



茵风轮总苷对 ADP 诱导血小板黏附及黏附受体表达的作用

许钺^{1*}, 彭代银¹, 李玉宝¹, 董焰¹, 徐先祥¹, 余世春², 刘青云¹

(1. 安徽中医学院药学院, 安徽合肥 230031;

2. 安徽省安泰医药生物技术有限责任公司, 安徽合肥 230088)

[摘要] 目的: 考察茵风轮总苷对 ADP 诱导血小板黏附及黏附受体表达的影响。方法: 采用体外血小板和内皮细胞黏附模型考查茵风轮总苷对 ADP 诱导血小板黏附的作用; 流式细胞仪检测茵风轮总苷对 ADP 诱导血小板黏附受体(GP Ib, GPIIb/IIIa)表达的影响。结果: 茵风轮总苷(25~50 mg·L⁻¹)可以显著增加 ADP 诱导血小板和内皮细胞的黏附作用($P < 0.05$); 茵风轮总苷具有增强 ADP 诱导血小板黏附受体 GP Ib 表达减少和 GPIIb/IIIa 表达增加的作用。结论: 茵风轮总苷可能通过增强 ADP 诱导血小板膜表面黏附受体表达, 增加血小板黏附来促进凝血过程。

[关键词] 茵风轮总苷; 血小板; 黏附; GP Ib; GPIIb/IIIa

茵风轮 *Clinopodium polycephalum* (Vaniot) C. Y. Wu et Hsuan 习称断血流, 民间用其治疗刀斧砍伤、鼻血、妇科出血等各种出血症。茵风轮总苷(total saponin of *Clinopodium polycephalum*, TSCP)在前期研究中发现止血作用明确^[1-2]。TSCP 在动物止血作用的基础研究中发现其主要环节是收缩血管^[2]和促进血小板黏附聚集^[1]的功能, 但是 TSCP 促进血小板黏附的机制还不清楚, 本文体外考察 TSCP 对 ADP 活化血小板黏附以及黏附受体表达的影响。

1 材料

茵风轮总苷由安徽省安泰医药生物技术有限责任公司提供; 健康无菌脐带由安徽医科大学第一附属医院妇产科、安徽省妇幼保健医院妇产科提供。FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司); M199 培养基(美国 Gibco 公司); FITC-CD41 抗体, FITC-CD42b 抗体(美国 BeckmanCoulter 公司); ADP(美国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 血小板悬液制备 抽取健康成年志愿者新鲜静脉血 20 mL(抽血前 2 周内未服用任何抗血小板药物), 前 2 mL 弃用, 注入含有 3.8% 枸橼酸钠(1:

9) 抗凝溶液的聚丙烯试管内, 上下颠倒轻摇充分混匀, 在 22 °C 下 800 r·min⁻¹ 离心 8 min, 收集富血小板血浆(PRP)。PRP 在 22 °C 下 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 得贫血小板血浆(PPP)用台式缓冲液轻轻洗涤 3 次, 并复悬于台式缓冲液中。

2.2 HUVECS 单层制备及处理 人脐静脉内皮细胞培养参照文献方法[3], 将长满培养瓶的细胞用 0.01% EDTA + 0.125% 胰蛋白酶消化, 收集细胞接种于含有 1% 明胶覆盖的 96 孔板内, 细胞数为 1 × 10⁵ 个/mL, 待细胞生长接近融合, 用于试验。

2.3 TSCP 对血小板和内皮细胞黏附的影响 取上述血浆加入 TSCP(终浓度 12.5, 25, 50 mg·L⁻¹) 室温作用 30 min, 然后各管加入 ADP(终浓度 0.5 mg·L⁻¹), 对照组仅加 ADP, 作用 5 min。洗涤离心收集, 台式缓冲液混悬, 以每孔 100 μL(2 × 10⁶ 个/孔) 加入 HUVECs 单层细胞中, 置 37 °C 培养箱培养 30 min, 小心吸出未结合的血小板悬液, 光镜下计数, 计算血小板黏附率, 每个样本计数 3 次, 取平均值。

血小板黏附率 = (加入血小板计数值 - 未黏附血小板计数值) / 加入血小板计数值 × 100%

2.4 TSCP 对 ADP 活化血小板膜蛋白(GP Ib, GPIIb/IIIa) 的表达影响 取上述 5 μL 血浆加入 TSCP(终浓度 12.5, 25, 50 mg·L⁻¹) 30 μL, 室温作用 30 min, 然后各管加入 2 mg·L⁻¹ ADP 10 μL, 对照组仅加 ADP, 作用 5 min。然后分别加入 FITC-CD42b, FITC-CD41 抗体各 5 μL, 室温下避光作用 20 min, 加入 1 mL 含

[稿件编号] 20100208003

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(070413123)

[通信作者] * 许钺, Tel: (0551) 5169038, E-mail: xuafan2008@yahoo.com.cn



1% 预冷多聚甲醛的 PBS 液室温下固定 30 min, 置入冰箱内待上流式细胞仪检测, 用 CellQuest 软件获取并分析 CD42b 和 CD41 的几何平均荧光强度。

3 结果

3.1 TSCP 对 ADP 活化血小板与内皮细胞黏附的影响 血小板经 ADP 活化后明显增加其与内皮细胞的黏附作用, 与空白组 (未加 TSCP 及 ADP) 相比, 黏附率显著增加 ($P < 0.05$), TSCP 在 25, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著增加 ADP 诱导的血小板与内皮细胞黏附 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 TSCP 对 ADP 活化血小板与内皮细胞黏附的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	黏附率/%
对照		11.38 ± 6.99
ADP	2	28.69 ± 7.56 ¹⁾
ADP + TSCP	12.5	32.69 ± 6.71
	25	47.41 ± 9.59 ³⁾
	50	58.56 ± 10.56 ³⁾

注: 与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 ADP 组相比³⁾ $P < 0.05$ (表 2, 3 同)。

3.2 TSCP 对 ADP 抑制血小板膜糖蛋白 GP IIb 表达的影响 血小板经不同浓度的 TSCP 处理后, 再经 ADP 作用, 流式细胞仪分析血小板膜糖蛋白 GP IIb 的表达, ADP 可减少血小板 GP IIb 表达, TSCP 可进一步抑制血小板 GP IIb 表达, 并随着浓度的增加抑制活性增加, 见表 2。

表 2 TSCP 对 ADP 抑制血小板膜糖蛋白 GP IIb 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光强度
对照		951.90 ± 24.13
ADP	25	32.67 ± 18.77 ²⁾
ADP + TSCP	12.5	498.54 ± 23.18
	25	487.68 ± 21.09 ³⁾
	50	438.47 ± 18.63 ³⁾

3.3 TSCP 对 ADP 活化血小板膜糖蛋白 (GPIIb/IIIa) 表达的影响 血小板经 TSCP 预处理后, 能明显提高 ADP 诱导血小板膜糖蛋白 (GPIIb/IIIa) 的表达, 随着浓度增加, 促进作用加强, 见表 3。

4 讨论

血小板通过形成血小板血栓覆盖在损伤部位而

表 3 TSCP 对 ADP 活化血小板表达膜糖蛋白 (GPIIb/IIIa) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光强度
对照		867.49 ± 18.51
ADP	2	971.80 ± 24.93 ²⁾
ADP + TSCP	12.5	1 045.46 ± 34.59 ³⁾
	25	1 063.41 ± 21.09 ³⁾
	50	1 278.49 ± 35.67 ³⁾

形成血管损伤后的首道防线。血小板活化后, 通过信号传导系统上调血小板整合素如 GPIIb/IIIa 复合物的结合力, 导致血小板聚集和血小板血栓形成^[4]。GPIIb 和 GPIIb/IIIa 复合物是血小板膜表面的主要膜糖蛋白。GPIIb 正常情况下均匀分布在血小板膜表面, 当血小板激活时, GPIIb 迅速从膜表面转移到中央管中, 导致膜表面表达量减少。GPIIb 与 vWF 的结合导致血小板信号传导系统激活, 引起血小板颗粒释放及 GPIIb/IIIa 复合物与配基结合力的增强^[5]。

本试验证实 TSCP 可显著增加 ADP 活化的血小板与内皮细胞间的黏附, 并具有剂量依赖性。TSCP 与 ADP 共同作用于血小板后, 血小板膜蛋白表达量较 ADP 单独作用时明显发生改变。应用荧光标记抗体通过流式细胞仪检测相关的血小板膜蛋白, GPIIb 特异性抗体与活化血小板的结合较静息状态下的血小板明显减少。这是可能是因为当血小板激活时, GPIIb 迅速从细胞膜表面转移到与表面膜相连的中央管中, 导致膜表面表达量的减少, 而 TSCP 预处理的血小板, 其膜表面 GPIIb 含量进一步减少。TSCP 还可以上调 ADP 诱导膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 的表达。这说明 TSCP 可通过 ADP 促进血小板活化, 调节血小板膜表面黏附受体的表达, 从而达到促进活化血小板黏附, 加速凝血过程, 这可能是 TSCP 发挥止血作用机制之一。

[参考文献]

[1] 彭代银, 刘青云, 戴敏, 等. 荫风轮总苷止血作用研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 909.

[2] 彭代银, 刘青云, 戴敏, 等. 荫风轮总苷对动物子宫作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(13): 1006.

[3] 陈樱, 刘德敏, 孟东. 人脐静脉内皮细胞体外培养方法的改进[J]. 天津医科大学学报, 2003, 9(3): 318.

[4] Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis[J]. N Engl J Med, 2007, 357(24): 2482.

[5] Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(3): 403.

[责任编辑 张宁宁]