

体外灌注实验测定丹酚酸 B 对小鼠血小板粘附功能的影响

韩纪举¹, 吴亚平^{1,2}, 赵晓民¹, 蔡洪信¹, 张 风¹, 夏作理¹

(1. 泰山医学院生命科学研究所以, 山东省泰安市 271000; 2. 荷兰乌特勒兹大学医学中心血液学系)

[关键词] 病理学与病理生理学; 丹酚酸 B; 血小板; 血液灌注; 鼠胶原; 粘附; 切变率

[摘要] 目的 探讨不同浓度丹酚酸 B 对小鼠血小板粘附凝集功能的影响。方法 用不同浓度的丹酚酸 B 加入小白鼠血液中, 以生理盐水做对照, 采用体外血液灌注的方法, 在低切变率(300 S^{-1})下观察血小板在胶原蛋白基质上的粘附形态, 计算粘附面积。结果 浓度为 400 mg/L、800 mg/L 及 1 200 mg/L 的丹酚酸 B 组血小板粘附面积分别为 $9.4\% \pm 1.2\%$ 、 $7.6\% \pm 1.1\%$ 和 $3.1\% \pm 0.5\%$, 而对照组血小板粘附面积为 $15.9\% \pm 2.6\%$, 组间比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); 对照组血小板多粘附聚集成块, 单个粘附少见, 而丹酚酸 B 作用组随浓度增加, 形态多见疏松散在、单个舒展的三角形或多角形。结论 利用鼠胶原蛋白包被膜进行血小板的体外灌注实验, 具有方便、直观地研究血小板的体外粘附面积和形态的优点, 同时表明丹酚酸 B 具有明显的抗血小板粘附凝集作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Salvianolic Acid B on Mouse Platelet Adherence Function

HAN Ji Ju¹, WU Ya Ping^{1,2}, ZHAO Xiao Min¹, CAI Hong Xin¹, ZHANG Feng¹, and XIA Zu Li¹

(1. Institute of Basic Medicine, Taishan Medicine College, Tai'an 271000, China; 2. Department of Hematology Medical Center of Utrecht University, Holland)

[KEY WORDS] Salvianolic Acid B; Platelet; Hemoperfusion; Mouse Collagen Protein; Adhesion; Shear Rate

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of different concentrations of salvianolic acid B on mouse platelet adherence function. **Methods** After different concentrations of salvianolic acid B were added into mouse blood, the adherence appearance and area of platelet on collagen protein were observed and calculated by hemoperfusion in vitro at low shear rate (300 S^{-1}), meanwhile normal saline served as the control. **Results** Adherence area of platelet of different concentrations of salvianolic acid B group (400 mg/L, 800 mg/L and 1 200 mg/L) and normal saline were $9.4\% \pm 1.2\%$, $7.6\% \pm 1.1\%$, $3.1\% \pm 0.5\%$, $15.9\% \pm 2.6\%$. There was significant difference in adherence area and appearance of platelet between different concentrations of salvianolic acid B group and control group ($P < 0.001$), and there was significant difference in adherence area between 400 mg/L and 800 mg/L salvianolic acid B ($P < 0.05$), 400 mg/L and 1 200 mg/L salvianolic acid B ($P < 0.001$), 800 mg/L and 1 200 mg/L salvianolic acid B ($P < 0.001$). In control group platelet agglutinated into pieces and the adherence of single platelet was a rare condition. In experimental group the adherence of platelet decreased with the increase of concentration of salvianolic acid B and the platelet adhered loosely and there were many single spreading triangle or polygon platelets. **Conclusion** Hemoperfusion in vitro by using slide coated with collagen protein is convenient and macroscopic to study the adherence area and appearance of platelet in vitro. Experimental results can reflect salvianolic acid B has conspicuous anti-adherence and anti-agglutination effects on platelet.

丹参属唇形科鼠尾草属植物, 丹参水溶性有效成分, 特别是丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 是丹参的主要水溶性成分, 是传统的活血化瘀中药, 常用于治疗心脑血管疾病。血小板聚集功能在生理性止血和病理性血栓形成中起重要作用。本研究采用体外血液灌注的方法, 探讨丹酚酸 B 对小鼠血小板聚集功能的影响, 初步评价丹酚酸 B 抗血栓形成的作用及其可能的机制, 为丹酚酸 B 广泛应用于防治血

栓性疾病提供进一步的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

肝素钠(天津市生物化学制药厂); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 上海伯奥生物科技有限公司); 乙醇和甲醇均为分析纯。丹酚酸 B 购自中药固体制剂制造技术国家工程研究中心(批号: 1041-040402)。昆明系雄性小鼠共 40 只, 体重 25 ± 2 g, 购自山东米歇尔生物制品有限公司。

1.2 仪器

体外灌注池由荷兰乌特勒兹大学血栓与止血实验室提供; 恒温水浴箱(宁波新芝生物科技股份有限

[收稿日期] 2007-05-29 [修回日期] 2007-11-26

[作者简介] 韩纪举, 高级实验师, 主要从事血液学的基础与临床研究, E-mail 为 jihan@tsmc.edu.cn。通讯作者夏作理, 教授, 博士生导师, 研究方向为老年医学。吴亚平, 博士, 教授, 研究方向为凝血与止血。

公司); BT-100B 数显恒流泵(上海沪西分析仪器厂); 循环水式多用真空泵(郑州城科工贸有限公司 SHB-III); BX51 型显微镜(OLYMPUS BX51) 及 Image-Pro Plus-Version 4.0 for windows™ 图像采集分析处理系统。

1.3 丹酚酸 B 溶液制备

精确称取 1.2 mg 丹酚酸 B 纯品加入 1 mL 生理盐水溶解成 1 200 mg/L。该药品现配避光。

1.4 实验分组

实验分为 400 mg/L、800 mg/L 和 1 200 mg/L 丹酚酸 B 溶液三个实验组; 以生理盐水替代丹酚酸 B 溶液为对照组。每组均随机取 10 只小鼠。

1.5 防凝血制备

顺畅抽取各实验组及对照组小鼠心脏血, 立即分别注入预先加有肝素(15 kU/L) 试管中充分混匀。

1.6 鼠尾胶原蛋白及鼠尾胶原蛋白膜制备

鼠尾胶原蛋白制备参照方法[1]; 用制备的鼠尾胶原蛋白(100 μL/片), 使之均匀覆盖于 18 mm × 18 mm 的盖玻片上, 置湿盒内、室温 24 h。晾干后用 1% BSA/HEPES(1 g BSA 加入 10 mmol 的 HEPES 100 mL 混匀) 封闭 10 min, 备用。

1.7 血液灌注实验

参照 Wu 等^[2] 方法, 模拟体内血管, 设计体积固定的灌注池。将包被有鼠尾胶原的盖玻片覆盖在灌注池上面, 灌注池与上方的盖玻片围成一个密闭管腔, 在恒定温度下(37℃) 使血液在一定切应力作用下通过管腔, 观察血小板在盖玻片上粘附的面积。本实验切应力为 300 S^{-1} , 血液流速为 3 mL/h。实验用的防凝血液加入不同浓度丹酚酸 B 后置于 37℃ 温育 30 min 后, 由外接管道单向注入灌注池, 灌注时间 5 min。每份血液重复 3 次。灌注完毕后, 取下盖玻片用 HEPES 液冲洗残留血液后, 即刻用 1:40 的戊二醛/HEPES(1 份 50% 戊二醛比 40 份 10 mmol-HEPES 液) 固定, 室温 10 min, PBS 漂洗玻片, 甲醇脱

水、固定 5 min, May-Grünwald-Giemsa 染色; 以水漂洗干净, 凉干, 常规封片; 用 BX51 型显微镜油镜下(100 ×) 观察血小板在盖玻片胶原膜表面的附着情况, 利用 Image-Pro Plus-Version 4.0 for windows™ 图像采集处理系统采图, 每张盖玻片采图 10 幅, 测量视野内血小板的粘附面积所占百分比, 并观察粘附血小板的形态, 以评价血小板粘附功能。

1.8 统计学处理

采用 $\bar{x} \pm s$ 表示各组血小板粘附面积, 实验各组的比较, 采用单因素方差分析。应用 Graphpad Instat v 3.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 小鼠血液灌注后血小板的粘附面积

浓度为 400 mg/L、800 mg/L 和 1 200 mg/L 的丹酚酸 B 组血小板的粘附面积均显著低于生理盐水对照组($P < 0.001$)。且丹酚酸 B 组血小板粘附面积随丹酚酸 B 浓度的增加而减少($P < 0.001$, 表 1)。

表 1. 小鼠血液灌注后血小板粘附面积 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	血小板粘附面积
对照组	15.9% ± 2.6%
400 mg/L 丹酚酸 B 组	9.4% ± 1.2% ^{abc}
800 mg/L 丹酚酸 B 组	7.6% ± 1.1% ^{ac}
1200 mg/L 丹酚酸 B 组	3.1% ± 0.5% ^a

a 为 $P < 0.001$, 与对照组比; b 为 $P < 0.05$, 与 800 mg/L 丹酚酸 B 组比; c 为 $P < 0.001$, 与 1 200 mg/L 丹酚酸 B 组比。

2.2 小鼠血液在鼠胶原包被膜上的粘附形态

在不同条件下血液体外灌注后血小板的粘附情况见图 1。生理盐水对照组血小板的粘附形态呈聚集团块状, 单个少见。丹酚酸 B 作用组随浓度增加, 血小板粘附聚集减少, 形态多见疏松散在、单个舒展的三角形或多角形。

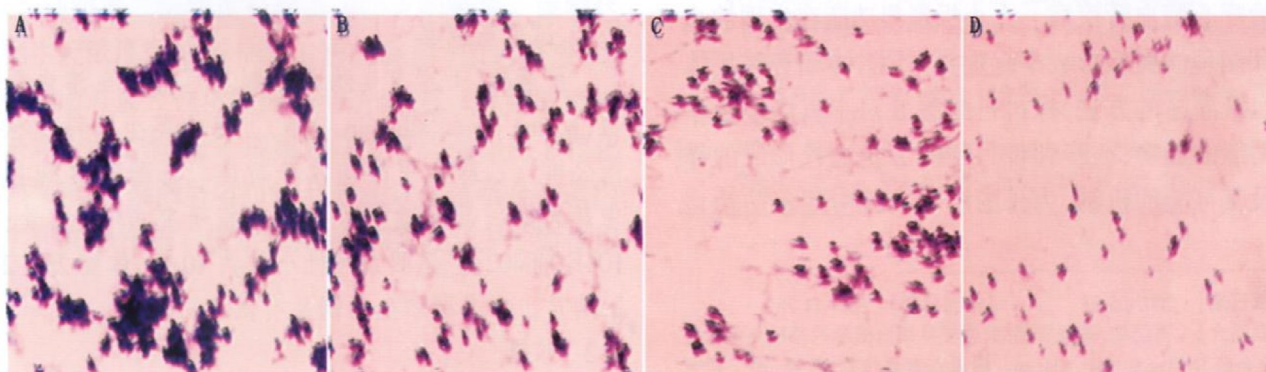


图 1. 丹酚酸 B 对小鼠血小板粘附功能的影响 A 为对照组, B、C 和 D 分别为 400 mg/L、800 mg/L 和 1 200 mg/L 丹酚酸 B 组。

3 讨论

血小板活化聚集与血栓形成和发展密切相关,血小板活化聚集后,可导致血栓形成,研究药物对血小板活化聚集的影响,对防治血栓性疾病和开发新药至关重要。丹酚酸 B 是丹参水溶性成分中重要的有效成分,对心脏和脑损伤有保护作用,对血栓形成也有影响。血小板激活是指血小板在刺激物(诱导剂)作用下发生的各种改变,如变形、粘附和聚集等,这些改变可以先后出现,或以不同组合出现,或单独出现,其中血小板的活化聚集是血小板的重要改变形式。循环血液中血小板与异物表面相互作用后具有伸展特性。伸展为血小板激活后的形态改变,即血小板变圆、周围伸出伪足、胞浆伸展和颗粒趋中运动。在电镜下可见血小板分为圆型、树突型、过渡型、展平型、崩溃型及聚集型。血小板活化始于粘附配体和兴奋性激动剂与其相应血小板膜受体的结合,并且通过酶、底物及协同因子构成的蛋白-蛋白、蛋白-脂质作用引起的细胞内信号反应起放大作用。血小板活化的主要诱导剂是胶原、血管性假血友病因子和 α 凝血酶等^[3]。

我们利用自制的体外血液灌注系统,模拟体内血液在血管内的流动状态,能够非常直观观测到在包被有胶原蛋白盖玻片上的血小板的流动及粘附状况。该体外灌注系统,具有结构科学合理、易于操作、重复性好、观察血小板形态直观且有利于对粘附血小板进行各种免疫学或免疫组织化学染色等优点。借助该方法观察在体外灌注时不同浓度的丹酚酸 B 对小鼠血小板粘附功能及形态的变化,能够克服以往无法直观血小板形态变化的不足。本研究结果表明,不同浓度的丹酚酸 B 对小鼠血小板的凝集具有明显的抑制作用,并随丹酚酸 B 的浓度升高血小板粘附面积显著降低,提示丹酚酸 B 能够抑制血小板在鼠尾胶原包被膜上的粘附,且血小板的粘附面积与丹酚酸 B 的浓度呈负相关。在没有丹酚酸 B 作用的对照组血小板粘附形态呈聚集团块状,单个血小板少见,而丹酚酸 B 组随着浓度增加血小板形态多见疏松散在、单个舒展的三角形或多角形。血小板形态与血小板功能关系密切,血小板的功能变化是血栓形成原因之一。血小板释放的物质如 ADP、5-羟色胺、儿茶酚胺和前列腺素等又可促进血小板粘附变形以至聚集,从而导致心脑血管内易于

形成血栓。在冠心病中,血小板外形变化为刺激型(血小板伪足形成)增多,血小板粘附性和血小板对各种聚集诱导剂(ADP、肾上腺素、胶原或花生四烯酸)的聚集反应增强^[4]。丹酚酸可影响前列腺素代谢,可能是其抗血栓形成的作用机制之一^[5]。

血小板聚集性和粘附性机制是非常复杂的过程。当血管内壁受损时,血小板粘附于暴露的内皮下胶原纤维或基底膜上是止血的最初步骤,粘附的血小板在胶原刺激下释放 ADP,很快引起附近血小板在该处聚集。另外已经证实几种表面糖蛋白可作为血小板胶原的受体,包括 $\alpha 2\beta 1$ 整合素和 GP ν 、GP Ib/IIIa 型胶原受体等。可能 $\alpha 2\beta 1$ 整合素涉及血小板与各种胶原相互反应,是主要的粘附受体^[6]。而 GP ν 被看作血栓形成的中心环节,其作用已由基因敲除的小鼠模型得到证实。GP ν 参与了血小板聚集物形成、Ca²⁺信号传递、磷脂酰丝氨酸暴露,还通过与 $\alpha 2\beta 1$ 整合素协同作用,介导血小板的早期粘附以及在胶原上沉积^[7]。而 Yang 等^[8]则认为 GP ν 对血小板的粘附不起主要作用,GP Ib/IIIa 和 $\alpha 2\beta 1$ 整合素对粘附起重要作用,且二者显示重叠效应。本实验丹酚酸 B 抗血小板凝集可能是通过抑制血小板释放各种介质和(或)阻止血小板上胶原相关受体与玻片表面的胶原蛋白结合,有待进一步实验证实。

[参考文献]

- [1] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002; 14.
- [2] Wu Y-P, Tom Vink, Marion Schiphorst, van Zanten GH, Martin JW, Jesseldijk I, et al. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by vonwillebrand factor-glycoprotein Ib interaction and inhibited by vonwillebrand factor-glycoprotein IIIb/IIIa interaction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (6): 1 661-667.
- [3] 何继强, 秦彦文. 血小板与动脉粥样血栓[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 286-304.
- [4] 王振义, 李家增, 阮长耿. 血栓与止血[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1996; 378.
- [5] 杜冠华, 张均田. 丹参水溶性有效成分——丹酚酸研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2000, **2** (5): 1 014.
- [6] Farndale RW, Siljander PR, Onley DJ, Sundaresan P, Knight CG, Barnes MJ. Collagen-platelet interactions: recognition and signalling [J]. *Biochem Soc Symp*, 2003, **70**: 81-94.
- [7] Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen induced thrombus formation in flowing human blood [J]. *Blood*, 2004, **103** (4): 1 333-341.
- [8] Yang LC, Wang CJ, Lee TH, Lin FC, Yang BY, Lin CR, et al. Early diagnosis of deep vein thrombosis in female patients who undergo total knee arthroplasty with measurement of P-selectin activation [J]. *J Vasc Surg*, 2002, **35** (4): 702-712.

(此文编辑 许雪梅)