

· 论 著 ·

# 丹参酮 II A 抑制血小板活化的 G 蛋白信号途径研究\*

张泽文, 王端旭, 林文杰, 陈江声

(汕头大学医学院第二附属医院血液肿瘤科, 广东汕头 515000)

**摘要:**目的 探讨丹参酮 II A(Tan II A)抑制血小板活化的 G 蛋白信号途径机制。方法 采用噻唑蓝(MTT)实验确定凝血酶和 Tan II A 对血小板的最适作用浓度和最适作用时间。分别采用核酸印迹法(Northern blot)和蛋白印迹法(Western blot)检测未处理组(对照组)、凝血酶处理组和 Tan II 处理组 G 蛋白及相关信号分子蛋白酶激活受体(PARs)、P2Y<sub>1</sub>、P2Y<sub>12</sub>、 $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体、血栓烷 A(TXA<sub>2</sub>)受体及血栓烷 A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)受体基因转录水平及蛋白表达水平,同时检测血小板聚集率。结果 凝血酶处理组血小板聚集率、G 蛋白及相关信号分子基因转录水平和蛋白表达水平高于对照组( $P<0.05$ )。不同浓度 Tan II A 处理组 G 蛋白及相关信号分子基因转录水平及蛋白表达水平明显低于凝血酶处理组( $P<0.05$ )。结论 Tan II A 可通过抑制 G 蛋白及相关信号分子的基因转录和表达抑制血小板活化。

**关键词:**丹参酮 II A; 血小板; G 蛋白

**DOI:**10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 11. 004

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2017)11-1449-03

## Mechanism of inhibition of platelet activation by tanshinone type II A through G protein signal pathway\*

ZHANG Zewen, WANG Duanxu, LIN Wenjie, CHEN Jiangsheng

(Hematology Oncology Department, the Second Hospital of Shantou University

Medical College, Shantou, Guangdong 515000, China)

**Abstract:** **Objective** To discuss the mechanism of inhibition of platelet activation by tanshinone type II A(Tan II A) through G protein signal pathway. **Methods** Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide(MTT) test was used to determine the optimum effective concentration and optimal time of thrombin and Tan II A on platelet. Northern blot and Western blot were used to detect the transcription and expression levels of G protein and related signal molecules, including protease activated receptors(PARs), P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub> receptors,  $\alpha$ 2A-adrenergic receptor and thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) receptor, in control group, thrombin treated group and Tan II A treated group, and the platelet aggregation rate was also detected. **Results** Platelet aggregation rate, and the transcription and expression levels of G protein and related molecules in thrombin treated group were higher than control group( $P<0.05$ ). The transcription and expression levels of G protein and related molecules in different concentrations of Tan II A treated groups were lower than thrombin treated group( $P<0.05$ ). **Conclusion** Tan II A could inhibit the activation of platelet by inhibiting the transcription and expression of G protein and the related molecules.

**Key words:** tanshinone type II A; blood platelet; G protein

血栓性疾病是威胁人类生命健康的常见血液系统疾病。血小板在凝血过程中通过血小板第三因子(PF<sub>3</sub>)提供磷脂表面,促进血液凝固,其表面信号转导分子在血小板促进止血、凝血方面发挥着重要作用<sup>[1-2]</sup>。中药丹参是唇形科植物丹参的干燥根,味苦,性微寒,归心、肝二经,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效<sup>[3-4]</sup>。本研究分析了丹参酮 II A(Tan II A)对凝血酶所致血小板活化的抑制作用,以及 G 蛋白偶联信号转导分子机制在其中所发挥的作用。现将研究结果报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 外周静脉血采集和血小板分离** 随机选择 20 名健康体检者,征得其同意并签署知情同意书后,采集外周静脉血 10 mL,以 3.8%枸橼酸钠溶液抗凝(血液与 3.8%枸橼酸钠溶液体积比为 9:1),2 000 r/min 离心 10 min,取血浆标本并分离血小板,调整血小板浓度至  $3\times 10^5$ /mL。

**1.2 凝血酶处理方法** 按  $1\times 10^4$ /孔的数量将血小板接种于 96 孔板微孔中,37℃放置过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 1 次,去除残留的胎牛血清;每孔加入凝血酶终浓度分别为 1、2.5、5、7.5、10 NIH U/mL 的无血清 DMEM 培养基 100  $\mu$ L,同时设不加凝血酶的对照组,培养 24 h;每孔加入噻唑蓝

(MTT)溶液 20  $\mu$ L,培养 4 h;弃去培养基,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150  $\mu$ L,室温避光震荡 10 min;酶标仪检测 492 nm 波长处光密度值(OD 值)。计算血小板存活率,血小板存活率=[实验组 OD 值(Ae)/对照组 OD 值(Ac)] $\times 100\%$ 。

**1.3 Tan II A 处理方法** 按  $1\times 10^4$ /孔的数量将血小板接种于 96 孔板微孔中,37℃放置过夜,PBS 漂洗 1 次,去除残留的胎牛血清;每孔加入浓度为 5 NIH U/mL 的凝血酶,以及 Tan II A 终浓度分别为 0.25、0.5、0.75、1.0、1.25  $\mu$ g/mL 的无血清 DMEM 培养基 100  $\mu$ L,同时设不加凝血酶及 Tan II A 的对照组,培养 24 h;每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu$ L,培养 4 h;弃去培养基,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,室温避光震荡 10 min;酶标仪检测 492 nm 波长处 OD 值。计算血小板存活率,血小板存活率=[实验组 OD 值(Ae)/对照组 OD 值(Ac)] $\times 100\%$ 。

**1.4 血小板分组及凝血酶、Tan II A 处理方法** 将上述血小板分为对照组、凝血酶处理组和 Tan II A 处理组。凝血酶处理组加入终浓度 5 NIH U/mL 凝血酶,Tan II A 处理组加入终浓度为 0.25、0.5、0.75、1.0  $\mu$ g/mL 的 Tan II A,37℃孵育 2 h。

**1.5 血小板聚集功能和活化血浆凝固时间(APCT)测定** 分别以腺苷二磷酸(ADP,终浓度 128 mg/L)、花生四烯酸(终浓

\* 基金项目:广东省中医药局科研课题(20141147)。

作者简介:张泽文,男,主治医师,主要从事血液内科疾病诊治及相关基础研究。

度 2.5 mmol/L)和胶原(终浓度 4.8 mg/L)作为诱聚剂,采用北京普利生公司 LBY-NJ4 型血小板聚集仪检测血小板聚集功能。采集每例患者肝素(终浓度 15 IU/mL)抗凝静脉血 5 mL,采用血小板聚集仪进行聚集率及 APCT 检测。

**1.6 G 蛋白及相关信号分子蛋白基因检测** 采用 TRIzol 试剂提取血小板 RNA,鉴定及测定纯度后,在 1%琼脂糖变性凝胶中进行 RNA 甲醛变性电泳后,将 RNA 转移并固定于尼龙膜上,采用地高辛标记探针核酸印迹法(Northern blot)检测 G 蛋白系列(Gaq、Gal2、Gai 和 Gaz)基因、蛋白酶激活受体(PARs)系列(PAR-1 和 PAR-4)基因、P2Y1、P2Y12 及  $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体、血栓烷 A(TXA2)受体基因。显色后采用美国 Syngene 公司图像分析系统进行图像扫描分析,确定各条带的强弱。

**1.7 G 蛋白及相关信号分子蛋白检测** 采用蛋白印迹法(Western blot)检测 Gaq、Gal2、Gai、Gaz、PAR-1、PAR-4 蛋白。取各组血小板,置 2 mL 含 10 mmol 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-Cl)及 1 mmol 乙二胺四乙酸(EDTA),pH 值为 8.0 的 Tris-EDTA(TE)溶液中,抽提蛋白质进行十二烷基聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE),采用半干式电转膜仪将电泳后的蛋白转移至纤维素膜(NC 膜)上,以小鼠抗人 Gaq、Gal2、Gai、Gaz、PAR-1 和 PAR-4 蛋白单克隆抗体为一抗,碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,采用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)/氮蓝四唑(NBT)显色。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行数据处理和统计

学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA 分析),两两比较用采用 LSD(方差齐性)和 Games-Howell(方差不齐性)检验。 $P < 0.05$  为比较差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 凝血酶和 Tan II A 对血小板存活率的影响** MTT 检测结果显示,经 5 NIH U/mL 凝血酶孵育 2 h 后,血小板存活率为(100.27 $\pm$ 1.52)%,延长孵育时间或加大凝血酶浓度后,血小板存活率则降低;0.25、0.5、0.75、1.0  $\mu$ g/mL Tan II A 处理对血小板存活率无影响,1.25  $\mu$ g/mL Tan II A 处理可使血小板存活率降低至(89.89 $\pm$ 1.71)%。

**2.2 凝血酶和 Tan II A 对其他指标的影响** 经 5 NIH U/mL 凝血酶处理后,血小板 G 蛋白及相关信号分子基因转录 mRNA 相对表达量较对照组明显增高( $P < 0.05$ )。经不同浓度 Tan II A 处理后,血小板 G 蛋白及相关信号分子基因转录 cDNA 灰度值及 mRNA 相对表达量均较对照组明显增高( $P < 0.05$ ),但低于凝血酶处理组( $P < 0.05$ );随着 Tan II A 浓度增加,血小板 G 蛋白及相关信号分子基因转录 cDNA 灰度值及 mRNA 相对表达量逐渐降低。凝血酶及 Tan II A 处理 2 h 后,表达 G 蛋白、PAR-1、PAR-4、 $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体及 TXA2 受体的细胞百分率均高于对照组( $P < 0.05$ )。随着 Tan II A 浓度增加,表达  $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体及 TXA2 受体的细胞百分率逐渐降低( $P < 0.05$ )。各处理组血小板聚集率及 APCT 见表 1。

表 1 各处理组血小板聚集率及 APCT( $\bar{x} \pm s$ )

| 处理组                       | 聚集率(%)                        |                               |                               | APCT(s)                       |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                           | ADP(128 $\mu$ g/mL)           | 花生四烯酸(2.5 mmol/L)             | 胶原(4.8 mg/L)                  |                               |
| 对照组                       | 61.8 $\pm$ 2.3                | 63.7 $\pm$ 3.5                | 53.6 $\pm$ 3.1                | 87.2 $\pm$ 0.6                |
| 凝血酶处理组                    | 189.8 $\pm$ 75.8 <sup>*</sup> | 184.5 $\pm$ 84.5 <sup>*</sup> | 179.3 $\pm$ 82.7 <sup>*</sup> | 156.8 $\pm$ 76.8 <sup>*</sup> |
| Tan II A 处理组( $\mu$ g/mL) |                               |                               |                               |                               |
| 0.25                      | 173.6 $\pm$ 69.8 <sup>#</sup> | 169.5 $\pm$ 58.2 <sup>#</sup> | 159.3 $\pm$ 73.5 <sup>#</sup> | 144.7 $\pm$ 66.2 <sup>#</sup> |
| 0.5                       | 151.6 $\pm$ 57.4 <sup>#</sup> | 139.8 $\pm$ 45.4 <sup>#</sup> | 133.5 $\pm$ 52.2 <sup>#</sup> | 128.1 $\pm$ 49.3 <sup>#</sup> |
| 0.75                      | 121.4 $\pm$ 28.8 <sup>#</sup> | 110.7 $\pm$ 32.8 <sup>#</sup> | 108.4 $\pm$ 43.6 <sup>#</sup> | 112.9 $\pm$ 38.5 <sup>#</sup> |
| 1.25                      | 89.1 $\pm$ 9.8 <sup>#</sup>   | 98.2 $\pm$ 8.7 <sup>#</sup>   | 90.3 $\pm$ 7.8 <sup>#</sup>   | 91.7 $\pm$ 8.8 <sup>#</sup>   |

注:与对照组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ;与凝血酶组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ 。

3 讨 论

血小板活化是心肌梗死、脑卒中、深静脉血栓形成等血栓性疾病的重要发病机制,因此抗血小板治疗是防治血栓性疾病的主要措施<sup>[5-8]</sup>。血小板功能亢进表现为黏附、聚集和活化能力增强,其分子调控网络涉及 G 蛋白及其偶联受体,如 PARs、 $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体及 TXA2 受体等<sup>[9-12]</sup>。

血小板表面存在多种跨膜受体,介导血小板与血管的黏附及血小板对激活剂的反应,在血小板止血和促凝血功能方面具有重要作用,其中最为主要的是 G 蛋白信号转导途径<sup>[13-16]</sup>。血小板激活剂与 G 蛋白偶联受体相互作用后,可通过以下信号转导机制发挥效应:(1)通过 Gaq 蛋白刺激 b 亚型磷脂酶 C(PLC),导致细胞浆  $Ca^{2+}$  浓度增加和蛋白激酶(PKC)活化;(2)通过 Gal2 和 Gal3 蛋白促进血小板内微管改变,形成丝足和层足,通过重组肌动蛋白细胞骨架,使血小板形态发生改变;(3)通过抑制 Gai 家族成员参与的腺苷酸环化酶的催化作用,抑制环磷酸腺苷(cAMP)的合成,尤其当内皮细胞合成前列腺素 I2(PGI2)和一氧化氮(NO)增多时,可导致血小板内 cAMP 水平升高<sup>[17-20]</sup>。本研究结果显示,凝血酶可诱导血小板表达 G 蛋白、相关信号分子,Tan II A 则具有一定的抑制作用。

**3.1 Tan II A 对血小板的影响** Northern blot 检测结果显示,对照组血小板 G 蛋白、PARs、P2Y1 和 P2Y12 受体,以及  $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体、TXA2 受体转录水平较低,经凝血酶处理后,各指标 mRNA 相对表达量明显升高( $P < 0.05$ ),表明凝血酶可诱导血小板上述各种蛋白的基因转录;经不同浓度 Tan II A 处理后,血小板 G 蛋白、PARs、P2Y1 和 P2Y12 受体,以及  $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体和 TXA2 受体 cDNA 灰度值和 mRNA 相对表达量均较对照组升高( $P < 0.05$ ),但较凝血酶处理组明显降低( $P < 0.05$ ),且随着 Tan II A 浓度的增加,cDNA 灰度值和 mRNA 相对表达量逐渐降低,表明 Tan II A 可抑制上述各种蛋白的基因转录,且具有一定的剂量依赖性。

**3.2 血小板活化过程中 Tan II A 的作用** 对照组血小板 G 蛋白及相关信号分子基因转录 mRNA 相对表达量极低。经 5 NIH U/mL 凝血酶诱导后,Gaq、Gal2、Gai、Gaz、PAR-1 和 PAR-4 表达量较对照组明显增高( $P < 0.05$ );经不同浓度 Tan II A 处理后,上述各种蛋白表达量也明显增加( $P < 0.05$ ),但较凝血酶处理组降低( $P < 0.05$ ),且表达量随 Tan II A 浓度增加呈递减趋势。孵育 2 h 后,各处理组表达 ADP 受体、 $\alpha$ 2A-肾上腺素能受体及 TXA2 受体的细胞百分率均明显高于对照组

( $P<0.05$ ),其中凝血酶处理组表达 3 种受体的细胞百分率最高;随着 Tan II A 浓度升高,表达 ADP 受体、 $\alpha 2A$ -肾上腺素能受体及 TXA2 受体的细胞百分率逐渐降低。由此可见,Tan II A 对血小板活化过程中的聚集及促凝功能等均有影响,血小板活化过程中 G 蛋白及相关的 PARs、P2Y1 和 P2Y12 受体、 $\alpha 2A$ -肾上腺素能受体及 TXA2 受体的基因转录和蛋白表达均可被 Tan II A 抑制。

综上所述,G 蛋白及相关信号分子参与了 Tan II A 抗血小板作用,从基因和蛋白水平为采用 Tan II A 防治血栓性疾病提供了一定的理论依据。

# 参考文献

[1] Stakos A, Tziakas N, Stellos K. Mechanisms of platelet activation in acute coronary syndromes [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2012, 10(5): 578-588.

[2] 赵战芝, 何钊, 唐雅玲, 等. 血小板因子 4 经 Toll 样受体 4 上调巨噬细胞基质金属蛋白酶 9 表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(8): 769-773.

[3] 徐筱跃. 丹参酮 II A 对免疫性血管炎、血小板及凝血活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(17): 4201-4203.

[4] 周丽美, 金烈, 朱潮涌, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对血液透析患者血小板聚集率及微炎症状态的影响[J]. 浙江实用医学, 2016, 21(2): 98-99, 108.

[5] 张钰. 血小板反应性与血栓出血事件的关系[J]. 中国实用内科杂志, 2015, 35(1): 31-35.

[6] 朱晋坤, 毛华, 尹扬光, 等. 阿司匹林和氯吡格雷对体外血小板黏附内皮细胞基质活性的影响及其机制研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(3): 283-287.

[7] 郑晓娜. 全身炎症反应综合征患者凝血功能变化研究[J]. 中外医学研究, 2016, 14(10): 21-22.

[8] 傅毅, 孙家兰, 赵静, 等. 血栓素 A2 受体 rs768963 基因多态性与血小板聚集功能的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(6): 525-528.

[9] 郭三喜. 血小板活化因子在下肢深静脉血栓形成中的临床意义[J]. 实用医技杂志, 2012, 19(12): 1301-1302.

[10] Varenhorst C, James S. Which antiplatelet agent for whom? Which patient populations benefit most from novel antiplatelet agents (ticagrelor, prasugrel) [J]. Curr Cardiol Rep, 2012, 14(4): 486-492.

[11] Wu Y, Wang P. Pharmacological actions and therapeutic applications of Salvia miltiorrhiza depside salt and its active components[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(9): 1119-1130.

[12] Xu SW, Liu PQ. Tanshinone II-A: new perspectives for old remedies[J]. Expert Opin Ther Pat, 2013, 23(2): 149-153.

[13] 陈赟. 血小板膜糖蛋白与血栓性疾病[J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(3): 221-223.

[14] 王华斌, 陈莉, 任宇, 等. 基于分子对接技术的小血小板 P2Y12 受体拮抗剂研究现状[J]. 药学进展, 2013, 37(3): 104-111.

[15] 张茜, 程欣茹, 盛光耀. 血小板活化因子与新生儿疾病[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(24): 1893-1895.

[16] 张金洪, 孙永安. 血栓弹力图评价缺血性心脑血管病患者抗血小板药物疗效及影响因素[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(6): 623-627.

[17] 李殊, 贺戎, 冯媛媛. 丹参酮 II A 磺酸钠对冠心病患者血小板功能的影响[J]. 临床医药实践, 2016, 25(3): 230-232.

[18] 许建国. 前列地尔联合丹参酮 II A 治疗肾功能不全疗效观察[J]. 中国现代医药杂志, 2013, 15(11): 49-50.

[19] 杨涓, 董江川, 李大主, 等. 丹参酮 II A 磺酸钠对冠心病患者血小板功能的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(15): 1294-1296.

[20] 朱海兵, 刘琳, 冯李长, 等. G 蛋白信号转导调节 5 和血小板衍生因子受体  $\beta$  在慢性脑白质损伤后的表达[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(6): 642-644.

(收稿日期: 2017-01-12 修回日期: 2017-03-18)

(上接第 1448 页)

in Alzheimer disease[J]. Neurol Clin Neurophysiol, 2002, 16(1): 2-8.

[2] Fitzpatrick J, Munzar M, Focht M, et al. 7C Gold urinary assay of neural thread protein in Alzheimer's disease[J]. Alz Rep, 2000, 3(3): 155-159.

[3] Levy S, Mcconville M, Lazaro GA. Competitive ELISA studies of neural thread protein in urine in Alzheimer's disease[J]. J Clin Lab Anal, 2007, 21(1): 24-33.

[4] 王蓉, 姬志娟, 盛树力, 等. 阿尔茨海默病尿神经丝蛋白方法的建立及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(1): 46-50.

[5] 陈英道, 石胜良, 张健, 等. AD7C-NTP 对阿尔茨海默病源性轻度认知功能损害患者诊断的临床价值[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(21): 1613-1617.

[6] Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease[J]. Trends Biotechnol, 2011, 29(1): 26-32.

[7] 江开达. 精神病学高级教程[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 58.

[8] Neugroschl J, Davis KL. Biological markers in Alzheimer disease[J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2002, 10(6): 660-677.

[9] Forlenza OV, Diniz BS, Gattaz WF. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease [J]. BMC Med, 2010, 16(1): 81-89.

[10] Zhang JJ, Shi SS. A literature review of AD7c-ntp as a biomarker for Alzheimer's diseases [J]. Ann Indian Acad Neurol, 2013, 16(3): 307-309.

[11] 孙宏侠, 白春艳. AD7C-NTP 在 AD 诊断中的研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 23(3): 374-375.

[12] 何丽杰. 影响医学检验分析前质量的因素[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(21): 1748-1749.

(收稿日期: 2016-11-12 修回日期: 2017-02-18)