

764-3 对人血小板功能及血管内皮细胞抗凝作用的影响

陈志勇 翁 进 李副刚 汪 钟

(中国医学科学院基础医学研究所药理室, 北京 100005)

The Effect of 764-3 on Human Platelets' Functions and the Anticoagulation Effect of Endothelial Cells

CHEN Zhi-Yong, WENG Jin, LI Fu-Gang and WANG Zhong

(Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100005, China)

ABSTRACT Human washed platelets and cultured confluent human umbilical vein endothelial cells were incubated with 764-3 which is extracted from *Salvia miltiorrhiza* Bge (SM) in China, at concentrations of 12.5, 25, 50, 100, 125, 250 and 500 mg. L⁻¹. It was found that 764-3 inhibit the expression of α -granular membrane protein 140 and platelet membrane glucoprotein Ib/III complex on platelet surface, and it increased the expression and activity of thrombomodulin on the surface of the endothelial cells. Our data provided new evidences for the antithrombotic effect of 764-3.

KEY WORDS 764-3; Endothelium cell; Platelet; α -granular membrane protein 140; Platelet membrane glucoprotein Ib/III complex; Thrombomodulin; Monoclonal antibody

摘要 研究了丹参的单体 764-3 对血小板 α 颗粒膜蛋白-140、血小板膜糖蛋白 Ib/III 复合物的表达和人脐静脉血管内皮细胞抗凝功能的影响。发现 764-3 能抑制血小板膜表面 α 颗粒膜蛋白-140 和糖蛋白 Ib/III 复合物的分子表达, 增加内皮细胞膜表面血栓调节蛋白的分子数和活性, 这为阐明 764-3

的抗血栓作用机制提供了新的实验依据。

关键词 764-3; 内皮细胞; 血小板; 颗粒膜蛋白-140; 血小板膜糖蛋白 Ib/III 复合物; 血栓调节蛋白; 单克隆抗体

丹参是一种具有活血化瘀作用的中药, 临床已证明它对血栓性疾病有治疗作用。764-3 是从丹参中提取的有效成分, 我们以往的工作表明 764-3 明显抑制人体外和兔体内外血小板聚集, 抑制血小板血栓素 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 的释放, 又可促进前列环素 (prostacyclin, PGI_2) 的生成^[1]。有报道表明, 764-3 增加牛主动脉内皮细胞组织纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, t-PA) 的释放^[2]。为进一步探讨 764-3 对血小板功能和内皮细胞抗凝作用的影响, 本文观察了 764-3 对血小板 α 颗粒膜蛋白-140 (α -granular membrane protein 140, α -GMP-140) 和血小板膜糖蛋白 Ib/III 复合物 (platelet membrane glucoprotein Ib/III complex, MGP Ib/III 复合物) 及人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 血栓调节蛋白 (thrombomodulin, TM) 的作用。

1 材料与方法

764-3 由中国医学科学院天津血液研究所赠送, 抗 α -GMP-140 单克隆抗体 S-12 由美国 Centocor 公司 John L. Ghrayed 博士馈赠, 抗 MGP Ib/III 复合物单克隆抗体 XH-3 和抗 TM 单克隆抗体 XH-4 为本实验室分离提纯, 胶原酶和凝血酶均购于 Sigma 公司, M199 为日本制药株式会社出品, 内皮细胞生长因子为本组制备。

1.1 ¹²⁵I 标记单克隆抗体 S-12、XH-3 和

XH-4

Iodogen 用二氯甲烷溶解 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 涂管 ($120 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$), 氮气吹干后, 避光保存。用时先加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液 $10 \mu\text{l}$, 再加入抗体溶液 $100 \mu\text{l}$ (含 $300 \mu\text{g}$ 抗体) 和 Na^{125}I 1 mCi , 室温反应 20 min 后, 上 Sephadex G-25 柱分离 (分离液为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl + 0.35% BSA), 分段收集洗脱液, 用 γ 计数器检测各段计数, 根据峰值分离出标记抗体^[3]。

1.2 血小板制备

健康志愿者, 两周内未服用阿司匹林类药物, 静脉取血, EDTA- Na_2 (2% EDTA- Na_2 + 0.7% NaCl) 抗凝, 抗凝剂: 全血 = $1:9$, 离心 ($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 分离富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP), 按本实验室常规制备洗涤过的血小板^[4]。计数调到 $2.5 \times 10^7/\text{ml}$, 取 $100 \mu\text{l}$ 血小板悬浮液分别与不同浓度的 764-3 ($12.5, 25, 50, 100, 125, 250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 室温孵育 15 min , 血小板洗涤液 (Hepes 液) 作为对照, 然后加入凝血酶 $0.5 \text{ U}/\text{管}$, 诱导 5 min , 再加入等体积的血小板固定液 (含 0.2% 戊二醛的 Hepes 液), 30 min 后离心 ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 用含有 0.35% BSA 的 Hepes 液洗一次后, 用 0.5 ml 相同溶液悬浮, 待测 $\alpha\text{-GMP-140}$ 和 $\text{MGP I}_b/\text{III}$ 复合物。

1.3 血小板膜 $\alpha\text{-GMP-140}$ 测定^[5]

取上述血小板悬液, 加入 ^{125}I 标记的 S-12 (每管 $20000 \text{ Ci} \cdot \text{min}^{-1}$), 4°C 过夜, 用上述含 BSA 的 Hepes 液洗三次, 用 γ 计数器计数, 结果以 $\alpha\text{-GMP-140}$ 分子数/血小板表示。

1.4 $\text{MGP I}_b/\text{III}$ 复合物测定^[6]

用 ^{125}I 标记的 XH-3 单抗与血小板孵育, 其它同 $\alpha\text{-GMP-140}$ 测定。

1.5 内皮细胞培养

按文献^[7]方法培养 HUVEC, 将 0.1% 胶原酶注入脐静脉, 30 min 后将消化下的内皮细胞加入培养皿中, 细胞在含 20% 灭活的小牛血清、青链霉素、肝素 ($12 \text{ U}/\text{ml}$) 和肉皮细胞生长因子的 M199 溶液中生长, 待融合后传 $2\sim4$ 代。所有实验用的细胞均种在用纤维连接蛋白 (fibronectin) 包被的 96 孔板上 (20000 细胞/孔), 置 37°C 培养 24 h , 细胞融合后备用。

1.6 TM 测定

融合的单层 HUVEC 与不同浓度的 764-3 ($6, 25, 12.5, 25, 50, 100, 125, 250, 500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 在 37°C

孵育 24 h , 用不加药的完全对照液作为对照, 实验前 HUVEC 用冷的 PBS 洗一次。

1.6.1 分子数 加入 ^{125}I 标记的 TM 单克隆抗体 XH-4 (30000 cpm), 4°C 过夜, 用 TEN 液 ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl) 洗三次, γ 计数器计数^[8]。

1.6.2 活性 全过程在 37°C 下进行。首先加凝血酶 $1 \text{ U}/\text{孔}^{-1}$, 诱导 5 min , 再加入蛋白 C $100 \mu\text{g}/\text{孔}^{-1}$, 孵育 30 min , 然后加 Hirudin $1 \text{ U}/\text{孔}^{-1}$, 孵育 15 min 终止反应。最后加入显色底物 S_{2366} $100 \mu\text{g}/\text{孔}^{-1}$, 2 h 后在酶标仪上测 OD 值 (波长 410 nm)^[9]。

1.7 数据处理

全部结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 t 检验法计算统计学差异。

2 结果

2.1 764-3 对人血小板膜表面 $\alpha\text{-GMP-140}$ 分子表达的影响

764-3 ($12.5\sim500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 明显抑制血小板膜 $\alpha\text{-GMP-140}$ 的分子数, 剂量与效应相关, 半数有效量 (50% effective dose, ED_{50}) 为 $81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure)。

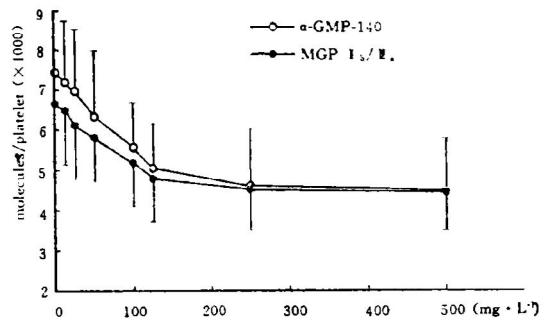


Figure. Effect of 764-3 on the expression of $\alpha\text{-GMP-140}$ and $\text{MGP I}_b/\text{III}$ complex on human platelet surface, $\bar{x} \pm s$, $n=7$.

2.2 764-3 对人血小板 $\text{MGP I}_b/\text{III}$ 复合物分子表达的影响

与对血小板 $\alpha\text{-GMP-140}$ 分子表达的结果相似, 764-3 也明显抑制血小板膜 $\text{GP I}_b/\text{III}$ 复合物的分子数, 剂量与效应相关, ED_{50} 为 $62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure)。

2.3 764-3 对 HUVEC 表面 TM 分子数

和活性的影响

相似剂量范围的 764-3 明显增加 HUVEC 表面 TM 分子数和活性。均呈现剂量依赖性关系。在最大效应组与二者分别较对照组高 2.1 倍和 1.5 倍 (Table)。

Table. The effects of 764-3 on expression and activity of TM on the surface of HUVEC.

764-3 (mg·L ⁻¹)	n	molecular numbers of TM on HUVEC (×1000)	TM activity (unit/ml)
0	7	36±1.9	10.2±1.3
12.5	7	35.5±2.3	12.0±1.4
25	7	51±3.1 * *	15.6±2.4 *
50	7	74±4.1 * *	17.2±1.5 * *
100	7	81±3.8 * *	20.1±2.3
125	7	82.4±4.2 * *	23.6±2.0 * *
250	7	112±4.2 * *	25.7±1.8 * *
500	7	109.8±3.9 * *	25.3±1.6 *

* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, compared with control.

3 讨论

α -GMP-140 是存在于血小板 α 颗粒膜上的糖蛋白, 在静止状态下, 血小板表面 α -GMP-140 很少, 当受到刺激时, α 颗粒膜迅速与浆膜融合, 释放颗粒内容物, α -GMP-140 得以在活化的细胞表面暴露和表达, α -GMP-140 可作为血小板发生释放反应的一个指标^[16]。前已提及, 764-3 抑制血小板聚集和 TXA₂ 释放, 本文结果表明 764-3 还抑制血小板 α -GMP-140 分子表达, 再次提示该药为一种较强的血小板功能抑制剂。

已知 MGP I_b/III_a 复合物由 MGP I_b 和 III_a 聚合而成, 当诱导剂如 ADP、肾上腺素、凝血酶等刺激血小板时, MGP I_b/III_a 复合物构型发生改变, 产生纤维蛋白原受体活性, 引起血小板聚集。因此, 血小板 MGP I_b/III_a 复合物与血小板聚集密切相关^[8]。764-3 抑制 MGP I_b/III_a 复合物的分子数, 看来是其抑制血小板聚集的机理。

TM 是一种糖蛋白, 存在于多种血管壁的内皮细胞膜表面, 通过与凝血酶结合形成复合物, 使凝血酶的促凝活性下降, 具有强的

抗凝作用^[11]。764-3 明显增加 TM 的分子表达和活性, 这也可能是 764-3 及丹参具有活血化瘀、抗血栓形成的作用机理之一。

综上所述, 764-3 可能是一种很有前途的血小板功能抑制剂和抗血栓药。

参考文献

- 汪 钟, 张 宏, 龙敏慧, et al. 丹参有效成份 764-3 对血小板聚集和花生四烯酸代谢产物的影响. 中国医学科学院学报, 1994, 16: 139~43.
- 张健民, 陈文杰, 钱冠清. 764-3 对大鼠血管及牛主动脉内皮细胞释放组织血浆素原激活物的作用. 中华血液学杂志, 1991, 12: 453~455.
- Fraker PJ, Speck LC. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetra chloro-3a,6a-diphenylglycluril. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978, 80: 849~857.
- 王 玲, 汪 钟. 毛冬青甲素对血小板激活时钙流动的影响. 中西医结合杂志, 1989, 9: 688~71.
- Wu GX, Li FG, Li PX, et al. Detection of activated platelets using activation-dependent monoclonal antibody (sz-51) in clinical disorders. *Nouv Rev Fr Hematol*, 1992, 34: 31~35.
- Shattil SJ, Hoxie JA, Michael Cunningham, et al. Changes in the platelet membrane glycoprotein I_bIII_a complex during platelet activation. *J Biol Chem*, 1985, 260: 11 107~11 114.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2 745~2 756.
- 周泉生, 赵益明, 白 霞, et al. 血管内皮细胞血栓调节蛋白放射免疫测定法的建立. 中华血液学杂志, 1991, 12: 489~490.
- Maruyama I, Majerus PW. The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 lung cancer cells. *J Biol Chem*, 1985, 260: 15 432~15 438.
- Li FG, et al. Detection of plasma α -granule membrane protein (GMP) 140 using radiolabeled monoclonal antibodies in thrombotic diseases. *Haemostasis*, 1993, 23: 121
- 白建平, 汪 钟. 内皮细胞促凝与抗凝作用机理的研究进展. 中国药理学通报, 1993, 9: 1~3.

(本文 1994-11-26 收到)