

磷脂酶C对血小板粘附性及表面膜GpⅡb的影响^{* *}

王常高¹, 瞿永华², 陈 涛³

(1 湖北工业大学 生物工程学院, 湖北 武汉 430068;

2 武汉工业学院 医学院, 湖北 武汉 430023;

3 中国科学院 武汉病毒研究所, 湖北 武汉 430071)

[摘 要] 采用旋转玻球法测定了磷脂酶C(PLC)经十二指肠给药后对家兔血小板粘附性的影响, 同时利用竞争性酶联免疫法测定了PLC对人血小板表面膜糖蛋白Ⅱb(GpⅡb)分子数的影响。结果表明, PLC冻干辅料及100和200 U/kg的PLC对家兔血小板粘附率无明显影响, 而400~1 000 U/kg PLC对血小板粘附率具有明显的影响。PLC冻干辅料对人血小板表面膜GpⅡb分子数没有明显影响, 而每mL血浆(PRP)中加入0.5、1.0和2.0 U的PLC对人血小板表面GpⅡb分子数可产生明显影响。

[关键词] 磷脂酶C; 血小板; 粘附率; GpⅡb

[中图分类号] R973.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)07-0005-04

血小板是机体正常凝血机制中的关键成分, 同时在病理性血栓形成过程中起着非常重要的作用^[1]。抗血小板药物主要通过抑制血小板的异常形态变化、粘附、释放及聚集等反应, 来抑制血栓形成和动脉粥样硬化等疾病的发生与发展。因此, 抗血小板药物已成为防治心脑血管疾病的重要药物^[2, 3]。

磷脂酶C(phospholipase C, 简称PLC)是一类可作用于磷脂C₃磷脂酰键的脂类水解酶, 广泛分布于动植物及微生物细胞和组织中, 在细胞代谢和信号传导中起着很重要的作用。作者近期研究发现, 利用微生物发酵制备的PLC能明显地抑制血小板的粘附性, 因而PLC是一种潜在的抗血小板新药。为进一步阐明PLC抗血小板粘附作用的机理, 本研究采用竞争性酶联免疫法测定了PLC对血小板表面膜糖蛋白Ⅱb(glycoprotein Ⅱb, 简称GpⅡb)数量的影响, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

1.1.1 PLC冻干制剂 由本课题组分离筛选的PLC菌株经发酵及一系列分离纯化制备的PLC添加辅料后冻干制成。药品效价为1 950 U/g, -20℃贮存。

1.1.2 阿司匹林(aspirin, 简称ASA) 阳性对照

药, 白色肠溶片, 由湖南制药厂生产。

1.1.3 酶联免疫试剂盒 包被鼠IgG(IgG-Coat); 标准IgG(IgG-ST); 羊抗鼠酶标二抗(HRP-GAM); 牛血清白蛋白(BSA); 单克隆抗体(McAb)SZ-2, 每支单抗用5 mL含5 g/L BSA的PBS溶解; 固定剂250 mL/L戊二醛, 用PBS按体积比1:100稀释成2.5 mL/L; 血小板洗涤液(20×TEN), 用D₂H₂O按体积比1:20稀释; 20×PBS, 用蒸馏水按体积比1:20稀释; 柠檬酸缓冲液(buffer 2×5), 用蒸馏水按体积比1:5稀释; 邻苯二胺(OPD, 干粉); 包被缓冲液(buffer 1×5), 用蒸馏水按体积比1:5稀释。

1.2 主要仪器设备

血小板粘附仪XSN-R1型, 由上海俊海科技公司制造; 酶标仪, 由美国TECAN公司制造。

1.3 血小板粘附性的测定

用玻球旋转法测定。取40只雄性新西兰大耳白家兔(2.5±0.25) kg, 随机分成阴性对照组(PLC冻干辅料组), 阳性对照组(ASA组)和100, 200, 400, 600, 800, 1 000 U/kg的PLC剂量组, 共8组, 每组5只, 开腹行十二指肠给药, 分别于给药前和给药后1, 2, 4 h时取静脉血1.8 mL, 加入含有0.2 mL 0.147 mol/L枸橼酸钠的硅化刻度管中, 混匀, 从试管中取1 mL加入容量为8 mL的长颈圆球瓶中, 置于XSN-R1型血小板粘附仪转盘上, 恒温37℃,

* [收稿日期] 2004-12-29

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2004ABA233)

[作者简介] 王常高(1971-), 男, 湖北监利人, 讲师, 在读博士, 主要从事微生物药物的研究。E-mail: wcg71415@163.com

3 0 r/m in 旋转 15 m in, 分别测定转动前、后血小板数, 计数 2 次, 取平均值, 按下式计算血小板粘附率:

血小板粘附率/% = (粘附前血小板数- 粘附后血小板数) / 粘附前血小板数.

1.4 血小板膜 Gp Ib 的测定

采用竞争性酶联免疫法测定.

1.4.1 标准曲线制备 取 IgG-Coat 1 支加 12 mL buffer1 溶解后, 加入酶标孔内(200 μ L /孔), 4 湿盒过夜, 用含有 0.5 mL /L Tween-20 的 PBS 洗涤 3 次, 甩干后封口置- 20 备用. 取 IgG-ST 1 支加 0.5 mL 含 5 g/L BSA 的 PBS 溶解后, 再用含 1 g/L BSA 的 PBS 倍比稀释成 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 ng/mL, 分别加入到已用 IgG-Coat 包被的酶标孔中(100 μ L /孔). 取 HRP-GAM 1 支加 6 mL 含 1 g/L BSA 的 PBS 溶解后, 分别向加有不同浓度 IgG-ST 的酶标孔中加入 100 μ L HRP-GAM, 37 温育 1 h. 竞争反应完毕后, 用含 0.5 mL /L Tween-20 的 PBS 洗涤 6 次, 甩干. 用 buffer 2 配成 OPD 1 mg/mL, 加入 300 mL /L H₂O₂ 0.5 μ L /mL, 于每个反应孔中加入 200 μ L 该显色液, 37 显色反应 20 m in, 加入 3 mol/L H₂SO₄ (50 μ L /孔) 终止反应, 酶标仪上测定各孔的 OD₄₉₂. 以各点 IgG-ST 量的 ln IgG-ST 为横坐标, 以各点 IgG-ST 量所对应的 OD₄₉₂ 的 ln OD₄₉₂ 为纵坐标, 绘制标准曲线.

1.4.2 PLC 对血小板表面膜 Gp Ib 的作用 健康成人空腹时静脉取血, 0.147 mol/L 枸橼酸钠与静脉血按体积比 1 : 9 抗凝, 800 r/m in 离心 10 m in, 取上清液得富含血小板的血浆 (PRP). 每管取 1 mL PRP, 分别加入生理盐水、PLC 冻干辅料及 0.5, 1.0, 2.0 U 的 PLC, 37 温育 30 m in. 反应完后加

入等体积的 2.5 mL /L 戊二醛, 37 固定 20 m in. 以 TEN 2 500 r/m in, 10 m in/次离心洗涤 2 次, 最后用含 0.2 g/L NaN₃ 的 TEN 悬浮血小板, 用 TEN 调整血小板为 2 $\times$ 10⁸ /mL. 取单抗 SZ-2 100 μ L 和血小板样品 100 μ L, 37 温育 1 h, 然后用含 0.5 mL /L Tween-20 的 PBS 2 500 r/m in $\times$ 10 m in 洗涤 2 次, 再以含 10 g/L BSA 的 PBS 悬浮血小板, 调整血小板浓度为 4 $\times$ 10⁷ /mL.

以上述经过不同处理并已结合有单抗 SZ-2 的血小板样品代替标准曲线制备中的 IgG-ST 进行竞争反应. 其余操作步骤均同标准曲线制备. 根据不同血小板悬浮样品测得的 OD₄₉₂ 值, 从标准曲线上求得待测样品所对应的 IgG 的量 (ng/mL). 再根据待测样品所对应的 IgG 的量 (ng/mL), 即可推算出平均每个血小板上所含糖蛋白 Gp Ib 的分子数量:

$$\begin{aligned} \text{每个血小板膜表面的糖蛋白分子数} = & \frac{\text{待测样品内 IgG} \times \text{阿佛加德罗常数}}{\text{IgG 摩尔质量} \times \text{待测样品内血小板数}} = \\ & \frac{\text{IgG (ng/mL)} \times 10^{-9} \times 6.023 \times 10^{23}}{1.5 \times 10^5 \text{ (g/mol)} \times 4 \times 10^7} = \\ & \text{IgG (ng/mL)} \times 10^2 \end{aligned}$$

1.5 统计方法

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 值检验.

2 结果与分析

2.1 PLC 对血小板粘附率的作用

PLC 冻干辅料阴性对照组、A SA 阳性对照组及 PLC 各剂量组分别于给药前和给药后 1, 2, 4 h 时取静脉血测定血小板粘附率, 结果见表 1.

表 1 PLC 对血小板粘附率的影响

Table 1 Effect of PLC on adhesion rate of platelet

分组 Group	剂量/(U · kg ⁻¹) Dose	血小板粘附率/% ($\bar{x} \pm s$, n = 5) Adhesion rate of platelet			
		给药前 Before adm inistration	给药后 1 h 1 h after adm inistration	给药后 2 h 2 h after adm inistration	给药后 4 h 4 h after adm inistration
冻干辅料 Freeze-drying additive	-	15.2 $\pm$ 2.31	14.7 $\pm$ 2.29	14.9 $\pm$ 3.12	15.50 $\pm$ 1.32
A SA	-	13.8 $\pm$ 2.44	10.0 $\pm$ 1.76	10.4 $\pm$ 3.02	9.89 $\pm$ 2.35
PLC	100	14.6 $\pm$ 2.95	14.4 $\pm$ 3.15	14.9 $\pm$ 2.25	13.70 $\pm$ 1.83
	200	12.9 $\pm$ 1.76	11.7 $\pm$ 2.17	12.8 $\pm$ 2.14	13.00 $\pm$ 2.57
	400	15.5 $\pm$ 3.04	11.7 $\pm$ 3.58	10.9 $\pm$ 2.64	10.60 $\pm$ 1.97
	600	16.3 $\pm$ 2.34	11.8 $\pm$ 3.23	10.5 $\pm$ 2.51	11.30 $\pm$ 4.01
	800	21.5 $\pm$ 3.59	15.2 $\pm$ 2.84	14.5 $\pm$ 3.61	13.90 $\pm$ 1.78
	1 000	17.7 $\pm$ 1.41	10.6 $\pm$ 2.10	9.8 $\pm$ 1.36	8.43 $\pm$ 2.64

由表 1 可以看出: PLC 冻干辅料给药前与给药后 1, 2, 4 h 时的血小板粘附率无明显改变 ($P >$

0.05), 可见 PLC 冻干辅料对血小板粘附性无明显影响; A SA 可明显降低血小板粘附性, A SA 给药

前与给药后 1, 2, 4 h 的血小板粘附率相比差异显著 ($P < 0.05$); 100 和 200 U/kg 的 PLC 对家兔血小板粘附性无明显影响, 其给药前与给药后 1, 2, 4 h 的血小板粘附率无显著差异 ($P > 0.05$); 400, 600, 800 和 1 000 U/kg 的 PLC 可明显降低血小板的粘附性, 且随着 PLC 剂量的增加, 其抑制血小板粘附的作用逐渐增强, 各组给药前与给药后 1, 2, 4 h 的血小板粘附率差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 PLC 对血小板表面膜 GpⅡb 的影响

2.2.1 标准曲线绘制 以各标准 IgG 浓度的 $\ln \text{IgG}$ 为横坐标, 各标准 IgG 量所对应的 OD_{492} 为纵坐标绘制标准曲线, 结果见图 1。由图 1 可见, 中间 4 点具有较好的线性关系, 而第 1 点和第 6 点偏离了线性区域, 可能是标准 IgG 的浓度过高和过低所致。因此在实际样品测定时, 主要取中间 4 点进行线性回归, 根据线性回归方程计算实际样品所对应的 IgG 量。

2.2.2 PLC 对血小板表面膜 GpⅡb 的作用 血小板分别经生理盐水、PLC 冻干辅料及 0.5, 1.0 和 2.0 U/mL PLC 处理后测定其 OD_{492} 值, 根据标准曲

线计算出所对应的 IgG 量, 再根据 1.4.3 中公式推算出平均每个血小板表面所含的 GpⅡb 分子数量, 结果见表 2。

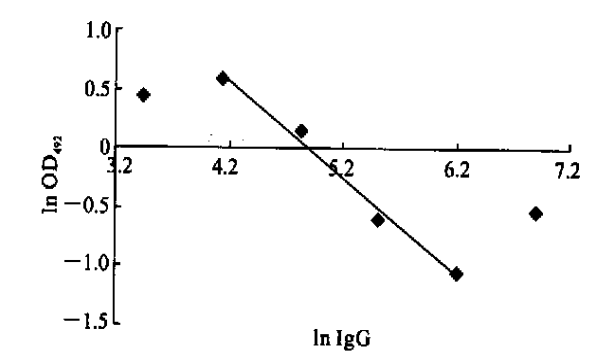


图 1 GpⅡb 测定标准曲线
Fig 1 Standard curve of GpⅡb determination

由表 2 可知, 与生理盐水相比, PLC 冻干辅料对血小板表面膜 GpⅡb 的分子数量基本上没有影响, 而各 PLC 剂量组对血小板表面膜 GpⅡb 分子数量产生了明显影响, 且随 PLC 剂量的增加, GpⅡb 分子数量逐渐减少。

表 2 PLC 对血小板 GpⅡb 分子数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 2 Effect of PLC on GpⅡb molecular number of platelet

分组 Group	剂量/(U · mL ⁻¹) Dose	OD ₄₉₂	IgG/(ng · mL ⁻¹)	GpⅡb 分子数 GpⅡb molecular number
生理盐水 PSS	-	0.768 ± 0.078	64 965.54	6 496 554
冻干辅料 Freeze-drying additive	-	0.805 ± 0.124	62 537.54	6 253 754
PLC	0.5	1.103 ± 0.118	48 465.54	4 846 544
	1.0	1.367 ± 0.102	40 738.19	4 073 819
	2.0	2.055 ± 0.453	29 282.81	2 928 281

3 讨 论

血栓的形成与血小板的粘附、释放、聚集等活性密切相关, 而血小板的粘附是导致血栓形成的最早反应之一, 因此抑制血小板粘附活性是控制血栓形成的有效途径之一。本研究表明, PLC 经十二指肠给药后能明显抑制家兔血小板粘附性, 因而服用 PLC 是一种有效控制血栓形成的措施。有研究^[4]表明, PLC 能有效抑制家兔实验性静脉血栓的形成。

这些研究成果对于将 PLC 研制开发成一种抗血栓的新型药物提供了重要依据。

血小板表面膜糖蛋白与血小板活性关系密切, 其中 GpⅡb 是血友病因子 (vWF) 及相关蛋白因子的受体, 在血小板粘附及聚集过程中起着重要的桥梁作用。近来也有研究^[5, 6]证实, GpⅡb 与血小板粘附聚集活性呈现正相关的生理规律。本试验研究表明, PLC 能明显减少血小板表面膜 GpⅡb 的数量, 这可能是 PLC 抑制血小板粘附作用的重要原因之一。

[参考文献]

[1] 王振义, 李家增, 阮长耿. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 48
[2] 王淑娟. 抗血凝及抗血小板药物的进展[J]. 中国医刊, 2002, 37(1): 6- 7.
[3] 焦建伟, 茹丙根. 溶栓剂研究的新进展[J]. 生物工程进展, 2002, 22(1): 30- 33
[4] 陈明锴, 陈 蔚, 宋建华, 等. 磷脂酶 C 对实验性血栓形成和纤溶功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(4): 477- 479

- [5] 刘平, 王学文. 尿毒症患者血小板膜糖蛋白 Ib 含量和血浆 vWF 浓度变化及其意义[J]. 中华肾脏病杂志, 1995, 11(2): 69-71.
- [6] 严海东, 赵丽娟, 项永迁, 等. 血液透析对尿毒症患者血小板粘附聚集功能及膜糖蛋白 Ib 的作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(4): 346-348.

Effect of PLC on platelet's adhesion and Gp Ib

WANG Chang-gao¹, QU Yong-hua², CHEN Tao³

(1 College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China;

2 Medical College, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China;

3 Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: The rounding glass ball method was taken to study the effect of phospholipase C (PLC) on platelet's adhesion administered via duodenum, and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (CELISA) was taken to study the effect of PLC on platelet's Gp Ib molecular number at the same time. The result was that freeze-drying additive, 100 and 200 U/kg PLC, had no evident effect on platelet's adhesion rate, but 400, 600, 800 and 1 000 U/kg PLC had significant effect. Freeze drying additive had no apparent effect on platelet's Gp Ib molecular number, but 0.5, 1 and 2 U/mL PRP PLC had significant effect.

Key words: PLC; platelet; adhesion rate; Gp Ib

(上接第 4 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)07-0001-EA

Expression of *c-myc* and *c-fos* in ovary of the *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus*

LEI Xin^{1,2}, ZHANG Yu-hui¹

(1 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

2 College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract: Immunocytochemical localization was investigated at different developmental stages of the follicles of the *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus* using antibodies against Myc and Fos. The results indicate that Myc is expressed strongly in the oocyte and follicle cells at the stages I-II, then more weakly at the stages III-IV. Fos is weakly expressed in the oocyte at early stages, but more strongly at stages III-IV. These results prove that for *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus*, *c-myc* plays a key role in the early development of oocyte, and *c-fos* in the medium and upper stages of oocyte. The two proto-oncogenes may regulate the oocyte development of *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus* by regulating the synthesis and secretion of sex steroids.

Key words: *Rana quadranus*; *Batrachuperus tibetanus*; *c-myc*; *c-fos*; ovary