

紫杉醇在体外对二磷酸腺苷诱导的血小板聚集的影响

张 蜀, 孙常丽, 聂 虎[△]

四川大学华西医院 急诊科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究紫杉醇在体外对二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集的影响。方法 血小板混悬液中加入不同浓度[0(对照组)、0.01 ng/mL、0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、1 000 ng/mL]的紫杉醇,在最佳 ADP 终浓度和最佳孵育时间条件下,分别测定血小板聚集率。结果 在 ADP 终浓度为 10 μ mol/L、孵育时间为 10 min 条件下,随着紫杉醇浓度的增高,其促进 ADP 诱导的血小板聚集的作用也随之增加,不同浓度紫杉醇间血小板聚集率的比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论 紫杉醇能在体外增强 ADP 诱导的血小板聚集,且诱导作用呈浓度依赖性。

【关键词】 紫杉醇 二磷酸腺苷 血小板聚集

Effect of Paclitaxel on Platelet Aggregation Induced by Adenosine Diphosphate *in vitro* ZHANG Shu, SUN Chang-li, NIE Hu[△]. Department of Emergency, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
[△] Corresponding author, E-mail: Dr. hu.nie@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of paclitaxel on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) *in vitro*. **Methods** Platelet suspension was incubated with paclitaxel in different concentrations (0 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL, 1 000 ng/mL), then the maximal extent of platelet aggregation was determined under the conditions of the best ADP concentration and the best incubation time. **Results** Under the condition of 10 μ mol/L ADP and incubated for 10 min, with the increase of paclitaxel concentration, the effect of paclitaxel on platelet aggregation induced by ADP elevated accordingly, and the differences among the different concentration groups were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Paclitaxel can enhance ADP-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner *in vitro*.

【Key words】 Paclitaxel Adenosine diphosphate Platelet aggregation

随着药物洗脱支架(drug eluting stent, DES)在冠状动脉疾病患者中的广泛应用,支架内血栓形成越来越受到人们的关注与重视。总的来说,支架内血栓发生的概率并不高,但由于其可能造成致命性的后果,因而成了近年内广大学者研究的热点^[1]。有研究表明,DES 与裸金属支架(bare metal stent, BMS)相比,DES 并不增加支架内血栓总发生率,但是其迟发晚期支架内血栓的发生率却以每年 2/1 000~4/1 000 的速率增加^[2]。DES 植入后晚期支架内血栓发生的原因很多,既可能与植入支架的手术操作有关,也可能和患者自身的基础病情相关;还有学者认为 DES 植入后晚期支架内形成血栓可能和 DES 本身所导致的内皮愈合延迟、增加炎症反应等密切相关^[2]。其中,血小板的聚集在血栓的形成过程中发挥了重要的作用。紫杉醇洗脱支架是目前临床上常用的一种 DES,但紫杉醇本身对血小板聚集功能的影响目前尚不清楚。目前国内外没有相

关紫杉醇对血小板聚集功能影响的研究。鉴于此,本实验研究了在体外情况下不同浓度的紫杉醇对二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导的血小板聚集的影响,旨在探讨紫杉醇药物本身对血小板聚集功能有无影响。

1 材料和方法

1.1 血液标本

清晨采取成年男性健康志愿者的空腹静脉血,年龄 22~28(24 $\pm$ 1.4)岁,既往均无慢性基础疾病,且最近 2 周内未曾服用过任何可能影响血小板功能的药物,采血前 1 d 禁食高脂食物,已签署知情同意书。收集血液后试管应立即行密封处理,标本置于 15~25 $^{\circ}$ C 条件下;实验在采集血标本后 2 h 内进行。

1.2 药物、主要试剂和仪器

紫杉醇(wt853.91):由 Sigma 公司提供,实验时先用二甲基亚砜(DMSO)促溶,然后用蒸馏水调整至所需浓度;ADP(wt427.20):由 Sigma 公司提

[△] 通讯作者, E-mail: Dr. hu.nie@gmail.com

供,实验时先用生理盐水溶解,然后用蒸馏水调整至所需浓度;DMSO:由 Sigma 公司提供;血液凝集仪:上海通用机电技术研究所 TYXN-91 型;全自动血细胞分析仪:Sysmex 公司 SE-9500 型;离心机:Heraeus 公司 Labofug 400R 型;电子天平:梅特勒 AL 型。

1.3 实验方法

1.3.1 药物溶解 室温下用电子天平称量 0.1 mg 紫杉醇,加入 1 mL DMSO,充分震荡使其完全溶解,最终用蒸馏水稀释至所需实验浓度。

1.3.2 试剂制备 血小板草酸铵稀释液:室温下用电子天平称量草酸铵 1 g,加入蒸馏水至 100 mL,过滤后在 4 ℃ 条件下保存。ADP 以 0.5 mL 蒸馏水溶解至浓度为 0.2 mmol/L,在 2~8 ℃ 条件下保存;使用前根据需要加入蒸馏水调整至所需实验浓度。

1.3.3 血小板混悬液的制备 参照相关文献^[3]制备富血小板血浆和贫血小板血浆,用以制作实验所需血小板混悬液。血小板计数采用草酸铵法^[3]。最终确定在 100 倍光学显微镜下计数血小板数目范围为 $250\times10^9/L\sim300\times10^9/L$ 。

1.3.4 最佳孵育时间的确定 血小板混悬液中分别加入 0(对照组)、10 ng/mL 紫杉醇(实验组),孵育不同时间(1、3、5、10、15、20、30 min)后,在相同浓度 ADP(3 $\mu\text{mol/mL}$)条件下采用比浊法测定最大血小板聚集率,根据结果确定最佳孵育时间。

1.3.5 最佳 ADP 终浓度的确定 血小板混悬液中分别加入 0(对照组)、10 ng/mL 紫杉醇(实验

组),孵育相同的时间(由 1.3.4 确定),在不同 ADP 终浓度下(1、3、5、10、15 $\mu\text{mol/mL}$)条件下采用比浊法测定最大血小板聚集率,根据结果确定最佳 ADP 终浓度。

1.3.6 不同浓度紫杉醇对血小板聚集率的影响 血小板混悬液分别加入不同浓度[0(对照组)、0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/mL]的紫杉醇,加入最佳 ADP 终浓度(由 1.3.5 确定),孵育相同时间(由 1.3.4 确定)后,采用比浊法分别测定血小板聚集率。紫杉醇促进 ADP 诱导的血小板聚集效果用公式(紫杉醇实验组血小板聚集率-对照组血小板聚集率)/对照组血小板聚集率 $\times100\%$ 来表示。

1.4 统计学方法

每组实验均重复 3 次,所有实验数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同孵育时间与血小板聚集作用的关系

随着孵育时间的延长,紫杉醇实验组和对对照组对 ADP 诱导的血小板聚集均呈现出逐渐增加后又逐渐降低的趋势,在 10~15 min 这段时间内,血小板的聚集表现最充分,且达到相对稳定的阶段。孵育 10 min 时血小板聚集率最大,且与孵育 15 min 比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。因此后续实验的最佳孵育时间定为 10 min。见表 1。

2.2 不同 ADP 终浓度与血小板聚集作用的关系

表 1 不同孵育时间时的血小板聚集率($n=3, \%$)

Table 1 The platelet aggregation in different incubation time ($n=3, \%$)

Group	1 min	3 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
Paclitaxel	65.47 $\pm$ 0.80	68.43 $\pm$ 0.83	71.47 $\pm$ 0.97	82.03 $\pm$ 1.53 *	76.33 $\pm$ 0.80	72.27 $\pm$ 1.10	67.63 $\pm$ 1.63
Control	46.37 $\pm$ 0.96	49.50 $\pm$ 1.25	53.73 $\pm$ 0.60	59.30 $\pm$ 1.05 *	54.40 $\pm$ 0.89	51.70 $\pm$ 0.36	46.43 $\pm$ 0.71

* $P<0.05$, vs. other time points

随着 ADP 终浓度的增大,血小板的聚集程度逐渐增加,在 5 $\mu\text{mol/mL}$ 和 10 $\mu\text{mol/mL}$ 条件下表现最为明显,而在 ADP 终浓度为 15 $\mu\text{mol/mL}$ 时血小板聚集率又出现下降。在终浓度为 10 $\mu\text{mol/mL}$

时血小板聚集程度最大,且与 5 $\mu\text{mol/mL}$ 比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。因此后续实验的最佳 ADP 终浓度定为 10 $\mu\text{mol/mL}$ 。见表 2。

2.3 不同浓度紫杉醇时的血小板聚集率

表 2 不同 ADP 浓度时的血小板聚集率($n=3, \%$)

Table 2 The platelet aggregation in different concentration of ADP ($n=3, \%$)

Group	ADP				
	1 $\mu\text{mol/mL}$	3 $\mu\text{mol/mL}$	5 $\mu\text{mol/mL}$	10 $\mu\text{mol/mL}$	15 $\mu\text{mol/mL}$
Paclitaxel	77.03 $\pm$ 1.24	81.00 $\pm$ 1.67	84.47 $\pm$ 0.65	90.30 $\pm$ 1.05 *	82.33 $\pm$ 1.36
Control	65.37 $\pm$ 1.36	68.03 $\pm$ 1.39	72.53 $\pm$ 1.00	76.60 $\pm$ 1.18 *	70.57 $\pm$ 1.25

* $P<0.05$, vs. other concentrations

当紫杉醇浓度为0(对照组)、0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/mL时,最大血小板聚集率分别为 $(75.07 \pm 1.00)\%$ 、 $(74.86 \pm 1.59)\%$ 、 $(76.16 \pm 1.82)\%$ 、 $(78.33 \pm 1.00)\%$ 、 $(89.97 \pm 1.98)\%$ 、 $(96.33 \pm 1.90)\%$ 、 $(98.67 \pm 0.55)\%$ 。随着紫杉醇浓度的增高,ADP诱导的血小板的聚集程度也随之增高。不同浓度紫杉醇间血小板聚集率的比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

当前在对DES进行长期疗效评价时,支架内血栓的形成是影响疗效和预后的主要问题之一。血栓的形成同诸多因素相关,涉及血管内膜、血小板、凝血系统、纤溶系统等多个方面,而其中尤以血小板的黏附、聚集和活化反应与血栓的形成关系最为密切。紫杉醇是复杂的二萜类化合物,临床中常用于肿瘤患者的化疗,其水溶性差而脂溶性较好,化学性质相对稳定。紫杉醇能使细胞发育停止于 G_0/G_1 期,从而抑制血管平滑肌细胞的分裂、增殖、迁移和信息传输,因此可以减少再狭窄的发生^[4]。由于紫杉醇呈脂溶性,相对容易通过细胞膜,而且其抗平滑肌增殖时的剂量远小于抗肿瘤时的剂量(大约低100倍),所以非常适用于通过支架缓慢释放药物以减少其对全身的毒副作用^[4]。应用紫杉醇EDS的临床试验包括ELUETS、ASPECT和TAXUS等均已验证了其有明显抑制再狭窄的作用。有研究表明,紫杉醇洗脱支架在早期释放所携带药物总量的3%~10%之后,仍有多达90%的药物残留于支架的多聚物涂层内,而这些残留的紫杉醇对人体的远期影响目前尚不清楚。同时,置入DES后的病理学研究表明,雷帕霉素和紫杉醇等药物在抑制血管平滑肌细胞迁移和增殖的同时,也抑制成熟内皮细胞的迁移和增殖,甚至对内皮祖细胞的增殖、分化和归巢都有一定的影响^[5]。DES的长期并发症是支架内血栓形成而非全身广泛的血栓形成,由于紫杉醇呈脂溶性,提示支架内局部的药物浓度可能远高于体循环中的血药浓度,继而推测可能由于局部紫杉醇浓度的升高,诱导促进血小板聚集,导致了支架内血栓的形成。当然,局部紫杉醇浓度升高从而诱导血小板聚集在支架内血栓的形成过程中可能只是诸多原因之一,其他因素包括内皮机械性损伤、血管内皮化延迟,以

及局部过敏反应与炎症等等,都可能在支架内血栓的形成过程发挥了相应的作用^[6-8]。

本次体外研究发现,随着孵育时间的延长,相同浓度的紫杉醇对ADP诱导的血小板聚集程度的影响呈逐渐增加后又逐渐降低的趋势,在10~15 min这段时间内,血小板的聚集表现最充分,此后又逐渐降低。一般而言,离体血小板仅能在离体3 h内保持相对稳定的活性^[9]。孵育时间过长导致离体血小板功能明显减退,可能影响实验结果。考虑到本实验为体外研究,在体内能否得到相同或者相似的结果,还有待于在接下来的动物体内实验中进一步证实。本研究发现随着紫杉醇浓度的增高,ADP诱导的血小板聚集程度也随之增高,且当紫杉醇浓度大于1 ng/mL时,血小板的聚集率随着紫杉醇的浓度增高而迅速增高。该结论提示,作为可以人为控制的条件之一,选择紫杉醇含量较低的DES可能有助于改善晚期支架内血栓的发生。该结论有待于在今后的临床实践中进一步得到证实。

参 考 文 献

- 1 Shishehbor MH, Goel SS, Kapadia SR, *et al.* Long-term impact of drug-eluting stents versus bare-metal stents on all-cause mortality. *J Am Coll Cardiol*, 2008;52(13):1041-1048.
- 2 葛 雷. 药物洗脱支架的研究现状与进展. *中国介入心脏病学杂志*, 2008;16(1):58.
- 3 邢继军, Guo JX, Zhang D 等. 一氧化氮阿司匹林对血小板聚集功能的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2005;13(6):753-756.
- 4 赵苏苏, 张东生, 卢 勤. 血管内药物涂层支架制备及应用的研究进展. *东南大学学报(医学版)*, 2007;5(5):378-381.
- 5 Steffel J, Eberli FR, Lüscher TF, *et al.* Drug-eluting stents - what should be improved? *Ann Med*, 2008;40(4):242-252.
- 6 Joner M, Finn AV, Farb A, *et al.* Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol*, 2006;48(1):193-202.
- 7 Virmani R, Guagliumi G, Farb A, *et al.* Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent; should we be cautious? *Circulation*, 2004;109(6):701-705.
- 8 Finn AV, Joner M, Nakazawa G, *et al.* Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation*, 2007;115(18):2435-2441.
- 9 孙越红, 王雅杰, 周景茹. 血小板聚集实验条件优化的研究. *现代检验医学杂志*, 2007;22(2):8-9.

(2013-04-08 收稿, 2013-08-01 修回)

编辑 余 琳