

在人血小板中添加谷氨酰胺可防止紫外线 C 诱导的血小板活化的毒性作用

Mazhar Mushtaq

苏莱曼·拉吉希大学基础医学系 沙特阿拉伯 布卡里亚 999088

【摘要】：血小板的主要功能是预防出血。输血血小板既可以预防，也可以治疗。从血液和血液成分的储存角度来看，世界各地都遵循标准协议，以确保血库的安全运行。利用紫外 -c 光处理血小板已成为血库保存血小板浓度的一种有价值的方法。然而，它的有害作用仍然存在，如激活血小板，从而失去其生理功能。本研究旨在证明在血小板浓缩液中添加谷氨酰胺可以预防 UV-C 的毒性作用。这项研究是用人类或小鼠的血小板进行的。所有实验均采用阳性对照和阴性对照，以确保实验结果的有效性。在血小板暴露于适当剂量的 UV-C 之前和之后评估体外血栓形成。为了评估 50mM 谷氨酰胺对血小板的细胞毒性作用，使用甲基噻唑四唑 (MTT) 来验证活力效应。我们已经成功地证明，使用谷氨酰胺可以减轻血小板浓缩物暴露于 UV-C 期间所造成的生理损害。我们的研究表明，添加适当浓度的谷氨酰胺可以保留 UV-C 对血小板的毒性作用。

【关键词】：血小板；谷氨酰胺；UV-C；血栓的形成

Addition of Glutamine in the Human Platelets Could Prevent Toxic Effect of Ultraviolet-C Induced Platelets Activation

Mazhar Mushtaq

Basic Medical Sciences Department, Sulaiman Al Rajhi University, Al-Bukayriah, Saudia Arabia 999088

Abstract: The primary function of platelets is to prevent bleeding. Transfusion of platelets can be prophylactic or therapeutic. From the storage perspective of blood and blood components, standard protocols are followed around the world to ensure the safe operation of blood banks. The Use of UV-C light in treating platelets has become a valuable method for storage and efficacy of platelets concentration in the blood bank. However, its deleterious effect remains, such as activation of platelets, thus losing their physiological function. In this study we intend to demonstrate that addition of glutamine in the platelets concentrate could prevent the toxic effect of UV-C. This study was conducted using human or mouse platelets. Use of positive and negative control in all experiment were ensured to validate the findings. In vitro thrombus formations was assessed before and after exposure of platelets to appropriate dose of UV-C. To assess the cytotoxic effect of 50 mM of glutamine on the platelets, methylthiazole tetrazolium (MTT) was used to validate the viability effect. We have successfully demonstrated that physiological damages done during the exposure of platelet concentrate to UV-C could be alleviated by the use of glutamine. Our study demonstrated that the toxic effect of UV-C on the platelets could be preserved by adding appropriate concentration of glutamine.

Keywords: Platelets; Glutamine; UV-C; Thrombus formation

1 引言

血小板是大骨髓细胞 (巨核细胞) 的微小细胞碎片。它们只占血液总量的一小部分。血小板的主要功能是预防出血。

各种病理障碍都归因于它们的数量和功能。关于血小板数量或功能下降的根本原因，文献中已记录了许多因素。通常情况下，这类患者需要输注血小板来维持止血。

紫外线 (UV) 光 (UV- a (60%), UV- b(100%) 和 UV- c(20%) 的广谱波长 Mirasol™ 病原体减少技术系统的使用以及 UV- c 对血小板浓缩物的有益作用已被充分证明^[1,2]。然而，其缺陷仍然存在，如生理功能下降，^[3] 和 ROS^[4] 的产生。在暴露血小板浓缩物期间改变 / 产生的其他生物分子有乳酸的产生，p 选择暴露和磷脂酰丝氨酸暴露^[3]。在一项有趣的研究中，UV-C 病原体失活处理不影响血小板整合素的激活；然而，当微流体流室^[5] 作用时，它可以减轻血小板血栓形成的特性。这种生理功能的下降，如果要输血，就不可避免地会使血小板失去作用，特别是对那些患有严

重血小板疾病的人来说。

Murphy 等人进行了一项非常有趣的研究，他们估计了血小板浓缩物储存期间血浆中 17 种氨基酸的水平，并得出结论：16 种氨基酸的浓度保持不变，而谷氨酰胺的浓度在第四天^[6] 时降至零。

本研究旨在证明在人血小板浓缩液中添加谷氨酰胺可延长其生理功能。我们在新鲜制备的人或小鼠血小板中使用 50mm 浓度的 l- 谷氨酰胺，并将它们暴露在 UV-C 光下短时间。

2 材料与方法

2.1 试剂

凝血酶，l- 谷氨酰胺。CCK8 试剂盒来自 Dijindo Laboratories，各种其他试剂来自 SigmaAldrich。

2.2 血小板制备

雄性小鼠，C57BL/6，4~6 周龄，近交系，在大学动物馆饲养。所有的动物研究都是根据全北国立大学医学院动物护理机构批准的协议进行的。心脏穿刺入柠檬酸葡萄糖

(ACD) (20mM 柠檬酸, 110 mM 柠檬酸钠, 5mM 葡萄糖)1:10 比例 V/V 抽血。如前所述^[7]制备血小板。然后让 Tyrode Buffer (TB) 或血小板富血浆 (PRP) 中的血小板在 37°C 下沉沉淀 60 分钟, 然后用于实验。钙的研究中, 在静息期间加入 0.02U 的 apyrase, 以减少 ADP 和 ATP 的影响。如有规定, 可加钙, 否则使用无钙缓冲液。

根据生物化学系的指导方针, 在获得参与者的知情同意后, 使用与采血相同的方案制备人类血小板。向参与者解释了测试的目的。在此之前还对参与者进行了筛查以进行潜在风险评估, 并遵循了医院实验室批准的基本安全程序。

2.3 UV-C 辐照

使用 Vilber loourmat BLX-254 在 254nm 发射, 从上面的 96 孔或 24 孔板中照射适当体积和浓度的血小板, 添加或不添加谷氨酰胺。根据该公司的规范, 血小板在室温下以 0.5 焦耳的恒定强度照射 100 秒, 并在未加盖的 60×15mm 的培养皿中持续震动。

由于 Gravemann 等人已经证明, 在 TheraflexTM 中使用 0.2 焦耳的 UV-C 会对 α IIb β 3 造成最小的损伤, 而 0.6 焦耳的 UV-C 会对整合素^[8]造成严重的损伤, 我们使用 0.5 焦耳的 UV-C 来证明, 使用谷氨酰胺可以改善血小板最大限度地暴露于 UV-C, 这可以导致整合素的显著变化。

2.4 体外血栓形成

用 0.5U/ml 凝血酶刺激血小板, 或用含谷氨酰胺或不含谷氨酰胺的 UV-C 连续晃动刺激血小板。在所需时间后, 抽吸额外的血小板, 用 1% 的福尔马林固定底部形成的血栓 15 分钟。洗一次后, 使用尼康 Eclipse TE2000-S 从 6 个随机显微镜视野中捕获相位对比图像。所获取的图像使用 Focus Lite Version 2.88 软件捕获。图像中所见血栓覆盖面积计算如前所述^[7]。

2.5 可行性分析

tb 悬浮血小板在 96 孔板中, 最终体积为 100 μ l/孔, 在 50mM 谷氨酰胺中孵育, 并暴露于 UV-C, 或在裂解缓冲液中, 并在所需的时间内不进行处理。使用 10 μ l 甲基噻唑 oletetrazium (MTT, Sigma) 评估活力测定。在 37°C 孵育 4 小时后, 用 100 μ l 二甲亚砜 (DMSO, Sigma) 取代培养基。用微孔板分光光度计在 570 nm 处测量光密度。

2.6 统计数据

采用未配对学生 t 检验对 sigmaplot 9 中的原始数据进行统计分析; p<0.05 为有统计学意义的概率值。数值用带有标准偏差的平均值表示, “n”表示实验次数。

3 结果与讨论

谷氨酰胺可防止 UV-C 诱导的血小板活化。将洗净的人类血小板重新悬浮在 TB 中, 补充 1mM Ca²⁺(右图, 图 1)。a), PRP; 不补充钙(左面板, 图 1。A.) 在谷氨酰胺存在或不存在的条件下暴露于 UV-C。添加凝血酶(阳性对照)会在两组中产生多个血栓形成灶。同样地, 当暴露于 UV-C 时, 在其自然栖息地(即血浆或 TB 洗过的血小板)中的血小板显示出类似的激活模式, 诱导血小板的大网格形成都是明显的。然而, 谷氨酰胺的加入消除了这一现象。图 1.A1,

表示图 1 的统计分析。A, 表示培养皿中覆盖面积的百分比。凝血酶诱导(阳性对照)和 VU-C 暴露分别导致覆盖面积的 50% 至 65%。然而, 谷氨酰胺的加入逆转了 UV-C 诱导的血小板活化。上述结果表明, 谷氨酰胺可以抑制 UV-C 诱导的血小板活化。我们从这个实验中得到的另一个有趣的答案是使用 PRP 或 TB 洗涤过的血小板产生了相同的结果。

为了评估 50mM 的谷氨酰胺是否对细胞有毒性, 我们使用了活性试验(图 2)来描述谷氨酰胺对血小板的无毒作用。为了验证我们早期出版物^[9]的数据, 我们详细地证明了谷氨酰胺对小鼠血小板的影响, 在相同条件下, 人类和小鼠的血小板活力测定结果没有太大差异。

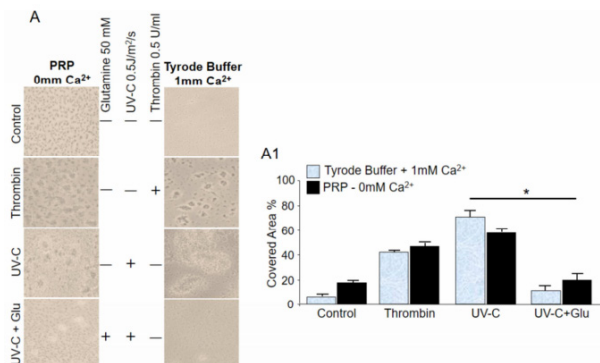


图 1

图 1 谷氨酰胺可预防 UV-C 诱导的人血小板活化: 将人血小板暴露于含有或不含有 50mM 谷氨酰胺的 UV-C 后, 评估体外血栓形成; 凝血酶 0.5U 作为阳性对照。(一个; n = 6)。添加了 1mM Ca²⁺ 的 TB 洗过的人血小板暴露于含有或不含有 50mM 谷氨酰胺的 UV-C(右图)。富血小板血浆(左图)同样暴露。谷氨酰胺(A1)组血小板覆盖面积显著降低, *P < 0.05, 经 t 检验。

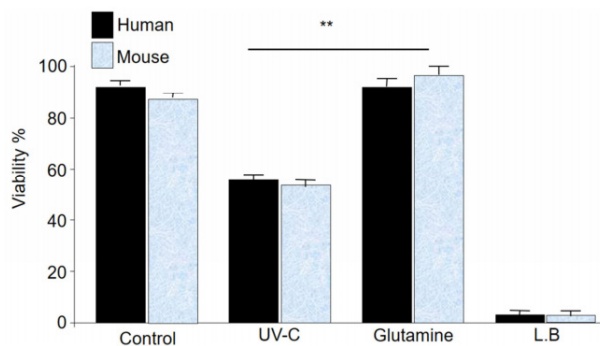


图 2

图 2 采用 CCK-8 试剂盒研究谷氨酰胺毒性作用(B; N=4)小鼠和人类血小板。谷氨酰胺对血小板没有毒性; 而 UV-C 照射后存活率降低至 50%, **P < 0.05。为了控制, 使用了裂解缓冲液(LB)。

血小板在血库中的储存一直是一个关键问题。频繁的躁动、细菌污染和躁动后的活化导致其生理功能的丧失。已采取各种措施, 以尽量减少储存的血小板浓缩液生理功能的损失。利用广谱波长, 在光敏剂核黄素^[10]的存在下; Mirasol 紫外线杀菌技术系统 UV-A (60%), UV-B (100%), UV-C(20%)被世界各地广泛采用, 作为防止细菌和病毒

污染的标准程序^[11]。此外，该技术已发展到窄带短波：“Theraflex”具有特定波长(254 nm)的UV-C光，已成为血库中血小板浓缩物安全性和有效性的宝贵工具^[12,13]。在一些发达国家，这种不需要任何添加剂的一次性暴露血小板的方法已被采用，但长期暴露会严重导致血小板功能障碍。在发展中国家或欠发达国家，Mirasol系统仍然盛行^[14-16]。图3总结了不同UV灯的不同特性。输血存活血小板是至关重要的。研究了不同的血小板浓缩物储存溶液；使用稀释的自体血浆、ViaCyteTM和防腐剂溶液均被证明可以保存血小板聚集和分泌颗粒内容物的能力^[17-19]。aflextm已被广泛用于这一目的。已发表的许多研究表明其毒性作用，如降低血栓形成性质^[20]和降低血小板暴露于UV-C的胶原诱导聚集^[12]。在我们的研究中，我们使用谷氨酰胺来消除Theraflex TM的毒性作用。

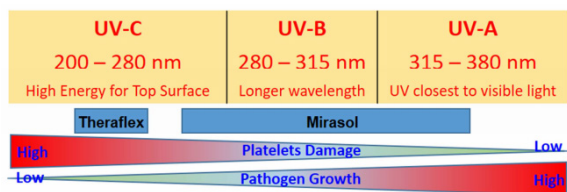


图 3

图 3 不同 UV 灯的不同特性。UV-C 波长窄，能量高，对血小板有潜在损伤，但有效杀菌。

参考文献:

- [1] Bashir S, Cookson P, Wiltshire M, Hawkins L, Sonoda L, Thomas S, et al. Pathogen inactivation of platelets using ultraviolet C light: effect on in vitro function and recovery and survival of platelets. *Transfusion* 2013; 53: 990–1000.
- [2] Johnson L, Hyland R, Tan S, Tolksdorf F, Sumian C, Seltsam A, et al. In vitro quality of platelets with low plasma carryover treated with ultraviolet C light for pathogen inactivation. *Transfusion Med. Hemotherapy*. 2016; 43: 190–197.
- [3] Van Aelst B, Devloo R, Vandekerckhove P, Compennolle V, Feys HB. Ultraviolet C light pathogen inactivation treatment of platelet concentrates preserves integrin activation but affects thrombus formation kinetics on collagen in vitro. *Transfusion* 2015; 55: 2404–2414.
- [4] De Jager TL, Cockrell AE, Du Plessis SS. Ultraviolet Light Induced Generation of Reactive Oxygen Species. In: Ahmad SI, editor. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. Cham: Springer International Publishing 2017; 15–23.
- [5] Britt Van Aelst, Rosalie Devloo, Philippe Vandekerckhove, et al. Ultraviolet C light pathogen inactivation treatment of platelet concentrates preserves integrin activation but affects thrombus formation kinetics on collagen in vitro. *Transfusion* 2015; 55: 2404–2414.
- [6] Murphy S, Munoz S, Parry-Billings M, Newsholme E. Amino acid metabolism during platelet storage for transfusion. *Br J Haematol* 1992; 81: 585-590.
- [7] Mushtaq M, Nam TS, Kim UH. Critical role for CD38-mediated Ca²⁺ signaling in thrombin-induced procoagulant activity of mouse platelets and hemostasis. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 15: 12952–12958.
- [8] Seltsam, Axel & Müller, Thomas. UVC Irradiation for Pathogen Reduction of Platelet Concentrates and Plasma. *Transfusion medicine and hemotherapy* 2011; 38: 43-54.
- [9] Mazhar M, Kim UH. The Role of Glutamine in the Prevention of Ultraviolet-C-Induced Platelet Activation. *Biochemistry Research International*. 2020. DOI: 8853696, 7 Pages.
- [10] Shirley Owusu-Ofori, Joseph Kusi, Alex Owusu-Ofori, Graham Freimanis, et al. Treatment of whole blood with riboflavin and UV light: impact on malaria parasite viability and whole blood storage. *Shock* 2014; 44: 33-38.
- [11] Jerrold H. L, Matthew D. Neal, and Jay H. Herman. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. *Critical Care* 2018; 22: 271-278.
- [12] Mohr H, Steil L, Gravemann U, Thiele T, Hammer E, Greinacher A, et al. A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short-wave ultraviolet light. *Transfusion* 2009; 49: 2612–2624.

转运后的谷氨酰胺^[21]在人血小板中被积极代谢，在这些细胞^[22]中代表优先的线粒体氧化底物。此外，外源性谷氨酰胺由血小板代谢为谷氨酸、天门冬氨酸和二氧化碳；没有乳酸形成^[12]这使得血小板更有活力，因为它们较少暴露在酸性环境中。

4 结论

文献中对这一主题的关注并不多。在本研究中，我们证明了谷氨酰胺可以缓解血小板浓缩物暴露于UV-C引起的生理变化。我们已经在小鼠模型中描述了不同的实验，表明谷氨酰胺保留了血小板的生理功能。在本研究中，我们使用了人类血小板，并证明了在UV-C下，血小板具有良好的保存功能。然而，还需要在分子水平上进行更深入的研究，以评估谷氨酰胺的详细途径以及如何维持血小板的生理功能。这项研究提出了一些问题。谷氨酰胺在无核细胞中如何以及在哪儿起作用以减轻UV-C的毒性作用？血小板中谷氨酰胺的存在对病原体的生长有直接影响吗？这些推测使本研究成为在UV-C和谷氨酰胺存在下氧化磷酸化和糖酵解的进一步代谢研究的课题。

致谢

感谢韩国全北大学医学部生物化学系主任金字贤教授对这项工作的监督和指导所付出的不懈努力。

- [13] Seltsam A, Muller TH. UVC irradiation for pathogen reduction of platelet concentrates and plasma. *Transfusion Med. Hemotherapy* 2011; 38: 43–54.
- [14] Freimanis G. Investigating the Prevalence of Transfusion Transmission of Plasmodium within a Hyperendemic Blood Donation System. *Transfusion* 2013; 53: 1429–1441.
- [15] Kabita C, Shamsuz Z, Rahul C, Surinder S, Shawn DK, Shalini T, et al. Evaluation of Mirasol pathogen reduction system by artificially contaminating platelet concentrates with *Staphylococcus epidermidis*: A pilot study from India. *Asian J Transfus Sci.* 2016; 10: 127–131.
- [16] Asa'ah N, Gabriel A, Emmanuel A, Claude T, Tazoacha A. Whole blood pathogen reduction technology and blood safety in sub-Saharan Africa: A systematic review with regional discussion. *Afr J Lab Med.* 2016; 5: 363.
- [17] Terpstra FG et al. Potential and limitation of UVC irradiation for the inactivation of pathogens in platelet concentrates. *Transfusion* 2008; 48: 304-313.
- [18] VandenBroeke T, Dumont LJ, Hunter S, Nixon J, Murphy S, Roger J, et al. Platelet storage solution effects on the accuracy of laboratory tests for platelet function: a multi-laboratory study. *Vox Sanguinis* 2004; 86: 183-188.
- [19] Karnicki K, Johnson C, St Cyr J, Ericson D, Rao G. Platelet storage solution improves the in vitro function of preserved platelet concentrate. *Vox Sanguinis* 2003; 85: 262-266.
- [20] Zhi L, Chi X, Vostal JG. In vitro and in vivo characterization of ultraviolet light C-irradiated human platelets in a 2 event mouse model of transfusion. *PLoS One* 2013; 8: e79869.
- [21] Valeria V, Elisabetta M, Marta F, Paola B. Glutaminetransport and enzymatic activities involved in glutaminolysis in human platelets. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243: 43-48.
- [22] Valeria V, Elisabetta M, Marta F, Paola B. GlutamineUtilization in Resting and Stimulated Platelets. *The Journal of Biochemistry* 1993; 114: 163–166.