

内皮损伤引起血小板沉积测定方法的建立与应用

王维亭, 徐向伟, 何小云, 赵专友, 汤立达

天津药物研究院 药代与药效动力学重点实验室, 天津 300193

摘要 **目的:** 研究建立血小板沉积模型的方法。**方法:** 采用 ^{99m}Tc 体外血小板标记与光化学血管内膜损伤法建立模型, 通过血小板沉积数测定研究模型的应用性。**结果:** 实验结果表明, ^{99m}Tc 体外血小板标记率受标记时间影响, 最佳时间为30 min; 洗涤2次可将未标记同位素基本分离掉; 血小板沉积数表示法较直接CPM计数法优越; 阳性对照欣维宁可减少血小板在内膜损伤动脉血管壁上的沉积。**结论:** 通过 ^{99m}Tc 体外血小板标记与光化学血管内膜损伤建立的血小板沉积方法, 科学、可靠, 有一定实用性。

关键词 血小板; ^{99m}Tc ; 光化学

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2009)02-0101-03

Establishment and application of model for platelet deposition induced by endothelial injury

WANG Wei-ting, XU Xiang-wei, HE Xiao-yun, ZHAO Zhuan-you, TANG Li-da

State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract **Objective:** To study the method of the model establishment for platelet deposition. **Methods:** Using ^{99m}Tc labeled platelet and damage of vascular intima with photo-chemistry, the application of model for platelet deposition was studied by the measurement of platelet deposition. **Results:** The labeling ratio of platelet with ^{99m}Tc was affected by the labeling time, the optimal time was 30 min, the unlabeled platelet could be separated from labeled platelet through two times of scrubbing by buffer, the method of the counts of platelet deposition has superiority than that of CPM, the deposition of platelet in damaged vessels with photochemistry could be reduced by Tirofiban in the positive control group. **Conclusions:** The method of ^{99m}Tc labeled platelet *in vitro* and damage of vascular intima with photochemistry is reliable, and can be used for evaluation of antiplatelet agents.

Keywords platelet; ^{99m}Tc ; photochemistry

血栓性疾病是威胁人类健康的重要疾病, 内膜损伤与血小板沉积是血栓性疾病的重要启动因素之一。内皮损伤测定的方法主要有乙酰胆碱鉴定法、血浆内皮释放活性物质(如NO、ET-1、 PGI_2 、 TXA_2)测定、内皮计数, 以及病理观测等, 这些方法对于整体系统内皮损伤与功能评价有重要意义, 但这些方法不能有效反映与评价血管内皮局部损伤, 以及微小血管内皮损伤的情况。本文采用光化学法建立局部、小血管的内皮损伤模型, 并利用 ^{99m}Tc 体外血小板标记方法, 评价内皮受损及引起的血小板沉积状态, 该模型的建立对于内皮功能研究与抗

血小板药物的研发与评价具有重要意义。

1 材料

1.1 药品及试剂

^{99m}Tc (^{99m}Tc), 天津市肿瘤医院提供。欣维宁(盐酸替罗非班氯化钠注射液, Tiro), 武汉远大制药集团有限公司产品, 批号 071201, 规格 5 mg/(100 mL·瓶), 临用前用生理盐水稀释至所需体积。

1.2 动物

Wistar 大鼠, 雌雄兼用, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(京)

收稿日期: 2009-06-09

基金项目: 系列化、国际化的国家生物医药国际创新园新药研发综合性大平台建设资助项目(009ZX09301-008)。

作者简介: 王维亭, 男(1974—), 医学硕士, 副研究员, 主要从事心血管药理与新药研究。Tel: (022) 23006858, E-mail: 23006858@163.com

2007-0001。

1.3 仪器

PK121R 低温冷冻离心机,意大利 ALC 公司生产。PT630G12 微机多探头 γ 计数仪,北京核仪器厂产品。WZ—50B 微量注射泵,浙江医科大学医学仪器厂生产。540 型血小板聚集分析系统,美国 CHRONO-LOG 公司产品。冷光激光发射器,天津 8358 厂提供。

2 方法

2.1 血小板标记

Wistar 大鼠,雌雄兼用,称重后乙醚麻醉;腹主动脉取血,以 ACD 抗凝剂抗凝,全血与抗凝剂体积比为 4:1,以 800 r/min 离心 15 min,得到富血小板血浆 (PRP);PRP 再以 2 000 r/min 离心 10 min 得到血小板,用 4.0 mL 枸橼酸钠缓冲液悬浮、洗涤血小板,以 2 000 r/min 离心 10 min,得到的血小板再用枸橼酸钠缓冲液悬浮。

向 PRP 的塑料试管中加入复合还原剂 1 mL (含 4-氨基苯甲酸 1.0 g/L,酒石酸亚锡 10.6 mg/L,酒石酸钠 2.0 mg/L, pH 7.0),再加入 $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$ 发生器淋洗的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 0.5 mL (100 MBq), 37 °C 温箱中,分别温孵 15、30、45、60 min;以 2 000 r/min 离心 10 min;去掉上清液 (洗涤液),得到标记血小板,再以 4 mL 枸橼酸钠缓冲液悬浮血小板,洗涤 3 次,最后加入 4 mL 枸橼酸钠缓冲液悬浮血小板,用于动物体内注射。根据下列公式计算标记率与洗脱率:

标记率 = (放射加入总量 - 洗涤液放射量) / 放射加入总量 $\times 100\%$

洗脱率 = 洗涤液放射量 / 放射加入总量 $\times 100\%$

根据标记率、放射强度、半衰期,以及体重等因素,给动物注射等量放射标记强度的血小板 (6.48×10^7 cpm/kg),并另取动物设置 3.24×10^7 、 1.30×10^8 cpm/kg 组进行沉积量的比较。

2.2 动物造型

Wistar 大鼠称重,20%乌拉坦 1.0 g/kg,ip 麻醉。仰卧位固定,分离右侧颈总动脉,下方垫塑料纸片;经舌下静脉给予 2%氯四碘荧光素二钠 20 mg/kg,体积 1 mL/kg (假手术组给予等体积生理盐水),循环 1 min,采用冷光激光发射器 (光纤直径 50 μm , λ 510 nm,光强度 10 mW/cm²,表面温度 36 °C 照射颈动脉 1.0 min,选取 3 个点照射,每点相距 2 mm;经右侧股静脉给予同位素标

记血小板,循环 5 min 后再经左侧股静脉给予药物。

2.3 血小板沉积量测定

给药 2 h 后,取下照射部位血管,置于 NS 中冲洗后,置微机多探头 γ 计数仪中测定放射性 (示踪放射量)。根据下列公式计算沉积血小板总数:

沉积血小板总数 = (示踪放射量 / 每个血小板标记放射量) $\times$ (动物体内血小板总数 / 注入体内血小板数)

2.4 分组与给药

Wistar 大鼠,体质量 (236.4 ± 9.7) g,雌雄兼用,随机分为 3 组,即:假手术组,模型组,阳性组 (欣维宁组)。其中阳性组给予欣维宁 150 $\mu\text{g/kg}$,给药体积均为 2 mL/只,假手术组与模型组给予等体积 NS,静脉输注 30 min。

2.5 统计学处理

计量资料数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,采用组间非参数 t 检验进行统计学处理,比较均数差异的显著性。

3 结果

3.1 标记时间对标记率的影响

标记时间为 15 min 时的标记率为 (34.4 ± 8.4) %,标记时间为 30 min 时的标记率增加为 (45.5 ± 5.7) %,与 15 min 时的标记率差异显著 ($P < 0.05$),60 min 时的标记率为 (47.0 ± 8.3) %,与 30 min 时的标记率无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果见图 1。

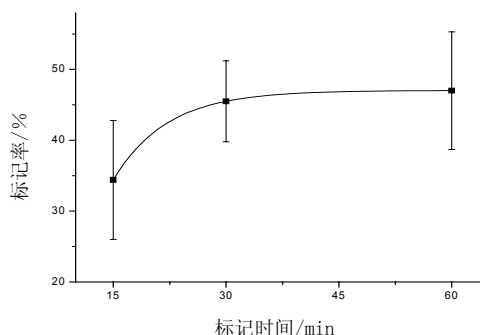


图 1 标记时间对标记率的影响 ($n=5$)

Fig. 1 The effect of labeling time on the radiolabeling ratio of platelet ($n=5$)

3.2 洗涤次数对洗脱率的影响

标记时间为 30 min 时,第一次洗脱率最高,为 (58.1 ± 8.7) %,第二次洗脱率为 (5.2 ± 0.8) %,之后趋于恒定,表明第一次洗涤基本上可将未标记的同位素分离掉。结果见图 2。

3.3 注入的标记血小板数对血小板沉积的影响

研究表明,在近似血小板沉积程度与特征的情况下,血小板沉积直接 CPM 计数受注入标记血小板量的影响,随注入量增加,CPM 计数增加,各组差异显著,注入量与 CPM 间呈高度线性关系($r=0.978\ 9$);而采用血小板沉积数表示法,血小板沉积数组间无明显差异,注入量与血小板沉积数间无线性关系($r=0.398\ 6$),提示各组血小板沉积程度与特征相似,表明方法科学。

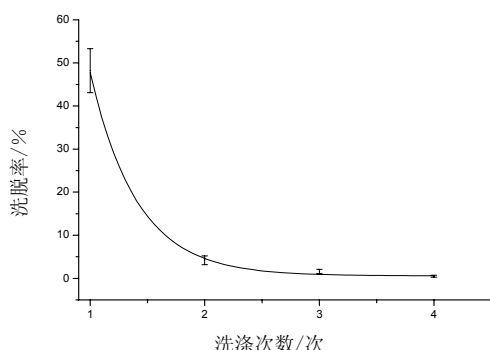


图2 洗涤次数对洗脱率的影响 ($n=5$)

Fig. 2 The effect of scrubbing times on the elution ratio of platelet ($n=5$)

3.4 血小板沉积量测定

动物实验结果表明,模型组血小板沉积数与假手术组比较明显升高($P<0.001$),沉积数范围为 $5.60\times10^4\sim7.97\times10^4$ 个,表明内膜损伤导致的小血小板沉积模型成功。阳性组欣维宁可减少血小板在内膜损伤动脉血管壁上的沉积,与模型组沉积的血小板数比较抑制了21.4%($P<0.001$)。结果见表1。

表1 血小板沉积量测定 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table1 Determination of platelet deposition ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	血小板沉积数 ($\times 10^4$)
假手术组	—	1.660 ± 0.511
模型组	—	$68.700\pm7.390^{***}$
欣维宁组	150	$54.000\pm6.470^{\Delta\Delta\Delta}$

与假手术组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.001$

*** $P<0.001$ vs control group; $\Delta\Delta\Delta P<0.001$ vs model group

4 讨论

放射标记的血小板可用于血栓疾病、血管内皮功能的检测,标记血小板的方法主要有体内标记法与体外标记法。体内标记法简便,但要求放射性核素对血小板有高度选择性结合力,体外标记法方法繁琐,但可靠性强、精确度高。体外标记主要有 ^{51}Cr 标记法,但其标记率低, ^{111}In 标记法标记率高,

但价格昂贵^[1,2]。

^{99}Tc 半衰期较短,为6 h,为辐射剂量小、使用安全的核素, ^{99}Tc 对血小板进行体外标记,方法简便,价廉,调整好复合还原剂的用量与用法可得到较高的标记率。在血小板沉积实验中,复合还原剂各成分均为临时配制与混合,在该复合还原剂的用量下,标记率为 $(48.0\pm7.4)\%$,范围为35.8%~57.5%。本研究还发现,复合还原剂各成分若采用冷冻、冷藏,或预先混合的情况下,标记率会降低(资料未发表)。标记时间对标记率有明显影响,较短的标记时间标记率会降低,标记时间为30 min时可获得较高、较稳定的标记率,标记时间延长标记率不再增加,为保证血小板活性,应尽量压缩标记时间,使血小板在体外留存的时间尽量缩短,因此本研究采用30 min的标记时间。洗脱次数对洗脱率影响不大,未标记的同位素基本上可以在第一次洗脱时分离掉,因此本研究采用洗涤2次进行未标记同位素的分离。

血管内膜损伤的方法主要有气囊法、化学法、电流法等,但这些方法主要应用于大动物或较大的血管,小动物或较小血管则不易掌握其损伤程度,损伤太重,血栓形成较快,不符合血小板沉积的临床病理生理特征。光纤冷激光内膜损伤法方法简便,可适用于小动物或小血管,且损伤程度易于控制,调整激光照射时间与光纤直径,及照射点多少可较好的控制内膜损伤程度,较好的模拟血小板沉积过程与沉积特征。

内皮损伤测定的方法主要有乙酰胆碱鉴定法、血浆内皮释放活性物质(如NO、ET-1、 PGI_2 、 TXA_2)测定、内皮计数,以及病理观测等,这些方法可用于整体系统内皮损伤与功能评价,但对于血管内皮局部损伤,以及微小血管内皮损伤有局限性。采用光化学法可建立局部、小血管的内皮损伤模型,采用 ^{99}Tc 体外血小板标记,通过血小板沉积状态测定,可用于评价抗血小板药物。

血小板沉积的结果表示方法,有的直接采用CPM计数,有的采用单位组织的放射活度^[3]。直接CPM计数法不能反映血小板实际沉积的量,而且受注入标记血小板量的影响较大。在同等沉积程度与特征的情况下,注入的标记血小板多,CPM计数高,注入的少则低,注入量与实测值呈高度线性关系,不能反映血小板沉积的实际情况;单位组织的放射活度表示法需要根据仪器效能进行换算,并且需要

(下转第106页)

表 1 Rg 回收率、日内和日间精密度

Table 1 Recovery rate, intra-day and inter-day RSD of Rg

浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	绝对回收率/ %	方法回收率/ %	RSD/ %	
			日内	日间
0.1013	78.56±1.48	99.58±7.23	7.26	7.23
10.13	75.47±1.67	104.92±3.11	2.96	5.50
50.65	77.26±1.83	94.85±2.76	2.91	2.94

3 讨论

有关血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠的测定方法国内外尚未有报道。本实验参考部分测定其类似物的文献^[1~3]，采用 LC-MS 联用测定人血浆中人参三醇二琥珀酸酯钠药物浓度的方法，以 ESI 源选择负离子提取方式检测 (SIM) 人参三醇二琥珀酸酯钠和内标吡达帕胺分子离子峰，具有较高的灵敏度和专属性；本方法只需有机溶剂进行一步萃取，大大简化了血浆样品的处理过程。此方法特异性好，无干扰，精密度、灵敏度等均符合人体血药浓度检测

和药物动力学研究的要求。

参考文献：

[1] 韩正洲, 李 宇, 等. 双波长薄层扫描法测定促血生颗粒中人参三醇的含量[J]. 中成药, 2003, 6(25): 159-161.

[2] 贾沪宁, 于清峰, 王志群, 等. 薄层色谱 pH 法测定人参三醇-3, 6-二琥珀酸单酯的离解常数[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(3): 232-234.

[3] 刘奕明, 杨 柳, 曾 星, 等. 参麦注射液中人参皂苷 Rg₁ 和 Re 药代动力学研究[J]. 药学学报, 2005, 40(4): 365-368.

(上接第 103 页)

称量组织质量，较适合大动物或大血管，对于小血管来说误差可能会增大。将标记的血小板仅作为示踪量，根据动物体内血小板总数并通过公式进行换算，可求出实际沉积的血小板数量，该表示方法不受注入体内标记血小板量的影响，可减小注入量影响因素的误差，表明方法科学、可靠。

参考文献

[1] 万叔良, 何红兵, 潘明新, 等. ⁹⁹锝标记血小板检测内

皮化人工血管内皮细胞抗血小板粘附聚集功能的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(3): 221-222.

[2] Sundrehagen E, Urdal P, Heggli D E, *et al.* Radiolabelling of platelets with Technetium-99m[J]. *Thromb Res*, 1990, 57 (5): 737-745.

[3] 陈献明, 潘家绮, 唐志刚, 等. ¹¹¹ 钪标记血小板观察兔受损主动脉内膜血小板沉积量[J]. 中华血液学杂志, 1993, 14(3): 121-123.