

• 系統編號	RN9604-4029		
• 計畫中文名稱	血小板附著到不同基質蛋白及內皮細胞的機轉探討---比較含 RGD 的 peptides 及抗 beta3 integrin 抗體的相對抑制活性(III)		
• 計畫英文名稱	Mechanisms of Platelet Adhesion to Various Matrices and Endothelial Cells--- Comparison of the Relative Activities of RGD-Peptides and Anti-beta 3 Integrin Monoclonal Antibodies (III)		
• 主管機關	行政院國家科學委員會	• 計畫編號	NSC94-2320-B038-003
• 執行機構	臺北醫學大學藥理學科		
• 本期期間	9408 ~ 9507		
• 報告頁數	24 頁	• 使用語言	中文
• 研究人員	許準榕 Sheu, Joen-Rong		
• 中文關鍵字	平滑肌細胞; Arg-Gly-Asp 蛋白;抗 β3 單源抗體		
• 英文關鍵字	Vascular smooth muscle cell, Arg-Gly-Asp-containing peptide, Anti-beeta3 integrin monoclonal antibody, Protein kinas C, triflavin		
• 中文摘要	<p>則研究結果顯示，對未活化的血小板而言，其附著到 collagen 上的量則明顯的比附著到 fibrinogen 上的較多；未活化的血小板其附著到 fibrinogen 的能力較不明顯；但是，相對而言，未活化的血小板其附著到 collagen 上的量就較明顯；另一方面，不論受 ADP 或 thrombin 活化的血小板其附著到 collagen 上的量比附著到 fibrinogen 上的多。另一方面，我們亦發現血小板前處理 triflavin(10μg/ml)及 anti-β3 單源抗體 Abciximab(20μg/ml)後，會明顯的抑制 ADP 活化的血小板附著到 fibrinogen 及 collagetypeIV 上；在去年度的計劃中，我們繼續前一年度的研究，進一步比較 triflavin(10μg/ml)及 anti-β3 單源抗體 Abciximab(20μg/ml)抑制受 thrombin 活化的血小板附著到 collagetypeIV 及 fibrinogen 的差異性；由研究結果顯示 triflavin(10μg/ml)及 anti-β3 單源抗體 Abciximab(20μg/ml)皆能明顯的抑制 thrombin 活化的血小板附著到 fibrinogen；反之，triflavin(10μg/ml)抑制 thrombin 活化的血小板附著到 collagetypeIV 的活性明顯的比 anti-β3 單源抗體 Abciximab(20μg/ml)來的強。另一方面，在去年度的計劃中，我們探討 MMP-9 在血小板的活性研究，由結果顯示：(1)在 invitro 實驗中發現外加 activatedMMP-9 具有抑制血小板凝集之能力。亦即在血小板凝集實驗中若外加 activatedMMP-9，則會隨著濃度之增加而有效地抑制由 collagen、ADP、arachidonicacid、thrombin 與 U46619 等血小板活化劑所引起的凝集作用，隨著血小 3 板活化劑使用種類的不同，MMP-9 之 IC50 約為 21~60ng/ml。(2)MMP-9 可有效的抑制由 collagen 刺激之血小板活化所引起的細胞內鈣離子移動與 phosphoinositidebreakdown。(3)MMP-9 可促進 NO 與 cGMP 之增加，抑制 TxB2 之形成。血管平滑肌細胞屬於貼附型細胞，在其生長過程中，細胞外基質(extracellularmatrix)扮演重要的角色。細胞生長時，經由 integrinreceptor(具 α、β 兩個次單元)接受外在蛋白質如 fibronectin 的活化，產生局部附著作用(focaladhesion)，與細胞外基質結合，造成平滑肌細胞的延展(cellspreading)。在這一系列作用中，會造成 proteinkinaseCpathway 的活化。本年度的計劃則進</p>		

一步探討 triflavin 干擾 fibronectin 與平滑肌細胞之附著情形；並與 Abciximab 對平滑肌細胞和 fibronectin 附著情形的影響做一比較。藉由細胞免疫染色及共軛聚焦顯微鏡技術的應用，觀察此反應中，proteinkinaseCfamily 是否受到活化及其分佈情形，證明 triflavin 與一般已知的人工合成 RGD 蛋白序列，對於平滑肌細胞上 integrinreceptor 產生相同的抑制效果。由研究結果顯示 fibronectin 刺激造成平滑肌細胞中 proteinkinaseC 產生一短暫升高並轉移到附著作用發生處，事先給予 RGDpeptides 可抑制此情形。若改以 triflavin 事先投與，其對 proteinkinaseC 的表現也有明顯的抑制作用；且抑制功效不亞於 Abciximab 造成的抑制成果，甚至更好。證明 triflavin 可成功結合到平滑肌細胞的 integrin 上，達到抑制平滑肌細胞生長。

Abciximab (20 .mu.g/ml) at inhibiting the thrombin-activated platelets adhesion to collagen type IV. However, both triflavin and Abciximab show the similar activity at inhibiting the thrombin-activated platelets adhesion to fibrinogen. On the other hand, in this study, we also present the results of MMP-9 in platelet activation. Activated MMP-9 concentration-dependently (15-90 ng/ml) inhibited platelet aggregation stimulated by agonists. Activated MMP-9 (21 and 90 ng/ml) inhibited phosphoinositide breakdown, intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization, and thromboxane A<sub>2</sub> formation in human platelets stimulated by collagen (1 .mu.g/ml). In addition, activated MMP-9 (21 and 90 ng/ml) significantly increased the formation of nitric oxide/cyclic GMP. On the other hand, the extracellular matrix influences the cellular spreading of vascular smooth muscle cells (VSMCs ) via integrin receptors. We know that VSMCs binding to fibronectin activates the protein kinase C (PKC) pathway, causes differential intracellular PKC isoform translocation, and mediates cell spreading. In this year, VSMCs binding to poly-L-lysine was used as control. We used commercial GRGDS peptides and RGD peptides to prove that the PKC $\alpha$  distribution and VSMCs spreading is mediated by integrin activation. Intracellular distribution of PKC isoforms was measured by confocal microscopy. VSMCs binding to fibronectin induced focal adhesion and cell spreading 5 within 30 minutes. Fibronectin induced a PKC isoform translocation to the cell nucleus and to focal adhesions within 30 minutes. In our previous report, triflavin could specifically bind on platelet GP IIb/IIIa receptor. It was a strong and specific disintegrin. Preincubated VSMCs with triflavin, and then measured the PKC distribution by confocal microscope. We observed triflavin inhibit the distribution of the PKC isoforms in VSMCs. It also inhibited the spreading of VSMCs. We compared triflavin with Abciximab, and found that triflavin was stronger than Abciximab in this reaction.

- 英文摘要