

蝙蝠葛碱对二尖瓣狭窄患者血小板膜糖蛋白 IV 再分布的影响

张彦周[△] 刘东旭 李裕舒 冯义柏 毛焕元

内容提要 目的:探讨蝙蝠葛碱对二尖瓣狭窄(mitral stenosis, MS)患者血小板不可逆聚集的影响。方法:用流式细胞仪测定 MS 患者(16 例)动脉血静息状态及凝血酶(0.05U/ml、0.1U/ml、0.5U/ml、1.0U/ml)激活时,血小板膜表面糖蛋白 IV(GPⅣ)及凝血酶敏感蛋白(TSP)分布状况,并与健康人(14 名)比较。结果:静息状态时 MS 患者血小板膜表面 GPⅣ分布显著高于健康人($P < 0.01$),而血小板膜表面 TSP 分布与健康人无显著性差异($P > 0.05$),激活状态时 MS 患者血小板膜表面 GPⅣ、TSP 分布明显高于健康人($P < 0.05$, $P < 0.01$);蝙蝠葛碱(50 μ mol/L)可显著抑制凝血酶诱导的血小板膜 GPⅣ再分布($P < 0.05$, $P < 0.01$),仅抑制较低浓度(0.05U/ml, 0.1U/ml)凝血酶诱导的血小板内 TSP 释放($P < 0.05$, $P < 0.01$),而对较高浓度(0.5U/ml, 1.0U/ml)凝血酶诱导的 TSP 释放无抑制作用。结论:MS 患者动脉血血小板活性及对凝血酶的反应性增高,蝙蝠葛碱可降低 MS 患者血小板不可逆聚集的危险性。

关键词 蝙蝠葛碱 二尖瓣狭窄 血小板 糖蛋白 IV 凝血酶敏感蛋白 凝血酶

Effect of Dauricine on Redistribution of Glycoprotein IV in Platelet Membrane of Patients with Mitral Stenosis
Zhang Yanzhou, Liu Dongxu, Li Yushu, et al Dept. of Cardiology, Institute of Cardiovascular Disease, Tongji Medical University, Wuhan (430022)

Objective: To investigate the effect of dauricine on the irreversible platelet aggregability of patients with mitral stenosis (MS). **Methods:** Glycoprotein IV (GPⅣ) and thrombospondin (TSP) levels on the membrane surface of the stationary platelet or platelet activated by thrombin (0.05 U/ml, 0.1U/ml, 0.5U/ml, 1.0U/ml) in 16 patients with MS were measured with flow cytometric method and compared with those of the healthy (14 cases). **Results:** The GPⅣ level of stationary platelet, the GPⅣ and TSP levels of activated platelet in MS patients were higher than those in the healthy significantly ($P < 0.01$), while the TSP level of stationary platelet was not different between the patients and the healthy ($P > 0.05$). The GPⅣ redistribution on the activated platelet surface was apparently inhibited by dauricine (50 μ mol/L, $P < 0.05$, $P < 0.01$) and the release of TSP from intracellular α -granules was inhibited by dauricine only in the activated platelets induced by thrombin of low concentration (0.05U/ml and 0.1U/ml, $P < 0.05$, $P < 0.01$), inhibiting effect was not found in those activated with high concentration of thrombin. **Conclusion:** The activity and reactivity to thrombin of platelets increased in MS patients, and dauricine was able to reduce the occurrence of the irreversible platelet aggregation in MS patients.

Key words dauricine, mitral stenosis, platelet, glycoprotein IV, thrombospondin, thrombin

血小板膜糖蛋白 IV(GPⅣ)再分布增多及血小板 α -颗粒内凝血酶敏感蛋白(TSP)释放是血小板激活的重要标志^(1,2),活化血小板间 TSP-GPⅣ-GPⅡb/Ⅲa-纤维蛋白原多聚复合物的形成,标志着血小板间发生了不可逆稳定性聚集⁽³⁾。血小板激活是二尖瓣狭窄

(MS)患者易发生血栓的重要因素之一^(4,5),MS 患者血小板膜表面 GPⅣ、TSP 分布状态,目前尚未见研究报道。蝙蝠葛碱(dauricine, DAU)是一种植物生物碱,其对血小板膜 GPⅣ再分布及血小板内 TSP 释放的药理作用不明。基于此,我们进行了如下研究。

资料与方法

同济医科大学心血管病研究所(武汉 430022)

[△]现在河南医科大学第一附属医院心内科(郑州 450052)

1 临床资料 中、重度二尖瓣狭窄患者 16 例(女

性 11 例, 男性 5 例), 年龄 29~57 岁, 平均 41.3 ± 8.9 岁, 其中并发房颤者 9 例, 左房附壁血栓 2 例。系同济医科大学心血管病研究所收治, 已行(或拟行)二尖瓣球囊扩张术的患者。诊断标准: 二尖瓣区有舒张期隆隆样杂者伴左房增大, 超声心动图证实二尖瓣狭窄, 瓣口面积 $0.5 \sim 1.5 \text{ cm}^2$ 。所有病例均无肝、肾疾患及血液系统疾患, 无风湿活动。健康人 14 名(女性 9 名, 男性 5 名), 年龄 26~59 岁, 平均 38.2 ± 9.4 岁, 为自愿接受检查者, 经体格检查、超声波及相关实验室检查排除心、肝、肾及血液系统疾患。所有受试者近两周内均未使用抗血小板药物及抗凝药物。

2 主要试剂及仪器 抗血小板膜 GPIV 单克隆抗体(GPIV McAb)及 TSP 单克隆抗体(TSP McAb)、凝血酶、羊抗鼠荧光标志抗体(IgG-FITC)为美国 Sigma 公司产品; 小牛血清白蛋白(BAS)由 Amersham Dickinson 公司生产; 多聚甲醛为 E. merck 试剂; FACSsort 型流式细胞仪由 Becton-Dickinson 公司制造。

3 方法

3.1 血小板分离 于上午取空腹股动脉血, 与 ACP 抗凝剂(71mmol/L 枸橼酸钠、85mmol/L 枸橼酸三钠和 111mmol/L 葡萄糖, pH6.5)以 6:1 混匀后, 离心获取富含血小板血浆, 加入 $50 \mu\text{g/L}$ 前列腺素 E_1 , 用 PBS 洗涤血小板 3 次, 用 0.35% BSA-台氏缓冲液调制血小板数为 $1.5 \times 10^{11}/\text{L}$, 单核细胞少于 0.005%⁽⁶⁾。

3.2 血小板激活 静息血小板悬液分别加入等渗生理盐水及 DAU(同济医科大学临床药理基地供给的标准品粉剂, 终浓度 $50 \mu\text{mol/L}$) 37°C 温育 5min, 再加入生理盐水或凝血酶(0.05U/ml、0.1U/ml、0.5U/ml、1.0U/ml)置 37°C 30min, 用等体积 1% 多聚甲醛固定。

3.3 血小板膜 GPIV、TSP 标志及测定 在静息血小板及激活血小板悬液(0.5ml)中加入 $100 \mu\text{l}$ 特异单克隆抗体(McAb)溶液(抗血小板膜 GPIV McAb 8mg/L, 抗血小板膜 TSP McAb 3mg/L), 阴性对照加鼠 IgG $100 \mu\text{l}$ (0.01mg/L), 混匀后 37°C 温育 30min, 用

0.35% BSA-台氏液洗涤(2000r/min, 5min)3 次, 加羊抗鼠荧光标志抗体 $50 \mu\text{l}$ (IgG-FITC 1:300), 避光 4°C 30min, 再用 PBS 洗涤 2 次。在流式细胞仪上分别测定 GPIV、TSP 阳性血小板百分率⁽⁷⁾, 用阳性血小板百分率表示血小板膜表面 GPIV、TSP 分布状态。

3.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验, 所有计算过程均在 IBM 计算机上用 SAS 软件系统完成。

结 果

1 静息血小板膜 GPIV 及 TSP 分布 见表 1。MS 患者动脉血血小板膜 GPIV 阳性百分率显著高于健康人($P < 0.01$), 而血小板膜 TSP 阳性百分率与健康人无显著性差异($P > 0.05$)。即 MS 患者静息血小板膜 GPIV 分布较健康人为多, 血小板膜 TSP 分布与健康人无差异。

表 1 静息血小板膜 GPIV 及 TSP 分布 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	GPIV	TSP
健康人	14	26.3 ± 6.7	12.6 ± 3.2
MS 患者	16	$37.4 \pm 8.8^*$	14.3 ± 4.9

注: 与健康人组比较, $* P < 0.01$

2 激活血小板膜 GPIV 及 TSP 的分布 见表 2。MS 患者血小板膜 GPIV、TSP 阳性百分率明显高于健康人($P < 0.05, P < 0.01$)。即 MS 患者激活血小板膜 GPIV、TSP 分布较健康人明显增多。

3 DAU 对凝血酶诱导的血小板膜 GPIV 及 TSP 分布的影响 见表 2。MS 患者血小板膜 GPIV 阳性百分率加 DAU 时明显低于未加 DAU 时($P < 0.05, P < 0.01$); MS 患者血小板膜 TSP 阳性百分率在 0.05U/ml 及 0.1U/ml 凝血酶诱导下加 DAU 时较未用 DAU 时为低($P < 0.05, P < 0.01$), 而在 0.5U/ml、1.0U/ml 凝血酶诱导下加 DAU 时与未加 DAU 时无显著性差异($P > 0.05$)。表明 DAU 可显著抑制 MS 患者凝血酶诱导血小板膜 GPIV 再分布, 一定程度地抑制胞内 TSP 释放。

表 2 激活血小板膜 GPIV 及 TSP 分布 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	GPV				TSP				
		凝血酶 (U/ml)	0.05	0.1	0.5	1.0	0.05	0.1	0.5	1.0
健康人	14		30.4±8.1	39.5±11.2	55.2±14.6	60.3±14.2	16.2±5.1	23.8±6.2	51.6±10.3	66.2±16.8
MS	16	N	49.8±12.3**	54.3±12.7*	78.4±15.9**	76.9±18.0*	27.7±6.2*	49.9±10.4**	69.2±16.1**	80.3±15.3*
患者		DAU	38.8±11.7△△	41.6±10.3△△	53.2±14.1△△	64.1±12.2△	16.6±5.7△△	37.3±11.2△	66.4±17.9	72.6±17.5

注: N 为未加 DAU 干扰; 与健康人组比较, $* P < 0.05, ** P < 0.01$; 与本组未加 DAU 比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

凝血酶是动脉血栓形成中激活血小板重要物质,被认为是符合生理特性的血小板诱导剂^(2,8),观察凝血酶诱导时血小板膜 GPIV、TSP 分布的变化可反映血小板的反应性^(1,2)。正常生理条件下,TSP 及大量 GPIV 存在血小板 α -颗粒中⁽⁹⁾,血小板膜上 GPIV 分布数量较少,TSP 分布数量更少。在某些病理条件下或某些生物活性物质作用时血小板 GPIV 发生再分布,TSP 从 α -颗粒中释放,二者在血小板膜上分布增多。当血小板膜 GPIV 再分布及血小板内 TSP 释放增多时,血小板膜 TSP 与 GPIV 结合,即可能发生血小板不可逆聚集^(10,11)。本实验显示 MS 患者静息状态下血小板膜 GPIV 再分布增多,在凝血酶诱导后血小板膜 GPIV、TSP 分布数量较健康人显著为高,提示 MS 患者动脉血小板活性、反应性及发生不可逆聚集的可能性增高,与 Kunishima 等研究结果相符^(4,5,12)。

GPIV 及 TSP 从胞内 α -颗粒中释放为次发性释放反应,ADP、肾上腺素及血栓素 A_2 可促进该释放反应发生。鉴于 DAU 在体外可抑制凝血酶诱导的血小板膜 GPIV 再分布及胞内 TSP 释放,故认为其作用机理可能为直接减少血小板血栓素 A_2 生成所致。曾秋棠等研究表明⁽¹³⁾,与本实验浓度相近的 DAU 可明显抑制血小板血栓素 A_2 的生成,这一结果支持上述结论。

DAU 具有扩管及广谱的抗心律失常作用,有着广阔的临床应用前景。该实验表明,DAU 可抑制活性增高的血小板由凝血酶诱导的不可逆稳定性聚集,在血小板活性增高的心血管疾病中减少血栓形成。

参 考 文 献

1. Tschöepe D, Schultheiss HP, Kolarov P, et al. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation* 1993;88:37—42.
2. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, et al. Effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation*

- 1993;88(Part 1):1502—1511.
3. McGregor JL, Catimel B, Parmentier S, et al. Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein III b; interaction with thrombospondin and its role in platelet aggregation. *J Biol Chem* 1989;261:501—506.
4. 温心竹,曹林生,冯义柏,等.经皮球囊二尖瓣扩张术对二尖瓣狭窄患者血凝系统的影响. *中华心血管病杂志* 1996;24(6):235—237.
5. Kataoka H, Yano S, Tamura A, et al. Hemostatic changes induced by percutaneous mitral valvuloplasty. *Am Heart J* 1993;125:777—782.
6. Thibert V, Bellucci S, Edelman L, et al. Quantitation of platelet glycoprotein IV (CD₃₆) in healthy subjects and in patients with essential thrombocythemia using an immunocapture assay. *Thrombosis and Hemostasis* 1992;68:600—605.
7. 王建中,孙 市,王淑娟,等.流式细胞术检测活化血小板. *中华医学检验杂志* 1994;17(4):232—235.
8. Eidl JF, Allison P, Nobel S, et al. Thrombin is an important mediator of platelet aggregation in stenosed coronary arteries. *J Clin Invest* 1989;84:18—27.
9. Berger G, Caen JP, Berndt MC, et al. Ultrastructural of CD₃₆ in the granule membrane of human platelets and megakaryocytes. *Blood* 1993;82:3034—3044.
10. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ochenhouse CF, et al. Membrane glycoprotein CD₃₆. A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992;80:1105—1115.
11. Leung LLK, Li WX, McGregor JL, et al. CD₃₆ peptide enhance or inhibitor CD₃₆-thrombospondin binding: a two-step process of ligand receptor interaction. *J Bio Chem* 1992;267:18244—18250.
12. Kunishima S, Hattori M, Kobayashig S, et al. Activation and destruction of platelet in patients with rheumatic heart disease. *Eur Heart J* 1994;15(3):335—338.
13. 曾秋棠,涂源淑,张银环,等.蝙蝠葛碱对冠心病患者血小板聚集及血小板和血浆血栓素生成的影响. *同济医科大学学报* 1991;20(4):243—245.

(收稿:1997-09-22 修回:1998-04-08)

《安徽中医学院学报》1999 年征订启事

《安徽中医学院学报》是国内外公开发行的中医药学术刊物,以提高为主,注重实用,立足安徽,面向全国。主要反映中医药教学、科研、临床成果与经验。辟有学术探讨、中医基础概念论析、新安医学研究、老中医经验、临床报道、针灸经络、现代医学、方药研究、实验研究、文献研究、教学研究等栏目,可供广大中医药人员、中西医结合工作者、中医院校师生及自学深造中医者参阅。本刊为双月刊,双月 1 日出版,1999 年每册定价为 2.50 元,全年 15.00 元,欢迎广大读者及时到当地邮局(所)订阅,国内代号 26—23。国外读者请与中国教育图书进出口公司(北京海淀区学院路 15 号)联系,国外代号 JNSC—44。编辑部电话:(0551)2821006—2025。