

# 保存期间血小板中外泌体浓度变化及其对凝血功能的影响

龚 丽<sup>1,2,3</sup>,米紫玥<sup>2,3\*</sup>,孔玉洁<sup>2,3</sup>,徐海霞<sup>2,3</sup>,田 力<sup>2,3</sup>,刘 忠<sup>1,2,3</sup>

**摘要** 目的 探讨不同保存时间手工血小板中外泌体浓度变化及其对凝血功能的影响。方法 等体积分装血小板, (22±2)℃保存0、3、5 d(D 0、D 3、D 5)后,超速离心法提取血小板外泌体;采用Western blot、透射电子显微镜、纳米流式分析仪对所提外泌体进行表征鉴定。使用纳米流式分析仪检测其颗粒浓度。取不同保存时间血小板外泌体至人新鲜血浆中,全自动凝血分析仪检测血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)。通过Western blot实验进行凝血因子VII含量测定。取不同保存时间血小板外泌体至人新鲜全血中,血栓弹力图仪检测外泌体对全凝血指标的影响。**结果** 鉴定结果显示外泌体免疫标志物TSG 101、CD 9特异性表达;所提外泌体呈现双层膜、类杯状结构;其粒径多为60~80 nm之间。D 0、D 3、D 5外泌体浓度分别为(13.86±7.93)×10<sup>12</sup>、(23.69±12.80)×10<sup>12</sup>、(45.81±25.87)×10<sup>12</sup>个/L。与D 0相比,D 3、D 5外泌体浓度显著增加(P<0.01),分别为1.8倍、4.0倍。与对照组相比,D 0与D 5外泌体分别可使PT减小[(0.16±0.15) s, P<0.01]、[(0.36±0.18) s, P<0.001];D 0与D 5外泌体分别可使APTT减小[(1.11±1.21) s, P<0.05]、[(2.10±1.14) s, P<0.001]。凝血因子VII定量实验结果显示其在D 0、D 5外泌体中含量差异有统计学意义(P<0.05)。血栓弹力图实验结果显示对照组、D 0、D 5外泌体作用于全血后其凝血时间R值分别为(5.46±0.90) min、(5.00±0.67) min、(4.38±1.00) min, D 5组与对照组、D 0组差异有统计学意义(P<0.05),提示外泌体具有一定的促凝作用。**结论** 随着保存时间延长,手工血小板中外泌体浓度显著增加且外泌体的促凝作用显著增强,血小板保存期间产生的外泌体

可能通过凝血因子VII参与促凝过程。

**关键词** 血小板;外泌体;凝血;凝血因子VII**中图分类号** R 331.1+43**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1283-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.020

血小板在保存期间可发生储存损伤(platelet storage lesion, PSL)<sup>[1]</sup>,分泌细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)。EVs数量随血小板保存时间延长而增加<sup>[2]</sup>。EVs已被证明具有促凝和促炎活性<sup>[3]</sup>,参与类风湿性关节炎和动脉粥样硬化等血栓并发症<sup>[4]</sup>。血小板EVs主要包括两类:外泌体、微囊泡<sup>[5]</sup>。外泌体、微囊泡均为双层膜结构,粒径大小分别为30~150 nm, 100~1 000 nm<sup>[6]</sup>。外泌体携带有丰富的蛋白质等生物活性物质<sup>[7]</sup>。近年来,研究者们关注于外泌体在各种生理病理状态下生物活性物质的变化及可能的影响机制,而对于随着血小板保存时间延长,外泌体浓度变化及其对凝血功能的影响的研究较少,血小板保存期间产生的外泌体是否参与EVs的促凝作用有待研究。因此,该研究着重探讨手工血小板中外泌体浓度与保存时间的关系,并在此基础上探究其对凝血功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 手工血小板,来自四川省德阳市中心血站。

**1.2 仪器与试剂** 超速离心机(Beckman Coulter, 美国贝克曼库尔特公司);纳米流式分析仪(福流,成都智予医学检验有限公司);透射电子显微镜(FEI Tecnai™ G 2 Spirit, 捷克FEI公司);化学发光凝胶成像系统(CLINX ChemiScope 3000 mini, 上海勤翔科学仪器有限公司);全自动凝血分析仪(Sysmex CS-2000 i, 成都协和生物技术有限责任公司);血栓弹力图仪(CFMS LEPU-8800, 北京乐普医疗科技有限责任公司);化学发光成像分析仪(ImageQuant™ LAS 4000, 美国通用电气医疗公司);单克隆兔抗人CD 9抗体、多克隆鼠抗人TSG 101抗体、钙联蛋白Calnexin抗体、羊抗兔IgG抗体、羊抗鼠IgG抗体(Abcam, 英国);PT检测试剂盒、APTT检测试剂

2022-04-20 接收

基金项目:中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号:2018PT32016);四川省国际科技创新合作/港澳台科技创新合作项目(编号:2020YFH0024)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学公共卫生学院,合肥 230032<sup>2</sup>中国医学科学院/北京协和医学院输血研究所,成都 610052<sup>3</sup>中国医学科学院输血不良反应研究重点实验室,成都 610052

作者简介:龚 丽,女,硕士;

田 力,男,医学博士,责任作者,E-mail:241775291@qq.com;

刘 忠,男,医学博士,责任作者,E-mail:liuz@ibt.pumc.edu.cn

\*对本文具有同等贡献

盒(Simens,德国);血栓弹力图检测试剂盒(乐普,北京);多克隆兔抗人F7抗体、单克隆鼠抗人 $\beta$ -actin抗体(美国Proteintech公司);5%BSA封闭液(Solarbio,北京)。

### 1.3 方法

**1.3.1 样本采集** 先后分别取10人份、5人份手工血小板(每人份约50 ml),分别置于血小板常温 $[(22\pm 2)^\circ\text{C}]$ 震荡保存箱中保存0(采集当天)、3、5 d(D0、D3、D5)后在无菌条件下从血小板样本中取15 ml。血小板样本以5 480 r/min离心10 min,去除大部分血小板。取上清液至离心管中, $-80^\circ\text{C}$ 保存。

**1.3.2 外泌体提取** 血小板上清液 $4^\circ\text{C}$ 解冻后经1 380 r/min离心10 min,再经3 580 r/min离心10 min后吸取上清液,7 750 r/min离心30 min,去除大细胞碎片及微囊泡。吸取上清液至超速离心管中,使用 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜进行过滤以去除小细胞碎片及微囊泡。使用超速离心机 $4^\circ\text{C}$ 下40 000 r/min离心1 h 30 min,保留沉淀,再加入一定量无菌磷酸盐缓冲液(PBS), $4^\circ\text{C}$ 下40 000 r/min离心1 h 30 min进行洗涤<sup>[8]</sup>。用200  $\mu\text{l}$ 无菌PBS重悬沉淀, $-80^\circ\text{C}$ 冻存。

### 1.3.3 外泌体的鉴定

**1.3.3.1 Western blot 外泌体免疫标志物的鉴定** 经RIPA裂解后,吸取外泌体蛋白质溶液于EP管中,加入上样缓冲液(Load buffer), $98^\circ\text{C}$  5 min金属浴进行蛋白变性, $4^\circ\text{C}$ 下12 000 r/min离心5 min。以10% SDS-PAGE电泳分离蛋白,使用湿式转膜装置进行蛋白质转膜;采用5%脱脂奶粉TBST封闭液对PVDF膜室温下封闭1 h;于封闭液稀释的一抗TSG 101(1:1 000)、CD 9(1:1 000)以及阴性对照蛋白标志物Calnexin(1:1 000)中 $4^\circ\text{C}$ 孵育过夜;1  $\times$  TBST充分洗膜后,于封闭液稀释的相应二抗(1:5 000)中室温孵育1 h,1  $\times$  TBST充分洗膜。加入化学发光工作液反应5 min,采用CLINX化学发光凝胶成像系统进行曝光、显影。同时以Hela细胞裂解液作为对照样品。

**1.3.3.2 透射电镜鉴定外泌体形态** 吸取外泌体样本10  $\mu\text{l}$ 滴加于铜网上沉淀1 min,滤纸吸去残液。吸取10  $\mu\text{l}$ 磷钨酸滴加于铜网上沉淀1 min,滤纸吸去残液。常温下干燥几分钟。于100 KV下进行电镜检测成像。

**1.3.3.3 外泌体粒径大小的鉴定** 吸取外泌体悬液于EP管中,按一定比例加入PBS进行稀释后,充

分混匀。按照纳米流式仪器操作说明设置检测参数,进行测量分析。

### 1.3.4 不同保存时间血小板中外泌体对凝血功能的影响

**1.3.4.1 外泌体对血浆凝血功能的影响** 取10 ml全血于枸橼酸盐抗凝管中(全血与枸橼酸盐的比例为9:1),室温下静置5 min,水平离心机中4 000 r/min离心15 min,取180  $\mu\text{l}$ 离心后上层血浆于若干EP管中,分别向其中加入20  $\mu\text{l}$  D0、D5血小板外泌体样本。同时,向180  $\mu\text{l}$ 新鲜血浆中加入20  $\mu\text{l}$ 无菌PBS作为对照组。室温下孵育30 min后使用全自动凝血仪检测加入外泌体、PBS后血浆的血浆凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)指标,以秒(s)为单位。共采集5份不同健康人新鲜全血,以避免个体差异影响。其中每2份外泌体样本使用同一份血浆。

**1.3.4.2 外泌体中凝血因子VII定量检测** 使用含有1% PMSF蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液分别对50  $\mu\text{l}$  D0、D5外泌体进行蛋白裂解,加入Loading buffer, $98^\circ\text{C}$ 金属浴5 min, $4^\circ\text{C}$ 下12 000 r/min离心5 min。以10% SDS-PAGE电泳分离蛋白,湿式转膜装置进行蛋白质转膜;按照蛋白Marker条带说明书将PVDF膜剪开;使用5% BSA封闭液对PVDF膜室温下封闭1 h;于封闭液稀释的一抗F7(1:1 000)、 $\beta$ -actin(1:10 000)中 $4^\circ\text{C}$ 孵育过夜;1  $\times$  TBST充分洗膜后,于封闭液稀释的相应二抗(1:10 000)中室温孵育1 h,经1  $\times$  TBST充分洗膜后加入化学发光工作液反应5 min,采用ImageQuant化学发光成像分析仪进行显影。使用ImageJ软件对其进行半定量分析。

**1.3.4.3 外泌体对全血凝血功能的影响** 静脉采集五份不同健康人新鲜全血至枸橼酸钠的抗凝管中,颠倒混匀。取50  $\mu\text{l}$  PBS及D0、D5外泌体样本分别加至1 ml新鲜全血中,室温下孵育1 h。在血栓弹力图仪的通道上装载普通杯,取上述含有外泌体、PBS的全血1 ml至试剂1瓶中,颠倒使之充分混匀,室温下静置4 min以激活血液,取340  $\mu\text{l}$ 试剂1瓶中血液至盛有20  $\mu\text{l}$ 试剂2的普通杯中。按照操作说明书使用血栓弹力图仪进行各样本的凝血时间(blood clotting time, R)、凝血速率(clotting rate,  $\alpha$ 角)、血块形成时间(clot formation time, K)、血块强度(clot intensity, MA)、凝血综合指数(blood clotting index, CI)等指标的检测。

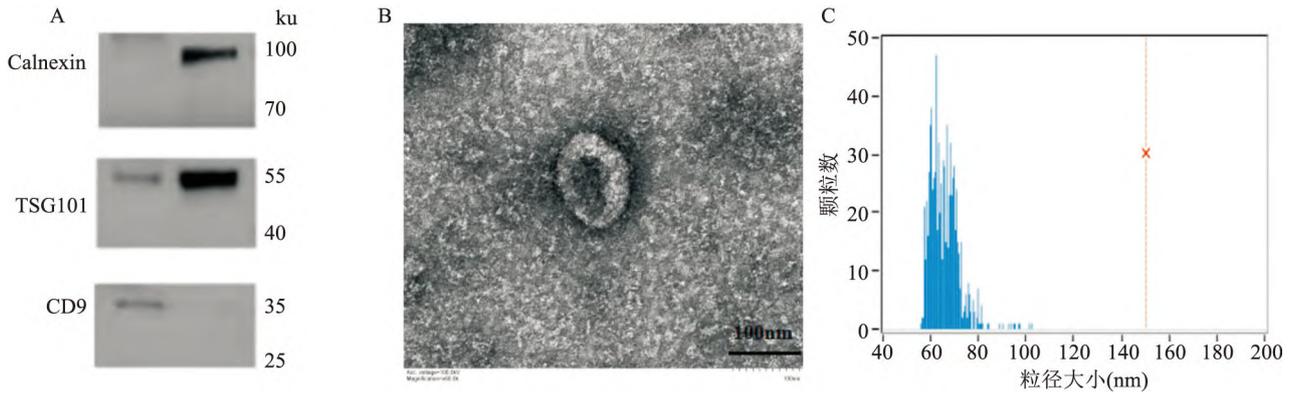


图1 血小板外泌体鉴定 ×10 000

A: Western blot 法检测 TSG 101、CD 9 在外泌体上表达;B:透射电镜技术检测外泌体形状;C:纳米流式技术检测外泌体粒径大小分布

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行方差齐性检验、正态性检验,组间比较采用重复测量设计的方差分析、配对 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 血小板外泌体的鉴定** 血小板中外泌体经 Western blot 法鉴定显示,特异性免疫学标志物 TSG 101 和 CD 9 在外泌体中出现富集,而非特异性免疫学标志物 Calnexin 蛋白则在外泌体中未检出(图 1A)。透射电镜分析显示为双层膜结构、类杯状外形(图 1B)。纳米流式粒径分析表明血小板中外泌体粒径分布集中于 60 ~ 80 nm,符合外泌体颗粒大小(图 1C)。

**2.2 血小板外泌体浓度随保存时间的变化** 纳米流式结果显示(表 1、图 2),保存 D 0、D 3、D 5 血小板中外泌体颗粒浓度不同,分别为  $(13.86 \pm 7.93) \times 10^{12}$ 、 $(23.69 \pm 12.80) \times 10^{12}$ 、 $(45.81 \pm 25.87) \times 10^{12}$  个/L。外泌体浓度随保存时间延长而增加,且不同保存时间的外泌体浓度差异有统计学意义;D 3 外泌体浓度为 D 0 的 1.8 倍( $P < 0.01$ ),D 5 外泌体的颗粒浓度为 D 0 的 4.0 倍,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。D 5 外泌体浓度约为 D 3 的 2.2 倍( $P < 0.05$ )。

**2.3 不同保存时间血小板中外泌体对凝血功能的影响**

**2.3.1 血小板中外泌体对血浆凝血功能的影响** 不同保存时间血小板外泌体对凝血功能的影响结果如表 2 所示。与对照组相比,D 0 与 D 5 组外泌体分别可使 PT 减小,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ );同时,与对照组相比,D 0 与 D 5 组外泌

表 1 不同保存时间手工血小板外泌体浓度

样本编号	浓度(×10 <sup>12</sup> 个/L)			F 值	P 值
	D 0	D 3	D 5		
1	8.14	9.90	32.87	13.28	<0.001
2	7.98	15.11	31.88		
3	3.92	7.22	10.16		
4	16.30	17.12	25.72		
5	6.01	14.34	57.40		
6	17.41	43.73	67.11		
7	13.30	26.35	101.39		
8	20.96	32.59	56.92		
9	30.26	40.47	41.92		
10	14.33	30.02	32.72		

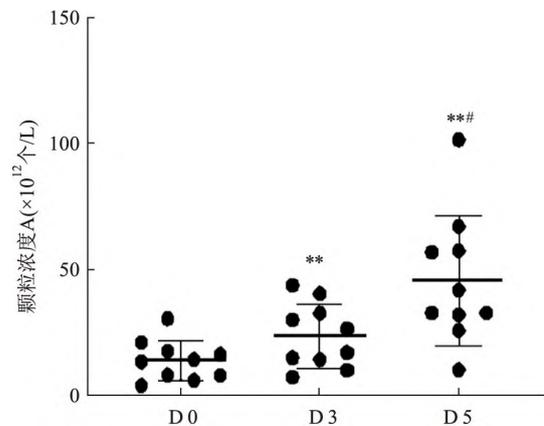


图2 血小板中外泌体浓度随保存时间的变化  
与 D 0 比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 D 3 比较: #  $P < 0.05$

体分别使 APTT 减小,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ )。

**2.3.2 血小板外泌体中凝血因子 VII 的定量检测**

Western blot 实验结果显示凝血因子 VII 在血小板保存 0 d 与 5 d 所分泌的外泌体中表达量存在差异。进一步通过半定量软件 ImageJ 检测各条带灰度值验证了该结果,相较于 D 0,D 5 组 VII 因子含量是 D 0 组的 1.4 倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 3)。

表2 不同保存时间血小板外泌体对PT、APTT的影响(s, n = 5,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	PT			APTT		
	PBS组	D 0组	D 5组	PBS组	D 0组	D 5组
凝血时间	12.00 ± 0.67	11.84 ± 0.66	11.64 ± 0.63	29.90 ± 2.31	28.80 ± 2.42	27.80 ± 2.50
缩短时间		0.16 ± 0.15 **	0.36 ± 0.18 ***		1.11 ± 1.21 *	2.10 ± 1.14 ***

与PBS组比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001

表3 不同保存时间血小板外泌体的凝血作用

样本	R (min)	K (min)	α角(°)	MA (mm)	CI
PBS	5.46 ± 0.90	1.78 ± 0.43	64.48 ± 6.58	58.48 ± 4.30	0.04 ± 1.72
D 0	5.00 ± 0.67	1.68 ± 0.30	66.30 ± 3.87	58.46 ± 2.93	0.50 ± 1.17
D 5	4.38 ± 1.00 *#	1.68 ± 0.56	67.54 ± 6.65	61.48 ± 7.00	1.38 ± 2.03

与PBS组比较: \* P < 0.05; 与D 0组比较: # P < 0.05

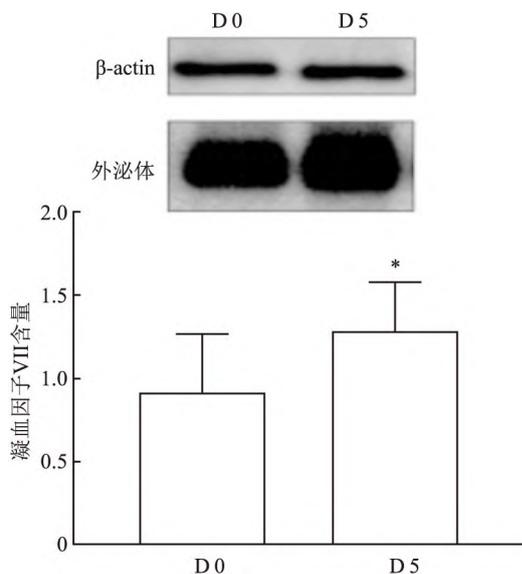


图3 血小板外泌体中凝血因子VII表达差异

与D 0比较: \* P < 0.05

### 2.3.3 血小板中外泌体对全血凝血功能的影响

D 5与D 0血小板外泌体对新鲜全血凝血指标的影响见表3。凝血时间R值提示凝血因子活性,与PBS组、D 0组相比,D 5组外泌体使全血凝血时间降低,差异有统计学意义[ $(t = 3.21, P < 0.05)$ 、 $(t = 2.82, P < 0.05)$ ],表明外泌体样本具有促凝作用;与PBS组相比,D 0、D 5组外泌体可使K值减小,α角增大,CI指数升高,但差异无统计学意义。与PBS、D 0组相比,D 5组外泌体样本可使血液中MA值变大,但差异无统计学意义。

### 3 讨论

已有相关文献<sup>[9]</sup>证明血小板制备与保存过程中高离心力、剧烈震荡、产生的激动剂(二磷酸腺苷、凝血酶)、低温(4℃)、碱性环境(pH > 7.6)及

酸性环境(pH < 6.2)等因素都可使血小板发生活化,导致血小板EVs增加。微囊泡与外泌体作为血小板EVs两种主要组成成分,Gao et al<sup>[10]</sup>研究了常温震荡保存条件下单采血小板中微囊泡的变化,结果显示保存5d时微囊泡含量是保存1d时的3倍。而在本研究中则检测了常温震荡保存手工血小板时其外泌体随着时间的变化,结果显示外泌体随着保存时间延长也呈增加趋势,与上述文献报道一致。

Sinauridze et al<sup>[11]</sup>研究显示血小板EVs促凝活性为活化血小板的50~100倍,其认为这不仅归因于促凝血磷脂的表面暴露,促凝血蛋白受体的密度增加也放大了促凝活性。研究<sup>[12]</sup>指出创伤导致的凝血障碍(trauma-induced coagulopathy, TIC)患者存活率降低时血小板EVs下降,Lopez et al<sup>[13]</sup>通过向出血大鼠模型输注血小板EVs证明其在体内发挥了促凝和改善酸中毒的作用。上述研究均未将微囊泡与外泌体分离,故无法明确二者作用大小。外泌体作为EVs重要组成部分,对其凝血功能的单独研究较少。在本研究中,通过比较保存D 0与D 5血小板中外泌体对血浆的凝血作用显示两组PT、APTT与对照组相比差异有统计学意义,血小板保存期间产生的外泌体可能通过内、外源性凝血途径发挥促凝作用。进一步检测两组血小板外泌体对全血凝血功能的影响,结果显示R值减小,提示凝血酶生成时间缩短,D 0与D 5外泌体中凝血因子活性存在差异。尽管两组的K值、α角、MA等数值上存在差异,但P值显示差异无统计学意义,可能是样本量不足的原因。尽管外泌体与微囊泡均含有血小板来源蛋白质、脂质、RNA等成分,但这些生物活性物质在外泌体与微囊泡上的表达并不一致。文献<sup>[14]</sup>已证明促凝物质PS在外泌体中不表达,外泌体可能存在与微囊泡相同的Va、Xa等各种凝血因

子成分参与促凝作用。

本课题前期进行了不同保存时间血小板中外泌体蛋白谱学的研究,结果显示凝血因子 VII 在保存 5 天血小板外泌体中表达上调,因此对其进行定量检测以分析因子 VII 在促凝反应中的作用,结果显示因子 VII 在 D 5 组外泌体中含量是 D 0 组的 1.4 倍,因此可以推测血小板在保存过程中分泌的外泌体可富集因子 VII 发挥促凝作用。因子 III 与 VIIa 形成复合物后促进因子 Xa 形成,导致凝血酶生成。这些凝血酶可促进内源性凝血途径中凝血酶的生成。因子 VII 还可直接使因子 IX 裂解为 IXa,从而进一步扩大内源性凝血途径的作用。因此,血小板保存过程中产生的外泌体发挥促凝作用,可能是由凝血因子 VII 参与内、外源性凝血途径介导的。此外,外泌体中富含的非编码 RNA 等生物活性物质可能也对其凝血作用产生调控作用。外泌体含量随着血小板保存时间的延长而增加,脂质在外泌体中不断积累<sup>[15]</sup>,某些脂质成分也有可能导致其凝血作用增强。外泌体可能通过凝血因子、脂质、RNA 等多种物质同时调节促凝作用,因此,对于血小板外泌体中调节促凝功能的某种或多种生物活性物质仍需进一步探究。

### 参考文献

- [1] Thon N J, Devine D V. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets[J]. *Transfusion*, 2007, 47(12): 2260–70.
- [2] Xie R F, Hu P, Li W, et al. The effect of platelet-derived microparticles in stored apheresis platelet concentrates on polymorphonuclear leucocyte respiratory burst[J]. *Vox Sang*, 2014, 106(3): 234–41.
- [3] 朱跃跃, 卞茂红, 谢如锋. 红细胞微粒的促凝血性质与小鼠急性肺损伤的关系[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 89–94.

- [4] Piccin A, Murphy W G, Smith O P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications[J]. *Blood Rev*, 2007, 21(3): 157–71.
- [5] Aatonen M T, Ohman T, Nyman T A, et al. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3(2): 525–9.
- [6] Hessvik N P, Llorente A. Current knowledge on Exosome biogenesis and release[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 193–208.
- [7] Yanez M M, Siljander P R, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 27066.
- [8] Hill A F. Exosomes and microvesicles[M]. *Methods Mol Biol*, 2017: 1–228.
- [9] Seghatchian J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion[J]. *Transfus Med Rev*, 1997, 11(2): 130–44.
- [10] Gao M, Zhang B, Zhang Y, et al. The effects of apheresis, storage time, and leukofiltration on microparticle formation in apheresis platelet products[J]. *Transfusion*, 2018, 58(10): 2388–94.
- [11] Sinauridze E I, Kireev D A, Popenko N Y, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3): 425–34.
- [12] Matijevic N, Wang Y, Holcomb J B, et al. Microvesicle phenotypes are associated with transfusion requirements and mortality in subjects with severe injuries[J]. *J Extracell Vesicles*, 2015, 4(1): 29338.
- [13] Lopez E, Srivastava A K, Burchfield J, et al. Platelet-derived-extracellular vesicles promote hemostasis and prevent the development of hemorrhagic shock[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17676.
- [14] Cointe S, Lacroix R, Dignat G F. Platelet-derived microparticles[J]. *Springer Int Pub*, 2017: 379–92.
- [15] McVey M J, Weidenfeld S, Maishan M, et al. Platelet extracellular vesicles mediate transfusion-related acute lung injury by imbalancing the sphingolipid rheostat[J]. *Blood*, 2021, 137(5): 690–701.

## Changes of exosomal concentration during platelet storage and the effects on coagulation function

Gong Li<sup>1,2,3</sup>, Mi Ziyue<sup>2,3</sup>, Kong Yujie<sup>2,3</sup>, Xu Haixia<sup>2,3</sup>, Tian Li<sup>2,3</sup>, Liu Zhong<sup>1,2,3</sup>

(<sup>1</sup>School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Chengdu 610052;

<sup>3</sup>Key Laboratory of Transfusion Adverse Reactions, Chinese Academy of Medical Sciences, Chengdu 610052)

**Abstract Objective** To detect exosomes concentration changes in manual platelet with different storage time and further investigate the effects of exosomes on coagulation function. **Methods** After divided into storage bags with same volume, the platelets were stored for 0, 3, 5 days (D 0, D 3, D 5) in (22 ± 2) °C. Exosomes were isolated from platelet samples by ultracentrifugation. Western blot, transmission electron microscope and nano-flow cytometry

were adopted to characterize exosomes. Meanwhile, exosomes particles concentration was detected by nano-flow cytometry. Exosomes with different storage time were added to plasma, then the effects on the plasma prothrombin time(PT) and activated partial thromboplastin time(APTT) were detected by the automatic coagulation analyzer. Expression of coagulation factor VII on exosomes from platelet stored for different time were tested by Western blot. Exosomes samples of D 0, D 5 were incubated with fresh whole blood, respectively. Then the coagulation indexes of each samples were detected by Thromboelastography test(TEG). **Results** Test showed the presence of TSG 101, CD 9, which were exosome specific markers. And the exosomes showed a double-layer membrane and cup-like structure. Moreover, the particle size distribution of exosomes was mainly between 60 ~ 80 nm. The concentration of exosomes stored for D 0, D 3, and D 5 were  $(13.86 \pm 7.93) \times 10^{12}$ ,  $(23.69 \pm 12.80) \times 10^{12}$ ,  $(45.81 \pm 25.87) \times 10^{12}$  particles/L, respectively. Compared with D 0, the concentration of exosomes stored for D 3 and D 5 increased significantly( $P < 0.01$ ), with 1.8 times and 4.0 times, respectively. Compared with the control group, PT in the D 0 and D 5 exosomes group could be decreased by  $[(0.16 \pm 0.15) \text{ s}, P < 0.01]$ 、 $[(0.36 \pm 0.18) \text{ s}, P < 0.001]$ , APTT could be decreased by  $[(1.11 \pm 1.21) \text{ s}, P < 0.05]$ 、 $[(2.10 \pm 1.14) \text{ s}, P < 0.001]$ , respectively. Semi-quantitative analysis of coagulation factor VII was performed by Western blot and it showed statistically differences in coagulation factor VII concentration( $P < 0.05$ ). TEG test showed that the coagulation time R value of control group, exosomes of D 0 and D 5 were  $(5.46 \pm 0.90) \text{ min}$ ,  $(5.00 \pm 0.67) \text{ min}$ ,  $(4.38 \pm 1.00) \text{ min}$ , respectively, indicating that exosomes had procoagulant activity( $P < 0.05$ ). **Conclusion** With the prolongation of storage time, the particles concentration of exosomes in manual platelets continuously increased and the blood procoagulant function of exosomes is significantly enhanced, platelet-derived exosomes during storage may be involved in the procoagulant process through the coagulation factor VII.

**Key words** platelet; exosomes; coagulation; coagulation factor VII

(上接第 1282 页)

## SOD mimetic Tempol improves aortic vasodilation function in mice exposed to intermittent hypoxia

Jiang Qian, Sheng Hao, Liu Guoying, Yu Xiaohai, Zhong Mingkui

(Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effect of superoxide dismutase (SOD) mimetic 4-Hydroxy-TEMPO (Tempol) on aortic vasodilation function in mice exposed to intermittent hypoxia. **Methods** Male C57 mice were randomly divided into normal oxygen (Control) group, intermittent hypoxia (IH) and IH + Tempol group. The mice in IH and IH + Tempol group were exposed to 4-weeks intermittent hypoxia, 8 h daily. In IH + Tempol treatment group, the mice were given Tempol (100 mg/kg) each day by the oral administration in the last week of intermittent hypoxia. The isolated thoracic aorta reactivity was studied using wire myography, the content of reactive oxygen species (ROS) was detected by dihydroethidium (DHE) staining, the concentration of nitric oxide (NO) was measured by ELISA kits. **Results** Compared with Control group, the endothelium-dependent vasodilation of thoracic aorta induced by acetylcholine (ACh) significantly decreased and cardiac hypertrophy, the level of aortic ROS significantly increased, the concentration of aortic NO was significantly reduced in the IH group mice. Treatment with Tempol could significantly improve the aortic endothelium-dependent vasodilation dysfunction and cardiac hypertrophy, and significantly inhibited the increase of ROS and decrease of NO in the thoracic aorta induced by intermittent hypoxia. **Conclusion** Tempol can improve intermittent hypoxia induced-cardiovascular dysfunction in mice by reducing ROS and increasing the bioavailability of NO.

**Key words** intermittent hypoxia; oxidative stress; endothelial dysfunction; Tempol