

# 血小板膜糖蛋白 b/ a 受体拮抗剂 RGDS 对血小板释放反应的影响

谢双锋<sup>1</sup>, 尹松梅<sup>1</sup>, 杨国雷<sup>1</sup>, 聂大年<sup>1</sup>, 李益清<sup>1</sup>, 王秀菊<sup>1</sup>, 马丽萍<sup>1</sup>, 吴裕丹<sup>1</sup>, 王景峰<sup>2</sup>  
(中山大学附属第二医院, 1 血液内科, 2 心血管科, 广东 广州 510120)

**摘要:** 【目的】观察血小板膜糖蛋白 b/ a (GP b/ a) 拮抗剂——四肽 Arg- Gly- Asp- Ser (RGDS) 对血小板聚集和 CD62p 表达的作用, 探讨 RGDS 对血小板聚集和释放反应的影响。【方法】检测二磷酸腺苷 (ADP; 终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ , 下同) 诱导血小板聚集的最大聚集率 ( $r_{\text{PA, max}}$ )、静息血小板和 ADP 诱导的血小板 CD62p 表达, 检测不同浓度 RGDS 对 ADP 诱导的  $r_{\text{PA, max}}$  的抑制率和血小板 CD62p 表达的抑制率, 进行回归分析。【结果】5 种浓度 (50、100、200、400、800  $\mu\text{mol/L}$ ) 的 RGDS 对  $r_{\text{PA, max}}$  均有显著抑制作用。正常人静息血小板 CD62p 表达率为 (3.5  $\pm$  0.6)%; ADP 激活血小板 CD62p 表达率为 (65.6  $\pm$  3.8)%, 两组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 50、100  $\mu\text{mol/L}$  的 RGDS 对血小板 CD62p 表达无抑制作用; 当 RGDS 浓度 200  $\mu\text{mol/L}$  时 (200、400、800  $\mu\text{mol/L}$ ), 其可抑制血小板 CD62p 的表达; RGDS 对  $r_{\text{PA, max}}$  的抑制作用和对血小板 CD62p 表达的抑制作用相关。【结论】RGDS 浓度  $< 200 \mu\text{mol/L}$  时, 对 ADP 诱导的血小板释放反应无影响; RGDS 浓度 200  $\mu\text{mol/L}$  时, 可抑制 ADP 诱导的血小板释放反应; 与 RGDS 显著的抗聚集效应相比, 其对血小板释放反应的影响比较小; RGDS 抑制血小板释放反应的作用与其抗血小板聚集有关。

关键词: 血小板膜糖蛋白 b/ a; 受体拮抗剂 RGDS; CD62p

中图分类号: R331.1+43

文献标识码: A

文章编号: 1672- 3554(2007)02- 0192- 04

## Effects of Glycoprotein b/ a Antagonist RGDS on Platelet Release Reaction in Vitro

XIE Shuang-feng<sup>1</sup>, YIN Song-mei<sup>1</sup>, YANG Guo-lei<sup>1</sup>, NIE Da-nian<sup>1</sup>, LI Yi-qing<sup>1</sup>, WANG Xiu-ju<sup>1</sup>, MA Li-ping<sup>1</sup>,  
WU Yu-dan<sup>1</sup>, WANG Jing-feng<sup>2</sup>

(1. Department of Hematology, 2. Cardiovascular Department, The Second Affiliated Hospital of SUN Yat- Sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the effect of tetrapeptide Arg- Gly- Asp- Ser (RGDS) on platelet aggregation and platelet CD62p expression. To study the effect of RGDS on platelet release reaction. 【Methods】The maximal platelet aggregation ( $r_{\text{PA, max}}$ ) induced by adenosine diphosphate (ADP) (final concentration 5  $\mu\text{mol/L}$ , the following were same), the platelet CD62p expression in resting state or induced by ADP was detected. With and without the effect of RGDS, platelet aggregation and CD62p expression induced by ADP were detected in vitro. The correlations between  $r_{\text{PA, max}}$  and CD62p were detected. 【Results】50  $\mu\text{mol/L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$ , 200  $\mu\text{mol/L}$ , 400  $\mu\text{mol/L}$ , and 800  $\mu\text{mol/L}$  RGDS could inhibit  $r_{\text{PA, max}}$  significantly. Platelet CD62p expression induced by ADP was much higher than that in its resting state. 50  $\mu\text{mol/L}$  and 100  $\mu\text{mol/L}$  RGDS had no significant effect on platelet CD62p expression. 200  $\mu\text{mol/L}$ , 400  $\mu\text{mol/L}$ , and 800  $\mu\text{mol/L}$  RGDS could inhibit platelet CD62p expression significantly. There was correlation between the  $r_{\text{PA, max}}$  and platelet CD62p expression inhibited by RGDS. 【Conclusion】RGDS ( $< 200 \mu\text{mol/L}$ ) had little effect on platelet release reaction induced by ADP. RGDS ( $\geq 200 \mu\text{mol/L}$ ) could inhibit platelet release reaction. The effects of RGDS on platelet release reaction were much less than those on platelet aggregation in same concentrations. The effect of RGDS on platelet release reaction had relation with its effect on  $r_{\text{PA, max}}$ .

Key words: platelet glycoprotein b/ a; RGDS; CD62p

[J SUN Yat- sen Univ(Med Sci), 2007, 28(2):192- 195]

收稿日期: 2006-10-25

基金项目: 广东省科技计划项目 ((2003C32709)

作者简介: 谢双锋 (1974 - ), 男, 河南洛阳人, 博士生, 主治医师; 尹松梅, 教授, 通讯作者. E- mail: sfxie@21cn.com

基础和临床实验均证明了血小板膜糖蛋白 b/ a(Glycoprotein b/ a, GP b/ a)受体拮抗剂强大的抗血小板聚集作用<sup>[1]</sup>,但其对血小板释放反应的作用尚不明确,相关研究无统一结论。我们通过观察不同浓度的 GP b/ a受体拮抗剂——四肽 Arg- Gly- Asp- Ser (RGDS)对血小板聚集和 CD62p 表达的影响,探讨 GP b/ a受体拮抗剂 RGDS对血小板释放反应的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

2006年1月-2006年10月于我院体检中心体检的健康者15人,20~40岁,性别不限,近1个月无用药史;排除冠心病、高血压、糖尿病患者及妊娠女性。空腹12h后肘静脉采血,柠檬酸葡萄糖液(acid citrate dextrose, ACD)抗凝,抗凝液与血液体积比例为1:6。

### 1.2 实验方法

1.2.1 血小板最大聚集率(maximal platelet aggregation,  $r_{PA, max}$ )的测定 ACD抗凝静脉血,150g离心8min,吸取富血小板血浆,再以650g离心10min;弃去上清液,加入含1g/L的牛血清白蛋白的羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液吹散沉淀,调整血小板数于(200~300) $\times 10^9/L$ ,每次测试取190 $\mu L$ ,加入诱导剂二磷酸腺苷(ADP)(二磷酸腺苷购自美国Sigma-Aldrich公司,本文中ADP终浓度均为5 $\mu mol/L$ );在TYXN-91智能血液凝集仪(上海通用机电技术研究所产品)连续测量并记录血小板聚集5min,以 $r_{PA, max}$ 为观察指标<sup>[12]</sup>。

1.2.2 血小板膜糖蛋白 CD62p 测定 ACD抗凝静脉血,分成每份90 $\mu L$ ,加入ADP孵育5min,实验组加入CD62p:PE、CD61:PerCP,对照组对应加入Mouse IgG:PE、CD61:PerCP染色,室温下作用20min,立即加入2~8%的甲醛溶液1mL,置2~8℃冰箱内固定30min,24h内上机检测;每次检测取5 $\mu L$ 标本,以CD61:PerCP和SSC双参数设门,检测CD62p阳性血小板的百分率。

1.2.3 RGDS对 $r_{PA, max}$ 作用 制备处理标本同1.2.1加入诱导剂ADP之前,先加入不同浓度的RGDS于37℃孵育2min,其余各步骤相同。 $r_{PA, max}$ 抑制率=[(对照组 $r_{PA, max}$ -RGDS用药后 $r_{PA, max}$ )/对照组 $r_{PA, max}$ ] $\times 100\%$ 。

1.2.4 RGDS对血小板 CD62p 表达率的作用 制备处理标本同1.2.2,静息组不加ADP直接测定,对照组加入ADP, RGDS用药组加入不同浓度的RGDS于37℃孵育10min后加入ADP;其余各步骤相同。CD62p表达抑制率=[(对照组CD62p表达率-RGDS用药后CD62p表达率)/对照组CD62p表达率] $\times 100\%$ 。

### 1.3 统计分析

采用统计软件SPSS 11.0进行数据分析,正常人静息状态下和ADP激动后血小板CD62p表达的比较采用随机化配对设计资料均数的t检验;各浓度RGDS孵育前后的比较采用随机化配对设计资料均数的t检验;不同浓度RGDS和其对 $r_{PA, max}$ 和CD62p的抑制率关系采用等级相关分析;采用回归分析确定RGDS对 $r_{PA, max}$ 和血小板CD62p表达率的量效关系。

## 2 结果

### 2.1 ADP诱导的血小板活化及释放反应

正常人(n=15)静息状态下血小板CD62p表达率为(3.5 $\pm$ 0.6)%;ADP激动后血小板活化并发生释放反应,血小板CD62p表达率明显增高到(65.6 $\pm$ 13.8)% (与静息状态比较, P=0.000);正常人(n=15)ADP诱导的 $r_{PA, max}$ 为(82.4 $\pm$ 6.5)%。

### 2.2 RGDS对血小板 $r_{PA, max}$ 和CD62p表达率的作用

实验中采用的5种浓度下, RGDS对 $r_{PA, max}$ 均有抑制作用,随着RGDS浓度的增加,抑制作用增强, RGDS能以浓度依赖性的方式抑制 $r_{PA, max}$ , RGDS的浓度和其对 $r_{PA, max}$ 抑制率之间存在正相关( $r=1$ , P=0.000),根据回归方程, RGDS对 $r_{PA, max}$ 抑制的 $IC_{50}$ 值为257 $\mu mol/L$ (95%可信区间211 $\mu mol/L$ ~312 $\mu mol/L$ )。实验中采用5种RGDS浓度中,当RGDS浓度200 $\mu mol/L$ 时,其抑制血小板CD62p表达的作用有统计学意义, RGDS的浓度和其对CD62p抑制率之间存在正相关( $r=1$ , P=0.000),实验采用最高浓度RGDS时,其对CD62p的抑制仍未达到 $IC_{50}$ (表1)。

### 2.3 RGDS对血小板 $r_{PA, max}$ 和CD62p表达率作用的关系

不同浓度RGDS作用时 $r_{PA, max}$ 和血小板CD62p表达抑制率呈正相关( $r=1$ , P=0.000);根据

表 1 RGDS对  $r_{PA, max}$  和 CD62p 表达率的作用  
Table 1 Effect of RGDS on  $r_{PA, max}$  and platelet CD62p expression

(n=15,  $\bar{x} \pm s$ )

RGDS ( $\mu\text{mol/L}$ )	$r_{PA, max}$ (%)	$r_{PA, max}$ inhibiting ratio (%)	$P^{1)}$	CD62p expression rate (%)	CD62p expression inhibiting ratio (%)	$P^{2)}$
Control	82.4 $\pm$ 6.5	-	-	65.6 $\pm$ 3.8	-	-
50	74.1 $\pm$ 6.6	8.9 $\pm$ 3.8	0.000	62.3 $\pm$ 2.8	4.2 $\pm$ 2.0	0.115
100	65.7 $\pm$ 8.1	17.6 $\pm$ 10.1	0.000	59.9 $\pm$ 1.8	7.4 $\pm$ 5.8	0.076
200	43.7 $\pm$ 6.1	50.1 $\pm$ 16.2	0.000	55.8 $\pm$ 4.6	15.2 $\pm$ 9.2	0.017
400	24.3 $\pm$ 1.4	67.8 $\pm$ 13.8	0.000	51.9 $\pm$ 2.7	20.8 $\pm$ 9.0	0.003
800	15.8 $\pm$ 6.3	80.9 $\pm$ 7.5	0.000	46.1 $\pm$ 2.0	29.5 $\pm$ 9.7	0.000

$r_{PA, max}$ : maximal platelet aggregation. RGDS: tetrapeptide Arg-Gly-Asp-Ser; 1) the concentration of RGDS and  $r_{PA, max}$  inhibiting ratio had ranked correlation ( $r=1$ ,  $P=0.000$ ); 2) the concentration of RGDS and CD62p expression inhibiting ratio had ranked correlation ( $r=1$ ,  $P=0.000$ ).

回归方程, 当 RGDS 对  $r_{PA, max}$  抑制率达到  $IC_{50}$  时, 其对 CD62p 表达抑制率的 95% 可信区间为 12%~18%。

### 3 讨 论

血小板活化在血栓形成中起重要作用。血小板活化包括 3 个方面: 黏附、聚集和释放; 三者相互促进, 形成的血小板血栓是血栓形成的始动环节; 血小板功能研究是血栓性疾病防治的重点。血小板胞浆颗粒和血小板膜糖蛋白参与血小板活化, 血小板胞浆颗粒主要有致密颗粒和  $\alpha$  颗粒, CD62p 是一种炎症反应的标志物, 是细胞黏附分子选择素成员之一, 主要分布于静息血小板的颗粒中, CD62p 在静息血小板上表达量很低; 当受到缺氧、自由基、凝血酶、ADP 等的刺激后, 发生脱颗粒反应, 颗粒膜与细胞膜融合, 使 CD62p 表达到血小板膜上, 介导白细胞和内皮细胞的起始黏附, 在炎症反应和血栓形成中起着中心环节作用<sup>[3,4]</sup>。既往研究表明, 降低高胆固醇血症患者血小板 CD62p 表达, 可能是他汀类降脂药物促进动脉粥样斑块消退的机制之一<sup>[5]</sup>。

血小板膜 GP b/ a 作为纤维蛋白原受体, 介导血小板聚集的最终途径, 在血小板黏附、聚集过程中起重要作用。血小板聚集产生的“外向内”信号转导, 进一步促进血小板释放。GP b/ a 受体拮抗剂抗血小板聚集的同时, 对血小板释放反应的影响报道不一。Ogawa<sup>[6]</sup>试验发现, 在搅拌条件下, GP b/ a 受体拮抗剂奥波非班的活性代谢产物 SC-57101A 能浓度依赖的抑制 ADP 与胶原诱导的血小板 PF4 与  $\beta$ -TG 的释放, 并且认为这种作用

是通过抑制聚集依赖性血栓素  $A_2$  实现的; 在不搅拌的条件下, SC-57101A 能抑制血小板 CD62p 表达, 虽然抑制率小但有统计学意义。Carroll<sup>[7]</sup>报告 GP b/ a 受体拮抗剂能抑制 ADP 诱导的血栓素  $A_2$  的合成, 但机制不明确。Divid<sup>[8]</sup>研究发现阿昔单抗和依替菲巴肽能够使 ADP 诱导的 CD62p 表达短暂升高, 然而奥波非班对 CD62p 表达无影响。UteKlinkhard<sup>[9]</sup>指出, 阿昔单抗浓度小于 0.5 mg/L 时能够使 ADP 诱导的 ATP 释放增加。以往作者的研究观察了多种 GP b/ a 受体拮抗剂对血小板释放的作用, 多数结论提示 GP b/ a 受体拮抗剂可轻度抑制或不改变血小板释放反应, 与我们的研究结论一致。

我们以 CD62p 表达率反映血小板的释放, 采用由低到高 5 个不同浓度的 RGDS, 观察其对 5  $\mu\text{mol/L}$  ADP 诱导的血小板 CD62p 表达的作用。发现当 RGDS 的浓度大于 200  $\mu\text{mol/L}$  时, 其抑制血小板 CD62p 表达的作用有统计学意义, 与其相同浓度对  $r_{PA, max}$  的抑制率比较, RGDS 对血小板 CD62p 表达的抑制率比较小, 800  $\mu\text{mol/L}$  RGDS 对血小板 CD62p 抑制率仅为 29% 左右; 浓度小于 200  $\mu\text{mol/L}$  的 RGDS 对血小板 CD62p 表达的抑制作用无统计学意义。低浓度的 RGDS 对 ADP 诱导的血小板释放反应无影响, 说明 RGDS 对血小板聚集与释放反应的抑制作用不一致, 与 RGDS 显著的抗聚集效应相比, RGDS 对 ADP 诱导的血小板释放反应的抑制作用较小。RGDS 对血小板聚集、CD62p 表达率的作用相关分析表明两者之间呈正相关, 提示 RGDS 对血小板释放反应的作用与其抗血小板聚集有关。血小板 GP b/ a 受体“外向内”信号传递引起血小板的第 2 次活化反

应,促进 颗粒与致密颗粒的释放,使更多的血小板聚集<sup>[10]</sup>。RGDS通过抗血小板聚集,减少了“外向内”信号转导,从而减少了血小板 颗粒的释放;而 RGDS对 ADP诱导的血小板释放反应的影响较小,提示诱导血小板 颗粒的释放反应可能存在多种途径,激动 GP b/ a受体产生“外向内”信号只是其中之一。所以在我们实验观察中,GP b/ a受体拮抗剂只能部分减少ADP诱导的血小板的释放反应。临床上GP b/ a受体拮抗剂单独应用虽然可以发挥强大的抗血小板聚集作用,但单独应用的临床效果并不理想。目前推荐GP b/ a受体拮抗剂和其他抗凝、抗血小板药物共同使用,联用其他药物除抗血小板聚集的作用外,可能有共同减少血小板释放作用,更好的改善血栓性疾病的预后。

#### 参考文献:

- [1] 杨永昌,黎 燕.糖蛋白 IIb/IIIa受体拮抗剂在抗血小板治疗中的应用及其研究进展 [J].国外医学.药学分册,2003,30(2): 86- 90.
- [2] 彭黎明,邓承祺,杨 元,等.现代血栓与止血的实验室检测及其应用 [M].北京:人民卫生出版社,2004: 160- 164.
- [3] SHEBUSKI R J, KILGORE K S. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(3): 729- 735.
- [4] CARTER A M, ANAGNOSTOPOULOU K, MANSFIELD M W, et al. Soluble P- selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease [J]. J Thromb Haemost, 2003, 1(8): 1718- 1723.
- [5] 马丽萍,徐立卓,尹松梅,等.普伐他汀在体内外对血小板 CD62p、CD41表达的影响 [J].中华血液学杂志,2000,21(9): 460- 462.
- [6] OGAWA T, SUGIDACHI A, OTSUGURO K, et al. Platelet alpha -granule secretion and its modification by SC- 57101A, a GP IIb/IIIa antagonist [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(10): 1911- 1918.
- [7] CARROLL R C, WANG X F, LANZA F, et al. Blocking platelet aggregation inhibits thromboxane A2 formation by low dose agonists but does not inhibit phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 [J]. Thromb Res, 1997, 88(2): 109- 125.
- [8] SCHNEIDER D J, TAATJES D J, SOBEL B E. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb- IIIa [J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(2): 437- 446.
- [9] KLINKHARDT U, KIRCHMAIER C M, WESTRUP D, et al. Differential in vitro effects of the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors abixicimab or SR121566A on platelet aggregation, fibrinogen binding and platelet secretory parameters [J]. Thromb Res, 2000, 97(4): 201- 207.
- [10] 王兆钺.血小板活化与信号传递 [J].中华血液学杂志,2002,23(3): 162- 163.

(编辑 黄小延)