

荧光探针测定人血小板内游离钙浓度及抗钙药物的影响

何 绮 陈淑华 尹钟洙

(中日友好医院临床医学研究所药物药理室, 北京 100029)

关键词 荧光探针, 血小板, 钙

Quin 2 是一种对钙离子敏感的荧光素。它的乙酰化形式 Quin2-AM 具有亲脂性, 可穿过细胞膜进入细胞内, 水解后可特异性地与细胞内钙离子结合发出荧光^[1]。我们利用 Quin 2 对人血小板静息状态下及加凝血酶后激动状态下的血小板内钙离子浓度进行了测定。中药成分粉防己碱(tetrandrine, Tet)有抗钙作用和抗血小板聚集作用^[2], 但它对凝血酶引起的细胞内钙离子浓度变化的影响尚未见报道。本研究利用荧光素 Quin 2 标记法观察了 Tet 对凝血酶引起的人血小板内游离钙浓度变化的影响。方法及结果如下:

健康人空腹抽取静脉血 10 ml, 置聚丙烯塑料管中, 加 1/7 体积的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液 (ACD) 抗凝。100×g 离心 10 min 制备富血小板血浆 (PRP)。每 1×10^8 个血小板加 $6.7 \mu\text{mol}$ Quin2-AM 于 37°C 保温 30 min, 加 1/10 体积 ACD, 于 $350 \times g$ 离心 15 min, 弃去上清, 用无钙 Hepes 液 (145 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO_4 , 0.5 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Hepes, 5 mmol/L glucos, pH 7.4) 悬浮血小板并调整血小板数至 $1 \times 10^8/\text{ml}$, 加入 0.2 mmol/L CaCl_2 于室温下避光放置 30 min。用日立 650-60 型荧光分光光度计, 激发光 330 nm , 发射光 492 nm , 恒温 37°C 下测定血小板在静息状态下的荧光强度 (F_{rest}) 及加 0.5 u/ml 凝血酶后荧光强度 (F_{act})。加入 4 mmol/L EGTA, 1 min 后加 0.1% TritonX-100 溶解细胞, EGTA 与 Ca^{2+} 络合, 测得最小荧光强度 (F_{min})。加 4 mmol/L CaCl_2 得到最大荧光强度 (F_{max})。平行管中加入无 Quin2-AM 负荷的血小板, 再依次加入 0.2 mmol/L CaCl_2 , 4 mmol/L EGTA,

0.1% TritonX-100 及 4 mmol/L CaCl_2 , 观察荧光强度的变化, 其中只有 TritonX-100 可轻度增强荧光强度, 因此在计算钙离子浓度之前, 要从 F_{min} 中减去这一增强值。Quin2-AM 的解离常数为 115 nmol/L , 根据 Tsien 公式, 可计算血小板内钙离子浓度。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = 115(F - F_{\text{min}})/(F_{\text{max}} - F) \text{ nmol/L}$$

为测定 Tet 对凝血酶引起的血小板内钙离子浓度变化的影响, 在 PRP 中分别加入 $100 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$ 和 $25 \mu\text{g/ml}$ 的 Tet, 37°C 保温 5 min, 再加入 0.5 u/ml 凝血酶用上述方法测定和计算。

试验结果: 在静息状态下, 健康人血小板内游离钙浓度为 $50.0 \pm 13.0 \text{ nmol/L}$ ($n = 5$), 加凝血酶 0.5 u/ml 后升高至 $194.2 \pm 23.0 \text{ nmol/L}$ 。加入 $100 \mu\text{g/ml}$, $50 \mu\text{g/ml}$ Tet 后, 静息时血小板内游离钙浓度分别为 $40.1 \pm 10.6 \text{ nmol/L}$, $40.2 \pm 5.2 \text{ nmol/L}$, 加凝血酶后浓度分别为 $86.1 \pm 23.7 \text{ nmol/L}$ ($p < 0.05$), $98.8 \pm 12.8 \text{ nmol/L}$ ($p < 0.05$), 抑制率分别为 55.7% , 49.1% 。而加入 $25 \mu\text{g/ml}$ 的 Tet 对凝血酶引起的游离钙浓度升高无明显抑制作用。

试验结果表明利用荧光素 Quin 2 可特异地测定血小板内游离钙浓度的变化。粉防己碱可明显抑制凝血酶引起的血小板内游离钙的升高, 这对于阐明粉防己碱抗钙作用机制有一定意义。

参 考 文 献

- 1 Tsien R Y. *Biochemistry*, 1980; 19: 2396
- 2 钱月明等. 中国药理学报, 1989; 10(1): 61

[本文于 1989 年 11 月 10 日收到]