RRPA88030711 ( 8.P)

# 行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

## 纖維蛋白凝塊回縮反應的機轉探討:比較triflavin和各種抗integrin單源抗體的相對作用活性

## Comparison of the relative effect of triflavin with various anti-integrin monoclonal antibodies in fibrin clot retraction

計畫編號: NSC 88-2314-B-038-105
執行期限: 87年8月1日至88年7月31日
主持人: 許準榕副教授　　執行機構: 台北醫學院醫學研究所

一、中文摘要

血漿中纖維蛋白凝塊的回縮作用(fibrin clot retraction)，對分解血塊而言，扮演著一個非常重要的角色。另外，此回縮作用亦可幫助受傷的血管儘快恢復通暢，以保持血流的穩定。對生理上的意義而言， fibrin clot retraction可加強血塊的分解和促進血管再recanalization。在作用機轉上，雖然詳細的機轉仍然不是很清楚，但由富含血小板的血漿中清楚可知，是由靜態且非移動性的纖維蛋白網和動態且具主動移動性質的血小板，兩者間相互作用造成的。最近，更進一步証實血小板細胞膜上的fibrinogen receptor，即$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin (醣蛋白IIb/IIIa complex)參與了此血小板-依賴型的凝塊回縮作用(platelet-dependent fibrin clot retraction)。 因此，抗$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin的單源抗體及可專一性結合到$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin上的合成 peptide，可作為一理想的研究工具來研究在血塊回縮反應中，血小板 $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 在其中所扮演的角色。由目前已知的研究結果得知，血小板活化後可幫助fibrin clot retraction，其中血小板可能經由其表面上的$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin直接和fibrin結合；另一方面，則可能藉由如血小板細胞內的蛋白質骨架重組作用 (cytoskeletal assembly) 而造成此回縮作用。

$\alpha_{IIb}\beta_3$本身為$\beta_3$ integrin的一員，屬於一種附著蛋白受體；它在體內參與了發育(development)、發炎 (inflammation)、腫瘤細胞轉移(tumor cell metastasis) 及血栓(thrombosis) 等等的反應。$\alpha_V\beta_3$也是$\beta_3$ integrin的一員，廣泛的存在於如內皮細胞(endothelial cell) 和纖維母細胞 (fibroblast) 上。因為$\alpha_V\beta_3$和$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin一樣可和fibrinogen結合，同時亦含有此$\beta_3$ subunit；因此，在fibrin clot retraction中，$\alpha_V\beta_3$ integrin可能亦扮演某種角色，值得進一步研究証實。

Triflavin為一種由出血性的蛇毒 *Trimeresurus flavoviridis*中所分離出的強效抗血小板凝集蛋白；它本身為單鏈含有70個 amino acid；在靠近C端位置，也就是在49-51的位置上含有 Arg-Gly-Asp 這三個amino acid, 在 triflavin 抑制血小板凝集過程中扮演了決定性的角色。Triflavin的作用機轉為競爭性的抑制fibrinogen和血小板$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin的結合作用；為一種專一性的$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin拮抗劑。它能強力的抗血小板凝集，因此在活體內亦能有效的防止血栓的產生。由本研究發現，血小板($1 \times 10^9$/ml)及人類臍靜脈內皮細胞 (HUVEC, $1 \times 10^7$/ml) 可明顯的促進纖維蛋白絲的回縮；且兩者的作用活性差不多。另外，我們亦發現triflavin (1 μM) 可明顯的抑制80%血小板引起的fibrin clot retraction, 而anti-P-selectin單源抗體則無明顯抑制活性。進一步研究發現，triflavin (1 μM) 亦可抑制內皮細胞所引起的回縮反應，且其抑制程度約與anti-$\alpha_V\beta_3$單源抗體相似

經由上述的研究可使我們更清楚的瞭解血小板及內皮細胞在fibrin clot retraction過程中的角色，特別是血管內皮細胞上的integrin $\alpha_v\beta_3$可能扮演一重要角色，而血小板上的p-selectin則不參與此回縮反應。

關鍵詞: Triflavin，醣蛋白IIb/IIIa complex, P-selectin, $\alpha_v\beta_3$, 纖維蛋白凝塊，內皮細胞

**Abstract**

Fibrin clot retraction may be important in the resolution of thrombi. Contraction of fibrin clots helps to maintain the patency of injury blood vessels. Physiologically, clot retraction may enhance clot lysis and facilitate recanalization of blood vessels. However, the mechanism of clot retraction remains unclear, though in platelet-rich plasma it has been clearly shown to result from the interaction of a static, non-motile fibrin mesh and dynamic, actively motile blood platelets. Recently, it has been demonstrated that integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glycoprotein IIb/IIIa complex; GP IIb/IIIa complex), a platelet surface receptor for fibrinogen, is essential for platelet-dependent clot retraction. The effects of anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ monoclonal antibodies (mAbs) and synthetic $\alpha_{IIb}\beta_3$ ligand-mimetic peptides provided insights into the functional requirements of $\alpha_{IIb}\beta_3$ for clot retraction. Platelet stimulation could support clot retraction through a direct action on $\alpha_{IIb}\beta_3$ or by stimulation of other processes such as cytoskeletal assembly.

$\alpha_{IIb}\beta_3$ belongs to the $\beta_3$ subfamily of integrins, adhesion receptors involved in development, inflammation, metastasis, and thrombosis. $\alpha_v\beta_3$ is widely distributed in tissues such as endothelial cells and fibroblasts. $\alpha_{IIb}\beta_3$ is relatively platelet specific, yet cells such as fibroblasts can also retract clots. $\alpha_v\beta_3$ has fibrinogen-binding activity similar to $\alpha_{IIb}\beta_3$. These considerations prompted us to examine the role of $\alpha_v\beta_3$ in fibrin clot retraction.

Triflavin, a potent platelet aggregation inhibitor, was purified from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Its sequence is rich in cysteine and contains the Arg-Gly-Asp sequence at residues 49-51 in the carboxy terminal domain. The Arg-Gly-Asp sequence of triflavin plays an important role in mediating the binding of triflavin towards GP IIb/IIIa complex. Triflavin inhibits platelet aggregation by interfering with the interaction of fibrinogen with the GP IIb/IIIa complex ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin). It is an effective agent in the prevention of thromboembolism. The present study was designed to determine the effect of triflavin on fibrin clot retraction, and to compare the relative activities of synthetic GRGDS peptide, anti-P-selectin, anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$ and anti-$\alpha_v\beta_3$ mAbs in this reaction.

In this study, we found that human platelets (1 x $10^9$/ml) and HUVECs (1 x $10^7$/ml) markedly promoted the fibrin clot retraction. On the other hand, triflavin (1 μM) significantly inhibited platelet-induced fibrin clot retraction about 80%, whereas P-selectin monoclonal antibody did not affect this reaction. Furthermore, triflavin (1 μM) also significantly inhibited HUVEC-induced fibrin clot retraction, the potency is very similar to anti-$\alpha_v\beta_3$ mAb in HUVEC-induced fibrin clot retraction.

Key words: Triflavin, glycoprotein IIb/IIIa complex, P-selectin, $\alpha_v\beta_3$, fibrin clot retraction, endothelial cells

## 二、緣由與目的

醫學界在很早以前就已經注意到血漿中的纖維蛋白凝塊具有回縮的現象(fibrin clot retraction)。在生理上的意義而言，此fibrin clot retraction 能幫助及加快血凝塊的分解作用及加速血管的recanalization (1)。但對於其詳細的作用機轉，至今尚未完全明白。由目前的研究可知 fibrin clot retraction 主要是藉由靜態且非移動性的纖維蛋白網和動態具移動性的血小板相互作用而造成的(2)。關於二者之間如何相互

作用而造成此 retraction 作用，依照研究時間順序約可分為下列幾個假說:

(一)血小板利用活化後所產生的偽足(pseudopod) 和纖維蛋白束連接在一起，接著偽足收縮利用此收縮的力量而將纖維蛋白網拉向血小板，而造成 fibrin clot retraction (3)。 (二) 拉鏈理論 (Zipper model)；此理論認為血小板-血小板之間附著在一起是引起 clot retraction 的重要因素；依照此理論的分析，當活化的血小板長出偽足後，會與其鄰近的血小板之偽足彼此間相互黏接在一起，而後漸漸地使二個血小板的表面如拉鏈般連接在一起，因而使得在二個血小板之間的纖維蛋白受到擠壓而造成 retraction 的現象。(三)另一種假說則認為剛開始時，血小板會先伸出偽足分別附著到不同的纖維蛋白絲上，而後偽足會沿著纖維蛋白絲匍匐爬行；而此爬行動作可能包含了血小板細胞內actin和actin-binding protein 及 microtubule 之間的相互作用。利用此爬行的力量，而使得原本較分散的不同纖維蛋白絲被拉在一起而造成 fibrin clot retraction (2)。此理論的核心思想仍然強調血小板和纖維蛋白絲二者之間的交互作用是造成 fibrin clot retraction的 主要原因，也是到目前為止較為被一般醫學界人士所接受的理論。

既然前述已提及血小板和纖維蛋白之間的相互作用是造成 fibrin clot retraction 的主要原因，但到底血小板細胞膜表面上的何種受體參與此反應?依目前的研究結果顯示血小板細胞膜表面上的纖維蛋白原受體 (fibrinogen receptor) 也就是醣蛋白 IIb/IIIa 複合物 (glycoprotein IIb/IIIa complex; $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) 扮演一個相當重要的角色(4)。 Integrin 係指一群細胞表面附著蛋白受體的總稱；這些 integrin 受體在結構上彼此都非常類似，都含有兩個相異的次單元 (heterodimeric subunit) α次單元和β次單元，此兩個次單元間以非共價鍵方式鍵結(5)。在功能不足的血小板上(thrombasthenic platelets)、完全缺乏$\alpha_{IIb}\beta_3$受體的血小板(6)或者缺乏ligand 結合能力的$\alpha_{IIb}\beta_3$突變物 (7) 以及缺乏訊息傳遞作用的$\alpha_{IIb}\beta_3$突變物 (6) 上都証明缺乏 fibrin clot retraction 的能力。利用抗$\alpha_{IIb}\beta_3$的單源抗體(8)或者是合成的$\alpha_{IIb}\beta_3$ ligand-mimetic的peptide (9) 都可以作為一理想的研究工具來探討$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 在 fibrin clot retraction 中所扮演的角色。

事實上，血小板活化後可幫助 fibrin clot retraction 的作用；其中如上述血小板可能經由 $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 直接和 fibrin 結合；另一方面，則可能藉由如血小板細胞內的蛋白骨架重組作用 (cytoskeletal assembly) 而造成此回縮作用。

$\alpha_{IIb}\beta_3$在 integrin 的分類上屬於$\beta_3$ family,而 $\beta_3$ integrin family 主要參與體內一些生理或病理上的反應: 如生物體的發育作用、發炎反應、腫瘤細胞的轉移作用及血栓反應等(5)；另一種常見的 $\beta_3$ integrin family 為$\alpha_v\beta_3$ integrin。$\alpha_v\beta_3$ integrin 目前已知廣泛的存在於一些組織上；如內皮細胞、 fibroblasts、 melanoma cells和osteoclasts (5)。相對於$\alpha_{IIb}\beta_3$專一性的存在於血小板，$\alpha_v\beta_3$則較廣泛的分布在別的組織細胞上。

目前已知 fibroblast 本身亦參與了 fibrin clot retraction 的反應(10)，而 fibroblast 本身亦可表現出 $\alpha_v\beta_3$ integrin;另外，$\alpha_v\beta_3$ 如 $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 一樣都可以和一些附著蛋白如 fibrinogen 結合。因此存在於內皮細胞或fibroblast上的$\alpha_v\beta_3$ integrin本身是否亦參與fibrin clot retraction ?探討$\alpha_v\beta_3$ 在fibrin clot retraction 中所扮演的角色以及$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_{IIb}\beta_3$比較起來在整個 clot retraction 中，分別所佔的比例多寡亦是本計畫中的研究重點。

再者，如前所述 fibrin clot retraction 為一種血小板-依賴型的反應。那麼除了$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 之外，是否還有別的血小板受體參與此反應? P-selectin是一種存在於血小板 α-granule 表面上的醣蛋白附著受體，其分子量約為 140 kDa，因此亦被稱為 GMP-140 (11)；當血小板活化後會因α-granule靠近細胞膜表面而表現出來；因

此亦被稱為 PADGEM (platelet activation dependent granule-external membrane protein)。除了血小板含有 P-selectin 之外，目前亦發現內皮細胞上的 Weibel-Palade body亦能表現出 P-selectin (11)。因此，是否血小板或內皮細胞上的 P-selectin 亦參與 fibrin clot retraction, 值得進一步再研究。

Triflavin 是一種蛇毒蛋白，從日產的龜殼花 (Trimeresurus flavoviridis)毒蛇中所分離出(12, 13)。它能夠抑制 thrombin、collagen、ADP 和 U46619 等活化劑所引起的血小板凝集反應(12)。進一步研究亦發現triflavin競爭性的抑制纖維蛋白原和血小板細胞膜醣蛋白IIb/IIIa受體結合(14)。因此，triflavin是一種專一性的醣蛋白IIb/IIIa受體拮抗劑。綜言之，本計畫主要的研究重點包括二大主軸：(1)探討fibrin clot retraction的作用機轉：除了血小板上的$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin之外，是否P-selectin和內皮細胞上的$\alpha_v\beta_3$ integrin亦參與此反應，以及兩者間所佔的角色多寡。(2)探討triflavin對fibrin clot retraction的作用：triflavin除了可以抑制血栓形成之外；是否亦能藉由增加fibrin clot retraction的作用而加速血栓分解；本實驗計畫同時比較triflavin、anti-$\alpha_v\beta_3$、anti-P-selectin單源抗體及目前已進入臨床使用的anti-$\alpha_{IIb}\beta_3$單源抗體等藥物彼此之間的相對活性作一比較。

## 三、結果與討論

由本研究結果顯示，人類的血小板的確可促進fibrin clot retraction的產生。血小板隨著濃度的增加，而增加此活性。在1 x $10^9$/ml的濃度下，此抑制活性可達到最高點(數據未列出)。另外，人類的臍靜脈內皮細胞 (HUVECs) 如血小板一樣，隨著濃度的增加而增加對fibrin clot retraction的作用；在1 x $10^7$/ml時達到最大抑制活性。因此，在接下去的實驗中，血小板固定在1 x $10^9$/ml而HUVEC固定在1 x $10^7$/ml，進一步探討血小板及內皮細胞在此反應的作用機轉。

血小板(1 x $10^9$/ml)及內皮細胞(1 x $10^7$/ml) 隨著時間的增加而增加對fibrin clot的retraction作用(圖 1)。在經過2小時後，血小板及內皮細胞約可分別增加70 ± 8及56 ± 6的回縮反應。此fibrin clot retraction的反應，血小板活性較內皮細胞稍微強些。

由上述實驗得知，血小板的確參與此fibrin clot retraction的反應；接下去我們亦欲進一步探討血小板細胞膜上的何種受體參與此反應。我們利用glycoprotein IIb/IIIa complex的拮抗劑triflavin以及anti-P-selectin的單源抗體來進一步研究其機轉。由圖 2可知，在投與triflavin (1 μM) 後會明顯的抑制血小板引起fibrin clot retraction的反應達80 %；然而anti-P-selectin單源抗體則無此抑制活性。因此，由本實驗得知，血小板細胞膜上的glycoprotein IIb/IIIa complex的確在血小板引起fibrin clot retraction的反應中扮演一非常重要的角色，然而P-selectin則可能不參與此反應。

接著，我們亦欲進一步探討內皮細胞在此反應的作用機轉。利用如前述之triflavin及anti-$\alpha_v\beta_3$ integrin單源抗體，比較兩者在內皮細胞引起fibrin clot retraction反應中所分別扮演的角色。由圖 3中顯示，在投與triflavin (1 μM) 及anti-$\alpha_v\beta_3$單源抗體 (10 μM) 後，兩者皆可明顯的抑制內皮細胞引起的fibrin clot retraction反應，且兩者的抑制活性非常類似。由本實驗結果顯示內皮細胞上的$\alpha_v\beta_3$單源抗體在此反應中亦扮演相當重要的角色；而triflavin亦可結合到$\alpha_v\beta_3$ integrin上而抑制此反應。

## 四、計畫成果自評

本研究計劃約達到90 %當初申請計劃時的內容；且本結果我們亦正準備投稿在國際著名學術期刊。因此，我們算是達到當初所設定的目標。

## 五、參考文獻

1.Carroll, R.C., Gerrard, J.M. and Gilliam,

J.M. (1981) Clot retraction facilitates clot lysis. Blood, 57: 44-48.

2. Cohen, I., Gerrard, J.M. and White, J.G. (1984) Ultrastructure of clots during isometric contraction. J. Cell Biol., 93: 775-787.

3. Pollard, T.D., Fujiwara, K., Handin, R. and Weiss, G. (1977) Contractile proteins in platelet activation and contraction. Ann. N. Y. Acad. Sci., 283: 218-236.

4. Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V. and Fitzgerald, L.A. (1988) The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. Blood, 71: 831-836.

5. Hynes, R.O. (1992) Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell, 69: 11-25.

6. George, J.N., Caen, J.P. and Nurden, A.T. (1990) Glanzmann's thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. Blood, 75: 1383-1395.

7. Chen, Y.P., O'Toole, T.E., Ylanne, J., Rosa, J.R. and Ginsberg, M.H. (1994). A point mutation in the integrin $\beta_3$ cytoplasmic domain (S752-P) impairs bidirectional signaling through $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet glycoprotein IIb/IIIa). Blood, 84: 1857-1865.

8. Frelinger, A.L., Cohen, I., Plow, E.F., Smith, M.A., Roberts, J., Lam, S.C.T. and Ginsberg, M.H. (1990) Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. J. Biol. Chem., 265: 6346-6352.

9. Hantgan, R.R. (1988) Localization of the domains of fibrin involved in binding to platelets. Biochim. Biophys. Acta, 968: 36-44.

10. Macieira-Coelho, A. and Azzarone, B. (1990) Correlation between contractility and proliferation in human fibroblasts. J. Cell Physiol., 142: 610-614.

11. Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V. and Bainton, D.F. (1985) A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. J. Cell Biol., 101: 880-886.

12. Huang, T.F., Sheu, J.R. and Teng, C.M.(1991) A potent antiplatelet peptide, triflavin, form Trimeresurus flavoviridis snake venom. Biochem. J., 277: 351-357.

13. Huang, T.F., Sheu, J.R. and Teng, C.M. (1991) Mechanism of action of a potent antiplatelet peptide, triflavin from Trimeresurus flavoviridis snake venom. Thrombos. Haemostas., 66: 489-493.

14. Huang, T.F., Sheu, J.R., Lin, C.H., Chung, J.L. and Teng, C.M. (1991) Triflavin, an antiplatelet Arg-Gly-Asp-containing peptide, is a specific antagonist of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. J. Biochem., 109: 328-334.

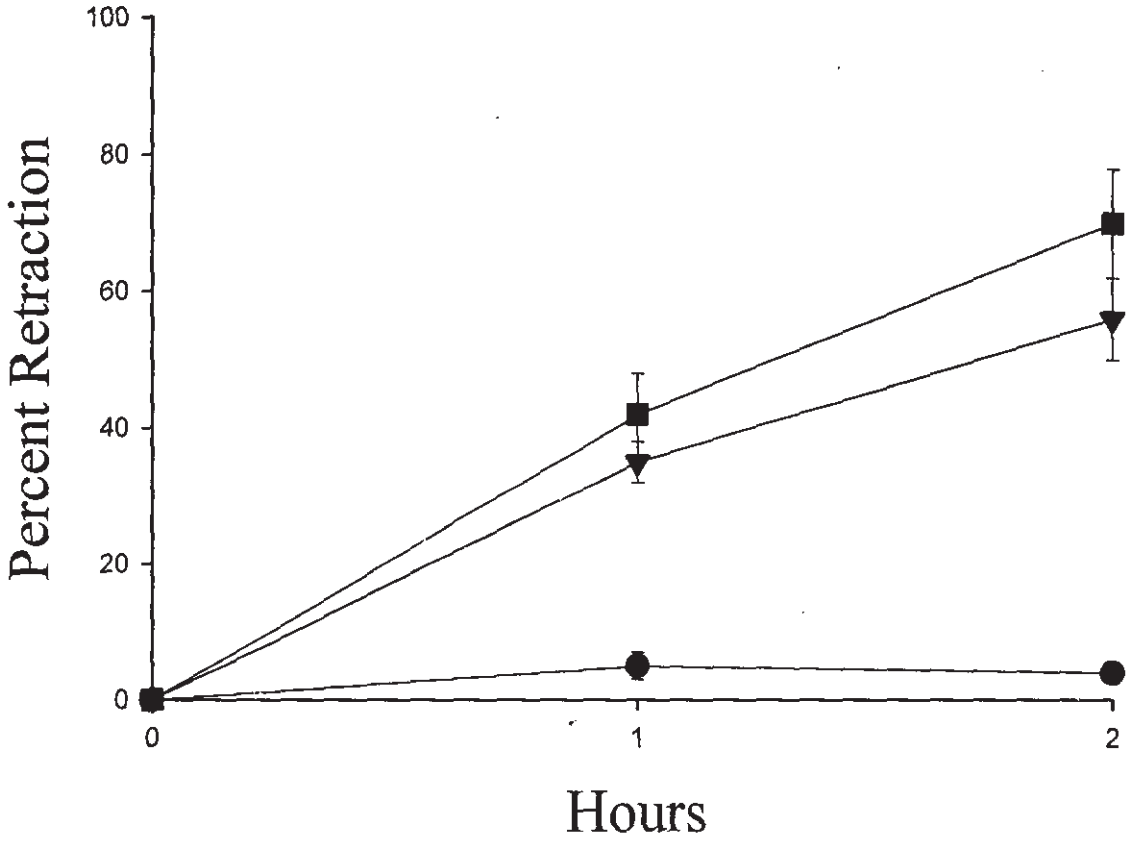


圖 1. 人類血小板懸浮液及臍靜脈內皮細胞(HUVEC)引起纖維蛋白凝塊回縮反應之圖示。

將 PBS 溶液(●)，人類臍靜脈內皮細胞($1 \times 10^7$/ml, ▼) 及人類血小板懸浮液 ($1 \times 10^9$/ml, □) 分別加入 fibronectin-depleted 的血漿中，在 37℃下反應 1 到 2 小時後，分別取出纖維蛋白絲，測量其長度且與控制組 (PBS) 相比較，並以百分比表示。數據以平均值 ± 標準誤差 (n=4)表示。

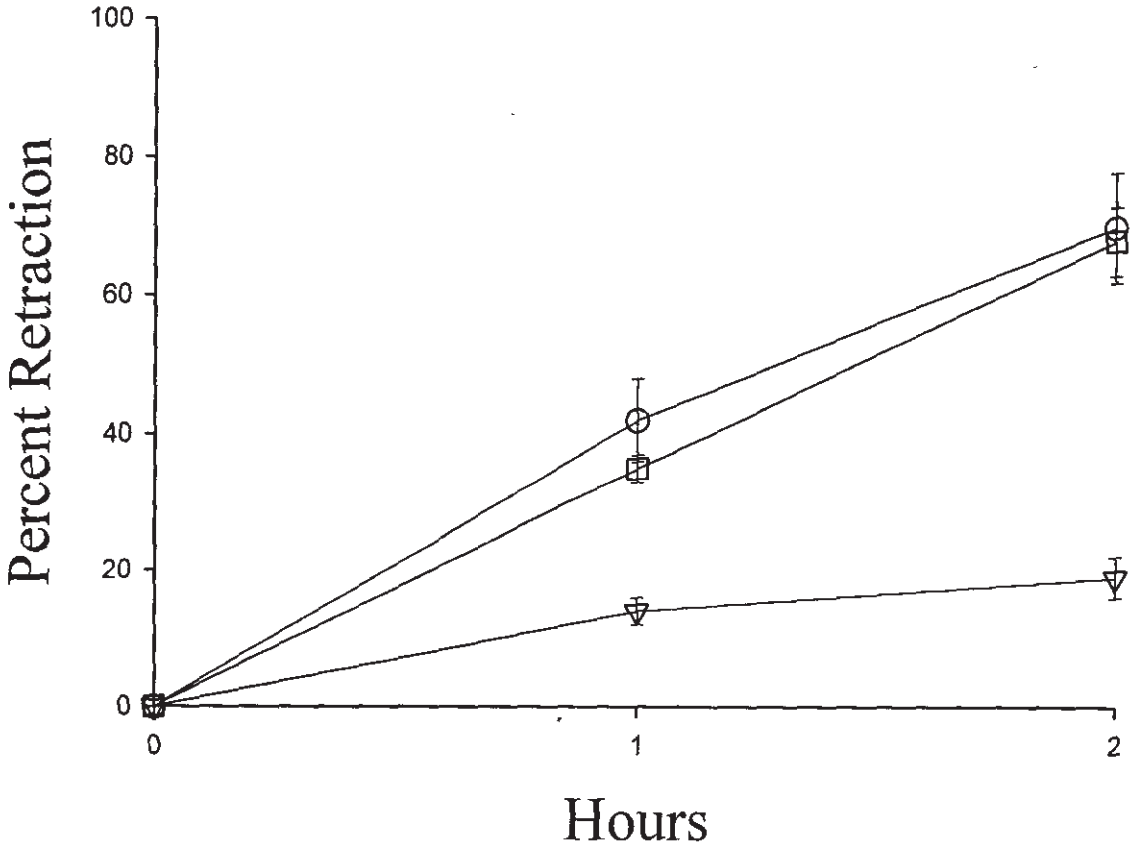


圖 2. Triflavin 與抗 P-selectin 單源抗體對抑制血小板引起纖維蛋白凝塊回縮反應的圖示。將 PBS 溶液(○)，triflavin (1 μM, ▽)與抗 P-selectin 的單源抗體(10 μM, □)分別先加入 fibrocectin-depleted 的血漿中反應 5 分鐘，再加入血小板懸浮液(1 x $10^9$/ml)。在 1 及 2 小時後，分別取出纖維蛋白絲並比較其長度。數據以平均值 ± 標準誤差(n=4)表示。

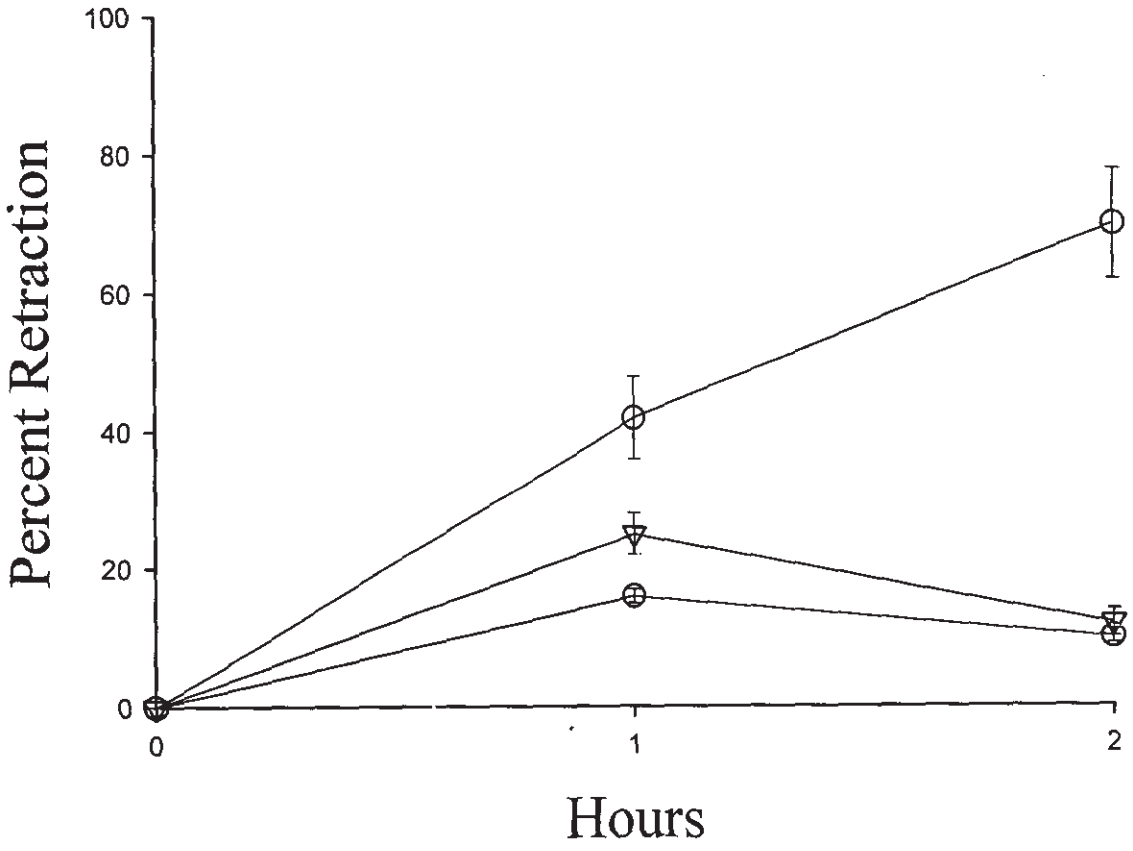


圖 3. Triflavin 與抗$\alpha_v\beta_3$單源抗體對抑制內皮細胞引起纖維蛋白凝塊回縮反應的圖示。將 PBS 溶液(○)，triflavin (1 μM, ▽)與抗$\alpha_v\beta_3$的單源抗體(10 μM, □)分別先加入 fibrocectin-depleted 的血漿中反應 5 分鐘再加入內皮細胞 ($1 \times 10^7$/ml)。在 1 及 2 小時後，分別取出纖維蛋白絲並比較其長度。數據以平均值 ± 標準誤差(n=4)表示。