

莪术二酮对凝血酶诱导的人血小板整合素 α IIb β 3 活化的抑制作用

程紫薇¹, 史寒冰², 刘沁华³, 夏泉^{4*}, 吴鸿飞^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032; 3. 安徽医科大学第一附属医院血液科, 安徽 合肥 230022; 4. 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 安徽 合肥 230022)

摘要: **目的** 研究莪术二酮对凝血酶诱导的人血小板整合素 α IIb β 3 活化的抑制作用。**方法** 健康志愿者全血制备成洗涤血小板, 分别以终浓度 100、150、200 μ mol/L 莪术二酮与洗涤血小板共孵育, 凝血酶作为诱导剂, 以不加莪术二酮的血小板同步处理为对照组, 采用血小板聚集实验检测凝血酶的最佳浓度和血小板的聚集功能, 流式细胞术检测血小板的活化 (P-选择素) 和整合素 α IIb β 3 活化 (PAC-1) 情况, Western blot 法检测 Integrin β 3 相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 莪术二酮可抑制凝血酶诱导的血小板聚集、P-选择素的表达、PAC-1 的结合能力以及 Talin 1、p-Src、p-Integrin β 3 蛋白表达 ($P < 0.05$), 但莪术二酮的作用弱于阳性药替罗非班 ($P < 0.05$)。**结论** 莪术二酮可以通过降低 Talin 1 和 p-Src 蛋白表达, 从而抑制整合素 α IIb β 3 活化, 进而抑制凝血酶诱导的血小板活化发挥抗血小板的作用。

关键词: 莪术二酮; 血小板; 活化和聚集; 整合素 α IIb β 3

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)06-2038-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.06.044

血小板是一种由骨髓中巨核细胞产生的血细胞, 与止血和动脉血栓形成密切相关^[1]。血小板可维持止血, 但其过度激活可能会导致血栓形成或其他心血管疾病^[2]。抗血栓是治疗血栓性疾病的主要手段, 抗血栓药物主要包括抗血小板、抗凝血及溶血栓药物, 在凝血及血栓形成过程中发挥不同的抑制作用^[3-4]。抗血小板药物能有效降低血栓引起的心脑血管疾病的发病率, 但其副作用和并发症严重影响临床使用, 如长期使用阿司匹林可能会导致严重的胃溃疡或出血, 氯吡格雷可能会导致再生障碍性贫血、血小板减少性紫癜等^[5]。开发更加安全、有效、副作用小的抗血小板药物, 在发挥抗血栓作用的同时较少引起出血风险, 具有重要的临床意义。

莪术是具有“行气破血”功效的活血化瘀中药^[6], 课题组前期研究发现, 莪术二酮具有抗凝血和抗血栓作用, 抑制体内血栓形成和二磷酸腺苷 (ADP) 诱导血小板聚集等^[7]。进一步研究发现, 莪术二酮通过调节 AMPK 参与的 vinculin/Talin 介导的整合素 α IIb β 3 信号通路抑制凝血酶诱导的血小板聚集^[8]。鉴于整合素 α IIb β 3 是血小板活化的最终共同通路, 本研究拟进一步探讨莪术二酮对整合素 α IIb β 3 活化的影响, 从而初步阐明莪术二酮抗血小板作用

的机制。

1 材料

1.1 细胞 收集近 2 周内未服用任何抗血小板药物的健康志愿者全血, 提取血小板。本研究经安徽医科大学第一附属医院临床医学研究伦理委员会批准 (伦理号 5101248)。

1.2 药物与试剂 莪术二酮由本课题组提取分离 (纯度 > 98%)。血小板洗涤溶液由氯化钠、氯化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸、D-葡萄糖配制而得; 台式液由氯化钠、氯化钾、磷酸盐、氯化钙、D-葡萄糖配制而得。凝血酶 (规格 2 000 U, 批号 024220403) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 前列地尔注射液 (规格 2 mL: 10 μ g, 批号 3B011T) 购自北京泰德制药股份有限公司; 氯化钠注射液 (规格 10 mL: 0.09 g, 批号 8E74D8) 购自中国大冢制药有限公司; 盐酸替罗非班注射液 (规格 50 mL: 12.5 mg, 批号 21210401) 购自鲁南贝特制药有限公司; FITC-P-选择素流式抗体 (批号 B369426) 购自美国 BioLegend 公司; FITC-PAC-1 流式抗体 (批号 WD3262181A) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; anti-Talin 1、anti-Integrin β 3、anti-p-Integrin β 3 抗体 (批号 GR309894-9、1008443-1、GR64472-10) 购自英国 Abcam 公

收稿日期: 2023-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82174011); 安徽省高等学校省级质量工程项目 (2022jyxm767)

作者简介: 程紫薇 (1999—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药理学。Tel: 15755928655, E-mail: 2421101343@qq.com

* 通信作者: 夏泉 (1969—), 男, 博士, 主任药师, 研究方向为中药心脑血管药理。Tel: (0551) 62922154, E-mail: xiaquan2010@163.com

吴鸿飞 (1982—), 女, 博士, 教授, 从事中药及其复方抗动脉粥样硬化研究。Tel: 13956934962, E-mail: wuhongfei2009@126.com

司; anti-Src、anti-p-Src 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 仪器 AYL-4-038 型血小板聚集仪 (美国海伦娜公司); CytoFLEX 型流式细胞分析仪 [贝克曼库尔特商贸 (中国) 有限公司]; XS500i 型血液分析仪 [希森美康医用电子 (上海) 有限公司]; KDC-1044 型低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); VE-186 型转移电泳槽、EPS300 型电泳仪、5200 型全自动化学发光系统 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 洗涤血小板制备 取健康志愿者全血置于含有枸橼酸钠抗凝剂的采血管中, 室温 800 r/min 离心 10 min, 取上层液体得到富集血小板血浆 (PRP), 加入前列地尔注射液 (每 1 mL 血小板加入 7 μ L 前列地尔注射液) 和体积约为 1/4 血小板总体积的枸橼酸葡萄糖溶液 (ACD 溶液)。将 PRP 于室温下 3 000 r/min 离心 3 min 后弃上清, 得到血小板沉淀; 取血小板沉淀加入 3 mL 洗涤溶液, 轻柔吹打均匀后 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清后加入台式液 (Tyrode's solution) 轻柔吹打均匀, 观察血小板呈云雾缥缈状悬浮为状态良好, 否则弃之不用。状态良好的血小板使用血液分析仪计数, 加入 Tyrode's solution 调整血小板密度为 2.2×10^8 /mL, 即为洗涤血小板。

2.2 血小板聚集功能测定 取 225 μ L 状态良好的洗涤血小板, 于室温下加入 25 μ L 生理盐水或不同浓度的凝血酶, 于 37 $^{\circ}$ C、1 200 r/min 搅拌速度条件下观察血小板在 5 min 内的最大聚集程度, 确定最佳凝血酶诱导剂量。洗涤血小板预先使用终浓度为 100、150、200 μ mol/L 的莪术二酮和阳性药物替罗非班 (4 μ g/mL) 预处理 15 min 后, 加入已确定剂量的凝血酶诱导血小板聚集, 记录聚集曲线的变化, 每个样本重复测定 3 次。

2.3 流式细胞术检测 P-选择素 (P-selectin) 表达 P-选择素的表达反映了血小板活化的状态。实验分为静息组、对照组、莪术二酮组 (100、200 μ mol/L)。取洗涤血小板 100 μ L 加入标记好的离心管中, 莪术二酮组分别加入不同浓度的莪术二酮, 静息组和对照组则分别加入等体积的溶剂, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。静息组加入生理盐水, 除静息组外各管均加入凝血酶 (0.1 U/mL) 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min; 在避光情况下加入流式抗体孵育 30 min, 孵育结束后加入 1 mL PBS 溶液终止反应, 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清后每管加 200 μ L PBS 重悬, 上机。实验重复 3 次。通过 CytExpert 软件定量分析血小板 P-selectin 的表达率。

2.4 流式细胞术检测 PAC-1 的结合 PAC-1 的结合反映了血小板整合素 α II b β 活化状态。实验分为静息组、对照组、莪术二酮组 (100、200 μ mol/L) 和阳性药物替罗非班组 (4 μ g/mL)。取洗涤血小板 200 μ L 加入标记好的离心管中, 莪术二酮组分别加入不同浓度的莪术二酮, 静息组和对照组则分别加入等体积的溶剂, 阳性药物组加入等体积的替罗非班, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。静息组加入生理盐

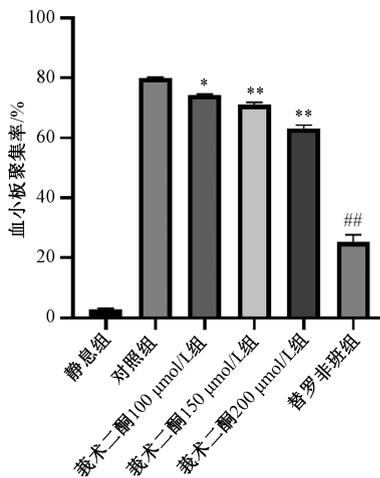
水, 除静息组外各管均加入凝血酶 (0.1 U/mL) 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min; 在避光情况下加入 PAC-1-FITC 流式抗体孵育 25 min。加入 1 mL PBS 混匀终止实验, 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 每管加 200 μ L PBS 重悬, 上机。实验重复 3 次。通过 CytExpert 软件分析血小板 PAC-1 的结合率。

2.5 Western blot 法检测血小板整合素活化相关蛋白表达 实验分为静息组、对照组、莪术二酮组 (200 μ mol/L) 和阳性药替罗非班组 (4 μ g/mL)。取状态良好的洗涤血小板, 按照“2.4”项下方法与药物避光孵育。静息组加入生理盐水, 除静息组外各管均加入凝血酶 (0.1 U/mL) 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 孵育结束后 3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 收集血小板沉淀, 加入 RIPA 细胞裂解液 250 μ L 于冰浴中放置 30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。取蛋白样品用 5 \times 上样缓冲液稀释, 于 100 $^{\circ}$ C 下加热 10 min 使蛋白变性。取变性的蛋白样本适量, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜, 以快速封闭液封闭 30 min, 加入 Integrin β 3、p-Integrin β 3、Src、p-Src、Talin 1、GAPDH 一抗 (稀释比例均为 1:1 000), 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 溶液清洗 3 次, 用 ECL 显影。采用 Fiji-Image J 软件分析条带灰度值。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

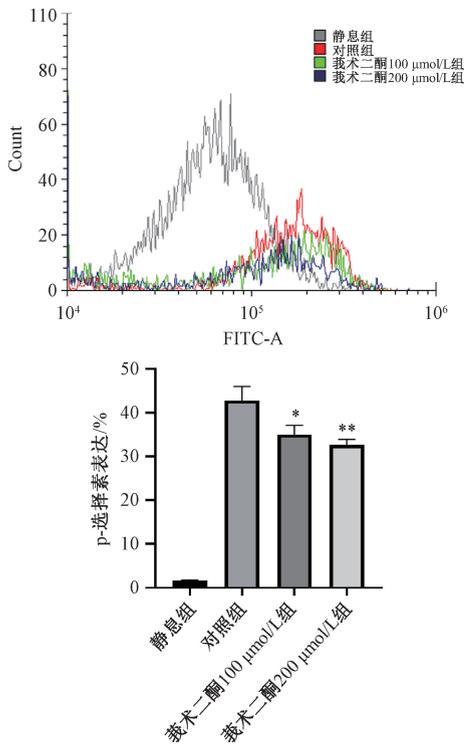
3.1 莪术二酮对血小板聚集率的影响 如图 1 所示, 与对照组比较, 莪术二酮各浓度均可抑制血小板聚集 (P<0.05, P<0.01), 并呈浓度依赖性, 但其抑制作用弱于替罗非班 (P<0.05)。



注: 与对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01; 与替罗非班组比较, ##P<0.01。

图 1 莪术二酮对血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

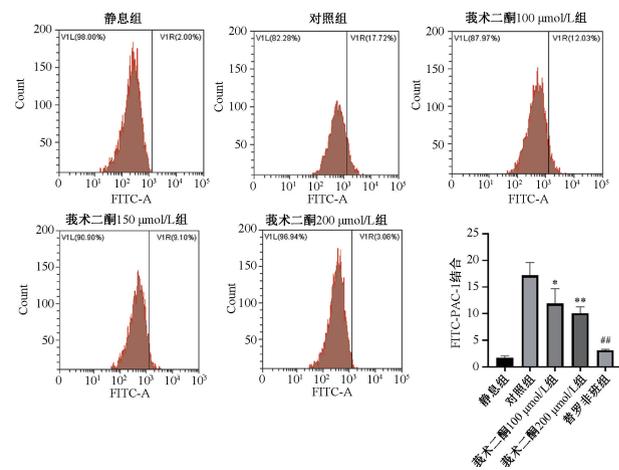
3.2 莪术二酮对血小板 P-选择素表达的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 莪术二酮 100、200 μ mol/L 组 P-选择素表达降低 (P<0.05), 表明莪术二酮抑制血小板活化。



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图2 莪术二酮对血小板P-选择素表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.3 莪术二酮对血小板与 PAC-1 结合能力的影响 如图3所示，与对照组比较，莪术二酮 100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组可抑制血小板与 PAC-1 的结合 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，表明莪术二酮可抑制血小板整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 的活化，但其抑制作用弱于替罗非班 ($P < 0.01$)。



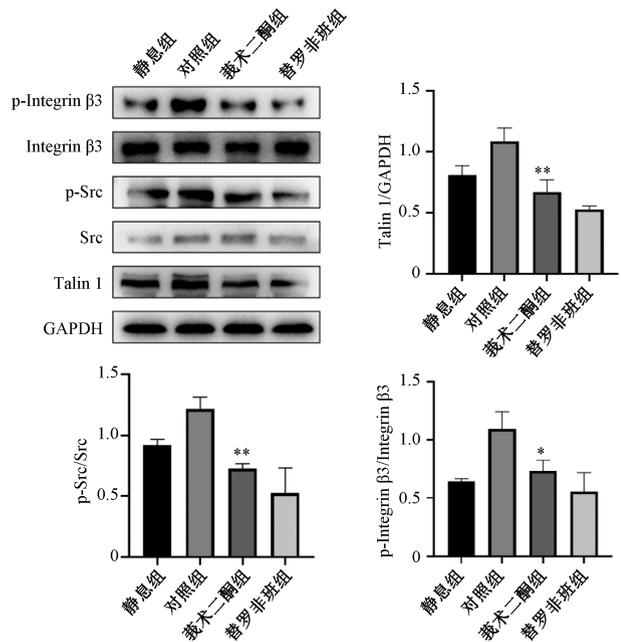
注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与替罗非班组比较，## $P < 0.01$ 。

图3 莪术二酮对血小板与 PAC-1 结合能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.4 莪术二酮对 Talin 1、p-Src、p-Integrin $\beta 3$ 蛋白表达的影响 如图4所示，与对照组比较，莪术二酮组 Talin 1、p-Src、p-Integrin $\beta 3$ 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 讨论

整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 是血小板活化的最终共同途径，当血



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图4 莪术二酮对 Talin 1、p-Src、p-Integrin $\beta 3$ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

小板与激动剂（如胶原、ADP 或凝血酶）接触时，会触发整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 由内向外信号转导（Inside-out），进而导致血小板的激活、聚集及血栓形成^[4]。目前临床使用的抗血小板药物有阿司匹林、氯吡格雷、依替巴肽、替罗非班等，均通过抑制血小板活化的信号通路发挥作用，但随着抗血小板作用增强出血风险也增加^[9]，其中替罗非班是一种起效快、药效强的整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 拮抗剂，其强效抑制作用引起的出血风险增加限制了在临床上的使用，因此开发既具有适度抗血小板作用又不会引起出血风险的药物更具有临床意义。活血化淤类中药在抗血小板治疗中具有优势，为抗血小板禁忌及高危人群的血栓性疾病的防治提供了新思路^[10]。本研究发现莪术二酮可抑制血小板和整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ ，但其作用弱于替罗非班，其对出血风险的影响和机制有待在今后的动物实验中进一步研究。

血小板活化与颗粒内容的释放有关，比如 ATP 和 Ca^{2+} 从致密颗粒中释放，P-选择素从 α 颗粒中释放，从而导致大量血小板聚集^[10]。P-选择素是一种储存在血小板 α 颗粒中的膜蛋白，随着血小板的活化转移至膜表面和血浆中，其表达反映了血小板的活化程度^[11]。本研究发现，100、200 $\mu\text{mol/L}$ 莪术二酮处理后可抑制洗涤血小板 P-选择素表达，其中 200 $\mu\text{mol/L}$ 莪术二酮抑制作用更强，说明其可抑制凝血酶诱导人血小板的活化。

整合素是异二聚体跨膜受体，每个受体由 α 和 β 亚基组成，其中整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 在血小板中特异性高度表达^[12]。在正常体循环中整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 保持低亲和力状态，防止不良血栓形成^[13]。当整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 与配体或激动剂结合后触发构象变化，由低亲和力状态转变为高亲和力状态，使整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$ 由静息状态转化为活化状态。整合素 $\alpha \text{IIb}\beta 3$

α IIb β 3 激活被认为是血小板反应性的标志,促进血小板聚集和血栓形成^[14-15]。本研究发现,莪术二酮可抑制 PAC-1 的结合,即可抑制整合素 α IIb β 3 的活化,这可能是其有效抑制血栓生长的原因^[7]。

一些蛋白与整合素 β 3 尾部结合,引起整合素的构象发生改变,进而促进其活化转变为高亲和力状态,其中 Talin 在其激活中起着至关重要的作用^[16]。Talin 诱导 α IIb 和 β 3 跨膜区和胞质结构域的解开(构象发生变化)从而激活整合素,kindlin 是激活过程中的协同调节因子^[17-18]。有研究表明,Talin 的缺失或 Talin 结合位点的突变会损伤激动剂诱导的整合素的活化和血小板聚集^[19]。整合素 α IIb β 3 与配体结合后,通过自身的磷酸化促进 Src 蛋白的磷酸化,是其由外向内(Outside-in)信号传导最早期的事件^[14]。有动物实验表明,c-Src 是 α IIb β 3 由外向内信号驱动的主要效应因子,促进整合素 α IIb β 3 由外向内信号的传导而导致血小板稳定粘附、延展、颗粒分泌等细胞反应^[12,20]。本研究发现莪术二酮可抑制 Talin 1 的表达和 Src 的磷酸化,且 Integrin β 3 的磷酸化受到明显抑制,说明其可能通过调控 Talin 1 和 Src 的磷酸化而抑制 Integrin β 3 的磷酸化,从而抑制整合素 α IIb β 3 活化,但具体机制有待进一步研究。

综上所述,莪术二酮可能通过抑制 Talin 1、p-Src 蛋白表达,抑制凝血酶诱导的人血小板整合素 α IIb β 3 活化,从而发挥抗血小板和抗血栓的作用。

参考文献:

[1] van der Meijden P E J, Heemskerk J W M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(3): 166-179.

[2] Mandel J, Casari M, Stepanyan M, et al. Beyond hemostasis: Platelet innate immune interactions and thromboinflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7): 3868.

[3] Koupenova M, Kehrel B E, Corkrey H A, et al. Thrombosis and platelets: an update[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 785-791.

[4] Delluc A, Lacut K, Rodger M A. Arterial and venous thrombosis: What's the link? A narrative review[J]. *Thromb Res*, 2020, 191: 97-102.

[5] Zhang L, Li Z, Ye X, et al. Mechanisms of thrombosis and research progress on targeted antithrombotic drugs [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(10): 2282-2302.

[6] 姜恩平,王卓. 莪术二酮对人宫颈癌 Hela 细胞增殖、凋亡和侵袭作用的研究[J]. 吉林医学, 2021, 42(5):

1032-1034.

[7] 王秀,夏泉,许杜娟,等. 莪术中莪术二酮抗凝血和抗血栓作用的实验研究[J]. 中成药, 2012, 34(3): 550-553.

[8] Fang H, Gao B, Zhao Y, et al. Curdione inhibits thrombin-induced platelet aggregation via regulating the AMPK-activated protein kinase-vinculin/Talin-Integrin α IIb β 3 sign pathway [J]. *Phytomedicine*, 2019, 61: 152859.

[9] Mao J, Zhu K, Long Z, et al. Targeting the RT loop of Src SH3 in platelets prevents thrombosis without compromising hemostasis[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(7): e2103228.

[10] 张缤纷,张文曦,奚肇庆. 活血化瘀中药抗血小板作用机制的研究综述[J]. 环球中医药, 2020, 13(5): 943-946.

[11] Mehic D, Machacek J, Schramm T, et al. Platelet function and soluble P-selectin in patients with primary immune thrombocytopenia[J]. *Thromb Res*, 2023, 223: 102-110.

[12] Estevez B, Shen B, Du X. Targeting Integrin and Integrin signaling in treating thrombosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 24-29.

[13] Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, et al. A structural mechanism of Integrin α IIb β 3 "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face [J]. *Cell*, 2002, 110(5): 587-597.

[14] Kim T I, Kim Y J, Kim K. Extract of seaweed *Codium fragile* inhibits Integrin α IIb β 3-induced outside-in signaling and arterial thrombosis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 685948.

[15] Zou J, Swieringa F, de Laat B, et al. Reversible platelet Integrin α IIb β 3 activation and thrombus instability[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12512.

[16] Huang J, Li X, Shi X, et al. Platelet Integrin α IIb β 3: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 26.

[17] Tao L, Zhang Y, Xi X, et al. Recent advances in the understanding of the molecular mechanisms regulating platelet Integrin α IIb β 3 activation [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(7): 627-637.

[18] 杨纪春,施小凤,黄建松,等. CHO 细胞模型中整合素 β 3 胞浆段尾部 NITY 基序对 α IIb β 3 介导的细胞功能的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(3): 768-773.

[19] Estevez B, Du X. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(2): 162-177.

[20] Senis Y A, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation [J]. *Blood*, 2014, 124(13): 2013-2024.