

冷藏对新鲜冰冻血浆诱导内皮细胞迁移的影响及其分子机制研究*

张春芳^{1)**} 谭 潭^{1, 3)**} 李建国¹⁾ 马虹英¹⁾ 陈主初¹⁾ 段朝军^{1, 2)***}

(¹⁾中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008; ²⁾中南大学湘雅医院医学实验研究中心, 长沙 410008;

³⁾郴州市第一人民医院检验科, 郴州 423000)

摘要 探讨冷藏是否导致新鲜冰冻血浆(fresh frozen plasma, FFP)中的转化生长因子- β (transform growth factor- β , TGF- β)发生变化并降低其对内皮细胞迁移的诱导能力及其分子机制。为证实冷藏可能导致 FFP 中 TGF- β 的水平升高进而影响其功能, 首先采用 ELISA 法分析当天解冻 FFP(FFP Day 0)和解冻后 4℃ 冷藏 1~5 天 FFP 中 TGF- β 含量, 迁移实验及 Western blot 分析比较 FFP(Day 0)和 FFP (Day 5)处理人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMECs)后的细胞迁移率及 TGF- β 信号通路 Smad2 和 Smad3 磷酸化, 进一步采用 ALK5-siRNA 和 ALK5 特异性抑制剂阻断细胞 TGF- β I 型受体 ALK5 的活性, 分析下调 TGF- β /Smad2/3 信号传导后的内皮细胞迁移率。结果显示: 随着冷藏时间的延长, FFP 中 TGF- β 1 水平逐渐增加, 其增加率为 244.31 ng/(L·d)($P < 0.05$); 与 FFP(Day 0)相比, FFP (Day 5)诱导内皮细胞 HPMECs 的 TGF- β 信号通路 Smad2/3 磷酸化显著增加($P < 0.05$); 不管是 FFP(Day 0)还是 FFP (Day 5)体外均能诱导内皮细胞迁移, 与 FFP (Day 0)相比, FFP(Day 5)诱导细胞迁移能力显著降低($P < 0.05$); 阻断 TGF- β I 型受体 ALK5 的活性、下调 Smad 3 信号传导可恢复 FFP(Day 5)诱导细胞迁移能力。上述结果表明, FFP 能显著诱导内皮细胞迁移, 4℃ 冷藏增加 FFP 中 TGF- β 1 水平并增加内皮细胞 TGF- β 1 信号传导, 进而降低 FFP 诱导内皮细胞迁移。提示, FFP 复苏疗效的提高可能与增加内皮细胞迁移有关, 冷藏导致内皮细胞迁移降低进而降低 FFP 复苏疗效。

关键词 冷藏, 新鲜冰冻血浆, 内皮细胞, 迁移, TGF- β /ALK5/Smad2/3

学科分类号 R459.9

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00596

出血性休克(hemorrhagic shock, HS)是创伤性死亡的主要原因^[1]。研究显示, 采用新鲜冰冻血浆(fresh frozen plasma, FFP)复苏能大大地降低 HS 病人的死亡率, 提高临床疗效, 因此 FFP 正在取代传统的晶体复苏液而成为首选^[2-6]。已有的研究显示, FFP 对血管内皮细胞具有保护作用^[7-8]。内皮细胞是一层连续覆盖整个血管腔表面的扁平鳞状细胞, 参与了血管舒缩、炎症发生以及血管形成等生理或病理过程调节^[9-10]。HS 或严重损伤的病人往往存在内皮细胞等脉管系统严重受损^[11]。内皮细胞迁移是血管内皮细胞修复损伤的关键环节, 对内皮屏障修复和功能完整具有重要作用^[12]。FFP 复苏疗效的提高是否与其诱导内皮细胞迁移相关, 目前还未见报道。

为了满足对 FFP 日益增长的需求及快速便捷获得 FFP, 各损伤救治中心或血库通常将 FFP 解冻

并 4℃ 左右冷藏, 最长可达 5 天^[13]。FFP 是由大量的生物活性分子组成, 像其他血制品一样, 这些生物活性分子由于其客观保存条件不同, 冷藏往往因蛋白质降解、聚集等原因致使部分生物活性分子的结构和活性发生改变^[14]。有报道, 4℃ 冷藏往往会导致血液制品中细胞因子、炎症脂类因子及生长因子等水平升高并影响其临床疗效^[15]。因此, 采用标准 4℃ 冷藏是否削弱 FFP 的生物学功能还不是很清楚。

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2001CB510207)和国家自然科学基金(30670990, 30871189)资助项目。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0731-84327239, Fax: 0731-84327332, E-mail: duancjxy@126.com

收稿日期: 2010-11-18, 接受日期: 2011-04-06

转化生长因子- β (transform growth factor- β , TGF- β) 是一种多功能生长因子, 在正常血管生长发育中起着重要作用^[16]. TGF- β 家族包含有 TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3. 三种成员均可与细胞膜上 TGF- β 丝氨酸/苏氨酸激酶 II 型受体结合并激活其 I 型受体, 随后进一步激活细胞内效应分子 Smad 蛋白家族, 活化的 Smad 蛋白家族转移到细胞核内调节下游靶基因的转录^[17]. 体外 TGF- β 通常抑制内皮细胞的迁移^[18]. 早期有报道 4℃ 冷藏可导致血小板释放 TGF- β 至血浆中^[19], 然而 FFP 在冷藏过程中 TGF- β 含量是否会发生变化并降低其对内皮细胞有益作用仍然不清楚. 因此本研究以内皮细胞迁移率作为功能研究点, 探讨冷藏后 FFP 诱导内皮细胞迁移是否降低及是否因冷藏导致细胞因子 TGF- β 浓度增加所致.

1 材料和方法

1.1 材料

人肺微血管内皮细胞 HPMECs、内皮细胞培养液 MV2、Trypsin/EDTA 消化液(0.025%/0.01%)、中和液(0.05%, 德国 PromoCell 公司); Lipofectamine™2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司); 抗磷酸化 Smad2 和 Smad3 抗体(美国 Cell Signaling 公司); 抗 TGF- β I 型受体(ALK5)抗体(美国 Santa Cruz 公司); β -actin 抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司); TGF- β I 型受体激酶特异抑制剂 SB431542 (SB, Tocris Bioscience 公司); TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司); 新鲜冰冻血浆(FFP, 墨西哥湾海岸血液中心); 乳酸钠林格液(LR, 美国 Pharmacopeia 公司); 人 ALK5 siRNA 及阴性对照 siRNA(产品号 4611, 美国 Ambion 公司); 24 孔 Transwell 培养板(美国 Corning 公司).

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞培养. 人肺微血管内皮细胞 HPMECs, 置于 10% FBS 和适量生长因子的 MV2 培养基 37℃ 5% CO₂ 中培养, 按照 PromoCell 公司提供的方法消化细胞及传代培养.

1.2.2 siRNA 制备及转染. 参考 Castañares 等^[18]报道序列合成人 ALK5 siRNA, 正义链: 5' CAUAU-UGCUGCAACCAGGAtt 3', 反义链: 5' UCCUGG-UUGCAGCAAUAUGtt 3', 阴性对照 siRNA 由 Ambion (reference 4611) 公司提供. siRNA 成品为已退火的冻干粉, 使用前用稀释缓冲液将其溶解成 20 μ mol/L 的工作母液. 所有 siRNA 均经过变性和

非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 去除未配对单链. Lipofectamine™ 2000 脂质体介导 ALK5 siRNA 及阴性对照 siRNA 转染细胞. 在 5 nmol/L 的 siRNA 中加入 250 μ l 无 RNA 酶水, 得到浓度为 20 μ mol/L 的 siRNA 母液. 转染前 24 h 将细胞接种至 6 孔板. siRNA 用无血清培养基稀释, 待加入细胞后, 终浓度约 80 nmol/L.

1.2.3 RT-PCR 检测转染后 ALK5 mRNA 的表达. 转染不同浓度的 siRNA 48 h 后, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录成 cDNA, 再进行 PCR 循环扩增. ALK5 的引物序列: 上游 5' TGGACTCAGCT-CTGGTTGGTGTCA 3', 下游 5' GCTCGCCGTGG-ACAGAGCAA 3', 扩增片段长度为 110 bp. 内参采用 β -actin, 引物序列: 上游 5' AAATCGTG-CGTGACATCAAA 3', 下游 5' AAGGAAGGCT-GGAAAAGAGC 3', 扩增片段长度为 195 bp. 取 RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, ALK5 加样量均为 10 μ l, 内参的加样量为 3 μ l, 溴化乙锭染色. 电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析.

1.2.4 FFP 冷藏保存及细胞处理. 枸橼酸抗凝后 FFP 置 -80℃ 保存, 使用时 37℃ 水浴融化, 若当天使用的 FFP 称为 FFP (Day 0), 解冻融化后 4℃ 放置 5 天 FFP 称为 FFP (Day 5). 内皮细胞接种原代培养的内皮细胞 HPMECs, 细胞于 35 mm 培养皿 (1.6 $\times$ 10⁶/培养皿) 或 6 孔培养板 (2.5 $\times$ 10⁵/培养板) 中, 过夜后加入 0.1% FBS 培养基继续培养 4 h, 随后用不同浓度的 FFP 处理 30 min, 收集细胞提取总蛋白, Western blot 分析蛋白质磷酸化水平, 或 16 h 分析细胞迁移率. 无血清培养基为空白对照.

1.2.5 细胞迁移实验.

Transwell 实验: Transwell insert 8 μ m 孔径过滤膜将 24 孔培养板每个孔分隔为上下两室. 培养前, 先用 0.1% 明胶包被培养板过滤膜. 上室接种细胞浓度为 3 $\times$ 10⁴ 个/孔, 下室中加入含不同浓度 FFP (Day 0)、FFP (Day 5) 及 10% LR 的培养基或加入 TGF- β I 受体抑制剂 SB431542 预处理 30 min 后再加入 FFP, 16 h 后, 细胞经 transwell 底部滤膜的孔隙迁移至膜的另一面, 用棉签轻轻擦拭掉膜上表面的未迁移细胞, 70% 乙醇固定过滤膜 10 min, 细胞核染料碘化丙啶 (30 mg/L) 染色 30 min, 倒置荧光显微镜观察迁移细胞, 并通过荧光显微图像采集和分析系统随机拍摄和记录 5 个视野, 计算迁移细

胞, 然后依据迁移的细胞数评估 FFP 对内皮细胞迁移的诱导能力。

细胞划痕实验: 浓度为 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 待细胞长满无缝隙后, 用 200 μ l 吸管尖端划“十”或“井”痕线, PBS 漂洗, 去掉漂浮的细胞, 然后加入含 10% FFPs 或 LR 的培养基继续培养 24 h. 倒置显微镜观察细胞划痕生长, 并通过显微图像采集和分析系统随机拍摄和记录 5 个视野. 用 Kodak 1D 软件的图像分析系统(version 3.6)测量划痕区域面积. 细胞生长率即愈合率(the percentage of recovery) $R\% = [1 - (\text{划痕区域 } T_1 / \text{划痕区域 } T_0)] \times 100\%$, T_1 代表实验后愈合时间的面积和 T_0 代表划痕后立即拍摄的面积^[18]. 依据愈合率确定 FFP 对内皮细胞迁移力影响。

1.2.6 Western blot 检测蛋白质磷酸化水平. 将每个 35 mm 平皿浓度为 1.6×10^6 个内皮细胞接种于培养皿中, 不同条件处理后, 加入预冷 PBS 漂洗的内皮细胞, 随后加入细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 25 mg/L Aprotinin, 25 mg/L Leupeptin)冰上裂解 30 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清, BAC 法进行蛋白质定量^[20]. 取 30 μ g 总蛋白 4%~12% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离, 电转至 PVDF 上. 3% BSA 室温封闭 2 h, 加入第一抗体 4℃ 孵育过夜, 然后 TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的第二抗体室温孵育 1 h, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min. ECL 试剂发光、显影和定影. 以 β -actin 为内参照, 实验重

复 3 次. Kodak 1D 软件的图像分析系统(version 3.6)测量蛋白质显带颜色深浅和面积并计算分子表达丰度。

1.2.7 TGF- β 信号的阻断. 二甲基亚砜配制 TGF- β I 型受体激酶特异抑制剂 SB431542, 参考文献[18]对内皮细胞 HPMECs 预处理 45 min, 阻断 TGF- β 信号通路, 随后加入 FFP 处理 30 min 进一步做 Western blot 分析, 或 16 h 做细胞迁移率分析。

1.2.8 FFP 中 TGF- β 浓度测定. 采用商业化的酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒测量分析 9 名不同献血者 FFP 的 TGF- β 1、TGF- β 2 及 TGF- β 3 蛋白质水平, 方法参考 ELISA 试剂盒说明书. 所有样品重复 3 次。

1.2.9 统计分析. 所有实验重复 3 次, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SPSS 11.0 统计软件 t 检验或析因设计方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 冷藏将增加 FFP 中 TGF- β 1 浓度

为了探讨冷藏是否导致 FFP 中 TGF- β 水平升高, 采用 ELISA 法检测了当天解冻及解冻后 4℃ 放置 1~5 天 FFP 中 TGF- β 水平, 结果为当天 FFP 中含有一定量 TGF- β 1(5 366.81 ng/L), 但随着冷藏时间的增加 FFP 中 TGF- β 1 水平逐渐增加, 其增加率为 244.31 ng/(L·d)(图 1a)($P < 0.05$)相反, FFP 中的 TGF- β 2 及 TGF- β 3 水平在冷藏过程中没有发生显著性改变($P > 0.05$, 图 1b 和图 1c)。

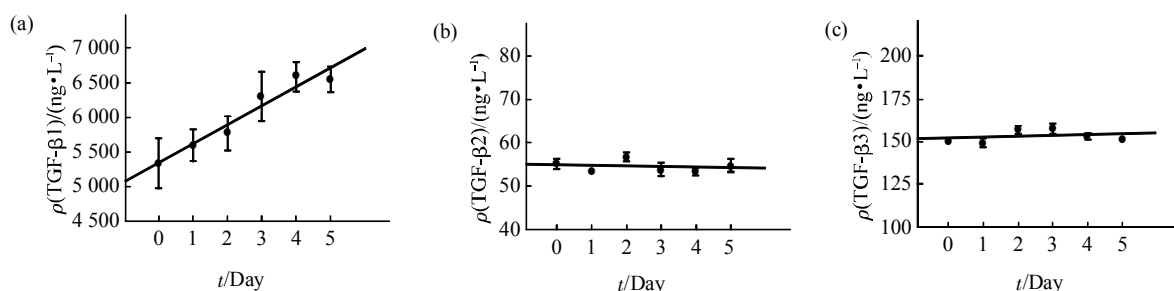


Fig. 1 TGF- β 1 protein level in FFP increases during storage

TGF- β 1 (a), TGF- β 2 (b) and TGF- β 3 (c) protein levels in FFP stored at 4℃ up to 5 days were measured by Quantikine ELISA kits. The data were presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$ pooled FFPs). TGF- β 1 increases at a rate of 244.31 ng/(L·d) ($P=0.002$). There are no statistical evidence that TGF- β 2 ($P=0.7$) and TGF- β 3 ($P=0.65$) changes with day.

2.2 冷藏增强 FFP 诱导 TGF- β /Smad2/3 信号通路传导

为了探讨 FFP 是否激活 TGF- β /Smad2/3 信号

转导, 不同剂量的 FFP 处理内皮细胞, 抗磷酸化抗体免疫印迹分析细胞 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平, 结果发现, 与对照组单独培养基相比, FFP 显

著增强细胞 Smad2 和 Smad3 磷酸化(图 2a)且呈剂量递增趋势, 然而, 相对于 FFP(Day 0), FFP(Day 5)诱导细胞 Smad2 和 Smad3 磷酸化水平更强(图 2a, b) ($P < 0.05$). 传统复苏液 LR 却未能诱导细胞 Smad2

和 Smad3 磷酸化, 类似单独培养基. 表明冷藏将导致 FFP 诱导细胞 Smad2 和 Smad3 磷酸化增强 TGF- β 信号传导.

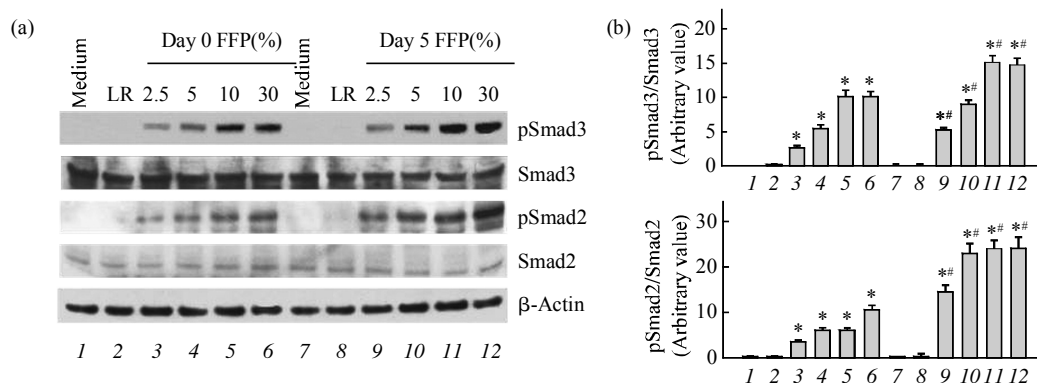


Fig. 2 Activation of TGF- β /Smad2/3 signaling by FFPs is dose-dependent and is enhanced during FFP storage

The ECs were serum-starved with medium containing 0.1% serum for 4 h and then treated with FFPs at the concentration of 2.5%, 5%, 10%, and 30%, or 30% LR for 30 min. Medium alone was a baseline control. Whole cell lysates were prepared and subjected to Western blotting. (a) Representative Western blots. (b) Representative Western blots from 3 independent experiments were shown and relative quantifications were expressed as $\bar{x} \pm s$ of 3 independent experiments. * $P < 0.05$ compared to medium. # $P < 0.05$ compared to the matching concentration of Day 0 FFP.

2.3 冷藏降低 FFP 诱导内皮细胞迁移

内皮细胞迁移对创伤和 / 或出血性休克的血管修复起重要作用. 为此, 首先采用标准的滤孔迁移实验检测 FFP 对内皮细胞迁移的影响. 与对照组

单独培养基或 LR 组相比, FFP(Day 0)和 FFP(Day 5)均能显著诱导内皮细胞迁移且诱导内皮细胞迁移呈剂量依赖性增加(图 3a, b), 与 FFP(Day 0)相比, FFP(Day 5)诱导内皮细胞迁移能力明显降

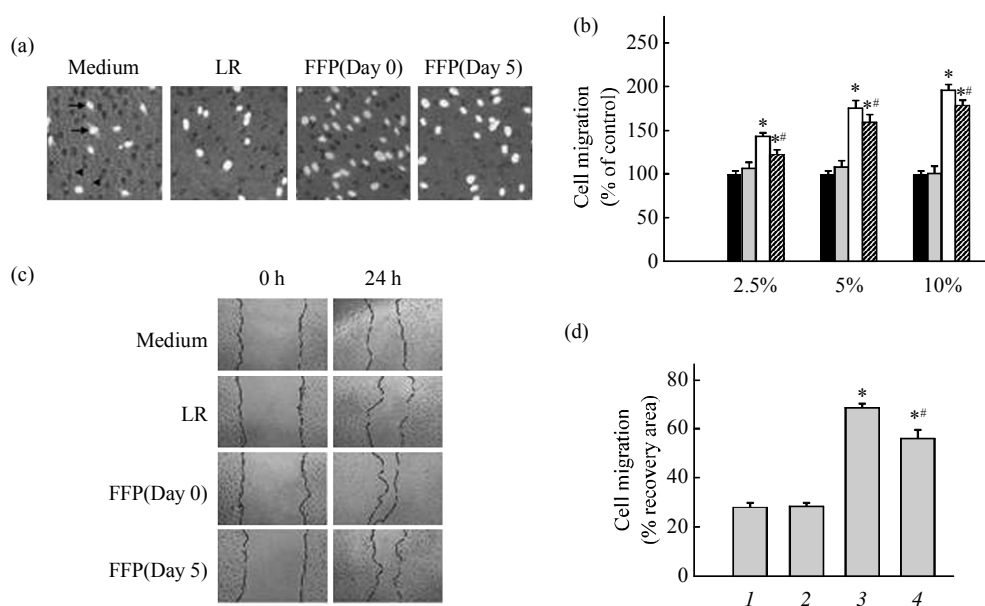


Fig. 3 FFP (Day 0) promotes EC migration which diminishes during storage

The ECs were seeded in transwell inserts (a) or 12-well plates (c) and cultured with various concentrations of FFPs or LR for 16 h. Cell culture medium was a baseline control. EC migration was measured by transwell assay. (a) Representative pictures showing transwell migration of cells treated with or without 10% FFP or LR. "→" points to the migrating white color cells. "◀" points to the dark pores of the filter. (b) Number of migrating cells was expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$ compared to LR. # $P < 0.05$ compared between Day 0 and Day 5 FFP. ■: Medium; □: LR; ◻: FFP(Day 0); ▨: FFP(Day 5). (c) Representative pictures of scratching assay showing migration of the cells treated with or without 10% FFP or LR. (d) Quantification of cell migration was expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$ compared to LR. # $P < 0.05$ compared between Day 0 and Day 5 FFP. 1: Medium; 2: LR; 3: FFP(Day 0); 4: FFP(Day 5).

低($P < 0.05$). 单独培养基和 LR 组之间没有显著差异. 单层细胞划痕实验结果显示, 与对照组或 LR 组相比, FFP(Day 0)和 FFP(Day 5)均显著诱导单层内皮细胞迁移, 与 FFP(Day 0)相比, FFP(Day 5)诱导细胞迁移能力明显降低(图 3c, d, $P < 0.05$). 表明 FFP 能诱导内皮细胞迁移, 其诱导迁移能力经 5 天 4℃ 冷藏后将显著降低.

2.4 抑制 TGF- β /Smad3 信号转导增加 FFP 诱导内皮细胞迁移

为了探讨 FFP(Day 5) TGF- β 1 水平的升高导致其诱导内皮细胞迁移力降低, 首先采用 TGF- β 受体 I ALK5 特异的抑制剂 SB431542 阻断 TGF- β /ALK5 信号通路. 如图 4a 和 4b 所示, 与溶剂对照组相比, SB431542 预处理显著提高 FFP(Day 0)和

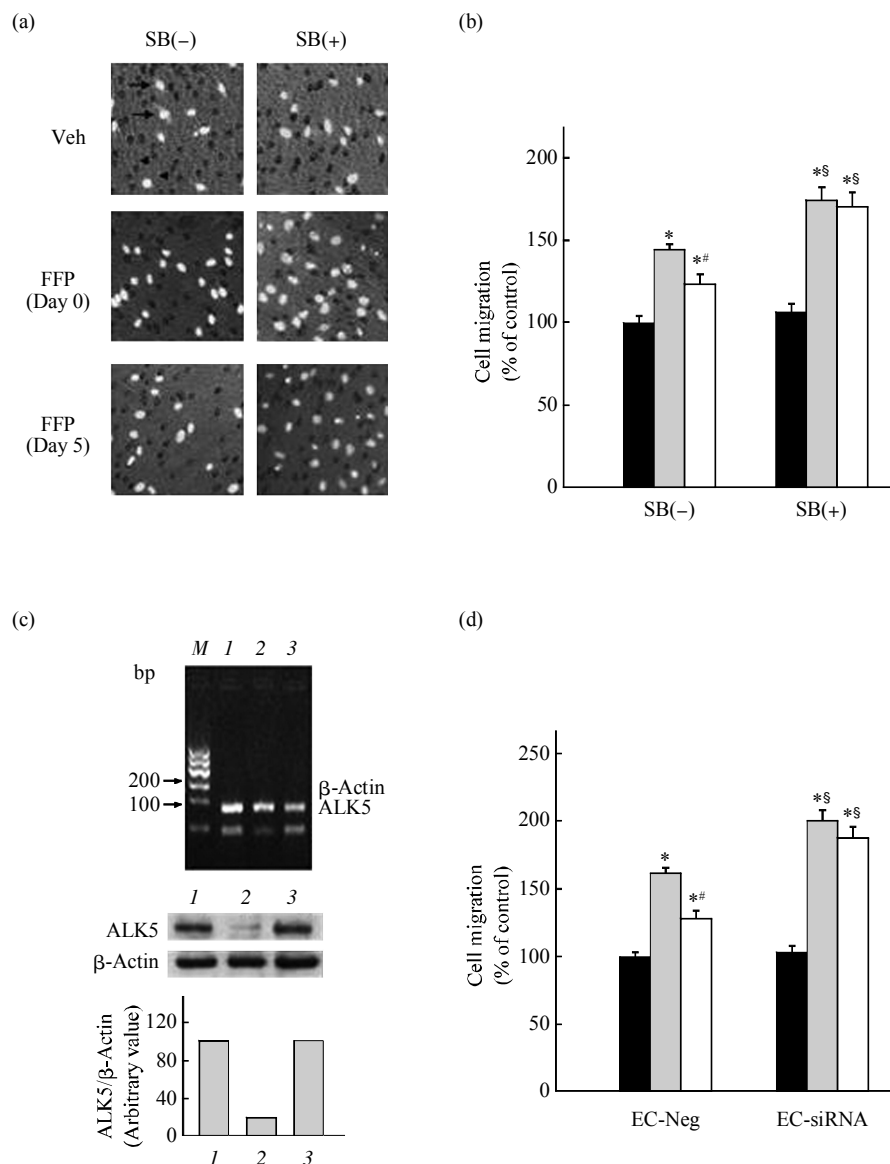


Fig. 4 Blocking ALK5 restores EC migration capacity of Day 5 FFP comparable to that of Day 0 FFP

Transwell assay was used to measure EC cells migration and the cells were seeded in transwell inserts. (a) Treated with SB431542 (SB, 3 μ mol/L) for 45 min followed by treatment with 2.5% of FFPs. Equal volume of DMSO was the vehicle control. Representative pictures showing migrating cells in transwell. "→" points to the migrating "white color" cells. "◄" points to the dark pores of the filter. (b) Number of migrating cells was expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$ compared to vehicle (DMSO). # $P < 0.05$ compared between Day 0 FFP and Day 5 FFP. \$ $P < 0.05$ compared between vehicle and SB. ■: Medium; □: FFP(Day 0); □: FFP(Day 5). (c) The total RNA of the cell line EC-Negative or EC-ALK5 siRNA was isolated and performed to RT-PCR for ALK5 mRNA level assay and Whole cell lysates were prepared and subjected to Western blotting. The expression of ALK5 mRNA (Top) and protein (Middle & Bottom). M: Marker; 1: EC; 2: EC-siRNA; 3: EC-Neg. (d) The EC-Negative or EC-siRNA cells were treated with 2.5% of FFPs. Number of migrating cells was expressed as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$ compared to Medium. # $P < 0.05$ compared between Day 0 FFP and Day 5 FFP. \$ $P < 0.05$ compared between EC-Negative and EC-siRNA. ■: Medium; □: FFP(Day 0); □: FFP(Day 5).

FFP(Day5)诱导内皮细胞迁移, 与单独培养基加入溶剂对照组相比, SB431542 预处理后, 提高 FFP (Day 0)诱导细胞的迁移率达 30%, 同时恢复 FFP (Day5)诱导细胞迁移率至 FFP(Day 0)水平, 但单独培养基组与单独培养基加溶剂组间无显著性差异. 进一步采用 ALK5 siRNA 下调内皮细胞中 TGF- β I 型受体(ALK5)的表达(图 4c), 结果显示, 与阴性对照 siRNA 转染内皮细胞(EC-Negative, EC-Neg)相比, FFP 诱导 EC- ALK5 siRNA 细胞迁移显著提高(图 4d, $P < 0.05$).

为了确定 SB431542 预处理或转染 ALK5 siRNA 是否阻断 TGF- β 信号传导, 我们检测细胞 Smad3 磷酸化水平, 如图 5 所示, SB431542 预处理后, FFP 诱导内皮细胞的 Smad3 磷酸化呈剂量依赖性下调, 而单独 SB431542 对细胞 Smad3 磷酸化无影响, 与溶剂对照组相比无显著差异($P < 0.05$), 同理检测转染 ALK5 siRNA 内皮细胞(EC-siRNA) Smad3 磷酸化水平, 结果显示, 与阴性对照 siRNA 转染内皮细胞(EC-Negative, EC-Neg)相比, Smad3 磷酸化显著下调, 表明 FFP 中 TGF- β 1 具有抑制内皮细胞的迁移作用, 内皮细胞迁移力的降低可能由 ALK5/Smad3 信号介导, FFP(Day5)诱导内皮细胞迁移力的降低与冷藏导致 TGF- β 1 水平增加有关.

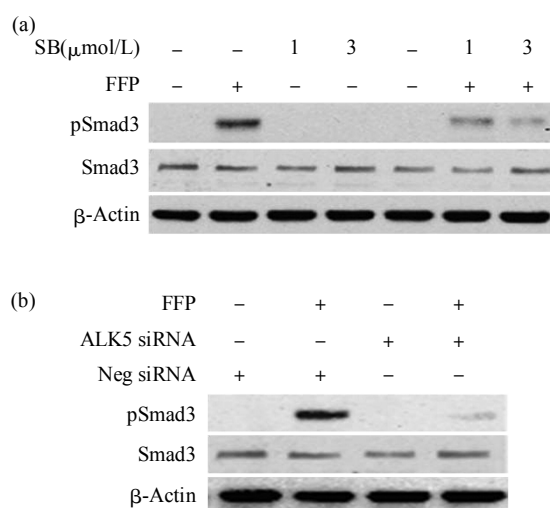


Fig. 5 Inhibition of ALK5 attenuates the activation of Smad3 by FFP

The ECs were serum-starved with medium containing 0.1% serum for 4 h. (a) Treated with various concentrations of ALK5 inhibitor SB431542 (1 μ mol/L or 3 μ mol/L) for 45 min followed by treatment with 10%FFP for 30 min. (b) The cell line EC-Neg or EC-ALK5 siRNA treatment with 10% FFP for 30 min. The whole cell lysates were prepared and subjected to Western blotting.

3 讨 论

FFP 正在取代传统的晶体液而成为早期和需要大量输液休克病人复苏液. 为了满足这种日益增长的需求, 血库中解冻的血浆常常被运往各创伤救治中心. 虽然与 FFP 相关的风险都有清晰的记录(包括传染性、免疫性等风险), 然而 FFP 作用机制以及冷藏是否降低 FFP 疗效仍然不清楚. 本研究结果显示, FFP 中含有大量的细胞因子 TGF- β , 随着冷藏时间的延长 TGF- β 含量逐渐增加, 与之一致的是, 与 FFP(Day 0)相比, 冷藏 5 天血浆即 FFP(Day 5)诱导 Smad2 和 Smad3 磷酸化显著增强, 尽管 FFP(Day 0)和 FFP(Day 5)均能诱导内皮细胞迁移, 但冷藏后 FFP 诱导细胞迁移能力显著降低, 阻断 TGF- β 1/ALK5/ Smad3 信号转导将增强 FFP 诱导内皮细胞迁移和恢复 FFP(Day 5)诱导内皮细胞迁移力. 因此, 表明标准冷藏将增加 FFP 中的细胞因子 TGF- β 1 含量并导致其诱导内皮细胞迁移能力降低.

为了研究冷藏导致 FFP 诱导内皮细胞迁移力降低, 本研究重点关注与内皮细胞迁移调节相关的关键因子 TGF- β , 结果表明冷藏将导致细胞因子 TGF- β 1 水平增加并增强胞内 Smad2 及 Smad3 的磷酸化, 进而降低 FFP 诱导内皮细胞迁移. 研究报道, 血小板在冷藏过程中有 10%~15%被活化并导致其 α 颗粒(α -granule)释放大量转化生长因子^[9], 因此我们推测血库标准程序制备 FFP 解冻后经过 1~5 天 4℃ 冷藏, 其 TGF- β 1 浓度显著增加, 增加的 TGF- β 1 可能来源于活化的 α 颗粒(α -granule), 但是否还可能来源于 FFP 中其他残余的血细胞, 有待进一步研究.

在内皮细胞中 TGF- β 活化 ALK5/Smad2/3 信号通路导致内皮细胞迁移受抑制^[16, 18]. 本研究发现, FFP(Day 0)能诱导 Smad2/3 磷酸化活化, 但与 FFP(Day 0)相比, FFP(Day 5)诱导 Smad2/3 磷酸化水平显著增加, ALK5 特异性抑制剂 SB431542 或转染 ALK5 siRNA 下调 ALK5 活性却能显著性抑制 ALK5/Smad3 信号传导, 与之一致的是, FFP(Day 0)能够功能性诱导内皮细胞迁移, FFP(Day 5)诱导内皮细胞迁移却显著降低, 阻断 ALK5/Smad2/3 信号传导不仅能增强 FFP(Day 0)诱导内皮细胞迁移而且还能恢复 FFP(Day 5)诱导细胞迁移水平. 因此, 提示 FFP 中含有大量的具有抑制内皮细胞迁移的 TGF- β 1, 冷藏可导致 TGF- β 1 大量释放并增强其

信号转导,降低 FFP 诱导内皮细胞迁移。

综上所述,本研究证实 FFP 能够促进内皮细胞迁移,冷藏将降低其功效,其部分缘由可能与冷藏增加 FFP 中 TGF- β 1 含量有关。以往研究显示 FFP 具有修补和恢复血管正常结构和功能,因此冷藏导致 FFP 中 TGF- β 1 含量增加并降低内皮细胞迁移可能是冷藏后 FFP 疗效降低的一种新机制。

参 考 文 献

- [1] Angele M K, Schneider C P, Chaudry I H. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock. *Crit Care*, 2008, **12**(4): 218
- [2] Holcomb J B, Wade C E, Michalek J E, *et al.* Increased plasma and platelet to red blood cell ratios improves outcome in 466 massively transfused civilian trauma patients. *Ann Surg*, 2008, **248** (3): 447-458
- [3] Gunter O L Jr, Au B K, Lsball J M, *et al.* Optimizing outcomes in damage control resuscitation: identifying blood product ratios associated with improved survival. *J Trauma*, 2008, **65**(3): 527-534
- [4] Gonzalez E A, Moore F A, Holcomb J G, *et al.* Fresh frozen plasma should be given earlier to patients requiring massive transfusion. *J Trauma*, 2007, **62**(1): 112-119
- [5] Kashuk J L, Moore E E, Johnson J L, *et al.* Postinjury life threatening coagulopathy: is 1:1 fresh frozen plasma:packed red blood cells the answer?. *J Trauma*, 2008, **65** (2): 261-270; discussion 270-271
- [6] Spinella P C, Perkins J G, Grathwohl K W, *et al.* Effect of plasma and red blood cell transfusions on survival in patients with combat related traumatic injuries. *J Trauma*, 2008, **64**(2 Suppl): S69-S77; discussion S77-S78
- [7] Pati S, Matijer N, Doursout M, *et al.* Protective effects of fresh frozen plasma on vascular endothelial permeability, coagulation, and resuscitation after hemorrhagic shock are time dependent and diminish between days 0 and 5 after thaw. *J Trauma*, 2010, **69**(Suppl 1): S55-S63
- [8] Letourneau P A, Pati S, Gerber M H, *et al.* Fresh frozen plasma increases adhesion molecule expression on human pulmonary endothelial cells. *J Surg Res*, 2010, **163**(2): 317-322
- [9] Aird W C. Proximate and evolutionary causation of endothelial heterogeneity. *Semin Thromb Hemost*, 2010, **36**(3): 276-285
- [10] Aird W C, Kwaan H C. Under-recognized significance of endothelial heterogeneity: hemostasis, thrombosis, and beyond. *Semin Thromb Hemost*, 2010, **36**(3): 225-226
- [11] Mochhala S, Wu J, Lu J. Hemorrhagic shock: an overview of animal models. *Front Biosci*, 2009, **14**: 4631-4639
- [12] Aird W C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I . Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*, 2007, **100**(2): 158-173
- [13] Murthi S B, Stansbury L G, Hess J R. Blood and coagulation support in trauma. *Blood Rev*, 2009, **23**(4): 149-155
- [14] Anderson N L, Polanski M, Pieper R, *et al.* The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics*, 2004, **3**(4): 311-326
- [15] Carpenter J M, Manning M C, Randolph T W. Long Term Storage of Proteins. New York: Wiley, 2002: 98-118
- [16] Goumans M J, Valdimarsdottir G, Itob S, *et al.* Balancing the activation state of the endothelium *via* two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*, 2002, **21**(7): 1743-1753
- [17] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003, **425**(6958): 577-584
- [18] Castaneres C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marc N, *et al.* Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J Cell Sci*, 2007, **120**(Pt 7): 1256-1266
- [19] Kanter J, Khan S Y, Kelher M, *et al.* Oncogenic and angiogenic growth factors accumulate during routine storage of apheresis platelet concentrates. *Clin Cancer Res*, 2008, **14**(12): 3942-3947
- [20] Duan C, Li M, Rui L. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. *J Biol Chem*, 2004, **279**(42): 43684-43691

Effect of Fresh Frozen Plasma on Endothelial Cell Migration Diminishes During Storage and Its Molecular Mechanisms*

ZHANG Chun-Fang^{1)**}, TAN Tan^{1,3)**}, LI Jian-Guo¹⁾, MA Hong-Ying¹⁾, CHEN Zhu-Chu¹⁾, DUAN Chao-Jun^{1,2)***}

¹⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410008, China;

²⁾ Medical Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

³⁾ Department of Clinical Laboratory, The First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 432000, China)

Abstract To determine whether TGF- β s and the effect on endothelial cell migration were altered during fresh frozen plasma (FFP) refrigeration, ELISA assay was carried out to quantify TGF- β s protein levels in FFP stored at 4 °C for up to 5 days. Human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) were treated with various concentrations of Day 0 and Day 5 FFPs or 10% Lactated Ringer's (LR) and were subjected to migration assay or Western blot analysis. ALK5 siRNA or ALK5 inhibitor were used to block FFP-induced Smad3 signaling in EC cells. It was found that TGF- β 1 protein levels increased in a time-dependent fashion at a rate of 244.31 ng/(L·d) ($P < 0.05$) and greater activation of its downstream mediators Smad2/3 during storage of FFP ($P < 0.05$). Both Day 0 FFP and Day 5 FFP stimulated EC migration *in vitro*; however, the effect of Day 5 FFP was significantly reduced. Inhibition of TGF- β type I receptor blocked FFP-induced Smad3 signaling in EC cells and restored the effectiveness of Day 5 FFP on EC migration to a comparable level as Day 0 FFP. These data suggest that the increased TGF- β levels during FFP storage contributes to the deterioration of stored FFP's effects on EC migration. A novel molecular mechanism contributing to the reduced efficacy of stored FFP was identified.

Key words storage, fresh frozen plasma, migration, TGF- β /ALK5/Smad2/3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00596

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2001CB5102) and The National Natural Science Foundation of China (30670990, 30871189).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-731-84327239, Fax: 86-731-84327332, E-mail: duancjxy@126.com

Received: November 18, 2010 Accepted: April 6, 2011