

运用微流控技术分析虫草素对剪切诱导血小板聚集和活化的抑制效果

高雪梅, 张天聪, 黄小静, 宦宣容, 李远* (重庆医科大学附属永川医院中心实验室, 重庆 402160)

摘要:目的 分析虫草素对不同非生理性剪切率诱导的血小板聚集和活化的抑制效果。方法 采用软光刻工艺加工聚二甲基硅氧烷-玻璃微通道芯片。收集健康志愿者枸橼酸钠抗凝全血,用钙黄绿素对血小板进行染色标记,并以虫草素体外孵育后,分别以 14.7 和 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流过带有 0.5 mm 长的 80% 狭窄的通道 150 s,同时用荧光显微镜实时拍摄血小板在微通道表面的黏附聚集图像;用 Image J 分析荧光图片,以血小板表面覆盖率作为血小板聚集的量化指标。流式细胞术分析虫草素对血小板钙离子动员,单核细胞-血小板聚集体的抑制效果,并通过凝血检测和溶血实验对虫草素出血风险以及血液相容性做评估。结果 虫草素可抑制剪切诱导的血小板聚集。在 14.7 和 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,血小板聚集均可被虫草素抑制。虫草素抑制血小板钙离子动员和单核细胞-血小板聚集具有剪切力相关性,并且对外源性凝血途径和内源性凝血途径无影响,具有良好血液相容性。结论 虫草素可有效抑制剪切率诱导的血小板聚集,是一种有潜力的抗血小板药物。

关键词: 血小板聚集;微流控技术;壁剪切率;虫草素

doi:10.11669/cpj.2024.06.010 中图分类号:R917;R979.9 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)06-0541-08

Analysis of the Inhibitory Effect of Cordycepin on Shear-Induced Platelet Aggregation and Activation by Microfluidic Technique

GAO Xuemei, ZHANG Tiancong, HUANG Xiaojing, HUAN Xuanrong, LI Yuan* (Central Laboratory, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the inhibitory effect of cordycepin on platelet aggregation and activation induced by different shear rates. **METHODS** Polydimethylsiloxane (PDMS)-glass microchannel chips were fabricated by soft lithography. The whole blood of normal people anticoagulated with sodium citrate was collected and incubated with different concentrations of cordycepin *in vitro*, the blood flowed through the straight microchannel or channel with 80% narrow for 150 seconds at the speed of 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ and 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ respectively. The adhesion and aggregation images of fluorescent labeled platelets on glass surface were photographed with the microscope, and the fluorescent images were analyzed with Image J. The platelet surface coverage percent was used as a quantitative index of platelet aggregation behavior. The effect of cordycepin on platelet calcium mobilization and monocyte-platelet aggregate(MPA) was analyzed by flow cytometry. The risk of cordycepin was assessed through test of blood coagulation. **RESULTS** Cordycepin inhibits platelet aggregation and the inhibition effect is related to the shear rates. At 14.7 and 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, platelet aggregation can be inhibited by cordycepin. Cordycepin inhibits platelet calcium mobilization and MPA effectively. It has no effect on exogenous and endogenous coagulation pathways. **CONCLUSION** Cordycepin can effectively inhibit shear-induced platelet aggregation and is a potential antiplatelet drug.

KEY WORDS: platelet aggregation; microfluidic technology; shear rate; cordycepin

血小板在人体中参与凝血的生理性反应调控^[1-3]。在正常生理条件下,凝血反应启动时,凝血级联途径激活凝血酶,凝血酶不仅可以使纤维蛋白原变成纤维蛋白单体,还可与血小板表面凝血酶受体结合,激活血小板。纤维蛋白单体形成纤维蛋白网,网络附近的血小板等血细胞进一步形成血栓。血小板被激活后,血小板内钙池可释放出大量钙离子^[4-5],参与血小板的活化过程,激

活的血小板还可分泌二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)和血栓素 A2(thromboxane A2, TXA2)等凝血因子激活附近其他血小板,最终通过血小板的 GP II b/III a 受体和纤维蛋白原结合发生最终的聚集^[6-8]。活化的血小板表面表达的 P-选择素可与单核细胞上受体 P-选择素糖蛋白配体-1 结合,形成单核细胞-血小板聚合体(MPA),促使炎症的发生^[9]。

基金项目:重庆市科卫联合医学科研项目中青年高端人才项目资助(2023GDRC008);重庆医科大学附属永川医院研究生创新基金项目资助(YJSCX202204)

作者简介:高雪梅,女,硕士研究生 研究方向:运用微流控技术分析抗血小板药物活性 * **通讯作者:**李远,男,硕士,研究员 研究方向:基于微流控芯片技术的临床检验诊断新技术与新方法研究 Tel:18983022607

剪切是体内激活血小板的重要因素。在正常生理条件下,静脉中壁剪切率低于 $500 \cdot \text{s}^{-1}$,大动脉剪切率约 $1\ 000 \cdot \text{s}^{-1}$ [10]。在病理性条件下,如动脉粥样硬化造成血栓或血管内植入医疗器械时,血管内出现非生理性狭窄,血流状态出现紊乱,血流剪切率会出现急剧升高接着再急剧降低的情况,狭窄处会形成瞬时升高的病理性高剪切率。此时的非生理性剪切会诱导血小板活化,使血管内出现病理性血小板聚集[11-13]。预防非生理性剪切诱导的血小板聚集对预防血栓的形成具有重要意义。

虫草素是蛹虫草的主要成分[14]。研究表明,蛹虫草中含有虫草素、虫草多糖、虫草酸、麦角固醇,还有丰富的人体必需氨基酸、微量元素等多种生物活性物质,其中虫草素,又名 3'-脱氧腺苷,是蛹虫草中特有的活性成分[15]。虫草素在抗肿瘤、抗白血病和免疫调节方面有较多研究,它还具有抗炎和降血脂等心血管保护作用。虫草素可降低胶原和 ADP 诱导的人类血小板聚集[16-18],但现有的研究进展仅在静态条件下以血小板激动剂激活血小板,缺乏对流动状态影响血小板活性的考虑[19],即目前还没有虫草素对剪切率诱导血小板聚集的抑制效果研究。明确虫草素对剪切力诱导血小板聚集的抑制作用对临床上治疗心血管疾病研发新型抗血小板药物及探索新的治疗方案具有一定价值。

微流控技术是一项可以体外模拟血液流变的技术,不仅可以还原血液流动环境,还可以提供实验过程中所需的不同剪切率条件[20-22]。在微流控通道中,血小板可通过表面受体与相应蛋白配体结合黏附到通道底部,而其他血液内活细胞不会黏附到底部,所以可通过荧光标记全血活细胞以分析血小板黏附行为[23]。本课题组前期建立的微流控技术芯片模型和其他组的微流控实验中使用的芯片相比,通道底面为洁净裸玻璃,玻璃上无胶原等黏附蛋白的修饰;玻璃对于血液而言是一种外源性植入材料,可直接吸附血浆中的蛋白(纤维蛋白原、血管性血友病因子等)以介导血小板的黏附聚集,减小由于蛋白包被不均等带来的结果误差,并且由于不同剪切下介导血小板聚集的主要蛋白不同,未包被的通道底部体现了不同剪切下相应蛋白黏附而介导的血小板聚集。本实验在不同的剪切率条件下分析了虫草素对血小板聚集和活化的抑制效果研究,通过观察流动条件下虫草素对血小板黏附聚集的抑制效果,为临床中虫草素的相关用量提供更多参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

虫草素($\geq 98\%$,上海源叶生物科技有限公司);Calcein-A M 荧光染料、anti-hu CD61、anti-hu CD41a、anti-hu CD14(美国 Intivrogen 公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、红细胞裂解液(美国 BD pharmingen 公司);Sylgard 184 聚二甲基硅氧烷(美国 Dow Corning 公司);HQ-6100 感光干膜(长兴化工材料有限公司);3.2% 枸橼酸钠静脉血液真空采集管(山东威高集团有限公司)。

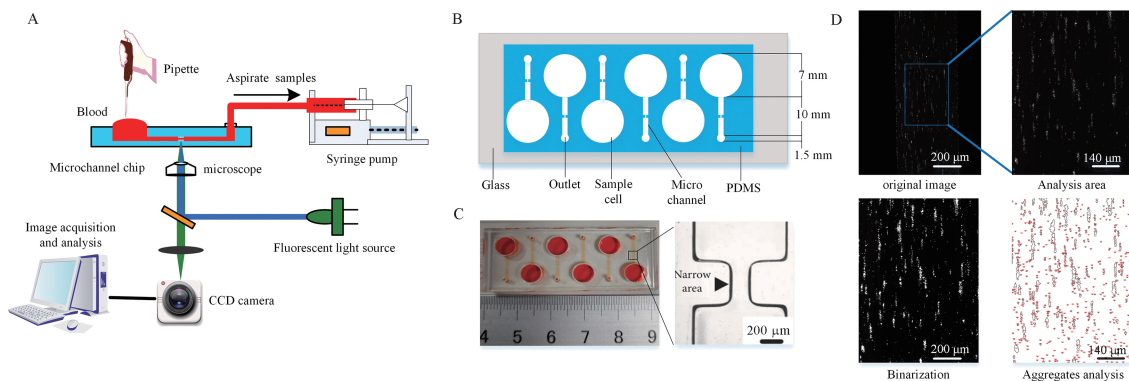
紫外曝光灯(实验室自制);FM-360 覆膜机(杭州新彩科技有限公司);PDG-32G-2 等离子清洗机(德国 Harrick 公司);1390 喷墨打印机[爱普生(中国)有限公司];RSP01-CS 双向推拉型精密注射泵(嘉善瑞创电子科技有限公司);IX71 倒置荧光显微镜(日本奥林巴公司斯);单色制冷相机(加拿大 Qicam 公司);Streampix 视频录制软件(加拿大 Norpix 公司)。

1.2 方法

1.2.1 微流控芯片模型制备 分析血小板黏附聚集的微流控芯片由微通道和两侧的样品池及出口组成,其中通道高 $70 \mu\text{m}$,宽 1 mm ,长 10 mm ,样品池直径 7 mm ,出口直径 1.5 mm ,80% 狭窄模型的狭窄位于通道中央,长度为 0.5 mm ,狭窄处宽 $200 \mu\text{m}$ 。将聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)基质和固化剂混合而成的预聚物浇铸在芯片阳模上,抽真空除气泡后进行加热固化。利用平头打孔器打孔形成样品池和出口,氧等离子清洗机处理后与清洗干净的载玻片进行不可逆键合,形成 PDMS-玻璃微流控芯片。该简易微流控装置中剪切率及所对应的出口体积流量由 solidworks 软件进行流体仿真得到。

1.2.2 血液样品采集及处理 采用 12 名健康人全血,健康志愿者由重庆市血液中心永川分中心招募。纳入标准为志愿者自述 1 个月内无服药史、手术史和酗酒史,血小板数量、红细胞比容、凝血功能均在正常参考值区间。本研究经重庆医科大学附属永川医院伦理委员会批准,采血前志愿者和患者均签署知情同意。采集的血液样本用质量分数 3.2% 枸橼酸钠抗凝管保存。

1.2.3 微流控技术观察动态血小板聚集 检测设备及分析过程见图 1~2。以 14.7 和 $50 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 抽吸狭窄通道中荧光标记血样(即模拟非生理性狭窄血管剪切率 $1\ 000 \cdot \text{s}^{-1}$ 和 $5\ 000 \cdot \text{s}^{-1}$),仿真结果见图 2。同时用高速摄像机拍照记录血小板的黏附聚集情况。用 Image J 分析血小板表面覆盖率。

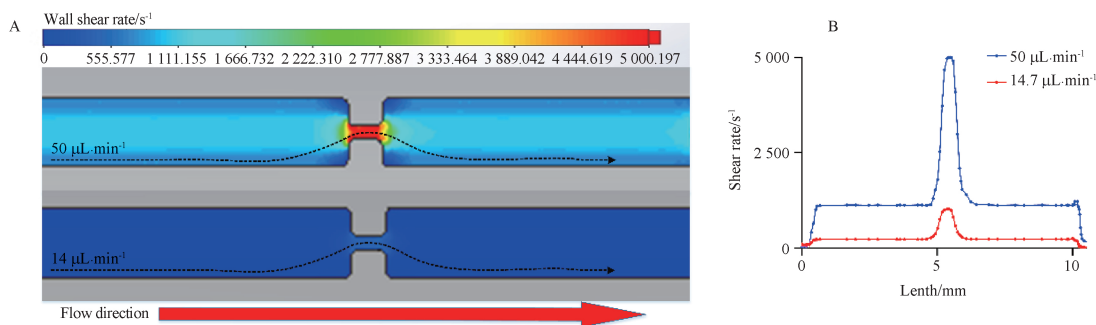


A - 微流控芯片技术平台示意图; B - 实验所用微流控芯片示意图; C - 芯片实物图; D - 数据分析流程; 白色团簇为血小板体。

A - the schematic diagram of the microfluidic chip; B - the schematic diagram of the microfluidic chip used in the experiment; C - the physical image of the chip; D - the data analysis process; The white clusters in the diagram are platelet bodies.

图1 微流控技术平台

Fig. 1 Microfluidic technology platform



A - 芯片底部沿壁的剪切率仿真热图; B - 各出口体积流量所对应的剪切率大小分布曲线图。

A - Simulation heat map of shear rate along the wall at the bottom of the chip; B - Distribution curve of shear rate corresponding to the volume flow rate at each outlet.

图2 微流控芯片流体力学仿真

Fig. 2 Fluid dynamics simulation of microfluidic chip

1.2.4 剪切诱导血小板聚集观察 将枸橼酸钠抗凝全血与钙黄绿素以 500:1 的体积比混合(钙黄绿素终浓度为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。随后将血液样本均分为 2 管,每管 $200 \mu\text{L}$ 。1 管作为实验组(虫草素浓度为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),另一管作为阳性对照组(加虫草素等体积生理盐水)。实验组和阳性对照组同时进行 37°C 孵育 30 min。将通道用 3% 牛血清白蛋白(BSA)进行封闭处理后用 PBS 润洗以用于剪切收集血样。剪切收集的血样做瑞氏涂片染色。阴性组不做任何处理直接进行瑞氏涂片染色。

1.2.5 钙离子释放检测 向枸橼酸钠抗凝全血加入终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fluo-4AM 和 CD61 荧光抗体避光孵育 15 min 后将其分为阴性对照组(加等体积生理盐水),阳性对照组(加等体积生理盐水)和实验组(虫草素浓度为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),各组在 37°C 下孵育 30 min。将通道用 3% BSA 进行封闭处理后用牛血清白蛋白 PBS 润洗以用于剪切收集血样。阴性对照组直接流式采集分析 Fluo-4AM 荧光

强度,阳性对照组和实验组上机采集数据 1 min 后,经剪切收集后流式上机采集 9 min。用 CytExpert 软件记录时长共 10 min,并进行血小板的 Fluo-4AM 荧光强度分析。分析方法参照 Mar 等^[24]实验。

1.2.6 单核细胞-血小板聚合体检测 单核细胞-血小板聚合体流式检测方法参考 Gremmel 等^[25]实验:枸橼酸钠抗凝全血分装为 2 管,各 $200 \mu\text{L}$ 。1 管作为实验组(虫草素浓度为 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),另一管作为实验阳性对照组(加虫草素等体积生理盐水)。将通道用 3% BSA 进行封闭处理后用 PBS 润洗以用于剪切收集血样。向每管中加入 CD41 和 CD14 荧光抗体常温避光孵育 15 min 后剪切收集,用 1 mL 1% 多聚甲醛固定 20 min 后再用 $1 \times$ 红细胞裂解液裂解红细胞 10 min, 450g 离心 5 min 后去上清,用 $200 \mu\text{L}$ 生理盐水重悬底部沉底。流式细胞仪上机记录 10 000 个细胞,分析单核细胞-血小板聚合体的百分比。

1.2.7 虫草素溶血实验 枸橼酸钠抗凝全血

200 g离心 5 min 后吸取底部红细胞 200 μL ,生理盐水洗涤 1 次后用生理盐水重悬。将 1 mL 药物与 20 μL 红细胞混匀震荡孵育后 200 g 离心 5 min,吸取上清液 200 μL 加入 96 孔板中进行吸光度检测,每个样本做 3 个复孔取均值计算。阳性对照组用 1 mL 双蒸水与 20 μL 红细胞混匀,阴性对照组用 1 mL 生理盐水与 20 μL 红细胞混匀。溶血率的计算见公式 1。其中 OD_i 代表实验组光密度, OD_n 代表阳性对照组光密度, OD_p 代表阴性对照组光密度。

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{(\text{OD}_i - \text{OD}_n)}{(\text{OD}_p - \text{OD}_n)} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

1.2.8 凝血项目检测 将枸橼酸钠抗凝全血 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清,分为实验组(虫草素浓度为 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和对照组(加等体积生理盐水),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min 后用血凝仪进行上机检测。检测指标为凝血酶原时间(prothrombin time, PT)和活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)。

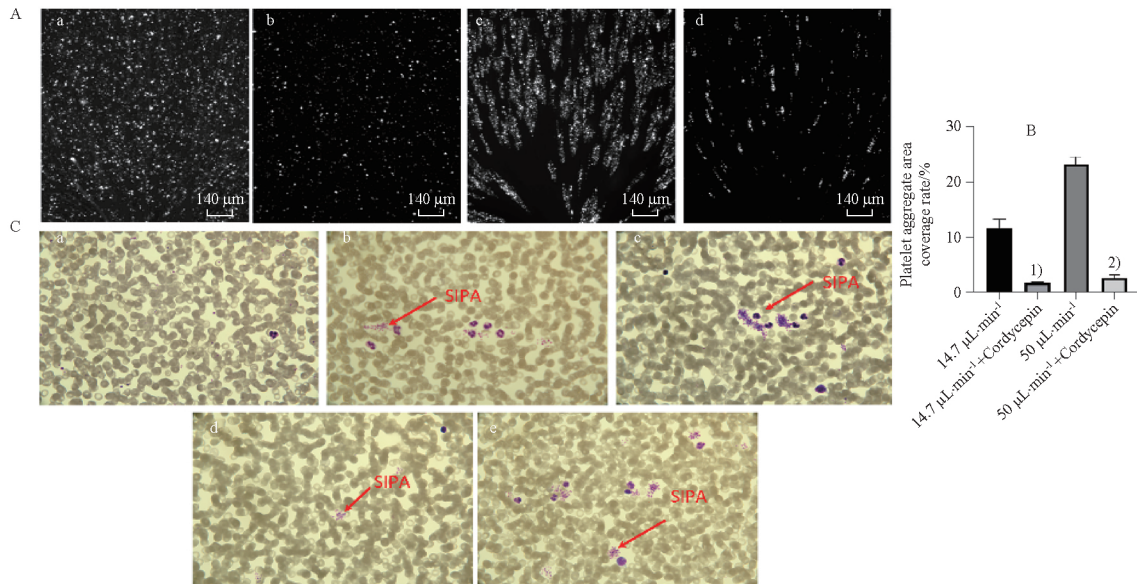
1.3 统计学分析

所有计量资料用平均值 \pm 标准差表示,统计分析采用 Graph pad 软件,多组间均值比较采用单因素重测方差分析(ANOVA),采用 Tukey 检验进行两两均值比较;两组均值比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板聚集情况和虫草素抑制血小板聚集效果

以血小板表面覆盖率参数分析血小板在不同剪切率条件下的黏附聚集情况。在 1 000 $\cdot \text{s}^{-1}$ 低剪切率时(14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$),血小板以分散点状聚集;在 5 000 $\cdot \text{s}^{-1}$ 高剪切率下(50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$),血小板聚集沿流线方向呈头大尾小的条索状,并且条索状面积随着剪切率增加而增大,聚集体个数随剪切率增加而减少。瑞氏染色结果可见随剪切率增大,血小板聚集体增大。通过药物组与对照组的比较,发现虫草素对剪切诱导血小板聚集有明显抑制作用(图 3)。



A - 微流控下第 150 秒时的荧光成像图,其中白色点状为血小板聚集体: a - 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组; b - 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下虫草素实验组; c - 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组; d - 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的虫草素实验组; B - 图 3A 中各组血小板表面覆盖率的统计直方图。与 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 阳性对照组相比, $^1)P < 0.01$; 与 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组相比, $^2)P < 0.001$; C - 剪切后血小板聚集瑞氏染色($\times 100$): a - 静息状态的血小板,阴性对照; b - 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组; c - 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下虫草素实验组; d - 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组; e - 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的虫草素实验组; SIPA - 剪切力诱导的血小板聚集体。A - the fluorescence imaging image at the 150th second under microfluidic control, with white dots representing platelet aggregates: a - the positive control group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; b - cordycepin group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; c - the positive control group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; d - cordycepin group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; B - the statistical histogram of platelet surface coverage in each group in Figure 3A. Compared with the positive control group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, $^1)P < 0.01$; Compared with the positive control group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, $^2)P < 0.001$; C - the aggregation of platelets after shearing by Wright's staining ($\times 100$): a - untreated platelets, as a negative control; b - positive control group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; c - cordycepin group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; d - positive control group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; e - cordycepin group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; SIPA - shear-induced platelet aggregation.

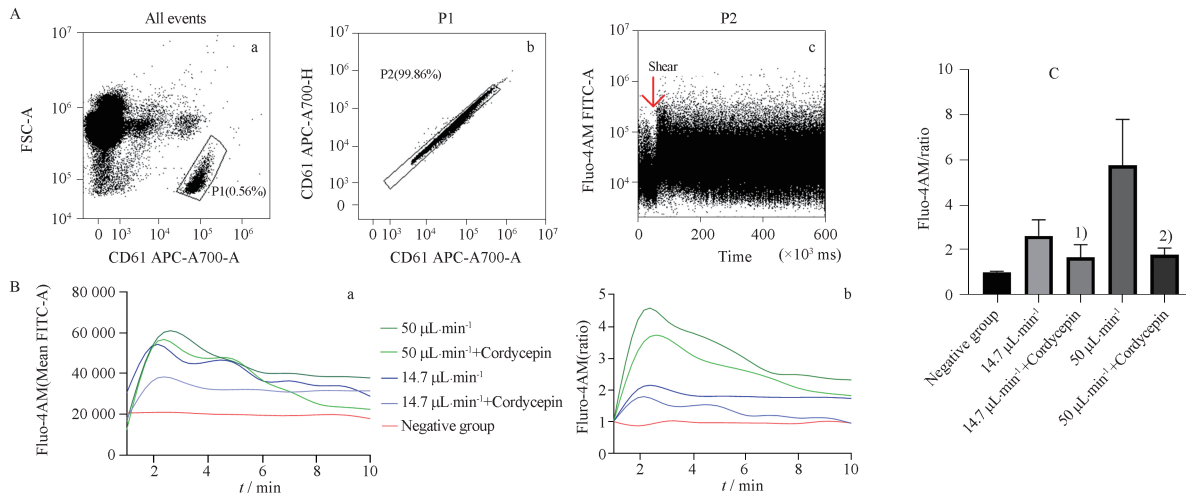
图 3 剪切力诱导血小板聚集的荧光图像和瑞氏染色涂片. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig 3 Fluorescence image and Wright's staining smear of shear induced platelet aggregation. $n = 5, \bar{x} \pm s$

2.2 钙离子释放检测结果

选择记录了10个时间窗口的血小板钙离子平均荧光强度。以ADP激活组作为阳性对照组,可见剪切力激活血小板钙池内钙离子的释放,而这也是血小板后续发生活化的基础(图4A)。实验

组分别代表在 14.7 和 $50\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的入口体积流量下的钙离子平均荧光强度。在各剪切力条件下,血小板钙池的钙离子释放随剪切力的增加而增加,虫草素有效地抑制剪切诱导的血小板钙释放(图4B)。



A - 钙离子流式检测圈门策略代表图: a - 流式细胞仪上样 CD61-FSC 所有事件, P1 门圈出目标细胞群体血小板; b - 去黏体, P2 门圈出单个血小板的群体; c - 血小板的时间-Fluo-4AM 平均荧光强度图; B - 钙离子平均荧光强度分析图: a - Fluo-4AM 平均荧光强度与时间的点图, 其中提取了10个时间窗口, 以记录 Fluo-4 的平均荧光强度变化; b - Fluo-4 荧光演变的归一化图, 表示为剪切后每个时间点的荧光强度与基线荧光的比率; C - 图4B中b图所对应的各组比率的比较直方图。与 $14.7\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 下阳性对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$; 与 $50\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组相比,²⁾ $P < 0.001$ 。

A - calcium ion flow detection loop gate strategy: a - for all events of CD61-FSC on flow cytometry, circle the target cell population platelets in the P1 gate; b - to remove adhesions, P2 gate circles the population of individual platelets; c - the time-Fluo-4AM average fluorescence intensity plot of platelets; B - analysis of the average fluorescence intensity of calcium ions: a - a plot of the average fluorescence intensity and time of Fluo-4AM, in which 10 time windows were extracted to record the changes in the average fluorescence intensity of Fluo-4; b - a normalized graph representing the fluorescence evolution of Fluo-4, represented as the ratio of fluorescence intensity to baseline fluorescence at each time point after shearing; C - the comparison histogram of the ratios of each group corresponding to Fig b in Figure 4B. Compared with the positive control group at $14.7\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the positive control group at $50\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

图4 剪切激活的血小板钙离子时间-荧光流式散点图像与分析统计图。 $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Shear-induced platelet calcium mobilization time-fluorescence flow scatter image and analysis statistical diagram. $n = 5, \bar{x} \pm s$

2.3 单核细胞-血小板聚集体

通过在单核细胞群中找到结合血小板的群体可直观地分析单核细胞-血小板聚合体的情况。剪切可有效激活血小板,形成单核细胞-血小板聚集体。剪切率越大,单核细胞-血小板聚集体越多,即血小板的活化程度越大,并且虫草素可有效抑制单核细胞-血小板聚合体的形成,见图5。

2.4 虫草素溶血分析检测

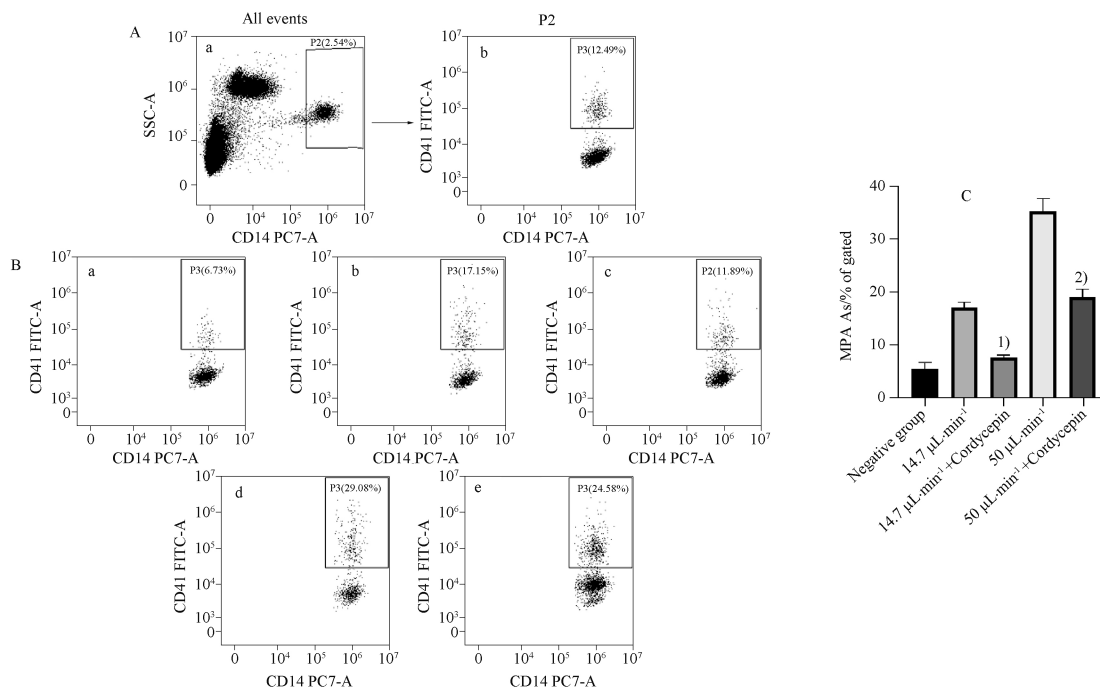
药物使用过程中,应避免对人体产生损伤。通过对药物是否会造成溶血进行分析,可判断药物的血液相容性,良好的血液相容性是药物投入临床使用的基础。通过观察浓度梯度的虫草素溶血实验结果可以发现虫草素不会导致严重的溶血反应,这保证了虫草素作为药物使用时的安全,见表1。溶血率低于5%即符合医用要求,不会导致严重的溶血反应。

2.5 凝血项检测结果

PT和APTT评估虫草素对凝血的抑制作用,这分别反映了外部和内部途径的凝血功能。虫草素显著抑制了剪切应力诱导的血小板聚集但不抑制PT和APTT(表2),表明虫草素抑制剪切应力导致的小板聚集,但不影响凝血系统功能。

3 讨论

心血管疾病是人类主要死亡原因之一,血小板功能紊乱可诱发凝血系统障碍并进一步诱导心血管疾病的发生^[26]。有效防止血小板的非生理性活化聚集将有利于预防心血管疾病的发生。目前临床上常使用阿司匹林、氯吡格雷等抗血小板药物治疗凝血,预防血栓形成^[27-29],但仍会存在有出血的风险,抗血小板治疗方案需要进一步完善。对于现有药物的改进、新药的开



A - 单核细胞-血小板结合的流式检测圈门策略: a - CD14-SSA 所有细胞事件, P2 圈出单核细胞群体, b - P3 圈出单核细胞中与血小板结合的占比; B - 各组流式图代表图: a - 静息状态的血小板, 阴性对照; b - 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组; c - 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下虫草素实验组; d - 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组; e - 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的虫草素实验组; C - 图 B 中各组聚集百分比结果值的统计直方图; 与 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下阳性对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 下的阳性对照组相比, ²⁾ $P < 0.001$ 。

A - gate strategy for flow cytometry detection of monocyte platelet binding: a - CD14-SSA all cell events, P2 gate circled monocyte population; b - circle the the proportion of monocytes bound to platelets in the P3 gate; B - representative flow charts for each group: a - represents untreated platelets, as a negative control; b - positive control group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; c - cordycepin group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; d - positive control group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; e - cordycepin group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$; C - statistical histograms of the percentage results of each group of aggregates in Figure; Compared with the positive control group at 14.7 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, ¹⁾ $P < 0.05$; Compared with the positive control group at 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, ²⁾ $P < 0.001$.

图 5 剪切诱导的血小板-单核细胞聚合体流式散点结果图. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 Flow scatter plot of shear induced platelet-monocyte polymer. $n = 5, \bar{x} \pm s$

表 1 虫草素对红细胞破坏的溶血值检测结果. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Results of hemolysis value of cordycepin on erythrocyte destruction. $n = 5, \bar{x} \pm s$

Cordycepin/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Hemolysis rate/%
50	0.12 \pm 0.02
100	0.19 \pm 0.07
200	0.49 \pm 0.01
400	0.79 \pm 0.13

表 2 虫草素对凝血项的影响结果分析. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Results of the effect of cordycepin on coagulation. $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	c/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PT/s	APTT/s
Control	0	11.55 \pm 0.78	30.20 \pm 0.28
Cordycepin	400	11.40 \pm 0.85 ^{ns}	30.10 \pm 0.42 ^{ns}
t value	-	0.18	0.28
P value	-	0.87	0.99

注: ns - 无统计学意义。

Note: ns - no statistical significance.

针对剪切诱导血小板聚集通路的抑制是一探讨的热点。非生理性剪切可促使血小板发生活化聚集,例如在植入医疗器械的血管内,会形成非生理性狭窄,血小板在局部会经历一段剪切力瞬时升高又瞬时降低的过程^[30-31]。在该剪切过程中,血管性血友病因子(von willebrand factor, vWF)会被拉伸延长并暴露出与血小板结合的位点 A2, A2 可与血小板膜蛋白 GP I b 结合促使血小板发生活化黏附,并最终激活血小板膜蛋白 GP II b/III a,活化的 GP II b/III a 可与纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)结合,介导血小板的不可逆聚集,最后形成血栓^[32-34]。针对非生理性剪切诱导的血小板聚集通路进行抗血小板药物的研发,可以有效预防体内血栓的形成。

随着微流控技术的发展,使得体外模拟血管流场环境成为一种可行的方法。在微流控芯片中,不仅可以通过控制出口体积流量以达到实验所需的高剪切条件,还可模拟还原血细胞流经血管时的动态

过程,如红细胞碰撞使得血小板沿壁流动^[35-37]。除此之外,本实验所使用的微流控芯片底部为洁净的裸玻璃,不仅减少了由于蛋白包被不均所带来的实验误差,而且还还原了医源植入性材料对血小板黏附聚集的吸附效应^[38-41]。在玻璃表面,血液中的蛋白如 Fg、vWF 等会吸附到玻璃上,提供血小板黏附聚集的结合位点。血小板在玻璃表面的聚集与流体剪切力相关,血小板沿流线形成聚集体,剪切力越大,血小板聚集程度越强;血小板单个聚集体体积随剪切力增加而增大。

虫草属真菌是一种用于治疗炎症和癌症的药物。据研究报道,虫草素是蛹虫草的一种主要成分,可以降低胶原诱导的人血小板中 $[Ca^{2+}]_i$ 水平和 TXA_2 的产生,有体外抗血栓形成的作用。在此基础上可继续进一步验证虫草素的抗血小板活性以及对其抑制效果的影响因素探究。本研究发现,虫草素对非生理性剪切诱导的血小板聚集和活化有明显的抑制作用,实验检测了 PT 和 APTT 指标,发现高浓度的虫草素并不会对凝血途径造成影响,虫草素的使用不会带来出血风险,并且不会造成溶血。表明虫草素值得在临床上进一步探究,是一种有潜力的抗血小板药物。

REFERENCES

- [1] RUBENSTEIN D A, YIN W. Platelet-activation mechanisms and vascular remodeling [J]. *Compr Physiol*, 2018, 8(3):1117-1156.
- [2] van der MEIJDEN P E J, HEEMSKERK J W M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(3):166-179.
- [3] KHODADI E. Platelet function in cardiovascular disease: activation of molecules and activation by molecules [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(1):1-10.
- [4] NESBITT W S, KULKARNI S, GIULIANO S, et al. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(4):2965-2972.
- [5] CUI Q, ZHAO Z, GAO T, et al. Effects of glycosaminoglycan from *urechis uncinatus* on ADP-induced platelet calcium and membrane glycoprotein expressions in rats [J]. *Acta Haematol*, 2021, 144(1):44-47.
- [6] GREMMEL T, FRELINGER A L, MICHELSON A D. Platelet physiology [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2016, 42(3):191-204.
- [7] FRANCO A T, CORKEN A, WARE J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer [J]. *Blood*, 2015, 126(5):582-588.
- [8] AU A E, JOSEFSSON E C. Regulation of platelet membrane protein shedding in health and disease [J]. *Platelets*, 2017, 28(4):342-353.
- [9] FU G, DENG M, NEAL M D, et al. Platelet-monocyte aggregates; understanding mechanisms and functions in sepsis [J]. *Shock*, 2021, 55(2):156-166.
- [10] STOKHOLM R, OYRE S, RINGGAARD S, et al. Determination of wall shear rate in the human carotid artery by magnetic resonance techniques [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2000, 20(5):427-433.
- [11] KIM D A, ASHWORTH K J, DI PAOLA J, et al. Platelet alpha-granules are required for occlusive high-shear-rate thrombosis [J]. *Blood Adv*, 2020, 4(14):3258-3267.
- [12] CASA L D C, KU D N. Thrombus formation at high shear rates [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 415-433.
- [13] BARK D L Jr, KU D N. Wall shear over high degree stenoses pertinent to atherothrombosis [J]. *J Biomech*, 2010, 43(15):2970-2977.
- [14] LI Y L, LIN Z J, ZHANG B, et al. The total arsenic and arsenic speciation in *Cordyceps* [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2023, 58(5):391-395.
- [15] LIN HUIRONG Z P. Research progress of cordycepin on prevention and treatment of age-related cardiovascular diseases [J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med (心血管康复医学杂志)*, 2021, 30(6):704-707.
- [16] KWON H W, SHIN J H, LIM D H, et al. Antiplatelet and antithrombotic effects of cordycepin-enriched WIB-801CE from *Cordyceps militaris* ex vivo, in vivo, and in vitro [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1):508. DOI: 10.1186/s12906-016-1463-8.
- [17] LEE D H, KIM H H, CHO H J, et al. Cordycepin-enriched WIB801C from *Cordyceps militaris* inhibits collagen-induced $[Ca^{2+}]_i$ mobilization via cAMP-dependent phosphorylation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in human platelets [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 22(3):223-231.
- [18] LEE D H, KIM H H, LIM D H, et al. Effect of cordycepin-enriched WIB801C from *Cordyceps militaris* suppressing fibrinogen binding to glycoprotein IIb/IIIa [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2015, 23(1):60-70.
- [19] BARK D L, J R., PARA A N, KU D N. Correlation of thrombosis growth rate to pathological wall shear rate during platelet accumulation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(10):2642-2650.
- [20] CHEN J, DING L, HE C, et al. Dynamic analysis of the inhibitory effects of aspirin and clopidogrel on platelet adhesion and aggregation for healthy people under physiological flow conditions by microfluidic chip technology [J]. *Acta Acad Med Sin (中国医学科学院学报)*, 2018, 40(3):299-307.
- [21] LI Y, DING R, DENG S R, et al. A simple microfluidic technology for assaying platelet adhesion and aggregation under physiological flow [J]. *Mil Med Sci (军事医学)*, 2017, 41(7):586-593.
- [22] IWANAGA T, MIURA N, BRAINARD B M, et al. A novel microchip flow chamber (total thrombus analysis system) to assess canine hemostasis [J]. *Front Vet Sci*, 2020, 7:307. DOI: 10.3389/fvets.2020.00307.
- [23] ZHANG T C, CHEN D, LIAO J, et al. Platelet aggregation on glass surface under physiological flow conditions [J]. *J Med Biomech (医用生物力学)*, 2022, 37(3):425-432.
- [24] FELIPO-BENAVENT M, MARTÍNEZ-ROMERO A, RUBIO-GUERRI C, et al. Flow cytometric kinetic assay of calcium mobilization in whole blood platelets of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)

- [J]. *Cytom A*, 2023,103(4):347-352.
- [25] GREMMEL T, AY C, RIEDL J, *et al.* Platelet-specific markers are associated with monocyte-platelet aggregate formation and thrombin generation potential in advanced atherosclerosis [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 115(3):615-621.
- [26] SANG Y, ROEST M, de LAAT B, *et al.* Interplay between platelets and coagulation [J]. *Blood Rev*, 2021, 46: 100733. DOI: 10.1016/j.blre.2020.100733.
- [27] SONG L, XUE M, WANG W T, *et al.* Research progress of platelet adhesion and drug intervention [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*(中国中西医结合杂志), 2022, 42(3):379-384.
- [28] CHAUDHARY P K, KIM S, KIM S. An insight into recent advances on platelet function in health and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(11):6022. DOI: 10.3390/ijms23116022.
- [29] YEUNG J, LI W, HOLINSTAT M. Platelet signaling and disease; targeted therapy for thrombosis and other related diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(3):526-548.
- [30] WANG S, GRIFFITH B P, WU Z J. Device-induced hemostatic disorders in mechanically assisted circulation [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2021, 27:1076029620982374. DOI: 10.1177/1076029620982374.
- [31] CHEN Z, ZHANG J, LI T, *et al.* The impact of shear stress on device-induced platelet hemostatic dysfunction relevant to thrombosis and bleeding in mechanically assisted circulation [J]. *Artif Organs*, 2020, 44(5):E201-E213.
- [32] GRANDE GUTIÉRREZ N, SHANKAR K N, SINNO T, *et al.* Thrombosis and hemodynamics; external and intrathrombus gradients [J]. *Curr Opin Biomed Eng*, 2021, 19:100316. DOI: 10.1016/j.cobme.2021.100316.
- [33] RANA A, WESTEIN E, NIEGO B, *et al.* Shear-dependent platelet aggregation; mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2019, 6: 141. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00141.
- [34] PROVENZALE I, BROUNS S L N, van der MEIJDEN P E J, *et al.* Whole blood based multiparameter assessment of thrombus formation in standard microfluidic devices to proxy *in vivo* haemostasis and thrombosis [J]. *Micromachines (Basel)*, 2019, 10(11):787. DOI: 10.3390/mi10110787.
- [35] CHAN C H H, SIMMONDS M J, FRASER K H, *et al.* Discrete responses of erythrocytes, platelets, and von Willebrand factor to shear [J]. *J Biomech*, 2022, 130: 110898. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2021.110898.
- [36] van ROOIJ B J M, ZÁVODSZKY G, AZIZI TARKSALOYEH V W, *et al.* Identifying the start of a platelet aggregate by the shear rate and the cell-depleted layer [J]. *J R Soc Interface*, 2019, 16(159):20190148. DOI: 10.1098/rsif.2019.0148.
- [37] HANKE J, RANKE C, PEREGO E, *et al.* Human blood platelets contract in perpendicular direction to shear flow [J]. *Soft Matter*, 2019, 15(9):2009-2019.
- [38] SEMENOV A N, LUGOVTSOV A E, SHIRSHIN E A, *et al.* Assessment of fibrinogen macromolecules interaction with red blood cells membrane by means of laser aggregometry, flow cytometry, and optical tweezers combined with microfluidics [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10):1448. DOI: 10.3390/biom10101448.
- [39] KIM S, YE S H, ADAMO A, *et al.* A biostable, anti-fouling zwitterionic polyurethane-urea based on PDMS for use in blood-contacting medical devices [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(36):8305-8514.
- [40] WU Y, ZHANG M, HAUCH K D, *et al.* Effect of adsorbed von Willebrand factor and fibrinogen on platelet interactions with synthetic materials under flow conditions [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 85(3):829-839.
- [41] HORBETT T A. Fibrinogen adsorption to biomaterials [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106(10):2777-2788.

(收稿日期:2023-03-19)