

## · 临床论著 ·

## 穿心莲成分 API 0134 对高脂血症患者血小板膜糖蛋白表达的影响

王宏伟<sup>1</sup> 李树生<sup>1</sup> 王国平<sup>2</sup> 陶德定<sup>1</sup> 赵华月<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察中药穿心莲成分 API 0134(API)对高脂血症患者血小板膜糖蛋白的影响,探讨 API 抗血小板聚集的机制。方法 随机选择 30 例高脂血症患者,应用免疫荧光标记和流式细胞仪测定静息血小板、活化血小板和不同浓度 API 作用后的活化血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、P 选择素(GMP-140)和血小板假性血友病因子(vWF)免疫荧光强度值。结果 与活化血小板组比较,不同浓度 API(25mg/L、50mg/L、100mg/L)均能够显著抑制 GP II b/III a 的平均荧光强度,抑制作用强度与用剂量成正比;API 50mg/L 和 API 100mg/L 亦能显著减低活化血小板的 GMP-140,API 100mg/L 可降低 vWF 的平均荧光强度( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。不同浓度 API 对活化血小板膜糖蛋白 GPIb 表达影响不显著( $P > 0.05$ )。结论 API 具有显著的抗血小板 GP II b/III a 的药理作用,中、大剂量 API 对血小板 GMP-140 和 vWF 的表达亦有抑制作用。

**关键词** 穿心莲成分;血小板膜糖蛋白;血小板聚集

**Effect of API 0134 on Platelet Membrane Glycoprotein Expression in Patients with Hyperlipemia** WANG Hong-wei, LI Shu-sheng, WANG Guo-ping, et al *Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

**Objective** By observing the effect of API 0134, an active ingredient of green chiretta, on platelet membrane glycoprotein (GP) in patients with hyperlipemia to explore the mechanism of the anti-platelet aggregation effect of API. **Methods** The mean immunofluorescent intensity (MFI) of the platelet membrane glycoprotein GP II b/III a, GPIb, P-selectin (GMP-140) and von Willebrand's factor (vWF) in resting platelet, activated platelet (untreated or treated with API 0134 of different concentrations) were detected in 30 randomly selected patients with hyperlipemia, using immunofluorescent marker and flow cytometry. **Results** API of all concentrations (25 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L) could significantly decrease the MFI of GP II b/III a in a positive dose-dependent manner, as compared with that in activated platelet untreated with API; API of 50 mg/L and 100 mg/L could also reduce the MFI of GMP-140 and vWF in activated platelet ( $P < 0.01$ ); but API of 100 mg/L showed insignificant influence on GPIb expression in activated platelet membrane. **Conclusion** API 0134 exerts obvious anti-platelet GP II b/III a effect on activated platelets, middle or large dose of API also shows inhibiting effect on GMP-140 and vWF expression in platelet.

**Key words** active ingredient of green chiretta; platelet glycoprotein; platelet aggregation

中药穿心莲成分 API 0134(API)具有较强的抗血小板聚集和抗血栓形成作用<sup>[1,2]</sup>。本研究观察 API 对 30 例高脂血症患者血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、P-选择素(GMP-140)和血小板假性血友病因子(vWF)的影响,旨在探讨 API 抗血小板聚集的机制。

## 资料和方法

1 研究对象 30 例高脂血症患者均来源于我院门诊,男 16 例,女 14 例,年龄 46~67 岁,平均 54.37 岁。其中高胆固醇血症 11 例,其胆固醇水平为 6.38~9.14mmol/L;甘油三酯血症 14 例,其甘油三酯水平为 1.29~5.01mmol/L;胆固醇及甘油三酯均增高 5 例。受试者测试前 2 周内未服用影响血小板功能药物。空腹血糖、血压和肝、肾功能均在正常范围。

2 药物、试剂及仪器 实验药物 API 0134 中药

基金项目:国家自然科学基金(No. 39870924)

作者单位:1. 华中科技大学同济医学院同济医院儿科(武汉 430030);2. 华中科技大学同济医学院病理教研室

通讯作者:王宏伟, Tel: 027 - 83662684, E-mail: hwwang54@sina.com

com

穿心莲经色谱法分离的有效成分,呈黄色结晶体,由华中科技大学同济医院制药厂提供。按实验所需浓度用 PBS 溶解和稀释配制。血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、GMP-140 单克隆抗体和 IgG-FITC 荧光标记二抗购自美国 BD 公司(晶美公司代理),vWF 单克隆抗体由苏州医学院血栓与止血研究室提供。凝血酶购自美国 Sigma 公司。流式细胞仪 FCM FACS Vantage 为美国 BD 公司产品。

### 3 实验方法

3.1 血小板制剂配备及实验分组 将实验分为 4 组:(1)静息血小板组,测定血小板活化前血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、GMP-140 和 vWF 的表达;(2)活化血小板组,即单纯加凝血酶(500 U/L)诱导血小板活化,但不加入 API 药物;(3)API 25 mg/L 组;(4)API 50 mg/L 组;(5)API 100 mg/L 组。(3)、(4)、(5)组均在凝血酶诱导血小板活化后,再加入不同剂量的 API,室温孵育 30 min。

3.2 标本的单抗荧光标记和流式细胞术(FCM)检测 取患者清晨空腹前肘静脉血 20 ml,枸橼酸钠抗凝,以 1 000 r/min,离心 10 min,分离富血小板血浆(PRP)。调整血小板悬液浓度为  $1 \times 10^6$ /ml。取各组血小板悬液标本,分别加入 GP II b/III a、GPIb、GMP-140 和 vWF 单克隆抗体各 20  $\mu$ l,混匀后室温孵育 25 min,阴性对照以 PBS 代替一抗孵育。0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗涤 2 次,然后加 IgG-FITC 20  $\mu$ l(1:25),混匀后室温避光孵育 25 min,行 FCM 检测设定血小板光散射阈值。每次收集 5 000 个血小板,检测每个血小板上所结合的 G-FITC 在 530 nm 波长处激发的平均荧光强度,以 Cellquest 软件(美国 BD 公司)分析结果,整个检测均在采血后 120 min 内完成。

4 统计学方法 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验。

### 结 果

API 对高脂血症患者血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、GMP-140 和 vWF 影响,见表 1。静息态血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、GMP-140 和 vWF 均有表达,以 GP II b/III a 糖蛋白表达的荧光强度最强。与静息态血小板比较,凝血酶诱导血小板活化后,血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GMP-140 和 vWF 荧光强度明显增强(分别为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),但 GPIb 荧光强度明显减弱( $P < 0.01$ )。

与活化血小板组比较,API 25 mg/L 浓度组,血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 表达的荧光强度明显降低

( $P < 0.05$ ),API 剂量增大,GP II b/III a 的荧光强度下降愈明显( $P < 0.01$ );API 50 mg/L、API 100 mg/L 对 GMP-140 表达均有显著抑制作用( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );API 100 mg/L 对 vWF 的表达亦有显著抑制作用( $P < 0.05$ )。但不同剂量的 API,对活化血小板膜糖蛋白 GPIb 表达的影响差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表 1 API 对高脂血症患者血小板膜糖蛋白 GP II b/III a、GPIb、GMP-140 及 vWF 表达的影响 (FIU,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	GP II b/III a	GPIb	GMP-140	vWF
静息血小板	26.1 $\pm$ 3.7	18.2 $\pm$ 2.5	1.3 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.6
活化血小板	43.6 $\pm$ 7.3**	9.7 $\pm$ 1.6**	7.7 $\pm$ 2.1**	3.7 $\pm$ 0.5*
API 25mg/L	37.9 $\pm$ 6.3 $\Delta$	10.2 $\pm$ 1.9	6.4 $\pm$ 2.1	3.6 $\pm$ 0.4
API 50mg/L	30.2 $\pm$ 5.7 $\Delta\Delta$	9.6 $\pm$ 1.7	3.6 $\pm$ 0.6 $\Delta$	3.4 $\pm$ 0.5
API 100mg/L	24.7 $\pm$ 4.2 $\Delta\Delta$	11.1 $\pm$ 2.3	1.0 $\pm$ 0.2 $\Delta\Delta$	2.3 $\pm$ 0.7 $\Delta$

注:FIU 为荧光强度单位;与静息血小板组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ ;与活化血小板组比较, $\Delta$   $P < 0.05$ , $\Delta\Delta$   $P < 0.01$

### 讨 论

GP II b/III a 是血小板膜上含量最丰富的糖蛋白,活化的 GP II b/III a 作为受体,与纤维蛋白原、vWF 配体结合,是血小板聚集的先决条件和终末通路<sup>[3]</sup>。血小板活化时,其表面处于激活状况的 GP II b/III a 增多。本研究发现,由凝血酶诱导活化后的血小板,其表面 GP II b/III a 活性增加达 62%。加入不同剂量的穿心莲成分 API,对活化血小板表达 GP II b/III a 的活性均有显著的抑制作用,且抑制强度与药物浓度呈正比。表明 API 抑制血小板膜糖蛋白受体 GP II b/III a 的活性,可能是其抗血小板聚集和抗血栓形成的主要机制。

GMP-140 目前被认为是的体内血小板活化的较好标志物。本研究表明,在活化的血小板中膜糖蛋白 GMP-140 的含量显著增加,是静息状态血小板的 5、6 倍,其增高幅度远大于 GP II b/III a 的增高幅度。API 50 mg/L 浓度可明显降低血小板 GMP-140 含量,API 100 mg/L 浓度的抑制作用更显著。因此认为 API 抑制 GMP-140 含量,可能是其抗血小板聚集和抗血栓形成的机制之一。本研究还表明,活化的血小板表面 vWF 增加。vWF 作为 GP II b/III a 和 GPIb 的配体,在血小板的黏附反应中发挥重要作用。本研究发现,大剂量的 API(100 mg/L)亦可减少活化血小板 vWF 的含量,说明 API 抗血小板聚集,抗血栓形成的机制是多方面的。

GPIb 是凝血酶和 vWF 的受体,是血小板参与初期止血的关键性物质之一。GPIb 主要存在于静息血小板表面。血小板活化时,GPIb 随骨架蛋白的收缩运动移位至开放通道,从而导致血小板膜表面 GPIb 分子数下调并重新分布<sup>[4]</sup>。本结果与黄紫嫣等近期研究

结论一致<sup>[5]</sup>。本研究进一步表明,不同浓度的 API 对血小板膜表面 GPIb 表达均无显著影响,表明 API 对活化血小板聚集的机制与 GPIb 受体途径无关。

API 的抗血小板聚集、抗血栓形成的作用较强,廉价易制取。与其它化学合成或单克隆抗体类型的 GPIIb/IIIa 抑制剂比较,无明显毒副作用,故中药穿心莲成分 API 0134 是有开发前景的新型血小板 GPIIb/IIIa 抑制剂。

参 考 文 献

1 付良武,赵华月,熊一力,等. API 0134 对四种诱聚剂致血小板聚的影响. 中国药理学通报 1995;11(3):209—212.  
Fu LW, Zhao HY, Xiong YL, et al. Effects of API 0134 on platelet aggregation induced by four kinds of aggregating agents in human and rats. Chin Pharmacol Bull 1995;11(3):209—212.

2 王宏伟,李树生,赵华月,等. API 0134 对高脂血症家兔血栓形成及血小板信号转导物质的影响. 中国动脉硬化杂志

2002;10(4):295—287.

Wang HW, Li SS, Zhao HY, et al. Effects of API 0134 on thrombus formation and platelet signaling transfer substance in rabbits with high cholesterolemia. Chin J Arteriosclerosis 2002;10(4):295—287.

3 Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, et al. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein II b/III a dependent mechanism. Circul 1999;99:2577—2582.

4 Nurden AT, Cazes E, Bihour C, et al. Confirmation the GPIb-IX complexes have a reduced surface distribution on platelets activated by thrombin and TRAP-14-mer peptide. Br Haematol 1995;90:645—654.

5 黄繁嫻,刘蓉,刘丽,等. 健康成人血小板膜糖蛋白的表达特征. 中华血液学杂志 1999;20(9):465—467.  
Huang FQ, Liu R, Liu L, et al. Expression patterns of platelet membrane glycoprotein in healthy adults. Chin J Hematol 1999;20(9):465—467.

(收稿:2003-06-09 修回:2003-10-10)

《中国中西医结合杂志》第六届编委会名单

- 名誉总编 季钟朴
- 总编辑 陈可冀
- 副总编辑 沈自尹 肖培根 陈维养(常务)
- 顾问 吴咸中 辛育龄 关幼波 邓铁涛 尚天裕 王永炎 侯 灿
- 编辑委员 马必生 王一涛 王书臣 王今达 王宁生 王 阶 王学美 王 佩 王宝恩
- 王硕仁 王雪苔 尹光耀 史大卓 史载祥 刘干中 刘建勋 刘耕陶 刘猷枋
- 危北海 匡调元 朱 兵 吕爱平 吕维柏 齐清会 孙 燕 李 恩 李乃卿
- 李大金 李玉光 李连达 李廷谦 李国贤 李国栋 李鸣真 李顺成 李恩宽
- 杨任民 杨秀伟 时毓民 陈士奎 陈小野 陈冬燕 陈香美 吴伟康 陆付耳
- 张大钊 张之南 张永祥 张伯礼 张国玺 张亭栋 张荣华 张家庆 张梓荆
- 林求诚 林志彬 林瑞超 郁仁存 周文泉 周 俊 周霭祥 金益强 赵伟康
- 唐由之 顾振纶 郭赛珊 徐治鸿 梁晓春 黄晓愚 曹小定 葛秦生 谢宗万
- 谢竹藩 董福慧 曾晓春 雷 燕 蔡定芳 裴正学 黎磊石 廖家楨 廖福龙
- 戴瑞鸿