

安菲博肽保护小鼠缺血性脑损伤的抗血小板活化机制

许哲昊, 后世翔, 陈春燕, 秦志强, 王坤, 章成, 周兰兰

摘要 目的 探究安菲博肽(ANF)对小鼠缺血性脑损伤的保护作用的抗血小板活化机制。方法 用改良线栓法制造小鼠大脑中动脉短暂性闭塞(tMCAO)的缺血性脑损伤模型。小鼠随即分为:假手术组、模型组、脑缺血组、ANF(4、2、1 μg/kg)组及阳性药替罗非班(TRF, 0.5 mg/kg)组。ANF组及TRF组在小鼠大脑中动脉短暂性闭塞至脑缺血90 min后进行再灌注,1 h后给予ANF或TRF,给药方法为尾静脉注射。在小鼠脑缺血再灌注24 h后,分别使用ELISA法测定各组小鼠血清血小板球蛋白(β-TG)和可溶性P-选择素水平;免疫组化检测各组小鼠的脑组织中血管性假血友病因子(vWF)的表达;免疫荧光法检测各组小鼠脑组织vWF和血小板膜糖蛋白(GP)Ib表达。结果 ANF(4、2 μg/kg)可显著降低缺血再灌注24 h后tMCAO小鼠血清中可溶性P-选择素和β-TG的浓度,降低tMCAO小鼠缺血脑组织微血管vWF和GPⅡb/Ⅲa的表达丰度。结论 ANF可能通过抑制血小板的活化从而产生对缺血性小鼠大脑的保护作用,ANF通过降低微血管GPⅡb/Ⅲa和vWF的表达丰度,抑制可溶性P-选择素和β-TG的过度释放,进而影响血小板黏附、聚集及血栓形成,从而减轻脑缺血再灌注损伤。

关键词 安菲博肽; 局灶性脑缺血; 血小板膜糖蛋白Ib; 血管性假血友病因子; 血小板活化

中图分类号 R 961

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1838-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.004

缺血性脑病是世界范围各个人群中都存在的一种疾病,也是临床上最为常见的能够引起患者死亡的疾病,其发病后死亡率和致残率很高,这些均是缺血性脑病的显著特点。除此之外,缺血性脑病能够对患者的生命安全造成极其严重的危害,并给社会及患者家庭带来沉重的医疗负担。因此,深入了解其发病机制,进行药物干预极为重要^[1-2]。

安菲博肽(anfibatide, ANF)是一种多肽,上世纪

90年代初从蛇毒中提取分离,具有显著的抗血小板黏附、聚集的效果,ANF作为血小板膜糖蛋白(glycoprotein, GP)Ib的受体阻断剂,是世界上第一种以GPⅡb/Ⅲa为靶点的抗血栓的药物。前期研究^[3]显示ANF可以显著降低缺血性脑损伤小鼠的脑梗死体积且具有保护大脑的功能,该文在前期研究基础上观察ANF对小鼠缺血性脑损伤保护作用及其抗血小板活化作用机制,为ANF进一步应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器 ANF购自合肥兆科药业有限公司,生理盐水配置,现配现用,批号:20150924;盐酸替罗非班氯化钠注射液购自武汉远大制药集团,5 mg/100 ml,批号:151008;鼠抗vWF单克隆抗体购自美国SANTA公司,批号:T7505;兔抗GPⅡb/Ⅲa多克隆抗体购自英国biorbyt公司,批号:A2319;CY3山羊抗鼠LgG购自北京博奥森生物技术有限公司,批号:990796;FITC标记山羊抗兔LgG、免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:122319A、13152A06;小鼠P-选择素、β-TG ELISA检测试剂盒购自美国R&D公司,批号:E202012M、E92163M;DMI-6000型激光共聚焦荧光显微镜、RM2135型石蜡切片机购自德国Leica公司;BM-II型病理组织包埋机、QP-B1型切片漂烘温控仪购自安徽电子科学研究所。

1.2 小鼠短暂性大脑中动脉闭塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)致局灶性脑缺血模型制备及分组给药 雄性昆明种小鼠50只,SPF级,6~8周、体质量18~22克,随机分为5组。使用改良Zea Longa法^[4]制备小鼠短暂性大脑中动脉闭塞模型。腹腔注射浓度为7%的水合氯醛(350 mg/kg)使小鼠麻醉,待小鼠瘫软翻正反射消失后将小鼠固定于鼠板,之后在颈部正中处做一纵向切口,大约为1 cm左右。然后缓慢将小鼠右侧颈总动脉、颈内和颈外动脉从肌肉组织中钝性分离,使其暴露在视野下,之后用3-0手术线结扎颈总和颈外动脉,在颈内和颈外动脉分叉处剪一小口,使用的线栓为细尼龙线(φ0.128或0.148 mm),插入头端用蜡

2018-07-26 接收

基金项目:安徽省高校拔尖人才学术资助重点项目(编号:gxhjZD2016035)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:许哲昊,男,硕士研究生;

周兰兰,女,博士,教授,责任作者, E-mail: lanzhou@aliyun.com

灼圆并蘸取多聚赖氨酸,尼龙线插入颈内动脉长度距分叉处约9~10 mm,结扎丝线。在小鼠颈部切口处滴加少量抗生素,然后缝合切口,最后进行消毒皮肤。待小鼠缺血90 min后拔出丝线,从而使血流再灌。手术过程使用保温毯维持小鼠体温在37℃左右,假手术组小鼠不做血管结扎和阻塞外,其余均与各组相同,整个实验时间控制在15 min内为宜。雄性昆明鼠,分为假手术组(Sham)、模型组、ANF组(4.2和1 μg/kg)和阳性药替罗非班(TRF)组(0.5 mg/kg)。各用药组分别于缺血90 min再灌注1 h后给药,注射量为10 ml/kg。

1.3 ELISA法检测小鼠血清血小板球蛋白(β-thromboglobulin, β-TG)和P-选择素含量 在小鼠脑缺血再灌注24 h后,眼眶取血,在4℃环境下静置1 h,3 000 r/min离心10 min,取上清液,-80℃保存待测。随即采用ELISA法测定,首先向预先包被P-选择素和β-TG抗体的包被微孔中,分别加入标本、标准品、HRP标记的检测抗体,温育并彻底洗涤。

1.4 免疫组织化学法检测小鼠缺血脑组织血管性假血友病因子(von willebrand factor, vWF)表达 待小鼠脑组织缺血再灌注24 h后,取出小鼠腹腔注射水合氯醛(350 mg/kg)使其麻醉,待小鼠翻正反射消失后,固定在鼠板上,剪开小鼠胸腔使其暴露心脏,确保其心脏保持搏动,先后用事先预冷的生理盐水和浓度为4%的多聚甲醛灌注,待全身发白身体僵硬后,取脑,依次用4%多聚甲醛和30%蔗糖水溶液固定。然后制备石蜡切片,采用过氧化物酶标记的链霉卵白素法染色法染色,具体操作步骤按试剂说明书进行。结果分析:每组5只动物,每张切片选取5个高倍视野,显微镜下观察切片vWF表达,采用Image-Pro Plus 6.0专业图片分析软件测量免疫阳性产物平均光密度值。

1.5 免疫荧光双标法检测小鼠缺血脑组织vWF和GPIbα表达 组织取材方法同上,待脑组织取出后,取缺血脑半球,进行冰冻切片。每只小鼠取10张制备完成的切片,置于冷丙酮中固定15 min。具体免疫荧光双染操作按说明书进行。免疫荧光双染完成后,将制作完成的切片在激光共聚焦荧光显微镜下观察并拍摄照片,采用Image-Pro Plus 6.0专业图片分析软件分别计算vWF和GPIbα的平均荧光强度。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 ANF对急性局灶性脑缺血小鼠血清β-TG和可溶性P-选择素含量的影响 与Sham组比较,缺血再灌注24 h后模型组tMCAO小鼠血清中可溶性β-TG和P-选择素浓度显著升高($F = 10.32, 18.79$, $P < 0.01$),同时,相对于模型组,ANF 4 μg/kg和2 μg/kg组tMCAO小鼠血清β-TG和可溶性P-选择素浓度显著下降($P < 0.01$);而与模型组比较,TRF组tMCAO小鼠血清β-TG和可溶性P-选择素浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1A、1B。

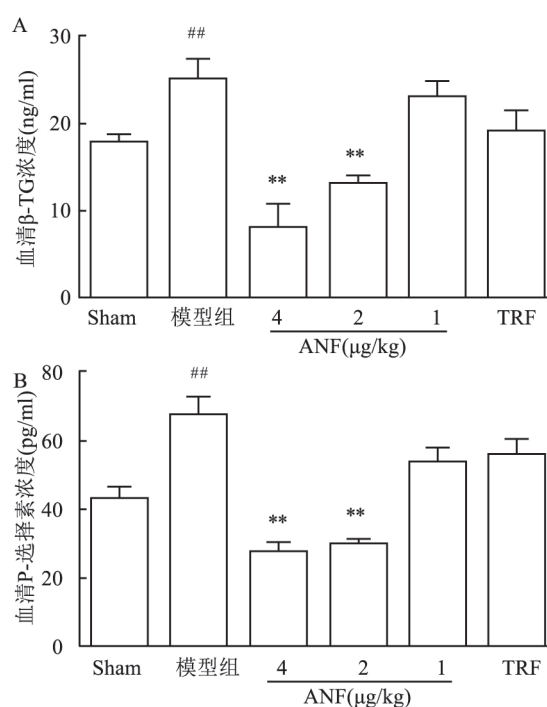


图1 ANF对急性局灶性脑缺血小鼠血清β-TG和P-选择素含量的影响

A: β-TG; B: P-选择素; 与Sham组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

2.2 ANF对急性局灶性脑缺血小鼠脑组织vWF表达丰度的影响 Sham组小鼠的正常脑组织中vWF表达丰度较低,而模型组tMCAO中小鼠缺血侧组织vWF表达丰度较Sham组明显增高,vWF阳性细胞主要表达在脑组织缺血区域的微血管壁上,切片染色呈棕色颗粒状。与Sham组比较,模型组tMCAO小鼠缺血侧脑组织vWF阳性细胞表达平均光密度明显升高,差异有统计学意义($F = 8.042$, $P < 0.01$)。与模型组比较,ANF 4 μg/kg和2 μg/kg组tMCAO小鼠脑组织中vWF表达丰度均有下调,

平均光密度值明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。TRF 组 tMCAO 小鼠脑组织 vWF 表达丰度未见降低,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

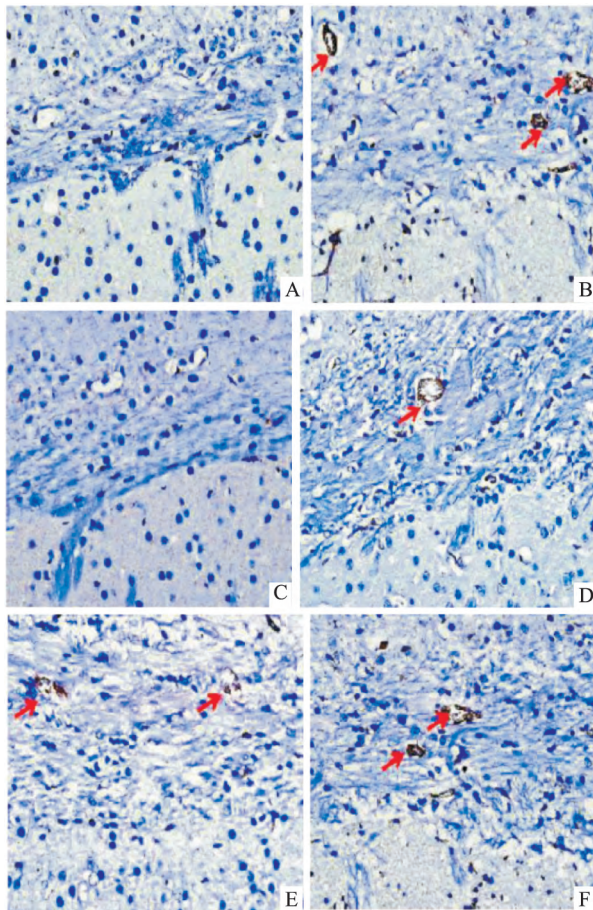


图2 ANF对急性局灶性脑缺血小鼠缺血侧脑组织vWF表达的影响 免疫组化×400

A: Sham 组; B: 模型组; C: ANF 4 μg/kg 组; D: ANF 2 μg/kg 组; E: ANF 1 μg/kg 组; F: TRF 组; G: vWF 表达丰度; 红色箭头标示处为 vWF 阳性颗粒; 与 Sham 组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 ANF对急性局灶性脑缺血小鼠脑血管 GPIbα和vWF表达的影响 采用免疫荧光双标法检测, FITC(fluorescein isothiocyanate), 即异硫氰酸荧光素, 其阳性反应在荧光显微镜下呈绿色, FITC 标记的山羊抗兔二抗与 GPIbα 反应, 显示 GPIbα 表达。CY3 阳性反应在荧光显微镜下呈红色, CY3 标记的山羊抗鼠二抗与 vWF 反应, 显示 vWF 表达。将两者组合(Merged), 在荧光显微镜下呈黄色, 表示两者在微血管壁上表达的分布情况。模型组小鼠脑组织 GPIbα 和 vWF 表达清晰达, 切片染色主要位于脑组织缺血半球, 分别呈绿色和红色, GPIbα 和 vWF 主要表达在脑组织缺血区域的微血管壁上。与 Sham 组比较, 模型组小鼠脑组织 vWF 和 GPIbα 的表达丰度明显升高, 差异有统计学意义 ($F = 17.930、5.895, P < 0.01$)。与模型组比较, ANF 4 μg/kg 和 2 μg/kg 可使 tMCAO 小鼠缺血侧脑组织微血管壁 GPIbα 和 vWF 的表达丰度显著下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。TRF 组虽也可使小鼠脑组织 vWF 和 GPIbα 的表达丰度有所降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤的机制还不是很明确, 目前公认的引起缺血再灌注损伤的学说有能量代谢障碍、细胞凋亡、氧自由基损伤等^[5-6]。脑缺血再灌注损伤是由各种因素共同作用的结果, 前期研究^[3]证实急性 tMCAO 小鼠体内凝血系统被激活, 血液呈现高凝状态, 缺血侧脑组织极易发生二次血栓形成, 二次血栓形成后加重脑内循环障碍从而再次损伤脑组织。当脑缺血组织恢复血液灌注时, 会造成脑血管内皮细胞的受损, 血小板的活化程度会明显提高, 活化血小板与血管内皮、粒细胞相互作用形成血栓, 从而造成急性脑梗死, 这一系列过程在急性脑梗进程中非常重要。

脑组织血管内皮细胞及活化血小板颗粒释放大量的内容物及膜糖蛋白入血, 在组织损伤中是识别血小板活化的重要指标^[7]。GPIb 是存在于血小板膜上的一种糖蛋白, 能够在血小板活化、血栓形成早期介导血小板黏附、聚集, 是 vWF 和凝血酶受体。胞黏附分子 P-选择素(granular membrane protein 140, GMP140) 由血小板 α 颗粒和内皮细胞释放, 能够诱导血小板的活化, 介导内皮细胞表面上粒细胞和单核细胞的滚动及其与血小板的黏附, GMP140 与血栓形成密切相关。β-TG 是血小板 α 颗粒分泌的血

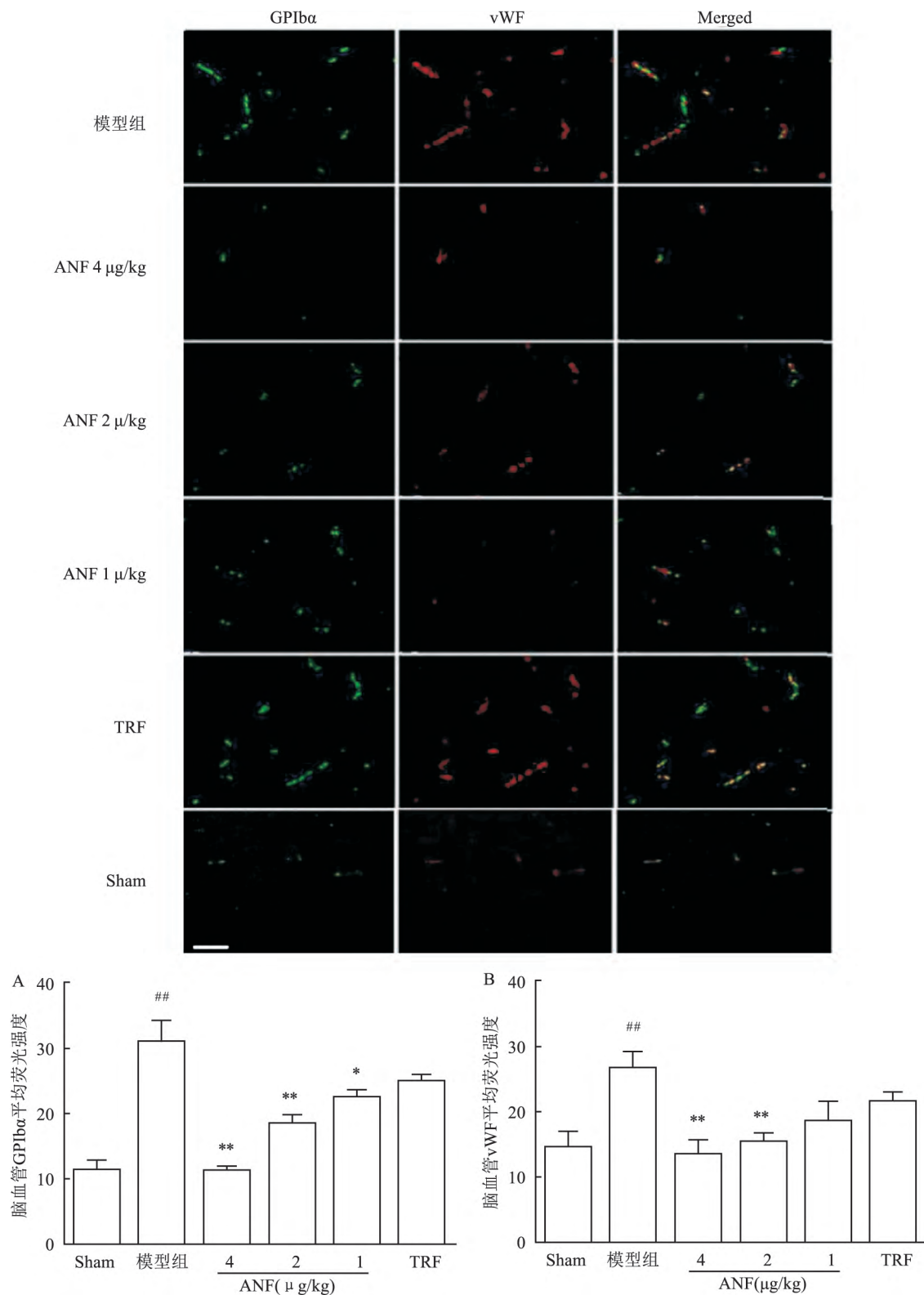


图3 ANF对急性局灶性脑缺血小鼠缺血侧脑血管 GPIIb/IIIa 和 vWF 表达的影响 免疫荧光 ×400

A: 脑血管 GPIIb/IIIa 平均荧光强度; B: 脑血管 vWF 平均荧光强度; 与 Sham 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

小板特异性球蛋白,血小板活化时 β-TG 被大量释放进入血液中,其参与凝血、免疫应答反应、炎症趋

化及组织修复等重要生理病理过程,并可进一步加重血管内皮的损伤^[8]。研究^[9]表明,特定的血小板

糖蛋白成分及颗粒释放物的量的改变不仅仅是血小板活化的标志性指标,而且也是卒中后死亡率的预测因子。加强对血小板活化分子标志物的监测对血管栓塞的预防有着极其重要的作用,同时也为缺血性脑病使用抗血小板药物进行防治提供了基础。

ANF 是九十年代初从蛇毒中分离得到的一种多肽,其相对分子质量为 29 799.7,其分子结构相对简单,包含 α 、 β 两个亚基,是全世界范围内第一个以 GPIb 为作用靶点的并在临床研究中的抗血栓药物。ANF 已在世界上好几个国家完成临床试验,拟用于治疗心肌梗死,且具有良好的安全性。前期研究^[3]显示,ANF 对缺血再灌注小鼠脑组织具有保护作用,能够降低脑损伤,改善损伤脑组织功能。本实验结果显示,ANF(4、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)可以显著下调 tMCAO 小鼠缺血区过度增高的脑血管 GPIb α 和 vWF 的表达丰度,降低血循环中血小板活化特异性标志物可溶性 P-选择素和 β -TG 的浓度。进一步分析其机制,ANF 作为 GPIb 受体拮抗剂,可抑制血小板的过度活化,降低脑血管 GPIb α 和 vWF 的表达丰度,减少可溶性 P-选择素和 β -TG 的过度释放,进而阻断 GPIb-vWF 途径,保护内皮血管细胞,防止血栓形成,保持脑微血管的畅通及血液灌注,从而降低缺血再灌注后小鼠的脑损伤,其确切机制有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Kalaria R N, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia [J]. *Biochim Biophys Acta* 2016, 1862(5): 915–25.
- [2] Deb P, Sharma S, Hassan K M. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: an overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis [J]. *Pathophysiology* 2010, 17(3): 197–218.
- [3] Li T T, Fan M L, Hou S X, et al. A novel snake venom-derived GPIb antagonist, anfibatide, protects mice from acute experimental ischaemic stroke and reperfusion injury [J]. *Br J Pharmacol* 2015, 172(15): 3904–16.
- [4] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke* 1986, 17(3): 472–76.
- [5] Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2010, 1207: 149–54.
- [6] Lo E H. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research [J]. *Br J Pharmacol* 2008, 153 Suppl 1: S396–405.
- [7] Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke [J]. *J Thromb Haemost* 2011, 9 Suppl 1: 92–104.
- [8] 罗永杰. 急性脑梗死患者血浆 β -TG、P-选择素动态变化的研究 [J]. *四川医学* 2000, 21(4): 326–8.
- [9] Carter A M, Catto A J, Mansfield M W, et al. Predictive variables for mortality after acute ischemic stroke [J]. *Stroke* 2007, 38(6): 1873–80.

Antiplatelet activation mechanisms of anfibatide on ischemic brain injury protection in mice

Xu Zhehao, Hou Shixiang, Chen Chunyan, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the antiplatelet activation mechanisms of anfibatide on ischemic brain injury protection in mice. **Methods** The focal cerebral ischemia-reperfusion model was built by the suture method for the right middle cerebral artery occlusion in mice. Male Kunming mice were randomly assigned to six groups including sham group, model group, ANF (4, 2, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and positive drug tirofiban (TRF, 0.5 mg/kg) treatment groups. In ANF and TRF treatment groups, ANF or TRF were administrated by intravenous injection after 90 min cerebral ischemia followed by 1 h reperfusion. 24 h after reperfusion, serum β -TG and soluble P-selection concentration were measured by ELISA, the vWF protein expression was investigated by immunocytochemistry, abundance of GPIb α and vWF were observed by immunofluorescence. **Results** ANF (4, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) significantly decreased the serum concentration of soluble P-selection and β -TG in tMCAO mice after 24 hour of reperfusion. ANF also reduced the abundance of GPIb α and vWF expression in the vascular walls of the ischemic hemisphere. **Conclusion**

The protective effect of ANF on focal cerebral ischemia in mice may be related to inhibition of platelet activation, reduction abundance of GPIb α and vWF in ischemic cerebral microvascular, inhibition over release of soluble P-selectin and β -TG in blood, and this affects platelet adhesion and aggregation and thrombus formation, so as to reduce the focal cerebral ischemia-reperfusion injury.

Key words anfibatide; focal cerebral ischemia; glycoprotein Ib; von willebrand factor; platelet activation