

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

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 peptide 及抗 beta 3 integrin 抗體的相對抑制活性(2/3)

計劃類別：一般型研究計劃

計畫編號：NSC 93-2320-B-038-013

執行期限：93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：許準榕教授

計劃參與人員：

成果報告類型：精簡報告

執行機構：台北醫學大學醫學研究所

中華民國九十四年五月三十一日星期二

一、中文摘要

在正常的生理環境下，血小板不會附著到血管內皮細胞上，除非內皮細胞受到破壞，此時血小板會附著到內皮下層的基質蛋白(如 collagen)上。當血小板附著到基質蛋白後，會進一步引起血小板凝集反應，此時細胞膜上的 GP IIb/IIIa complex ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin)產生形態上的改變，使得血液中的一些附著蛋白分子如 fibrinogen 結合上去引起血小板凝集反應。這些附著蛋白引起的凝集反應，主要是透過其分子上的 Arg-Gly-Asp (RGD)序列和 GP IIIa 產生結合反應，這其中以 fibrinogen 扮演最重要的角色。

在血小板凝集的過程中，血小板細胞內發生許多連串的訊息傳遞變化，如細胞內鈣離子濃度的增加、蛋白質的磷酸化、phosphoinositide 的代謝、prostanoids 的產生、細胞內 pH 值的改變、自由基的產生及釋放某些重要的生長因子(PDGF)或 cytokines 等。另外，目前研究已知活化的血小板(但非未活化血小板)會直接附著到內皮細胞上，此暗示著血小板所引起的血栓在內皮細胞沒有受損傷的狀態下亦有可能發生，特別是在微細血管附近。至於活化的血小板如何附著到內皮細胞以及此兩種細胞間各利用其表面上的何種受體以及經由何種附著蛋白當橋樑使兩細胞間彼此互相附著，有關這方面的研究並不多。

本連續性的計劃擬一系列的探討及比較有關血小板附著到細胞外基質蛋白(如 collagen type IV、fibrinogen)所引起的細胞內相關訊息傳遞作用的變化及差異性，用以瞭解及比較此二種附著蛋白對血小板附著後引起血小板活化的差異性及影響。本計劃之所以選擇上述附著蛋白主要為 collagen type IV 為血小板附著到內皮下基質蛋白的主要附著蛋白，而 fibrinogen 為引起血小板凝集反應的重要附著蛋白。

另外，本實驗的另一研究重點為研究活化的血小板附著到附著蛋白的機轉探討；探討血小板其細胞膜上的何種附著分子(如受體)以及何種附著蛋白參與血小板-內皮細胞之間的反應；因此我們將分別利用含 RGD 的 β_3 integrin 拮抗劑(如 triflavin)或者抗 β_3 integrin 的單源抗體(anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$)，比較上述這二種藥物對血小板附著到不同的基質蛋白的抑制活性(efficacy 和 potency 的差異性)。由去年的研究結果顯示與未活化的血小板比較起來，受 ADP (10 μ M)或 thrombin (0.5 U/ml)活化的血小板的確比較能夠明顯的附著到 fibrinogen 和 collagen type IV 上；但若以此二種附著蛋白的附著能力而言，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 (10 μ g/ml)及 anti- β_3 單源抗體 Abciximab (20 μ g/ml)後，會明顯的抑制 ADP 活化的血小板附著到 fibrinogen 及 collagen type IV 上；在今年度的計劃中，我們繼續前一年度的研究，進一步比較 triflavin (10 μ g/ml) 及 anti- β_3 單源抗體 Abciximab (20 μ g/ml)抑制受 thrombin 活化的血小板附著到 collagen type IV 及 fibrinogen 的差異性；由研究結果顯示 triflavin (10 μ g/ml)及 anti- β_3 單源抗體 Abciximab (20 μ g/ml)皆能明顯的抑制 thrombin 活化的血小板附著到 fibrinogen；反之，triflavin (10 μ g/ml) 抑制 thrombin 活化的血小板附著到 collagen type IV 的活性明顯的比 anti- β_3 單源抗體 Abciximab (20 μ g/ml)來的強。另一方面，在本年度的計劃中，我們探討 MMP-9 在血小板的活性研究，由結果顯示：(1) 在 in vitro 實驗中發現外加 activated MMP-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 activated MMP-9，則會隨著濃度之增加而有效地抑制由 collagen、ADP、arachidonic acid、thrombin 與 U46619 等血小板活化劑所引起的凝集作用，隨著血小

板活化劑使用種類不同，MMP-9 之 IC_{50} 約為 21~60 ng/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 phosphoinositide breakdown。(3) MMP-9 可促進 NO 與 cGMP 之增加，抑制 TxB_2 之形成。

關鍵詞：血小板，triflavin，含 Arg-Gly-Asp 蛋白，抗 β_3 單源抗體，MMP-9

Abstract

Endothelial integrity is necessary for the normal functioning of blood vessels and for maintaining a non-thrombotic state, whereas endothelial damage induces platelet adhesion to subendothelial matrices (such as collagen) following by trigger platelet aggregation. When platelets are activated by agonists, platelets initially undergo shape change and subsequently express fibrinogen receptor (GP IIb/IIIa complex, $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) on their membrane surface. Binding of fibrinogen to $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin appears to be the final common pathway for platelet aggregation. Nowadays, it is well established that the β_3 integrin recognition site on fibrinogen involves the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. When platelet are activated, the morphological changes accompanied by changes in many signal transductions including intracellular Ca^{+2} mobilization, protein phosphorylation, phosphoinositide metabolism, prostanoid formation, intracellular pH changes, free radical formation, and release of growth factors (such as PDGF) or cytokines etc. On the other hand, activated but not resting, platelets have been shown to adhere to intact endothelium, it has been suggested that platelet thrombi may also occur in the absence of endothelial cell denudation, particularly in the microvasculature. However, the pathways responsible for the interaction of platelets and the endothelium are not well characterized. The present study is designed to compare and characterize the differences of intracellular signal transductions while platelet adhesion to various extracellular matrices (ECMs; collagen type IV, fibrinogen). Furthermore, this study is also designed to further clarify the roles of the different receptors and cell associated-adhesive proteins involving in the interaction of activated platelets with extracellular matrix. In addition, we also compare the relative inhibitory activities of RGD-containing peptides (triflavin) with those of monoclonal antibodies against the β_3 integrin in these reactions. In the study of last year, we found that ADP (10 μ M)- or thrombin (0.5 U/ml)-activated platelets adhesion to immobilized fibrinogen (0.5 mg/ml) and collagen type IV (20 μ g/ml) were more pronounced as compared with the resting platelets in a concentration- and time-dependent manners. Activated platelets adhesion to immobilized collagen type IV was shown more pronounced than fibrinogen. On the other hand, the maximal adhesion was reached about 60 min after activated platelets addition to microplate wells pre-coated with fibrinogen or collagen. In the present study, we found that the RGD-containing peptide, triflavin (10 μ g/ml) was more potent effect than anti- β_3 monoclonal antibody, Abciximab (20 μ 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^{+2} mobilization, and thromboxane A_2 formation in human platelets stimulated by collagen (1 μ g/ml). In addition, activated MMP-9 (21 and 90 ng/ml) significantly increased the formation of nitric oxide/cyclic GMP.

Keywords : platelet, triflavin, Arg-Gly-Asp-containing peptide, anti- β_3 integrin monoclonal antibody, MMP-9

二、報告內容

(一) 緣由與目的

體內正常血管的內皮細胞通常具有 nonthrombogenic 的特性，亦即它無法和血小板或血液內的其他成份反應，之所以會有此現象，主要是血液內有許多的保護機制來避免血小板或凝血因子與內皮細胞反應 如：(1) 具有完整的內皮細胞 (2) 含有許多預防凝血因子活化的機制(anti thrombin III or activated protein C) (3) 肝臟對活化凝血因子的清除作用 (4) 血栓溶解系統的活化 (如轉換成 β -globulin plasminogen 或 plasmin) 以及(5)藉著血流將活化的凝血因子稀釋掉。另外，血管的內皮細胞亦會釋放出某些物質來防止及調節血小板凝集反應如 prostacyclin (Moncada, 1982) 及 nitric oxide (Radomski et al.,1987)等。

當血管受到傷害時會使得血管內皮細胞的完整性受到破壞，同時亦會曝露出血管內皮下層的基質蛋白 (matrix protein)。血管的傷害可能是由於直接的物理性傷害、免疫反應、細菌或病毒的感染、血流動力學方面的改變 (如 shear stress)、血液中高濃度的膽固醇以及在發炎反應中從血小板或白血球中所釋放的分解酵素等等。對動脈血栓 (arterial thrombosis)而言，血管的傷害及血小板的活化可說扮演重要的角色，且此兩者間彼此合作，一個因子的產生可促使另一因子的活化。

在正常的生理環境下，血小板不會附著(adhesion)到正常的血管內皮細胞上，除非內皮細胞受到破壞，此時血小板會附著到內皮下層的基底膜(basement membrane)上，基底膜主要是由 collagen, elastic tissue, proteoglycans 和一些 non-collagenous glycoproteins 所構成(Yurchenco & Schittny, 1990);目前 collagen 已知有 14 種 subtypes, 約可分為兩大類: fibrillar collagen type I、II、III 和 V；其餘屬於 non-fibrillar collagens type；其中 fibrillar collagen type I 為體內重要的 collagen subtype，主要存在於皮膚或肌腱 (tendon)。在血管內主要存在外層，在中層及內層亦有分佈；它可以由內皮細胞或平滑肌細胞所合成。在發生動脈粥狀硬化症的血管(atherosclerotic vessel)內層，可發現 collagen type I 大量的增生；另外，collagen type IV 屬於 non-fibrillar collagen；collagen type IV 會與 laminin、heparin 以及 heparan sulphate-containing proteoglycan 構成內皮細胞之基底膜的主體(Akiyama et al.,1990)。Collagen 不僅提供一個細胞附著的介面，同時它亦能活化血小板引起血小板釋放其內含物(α -granules 或 dense granules)或引起血小板凝集反應。另外，collagen 亦能促使一些細胞進行增生(proliferation)、分化(differentiation)及移動(migration)反應(Cardarelli et al., 1992)。有關 collagen 受體的研究，目前一般認為包含 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 和 $\alpha_3\beta_1$ 等 integrin。當血小板附著到 collagen 時，可能是經由它細胞膜上的 $\alpha_2\beta_1$ integrin (glycoprotein Ia/IIa complex) (Saelman et al.,1994)。Integrin 泛指一群細胞表面附著蛋白受體，這些 integrin 在結構上彼此之間都非常相似，都含有兩個 相異的次單元： α 和 β 次單元，此兩次單元以非共價鍵方式鍵結。

如前述，當血小板附著到基質蛋白(如 collagen)後，緊接著會引起血小板釋放反應發生；血小板內含幾種 secretory granules (α -granules 或 dense granules)，當血小板受到較小的刺激時 (如 ADP)，其釋放反應主要以 dense-granules 為主；若遭受較大的刺激反應 (如 thrombin 或 collagen) 則會明顯進一步促使 α -granules 釋放其內含物。Dense-granules 主要含有 serotonin, Ca^{+2} 和 ADP；而 α -granules 主要內含以蛋白質為主如 platelet factor-4、 β -thrombospondin、platelet-derived growth factor (PDGF)、fibrinogen 和 vWF 等等。在釋放反應之後，因血小板受到釋放物的不同活化反應，緊

接著引起血小板凝集反應。當血小板受到刺激活化後，會使得細胞膜上的 GP IIb/IIIa complex ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin)產生形態上的改變，使得血液中的一些附著蛋白分子如 fibrinogen、vWF、fibronectin、vitronectin 等附著上去引起血小板凝集反應 (Plow et al., 1985)。這些附著蛋白引起的凝集反應，主要是透過其分子上的 Arg-Gly-Asp (RGD) 序列和 GP IIIa 產生結合反應，這其中以 fibrinogen 扮演最重要的角色 (Bennett, 1996)。

當血管內皮細胞受傷，血小板會附著到 subendothelial matrix 上，造成血小板活化進一步引發凝集反應的發生；除此之外，目前研究已知活化的血小板（但非未活化血小板）會直接附著到內皮細胞上，由此暗示著血小板所引起的血栓 (platelet thrombi) 在內皮細胞沒有受損傷的狀態下亦有可能發生，特別是在微細血管 (microvasculature) 附近 (Tloti et al., 1991)。對目前的研究而言，血小板細胞膜上的哪些受體參與附著到 matrix protein 上以及如何引起血小板凝集反應的機轉被研究的相當多；然而活化的血小板如何附著到內皮細胞以及兩細胞間各利用其表面上的何種受體以及經由何種附著蛋白當橋樑使兩細胞彼此間互相附著，有關這方面的研究並不多。目前有研究認為血小板細胞膜上的 P-selectin 以及 GP IIb/IIIa complex ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin) 在此附著反應方面扮演某種特定角色 (Li et al., 1996)，至於其它的受體如 GP I α 、GP IIa (collagen 受體)、GP IV (thrombospondin 受體)、GP IX 以及 PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) 是否有參與此附著反應，並未被完全瞭解；另一方面，內皮細胞膜表面提供何種受體參與活化血小板的附著反應，亦尚未完全清楚。有研究報告指出內皮細胞上的受體蛋白如 endothelial-sialylated glycoprotein、P-selectin 及 $\alpha_v\beta_3$ integrin 可能參與其中 (Buchanan et al., 1993)；至於 E-selectin、 β_1 integrin、PECAM-1、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)、ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) 及 GP I α 是否參與其中，則亦不清楚。除了血小板及內皮細胞的表面附著分子 (如受體) 參與此兩細胞的附著反應外，尚需附著蛋白當此兩細胞的橋樑，到底是由 platelet-bound adhesive proteins 如 fibrinogen、fibronectin 及 vWF 參與此反應，或者由 endothelial cell-associated adhesive proteins 如 collagen type IV、fibronectin 和 vWF 來當做活化血小板與內皮細胞之間的橋樑，目前並不清楚，需進一步研究證實。當活化血小板附著到內皮細胞後，會引起內皮細胞的活化，但關於內皮細胞內相關訊息傳遞的活化情形，仍有研究的空間；如有哪些 PKC isoforms 被活化、eNOS 及 iNOS 活化的差異性、是否會促進 PDGF 的釋放及 prostacyclin (PGI₂) 的合成等等，值得我們進一步去評估與探討。

最近很多被稱為 disintegrins 的抗血小板蛇毒蛋白陸續被發現 (Gould et al., 1990)，這些 disintegrin 其 amino acid 序列上有一共通性為其分子靠近 C 端處都含有 Arg-Gly-Asp (RGD) 這三個 amino acid 分子，這 RGD 分子同時也是 fibrinogen 結合到血小板 $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 的部分。因此，這些 disintegrin 可以和 fibrinogen 競爭血小板上的 $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 受體，因而抑制血小板凝集反應。Triflavin，也是一種 disintegrin 的蛇毒蛋白，從日產的龜殼花 (*Trimeresurus flavoviridis*) 毒蛇中所分離出 (Huang et al., 1991)。由過去幾年的研究結果顯示，triflavin 的確是有潛力的抗血栓治療劑。

最近這三、四年我們更深一層的探討這類含 RGD 的 $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 拮抗劑新的藥理活性應用；如我們發現 triflavin 可以經由抑制內皮細胞上的 $\alpha_v\beta_3$ integrin 受體進而抑制內皮細胞的附著與轉移作用；在新生血管作用 (angiogenesis) 方面，triflavin 會經由抑制內皮細胞對細胞外基質蛋白的附著與轉移作用而在活體內表現出抑制新生血管作用 (Sheu et al., 1997a)。當血管內皮細胞受損時，一方面會造成血小板凝集反應，引起血栓反應；另一方面，凝集的血小板會引起受損的血管產生收縮反應，嚴重的話會造成血管痙攣 (angiospasm)。研究亦發現 triflavin 可有效的抑制血小板引起的去內皮

血管收縮反應(Sheu et al., 1997b)。因此 triflavin 不僅對血栓有明顯的抑制作用，同時對血栓所伴隨的血管痙攣作用也有抑制作用。另外，我們亦發現 triflavin 可明顯的抑制由敗血性休克所引起的血小板減少的現象(Sheu et al., 1999)；最近的研究更發現 triflavin 可明顯的抑制因氣球擴張術所引起的血管內膜的增生反應 (Sheu et al., 2001)。由種種的研究顯示 triflavin 可明顯的阻斷體內由 β_3 integrin 所引起的各式疾病，因此可充份利用 triflavin 的特性來探討相關疾病引起的機轉及 RGD 藥物的相對療效；另外， $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin 的單源抗體 (Abciximab；Reopro[®])亦已在臨床上做為治療氣球擴張術後引起血管內膜增生的再窄化現象 (restenosis) (Simoons et al., 1994)。本實驗擬探討有關血小板附著到不同的細胞外基質蛋白 (如 collagen type IV 及 fibrinogen) 所引起的變化及差異性，用以瞭解此二種附著蛋白對血小板附著後的差異性及重要性。本計劃之所以選擇上述這二種附著蛋白主要為這二種附著蛋白當血小板進行附著、活化及凝集反應時個自扮演不同的角色；如 collagen type IV 為血小板附著到內皮下基質蛋白的主要附著蛋白，而 fibrinogen 為引起血小板凝集反應的重要附著蛋白。另外我們將分別利用含 RGD 的 β_3 integrin 拮抗劑 (如 triflavin)或者抗 β_3 integrin 的單源抗體(如 anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, Abciximab)，比較上述二種藥物對血小板附著到基質蛋白的抑制活性(potency 的差異性)。

另外，近年來研究亦發現利用 zymography 可在 washed human platelets 之 homogenate 中發現分子量為 72 kDa、92 kDa、125 kDa 和 > 200 kDa 之 Gelatinase (MMPs 分類之一)，其中以 72 kDa 和 92 kDa 最為顯著 (Carlos et al., 1999)。分子量為 72 kDa 者於 MMPs 之分類中稱之為 Gelatinases A 即 MMP-2；另一個分子量為 92 kDa 者是我們本次研究之重點，即 Gelatinases B (MMP-9)。MMP-9 具有調節血小板凝集之作用。當血小板受到 thrombin 或 collagen 等刺激劑活化後所引發之凝集，可使 MMP-9 由血小板中釋放，進而影響周圍之單核球、血管內皮細胞、腫瘤細胞大量釋出 MMP-9，MMP-9 之大量釋放將導致血管新生與腫瘤細胞的侵入性增加及繁殖加速。然而文獻中亦發現生物體內有一反制之機制，即當被大量釋放之 Pro-MMP-9 活化後，對於經由 thrombin 或 collagen 所引發之凝集現象會有顯著的抑制能力。經研究發現由 thrombin 或 collagen 所引發的凝集現象，Pro-MMP-9 並無顯著的抑制能力。由於目前對活化之 MMP-9 可抑制血小板凝集之作用機轉仍未明瞭，因此本年度將深入探討 MMP-9 對血小板之作用機轉。

(二) 研究方法與實驗數據統計分析：

(a)、純化蛇毒蛋白 triflavin

蛇毒(*Trimeresurus flavoviridis*) 從法國(Latoxan) 購入，並儲存在-20 中。將 Fractogel TSK HW-50 以蒸餾水浸泡，再以 1M NaCl 水溶液浸泡，充填於 400 ml 的層析管中。將蛇毒用 0.1 M NaCl 溶解，再置入膠體上層，以 0.1 M NaCl 當沖流液，在 278 nm 波長下收集分離下來的蛇毒蛋白。利用透析膜行透析作用，利用人類或兔子的血小板行篩選，收集具有抑制血小板活性的分劃。經冷凍乾燥後再以 CM-Sephadex C-50 離子交換柱層析法，以三種溶液進行沖流：

- (1) 0.05 M (pH 5.0) 醋酸銨 200 ml
- (2) 0.05 M (pH 5.0) 與 0.2 M (pH 6.8) 醋酸銨各 450 ml
- (3) 0.6 醋酸銨 (pH 8.0) 650 ml

收集沖下的各個分劃 (peak)，經透析、抑制血小板活性篩選、並 經冷凍乾燥，再用 Sephadex G-75 膠質過濾法以碳酸氫銨 (ammonium bicarbonate) 當沖流液收集

分割，如前述方法重覆操作；最後再以 Sephadex G-50 膠質過濾法純化，重覆上述步驟。最後將半純化的 triflavin 以 reverse-phase HPLC 來純化，以 1.0 ml/min 的流速做二種溶液的沖流梯度。溶液 A: 100 % H₂O 其內含 0.1% TFA (trifluoroacetic acid)；溶液 B: 20 % H₂O 加 80 % acetonitrile 亦含 0.1 % TFA。在約 20 min 處收集單一分劃此即 triflavin。利用 20 % polyacrylamide gel 跑電泳判斷其純度，並與已知分子量的標準品比較其分子量應在 7,500 左右；並做抗血小板凝集活性分析，才能確認所純化出的 triflavin 活性沒受到影響。

(b)、製備人類血小板懸浮液

將抗凝血劑 acid/citrate/glucose (ACD)與志願健康者的全血以 1 : 9 (v/v)混合，以 120 g 離心 10 分鐘。取出上層富含血小板血漿 (PRP),加入 heparin (6.4 U/ml), PGE₁ (0.5 μM) 於 37 °C 下溫浴 10 分鐘，再以 500 g 離心 10 分鐘，去上層液，用 Tyrode 溶液打散；最後用 Tyrode 溶液將血小板濃度調整為 2×10^9 platelets/ml。

(c)、血小板附著到細胞外基質蛋白實驗

將上述製備完成之血小板懸浮液以 Tyrode 溶液清洗後，將濃度調為 2×10^9 /ml，接著用不同的活化劑 thrombin (0.5 U/ml) 和 ADP (10 μM) 活化血小板 3 分鐘。將活化及未活化血小板分別置入預先 coating 一層細胞外基質蛋白 fibrinogen (0.25-2.0 mg/ml) 及 collagen type IV (10-40 μg/ml) 的 96-well 培養盤中，分別反應 10-120 分鐘，反應終了以 tyrode 溶液清洗二次；最後以微盤分析儀分析血小板附著到不同細胞外基質蛋白的時間-反應曲線 (Bellavite et al., 1994)；在另一組實驗中，則先將活化或未活化血小板分別與 triflavin (10 μg/ml)以及 anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ (20 μg/ml)單源抗體反應 10 分鐘，再如前述加入預先 coating 一層細胞外基質蛋白的 96-well 微盤中分別反應 60 分鐘。由本實驗將可求得 此二種藥物的濃度-反應曲線，並計算出其相對的 potency；同時可瞭解此二種附著蛋白對血小板附著能力的差異性。

(d) Pro-MMP 的活化

Pro-MMP 和 10 mM APMA stock solution 以 體積比 10:1 混合，在 37 °C 下反應 2~3hr。以 APMA solution 作 solvent control，結果發現 APMA solution (1.2~5.4 μM) 之存在不會影響以下實驗進行。

(e) [³H]-inositol monophosphate 生成的測定

將以 A.C.D. (1: 9 v/v) 為抗凝劑的人類富含血小板血漿於室溫下離心 500 g 10 分鐘，除去上層液，將下層血小板顆粒懸浮於不含鈣離子及 BSA 的 Tyrode 溶液中，並外加 1 mM EDTA 及 75 μCi/ml 的 [³H] inositol。於 37 °C 下溫浴 2 小時，再以 500 g 離心 4 分鐘，所得的血小板顆粒用含 BSA (3.5 mg/ml)，不含 EDTA 的 Tyrode 溶液懸浮之，然後稀釋至所須的濃度 (5×10^8 /ml)。將 1 ml 的血小板懸浮液加入經 silicone 包衣的 3.5 ml 小玻璃管中，並以小磁棒作每分鐘 1200 轉的攪拌並維持在 37 °C 下，然後加入 5 mM LiCl 反應 2 分鐘，接著加入 MMP-9 或者等量的 Tyrode 溶液 (對照組)，在 37 °C 下反應 60 分鐘，最後再加入血小板凝集劑 collagen (1 μg/ml)引發凝集反應，6 分鐘後加入等體積 10% (w/v)冰冷的 trichloroacetic acid (TCA) 以中止反應，接著以 1,000 g 離心 4 分鐘，所得上清液 (1 ml) 以乙醚 (10 ml) 抽取殘存的 TCA 三次，用 80 °C

熱水浴將殘存的乙醚趕走，用 1 N NaOH 調整 pH 值至 7~8，最後用蒸餾水調整體積至 4 ml，然後取 3.5 ml 加入含 Dowex-1 之陰離子交換樹脂管柱中(50 %，w/v，1 ml) 以沖流液分別沖流出 [³H]inositol, [³H]glycerophosphoinositol, [³H]IP₁, [³H]IP₂ 和 [³H]IP₃。沖流液分別以試管收集(每管 1 ml)加入 counting solution (atomlight) 後，以 Liquid Scintillation Counter 測定所含放射線的強度。結果以 inositol monophosphate (IP₁)當做一指標，代表全部 inositol phosphates 生成的量。

(f) 血小板內鈣離子的測定

以 A.C.D. 為抗凝劑與健康人血以 1: 9 (v/v) 之比例混合，在室溫下立即以 120 g 離心 10 分鐘，所得上層液，再以 500 g 離心 10 分鐘，而後，除去上清液，將下層的血小板以 Tyrode 溶液懸浮之，並加入 Fura 2-AM (5 μM), EDTA (2 mM) 和 PGE₁ (0.5 μM)，於 37 °C 下避光溫浴 60 分鐘後，再加入 apyrase (1 U/ml)，並一併溫浴 5 分鐘，再依照製備血小板懸浮液的方法製備懸浮液。經 Fura 2-AM 處理過之血小板懸浮液，在加入凝集劑後與鈣離子作用所產生的螢光以螢光分光儀 (CAF-110 Intracellular Ion Analyzer, JASCO, Japan) 記錄之 excitation wavelength (339 and 380 nm), emission wavelength (505 nm)，然後利用公式計算細胞內鈣離子濃度。

(g) 血小板細胞內 thromboxane B₂ 的測定

人類血小板懸浮液 (0.4 ml, 4.5×10⁸/ml) 與 MMP-9 先混合反應 3 分鐘後，加入 collagen (1 μg/ml) 引發血小板活化，反應進行 6 分鐘後，加入 EDTA (2 mM) 和 indomethacin (50 μM) 以終止 thromboxane 的生合成，經由離心機 Sigma-201 M 在 14,000 r.p.m. 下離心 3 分鐘，取出上清液。上清液中所含的 thromboxane B₂ 的量利用 Thromboxane B₂ EIA Kit 測定之。

(h) 血小板細胞內 cyclic GMP 含量的測定

將血小板懸浮液在 37 °C，1200 r.p.m. 攪拌溫浴 1 分鐘後，加入 IBMX (100 μM) 反應 2 分鐘，隨後加入不同濃度 MMP-9 (反應 3 分鐘)、PGE₁ 或 nitroglycerin (反應 6 分鐘)，隨即加入 10 mM EDTA 後，立即煮沸 5 分鐘，再置入冰浴中冷卻，並以 EIA kits 測定 cyclic GMP 的含量。

(i) 血小板細胞內 NO 的含量測定

將的不同濃度 MMP-9 與血小板懸浮液反應 3 分鐘後，立即以 14,000 r.p.m. 離心 8 分鐘，取上清液 100 μl 加入兩倍體積的無水酒精，均勻搖盪攪拌，接著在 4 °C 冷藏 30 分鐘，再離心 14,000 r.p.m. 8 分鐘，取上清液待測，此目的為除去待測物中的蛋白質。取 10 μl 打入反應槽中，以 VCl₃ 當還原劑，將待測物中的 nitrate、nitrite 還原成 NO，利用氫氣將 NO 帶入一氧化氮分析儀(NO Chemiluminescence Analyzer, Model 280, Sievers Co. Ltd.) 中與臭氧反應，並偵測反應後釋出 600 nm 以上的螢光，並以 NaNO₃ 做 standard curve，藉此可推算待測物的濃度。

(j) 實驗數據統計分析：

實驗數據以實驗結果之平均值 (Mean) ± 標準誤差 (S.E.M.) 來表示, 控制組與實驗組之間的比較以 Student t-test 作統計分析; 若 $P < 0.05$ 則表示有意義的差別。

(三) 結果與討論

由 Fig. 1 和 2 可知, 不論未活化或受 thrombin 活化的血小板其附著到 collagen type IV 的量一樣比 fibrinogen 來得多; collagen type IV 在 in vitro 的狀態上較 fibrinogen 容易附著到血小板細胞膜上, 其原因可能與 fibrinogen 結合到 glycoprotein II_b/ III_a complex 上時, 要 stirring 有關。

再者若以劑量-反應曲線計算則發現若 coating fibrinogen 的濃度由 0.25-2.0 mg/ml 時, 我們發現其到達最大附著反應的濃度約在 1.0-2.0 mg/ml (Fig. 1); 若將血小板事先與含 RGD 的 peptide, triflavin (10 µg/ml) 或 anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的單源抗體 Abciximab (20 µg/ml) 反應, 再加入 coating fibrinogen 的 wells 中, 我們發現 triflavin 和 Abciximab 兩者都可以明顯的抑制被 thrombin 活化的血小板附著到 fibrinogen (Fig. 1)。比較兩者的 potency, 則發現 triflavin 效果和 Abciximab 類似; 反之, 由 Fig. 2 中可知 collagen 最大的附著濃度約在 30 µg/ml 左右, 而 triflavin (10 µg/ml) 的抑制效果則明顯的比 Abciximab 強許多 (Fig. 2), 其原因可能與 triflavin 對 receptor 的親和力比 Abciximab 來得強; 比較 Abciximab 對抑制血小板附著到 fibrinogen 及 collagen type IV 可明顯發現, Abciximab 抑制血小板附著到 fibrinogen 比 collagen type IV 明顯, 其原因為 fibrinogen 附著到血小板細胞膜主要是藉著 GP II_b/ III_a complex ($\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin), 而 collagen 主要是藉由 GP II_a receptor, 因此 Abciximab 較易抑制 fibrinogen 的附著反應。另一方面, 當血小板活化後會明顯的釋放出 MMP-9, 在人類的血小板懸浮液中, MMP-9 與血小板懸浮液溫浴 3 分鐘後, 對於 collagen (1 µg/ml), thrombin (0.01 U/ml), U46619 (1 µM), ADP (20 µM) + fibrinogen (200 µg/ml) 及 arachidonic acid (60 µM) 所引發的血小板凝集反應和 ATP 釋放反應, 均呈濃度相關的方式產生抑制作用 (Fig. 3)。用 collagen (1 µg/ml) 可引起已標定 [³H]-inositol 的人類血小板快速地產生具放射性的 IP₃, IP₂, IP, 而以 [³H]-IP 的量作為一個指標。如 Fig. 4 血小板受 collagen (1 µg/ml) 活化而增加的 inositol monophosphate 的量約為未活化血小板的 2.1 倍; 若以不同濃度的 MMP-9 (21 和 90 ng/ml) 與血小板懸浮液反應 3 分鐘, 發現 MMP-9 會抑制 collagen 所引起血小板內 phosphoinositides 的分解。當血小板受到活化劑刺激後, 可藉由鈣離子內流 (influx) 或是移動 (mobilization) 而使得細胞內鈣離子濃度增加。collagen 是一種很強的血小板凝集劑, 具有上述的能力, 進而明顯地增加細胞內鈣離子的濃度。因此本實驗以 collagen (1 µg/ml) 作為血小板活化劑, 當 MMP-9 以 21 及 90 ng/ml 不同濃度加入經由 Fura 2-AM 處理過後的人類血小板懸浮液中, 均能察見明顯的抑制細胞內鈣離子的移動 (Fig. 4), 其抑制程度分別約為 75% 及 91%; 由此可知, MMP-9 會抑制 collagen 所引起的血小板細胞內鈣離子的增加。

在 arachidonic acid (AA) 的 pathway 中, AA 最後會代謝成 thromboxane A₂ (TxA₂), 此反應的過程被認為是引起血小板凝集的重要途徑之一, 所以這也是在探討血小板的凝集機轉時不可遺漏的一環。由於 TxA₂ 的半衰期 (half-life) 很短, 約只有 30 秒, 便會水解成較穩定的 TxB₂。因此測量 TxB₂ 的濃度可代表 AA 經由 cyclooxygenase 代謝所生成 TxA₂ 的含量。由 Table 1 結果顯示, 未受活化的血小板其產生 TxB₂ 的量較低, 而受到 collagen (1 µg/ml) 活化時, TxB₂ 的量明顯地增加, 但在加入不同濃度的 MMP-9 (21 及 90 ng/ml) 後, 有意義地抑制 collagen (1 µg/ml) 所引起 TxB₂ 的形成;

由此可知，MMP-9 會影響 thromboxane A₂ 的生成。另一方面，cyclic GMP 含量的提昇對於抑制血小板凝集反應有很大的幫助，nitroglycerin 抑制血小板凝集的機轉，便是提高 cyclic GMP 的含量。在本實驗中我們也用 nitroglycerin (10 μM)來提昇 cyclic GMP 的含量，觀察到 cyclic GMP 的濃度由 resting 的 5.7 ±0.2 (pmol/ml)提昇為 12.6 ± 1.6 (pmol/ml)，而當我們加入 MMP-9 (21 及 90 ng/ml)與血小板懸浮液反應 3 分鐘，發現 cyclic GMP 的含量明顯地增加，分別為 9.5 ±0.9 及 11.7 ±0.6 (pmol/ml)；由此可知，MMP-9 使血小板內 cyclic GMP 的含量有意義的增加 (Table 1)。當血小板受到一些活化劑刺激後，會引起 NO 的釋放，繼而活化了 guanylate cyclase 來調控血小板的功能，collagen 可藉由活化細胞內的 NOS 而引起 NO 釋放的增加。由 Table 1 可知，MMP-9 (21 及 90 ng/ml)作用於血小板後，可使 NO 的量明顯的增加，由此可知 MMP-9 會刺激血小板釋放 NO。

三、參考文獻

- Akiyama SK, Nagata K, Yamada KM. (1990) Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochim. Biophys. Acta* 1031: 91-110
- Bellavite P, Andrioli G, Guzzo P, Arigliano P, Chirumbolo S, Manzato F, Santonastaso C. (1994) A colorimetric method for the measurement of platelet adhesion in microtiter plates. *Analy. Biochem.* 216: 444-450.
- Bennett JS. (1996) Structure biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Trend. Cardiovasc. Med.* 6: 31-37.
- Buchanan MR, Bertomeu MC, Haas TA, Orr FW, Eltringham-Smith LL. (1993) Localization of 13-hydroxyoctadecadienoic acid and the vitronectin receptor in human endothelial cells and endothelial cell/platelet interactions in vitro. *Blood* 81: 3303-3312.
- Cardarelli PM, Yamagata S, Taguchi I, Gorcsan F, Chiang SL, Lobl T. (1992) The collagen receptor α₂β₁, from MG-63 and HT 1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide. *J. Biol. Chem.* 267: 23159-23164.
- Carlos FP, Maria A, Martinez C, Eduardo S, Sawicki G, Wozniak M, Marek W, Radomski ST. (1999) Differential Regulation of Platelet Aggregation by Matrix Metalloproteinases-9 and -2. *Thromb. Haemost.* 82: 1730-1735.
- Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewarowski S. (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 195: 168-171.
- Huang TF, Sheu JR, Teng CM. (1991) A potent antiplatelet peptide, triflavin, from *Trimeresurus flavoviridis* snake venom. *Biochem. J.* 277: 351-357.
- Li JM, Pololsky RS, Rohrer MJ, Cutler BS, Massie MT, Barnard MR, Michelson AD. (1996) Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GP IIb/IIIa. *J. Surg. Res.* 61: 543-548.
- Moncada S. (1982) Biological importance of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.* 76: 3-31.
- Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie G, Ginsberg MH (1985) The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82: 8057-8061.
- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. (1987) Comparative pharmacology of endothelium-dependent relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.* 92: 181-187.
- Saelman EUM, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PhG, Heijnen HFG, Sage EH, Williams S, Mckeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. (1994) Platelet adhesion to collagen type I through VIII under conditions of stasis and flow in mediated by GP Ia/IIa

- ($\alpha_2\beta_1$ -integrin). *Blood* 83: 1244-50.
- Sheu JR, Hung WC, Wu CH, Ma MC, Kan YC, Lin CH, Lin MS, Luk HN, Yen MH. (1999) Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia. *Circulation* 99: 3056-3062.
- Sheu JR, Wu CH, Chen YC, Hsiao G, Lin CH. (2001) Mechanisms in the inhibition of neointimal hyperplasia with triflavin in a rat model of balloon angioplasty. *J. Lab. Clin. Med.* 137: 270-278.
- Sheu JR, Yen MH, Ken YC, Huang WC, Chung PT, Luk HN. (1997a) Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Acta* 1336: 445-454.
- Sheu JR, Yen MH, Huang WC, Lee YM, Su CH, Huang TF. (1997b) Triflavin inhibits platelet-induced vasoconstriction in de-endothelialized aorta. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 17: 3461-3468.
- Simoons ML, de Boer JM, van den Brand MJB, van Miltenburg AJ, Hoorntje JC et al. (1994) Randomized trial of a GP IIb/IIIa platelet receptor blocker in refractory unstable angina. *Circulation* 89: 596-603.
- Tloti MA, Moon DG, Weston LK, Kaplan JE. (1991) Effect of 13-hydroxy octadeca-9, 11-dienoic acid (13- HODE) on thrombin induced platelet adherence to endothelial cells in vitro. *Thromb. Res.* 62: 305-317.
- Yurchenco PD, Schittny JC. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4: 1577-1590.

四、圖形

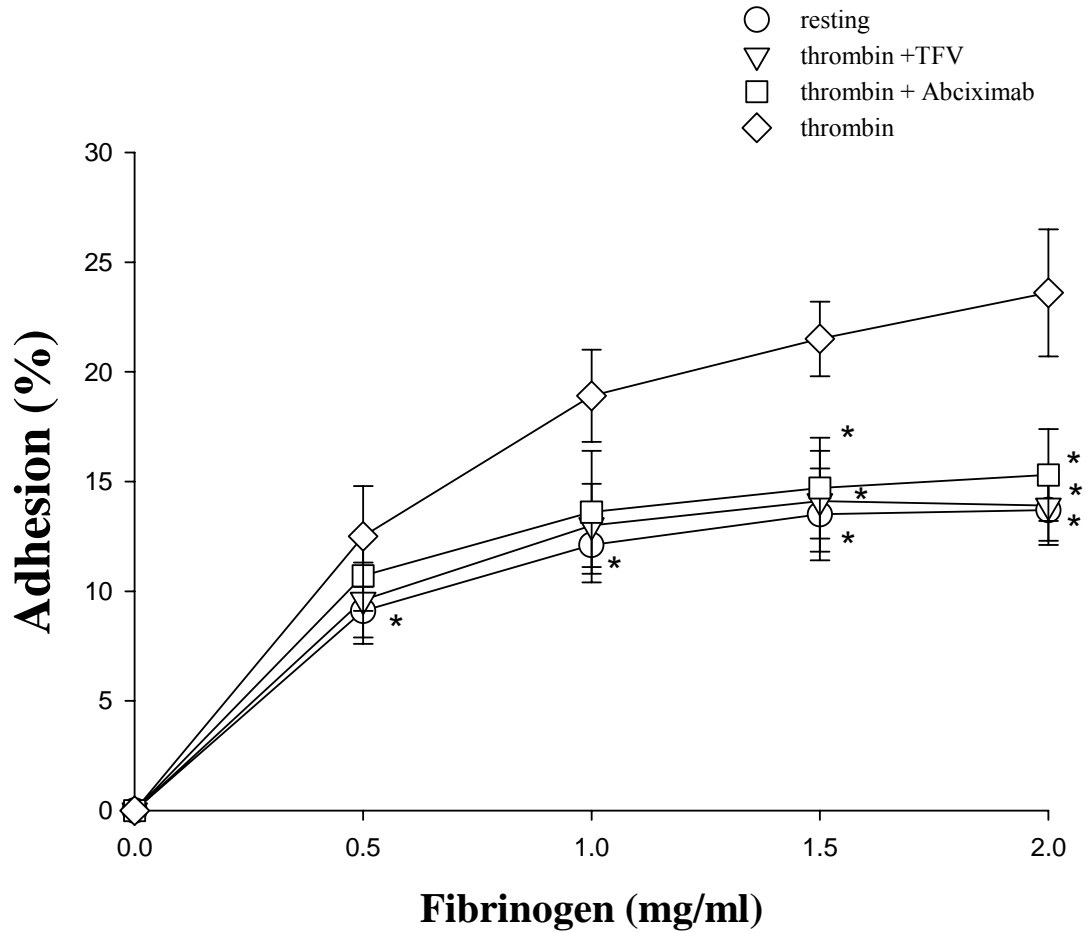


Fig. 1 Concentration-response courses of adhesion of unstimulated and thrombin-stimulated platelets to immobilized fibrinogen. Unstimulated (○) and thrombin (0.5 U/ml)-stimulated platelets (◇) were incubated with various concentrations of immobilized fibrinogen (0.5-2.0 mg/ml) for 60 min in the absence or presence of triflavin (▽; TFV, 10 μg/ml) or Abciximab (□; 20 μg/ml) in microplate wells. Data are presented as means ± S.E.M. (n=4). **P* < 0.05 as compared with the control group (in the absence of thrombin).

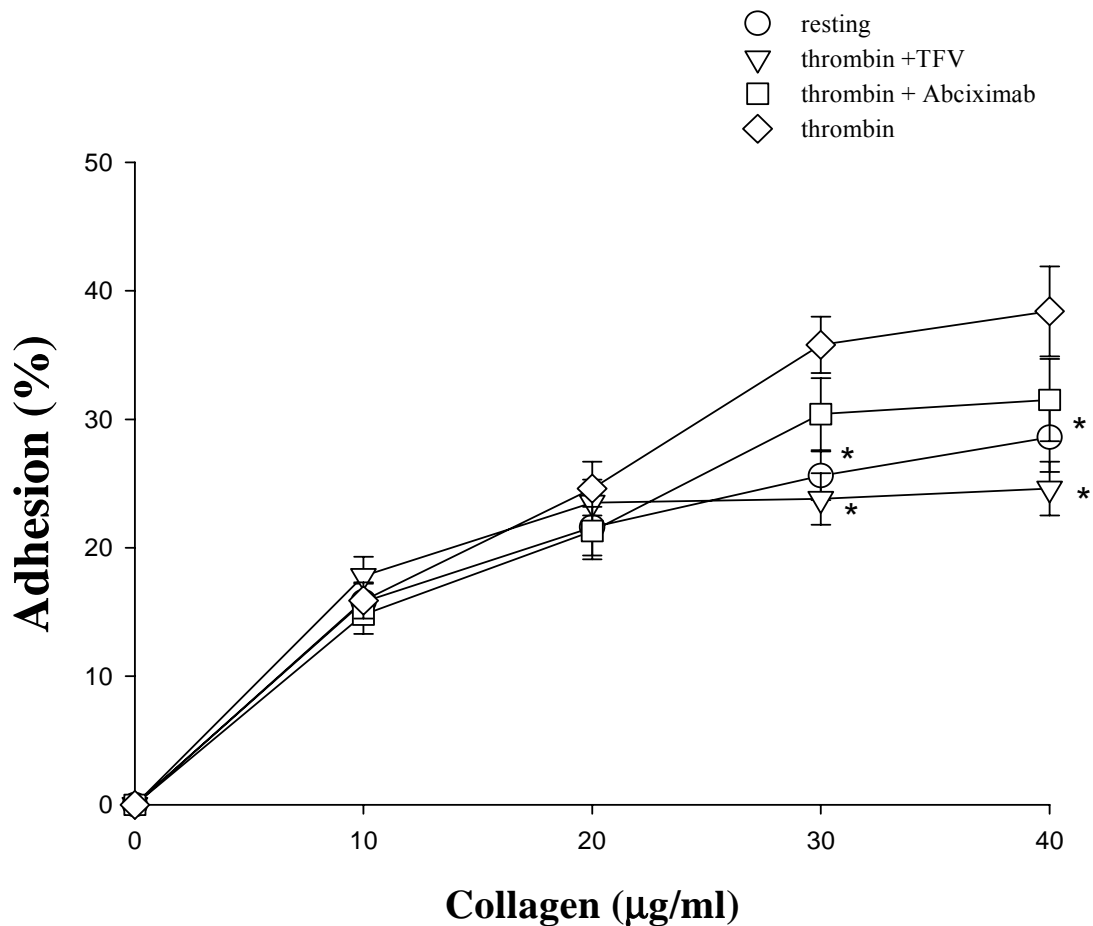


Fig. 2 Concentration-response courses of adhesion of unstimulated and thrombin-stimulated platelets to immobilized collagen type IV. Unstimulated (○) and thrombin (0.5 U/ml)-stimulated platelets (◇) were incubated with various concentrations of immobilized collagen type IV (10-40 µg/ml) for 60 min in the absence or presence of triflavin (▽; TFV, 10 µg/ml) or Abciximab (□; 20 µg/ml) in microplate wells. Data are presented as means ± S.E.M. (n=4). **P* < 0.05 as compared with the control group (in the absence of thrombin).

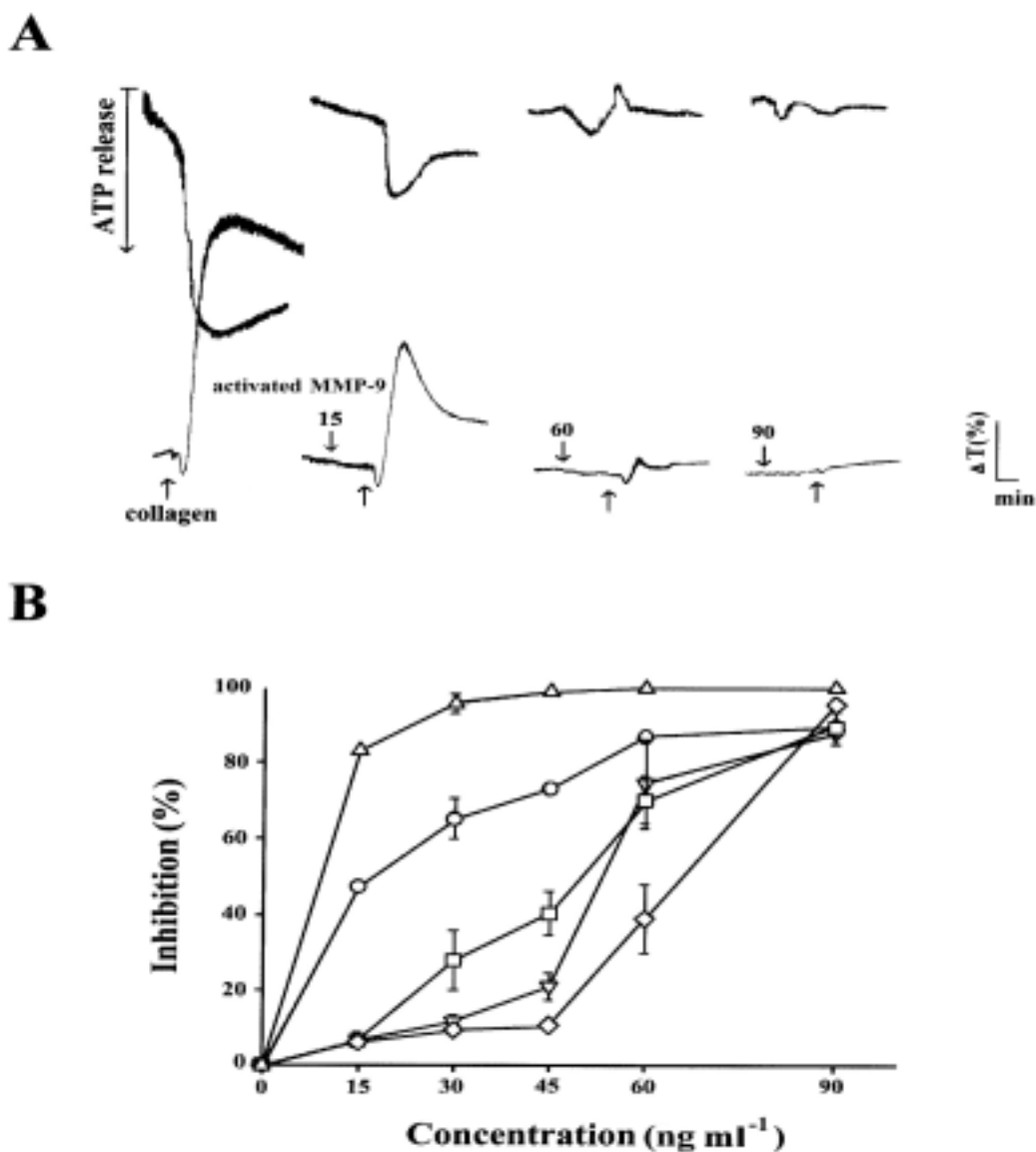


Fig. 3 (A) Tracing curves of activated MMP-9 on collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)-induced aggregation and (B) concentration-inhibition curves of activated MMP-9 on collagen (1 $\mu\text{g/ml}$, \square), thrombin (0.01 U/ml, \square), U46619 (1 μM , \square), ADP (20 μM , \diamond), and arachidonic acid (60 μM , \triangle)-induced platelet aggregation in washed human platelets. Platelets were preincubated with activated MMP-9 (15-90 ng/ml); agonists were then added to trigger aggregation (lower tracings) and ATP release (upper tracings) (A). Data are presented as a percentage of the control (means \pm S.E.M., n = 4).

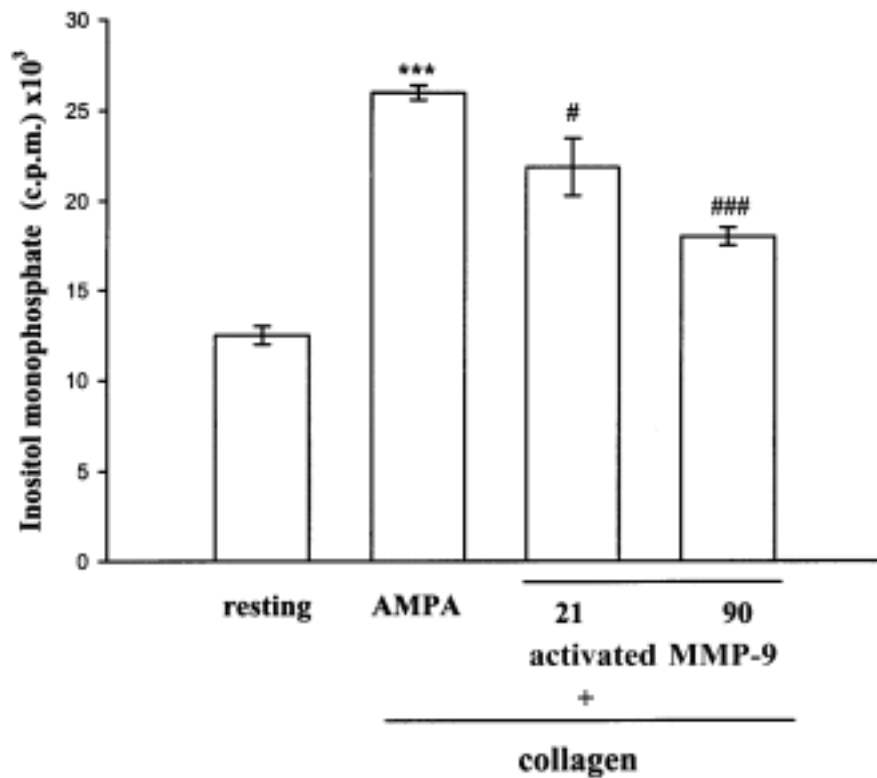


Fig. 4 Effect of activated MMP-9 on collagen-induced inositol monophosphate formation in human platelets. [³H]-Inositol-labeled platelets were preincubated with p-aminophenylmercuric acetate (10 μ M) (AMPA, solvent control) or activated MMP-9 (21 and 90 ng/ml), followed by the addition of collagen (1 μ g/ml) to trigger platelet aggregation. Data are presented as the means \pm S.E.M. (n = 4). *** $P < 0.001$ as compared with the resting group; # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ as compared with the AMPA group.

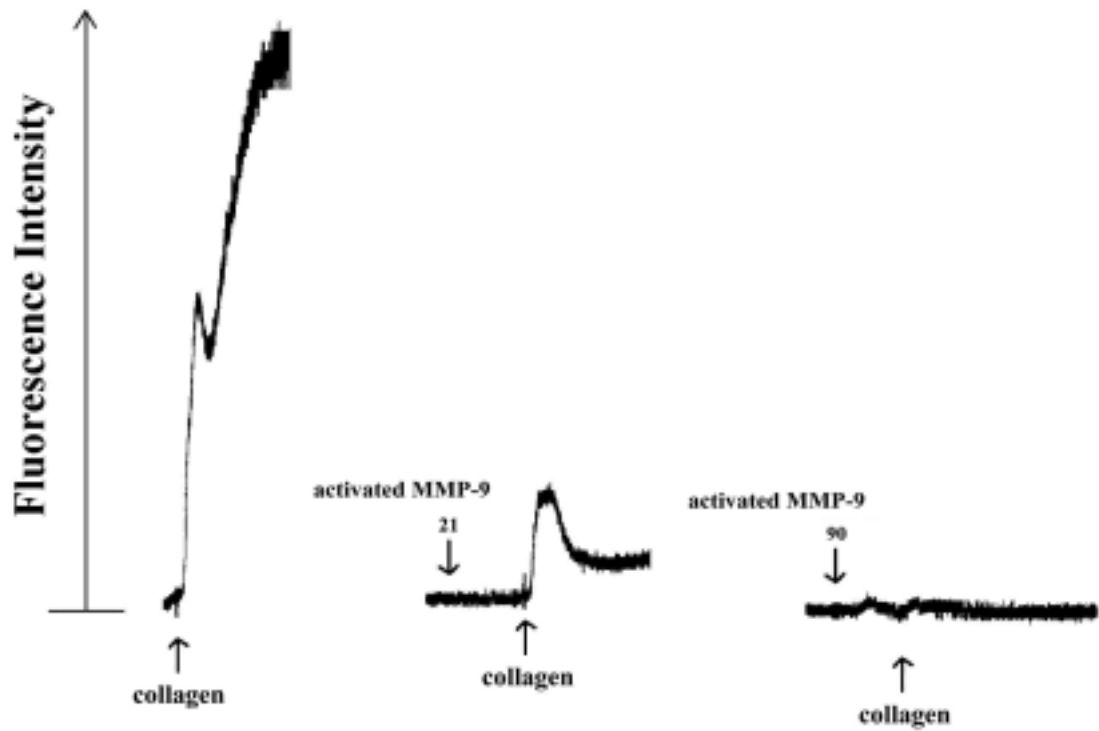


Fig. 5 Effect of activated MMP-9 on collagen-induced intracellular Ca^{+2} mobilization in human platelets. Platelets were preincubated with Fura 2-AM (5 μM) followed by the addition of collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence or presence of activated MMP-9 (21 and 90 ng/ml), which was added 3 min prior to the addition of collagen. Data are presented as the means \pm S.E.M. (n=4). Profiles are representative examples of four similar experiments.

Table 1

Effect of activated MMP-9 on thromboxane B₂, nitrate and cyclic GMP formation in washed human platelets.

	Concentration	Thromboxane B ₂ (ng/ml) n=5	Nitrate (μM) n=6	Cyclic GMP (pmol/ml) n=4
Resting		193.0 ± 11.5	1.2 ± 0.2	5.7 ± 0.2
Collagen (μg/ml)	1	619.0 ± 23.8 ^{***}	4.6 ± 0.4 ^{***}	————
+ Activated MMP-9 (ng/ml)	21	392.8 ± 16.1 ^{###}	————	————
	90	325.3 ± 17.8 ^{###}	————	————
Nitroglycerin (10 μM)	10	————	————	12.6 ± 1.6 ^{**}
Activated MMP-9 (ng/ml)	21	————	5.8 ± 0.8 ^{***}	9.5 ± 0.9 ^{**}
	90	————	6.6 ± 0.5 ^{***}	11.7 ± 0.6 ^{***}

Platelet suspensions were preincubated with activated MMP-9 (21 and 90 ng/ml) for 3 min at 37°C, and then collagen (1 μg/ml) was added to trigger thromboxane B₂ formation. Addition of nitroglycerin into the platelet suspensions served as positive control of cyclic GMP. Data are presented as the means ± S.E.M. (n= number). ^{**} *P* < 0.01 and ^{***} *P* < 0.001 as compared with the resting groups; ^{###} *P* < 0.001 as compared with the collagen group.