

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2005)13-06-0714-03

## 在流动状态下蜂胶对血小板与胶原粘附功能的影响

张云香<sup>1</sup>, 李伟<sup>1</sup>, 李清<sup>2</sup>, 吴亚平<sup>3</sup>, 王家富<sup>1</sup>

(1. 泰山医学院病理生理学教研室; 2. 泰安市中心医院药剂科, 山东省泰安市 271000; 3. 乌德勒兹大学, 荷兰)

[关键词] 病理学与病理生理学; 蜂胶; 血小板; 粘附; 胶原; 血管损伤

[摘要] 目的 探讨蜂胶提取液对血小板与胶原粘附功能的影响。方法 采用体外灌注法, 复制血管内膜创伤模型, 在剪切应力为 1 000/s 时, 血液流经胶原膜后, 测量血小板粘附面积。加入 24% 的乙醇作阴性对照组, 终浓度为 0.1g/L 的 24% 乙醇蜂胶提取液为实验组, 同浓度的阿魏酸作阳性对照组。结果 阴性对照组与实验组相比较, 胶原膜表面血小板粘附面积从 24.0% 降至 11.5%, 经统计学处理有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 阳性对照组胶原膜表面血小板粘附面积与阴性对照组相比, 差异亦有非常显著性统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 但与实验组比较, 血小板粘附面积无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。结论 蜂胶乙醇提取液能明显降低血小板在胶原膜表面的粘附。

[中图分类号] R364

[文献标识码] A

## Effects of Propolis on Blood-Platelet Adhesion to Collagen in Flow

ZHANG Yur-Xiang<sup>1</sup>, LI Wei, LI Qing<sup>2</sup>, WU Ya-Ping<sup>3</sup>, and WANG Jia-Fu<sup>1</sup>

(1. Taishan Medical College, 2. Department of Agent, Taian Central Hospital, Taian of Shandong Province, 271000 China; 3. Department of Hematology, Medical Center of Utecht University, Holland)

[KEY WORDS] Propolis; Adhesion; Collagen; Intima injury

[ABSTRACT] **Aim** To investigate effects of Propolis-ethanol extract on platelet adhesion to collagen function. **Methods** Intima injury model was copied by using vitro perfusion. Platelet coverage on collagen was measured when shearing stress was 1000/s after blood passing collagen surface. We set three groups: negative control group (24% ethanol), experimental group (0.1 g/L, 24% Propolis-ethanol extract), positive control group (0.1 g/L, ferulic acid). **Results** Platelet coverage in experimental group was decreased from 24.0% to 11.5%, there was significant difference than that in negative control group ( $P < 0.01$ ); There was no significant difference between experimental group and positive control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** Propolis-ethanol extract could decrease the platelet adhesiveness area on collagen surface.

血管内皮损伤后, 胶原及其他血管内皮下的基质蛋白暴露, 血液中的血小板通过血管性假血友病因子 von Willebrand 因子 (vWF) 粘附与胶原表面同时被激活, 并释放多种血小板因子, 而启动动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的发生发展, 故抑制血小板的粘附功能是防止 As 发生的关键。蜂胶是蜜蜂采集松树和杨树等植物的芽苞分泌物和树脂等并混入上颚腺分泌物混合而成的一种胶状物。其消炎、抗肿瘤及免疫调节作用研究甚多<sup>[1,2]</sup>, 但改善血小板活性的形态学研究尚未见报道, 本实验运用体外灌注的方法, 研究蜂胶对血小板在胶原表面粘附功能的影响, 现总结如下。

## 1 材料与方法

## 1.1 试剂与设备

胶原购于 sigma 公司, 阿魏酸 (ferulic acid, FA) 购于国药集团化学试剂有限公司, 蜂胶乙醇提取液 (ethanol extract propolis, EEP) 自制, 肝素钠系天津市生物化学制药厂生产; 牛血清白蛋白 (BSA) 购于上海伯奥生物科技有限公司, 乙醇和甲醇均为分析纯。体外灌流设备——灌流池系荷兰乌特勒兹大学血栓与止血实验室提供, 恒温水浴箱系宁波新芝生物科技股份有限公司生产, 微量注射泵 (WZ-50G) 系浙江大学医疗器械厂生产, 循环水式多用真空泵 (SHB-④) 系郑州长城科工贸有限公司生产; Ix51 倒置式基础型显微镜 (OLYMPUS B × 51) 及 Image-Pro 图像处理系统。

## 1.2 蜂胶提取

采集新鲜的泰山松柏蜂胶, 用 24% 乙醇作溶剂<sup>[3]</sup>, 参照文献<sup>[4]</sup>的方法略加改进提取蜂胶。蜂胶提取液中蜂胶含量为 2.16%, 提取液蜂胶中总黄酮含量为 7.28%, 铅含量 0.165PPm。将提取液置棕色

[收稿日期] 2005-04-22 [修回日期] 2005-10-28

[基金项目] 山东省教育厅基金 (J00K62)

[作者简介] 张云香, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。通讯作者王家富, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, 联系电话 0538-6229902, E-mail 地址为 jfwang@tsmc.edu.cn。

瓶中 4℃ 保存备用。

### 1.3 标本制备

分别抽取 10 天内未服用任何药物的 3 例健康人静脉血 20 mL, 其中男性 2 例, 女性 1 例。注入预先加有肝素的试管中立即充分混匀。

### 1.4 胶原膜的制备

用 50 mmol/L 冰乙酸溶解人  $\alpha_1(\text{I})$  型胶原, 使浓度为 1 g/L, 用喷雾器将其均匀喷洒在洁净的 20 mm × 20 mm 的盖玻片上, 大约 30  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , 晾干, 1 h 后用 1% 的 BSA/HEPES 封闭 10 min。

### 1.5 血液灌注实验

参照文献[5], 盖玻片用胶原包被如图 1 所示, 将胶原膜向下, 覆盖在灌注池上面, 灌注池为一高 0.1 mm 宽 2 mm 小槽, 与上方的盖玻片围成一个管腔。调试灌注装置使切应力 1 000/s, 血液流速为 10 mL/h。实验用防凝血液置于 37℃ 预温 5 min 后, 由外接管道单向注入灌注池。灌注时间 5 min。灌注完毕, 取下盖玻片用 HEPES 冲洗残留液体, 1.25% 的戊二醛室温固定 10 min 或 4℃ 过夜, 甲醇脱水, 晾干, May-Gr $\cdot$ nwald-Giemsa 染色。每组实验至少重复 3 次。用 Ix51 倒置式基础型显微镜观察血小板在胶原膜表面的粘附情况, 高倍镜下采图, 每张盖玻片连续采图 20 幅, 传输于计算机。3 张盖玻片累计做为一个实验组数据。用 Image-Pro 图像处理系统测量血小板的粘附面积百分比, 以评价血小板在胶原膜表面的粘附功能。

### 1.6 实验分组

实验分为三组进行: 对照组为 24% 乙醇, 蜂胶组为蜂胶乙醇提取液, 阿魏酸组为阿魏酸乙醇溶液, 作为阳性对照。分别取上述 3 种试剂加入抗凝血中混匀, 使其在血液中的终浓度均为 1.0 g/L。

### 1.7 统计学处理

实验数据采用  $\bar{x} \pm s$ , 进行单因素方差分析。应

用 Graphpad Prism 4.0 和 Graphpad Instat v3.0 统计软件处理。

## 2 结果

### 2.1 灌注装置

实验所用灌注装置如图 1 所示。

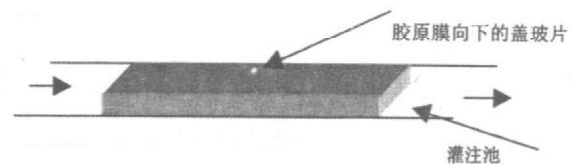


图 1. 灌注装置示意图 图中箭头示血液灌注方向。

### 2.2 蜂胶影响血小板与胶原粘附

当血液流经  $\alpha_1(\text{I})$  型胶原膜后, 可观察到血小板粘附于胶原膜表面。对照组血小板分布密度较大且有血小板聚集块形成。蜂胶组血小板分布稀疏, 密度较均匀, 如图 2B (Figure 2B) 所示。血小板粘附于胶原的检测结果见表 1 (Table 1)。与对照组比较, 蜂胶组血小板粘附面积明显减少 ( $P < 0.01$ ), 阿魏酸组血小板粘附面积也明显减少 ( $P < 0.01$ ); 蜂胶组较阿魏酸组血小板粘附面积略少, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1. 血小板在胶原膜表面的粘附面积 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Result of platelet adhesiveness area on collagen surface

| 分组   | n  | 粘附率                            |
|------|----|--------------------------------|
| 对照组  | 60 | 24.0% $\pm$ 5.2%               |
| 蜂胶组  | 62 | 11.5% $\pm$ 2.6% <sup>a</sup>  |
| 阿魏酸组 | 57 | 13.0% $\pm$ 2.7% <sup>ab</sup> |

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P > 0.05$ , 与蜂胶组比较。

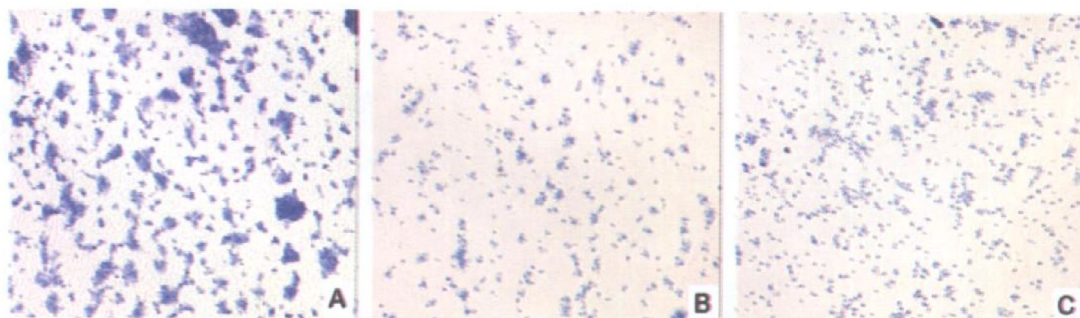


图 2. 血小板在胶原蛋白膜表面的粘附状况 (400×) A 为对照组, B 为蜂胶组, C 为阿魏酸组。

Figure 2. Platelet adhesive situation on collagen surface (400×)

### 3 讨论

动脉粥样硬化(As)发病机理主要有3种学说:脂质浸润学说、血栓源学说和损伤反应学说。血栓源学说认为As的发生与血管内皮损伤、血小板粘附、聚集和血栓形成密切相关。近年来研究<sup>[6]</sup>发现血小板在As的发病过程中起重要作用。

正常情况下血小板在血液循环中处于静息状态,其表面的GPⅡb/Ⅲa复合物无结合配基的活性,但在被激活过程中血小板质膜GPⅡb/Ⅲa的构型发生变化,暴露出GPⅡb/Ⅲa内配体结合位点,同时血小板内储存的GPⅡb/Ⅲa复合物也释放到血小板表面,均有利于胶原等配体与血小板结合。当血管内膜损伤,其下胶原等组织暴露。促使血小板与受损的内皮细胞粘附,进而活化血小板。活化的血小板释放ADP、血栓素A<sub>2</sub>和第Ⅰ因子等活性物质,其又可致血管内皮损伤和内皮细胞增殖<sup>[7]</sup>、促进脂质浸润、平滑肌细胞迁移和增殖及抑制溶栓机制等变化,都有利于As形成。故抑制血小板活化与粘附对预防As发生和发展具有重要意义。

蜂胶是由蜜蜂生产的天然产物,在医学上的应用日渐广泛,对心血管疾病的防治研究也在逐渐深入。钱荣华等<sup>[8,9]</sup>观察到蜂胶不仅能降低胆固醇和甘油三酯,还可显著降低血液粘稠度,改善血液流变性。文献<sup>[10]</sup>报道,蜂胶能使血液中TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8降低,炎性抑制因子IL-10升高,从而间接抑制血小板在损伤内膜处的粘附。本实验模拟了人体血液循环系统,测量血小板在胶原膜表面的百分粘附面积百分比,能直接反映出血小板与胶原膜粘附的活性变化。光镜下发现,对照组中血小板在胶原膜表面有明显的聚集块形成,而EEP组和FA组呈散在分布,且血小板粘附率明显降低,未见血小板凝

集块形成,这表明终浓度为0.1 g/L蜂胶乙醇提取液和阿魏酸乙醇溶液对血小板与胶原的粘附活性有显著抑制作用。

蜂胶中含有黄酮、阿魏酸、咖啡酸等300多种成分<sup>[11]</sup>,其黄酮含量最为丰富。经测定本实验用蜂胶乙醇提取液中黄酮含量为7.28%,说明蜂胶的抗血小板粘附功能可能与其黄酮类化合物有密切关系。这为As防治研究提供了一条新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Han S, Sung KH, Yim D, Lee S, Cho K, Lee CK, et al. Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis. *Arch Pharm Res*, 2002, **25** (6): 895-902
- [2] Orsolich N, Sver L, Terzic S, Tadic Z, Basic I. Inhibitory effect of water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action. *Nutr Cancer*, 2003, **47** (2): 156-163
- [3] De Lange DW, Van Golden PH, Scholman WL, Kraaijenhagen RJ, Akkerman JW, Van De Wiel A. Red wine and red wine polyphenolic compounds but not alcohol inhibit ADP-induced platelet aggregation. *Eur J Intern Med*, 2003, **14** (6): 361-366
- [4] 姜玉锁,张春香,张映明,武建亮. 不同浓度乙醇对蜂胶中的铅提取效果的研究. *养蜂科技*, 2003, **30** (1): 2-4
- [5] Wu Y-P, Tom Vink, Marion Schiphorst, van Zanten GH, Martin JW, Jsseldijk I, et al. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von willebrand factor-glycoprotein Ib interaction and inhibited by von willebrand factor-glycoprotein IIIb/IIIa interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (6): 1661
- [6] 何继强,秦彦文. 血小板与动脉粥样血栓. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 286-306
- [7] 田庆印,吴葆杰. 氧化型低密度脂蛋白与血栓形成. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 279-283
- [8] 钱荣华,赵斐,竹剑平. 蜂胶降血脂作用的实验研究. *心脑血管病防治*, 2003, **3** (4): 24-25
- [9] 栾金水,王南舟,田路. 蜂胶的药理作用研究. *中药材*, 2000, **23** (6): 346-348
- [10] Barak V, Birkenfeld S, Halperin T, Kalickman I. The effect of herbal remedies on the production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Isr Med Assoc*, 2002, **4** (11): 919-922
- [11] 胡福良,玄红专,李英华. 蜂胶的化学成分和植物来源的研究进展. *中国现代应用药学杂志*, 2002, **19** (6): 469-471

(此文编辑 胡必利)