

• 论 著 •

人血小板体外抗菌活性研究^{*}

顾昊宇, 展富琴, 顾爱萍, 秦陈浩, 何春燕[△]

(苏州大学附属第二医院检验科, 江苏苏州 215004)

摘要:目的 探讨洗涤人血小板在体外对革兰阳性球菌代表菌(金黄色葡萄球菌)及革兰阴性杆菌代表菌(大肠埃希菌)活性的影响。**方法** 分离和洗涤人血小板, 加入 20 倍的细菌共孵育 3 h。将共孵育后的反应液梯度稀释后涂平板, 计数细菌菌落形成单位(CFU)来判断活菌数量; 将共孵育后反应液离心, 检测上清液中 Th1/Th2/Th17 细胞因子, 分析与细菌作用后的血小板细胞因子释放情况。**结果** 金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌与血小板共孵育后, 细菌 CFU 数目均明显下降。血小板对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的杀菌率分别为 96.8% 和 40.5%。金黄色葡萄球菌可以促进血小板产生 γ -干扰素和白细胞介素-17a, 而大肠埃希菌没有显示出明显作用。**结论** 洗涤血小板能够明显抑制金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌的活性, 并释放出较高浓度的炎性细胞因子。

关键词: 洗涤血小板; 抗菌活性; 细胞因子; 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.24.006 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)24-3583-03

Study on in vitro antimicrobial activity of human platelets^{*}

GU Haoyu, ZHAN Fuqin, GU Aiping, QIN Chenhao, HE Chunyan[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215004, China)

Abstract: **Objective** To discuss the effects of washed platelets on activity of the G⁺ bacteria (Staphylococcus aureus) and G⁻ bacteria (Escherichia coli). **Methods** Human platelets were separated, washed, and incubated for 3 hours with the above bacteria of 20 times quantity. After co-incubation, the reaction solution was diluted and plated on the agar, and the bacterial colony forming units(CFU) were counted to determine the number of living bacteria. Moreover, Th1/Th2/Th17 cytokines in the supernatant were detected by CBA after centrifugation of the reaction solution. **Results** After incubation with Staphylococcus aureus and Escherichia coli, washed platelets presented significant decrease of bacterial CFU counts. The bactericidal rates of platelets to Staphylococcus aureus and Escherichia coli were 96.8% and 40.5%, respectively. In addition, Staphylococcus aureus could promote the production of IFN- γ and IL-17a released by platelets, while Escherichia coli did not show any obvious effect. **Conclusion** Washed platelets can significantly inhibit the activity of Staphylococcus aureus and Escherichia coli and release high concentration of inflammatory cytokines.

Key words: washed platelets; antibacterial activity; cytokines; bacteria

血小板是骨髓中成熟巨核细胞脱落下来的小细胞质, 是血液中的一个重要成分。既往大量研究多围绕血小板参与止血和血栓形成而展开^[1]。然而最新研究显示, 血小板作为机体防御体系中的一部分, 在抗细菌感染及杀菌方面有明显的作用。比如, 血小板可以产生趋化因子募集吞噬细胞, 活化血小板表达特异性受体以结合病毒和细菌, 释放抗感染物质消灭病原微生物等^[2-4]。此外, 血小板在体内可以与巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞及 T 淋巴细胞相互作用。当血管损伤时, 血小板会聚集在伤口周围帮助止血, 促进伤口愈合, 当碰到病原微生物及微生物相关分子时, 血小板则会发生聚集, 将病原微生物包围, 限制其活动^[5-6]。有研究显示, 从血小板中分离提纯的蛋白多肽, 如血小板型磷脂酶 A2(PLA2)具有较明显的抗菌作用, 但利用血小板直接进行抗菌或杀菌试验的研究却少见报道^[7]。因此, 本研究将血小板与金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌进行共同反应, 计数残留细菌的菌落形成能力, 用来判断血小板的杀菌功能, 同时检测血小板与细菌直接作用后释放细胞因

子的情况, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌 金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 25923)、大肠埃希菌标准菌株(ATCC 25922)购自中国生物制品鉴定所。

1.1.2 试剂 Th1/Th2 细胞因子检测试剂盒(BD 公司产品), 琼脂平板培养基(杭州百思生物技术有限公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 血小板分离 洗涤血小板(WPs)的制备: ACD(7:1)抗凝血, 以 1 100 r/min 离心 11 min, 吸取上层液为富含血小板血浆(PRP), 计数调整浓度为 3×10^8 /mL, 室温静息 0.5 h 备用。PRP 以 3 000 r/min 离心 2 min, 弃上清液, CGS 缓冲液(pH 7.0)重悬, 2 200 r/min 离心 2 min, 弃上清液, MTB 缓冲液(pH 7.0)重悬。调整血小板数为 3×10^8 /mL, 即为 WPs, 加入 $1 \mu\text{mol/L}$ Ca²⁺、Mg²⁺, 室温静息 1.0~1.5 h 备用(试验所用试剂及器材经无菌处理, 操作也遵循无菌原则)。

^{*} 基金项目: 江苏省医学青年人才资助项目(QNRC2016865)。

作者简介: 顾昊宇, 男, 技师, 主要从事自身免疫疾病方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 34698925@qq.com。

1.2.2 细菌计数 金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌经过液体 LB 培养基扩增后,经 10 000 倍稀释后取 100 μ L 接种血平板,将培养皿放入 37 $^{\circ}$ C 温箱培养。18~24 h 后取出计数细菌菌落形成单位(CFU),通过 CFU 数目计数细菌浓度。

1.2.3 杀菌试验 取 1×10^7 个血小板加入 2×10^8 个细菌,用 MTB 调整反应体积至 100 μ L,轻轻混匀后放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 3 h 作为试验组。对照组不加细菌。杀菌活性测定采用梯度稀释的方法^[8];取 50 μ L 反应液加入 450 μ L 生理盐水 10 倍稀释,连续稀释 4 次,每次稀释都取出 100 μ L 的稀释液接种至血平板,将培养皿放入 37 $^{\circ}$ C 温箱培养。18~24 h 后取出计数 CFU。杀菌率=(对照组 CFU-试验组 CFU)/对照组 CFU $\times100\%$ 。

1.2.4 细胞因子检测 血小板与细菌共孵育 3 h 后取 50 μ L 反应液,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液检测细胞因子水平,包括白细胞介素-2(IL-2)、IL-4、IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰(IFN- γ)、IL-17a。检测方法如下:(1)混合微球,7 种微球分别检测 7 种细胞因子,每种微球取 10 μ L/样本。将所有 7 种捕获微球都装入一根流式管中,标记为“混合微球”,充分漩涡混匀;(2)重悬微球,将混合好的微球用 1 500 r/min 离心 5 min,去除上清液,加入等体积的血清增强液,充分漩涡混匀,室温避光孵育 30 min;(3)取 25 μ L 混合微球,加入 25 μ L 待测样本或标准品,最后加入 25 μ L 藻红蛋白(PE)检测试剂,充分混匀,室温避光孵育 3 h。每管加入 1 mL 洗液,1 500 r/min 离心 5 min,去除上清液,加入 200 μ L 洗液,重悬微球上流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件对所获得的数据进行统计分析,CFU 数据及细胞因子水平均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 Mann-Whitney 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血小板杀菌试验结果 将洗涤血小板与金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌分别共孵育 3 h 后检测残留细菌的 CFU 数目,计算杀菌率,MTB+金黄色葡萄球菌 CFU 数目为 $(17.20\pm1.04)\times10^7$ 个/mL,杀菌率为 100.0%;血小板+金黄色葡萄球菌 CFU 数目为 $(0.50\pm0.05)\times10^7$ 个/mL,杀菌率为 96.8%;MTB+大肠埃希菌 CFU 数目为 $(7.40\pm1.06)\times10^7$ 个/

mL,杀菌率为 100.0%;血小板+大肠埃希菌 CFU 数目为 $(3.40\pm0.99)\times10^7$ 个/mL,杀菌率为 40.5%。金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌与血小板共孵育后,细菌 CFU 数目均明显下降,分别降为 5.4×10^6 个/mL 和 3.4×10^7 个/mL。血小板对金黄色葡萄球菌的杀菌率为 96.8%,对大肠埃希菌的杀菌率为 40.5%,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。此外,从 LB 琼脂平板上也可以看出,金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌与血小板共孵育后,细菌 CFU 数量明显减少,见图 1。

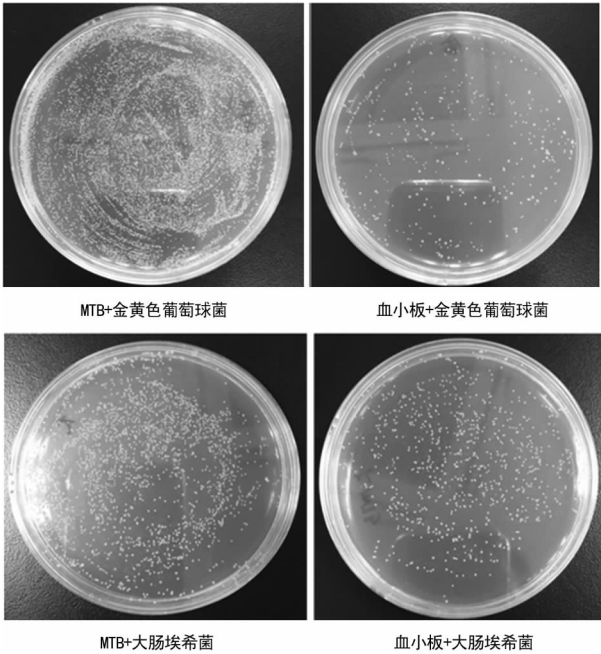


图 1 血小板对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌 CFU 数目的作用

2.2 血小板释放细胞因子结果 洗涤血小板与金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌分别共孵育 3 h 后上清液中细胞因子浓度见表 1。金黄色葡萄球菌可以促进血小板产生大量 IFN- γ [(305.7 ± 58.5) pg/mL]和 IL-17a [(639.3 ± 94.6) pg/mL],与其他组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。大肠埃希菌没有显示出明显作用。

表 1 血小板与细菌作用后分泌细胞因子情况($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	IL-17a	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
血小板+MTB	5.0 $\pm$ 0.0*	1.0 $\pm$ 0.0*	1.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.0	6.5 $\pm$ 0.1
MTB+金黄色葡萄球菌	9.3 $\pm$ 0.2*	3.1 $\pm$ 0.6*	2.5 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.0	3.3 $\pm$ 0.7	7.5 $\pm$ 0.9
MTB+大肠埃希菌	5.0 $\pm$ 0.0*	3.7 $\pm$ 0.4*	1.7 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.2
血小板+金黄色葡萄球菌	639.3 $\pm$ 94.6	305.7 $\pm$ 58.5	1.9 $\pm$ 0.9	1.0 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 1.2	1.0 $\pm$ 0.0	7.7 $\pm$ 1.6
血小板+大肠埃希菌	9.4 $\pm$ 6.2*	2.7 $\pm$ 2.3*	2.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 2.0	1.3 $\pm$ 0.4	7.3 $\pm$ 1.8

注:与血小板+金黄色葡萄球菌组比较,* $P<0.05$

3 讨 论

众所周知,血小板在止/凝血过程中发挥了重要作用,而最新研究证实,血小板也有直接免疫功能及间接免疫调控作用。从进化论的角度分析这也是有道理的,无脊椎动物的生理结构比较简单,它们的血细胞还没有分化,需要同时介导止血和抗

感染两大功能。在低等生物中,血栓不仅对防止损伤形成有重要作用,同时对预防病原微生物感染也有重要作用,因为血栓能够有效地将病原微生物封闭起来,形成一个相对隔离的空间,防止病原微生物进一步扩散。而高等生物进化出了更为复杂的血液系统,分化出血小板和免疫细胞。血小板负责止/凝

血,免疫细胞承担免疫功能。尽管如此,血小板在发挥免疫功能方面并非毫无作为。血小板产生、表达及释放很多与免疫和炎性反应相关的分子有关。比如,血小板产生趋化因子募集免疫细胞,血小板表面表达结合病毒和细菌的受体,释放抗感染物质消灭病原微生物等。此外,大量研究证据表明,血小板在体内可以与中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞,甚至 T 淋巴细胞相互作用。血管损伤时血小板会聚集帮助止血和伤口愈合,当碰到病原微生物及微生物相关分子时,血小板也会发生聚集网络和封闭病原微生物。因此,原来关于血小板和免疫细胞各司其职的模式可能会被打破,血小板在抗感染方面可能有非常重要的作用^[9-11]。

血小板减少在感染性疾病特别是脓毒血症中被认为是与发病率和病死率相关的一项指标^[12]。在重症监护室患者中血小板减少与多器官功能衰竭及病死率之间有直接相关性,血小板急剧减少的程度往往提示存在严重的脓毒血症且预后较差^[13]。在小鼠脓毒血症模型中也证实了这一结论。随着小鼠体内血小板数量的下降,脓毒血症小鼠的病死率逐步上升,血流、肺、肝及脾中细菌水平明显增加。当小鼠血小板数量低于 1% 并出现脓毒血症时,48 h 内所有的感染小鼠均死亡^[14]。说明小鼠体内血小板数量需要维持在一定水平,才能有效启动机体抗感染和免疫功能。关于血小板抗菌的机制也得到大量的研究,主要有以下几个方面:(1)活化的血小板可以释放大量的抗菌物质,主要包括阳离子抗菌肽、血小板抗菌蛋白(PMP)^[15]及血小板来源的 PLA2^[16]。有研究证实,阳离子抗菌肽、PMP 及血小板来源的 PLA2 这 3 种物质有直接杀灭细菌的作用。(2)血小板可以与损伤部位的内皮细胞相互作用,形成血栓将细菌包裹起来,有效阻止细菌扩散到远端器官^[17]。(3)血小板黏附细菌后可以与其他吞噬细胞,如中性粒细胞和巨噬细胞相互作用,促进吞噬细胞的吞噬功能。

目前,临床耐药菌日趋增多,而金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌是最常见的医院感染致病菌。金黄色葡萄球菌极易产生耐药性,该类细菌对除万古霉素以外的大多数抗菌药物均有耐药性,使临床治疗十分困难。因此,研发有效抑制、杀灭临床常见耐药菌的新型治疗药物有重要意义。血液系统中除了已经认识的各种吞噬细胞外,其他细胞如血小板也具有明显抗菌作用,对于血小板新型功能的发现和应用有可能为治疗细菌感染提供一种新的思路,尤其是应对不断出现的多重耐药菌株,甚至超级细菌可能有良好的前景。

参考文献

- [1] Jenne CN, Urrutia R, Kubes P. Platelets; bridging hemostasis, inflammation, and immunity[J]. *Int J Lab Hematol*, 2013, 35(3): 254-261.
- [2] Semple JW, Italiano Jr JE, Freedman J. Platelets and the immune continuum[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(4): 264-274.
- [3] Semple JW, Freedman J. Platelets and innate immunity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(4): 499-511.
- [4] Qu Z, Chaikof EL. Interface between hemostasis and adaptive immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2010, 22(5): 634-642.

- [5] Shannon O. Platelet interaction with bacterial toxins and secreted products[J]. *Platelets*, 2015, 26(4): 302-308.
- [6] Wong CH, Jenne CN, Petri B, et al. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8): 785-792.
- [7] 李艳, 梁宁生, 陆益, 等. 重组人血小板型磷脂酶 A2 对耐药菌的杀菌作用与耐药性诱导[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(8): 880-882.
- [8] Aktan I, Dunkel B, Cunningham FM. Equine platelets inhibit *E. coli* growth and can be activated by bacterial lipopolysaccharide and lipoteichoic acid although superoxide anion production does not occur and platelet activation is not associated with enhanced production by neutrophils[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 152(3/4): 209-217.
- [9] Carestia A, Kaufman T, Schattner M. Platelets; new bricks in the building of neutrophil extracellular traps[J]. *Front Immunol*, 2016, 7(6): 271-276.
- [10] Wong CH, Jenne CN, Petri B, et al. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(8): 785-792.
- [11] McDonald B, Davis RP, Kim SJ, et al. Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice[J]. *Blood*, 2017, 129(10): 1357-1367.
- [12] 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.
- [13] Claushuis TA, van Vught LA, Scicluna BP, et al. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients[J]. *Blood*, 2016, 127(24): 3062-3072.
- [14] de Stoppelaar SF, van't Veer C, Claushuis TA, et al. Thrombocytopenia impairs host defense in gram-negative pneumonia-derived sepsis in mice[J]. *Blood*, 2014, 124(25): 3781-3790.
- [15] Miroshnikov SA, Gritsenko VA, Ivanov IB. Effective Treatment of Staphylococcal Scalded Skin Syndrome with Platelet Microbicidal Protein in CBRB-Rb(8, 17) 11em Mice Model[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2015, 7(3): 203-206.
- [16] Gill P, Jindal NL, Jagdis A, et al. Platelets in the immune response; Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(6): 1424-1432.
- [17] Yeaman MR. Platelets in defense against bacterial pathogens[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(4): 525-544.