

## 体外研究青霉素对小鼠外周血小板活性与功能的影响

刘 淼<sup>1</sup>, 庞花艳<sup>2\*</sup>, 龚 菲<sup>1</sup>, 姜 姗<sup>3</sup>, 张 黎<sup>3</sup>, 彭 黎<sup>1</sup>, 干银弟<sup>3</sup>

1. 湖北省第三人民医院 检验科, 湖北 武汉 430033

2. 武汉市武昌医院 妇产科, 湖北 武汉 430063

3. 湖北省第三人民医院 病理科, 湖北 武汉 430033

**摘要:** 目的 研究青霉素对血小板活性、寿命及黏附相关功能的影响。方法 分离C57BL/6J小鼠外周血小板, 使用10、50、100、500、1 000、5000 U/mL青霉素处理24 h, MTT法检测血小板活性, 计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>); ELISA法检测IC<sub>50</sub>的青霉素对血小板中蛋白激酶A(Protein kinase A, PKA)、β血小板球蛋白(β-thromboglobulin, β-TG)、超氧化物歧化酶2(Superoxide dismutase 2, SOD2)、血小板第4因子(Platelet factor 4, PF<sub>4</sub>)和血小板内皮细胞黏附分子-1(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)含量的影响。结果 随着青霉素浓度的增大, 血小板数目逐渐减少, 血小板存活率逐渐降低, IC<sub>50</sub>值为985.68 U/mL。与对照组比较, 青霉素组的PKA、β-TG、SOD2、PF<sub>4</sub>和PECAM-1的含量显著降低, 差异具有统计学意义(P<0.05)。结论 青霉素可能通过降低PKA、SOD2、β-TG、PF<sub>4</sub>和PECAM-1含量, 进而显著降低血小板存活率, 抑制血小板活性及其聚集功能。

**关键词:** 青霉素; 血小板; 蛋白激酶A; 血小板内皮细胞黏附分子-1

中图分类号: R965.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2020)09-1758-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.09.014

## Effect of penicillin on activity and function of peripheral platelet in mice

LIU Miao<sup>1</sup>, PANG Huayan<sup>2</sup>, GONG Fei<sup>1</sup>, JIANG Shan<sup>3</sup>, ZHANG Li<sup>3</sup>, PENG Li<sup>1</sup>, GAN Yindi<sup>3</sup>

1. Department of Laboratory, The Third People's Hospital of Hubei Province, Wuhan 430033, China

2. Department of Gynecology and Obstetrics, Wuhan Wuchang Hospital, Wuhan 430063, China

3. Department of Pathology, The Third People's Hospital of Hubei, Wuhan 430033, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of penicillin on activity, longevity and adhesion-related functions of platelet. **Methods** Peripheral platelets of C57BL/6J mice were isolated. Platelets were treated with 10, 50, 100, 500, 1 000, 5 000 U/mL penicillin for 24 h. MTT was used to detect platelet activity and IC<sub>50</sub> values were calculated. The study was divided into control group and penicillin group. The contents of protein kinase A (PKA), β-thromboglobulin (β-TG), superoxide dismutase 2 (SOD2), Platelet factor 4 (PF4) and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in platelets were detected by ELISA. **Results** With the increase of penicillin concentration, the number of platelets decreased gradually, and the platelet survival rate gradually decreased. The calculated IC<sub>50</sub> value is 985.68 U/mL. Compared with the control group, the contents of PKA, β-TG, SOD2, PF4 and PECAM-1 in the penicillin group were significantly lower, and the difference was statistically significant (P < 0.05). **Conclusion** Penicillin may significantly reduce platelet survival rate, platelet activity and aggregation function by reducing the contents of PKA, SOD2, β-TG, PF4 and PECAM-1 in platelets.

**Key words:** penicillin; platelets; protein kinase A; platelet endothelial cell adhesion molecule-1

外伤和异物植入易引起机体组织损伤和出血, 在凝血酶等刺激作用下, 血小板可快速到达出血部位, 通过改变形状和表达受体启动快速止血凝血反应<sup>[1]</sup>。血小板作为血液中一种特殊的成分, 不仅具

有止血功能, 在介导非特异性反应、炎症反应、组织修复以及宿主防御等方面也具有重要作用<sup>[2]</sup>。既往研究发现, 血小板在循环血液中的寿命只有8~9 d, 体外储存血小板的功能会在5 d之内基本丧失, 在

收稿日期: 2019-12-28

第一作者: 刘 淼(1986—), 男, 硕士研究生, 主管技师, 主要从事炎症发生机制研究。

\*通信作者: 庞花艳(1985—) E-mail: 542044854@qq.com

感染、糖尿病、肿瘤和原发性血小板减少性紫癜等疾病中会出现血小板寿命缩短而被提前清除,继而影响血小板正常生理功能<sup>[3-4]</sup>。因此,有关血小板寿命调控机制的相关研究尤为重要。

药源性血小板减少症是指药物导致机体血小板计数低于正常范围,引发机体出血不止等症状。研究发现,精神神经系统药物、抗菌药物、抗凝抗血小板药物以及抗肿瘤药物等均会引起药源性血小板减少症<sup>[5]</sup>。相关研究也证实了抗菌类药物,如青霉素类、头孢菌素类药物等会导致血小板减少,使血小板凝集功能减退<sup>[6]</sup>。药源性血小板减少引起的凝血障碍是临床抗生素用药的不良反应,本研究采用常用 $\beta$ -内酰胺类抗生素药物代表之一青霉素处理小鼠外周血小板,探讨青霉素对血小板活性、寿命、激活及黏附相关功能的影响,以期为抗生素的临床使用提供基础资料。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

20只雄性C57BL/6J小鼠,22~23g,8周龄,购自华中农业大学,实验动物生产许可证SCXK(鄂)2015-0019。

### 1.2 药物及主要试剂

青霉素(货号P0389),购自美国Sigma公司;MTT检测试剂盒(货号G020-1、规格500T),购自南京建成生物工程研究所;蛋白激酶A(Protein kinase A, PKA)ELISA检测试剂盒(货号MU30643、规格48T)、 $\beta$ 血小板球蛋白( $\beta$ -thromboglobulin,  $\beta$ -TG)ELISA检测试剂盒(货号MU30686、规格48T)、超氧化物歧化酶2(Superoxide dismutase 2, SOD2)ELISA检测试剂盒(货号MU30941、规格48T)、血小板第4因子(Platelet factor 4, PF4)ELISA检测试剂盒(货号MU30619、规格48T)、血小板内皮细胞黏附分子-1(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)ELISA检测试剂盒(货号MU30828、规格48T)、磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS)(货号PAB180003),购自武汉华联科生物技术有限公司;小鼠外周血血小板分离液试剂盒(货号PLA2011M),购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司;台式缓冲液(Tyrode's buffer)(货号BCZ0061),购自BioRike博瑞克公司。

## 2 方法

### 2.1 小鼠外周血小板的分离

使用2%戊巴比妥钠(25 mg/kg)麻醉C57BL/6J小鼠,打开小鼠腹腔暴露腹主动脉,使用含100  $\mu$ L

ACD缓冲液的2 mL注射器在腹主动脉取血900  $\mu$ L,将血液转移到15 mL离心管中,加入1.5倍体积的PBS将其与血液混匀,200 $\times$ g离心8 min,吸取离心后上层富血小板血浆(Platelet-rich plasma, PRP)至新离心管中。剩余的下层血液中再加入约2 mL PBS将其混匀,200 $\times$ g离心5 min,吸取离心后的上层PRP,将两次离心所得PRP合并,700 $\times$ g离心10 min,弃去上清,下层即为血小板,使用1 $\times$ Tyrode's buffer洗涤血小板2次,用于后续实验。

### 2.2 血小板活性检测

实验组和对照组样本均采用MTT法检测不同浓度青霉素对血小板活性的影响。根据Lescano(2018)的实验步骤进行MTT测定<sup>[7]</sup>,将新鲜分离的血小板使用1 $\times$ Tyrode's buffer洗涤2次后,以1.5 $\times$ 10<sup>8</sup>/mL浓度与不同浓度青霉素(10、50、100、500、1 000、5 000 U/mL)或PBS(对照组)在96孔板上一起孵育24 h。孵育完成后,将血小板与5 mg/mL MTT溶液在CO<sub>2</sub>培养箱中孵育3 h。然后除去MTT染料,向孔中加入100  $\mu$ L溶解溶液(酸化的10% SDS),使用酶标仪在540 nm处测量吸光度(A)值。

### 2.3 PKA、 $\beta$ -TG、SOD2、PF4和PECAM-1含量检测

收集与半数抑制浓度(985.68 U/mL)青霉素孵育24 h后的血小板,置于冰盒中,使用超声裂解仪裂解,超声5 s停止5 s,共10次后,取血小板裂解液上清。试剂盒法检测PKA、 $\beta$ -TG、SOD2、PF4和PECAM-1含量。

### 2.4 统计学分析

采用统计学软件SPSS 22.0进行数据分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验。

## 3 结果

### 3.1 血小板存活率

血小板存活率结果如图1所示,随着青霉素浓度的增大,血小板数目逐渐减少,血小板存活率逐渐降低。青霉素作用24 h的IC<sub>50</sub>值为985.68 U/mL。

### 3.2 青霉素对血小板寿命相关蛋白PKA和SOD2含量的影响

与对照组比较,青霉素组的PKA和SOD2的含量显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见表1。

### 3.3 青霉素对血小板释放功能相关蛋白 $\beta$ -TG和PF<sub>4</sub>含量的影响

与对照组比较,青霉素组的 $\beta$ -TG和PF<sub>4</sub>含量均显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结果见表2。

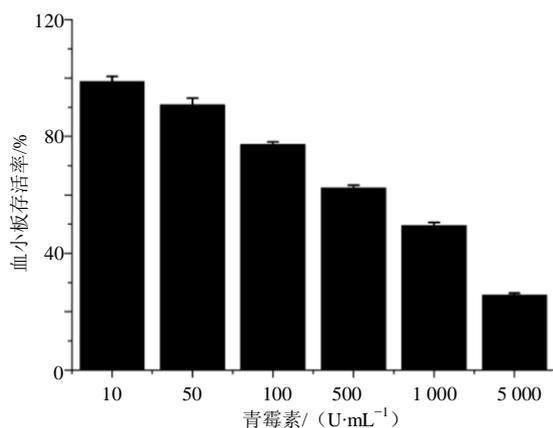


图1 不同浓度青霉素对血小板活性的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Fig. 1 Effect of penicillin in different concentrations on platelet activity ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

表1 青霉素对血小板PKA和SOD2含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Table 1 Effects of penicillin on the contents of platelet PKA and SOD2 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

| 组别  | 剂量/<br>(U·mL <sup>-1</sup> ) | PKA/<br>(ng·mL <sup>-1</sup> ) | SOD2/<br>(pg·mL <sup>-1</sup> ) |
|-----|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 对照  | —                            | 17.29±0.22                     | 598.75±2.02                     |
| 青霉素 | 985.68                       | 7.76±0.01*                     | 257.71±4.52*                    |

与对照组比较: \* $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group

表2 ELISA检测青霉素对血小板 $\beta$ -TG和PF<sub>4</sub>含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Table 2 Effects of penicillin on contents of platelet  $\beta$ -TG and PF<sub>4</sub> were detected by ELISA ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

| 组别  | 剂量/<br>(U·mL <sup>-1</sup> ) | $\beta$ -TG/(pg·mL <sup>-1</sup> ) | PF <sub>4</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|-----|------------------------------|------------------------------------|---|
| 对照  | —                            | 36.63±0.21                         | 3.40±0.04                               |
| 青霉素 | 985.68                       | 16.67±0.28*                        | 1.44±0.02*                              |

与对照组比较: \* $P<0.05$

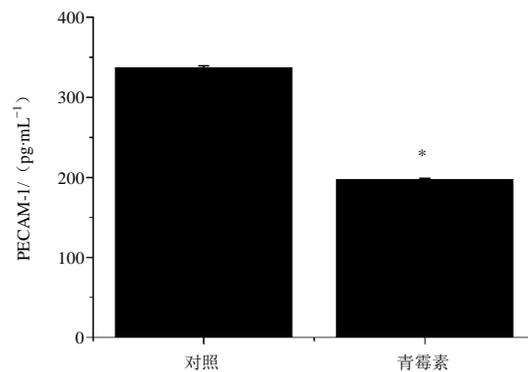
\* $P<0.05$  vs control group

### 3.4 青霉素对血小板黏附功能相关蛋白PECAM-1含量的影响

青霉素组的PECAM-1含量显著低于对照组,其差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结果见图2。

## 4 讨论

药源性血小板减少症无明显的临床症状,病情一般都较为轻微,少数可能会导致消化道甚至颅内出血等严重症状,如未及时发现或处理将严重危害患者的生命安全<sup>[8]</sup>。引起药源性血小板减少的药物种类较多,据统计抗感染药物所占比例最大<sup>[9]</sup>。当机体发生感染性疾病时,一般会采用抗菌药物进行治疗,然而研究发现在抗生素特别是青霉素类抗生



与对照组比较: \* $P<0.05$

\* $P<0.05$  vs control group

图2 ELISA检测青霉素对血小板PECAM-1含量的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )  
Fig. 2 Effect of penicillin on contents of platelet PECAM-1 detected by ELISA ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effect of penicillin on contents of platelet PECAM-1 detected by ELISA ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

素大量使用后机体可能出现出血时间延长、血小板凝集机能降低,甚至出现药源性血小板减少症<sup>[6]</sup>。抗菌药物导致血小板减少症状一般具有剂量相关性,随着使用剂量越大,血药浓度越高,症状发生概率越大<sup>[10]</sup>。抗生素引起药源性血小板减少的机制尚不明确,本次研究用不同浓度青霉素处理血小板,检测血小板中 $\beta$ -TG、PF<sub>4</sub>、PECAM-1、PKA和SOD2含量变化,初步探讨青霉素引发药源性血小板减少症的可能机制。

PKA在血小板信号转导、黏附、聚集以及释放等多种生理功能中发挥着重要的调控作用,血小板内一定量的PKA活性可维持血小板循环稳定<sup>[14]</sup>。已有研究表明,在血小板缺乏症、糖尿病及细菌感染患者体内发现PKA活性低下且受到抑制,且动物实验研究发现,抑制PKA活性或敲除PKA蛋白会导致血小板功能丧失以及促进血小板凋亡,致使血小板数目急剧下降。SOD2为PKA下游蛋白,参与细胞寿命的调控,且PKA活性与SOD2正相关<sup>[15]</sup>。闫荣和戴克胜<sup>[15]</sup>的研究表明抑制血小板中PKA活性可降低血小板聚集功能。本研究结果表明经青霉素处理的血小板中PKA和SOD2的含量显著降低,推测青霉素可能通过抑制PKA/SOD2表达,进而减少血小板数量、降低血小板聚集能力。

$\beta$ -TG和PF<sub>4</sub>是由血小板 $\alpha$ 颗粒所释放的两种特异性蛋白质,可以随着血小板的激活而被释放到血液中,可作为体内血小板激活的特异性指标,其含量增高反映了血小板聚集性增强<sup>[11-12]</sup>。PECAM-1,又名CD31,是一种跨膜糖蛋白,属黏附分子免疫球蛋白超家族的成员,是血小板上唯一的一种细胞黏附分子,已有研究证明其能够参与调控血小板的黏

附、聚集等多种功能<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,青霉素可显著降低血小板内 $\beta$ -TG、PF<sub>4</sub>和PECAM-1的含量,进一步验证了青霉素对血小板活性及其聚集功能的抑制作用。

本次研究结果提示,青霉素可显著降低血小板的存活率,抑制血小板活性及聚集功能,其机制可能与降低PKA、SOD2、 $\beta$ -TG、PF<sub>4</sub>和PECAM-1含量有关,具体的作用机制还需进一步深入研究。通过对 $\beta$ -内酰胺抗生素代表药物之一青霉素对血小板活性和功能的抑制作用的研究,旨在呼吁临床医药人员加强对抗菌药物使用的规范化,定期对抗菌药物使用患者进行血常规检查,强化监测过程,早发现早干预,从而减少因抗生素大剂量使用对血液系统的不良影响。

#### 参考文献

- [1] Duerschmied D, Bode C, Ahrens I. Immune functions of platelets [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(4): 678-691.
- [2] Nurden A T. Platelets, inflammation and tissue regeneration [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(6): 13-33.
- [3] Hoigné R. Drug induced immune-thrombocytopenia [J]. *Acta Haematol*, 2015, 68(1): 1-2.
- [4] Cox D, Kerrigan S W, Watson S P. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(6): 1097-1107.
- [5] 秦伟, 王晓雪, 杜雯雯, 等. 药源性血小板减少症的研究进展 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2017, 17(5): 577-580.
- [6] 赵娟, 杨远荣. 抗菌药物致血小板减少文献分析 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(10): 2025-2030.
- [7] Lescano I C H, Lima F F D, Mendes-Silvério I C B, et al. Effect of polyphenols from campomanesia adamantium on platelet aggregation and inhibition of cyclooxygenases: molecular docking and *in vitro* analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 617.
- [8] 杨九一, 顾健. 药源性血小板减少症机制研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(22): 1874-1877.
- [9] 唐巧云, 黄丽, 罗圣平, 等. 264例药源性血小板减少症分析 [J]. *中国药物应用与监测*, 2017, 14(1): 41-44.
- [10] 司继刚. 抗菌药物致凝血障碍原因分析与对策 [J]. *医药导报*, 2015, 34(6): 758-761.
- [11] Egan K, van Geffen J P, Ma H, et al. Effect of platelet-derived  $\beta$ -thromboglobulins on coagulation [J]. *Thromb Res*, 2017, 154: 7-15.
- [12] Lord M S, Cheng B, Farrugia B L, et al. Platelet factor 4 binds to vascular proteoglycans and controls both growth factor activities and platelet activation [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(10):4054-4063.
- [13] 杨颖, 罗晖. 血小板内皮细胞粘附分子-1(PECAM-1)的研究与疾病 [J]. *川北医学院学报*, 2008, 23(6): 627-631.
- [14] Rukoyatkina N, Butt E, Subramanian H, et al. Protein kinase A activation by the anti-cancer drugs ABT-737 and thymoquinone is caspase-3-dependent and correlates with platelet inhibition and apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(6): e2898.
- [15] Zhao L, Liu J, He C, et al. Protein kinase A determines platelet life span and survival by regulating apoptosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(12): 4338-4351.
- [16] 闫荣, 戴克胜. 蛋白激酶A抑制剂对血小板膜糖蛋白Iba表达及血小板功能的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2009, 30(3): 171-174.