

·临床研究·

$O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 表达上调对 2 型糖尿病患者 血小板异常活化的影响

陈菲¹, 罗创华¹, 卢汉平¹, 周侗¹, 杨中汉¹, 杨霞¹, 高国全^{1,2}, 齐炜炜¹
(中山大学 1. 中山医学院生物化学教研室, 2. 热带病防治研究教育部重点实验室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨血小板 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 水平变化导致 2 型糖尿病患者血小板异常活化的分子机制。【方法】检测 2 型糖尿病患者和正常对照组的血小板 4 项临床参数;应用免疫荧光技术观察血小板形态结构的变化;应用流式细胞术测定两组血小板内线粒体 $O_2\cdot^-$ 、胞浆 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 水平;用 NADH/PMS 和 H_2O_2 分别处理正常对照组血小板,流式细胞术检测血小板的活化阳性百分率;应用 Western Blot 检测两组血小板内过氧化氢酶(Catalase)、超氧化物歧化酶 2 型(Mn-SOD)的表达差异。【结果】2 型糖尿病组平均血小板体积(MPV)明显高于正常对照组($P < 0.001$),而血小板数量(PLT)、血小板分布宽度(PDW)、血小板比积(PCT)差异均无统计学意义;免疫荧光显示 2 型糖尿病组血小板形态结构较正常对照组发生改变,流式细胞术检测血小板的线粒体 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 水平明显高于正常对照组($P < 0.05$),而胞浆 $O_2\cdot^-$ 水平差异无统计学意义。通过流式分析 H_2O_2 和 NADH/PMS 体系明显促进血小板的活化($P < 0.01$)。Western Blot 结果显示 2 型糖尿病组血小板 Catalase 的表达下调,而 Mn-SOD 的表达及活性无差异。【结论】糖尿病血小板内 Catalase 表达下调可能是导致线粒体 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 水平升高的原因,从而调控糖尿病血小板的异常活化。

关键词: 2 型糖尿病;血小板活化;平均血小板体积; $O_2\cdot^-$; H_2O_2

中图分类号:R34

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)01-0056-07

Effect of Elevated $O_2\cdot^-$ and H_2O_2 Expression on Abnormal Activation of Platelets in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

CHEN Fei¹, LUO Chuang-hua¹, LU Han-ping¹, ZHOU Ti¹, YANG Zhong-han¹, YANG Xia¹,
GAO Guo-quan^{1,2}, QI Wei-wei¹

(1.Department of Biochemistry and Molecular Biology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2.China Key Laboratory of Tropical Disease Control, Ministry of Education, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: QI Wei-wei, E-mail: qiww3@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the molecular mechanism of abnormal platelet activation induced by platelet $O_2\cdot^-$ and H_2O_2 levels in type 2 diabetes mellitus.【Methods】The platelet parameters in patients with type 2 diabetic patients and normal controls were measured; Immunofluorescence technique was used to observe the platelet morphology changing; Flow cytometry was used to detect platelet intracellular $O_2\cdot^-$ and H_2O_2 content in two groups, then with platelets in normal controls treated with NADH/PMS system and H_2O_2 respectively, platelet activation positive percentage was observed. Standard Western blot analysis protocols were used to detect expression difference of Catalase and type 2 super-oxide dismutase(Mn-SOD) in platelets.【Results】The MPV in the group of type 2 diabetic patients was significantly higher than in the normal control group($P < 0.001$), but there was no statistic

收稿日期:2016-09-22

基金项目:国家自然科学基金(81471033, 81600641);广东省自然科学基金(2014A030313073, 2015A030311043, , 2016A030311035);广州市科技计划产学研协同创新重大专项(201508020033);中山大学高校基本科研业务费青年教师科研资助计划项目(16ykpy24);广东省高等学校高层次人才项目;国家大学生创新团队项目

作者简介:陈菲,硕士研究生,研究方向:糖尿病与血小板,E-mail:CPUcf2012@126.com;齐炜炜,通信作者,讲师,硕士生导师,研究方向:糖尿病血管病变的分子机制及治疗,E-mail:qiww3@mail.sysu.edu.cn

difference in PLT, PDW, PCT between two groups. Immunofluorescence results showed that morphology of platelets in type 2 diabetic patients changed contrast to normal group. Through flowcytometry detection, the content of mitochondrial $O_2\cdot^-$ and H_2O_2 of platelet in type 2 diabetic patients were obviously higher than in normal group ($P < 0.05$), whereas no significant difference in cytoplasmic $O_2\cdot^-$. We adopted NADH/PMS system and H_2O_2 to treat platelets of normal group, heightened activated positive percentage were observed which described $O_2\cdot^-$ and H_2O_2 can significantly promote platelet activation ($P < 0.01$). Western blot results showed that expression of Catalase in platelet of type 2 diabetes patients decreased, while the expression and activity of Mn-SOD had no difference. 【Conclusion】 It is diabetic platelet Catalase expression decreased that may lead to Diabetic platelet mitochondrial $O_2\cdot^-$ and H_2O_2 level increased, thus regulating aberrant activation of diabetic platelet.

Key words: type 2 diabetes patients; platelet activation; MPV; $O_2\cdot^-$; H_2O_2

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1): 56-62]

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一组以高血糖为特点的代谢综合征,是导致血栓和心血管疾病的重要因素^[1-2];糖尿病血管病变是T2DM最常见的慢性并发症,也是患者致残致死的主要病因。T2DM患者血小板异常活化,聚集功能增强,加速了患者动脉粥样硬化和血栓的进程,导致T2DM血管病变的进一步加剧^[3-4]。研究表明导致血小板活化的因素,包括高血糖、胰岛素抵抗和严重的氧化应激压力等^[5]。其中,严重的氧化应激压力,尤其是活性氧ROS的过量产生,在T2DM血管病变的发生发展中发挥重要作用^[6-7]。ROS的种类繁多,主要包括超氧根阴离子($O_2\cdot^-$)、羟自由基($OH\cdot$)、过氧化氢(H_2O_2)3种。ROS是细胞内 O_2 部分还原所形成的,比 O_2 活泼,线粒体是ROS产生的主要部位,线粒体损伤导致胞内ROS水平急剧上升^[8-9]。ROS作为一把双刃剑,低浓度具有调节细胞生长信号、免疫应答、干细胞分化的功能,而过量的ROS产生则会损伤细胞器、蛋白质、脂质、DNA等^[10-11]。虽然文献报道T2DM患者过量的ROS能够促进血小板的活化^[12-14],但ROS促进血小板活化的分子机制尚未阐述清楚。本文应用流式细胞术、免疫荧光、Western Blot等技术检测T2DM与正常对照组血小板的活化阳性率差异、胞内ROS产生的类型以及与 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 产生相关的酶(超氧化物歧化酶2型Mn-SOD、过氧化氢酶Catalase)的表达的变化,用NADH/PMS体系产生的 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 处理正常对照组血小板检测其对血小板活化的影响,分析糖尿病状态下血小板内 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 的表达与血小板活化的关系,探讨糖尿病状态下血小板异常活化的可能机制,为研究糖尿病血管病变的治疗提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

流式抗体CD41a-PECy5, CD62p-PE购自美国BD公司; Mito-SOX 荧光探针试剂、DHE 荧光探针试剂、DCF-DA 荧光探针试剂均购自Sigma公司; 一抗Tubulin 购自Cell Signaling公司; DAPI、抗鼠594 荧光二抗购自Life公司; 进口山羊血清购自Sigma公司; H_2O_2 和 NADH、PMS 均购自Sigma公司; ECL 化学发光检测试剂盒购自北京普利来公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自凯基公司; 辣根过氧化物酶标记(HRP)标记的抗兔、抗鼠二抗均为Vector公司; Catalase 抗体为Proteintech公司; Mn-SOD 抗体为eBioscience公司; 内参 β -actin 抗体为Sigma公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 研究对象

根据2015年ADA糖尿病医学诊断标准选取广州医科大学附属第三医院2016年03月至06月入住的2型糖尿病患者30例,男16例,女14例,平均年龄(65.62 ± 11.84)岁; 正常对照组为体检者,所有体检者在体检前两周内无服用阿司匹林、肝素等影响血小板功能的药物史,30例,男16例,女14例,平均年龄(52.65 ± 7.37)岁。

1.3 方法

1.3.1 血小板四项参数的检测 所有对象在不扎止血带的情况下,清晨空腹由肘静脉采集血液0.5 mL至含有15% K_3 EDTA的抗凝管中,混匀后立即用全自动血细胞分析仪(美国Abbott Laboratories公司)检测血小板四项参数,包括血小板数量(platelet count, PLT)、平均血小板体积(mean platelet volume, MPV)、血小板分布宽度(platelet distribution width,

PDW)、血小板比积(plateletcrit, PCT)。

1.3.2 PRP的制备 用无菌真空采血管(3.2%枸橼三钠抗凝)采集3 mL静脉血,颠倒混匀,常温250 ×g离心20 min得到富含血小板的血浆(platelet-rich plasma, PRP),离心加速和降速均调至SLOW以尽量减少血小板的激活。剩余的血液常温1 400 ×g离心10 min得到缺乏血小板的血浆(platelet-poor plasma, PPP)。用PPP调节PRP,使血小板浓度保持在 $2 \sim 3 \times 10^8$ 个/mL。

1.3.3 血小板免疫荧光检测 参照文献[15]实验步骤,将PRP滴加事先已铺放好Poly-L-Lysine包被的coverslip 6孔板中,静置2 h使其自然沉降,加入预冷的多聚甲醛固定30 min。抗体孵育,图像采集(Zeiss LSM710激光共聚焦显微镜)。采集过程使用60×NA值为1.4的物镜在Multitrack模式下进行。

1.3.4 血小板的流式细胞术 采用流式细胞仪(美国Beckman公司)检测。①检测血小板的活化浓度为1:100的PRP,加入鼠源抗人抗体(CD41a-PECy5, CD62p-PE, 1:100),室温避光孵育20 min,上机检测。同型对照加IgG1-PECy5, IgG1-PE(美国BD公司)。②检测血小板内的线粒体 $O_2\cdot^-$ 、胞浆 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 浓度为1:100的PRP分别加入Mito-SOX荧光探针试剂(浓度为5 $\mu\text{mol/L}$)、DHE荧光探针试剂(浓度为10 $\mu\text{mol/L}$)、DCF-DA荧光探针试剂(浓度为10 $\mu\text{mol/L}$),再加入鼠抗人抗体CD41a-PECy5(1:100),室温避光孵育30 min,上机检测。③检测 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 对血小板活化的影响由于 $O_2\cdot^-$ 不稳定,参照文献[16-17]分别在PRP中加入1 mmol/L H_2O_2 和NADH/PMS体系(2 mmol/L NADH、0.1 mmol/L PMS)产生的 $O_2\cdot^-$,常温静止处理1 h,加入CD41a-PECy5, CD62p-PE流式抗体避光孵育20 min,上机检测。

1.3.5 Western Blot免疫印迹 PRP 1 000 ×g离心15 min得到血小板沉淀,用含3.5 mg/mL BSA的washing buffer(103 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L $MgCl_2$, 5 mmol/L 葡萄糖, 36 mmol/L 柠檬

酸, pH6.5)洗涤,沉淀用蛋白裂解液SDS裂解。按照Western Blot步骤进行蛋白电泳^[18],抗体孵育,图像由化学发光成像系统(GE公司生产)采集。

1.4 统计学分析

使用SPSS 20.0软件进行统计分析,所有数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,组间比较采用独立样本t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板四项参数及形态结构变化检测

抽取所有对象的空腹静脉血后立即用全自动血细胞分析仪检测血小板4项参数。与正常对照组相比,T2DM组血小板的4项参数中MPV明显增高(10.95 ± 0.71 vs. 9.87 ± 0.69 , $P < 0.001$;表1)。MPV是指平均血小板体积,MPV越大,代表血小板的活性越高,分析临床资料的结果提示T2DM组血小板较正常组是异常活化的。血小板是无核的微小细胞,富含微丝微管骨架结构;静息状态下的血小板呈圆盘状,活化过程中血小板形态结构发生改变,收缩变圆、伸出伪足,黏附聚集能力增强。采用免疫荧光技术检测血小板膜骨架微管蛋白tubulin的表达,DAPI的染色排除有核细胞的污染。结果显示正常对照组的血小板形态结构呈圆环状,T2DM组血小板的形态结构发生改变,变圆呈实心形或梭形(图1),进一步证明2型糖尿病组血小板与正常对照组相比异常活化。

2.2 血小板线粒体 $O_2\cdot^-$ 、胞浆 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 检测

ROS包含了一系列的活性氧簇,且定位不同,应用CD41a-PECy5标记血小板,选用3种特异的荧光探针Mito-SOX、DHE、DCF-DA分别检测血小板内的线粒体 $O_2\cdot^-$ 、胞浆 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 ,应用流式细胞术明确T2DM患者发生改变的ROS类型。结果显示T2DM组血小板内的 H_2O_2 、线粒体 $O_2\cdot^-$ 水平较正常对照组明显升高($P < 0.01$,图2A、B),而胞浆 $O_2\cdot^-$ 水平无明显变化(图2C)。

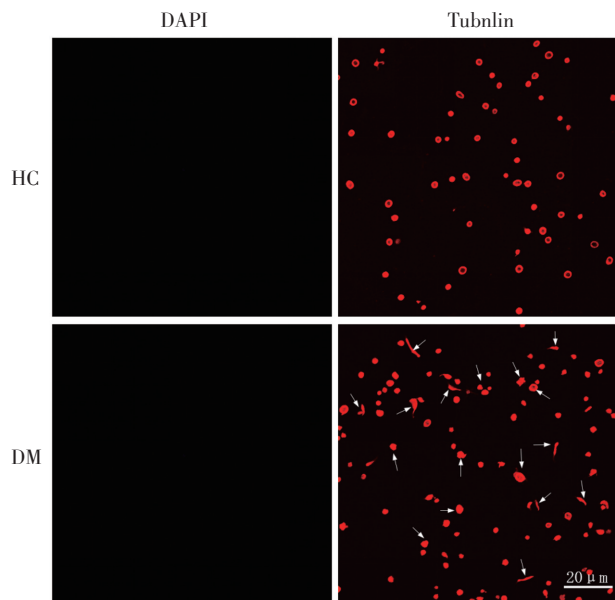
表1 各观察组血小板参数测定结果

Tab.1 Results of platelet parameters in each observation group

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PLT/($10^9/L$)	MPV(fl)	PDW(10GSD)	PCT/%
HC	30	272.38 ± 58.06	9.87 ± 0.69	11.96 ± 2.05	0.28 ± 0.05
T2DM	30	242.97 ± 59.49	$10.95 \pm 0.71^{1)}$	12.07 ± 2.00	0.25 ± 0.07

1) contrast to HC group, $P < 0.001$



Platelet membrane skeleton tubulin was stained with anti-tubulin antibody and imaged by confocal microscopy. The ring-like tubulin staining represented the typical morphology of resting platelets. Contrast to the HC group, morphology of platelets in DM group changed, spindle-shaped or solid form. Scale bars: 20 μ m

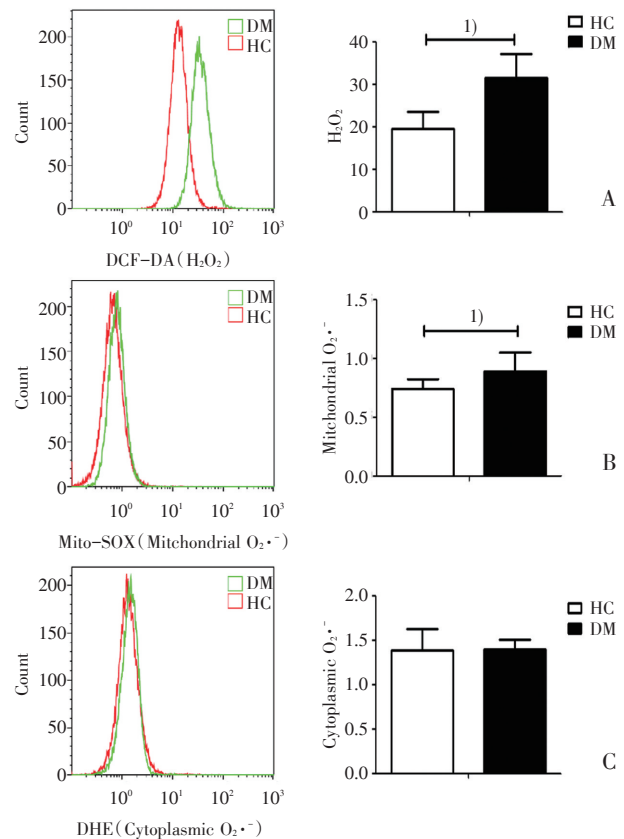
图1 正常对照组与糖尿病组血小板免疫荧光结果
Fig.1 Platelet immunofluorescence in HC group and DM group

2.3 $O_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 对血小板活化的影响

T2DM组血小板内 H_2O_2 和线粒体 $O_2^{\cdot-}$ 水平较正常对照组明显升高,为了探究血小板内 ROS 与血小板活化的关系,应用 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 处理健康正常人的血小板,检测 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 是否具有导致血小板活化的作用。 $O_2^{\cdot-}$ 不稳定,因此采用 NADH/PMS 体系来产生 $O_2^{\cdot-}$,其原理用化学方程式表示为 $NADH + PMS^+ \rightarrow NAD^+ + PMSH$; $PMSH + PMS^+ \rightarrow 2PMS \cdot + H^+$; $PMS \cdot + {}^3O_2 \rightarrow PMS^+ + O_2^{\cdot-}$ 。NADH/PMS 和 H_2O_2 处理 PRP 1 h 后, CD41a-PECy5 标记血小板, CD62p-PE 标记活化的血小板。流式检测结果显示正常对照组血小板活化阳性率为 13.71%, NADH/PMS 体系处理血小板后血小板活化阳性率为 32.68%, H_2O_2 处理血小板后血小板活化阳性率为 62.04% (图 3A); 统计学数据显示 H_2O_2 和 NADH/PMS 体系均能明显导致血小板活化 ($P < 0.01$, 图 3B)。

2.4 Western Blot 检测

为明确 T2DM 组血小板内 H_2O_2 和线粒体 $O_2^{\cdot-}$ 水平升高的机制,应用 Western blot 检测影响



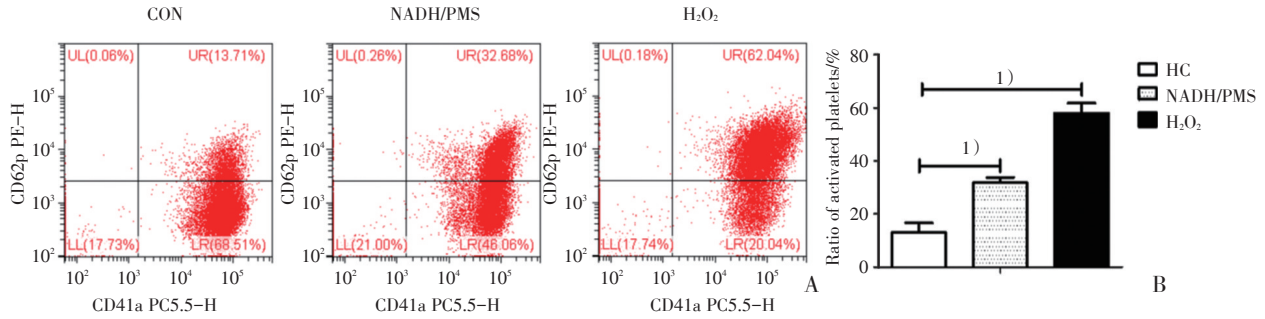
Expression of H_2O_2 , mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ in DM group platelets were significantly higher than HC group platelets and no difference in cytoplasmic $O_2^{\cdot-}$ between DM and HC group platelets. PRP were incubated for 30 min in the presence of CD41a, DCF-DA (10 μ mol/L), DHE (10 μ mol/L) or Mito-SOX (5 μ mol/L). Representative flow cytometry plots show the separate analysis of H_2O_2 (A), mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ (B) and cytoplasmic $O_2^{\cdot-}$ content (C) in HC and DM group platelets. HC group $n=16$; DM group $n=11$. $1) P < 0.01$

图2 血小板内 H_2O_2 、线粒体 $O_2^{\cdot-}$ 、胞浆 $O_2^{\cdot-}$ 检测结果
Fig.2 H_2O_2 , mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ and cytoplasmic $O_2^{\cdot-}$ content in platelets

这两种 ROS 最常见的酶 Mn-SOD 和 Catalase。细胞内产生的 $O_2^{\cdot-}$ 能够被 Mn-SOD 快速转化为 H_2O_2 , 继而 H_2O_2 可以被 Catalase 转化为 H_2O 。SOD 有 3 种类型, SOD1 (Cu/Zn-SOD) 存在于胞内, SOD2 (Mn-SOD) 存在于线粒体内, SOD3 (胞外 SOD) 存在于细胞外, 其中 Mn-SOD 能够将线粒体产生的 $O_2^{\cdot-}$ 转化为 H_2O_2 。结果显示 T2DM 患者血小板的 Mn-SOD 表达较正常对照组无明显变化, 而 Catalase 的表达较正常对照组明显下调 ($P < 0.05$; 图 4A、B)。两组的 Mn-SOD 在蛋白水平表达无差异, 进一步需要检测 Mn-SOD 酶活

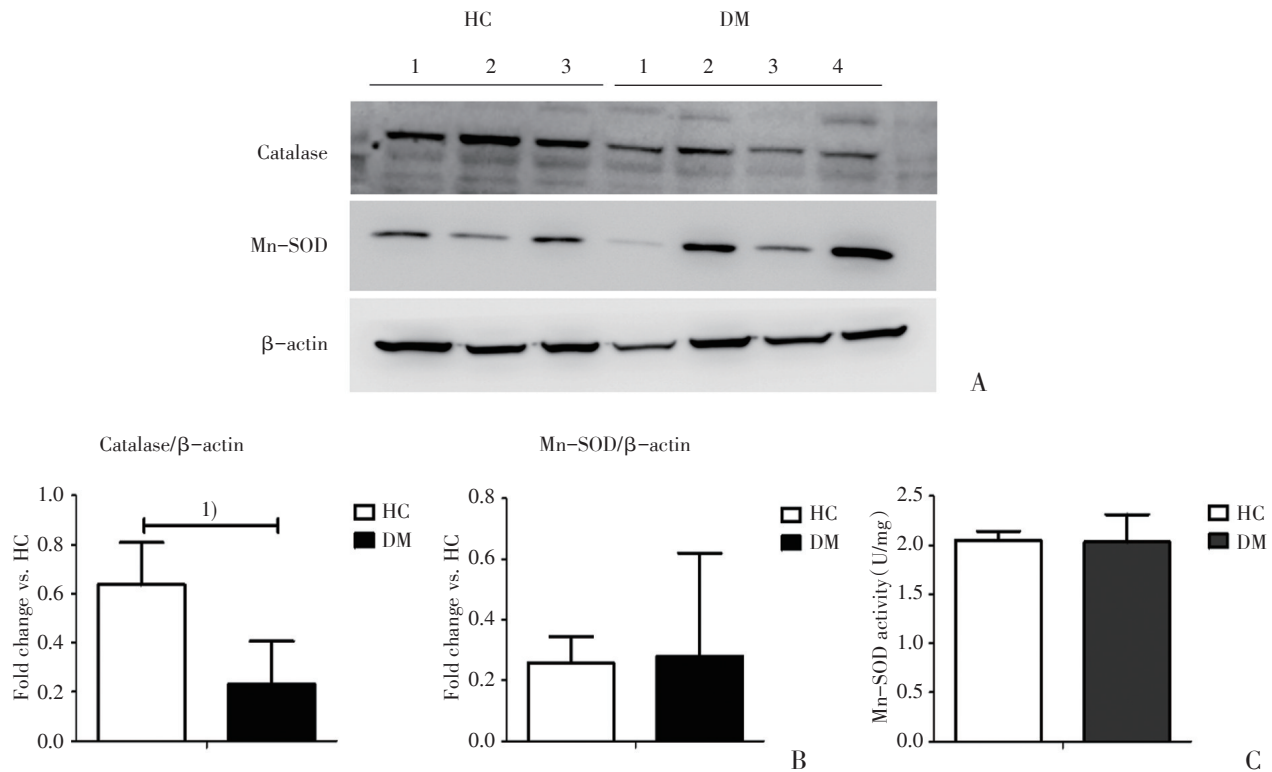
性。结果显示 Mn-SOD 的活性二者无差异(图 4C),表明 T2DM 患者血小板内 ROS 的过量产生主要是由于过氧化氢酶 Catalase 表达的下调,血

小板内氧化还原反应平衡遭到破坏,从而抗氧化能力下降。



NADH/PMS system and H₂O₂ activate HC resting platelets significantly. A: Representative flowcytometry scatterpot of positive activated platelets. HC group PRP was treated with NADH/PMS system (NADH 2 mmol/L, PMS 0.1 mmol/L; NADH reacts with PMS to generate O₂·⁻) or with H₂O₂ (1 mmol/L) for 1h, then the positive activated platelets were detected using flowcytometry technique. B: Statistic result of the ratio of positive activated platelets. n=10. 1)P<0.01

图3 NADH/PMS(O₂·⁻)、H₂O₂激活血小板
Fig.3 NADH/PMS (O₂·⁻) and H₂O₂ activate HC group platelets



Expression of Catalase was increased, the activity and expression of Mn-SOD wasn't changed. A: Western Blot analysis of platelet intracellular O₂·⁻, H₂O₂ generation related enzyme Mn-SOD and Catalase. Mn-SOD is the only enzyme transforming O₂·⁻ to H₂O₂ and Catalase can transform H₂O₂ to H₂O. B: Quantification of Catalase and Mn-SOD expression. C: Mn-SOD activity detected by a kit. HC n=12, DM n=18. 1)P<0.05

图4 血小板内 Mn-SOD、Catalase 表达变化
Fig.4 Mn-SOD and Catalase expression in platelets

3 讨论

糖尿病是一种全球化疾病,是继肿瘤、心血管疾病之后的第三大非传染性疾病,严重危害人类生命健康。长期高血糖引发各种慢性综合征,其中糖尿病血管病变是导致糖尿病患者致残致死的主要原因。血小板在糖尿病血管病变的发生发展中扮演着重要角色^[19-23],大量文献报道糖尿病患者血小板异常活化,MPV显著增高,从而促进了糖尿病患者动脉粥样硬化和血栓的形成^[24-26],但糖尿病状态下血小板异常活化的原因尚不明确。

本文首次明确了导致糖尿病状态下血小板活化的ROS类别,分析了胞内过量 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 生成的可能机制,为进一步研究血小板异常活化导致血管病变提供了依据。本文通过分析T2DM患者及正常健康体检者血小板四项参数,发现T2DM患者反映血小板活化的检测指标MPV显著增高。血小板是无核的细胞,但是富含微丝微管等骨架结构,免疫荧光技术检测T2DM组血小板膜骨架微管蛋白tubulin结构发生明显改变,呈实心形或梭形结构。血小板在活化时会发生形态结构改变,伸出伪足、释放活性物质等,从形态学上进一步证明糖尿病状态下血小板较正常对照组异常活化^[27-29]。

文献虽报道T2DM患者血小板内的ROS异常升高可能参与调控血小板的异常活化,但致使血小板活化的具体ROS类别尚未探讨清楚。本研究主要分析了 $O_2\cdot^-$ 、 $OH\cdot$ 和 H_2O_2 这三种ROS类别,并证明了血小板内ROS的来源主要可能是线粒体的损伤及过量 H_2O_2 的产生。NADH/PMS体系和 H_2O_2 均有导致血小板异常活化的功能,因此本研究推测T2DM患者血小板内产生的过量 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 通过介导血小板异常活化,从而参与调控动脉粥样硬化和血栓的形成。SOD是唯一使 $O_2\cdot^-$ 转变为 H_2O_2 的酶,而Catalase能够进一步将 H_2O_2 转换成 H_2O ,降低 H_2O_2 对细胞的毒害损伤作用。有文献报道,STZ诱导的大鼠肺组织中SOD和Catalase活性均下降^[30],而本研究的结果提示Mn-SOD的表达和活性无明显变化,Catalase表达明显下调。因此本研究认为Catalase的表达下调可能是导致血小板 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 过量产生的主要原因。

综上所述,T2DM患者血小板内Catalase等抗氧化酶表达的下调导致其胞内 $O_2\cdot^-$ 和 H_2O_2 的过量生成,从而导致T2DM患者血小板的异常活化。提高血小板内抗氧化酶系的能力可能是治疗T2DM患者血管病变的一个重要靶点,能够延缓糖尿病患者动脉粥样硬化和血栓的进程。

参考文献

- [1] Ajjan R, Grant PJ. Coagulation and atherothrombotic disease[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186(2):240-259.
- [2] Ajjan RA, Ari Ns RAS. Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state [J]. *Blood Rev*, 2009, 23(2):67-78.
- [3] Colwell J, Halushka P, Sarji K, et al. Altered platelet function in diabetes mellitus [J]. *Diabetes*, 1976, 25(2 SUPPL):826-831.
- [4] Sagel J, Colwell JA, LC, et al. Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus [J]. *Ann Intern Med*, 1975, 82(6):733-738.
- [5] Santilli F, Simeone P, Liani R, et al. Platelets and diabetes mellitus [J]. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2015, 120(8):28-39.
- [6] 赵云跃, 钟钧琳, 谢冬梅, 等. 曲美他嗪降低1型糖尿病大鼠心肌组织炎症反应和氧化应激水平[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(3):390-395.
- [7] 钱孝贤, 陈燕铭, 吴伟康, 等. 伊贝沙坦对糖尿病大鼠心脏的保护作用及抗氧化反应的机制探讨[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2006, 27(6):44-47.
- [8] Grivennikova VG, Vinogradov AD. Mitochondrial production of reactive oxygen species [J]. *Biochemistry*, 2013, 78(13):1490-1511.
- [9] Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147:37-52.
- [10] Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60:1-4.
- [11] Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:14.
- [12] Kr Tz F, Sohn H Y, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game [J]. *Arterioscler*, 2004, 24(11):1988-1996.
- [13] Bakdash N, Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation

- [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(2): 158-166.
- [14] Jang JY, Min JH, Chang T S, et al. Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(16): 2528-2540.
- [15] Feng W, Chang C, Liu W. Dissection of autophagy in human platelets [J]. *Autophagy*, 2014, 10(4): 642-651.
- [16] Sugahara S, Ueda Y, Ono M. Antioxidant effects of herbal tea leaves from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on multiple free radical and reducing power assays, especially on different superoxide anion radical generation systems [J]. *Food Sci*, 2015, 80(11): 1750-3841.
- [17] Masuoka N, Kubo I. Suppression of superoxide anion generation catalyzed by xanthine oxidase with alkyl caffeates and the scavenging activity [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2016, 67(3): 283-287.
- [18] Gao G, Li Y, Fant J, et al. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium--derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization [J]. *Diabetes*, 2002, 51(4): 1218-1225.
- [19] Martin JF, Trowbridge EA, Salmon G, et al. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration [J]. *Thromb Res*, 1983, 32(5): 443-460.
- [20] Kamath S, Blann AD, Lip GYH. Platelet activation: assessment and quantification [J]. *Eur Heart J*, 2001, 22(17): 1561-1571.
- [21] Karpatkin S. Heterogeneity of human platelets II. Functional evidence suggestive of young and old platelets [J]. *J Clin Invest*, 1969, 48(6): 1083-1087.
- [22] Caen J, Michel H. Platelet shape change and aggregation [J]. *Nature*, 1972, 240(5377): 148-149.
- [23] Hensler ME, Frojmovic M, Taylor RG, et al. Platelet morphologic changes and fibrinogen receptor localization. Initial responses in ADP-activated human platelets [J]. *Am J Pathol*, 1992, 141(3): 707-719.
- [24] Kodiatt TA, Manikyam UK, Rao SB. Mean platelet volume in Type 2 diabetes mellitus [J]. *J Lab Physicians*, 2012, 4(1): 5-9.
- [25] Lee EY, Kim SJ, Song YJ, et al. Immature platelet fraction in diabetes mellitus and metabolic syndrome [J]. *Thromb Res*, 2013, 132(6): 692-695.
- [26] Chu SG, Becker RC, Berger PB, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(1): 148-156.
- [27] Liu Z, Li S, Cai Y. Manganese superoxide dismutase induces migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via H₂O₂-dependent snail signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(1): 44-50.
- [28] Hwang I, Lee J, Huh JY. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction [J]. *Diabetes*, 2012, 61(3): 728-738.
- [29] Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (Sod2) and redox-control of signaling events that drive metastasis [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(2): 191-201.
- [30] Alam MM, Meerza D, Naseem I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice [J]. *Life Sci*, 2014, 109(1): 8-14.

(编辑 徐杰)