

二苯乙烯苷对血小板聚集和 细胞质游离钙离子浓度的影响*

张又枝, 张玉霖, 杨丽萍, 吴基良

(咸宁学院药学院药理教研室, 湖北 437100)

[摘要] 目的 观察二苯乙烯苷对兔血小板内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)的影响,探讨其抗血小板聚集的作用机制。方法 采用比浊法测定兔血小板聚集功能;双波长荧光探针 Fura-2 测定血小板细胞质内 $[Ca^{2+}]_i$ 。结果 $1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯乙烯苷体外给药对二磷酸腺苷(ADP)和凝血酶引起的血小板聚集有浓度依赖性抑制作用。有无细胞外钙时, $1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 二苯乙烯苷对静息态血小板的 $[Ca^{2+}]_i$ 均无明显影响,但对激活态血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高有明显抑制作用,呈剂量依赖性。结论 二苯乙烯苷抑制血小板聚集的作用机制可能与其抑制血小板细胞质 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高有关。

[关键词] 二苯乙烯苷;血小板聚集;钙

[中图分类号] R282.71;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2010)09-1120-03

Effect of Stilbene Glucoside on Platelet Aggregation and Cytoplasmic Free Calcium Concentration

ZHANG You-zhi, ZHANG Yu-lin, YANG Li-ping, WU Ji-liang (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Xianning College, Xianning Hubei, 437100, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of stilbene glucoside on intracellular free calcium concentration of rabbit platelet, and to probe the possible mechanism of its anti-platelet aggregation. **Methods** Rabbit platelet aggregation and platelet $[Ca^{2+}]_i$ were determined by Born method and double beam fluorescence spectrophotometer method, respectively.

Results Stilbene glucoside $1-10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ inhibited the rabbit's platelet aggregation induced by ADP and thrombin in a concentration-dependent manner *in vitro*. $1-10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ stilbene glucoside had no effect on the resting $[Ca^{2+}]_i$, but inhibited $[Ca^{2+}]_i$ induced by thrombin in a concentration-dependent manner with or without extracellular $[Ca^{2+}]_i$. **Conclusion** Stilbene glucoside markedly inhibits the rabbit platelet aggregation, and the mechanism of which may be related to its depression on the rise of platelet $[Ca^{2+}]_i$.

KEY WORDS Stilbene glucoside; Platelet aggregation; Calcium

二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, THSG)为传统中药何首乌的主要水溶性成分。大量研究发现, THSG 有很多药理作用, 有关 THSG 的研究日渐增多, 已在降血脂、抗衰老、抑制肿瘤等方面显示出功能性, 这在当今日趋老龄化的社会中凸现其重要的研究和开发价值^[1]。笔者研究 THSG 对血小板聚集功能和血小板细胞质内钙离子浓度的影响, 验证其对血小板细胞内钙超载的抑制作用, 进一步研究 THSG 对血小板聚集的影响和机制, 为研究 THSG 的抗血栓作用提供进一步的科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品与动物 THSG(纯度>99%, 华中科技大学

[收稿日期] 2009-12-07 [修回日期] 2010-03-22

[基金项目] * 湖北省教育厅青年基金资助项目(基金编号: Q200728003)

[作者简介] 张又枝(1979-), 女, 湖北浠水人, 讲师, 硕士, 主要从事心血管药理工作。电话: 0715-8272135, E-mail: magiclifezhang@yahoo.com.cn。

同济医学院王嘉陵教授提取); 乙酰羟甲酯(Fura-2/AM, Sigma 公司, 批号: S1052); NN-羧乙基哌嗪乙烷磺酸(HEPES, Amresco 公司, 批号: 5011); 乙二醇双(a-氨基乙基)醚四乙酸(EGTA, Biosharp 公司, 批号: 0732); 曲拉通(TritonX-100, Amresco 公司, 批号: 0556B024); 胎牛血清清蛋白(BSA, 杭州四季青生物工程材料有限公司, 批号: 081204); 凝血酶(THR, Sigma T4648)无钙 HEPES 缓冲液(氯化钠 $145 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钾 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 硫酸镁 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, HEPES10, pH 7.45); ACD 抗凝液(柠檬酸钠 $86 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 柠檬酸 $53 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 葡萄糖 $111 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$); 其他化学试剂均为国产分析纯。日本大耳白兔, δ , 体质量(2.0 ± 0.5) kg, 由湖北省医学科学院提供。

1.2 仪器 LBL-NJ2 血液凝聚仪(北京普利生仪器中心), F4500 型荧光分光光度计(Hitachi. Ltd. Tokyo Japan); 低速离心机(上海安亭科学仪器厂); HQ45Z 恒温摇床(武汉中科科仪技术发展有限责任公司);

pHS-25 数显 pH 计(上海精密科学仪器有限公司);数显恒温水浴锅(金坛市富华仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 富血小板血浆 (PRP) 和贫血小板血浆 (PPP) 的制备 家兔 PRP 及 PPP 的制备见文献[2], 并作修改。以 20% 乌拉坦麻醉动物, 颈总动脉取血, 收集于有抗凝剂的离心管中混匀, 血与抗凝剂比例为 9 : 1。500 r · min⁻¹ 离心, 5 min, 吸取上层富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP), 剩余血液继续离心 2 500 r · min⁻¹ × 10 min 得贫血小板血浆 (platelet-poor plasma, PPP), 按比浊法测定血小板聚集率。

1.3.2 Born 比浊法测定血小板聚集功能 按照“1.3.1”项方法制备家兔的 PRP 和 PPP, 随机均分为 4 组: 对照组, 3 种浓度的 THSG 组, 并用 PPP 调零使 PRP 密度为 (400 ~ 450) × 10⁹ · L⁻¹, 待用。每次取 PRP 200 μL, 分别加入不同浓度的药物或 0.9% 氯化钠注射液, 37 °C 孵育 5 min, 然后加入不同的诱聚剂 ADP (终浓度 5 μmol · L⁻¹), THR (终浓度 200 U · L⁻¹), 按 Born 比浊法测定血小板聚集率^[3], 以血小板最大聚集率作为观测指标, 计算血小板聚集抑制率 (%) = (空白管血小板聚集率 - 给药管血小板聚集率) / 空白管血小板聚集率 × 100%。

1.3.3 Fura-2/AM 标记的兔血小板悬液的制备 兔 PRP 经离心 10 min 得血小板沉淀; 用 HEPES 缓冲液 (pH7.45) 洗涤后, 将血小板悬浮于缓冲液中。将已制备好的细胞悬液加入 Fura-2/AM 至终浓度为 3 μmol · L⁻¹, 37 °C 避光温育 45 min, 使 Fura-2/AM 载入细胞内, 将已负载的血小板悬液 2 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 去掉上清液, 用缓冲液 (pH7.45) 充分洗涤 1 次后, 重新悬浮。调整血小板数至 2 × 10⁸ · mL⁻¹, 锥虫蓝检查细胞活性, 活细胞率 > 95%。悬液分两组: 一组为细胞外含有 1 mmol · L⁻¹ 氯化钙的有钙组, 另一组为含有 1 mmol · L⁻¹ EGTA 无钙组。分别与药物作用 10 min 后, 测定荧光强度。

1.3.4 血小板细胞质游离钙离子 [Ca²⁺]_i 浓度的测定

取一定量负载 Fura-2/AM 的细胞悬液, 以 E_x 300 ~ 400 nm, E_m 500 nm 进行激发光波长扫描, 观察荧光峰值的激发波长, 判断细胞负载情况, 以峰值在约 340 nm 处为最佳负载状态。按以上参数执行双波长测定, 测定分组: 分为静息态和激活态 (加入 THR, 终浓度 200 U · L⁻¹), 静息态和激活态均包括 0.9% 氯化钠注射液组 (NS 组) 和给药组 (THSG 浓度分别为 1, 3, 10 μmol · L⁻¹)。每组测定荧光强度后加入 10% Triton-x-100 破膜剂使 Fura-2 被钙离子饱和, 测得 F_{max} 和 S_{b2}; 再加入 10 mmol · L⁻¹ EGTA, 以充分络合钙离子, 由此测得 F_{min} 和 S_{f2}。浓度计算基本公式:

$$[Ca^{2+}]_i = \frac{K_d \cdot (F - F_{min})}{F_{max} - F} \cdot \frac{S_{f2}}{S_{b2}}$$

公式中钙解离常数 K_d = 224; S_{f2} 为无钙时 Fura-2 所产生的荧光强度, S_{b2} 为钙近于饱和时 Fura-2 所产生的荧光强度, S_{f2}/S_{b2} 即 E_x 380 nm 时的最大和最小荧光值之比; F_{max} 为最大荧光比值 (破膜后的最大比值); F_{min} 为最小荧光比值 (钙被络合后的比值)。

1.3.5 统计学方法 实验数据以均数 ± 标准差表示, 并采用 t 检验进行统计学处理, P < 0.05 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 THSG 对 ADP 和凝血酶诱导家兔血小板聚集的影响 见表 1。可见, 与对照组比较, THSG 体外给药均可剂量或浓度依赖性的抑制由 ADP 和 THR 诱导的兔血小板聚集 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

2.2 THSG 对家兔血小板内 [Ca²⁺]_i 的影响 见表 2。可见, 细胞外 [Ca²⁺]_o 为 1 mmol · L⁻¹ 时: 对照组用 200 U · L⁻¹ THR 刺激后, [Ca²⁺]_i 明显提高, 两组比较差异有极显著性 (P < 0.01); 不同浓度 THSG 作用 10 min 后, 对静息态血小板的 [Ca²⁺]_i 无明显影响 (P > 0.05), 但对激活态血小板 [Ca²⁺]_i 有明显抑制作用 (P < 0.05 或 P < 0.01), 且呈剂量依赖性。细胞外无 Ca²⁺ 时: 静息态的血小板细胞质 [Ca²⁺]_i 用 200 U · L⁻¹ THR 刺激后其浓度也有明显提高, 两组比较, 差异有极显著性

表 1 THSG 对 ADP 和 THR 诱导家兔血小板聚集的影响

Tab. 1 Effect of THSG on platelet aggregation induced by ADP and THR in rabbits

% , $\bar{x} \pm s$

组别	浓度/ (μmol · L ⁻¹)	ADP		THR	
		聚集率	抑制率	聚集率	抑制率
THSG 组	1	57.2 ± 10.6 ^{*1}	12.4	65.4 ± 15.3 ^{*1}	19.9
	3	43.4 ± 9.4 ^{*2}	33.5	52.6 ± 11.6 ^{*2}	35.5
	10	34.5 ± 7.3 ^{*2}	47.2	23.4 ± 9.2 ^{*2}	71.3
对照组	...	65.3 ± 13.0	...	81.6 ± 12.3	...

与对照组比较, ^{*1}P < 0.05, ^{*2}P < 0.01

Compared with control group, ^{*1}P < 0.05, ^{*2}P < 0.01

表2 THSG 对家兔血小板内游离钙离子浓度的影响

Tab. 2 Effect of THSG on cytosolic free Ca^{2+} in rabbit platelet with or without $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ extracellular calcium $\bar{x} \pm s$

组别	浓度/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞外有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$		细胞外无 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$	
		给 THR 前	给 THR 后	给 THR 前	给 THR 后
THSG 组	1	87.86±25.46	168.41±58.56 ^{*1}	51.48±12.73 ^{*2}	125.21±36.36 ^{*1}
	3	89.14±23.86	104.11±23.54 ^{*3}	50.43±13.54 ^{*2}	75.16±30.21 ^{*3}
	10	89.36±26.33	18.93±11.38 ^{*3}	51.54±13.35 ^{*2}	20.35±10.92 ^{*3}
对照组	...	87.57±26.23	202.12±84.65 ^{*4}	52.36±14.47	202.12±84.65 ^{*4}

与对照组比较, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$; 与本组有 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$ 给 THR 前比较, ^{*2} $P < 0.05$; 与本组 THR 前比较, ^{*4} $P < 0.01$

Compared with control group, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$; Compared with the group before THR treatment with $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$, ^{*2} $P < 0.05$; Compared with the group before THR treatment, ^{*4} $P < 0.01$

($P < 0.01$); THSG 作用 10 min 后, 对静息态血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 无明显影响 ($P > 0.05$), 但对激活态血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高有明显抑制作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且随着剂量增大呈剂量依赖性。

3 讨论

血小板在不同诱导剂作用下发生不同的活化反应, 但最终通过增加血小板细胞质 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 而引起血小板活化聚集。 Ca^{2+} 是血小板代谢与功能的一个重要调节因子, 在血小板的变形、聚集、释放反应中都可由血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高触发。血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高可激活肌球蛋白轻链酶, 使肌球蛋白轻链磷酸化而导致肌球蛋白聚合, 因而改变血小板的细胞骨架结构; 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高还可促进包括 TXA_2 等多种 Ca^{2+} 依赖蛋白酶的作用, 调节血小板脂质代谢, 使 TXA_2 的生成增加及血小板释放反应增强。因此血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高是血小板参与血栓形成的重要机制之一^[4]。

本研究结果显示, THSG 浓度依赖性地抑制 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集。在有外钙和无外钙的情况下, THSG 对血小板静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 均无明显影响, 表明 THSG 不影响基础状态下血小板外钙内流和内钙释放。当细胞外 Ca^{2+} 为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 诱导剂诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高主要是由外钙内流引起的^[5], 而无外钙的情况下, 诱导剂诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高主要取决于内钙释放。THSG 能够剂量依赖性的抑制两种条件下由 THR 刺激后的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高幅度, 说明 THSG 既可抑制外钙内流, 又能抑制内钙释放。实验还表明, 当血小板无钙

存在时其静息态 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较外钙存在时其静息态 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 低 40.1%, 与 HALLAM 等^[6] 报道吻合, 表明细胞外钙对维持细胞内钙的稳态有重要作用。

本研究结果还表明, THSG 抗血小板聚集作用可能与其抑制血小板细胞质 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度有关。据报道^[7], 脑卒中患者的血小板活性增强, 而 THSG 具有抗血栓和血小板聚集的作用, 因此该药对于血栓患者可能有一定的辅助治疗意义。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.09.002

[参考文献]

- [1] 鲁 坚, 侯双菊, 千 梅, 等. 二苯乙炔昔的研究进展[J]. 安徽化工, 2006, 141(3):10-13.
- [2] 陈 蓉, 谢梅林, 周 佳. 蛇床子素抑制血栓形成和血小板聚集的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(4): 440-443.
- [3] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学与协和医科大学联合出版社, 1998: 1151.
- [4] 曾福仁, 尹松梅. 血小板细胞质游离钙与血栓性疾病[J]. 中华血液学杂志, 2002, 23(9): 501-502.
- [5] DAI Y, LI J. Transfer mechanism of platelet activation signal[J]. Prog Anat Sci, 1995, 1(2): 149-161.
- [6] HALLAM T J, RINK T J. Responses to adenosine diphosphate in human platelets loaded with the fluorescent calcium indicator quin-2[J]. J Physiol (Lond), 1985, 368(1): 131-138.
- [7] 周 红, 施咏梅, 刘韶华. 血小板激活及血小板参数变化在脑梗死发病机制中的作用[J]. 临床神经病学杂志, 2006, 19(1): 18-21.