现 SNAP-23 参与形成 SNARE 复合体^[30]。近期 Ye 等^[31] 研究发现,家族性噬血细胞性淋巴瘤组织细胞增生症 4 型 (FHL4) 患者 (主要缺乏 STX-11 基因) 的血小板 α 颗粒释放受到严重损害,提示 STX-11 在血小板 α 颗粒释放中扮演重要角色。研究证实, SM 蛋白是 SNARE 复合体形成的启动分子,触发 SNARE 蛋白的聚集形成膜融合复合体,参与血小板 α 颗粒分泌的动态调节^[32-33]。现已证实, SM 蛋白的种类超过 10 种,与血小板 α 颗粒释放密切相关的 SM 蛋白只有 Munc18a、b、c 3 种^[34]。Munc18b 是血小板中表达最多的 SM 蛋白, FHL5 患者由于基因突变而缺乏 Munc18b 蛋白,导致患者血小板 α 颗粒和致密颗粒的释放功能存在明显缺陷;进一步研究发现,血小板 Munc18b 主要与 STX-11 结合,参与 SNARE 复合体的形成^[35-36]。因此我们推测, Munc18b 参与动态调节 VAMP-8、SNAP-23 和 STX-11 聚集形成 SNARE 复合体,在血小板 α 颗粒释放过程中发挥至关重要的作用。本研究检测了 Munc18b 和相关 SNARE 蛋白的表达及与 SNARE 蛋白之间的相互作用, Western Blot 检测结果显示, LPS 刺激后血小板 Munc18b 与 SNARE 蛋白表达均显著增加,而 CORM-2 能有效抑制其蛋白表达;免疫沉淀反应结果显示, LPS 刺激后血小板 Munc18b 与 SNARE 蛋白相互作用增强,提示 SNARE/Munc18b 复合体形成增加,而 CORM-2 则能有效抑制血小板 Munc18b 与 SNARE 蛋白之间的相互作用,使 SNARE/Munc18b 复合体形成减少。

综上,我们推测,静息状态下血小板中 Munc18b 与 STX-11 单独结合,阻止 SNARE 复合体形成;脓毒症时 LPS 激活血小板,通过信号由外向内传递, Munc18b 活化后与 STX-11 的亲和力下降,拉拢聚集 SNAP-23 和 STX-11 形成开放式的结构,通过 Munc18b 的活性中心与 VAMP-8 结合,促进形成 SNARE 四聚体,导致血小板膜融合孔形成, α 颗粒释放。通过 CORM-2 释放 CO 干预可有效抑制血小板 SNARE/Munc18b 复合体形成,减少脓毒症时血小板 α 颗粒释放,从而减轻脓毒症损伤。但 CORM-2 调控 SNARE/Munc18b 复合体的形成、最终导致血小板 α 颗粒释放的具体机制尚待进一步研究阐明。

参考文献

- [1] Chang HJ, Lynn C, Glass RM. JAMA patient page. Sepsis [J]. JAMA, 2010, 304 (16): 1856. DOI: 10.1001/jama.304.16.1856.
- [2] 鹿兴, 李彤, 李军, 等. 早期目标导向治疗对严重脓毒症或脓毒性休克患者病死率影响的 Meta 分析 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (9): 735-738. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.09.007.
- [3] Lu X, Li T, Li J, et al. Effect of early goal-directed therapy on mortality in patients with severe sepsis or septic shock: a Meta analysis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (9): 735-738. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.09.007.
- [4] Tymk K. Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis [J]. Microcirculation, 2011, 18 (2): 152-162. DOI: 10.1111/j.1549-8719.2010.00080.x.
- [5] 马晓春. 脓毒症指南带给我们的几点思考 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 427-428. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.002.
- [6] Ma XC. The "guidance of sepsis" leads us to ponder over some problems [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (6): 427-428. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.002.
- [7] SepNet Critical Care Trials Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study [J]. Intensive Care Med, 2016, 42 (12): 1980-1989. DOI: 10.1007/s00134-016-4504-3.
- [8] 张平平, 王庆树, 李志军, 等. 血必净注射液对脓毒症患者凝血功能的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 198-200. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.010.
- [9] Zhang PP, Wang QS, Li ZJ, et al. Effects of Xuebijing injection on blood coagulation in patients with sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2014, 21 (3): 198-200. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.010.
- [10] 韩宇, 高传玉, 秦秉玉, 等. 抗凝治疗对脓毒症凝血和炎症指标的影响及其意义 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 22 (2): 102-105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.005.
- [11] Han Y, Gao CY, Qin BY, et al. The effect of anticoagulant therapy on coagulation and inflammation markers in sepsis patients and its significance [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 22 (2): 102-105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.005.
- [12] de Stoppelaar SF, van 't Veer C, van der Poll T. The role of platelets in sepsis [J]. Thromb Haemost, 2014, 112 (4): 666-677. DOI: 10.1160/TH14-02-0126.
- [13] Golebiewska EM, Poole AW. Secrets of platelet exocytosis—what do we really know about platelet secretion mechanisms? [J]. Br J Haematol, 2014, 165: 204-216. DOI: 10.1111/bjh.12682.
- [14] 庄明峰, 刘大东, 孙炳伟. 脓毒症时糖原合成酶激酶 3 相关作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (7): 519-521. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.07.016.
- [15] Zhuang MF, Liu DD, Sun BW. Advance in the research regarding the effect of glycogen synthase kinase 3 in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (7): 519-521. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.07.016.
- [16] 孙艳, 孙炳伟. 膜糖蛋白活化、造血系细胞特异蛋白-1 磷酸化与脓毒症时血小板功能异常的关系研究进展 [J]. 江苏大学学报 (医学版), 2011, 21 (6): 544-548. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7783.2011.06.024.
- [17] Sun Y, Sun BW. Activation of platelet membrane glycoprotein and phosphorylation of hematopoietic cell-specific protein-1 in septic coagulation [J]. J Jiangsu Univ (Med Ed), 2011, 21 (6): 544-548. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7783.2011.06.024.
- [18] Koseoglu S, Flaumenhaft R. Advances in platelet granule biology [J]. Curr Opin Hematol, 2013, 20 (5): 464-471. DOI: 10.1097/MOH.0b013e3283632e6b.
- [19] 孙炳伟, 王波, 杨国涛, 等. 外源性一氧化氮释放分子 2 对急性肺损伤时肺部炎症反应的抑制作用 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2010, 39 (5): 458-463. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2010.05.003.
- [20] Sun BW, Wang B, Yang GT, et al. Inhibitory effect of extrinsic CO-releasing molecules-2 (CORM-2) on inflammatory responses in mice with LPS-induced acute lung injury [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2010, 39 (5): 458-463. DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2010.05.003.
- [21] Liu D, Liang F, Wang X, et al. Suppressive effect of CORM-2 on LPS-induced platelet activation by glycoprotein mediated Hs1 phosphorylation interference [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e83112. DOI: 10.1371/journal.pone.0083112.
- [22] Woth G, Varga A, Ghosh S, et al. Platelet aggregation in severe sepsis [J]. J Thromb Thrombolysis, 2011, 31 (1): 6-12. DOI: 10.1007/s11239-010-0486-0.
- [23] Rondina MT, Carlisle M, Fraughton T, et al. Platelet-monocyte aggregate formation and mortality risk in older patients with severe sepsis and septic shock [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2015, 70 (2): 225-231. DOI: 10.1093/gerona/glu082.
- [24] 刘大东, 庄明峰, 张景丽, 等. 外源性一氧化氮释放分子 2 体外干预内毒素/脂多糖致健康人血小板过度活化的研究 [J]. 中华烧伤杂志, 2015, 31 (5): 354-360. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.05.010.
- [25] Liu DD, Zhuang MF, Zhang JL, et al. Study of exogenous carbon monoxide-releasing molecules 2 on endotoxin/lipopolysaccharide-induced abnormal activation of platelets of healthy human donors [J]. Chin J Burns, 2015, 31 (5): 354-360. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.05.010.
- [26] Xu X, Sun B. Platelet granule secretion mechanisms: Are they modified in sepsis? [J]. Thromb Res, 2015, 136 (5): 845-850. DOI: 10.1016/j.thromres.2015.09.008.
- [27] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.003.
- [28] Zeng WM, Mao P, Huang YB, et al. Analyses of factors affecting prognosis of patients with sepsis and evaluation of their predicting values [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (2): 118-123. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.003.
- [29] 贺能英, 严启滔, 郭振辉. 脓毒症的免疫反应与炎症 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 435-438. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.004.
- [30] He NY, Yan QT. The immune response and inflammation in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (6): 435-438. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.004.
- [31] Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, et al. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 (9): 1945-1955. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02690.x.
- [32] Liu D, Wang X, Qin W, et al. Suppressive effect of exogenous carbon monoxide on endotoxin-stimulated platelet over-activation via the glycoprotein-mediated PI3K-Akt-GSK3 β pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23653. DOI: 10.1038/srep23653.
- [33] 刘大东, 徐晓涵, 庄明峰, 等. 外源性一氧化氮对脓毒症时血小板异常释放的抑制作用及其分子机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (2): 110-116. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.006.
- [34] Liu DD, Xu XH, Zhuang MF, et al. Suppressive effect of exogenous carbon monoxide on abnormal platelet exocytosis and its molecular mechanism in sepsis [J]. 2016, 28 (2): 110-116. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.006.
- [35] Al Hawas R, Ren Q, Ye S, et al. Munc18b/STXBP2 is required for platelet secretion [J]. Blood, 2012, 120 (12): 2493-2500. DOI: 10.1182/blood-2012-05-430629.
- [36] Marks MS. SNAREing platelet granule secretion [J]. Blood, 2012, 120 (12): 2355-2357. DOI: 10.1182/blood-2012-07-442756.
- [37] Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins [J]. Science, 2009, 323 (5913): 474-477. DOI: 10.1126/science.1161748.
- [38] 刘晨曦, 任玲, 陈红印, 等. Complexin 蛋白的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2004, 35 (4): 361-363.
- [39] Liu CX, Ren L, Chen HY, et al. Research progress in complexin [J]. Prog Physiol Sci, 2004, 35 (4): 361-363.
- [40] Zhao M, Wu S, Zhou Q, et al. Mechanistic insights into the recycling machine of the SNARE complex [J]. Nature, 2015, 518 (7537): 61-67. DOI: 10.1038/nature14148.
- [41] Ren Q, Barber HK, Crawford GL, et al. Endobrevin/VAMP-8 is the primary v-SNARE for the platelet release reaction [J]. Mol Biol Cell, 2007, 18 (1): 24-33. DOI: 10.1091/mbc.E06-09-0785.
- [42] Karim ZA, Zhang J, Banerjee M, et al. I κ B kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion [J]. Blood, 2013, 121 (22): 4567-4574. DOI: 10.1182/blood-2012-11-470468.
- [43] Ye S, Karim ZA, Al Hawas R, et al. Syntaxin-11, but not syntaxin-2 or syntaxin-4, is required for platelet secretion [J]. Blood, 2012, 120 (12): 2484-2492. DOI: 10.1182/blood-2012-05-430603.
- [44] Woronowicz K, Dilks JR, Rozenvayn N, et al. The platelet actin cytoskeleton associates with SNAREs and participates in alpha-granule secretion [J]. Biochemistry, 2010, 49 (21): 4533-4542. DOI: 10.1021/bi100541t.
- [45] Jahn R, Scheller RH. SNAREs—engines for membrane fusion [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7 (9): 631-643. DOI: 10.1038/nrm2002.
- [46] 董永明. Sec1/Munc18 蛋白的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2008, 8 (1): 174-176, 183. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6273.2008.01.060.
- [47] Dong YM. Research progress on Sec1/Munc18 proteins [J]. Prog Mod Biomed, 2008, 8 (1): 174-176, 183. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6273.2008.01.060.
- [48] Pagel J, Beutel K, Lehmann K, et al. Distinct mutations in STXBP2 are associated with variable clinical presentations in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL5) [J]. Blood, 2012, 119 (25): 6016-6024. DOI: 10.1182/blood-2011-12-398958.
- [49] Dieckmann NM, Hackmann Y, Aricò M, et al. Munc18-2 is required for syntaxin 11 localization on the plasma membrane in cytotoxic T-lymphocytes [J]. Traffic, 2015, 16 (12): 1330-1341. DOI: 10.1111/tra.12337.

(收稿日期: 2016-10-07)