



胰岛素对全血血小板膜P-选择素表达影响的研究

近年来有研究报道,胰岛素除具有调节糖代谢等生理功能外,尚可抑制血小板活性[1],确切机制尚不十分清楚。我们采用鼠抗人P-选择素单克隆抗体及流式细胞术建立了全血血小板糖蛋白P-选择素的测定方法,观察胰岛素在不同因素作用下对血小板P-选择素表达的影响,探讨胰岛素对血小板的作用机制,为寻找防治心血管疾病、糖尿病并发症的方法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

20例健康青年人男女各10人,18~32(26.2±1.8)岁,2周内未服用任何药物。

1.2 主要试剂

胰岛素(生物合成人胰岛素,丹麦诺和诺德公司);鼠抗人P-选择素单克隆抗体SZ-51(苏州医学院血栓与止血研究室);纯化小鼠IgG(军事医学科学院),异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠IgG(军事医学科学院);HEPES缓冲液(Sigma);胶原(苏州医学院血栓与止血室);2%福尔马林盐溶液(37%福尔马林2 ml与1 000 ml生理盐水混匀)。

1.3 实验方法

参照Janes[2]、武艺[3]等方法并略加改良,采用鼠抗人P-选择素单克隆抗体SZ-51,建立全血血小板膜P-选择素表达的流式细胞术(FCM)测定方法。

1.3.1 样本制备 采用真空血器(WZK-9NC型,含3.8%枸橼酸钠)由专人经肘正中静脉取清晨空腹血液(不扎止血带,1次采血成功),弃去首2 ml,采集1 ml静脉血(血液:抗凝剂=9:1)。静置2~3 min,取5 μ l全血分别加至6支含50 μ l HEPES缓冲液的1.5 ml离心管中。

1.3.2 静息相、活化相全血血小板膜P-选择素表达的测定(1-3号管):1号管不含激动剂,2号管含0.5 U/ml凝血酶10 μ l,3号管含100 μ g/ml胶原10 μ l,室温下孵育20 min后,于各管中分别加入饱和浓度的SZ-51(1:100)10 μ l和FITC-IgG(1:5)10 μ l,各孵育20 min,之后用2%福尔马林盐溶液1 ml固定20 min,取1 ml样品加入FCM专用测试管内测定。在2 h内上机检测。作自身对照。

1.3.3 胰岛素(4-6号管)作用下全血血小板膜P-选择素表达的测定 方法基本同前,只是在加入激动剂之前20 min先各自加入胰岛素(2 000 pmol/L),其余步骤同前。

1.3.4 对照选择 空白对照组用缓冲液代替P-选择素,阴性对照组用纯化小鼠IgG代替P-选择素。

1.3.5 胰岛素对血小板膜P-选择素表达的量效关系

方法同前,采集1 ml静脉血共5管,静止2~3 min,每管取5 μ l全血分别加至4支盛有50 μ l HEPES缓冲液的1.5 ml的离心管中,各管中分别含0、200、2 000、4 000 pmol/L胰岛素10 μ l,室温下孵育20 min后,于各管中皆加入凝血酶(0.5 U/ml)10 μ l,其余步骤同前。

1.3.6 胰岛素对血小板膜P-选择素表达的时效关系

方法同前,采集1 ml静脉血共5管,静止2~3 min,每管取5 μ l全血分别加至4支盛有50 μ l HEPES缓冲液的1.5 ml的离心管中(含凝血酶0.5 U/ml 10 μ l),1号管不含胰岛素,其余管含2 000 pmol/ml胰岛素10 μ l,各管孵育时间分别为0、10、20、30 min,立即用2%福尔马林盐液1 ml固定,20 min后于各管中加入饱和浓度的SZ-51(1:100)10 μ l和FITC-IgG(1:5)10 μ l,各孵育20 min后,取1 ml样品入FCM专用测试管内上机检测。

1.4 观察和测量

应用流式细胞仪(美国EPICS ELITE型)对全血血小板膜P-选择素进行荧光定量,标准荧光微球调整变异系数在2%以内。设置空白对照组用缓冲液取代P-选择素,阴性对照组用IgG代替P-选择素,以消除本底荧光的影响。每例样本测定10 000个血小板。测量每例样本血小板平均荧光强度(MFI),单位为阳性荧光道数,以此作为血小板膜P-选择素的表达量,凡大于正常人血小板膜表面荧光强度的99%的血小板,定为阳性血小板,即为活化小板,阳性血小板百分率(PC%)= 阳性血小板数/10 000。

1.5 统计学处理

实验数据采用SPSS统计软件中配对t检验、多个样本均数比较方差分析、两两比较SNK方法进行统计。

2 结果

2.1 胰岛素对正常青年人全血血小板膜P-选择素表达(FC%)的影响

表1结果显示:静息血小板膜P-选择素表达含量(FC%)很低,凝血酶、胶原活化诱导后血小板膜P-选择素表达显著增加($P<0.05$)。胰岛素(2 000 pmol/L)对静息血小板膜表达无明显影响($P>0.05$)。但显著抑制凝血酶、胶原活化诱导的血小板膜P-选择素表达($P<0.05$)。

表 1 胰岛素对血小板膜 P- 选择素表达 (FC%) 的影响
($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab.1 Effects of insulin on the expression of P-selectin on platelet membrane(FC%) ($n=10, Mean\pm SD$)

Group	Quiescent	Thrombin-activated	Collagen-activated
Control	13.55 \pm 0.94	71.67 \pm 2.07	68.18 \pm 2.57
Insulin	13.49 \pm 0.86 [#]	39.70 \pm 2.10 [*]	39.25 \pm 1.57 [*]

[#] $P>0.05$, ^{*} $P<0.05$ vs control group

2.2 胰岛素对凝血酶诱导的血小板膜P-选择素表达的量-效、时-效关系

表2结果显示,胰岛素在200~400 pmol/L范围内对凝血酶诱导的P-选择素表达具有抑制作用,且效应该呈剂量依赖性,线性关系良好($r=0.9461$),方差分析表明,各组之间有显著的统计学差异($P<0.05$)SNK法显示各组间两两比较有显著的统计学差异($P<0.05$)。表3结果表明,2 000 pmol/L的胰岛素与全血血小板孵育10~30 min范围内对凝血酶诱导的P-选择素表达具有抑制作用,且效应呈时间依赖性,线性关系良好($r=0.9188$),方差分析表明,各组之间有显著的统计学差异($P<0.05$),SNK法显示各组间两两比较有显著的统计学差异($P<0.05$)。

表 2 胰岛素对凝血酶诱导的 P-选择素表达的剂量关系 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Dose-dependent effect of insulin on thrombin-induced P-selectin expression ($n=5, Mean \pm SD$)

Group	P-selectin
1 (0 pmol/L)	61.36±1.13
2 (200 pmol/L)	55.78±1.39 [#]
3 (2 000 pmol/L)	37.90±1.23 ^{#△}
4 (4 000 pmol/L)	27.06±1.17 ^{#△☆}

[#] $P < 0.05$ vs group 1, [△] $P < 0.05$ vs group 2, [☆] $P < 0.05$ vs group 3

表 3 胰岛素对凝血酶诱导的 P-选择素表达的时效关系 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Time-dependent effect of insulin on thrombin-induced P-selectin expression ($n=5, Mean \pm SD$)

Groups	P-selectin
1 (0 pmol/L)	61.36±1.13
2 (200 pmol/L)	43.66±1.11 [#]
3 (2 000 pmol/L)	32.80±1.56 ^{#△}
4 (4 000 pmol/L)	29.30±1.52 ^{#△☆}

[#] $P < 0.05$ vs group 1, [△] $P < 0.05$ vs group 2, [☆] $P < 0.05$ vs group 3

3 讨论

研究表明, 适量剂量的胰岛素可抑制血小板的活性[1], 其机制尚不十分清楚, 众所周知, 血小板膜糖蛋白在血小板功能方面起着十分重要的作用, 目前有关胰岛对血小板膜糖蛋白表达的影响报道甚少, 作者曾通过实验首次证明胰岛素可通过抑制血小板膜糖蛋白GP II b / IIIa的表达而产生抗血小板聚集效应[4]。并证实胰岛素可通过NOS→NO→GC→cGMP通路抑制血小板膜GP II b / IIIa的表达。P-选择素是存在于静息血小板的 α 颗粒内, 相对分子质量140 KD, 又称颗粒膜糖蛋白(GMP-140)、CD62等。静息血小板表面P-选择素含量极低, 血小板经凝血酶和组胺等刺激后, P-选择素随 α 颗粒膜与胞浆膜融合, 导致P-选择素迅速表达在血小板膜表面上, 可作为血小板活化的标志, 反映 α 颗粒的分泌, 参与某些心血管疾病的病理生理过程[5]。本实验再次采用流式细胞仪方法对胰岛素对血小板膜糖蛋白P-选择素表达的影响进行研究。结果表明: 胰岛素可显著抑制活化血小板膜P-选择素的表达产生抑制血小板活性效应, 该效应呈时间和剂量依赖性。值得注意的是, 本实验只是对健康青年人胰岛素调节血小板功能机制进行研究, 至于在胰岛素抵抗状态下, 胰岛素对血小板功能的影响比较复杂, 对胰岛素调控的途径和靶点的研究将有可能为心血管疾病、糖尿病的防治提供新的策略。

参考文献:

- [1] Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G. The vascular effects of L-Arginine in humans, the role of endogenous insulin [J]. J Clin Invest, 1997, 99(3): 433-8.

[2] Janes SL, Wilson DJ, Chronos N, et al. Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet-bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets[J]. Thromb Haemost, 1993, 70(4): 659-66.

[3] 武艺, 左连富, 曹雪笠, 等. 冠心病患者血小板膜结合纤维蛋白原的荧光定量研究[J]. 中华心血管病杂志, 1996, 24(3): 200-2.

Wu Y, Zuo LF, Cao XL, et al. An immunofluorescent quantitative measurement of platelet-bound fibrinogen in patients with coronary artery disease[J]. J Chin Cardiol, 1996, 24(3): 200-2.

[4] 彭必友, 董为人, 汪吉仪, 等. 胰岛素对正常人血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 表达的影响及机制[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 943-5.

Peng BY, Dong WR, Wang JY, et al. Effect of insulin on the expression of platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa and its mechanisms[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9):943-5.

[5] Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry[J]. Blood, 1987, 70(1): 307-15.

参考文献:

[1] Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G. The vascular effects of L-Arginine in humans, the role of endogenous insulin [J]. J Clin Invest, 1997, 99(3): 433-8.

[2] Janes SL, Wilson DJ, Chronos N, et al. Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet-bound fibrinogen on normal subjects and patients with activated platelets[J]. Thromb Haemost, 1993, 70(4): 659-66.

[3] 武艺, 左连富, 曹雪笠, 等. 冠心病患者血小板膜结合纤维蛋白原的荧光定量研究[J]. 中华心血管病杂志, 1996, 24(3): 200-2.

Wu Y, Zuo LF, Cao XL, et al. An immunofluorescent quantitative measurement of platelet-bound fibrinogen in patients with coronary artery disease[J]. J Chin Cardiol, 1996, 24(3): 200-2.

[4] 彭必友, 董为人, 汪吉仪, 等. 胰岛素对正常人血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 表达的影响及机制[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 943-5.

Peng BY, Dong WR, Wang JY, et al. Effect of insulin on the expression of platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa and its mechanisms[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(9):943-5.

[5] Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry[J]. Blood, 1987, 70(1): 307-15.