

云南白药对大鼠血小板聚集及膜糖蛋白表达的影响

叶剑锋¹, 严伟民¹, 甘卓慧¹, 高崇昆², 张立群², 李德良², 郑筱祥¹ (1. 浙江大学生物医学工程系, 浙江 杭州 310027; 2. 云南白药集团股份有限公司, 云南 昆明 650200)

摘要:目的 研究大鼠服用云南白药后, 血小板在 ADP 及花生四烯酸诱导下聚集率的变化, 以及血小板糖蛋白 CD61 及 CD62P 在静息及 ADP 诱导条件下在膜表面表达的变化。方法 大鼠 ig 给药 3d 后, 取血, 用血小板聚集仪测定血小板的聚集率以及用流式细胞仪测定 CD61 和 CD62P 的表达。结果 无论在 ADP 或花生四烯酸诱导下, 云南白药组血小板聚集率都显著高于对照组 ($P < 0.01$); 在静息条件下, CD61 及 CD62P 在膜表面的表达虽有少量增加, 但与对照组相比没有显著差异 ($P > 0.05$), 但在 ADP 刺激条件下, 给药组 CD61 及 CD62P 表达比对照组都有显著增加 ($P < 0.01$)。结论 在诱导条件下, 云南白药可以促进血小板聚集及血小板膜上 CD61 及 CD62P 的表达, 但不会增加静息血小板表面 CD41 及 CD62P 的表达, 不会形成促血栓倾向。

关键词: 云南白药; 血小板; CD61; CD62P; 流式细胞术

中图分类号: R285.5; R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)02-0100-04

Effects of Yunnan Baoyao on the expression of platelet membrane glycoproteins

YE Jian-feng¹, YAN Wei-min¹, GAN Zhuo-hui¹, GAO Chong-kun², ZHANG Li-qun², LI De-liang², ZHENG Xiao-xiang¹
(1. Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Yunnan Baoyao Group Co. LTD, Kunming 650200, China)

基金项目: 云南省省院省校科技合作项目(项目编号 2000 YZ04)

作者简介: 叶剑锋, 男, 出生于 1973 年 9 月, 博士研究生, 助研, 从事心脑血管药理作用研究及药效评价

联系人: 郑筱祥教授, 博导, Tel: 0571-87951091, Fax: 0571-87951676, E-mail: zxx@meil.hz.zj.cn

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the alterations of aggregation rate of platelets induced by ADP or arachidonic acid and to study the change of membrane glycoproteins of resting platelets or platelets activated by ADP after administration of Yunnan Baoyao. **METHOD** After SD rats were administrated with Yunnan Baoyao for three days, the platelet aggregation rate was detected by platelet aggregation analyzer, and the expression of CD41 and CD62P on platelets membrane was detected by flow cytometry. **RESULTS** The platelet aggregation rate of groups administrated with Yunnan Baoyao was much higher than control group ($P < 0.01$). If the platelets were activated by ADP, the expression of CD61 and CD62P on the platelets membrane in Yunnan Baoyao group was increased significantly compared with the control group. However, there was no significant change of these glycoproteins in resting platelets among groups ($P > 0.05$). **CONCLUSION** Yunnan Baoyao, under stimulating condition, can increase the reaction activity of platelet and the expression of CD61, CD62P on the membrane. However, Yunnan Baoyao will not increase its glycoproteins expression on platelet membrane under normal condition.

KEY WORDS: Yunnan Baoyao; platelet; CD61; CD62P; flow cytometry

云南白药的止血作用已为国内外普遍接受并广泛应用^[1-3],近年来在临床上已经证明术前口服云南白药可以减少手术中的出血量,这大大扩展了云南白药的临床应用。但云南白药的止血机制并没有进行深入研究,同时也不确定服用云南白药后是否会造成促血栓形成倾向。本实验从小血小板入手,研究云南白药在静息及诱导的条件下对大鼠血小板聚集功能及膜表面糖蛋白表达的变化,试图进一步阐明云南白药的止血机制以及云南白药对正常血小板功能的影响。

1 材料

1.1 药品和试剂

云南白药粉剂,批号:20001101,由云南白药集团提供,使用时用生理盐水配制成悬液;花生四烯酸钠盐,多聚甲醛购自 Sigma 公司;ADP 钠盐购自上海生化所西巴斯公司;FITC-小鼠抗大鼠 CD61 单抗、兔抗大鼠 CD62P 多克隆抗体、小鼠来源的 FITC-IgG1a 购自 BD Pharmingen 公司;PE-羊抗兔 IgG 二抗购自 SBA 公司。

1.2 实验动物及饲料

SD 大鼠,雌雄各半,体重 230~270g,由浙江医学科学院动物实验中心提供。动物饲养合格证:浙实验动物准字(96)002。饲料为标准大鼠颗粒饲料,含蛋白质 20%,由浙江医学科学院动物实验中心提供。

1.3 仪器

血小板聚集凝血因子分析仪,北京世帝科学仪器公司,型号为 LG Paber II;流式细胞仪,BD 公司,型号为 FACSort。

2 方法

2.1 分组及给药

30 只大鼠,随机分 3 组,每组 10 只。参考云南白药的动物研究资料(由云南白药公司提供)以及文献^[4]中单用云南白药治疗内出血性疾病的剂量,并按体表面积换算,设置大鼠的给药剂量为 340 及 670 mg·kg⁻¹·d⁻¹,分别 ig 生理盐水、云南白药高低剂量组,连续 3d,每天两次。并于取血前 1~1.5h 再给药一次。

2.2 取血

大鼠用 1%戊巴比妥钠 4mL/kg 腹腔麻醉。分离一侧颈

外动脉,用一次性注射器取血 4.5mL,以 3.8%枸橼酸钠 1:9 抗凝。

2.3 血小板聚集率测定

常规分离富血小板血浆 (PRP) 及贫血小板血浆 (PPP)。取 300 μ L PRP 放入测试杯中,分别以花生四烯酸钠盐 (4.3 mmol/L) 及 ADP (10 μ mol/L) 为聚集诱导剂,在血小板聚集凝血因子分析仪上测试血小板在不同时间的聚集率及最大聚集率。

2.4 FCM 标本处理

抗凝血分离 PRP 后,将血样进行两种不同的处理:一是以 1:1 加入 2%多聚甲醛,室温固定 15min。二是加入终浓度为 10 μ mol/L ADP,血小板激活 5min 后再加入 1:1 的 2%多聚甲醛固定 15min。各取固定后的 PRP 7.5 μ L,加入 1:10 稀释兔抗大鼠 CD62P 多克隆抗体 15 μ L,室温染色 30min。用 PBS 离心清洗三次。弃上清,加入 1:10 稀释 FITC-小鼠抗大鼠 CD61 单抗 15 μ L 及 1:100 稀释 PE-羊抗兔 IgG 二抗 5 μ L,避光室温染色 30min。用 PBS 清洗三次后,以备流式细胞仪检测。以小鼠来源的 FITC-IgG1a 及 PE-羊抗兔 IgG 二抗经相同处理为同型对照。

2.5 血小板 FCM 检测

用 BD 公司的流式细胞仪检测,用 488nm 的氩离子激发, FSC,SSC 用对数放大,FSC 设阈值,以 CD61 阳性设门圈定血小板,测定 50000 万个血小板,计算荧光阳性百分率及平均荧光强度 (MFI,单位为道数)。把 CD62P 的阳性率定义为血小板的活化百分率。

2.6 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用 t 检验进行比较, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 实验结果

3.1 云南白药对血小板聚集的影响。

无论在 AA 或 ADP 诱导下,云南白药高低剂量组的富血小板血浆在不同时间点上的聚集百分率和 6min 内的最大聚集百分率都显著高于对照组 ($P < 0.05$),但大、小剂量之间没有显著差异 ($P > 0.05$)。见表 1,表 2。

表 1 云南白药对 AA 诱导的血小板聚集率的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of Yunnan Baoyao on the platelets aggregation induced by AA ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	不同时间(s)血小板聚集率(%)					
	60	120	180	240	300	
对照	7.6 ± 6.4	15.2 ± 14.8	23.6 ± 19.3	27.0 ± 20.6	31.4 ± 19.7	49.1 ± 9.9
云南白药 (340 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	23.5 ± 12.9 ²⁾	39.5 ± 18.2 ²⁾	43.6 ± 14.5 ¹⁾	51.5 ± 8.8 ²⁾	60.8 ± 8.8 ²⁾	66.3 ± 10.2 ²⁾
云南白药 (670 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	27.8 ± 20.1 ¹⁾	44.3 ± 23.1 ¹⁾	51.6 ± 20.4 ¹⁾	54.5 ± 17.1 ²⁾	60.8 ± 14.5 ²⁾	66.4 ± 12.2 ²⁾

注:与对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with the control group: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

表2 云南白药对ADP诱导的血小板聚集率的影响($n = 10$)

Tab 2 Effects of Yunnan Baoyao on the platelets aggregation induced by ADP

组别	不同时间(s)血小板聚集率(%)					
	60	120	180	240	300	
对照	12.6 ± 12.1	24.6 ± 12.4	34.8 ± 14.7	41.7 ± 18.2	54.6 ± 21.9	57.2 ± 21.7
云南白药 (340 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	14.7 ± 6.3	32.6 ± 7.9	51.3 ± 10.1 ²⁾	72.7 ± 12.5 ²⁾	76.7 ± 10.3 ²⁾	88.6 ± 11.4 ²⁾
云南白药 (670 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	15.6 ± 9.8	36.8 ± 7.7 ¹⁾	57.3 ± 9.7 ²⁾	77.3 ± 13.9 ²⁾	88.0 ± 14.8 ²⁾	92.2 ± 11.2 ²⁾

注:与对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs control group

3.2 云南白药对血小板膜表面糖蛋白表达的影响

云南白药在静息及ADP诱导条件下对大鼠血小板表面的CD61、CD62P及血小板的活化百分率的影响,见表3,表4所示。以MFI表示糖蛋白表达的高低。

表3 云南白药在静息条件下对血小板表面糖蛋白表达的影响($n = 10$)

Tab 3 Effects of Yunnan Baoyao on the expression of glycoproteins in the membrane of resting platelets

组别	CD61 (道数)	CD62P (道数)	活化百分率 (%)
对照	33.6 ± 6.1	3.5 ± 0.8	10.3 ± 4.6
云南白药 (340 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	35.2 ± 4.8	4.1 ± 0.5	13.6 ± 3.7
云南白药 (670 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	37.4 ± 6.1	4.2 ± 0.6	12.5 ± 3.9

表4 云南白药在ADP诱导下对血小板表面糖蛋白表达的影响($n = 10$)

Tab 4 Effects of Yunnan Baoyao on the expression of glycoproteins in the membrane of platelets activated by ADP

组别	CD61 (道数)	CD62P (道数)	活化百分率 (%)
对照	44.3 ± 6.0	5.1 ± 1.2	24.8 ± 7.0
云南白药 (340 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	57.3 ± 10.6 ²⁾	7.9 ± 1.7 ³⁾	40.0 ± 7.9 ³⁾
云南白药 (670 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	61.0 ± 13.0 ³⁾	8.2 ± 2.4 ³⁾	39.6 ± 8.7 ³⁾

注:与对照组比较:²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$

²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ vs control group

结果显示,在给药后,大鼠血小板表面的CD61、CD62P的表达及血小板活化的百分率都有所增加,与对照组相比,各组的各个指标都没有显著性差异($P > 0.05$)。但在ADP的刺激下,给药组无论在糖蛋白的表达还是血小板的活化程度

都远远高于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。各组的CD61、CD62P的表达及血小板活化的百分率与未加刺激时相比,有显著增加($P < 0.001$),并且给药组的各种指标的变化幅度都显著高于对照组。

4 讨论

云南白药作为一种传统的具有很好止血作用的中药,已广泛用于治疗临床消化道出血以及用于减少手术时的出血^[2,4]。血小板通过黏附、聚集、释放等反应在止血过程中起着重要作用,这些作用都与血小板膜表面的糖蛋白密切相关。当血小板活化时,CD61从血小板开放管道系统从膜内转移到膜外,使它在质膜上的表达增加^[5]。同时它与CD41的结合也增加,其CD41/CD61复合物的构型发生改变,增加对纤维蛋白原受体的结合,促进血小板的聚集^[6]。血小板a颗粒膜与质膜融合,CD62P暴露在血小板质膜表面,成为血小板晚期活化的重要标志^[7]。利用流式细胞仪检测血小板表面糖蛋白已广泛应用在临床血小板功能及出血与血栓性疾病上^[8,9]。

研究表明^[2],云南白药可以显著缩短出血时间、凝血时间及凝血酶原时间,但笔者未有报道显示它与血小板功能方面的关系。鉴于血小板在止血及血栓形成中的重要作用,研究云南白药对血小板聚集功能的作用对阐明云南白药的药理作用具有重要意义。本研究表明,ig云南白药后,大鼠体内的静息血小板糖蛋白的表达与正常相比,虽有少量的升高,但没有明显差异($P > 0.05$)。由于在操作上不可避免地会引起血小板的部分活化,所以这轻微变化也可能是由于操作过程所引起。在光/色素法大鼠肠系膜活体微血栓模型中,我们发现大鼠在服用云南白药后,不会增加血栓形成时间。但在ADP刺激下,给药后的血小板的反应更为敏感,其活化的程度、糖蛋白的表达都显著高于对照组,把更多的糖蛋白表达于膜表面,参与血小板的聚集、黏附以及同其它细

胞的相互作用,这有利于止血反应的进行。这些结果为云南白药应用于减少术后出血提供了部分实验依据。

参考文献

- [1] 姬斌.云南白药的临床应用[J].中国医院药学杂志,2001,20(2):110.
- [2] 朱天忠,卢长云.云南白药的药理及临床研究进展[J].中西医结合杂志,1987,7(6):377,384.
- [3] 申海明.近三十年来云南白药临床应用状况[J].云南中医杂志,1986,4:46.
- [4] 丁冠男,李树人.云南白药用于减少术中出血量及对围手术期病人凝血功能影响的探讨[J].中华实用医学,2002,4(10):11.
- [5] Nurden P. Bidirectional trafficking of membrane glycoproteins follow-

ing platelet activation in suspension[J]. Thromb Haemost, 1997,78:1305-1315.

- [6] Warkentin TE, Powling MT, Hardisty RM. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation[J]. Br J Haematol, 1990,76:387-394.
- [7] Metzelaar MJ, Clevers HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets[J]. Thromb Haemost, 1992,68:378.
- [8] 韩悦,王兆钺,阮长耿.流式细胞仪在血栓与出血性疾病诊断中的意义[J].国外医学输血与血液学分册,1998,21(5):284.
- [9] 王建中,王淑娟,袁家颖,等.流式细胞术诊断血小板无力症[J].中华医学检验杂志,1995,18(1):44.

收稿日期:2002-09-27