

Salganicoff 血小板条实验方法

周序斌¹, L SALGANICOFF, R SEVY

(Dept Pharmacology, Temple University School of Medicine, Philadelphia PA 19140, USA)

提要 Salganicoff 血小板条是一种新的血小板收缩蛋白模型。以弹性尼龙网作支架，把离心后血小板沉着于上，血小板不可逆聚集而与尼龙网交织一起，切成小条，悬挂在浴槽中记录张力活动。除尼龙网外，它全由血小板组成，似早期动脉血栓。对药物产生的反应，特异性强，重复性好。是观察血小板生理功能和研究防治血栓形成药的有用方法。

关键词 血小板；收缩蛋白；血块凝缩；尼龙网

1984年4月12日收稿 1985年6月12日修回

¹ 现在山东医学院药理学教研室

本文摘要刊登于第三届全国药理学术会 议论文摘要专刊(1984)。

Salganicoff 教授及其同事把血小板沉附在尼龙网上，切成小条，进行灌流，创造一个新的模型⁽¹⁾。既可观察收缩活动和生化变化，也可观察药物和离子对它的影响^(2,3)。现结合我们的试验，将此方法介绍，并简述其特性。

材 料 与 方 法

材料 离心管由上下两部分构成，上部为50 ml 聚碳酸酯离心管切去底部而成。外径28 × 87 mm，下部是由一金属平顶镶嵌在塑料

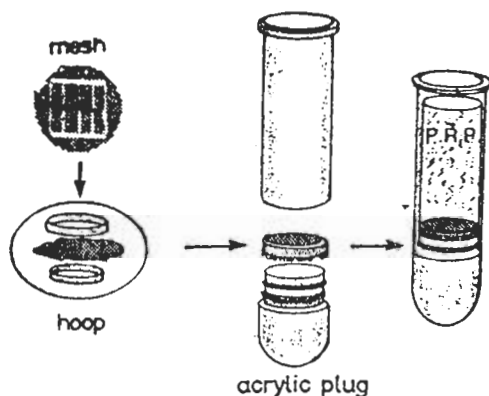


Fig 1. Preparation of platelet strips.

底座中而形成。金属平顶突出底座 4 mm 以安装尼龙网环。底座有一颈部可与上部衔接，并设有二个橡胶套环(图 1)。

网环由两个聚碳酸酯环组成，用以支撑尼龙网。外环外径 25 mm，内径 22.6 mm；内环外径 22.4 mm，内径 20 mm，二环高度均为 3.8 mm，比金属平顶短 0.2 mm。

尼龙网为富有弹性，以“平针”织成的尼龙袜制成。先用指甲油作上两条长 16 mm，相距 10 mm 之平行线，然后夹入两网环之间。网的松紧度以平行线相距不超过 11 mm 为准。

传感器系美国 Gould Statham UCZ 产品。测微计日本 Mitutoyo Outside Micrometer，最小感量 0.01 mm。记录器美国 Gould Brash 816 八导记录器。

ACD 抗凝剂含枸橼酸钠 2.5%，枸橼酸 1.5%，葡萄糖 2.0%。改良 K-H 液含 NaCl 119 mM，NaHCO₃ 25 mM，KCl 4.7 mM，MgCl₂ 2 mM，KH₂PO₄ 1.2 mM，葡萄糖 5 mM，EGTA 50 μM，CaCl₂ 另加。用前充以 95% O₂ + 5% CO₂，调节 pH 至 7.4。

K₂SO₄ 等张液含 K₂SO₄ 113 mM，MgSO₄ 2 mM，KHCO₃ 25 mM，葡萄糖 5 mM，EGTA 2 mM。用前充以 95% O₂ + 5% CO₂，调节 pH 至 7.4。简称 SO₄ 液。

标本制备 从静脉取两周内未用过阿司匹林等药物的健康成人血液 80 ml，以 ACD 抗凝

液 1:10 容量防凝。将防凝血液以 150 × g 离心 20 min，为富血小板血浆 (PRP)。在 Coulter 计数器上计数，将含有 9 × 10⁹ 血小板数之 PRP 装入已安有尼龙网之离心管内，冷却至 0-4℃，每 ml PRP 加入 1M 的 Tris-Cl 缓冲液 15 μl，摇匀后每 ml PRP 再加入 1M CaCl₂ 10 μl 使再钙化。混匀后立即在 0-4℃ 以 10 000 × g 离心 15 min，使血小板全沉着于尼龙网上。弃去上清液，置于 37℃ 中 20 min 使内源性凝血酶激活，引起血小板不可逆聚集而与尼龙网交织一起。然后把环与尼龙网分开，在 0-4℃ 的 K-H 液中，沿记号剪去尼龙网外边，留下二平行线中间部分切成四条 10 × 4 mm 条，每条约含血小板 7.3 × 10⁸。

实验操作 在浴槽内把血小板条一端与测微器相连，另一端与传感器相连。以 0-4℃ K-H 液灌流并供以 95% O₂ + 5% CO₂。首先充分松弛血小板条，在记录器上记下张力为 0 位置，然后旋转测微器，把血小板条逐渐舒展开，使初始张力至 100 mg，稳定 20 min 后，加入 CaCl₂ 1 mM，调温到 37℃。这时，血小板条开始收缩，经 30-40 min，张力达最大值 350-500 mg，可供抑制剂实验。当张力达最大值后改为等张液灌流，血小板条先出现一个短暂的张力增高后逐渐下降，10-20 min 内充分松弛，张力降为 30-70 mg。改为 K-H 液灌流并逐渐加 CaCl₂ 到 1 mM，可供兴奋剂实验(图 2)。

特 性

形态学观察 电镜观察血小板条与血小板聚集模型⁽⁴⁾和早期动脉血栓⁽⁵⁾非常相似。在激活前，血小板密集一起，但膜与膜互不接触，致密体，α 颗粒和线粒体存在，仅少量血小板可能因低温和离心而引起变形或形成伪足。经 37℃ 激活后，血小板相互连接，膜与膜之间间隙消失，致密体消失，α 颗粒密度降低⁽⁶⁾。当标本固定于组织浴槽内并产生一定张力时，细丝状结构明显可见。沿舒展方向排列，相邻血小板伪足内细丝可相互连接。以 SO₄ 液或 PGE₁

松弛血小板条，则可见血小板分离，细丝状结构很难辨认。

张力特性 浴槽内以 K-H 液灌流的标本，当灌流液温度由 0-4°C 升到 37°C 时，不论灌流液含 Ca^{2+} 与否，均可见血小板条自动收缩而使张力增加，30-40 min 内达最高峰，一般为 350-500 mg，张力大小与血小板条所含血小板数量及起始张力(即加温前被舒展的张力)密切相关。血小板数量越多，起始张力越高，则加温后张力越高。加温前在 K-H 液中加 Ca^{2+} 至 1 mM，可使张力曲线平稳，经 5-6 h 后，自然衰减 20-40%，一般可维持 6-10 h，在这段时间内对药物反应良好。部分标本在张力升高后可出现第二个高峰，接着迅速降到原高峰，随后则缓慢衰减，加温前不在 K-H 液中加 Ca^{2+} ，不影响最大张力的产生。但曲线波动不稳，自然衰减也较快。

在 37°C 中自动张力的产生，可能是在内源性酶作用下引起膜磷脂分解产生血栓素 ($\text{thromboxane})\text{A}_2$ 等活性物质，促进内 Ca^{2+} 增高，引起收缩蛋白收缩。若加入阿司匹林可抑制自动张力产生。 Ca^{2+} 的来源，主要是细胞内

结合钙的释放。张力自然衰竭既有活性物质耗竭，也有代谢功能衰退的因素，后者也影响对外源性 ADP、肾上腺素等物质的反应。

当标本在 K-H 液中张力达最大值时，改为 SO_4 液灌流，立即出现张力短暂上升而后下降现象，20 min 内降到 30-70 mg，这时改为 K-H 液灌流，并以小量开始加入 $10\ \mu\text{M}\ \text{Ca}^{2+}$ 至 1 mM，张力也不改变，而对 ADP、肾上腺素等兴奋剂反应良好。在 SO_4 液中标本张力短暂上升，可能因高 K^+ 溶液引起膜去极化所致。以等张 KCl 溶液灌流也可出现张力短暂上升，但随 KCl 溶液灌流后给以 SO_4 液，却无张力短暂上升现象。在 SO_4 液中标本张力下降，几乎达完全松弛程度，这与 EGTA 与 Ca^{2+} 络合，使血小板内 Ca^{2+} 下降有关。以含有 2 mM EGTA 的 K-H 液代替 SO_4 液，同样可使标本张力下降，但下降速率较慢。处于 SO_4 液中张力很低的标本，对 ADP、肾上腺素等兴奋剂仍有反应，但随 SO_4 液灌流时间延长，反应明显减弱以至完全消失，这可能与内 Ca^{2+} 丢失程度有关⁽⁹⁾。经 SO_4 液灌流使标本松弛后，改为 K-H 液灌流，从小量开始加 Ca^{2+} 于 K-H 液，也不

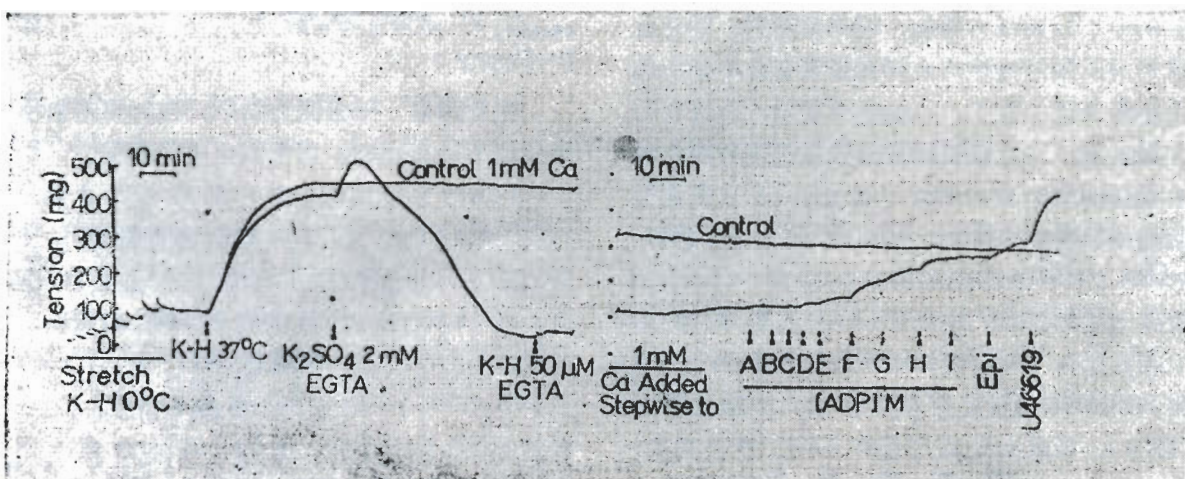


Fig 2. Procedure for platelet strip experiment. Sample record after ADP. Note additional responses to epinephrine (Epi) and U 46619 after maximal response to ADP. K-H = Krebs-Henseleit solution.

引起张力增加,可能是在内 Ca^{2+} 较少情况下,膜对 Ca^{2+} 通透性下降,即使灌流液含 Ca^{2+} 已达 1 mM ,但因内 Ca^{2+} 缺乏,所以张力不增加^(7,8)。

药理特性 ADP、肾上腺素、去甲肾上腺素、胶原、凝血酶、花生四烯酸、 PGH_2 及其同类物 U 46619、U 44069、 TXA_2 同类物 SQ 26655 等血小板聚集诱导剂以及钙离子载体 A 23187 均能使松弛的血小板条张力增加;聚集抑制剂 PGI_2 、 PGE_1 、罂粟碱⁽¹⁾以及活血化瘀药丹参注射液、川芎嗪注射液⁽¹⁰⁾均能使紧张的血小板条张力下降。实验重复性良好,并呈剂量反应曲线关系。我们测得⁽⁹⁾在含 1 mM Ca^{2+} 的 K-H 液中,ADP 对血小板条的 ED_{50} 为 $6.6 \mu\text{M}$,肾上腺素为 $0.3 \mu\text{M}$,U 46619 为 55 nM ,在不含 Ca^{2+} 的 K-H 液中,花生四烯酸对血小板条的 ED_{50} 为 $0.6 \mu\text{M}$,SQ 26655 为 6 nM 。

日本学者⁽¹¹⁾以肾上腺素引起血小板条张力增加,测定 5-HT 分泌也相应增加。他们发现 ADP、肾上腺素引起血小板条收缩的剂量与引起血小板聚集的剂量相近,罂粟碱、 PGE_1 引起血小板条松弛剂量与抑制血小板聚集剂量相近。5-HT 引起血小板聚集作用明显,我们在人类血小板所制成的标本中发现 5-HT 能使松弛的血小板条张力增加,但作用不强。能使血管平滑肌强烈收缩的血管紧张素 II 并不能引起血小板条张力改变。以加压素实验,发现它的作用较弱。肾上腺素能 β 受体阻断剂心得安和 α_1 受体阻断剂 prazosin 不能影响肾上腺素引起血小板条张力增加,而 α_2 受体阻断剂 yohimbine 1 mM 能完全抑制肾上腺素 $6 \mu\text{M}$ (最大反应剂量)的作用。在给 TXA_2 同类物 SQ26655 之前,加入 TXA_2 受体阻断剂 SQ 26536 1 mM 使 SQ 26655 剂量反应曲线右移,但形态不变(图 3)。以最大反应剂量的 ADP、肾上腺素、U 46619 先后不同次序给药,均能使张力进一步增加(图 4)。这些实验表明了标本具有严格的药理学特性,并与血小板基本生理功能有一定的联系。

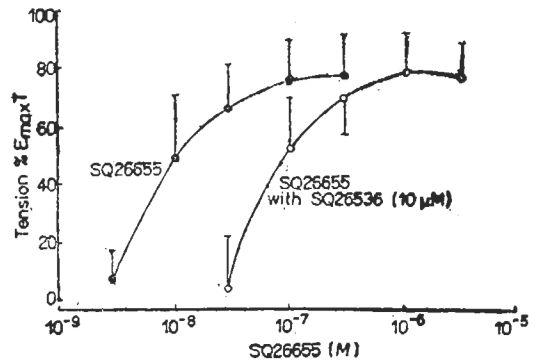


Fig 3. Effect of thromboxane A_2 receptor antagonist SQ 26536 on contractile response to thromboxane A_2 receptor agonist SQ 26655. $E = E\% E_{\text{max}} T \pm \text{SD}$ ($n = 6$). $E_{\text{max}} T = \text{Original tension in K-H corrected for decay in control strip}$.

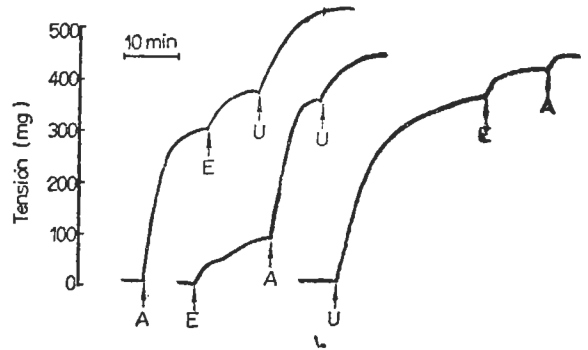


Fig 4. Contractile response to maximal dose of one agent incremented by addition of other agents. A = ADP 0.3 mM , E = Epinephrine $6 \mu\text{M}$. U = U46619 $1 \mu\text{M}$.

生化测定 结合张力观察,随时可把血小板条取下进行固定,用来测定生化改变。

Lowry 法测定每一血小板条蛋白含量为 $1.01 \pm 0.16 \text{ mg}$ 。以 $[^3\text{H}] \text{cAMP}$ 标记测定处于最大张力的血小板条含 cAMP 约 10 pM/mg 蛋白。以 1 nM 至 $0.3 \mu\text{M}$ 浓度作 PGI_2 剂量反应曲线,随张力降低,伴随着 cAMP 增高, 3 nM 的 PGI_2 (ED_{50}) 可使 cAMP 增加 7 倍⁽⁶⁾。血小板在受凝血酶刺激后,在 Ca^{2+} 和钙调素作用下引起 20,000 道尔顿肌球蛋白轻链磷酸化,从而引起收缩蛋白收缩⁽⁶⁾。血小板条实验表明张力、肌球蛋白轻链磷酸化和 cAMP 含量相互之间有密切联系^(2,3,6)。

讨 论

Salganicoff 血小板条是通过等长或等张收缩观察血小板收缩蛋白功能活动的新模型。绝大多数聚集诱导剂能使它张力增加,聚集抑制剂使它张力降低,但与聚集实验不同:1. 血小板条本身是经凝血酶激活使血小板引起不可逆聚集而制成,具有收缩和松弛功能,反复给药,重复性良好。2. 5-HT、加压素具有良好的诱导聚集作用,但对人血小板条张力增加作用却较弱。

本实验与血块回缩实验相比,具有下列优点:1. 成分纯,除血小板外,几无纤维蛋白和其他血细胞参与。2. 观察指标明显,血小板条张力可放大记录成 8.8-12.5 cm 的收缩波。3. 可重复实验,连续记录。

形态学上,血小板条如同早期动脉血栓,通过张力及生化测定可观察药物或离子对其张力及生化改变。也可把血小板条与血管上皮紧密接触,观察它与血管上皮之间的相互作用。

标本制备易取得成功,观察时间长。但实验仪器精密度要求高,一次需血量也较大。虽

然某些现象暂时得不到解释,但却为探讨血小板生理功能以及相互关系提供了有利工具。我们认为,血小板条实验方法是探讨血小板生理活动和研究防治血栓形成药的有用方法。

参 考 文 献

- 1 Salganicoff L, Russo M, Loughnane M. *Thromb Haemost* 1977; 38: 155
- 2 Daniel J, Sevy R, Salganicoff L. *Ibid* 1981; 46: 95
- 3 Bromberg M, Sevy R, Daniel J, Salganicoff L. *Fed Proc* 1982; 41: 1304
- 4 Hovig T. *Thromb Diath Haemorrh* 1962; 8: 445
- 5 Kajaerheim A, Hovig T. *Ibid* 1962; 7: 1
- 6 Daniel J, Molish I, Holmsen H, Salganicoff L. In: Rosen OM, Krebs EG, eds. *Protein phosphorylation*. 1st ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981: 913-28
- 7 Salganicoff L, Sevy R. *Fed Proc* 1980; 39: 582
- 8 Salganicoff L. *Thromb Haemost* 1979; 42: 215
- 9 Zhou XB, Salganicoff L, Sevy R. *Pharmacologist* 1983; 25: 135
- 10 周序斌. *药学报* 1985; 20: 334
- 11 Yamakado T, Nishikawa M, Azuma H, Hidaka H. *Eur J Pharmacol* 1983; 91: 441

Acta Pharmacologica Sinica 1986 May; 7 (3): 247-251

Preparation of Salganicoff's platelet strip

ZHOU Xu-bin¹, L SALGANICOFF, R SEVY

(Dept Pharmacology, Temple University School of Medicine, Philadelphia PA 19140, USA)

ABSTRACT Salganicoff's platelet strip, a new biological preparation, is used to observe the behavior of the platelet contractile protein with isometric tension. By centrifuge the platelets were deposited on a flat surface of a highly compliant nylon mesh. With heating the platelets were irreversibly activated by the thrombin generated in the residual plasma. The mesh was cut into strips, which were mounted for recording tension. It contracted in response to aggregating agents and relaxed to

antagonists. It contracted like clot retraction. Being consisted of almost entirely platelets, it was more specific and the response showed a better reproducibility. It is a convenient tool for the study of physiological and biochemical studies of platelets and fibrinolytic agents.

KEY WORDS blood platelets; contractile proteins; clot retraction; nylon mesh

¹ Now in Shandong Medical College, Ji-nan China.