

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.032.html>

◇ 药学研究 ◇

## 莪术二酮抑制凝血酶诱导血小板活化和聚集的研究

乔文豪<sup>1</sup>, 张冬玲<sup>1</sup>, 赵莹莉<sup>2</sup>, 黄燕<sup>2</sup>, 孙继敏<sup>2</sup>, 许杜娟<sup>1,2</sup>, 夏泉<sup>1,2</sup>

**摘要** **目的** 研究莪术二酮对凝血酶诱导大鼠血小板活化和聚集的影响, 来阐明莪术二酮抗血小板活化的机制。**方法** 电阻抗法测定凝血酶诱导大鼠洗涤血小板聚集率, 计算莪术二酮对其抑制率。荧光分光光度法测莪术二酮抑制血小板胞内钙离子浓度变化。流式细胞术检测血小板 P-selectin (CD62p) 的表达。Western blot 测定磷酸化蛋白的磷脂酶 C (PLC)、蛋白激酶 C (PKC) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 的变化。**结果** 400 μmol/L 的莪术二酮可以有效地抑制 0.3 U/ml 凝血酶诱导的大鼠血小板的聚集。50、100 μmol/L 的莪术二酮可以显著抑制血小板活化标志物 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上升和 P-selectin (CD62p) 的表达。在蛋白水平上, 莪术二酮可以抑制 PLC<sub>β</sub>3、PKC $\theta$  和 MAPKs 蛋白的磷酸化。**结论** 初步认为莪术二酮通过 PLC-PKC-MAPKs 通路抑制凝血酶诱导的血小板活化和聚集, 阐明了莪术二酮抗血小板活化的部分机制。

**关键词** 莪术二酮; 凝血酶; 血小板活化和聚集; PLC-PKC-MAPKs 通路

**中图分类号** R 285.5; R 331.1 + 43

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0376-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.016

血管栓塞性疾病为临床常见病, 目前的研究<sup>[1-2]</sup>结果表明, 血管内皮损伤和血小板功能异常是血栓形成的重要诱因。已有的抗血小板药物, 例如阿司匹林、氯吡格雷、华法林, 已经用于临床治疗。但是, 这些药物应用过程中存在着副反应、药物抵抗以及潜在的出血倾向, 限制了其在临床的使用。为了发现更多有效的抗血小板药物, 本课题组从中药中进行了寻找。莪术是一味具有行气破血、消积止痛功效的传统抗血瘀的中药<sup>[3-4]</sup>。之前的研究<sup>[5]</sup>显示莪术中倍半萜类成分莪术二酮(化学结构式见图 1)可以抑制血小板的聚集和 HepG2 细胞增殖。结

合目前抗血小板药物的研究趋势, 该研究以凝血酶为诱导剂, 大鼠的洗涤血小板为研究对象, 观察莪术二酮对凝血酶诱导的血小板活化和聚集的标志物和信号通路的影响, 探讨莪术二酮可能作用的靶点, 从而找出莪术中抗血小板活化的有效成分。

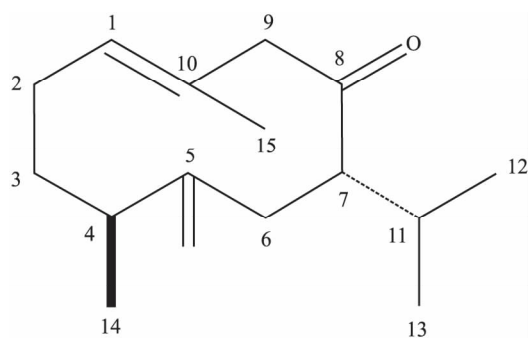


图 1 莪术二酮的结构式

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取成年健康 SD 大鼠, 普通级, 雌雄各半, 180~220 g, 实验动物来自于安徽医科大学实验动物中心, 饲养 1 周后用于实验, 期间自由进食和饮水。

**1.2 主要试剂和仪器** 莪术二酮(课题组制备纯度 $\geq 99\%$ ); 10% 水合氯醛溶液(青岛宇龙海藻有限公司); 凝血酶(美国 Sigma 公司); 钙离子荧光探针 Fluo 3-AM(日本株式会社同仁化学研究所); CD62p-FITC、多克隆兔抗 Phospho-PLC<sub>β</sub>3 (Ser1105)(英国 Abcam 公司); 单克隆兔抗 PLC<sub>β</sub>3、多克隆兔抗 Phospho-PKC $\theta$  (Thr538)(美国 Cell Signaling 公司); 单克隆兔抗 PKC $\theta$ (美国 Anbo Biotechnology 公司); 多克隆兔抗 ERK1/2、多克隆兔抗 Phospho-ERK1/2 (Tyr204)(美国 Immunoway 公司); 多克隆兔抗 p38MAPK、多克隆兔抗 Phospho-p38MAPK (Thr180)、多克隆兔抗 Phospho-JNK1/2/3 (Thr183/Tyr185)(美国 Bioworld 公司); 多克隆兔抗 JNK1/2(武汉博士德生物工程有限公司); FA2004 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); DL-5 型低速大

2016-12-21 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1408085MH172)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学药学院, 合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022

作者简介: 乔文豪, 男, 硕士研究生;

夏泉, 男, 副教授, 责任作者, E-mail: xiaquan2010@163.com

容量离心机(上海安亭科学仪器厂);血小板计数显微镜(日本 Olympus 公司);PL-11 型全自动血小板分析仪(南京神州英诺华医疗科技有限公司);RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司);EPICS XL 型流式细胞仪(美国 Beckman Counter 公司);PowerPacTMBasic 电泳仪电、Mini-PROTEAN® Tetra 垂直电泳槽(美国 BIO-RAD 公司);Bioshine ChemiQ4600mini 化学发光成像系统(上海欧翔科学仪器有限公司)。

**1.3 洗涤血小板制备** 取禁食 12 h 的大鼠称重,腹腔注射 10% 水合氯醛(3 ml/kg),待麻醉完全后,使用采血针进行腹主动脉采血,置于 3.8% 柠檬酸钠抗凝管中,每管血上下轻轻颠倒 6~7 次使之与抗凝剂混匀,800 r/min 离心 10 min 后取出,轻轻吸取上层的富集血小板。加入体积约为 1/4 富集血小板总体积的 ACD 溶液(20.9 mmol/L 柠檬酸,44.8 mmol/L 柠檬酸钠,74.1 mmol/L 葡萄糖,pH 5.0),3 000 r/min 离心 2 min,去掉上层液体,在血小板沉淀中加入 3~4 ml 洗涤液(113 mmol/L NaCl,24 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,4 mmol/L KCl,4 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.2 mmol/L EGTA,0.1% 葡萄糖,pH 6.0)轻轻吹打混匀,3 000 r/min 离心 2 min,去掉上层液体,在沉淀中加入 HEPES-Tyrode 液(134 mmol/L NaCl,12 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>,2.9 mmol/L KCl,0.34 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,5 mmol/L HEPES,5 mmol/L 葡萄糖,pH 7.4)吹打混匀,计数为 3 × 10<sup>8</sup>/ml,加入前列环素(终浓度 0.1 μmol/L)放置在 37 °C 30 min 后待检测。

**1.4 血小板聚集率的测定** 取洗涤血小板 500 μl 加入样品杯上机,仪器进行血小板计数后,37 °C 条件下加入生理盐水或者不同浓度的凝血酶,进行 3 次聚集率的检测,给出血小板最大聚集率,检测持续的时间 5 min。取得凝血酶诱导合适的聚集浓度后,样品改加入生理盐水或者不同浓度的莪术二酮,孵育 10 min 上机。血小板聚集抑制率按下式计算:血小板聚集抑制率(%) = [(对照组聚集率 - 给药组聚集率) / 对照组聚集率] × 100%

### 1.5 血小板内钙离子([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)测定

**1.5.1 血小板负载 Fluo 3-AM** 取制备的洗涤血小板悬液,分为仅加入生理盐水的静息组、0.3 U/ml 凝血酶作用的对照组、25 μmol/L 莪术二酮组、50 μmol/L 莪术二酮组、100 μmol/L 莪术二酮组。加入用 DMSO 溶解的 Fluo 3-AM 混匀,Fluo 3-AM 在血小板悬液中的终浓度为 5 μmol/L,然后将样品放置

37 °C 条件下避光孵育 30 min,3 000 r/min 离心 2 min 后吸弃上清液,沉淀用洗涤液洗两次,再用 HEPES-Tyrode 液重悬,并调节血小板计数为 2 × 10<sup>8</sup>/ml,将样品放置在 37 °C 条件下 10 min,待测。

**1.5.2 荧光分光光度计测定 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** 样品分为胞外有 Ca<sup>2+</sup> 组和胞外无 Ca<sup>2+</sup> 组,其中胞外有 Ca<sup>2+</sup> 组测定之前在负载的血小板悬液中加入 CaCl<sub>2</sub> 溶液(终浓度为 1 mmol/L),胞外无 Ca<sup>2+</sup> 组则不加。两组均提前加入生理盐水或者不同浓度的莪术二酮,37 °C 避光孵育 10 min,激发波长设置为 490 nm,发射波长为 526 nm,上机检测,最后加入凝血酶诱导血小板。按下面公式计算血小板胞质 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = Kd · [(F - F<sub>max</sub>) / (F<sub>min</sub> - F)]。其中 Kd 为解离常数,为 400 nmol/L; F 为样品初始测得的荧光强度值,F<sub>max</sub> 为加入 Triton X-100(终浓度为 1%)测得的荧光强度值;F<sub>min</sub> 为加入 EDTA(终浓度为 5 mmol/L)时测得的荧光强度值。

**1.6 流式细胞术检测血小板 CD62p 的表达** 取制备的洗涤血小板按 1.5.1 分组,与生理盐水或者不同浓度的莪术二酮避光孵育 10 min,再加入凝血酶刺激 5 min,样品中加入 CD62p-FITC 混匀后放置在室温条件下避光孵育 30 min。上机前在样品中加入 1 ml PBS 稀释。使用流式细胞仪上机检测。

**1.7 Western blot 检测蛋白表达** 将洗涤血小板按 1.5.1 分组,提取样品总蛋白,使用 BCA 法进行蛋白定量,计算蛋白上样量并上样,依次进行电泳、转膜、封闭,配制磷脂酶 C(phospholipase C, PLC)、蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)蛋白以及磷酸化蛋白的一抗稀释液,并将膜置入其中,4 °C 孵育过夜,使用辣根酶标记的山羊抗兔或抗小鼠二抗稀释液(1:1 000)室温下孵育 1 h。洗涤、显影,测定蛋白条带累积光密度值,计算蛋白表达相对含量。

**1.8 统计学处理** 实验数据用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,采用单因素方差分析方法(One-way ANOVA)进行比较,实验数据结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 莪术二酮对血小板聚集的影响** 实验结果显示,在洗涤血小板中加入 1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>,随着凝血酶浓度的升高,血小板的聚集率也逐渐升高,聚集率约为 75% 时 [(75.70 ± 2.68)%,  $F = 75.97$ ],对应

的凝血酶浓度为 0.3 U/ml,具有显著地诱导血小板聚集的作用,后续实验采用 0.3 U/ml,见图 2A。提前加入莪术二酮孵育血小板,探究其合适的抑制聚集浓度。随着莪术二酮浓度增加,其对凝血酶诱导的血小板抑制效果逐渐增强,当加入莪术二酮的浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$  时,抑制效果较好,抑制率约为 47%  $[47.57 \pm 3.16] \%$ ,  $F = 85.52$  ],见图 2B。

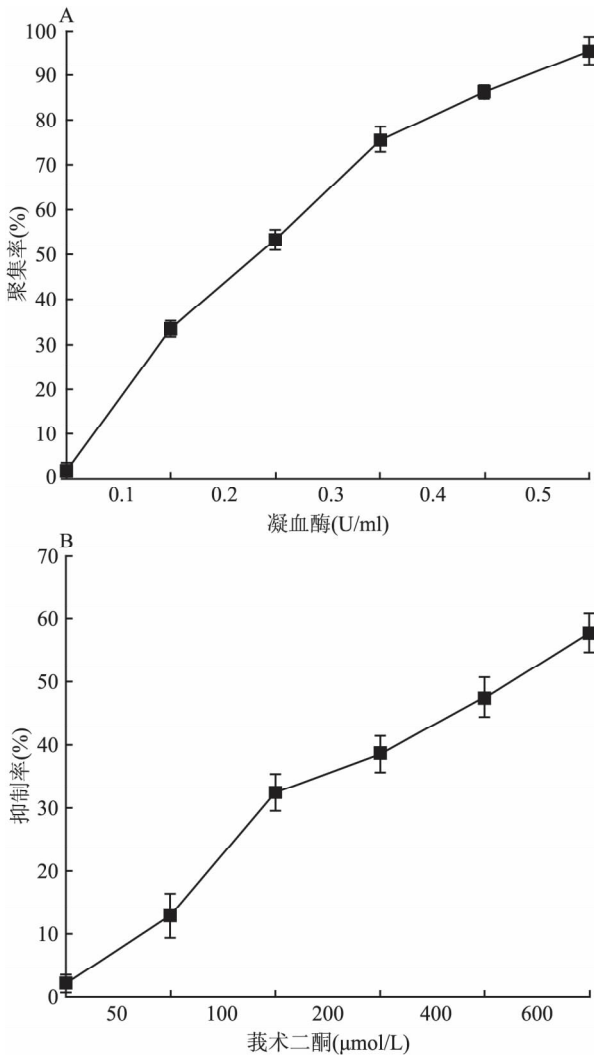


图2 莪术二酮对血小板聚集的影响

A: 不同浓度的凝血酶诱导血小板聚集; B: 不同浓度的莪术二酮抑制凝血酶诱导血小板聚集

**2.2 莪术二酮对血小板  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度的影响** 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高是血小板活化的指标之一,而  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高的方式主要通过胞内钙储库的释放和胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流。结果表明,在血小板胞外不含有  $\text{Ca}^{2+}$  时,50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的莪术二酮可以显著抑制 0.3 U/ml 凝血酶作用的胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高 ( $F = 38.08, P < 0.01$ ),见图 3A。同时,当在血小板胞

外含有 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ , 50  $\mu\text{mol/L}$  和 100  $\mu\text{mol/L}$  的莪术二酮仍可以显著抑制 0.3 U/ml 凝血酶作用的胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高 ( $F = 34.34, P < 0.01$ ),见图 3B。比较胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高情况,当血小板胞外存在  $\text{Ca}^{2+}$  时,可以产生血小板  $\text{Ca}^{2+}$  流入胞内的作用,使血小板进一步活化。

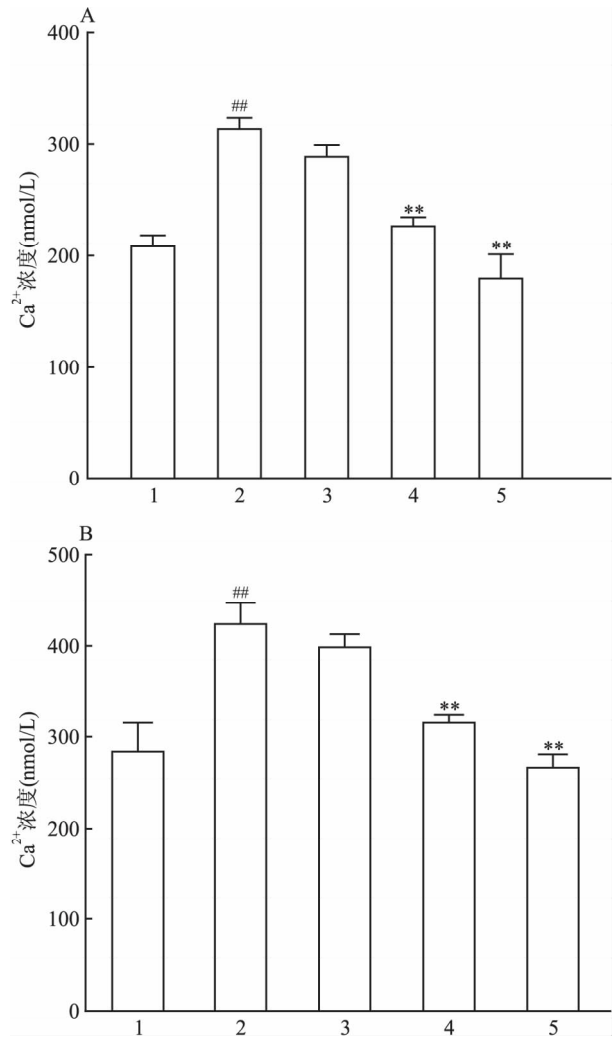


图3 莪术二酮对血小板  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  浓度的影响

A: 胞外不含  $\text{Ca}^{2+}$  时,莪术二酮对血小板胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响; B: 胞外含 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  时,莪术二酮对血小板胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响; 1: 静息组; 2: 对照组; 3: 25  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮组; 4: 50  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮组; 5: 100  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮组; 与静息组比较: <sup>##</sup>  $P < 0.01$ ; 与对照组比较: <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

**2.3 莪术二酮对血小板 P-selectin (CD62p) 表达的影响** 为了探究莪术二酮是否能抑制血小板  $\alpha$  颗粒物的释放,本实验以颗粒中含有的 P-selectin (CD62p) 为研究对象,测定 CD62p 表达,同时也反映了血小板的活化情况。通过检测血小板 CD62p 荧光强度变化,得到莪术二酮抑制血小板活化的能

力。结果表明,50、100  $\mu\text{mol/L}$  的莪术二酮可以显著降低 CD62p 的表达 ( $F = 58.74, P < 0.01$ ), 荧光强度值显著降低, P-selectin (CD62p) 表达明显受到莪术二酮的抑制, 见图 4。

#### 2.4 莪术二酮对磷酸化 PLC、PKC 表达的影响

PLC $\beta$  是 G 蛋白偶联受体  $\alpha$  直接作用的下游蛋白, 具有调节血小板内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的作用。PKC 作为 PLC 的下游蛋白, 能够调节血小板 P-selectin (CD62p) 的表达和胞内颗粒物的释放。如图 5 所示, 50、100  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮抑制了 PLC $\beta$  的磷酸化降低 ( $F = 23.67, P < 0.01$ )。PKC $\theta$  的磷酸化表达变化与 PLC $\beta$  相似, 50  $\mu\text{mol/L}$  ( $F = 6.32, P < 0.05$ ) 和

100  $\mu\text{mol/L}$  ( $F = 6.32, P < 0.01$ ) 莪术二酮降低了 PKC $\theta$  的磷酸化升高。

**2.5 莪术二酮对磷酸化 MAPKs 表达的影响** 本实验探究了莪术二酮对于 MAPKs 3 个蛋白亚型: ERK1/2、p38 MAPK 和 JNK1/2 的磷酸化表达的影响。如图 6 所示, MAPKs 3 个蛋白亚型磷酸化受到莪术二酮的抑制, 50、100  $\mu\text{mol/L}$  均可显著抑制凝血酶作用的 ERK1/2 磷酸化 ( $F = 253.25, P < 0.01$ ), 也可以抑制 p38 MAPK 的磷酸化, 而 100  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮对 JNK1/2 的抑制作用相对较弱 ( $F = 83.20, P < 0.01$ )。

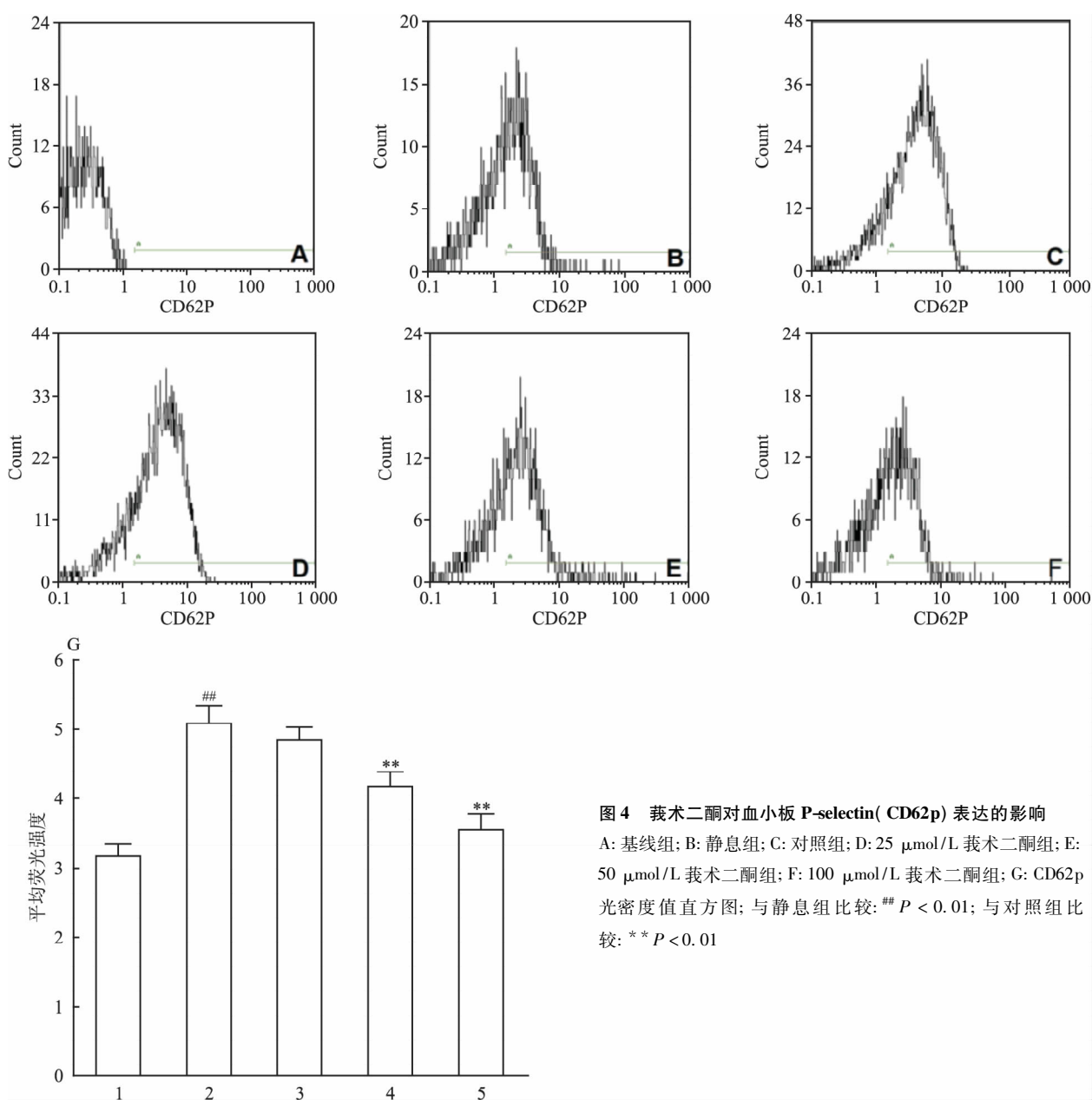


图 4 莪术二酮对血小板 P-selectin (CD62p) 表达的影响

A: 基线组; B: 静息组; C: 对照组; D: 25  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮组; E: 50  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮组; F: 100  $\mu\text{mol/L}$  莪术二酮组; G: CD62p 光密度值直方图; 与静息组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

为了寻找疗效更好的抗血小板药物,课题组对活血化瘀药莪术进行了研究,发现莪术二酮具有抗血小板的活化的作用<sup>[6]</sup>。为了找出莪术二酮抑制凝血酶诱导大鼠洗涤血小板聚集的有效浓度,取聚集率约为75%的凝血酶浓度值0.3 U/ml。根据课题组之前研究<sup>[6]</sup>的数据,选取50~600 μmol/L的莪术二酮筛选合适的浓度范围,结果显示,400 μmol/L莪术二酮对血小板聚集的抑制率约为50%,与之前研究结果相近。本研究显示,50 μmol/L莪术二酮可以显著抑制血小板的聚集,然而,血小板的活化是一个复杂的级联反应过程。为了探究是否存在更低浓度的莪术二酮在蛋白水平上已经能够引起血小板的活化指标的变化而未影响凝血酶诱导的血小板聚集,课题组在之后的实验中增加了25 μmol/L的莪术二酮组。

当血小板活化时,许多血小板活化标志物会产生变化,包括α颗粒、致密颗粒、P-selectin(CD62p)、三磷酸腺苷和胞内Ca<sup>2+</sup>等<sup>[7-9]</sup>。当凝血酶诱导血小板活化时,胞内Ca<sup>2+</sup>升高。50、100 μmol/L莪术二酮能显著抑制血小板胞内Ca<sup>2+</sup>升高,但是胞外存在1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>时,胞内Ca<sup>2+</sup>浓度高于胞外不含

Ca<sup>2+</sup>的血小板,说明当血小板活化时胞外Ca<sup>2+</sup>内流有助于血小板活化。与抑制胞内Ca<sup>2+</sup>浓度相似,50、100 μmol/L莪术二酮也可以有效抑制P-selectin(CD62p)的释放。

血小板活化可由多个受体介导,PLC位于Gq的下游,是重要的血小板活化通路上的蛋白,调节胞内Ca<sup>2+</sup>浓度,并且分解PIP<sub>2</sub>,激活PKCs。PLCβ亚型是PLC蛋白家族中重要的蛋白亚型,当凝血酶受体激活时,会激活PLCβ<sub>3</sub>。PLCβ<sub>3</sub> Ser1105磷酸化受到PKA和PKC的作用而减少,而PLCβ<sub>3</sub> Ser<sup>537</sup>的磷酸化受CaMKII的调节,与PLCβ<sub>3</sub>的基础激活有关<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究中首先探究PLCβ<sub>3</sub> Ser1105磷酸化情况。PKCs家族是一类丝氨酸/苏氨酸激酶蛋白,具有广泛的作用。Pook et al<sup>[11]</sup>研究发现PKCθ调节α颗粒的释放,之前研究发现莪术二酮可以有效抑制P-selectin(CD62p)的表达和α颗粒的释放,本研究探究了血小板PKCθ的表达,发现有相似的结果,然而PKCs仍然需要更多的研究来阐明各个蛋白亚型在血小板活化中的作用。近期的研究<sup>[12]</sup>证实,MAPKs在血小板的活化和血栓形成中起着重要的作用。Oh et al<sup>[12]</sup>研究发现,JNK1激活后会作用于整合素αIIbβ<sub>3</sub>受体的激活,ERK2在凝血酶诱导的血小板聚集和TXA<sub>2</sub>合成中发挥着作

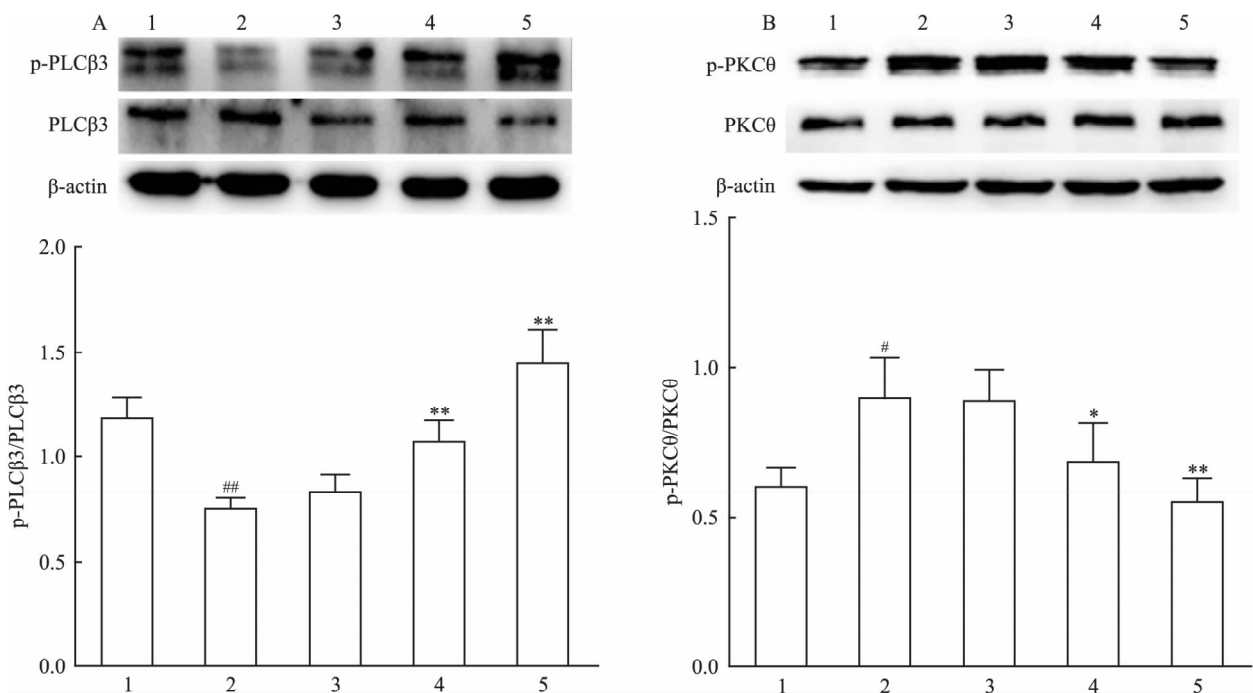


图5 莪术二酮对磷酸化PLC、PKC表达的影响

A: 莪术二酮对PLCβ磷酸化的抑制作用; B: 莪术二酮对PKCθ磷酸化的抑制作用; 1: 静息组; 2: 对照组; 3: 25 μmol/L莪术二酮组; 4: 50 μmol/L莪术二酮组; 5: 100 μmol/L莪术二酮组; 与静息组比较: <sup>#</sup>P<0.05, <sup>##</sup>P<0.01; 与对照组比较: <sup>\*</sup>P<0.05, <sup>\*\*</sup>P<0.01

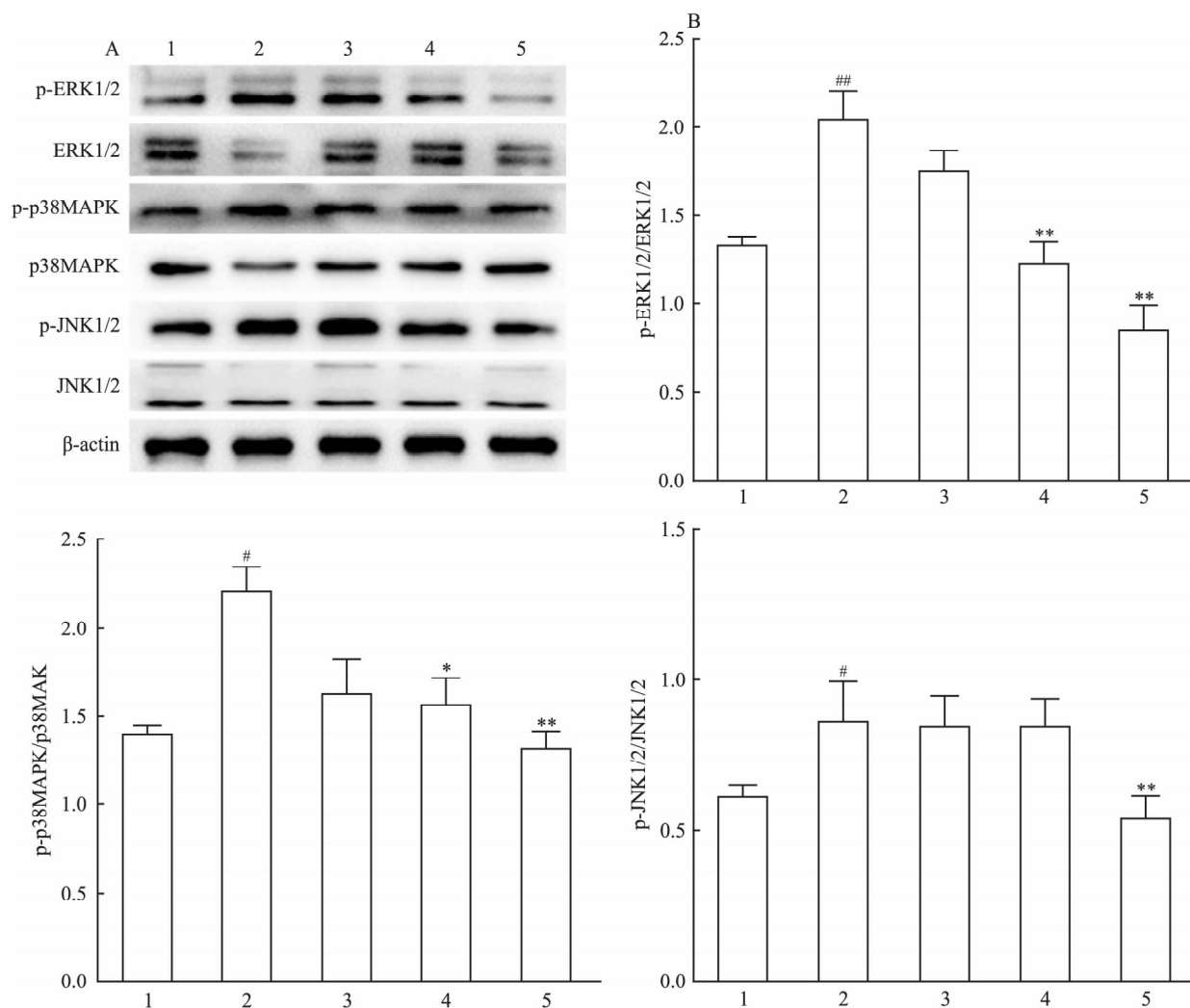


图6 莜术二酮对磷酸化 MAPKs 表达的影响

A: 莜术二酮对 MAPKs 蛋白 3 个亚型磷酸化的抑制作用; B: 不同亚型的分组情况和磷酸化结果直方图; 1: 静息组; 2: 对照组; 3: 25 μmol/L 莜术二酮组; 4: 50 μmol/L 莜术二酮组; 5: 100 μmol/L 莜术二酮组; 与静息组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

用。MAPKs 有 3 个亚型,而莜术二酮抑制 3 个蛋白亚型的磷酸化的具有浓度差异性,说明 3 个蛋白亚型对于莜术二酮作用的敏感程度不同,本研究显示 ERK1/2 和 p38 MAPK 对莜术二酮作用较为敏感,而 JNK1/2 的敏感性相对其他两个亚型低。关于 100 μmol/L 莜术二酮抑制凝血酶作用的 ERK1/2 磷酸化超过对照组,通过查阅文献<sup>[13]</sup>发现,检测相关蛋白的磷酸化与正常组之间差异,存在较高剂量的中药单体作用于血小板抑制蛋白磷酸化的作用超过了正常组的情况。本研究将借助检测中药单体作用细胞毒性的方法,来确定 100 μmol/L 莜术二酮抑制血小板活化的过程中是否会有毒性。

综上所述,莜术二酮可以抑制凝血酶诱导的血小板的聚集,以及胞内  $Ca^{2+}$  升高和 P-selectin (CD62p) 的释放,并且初步确定莜术二酮通过 PLC-

PKC-MAPKs 通路抑制凝血酶诱导的血小板活化和聚集,阐明了莜术行气破血的部分机制(图 7),但其

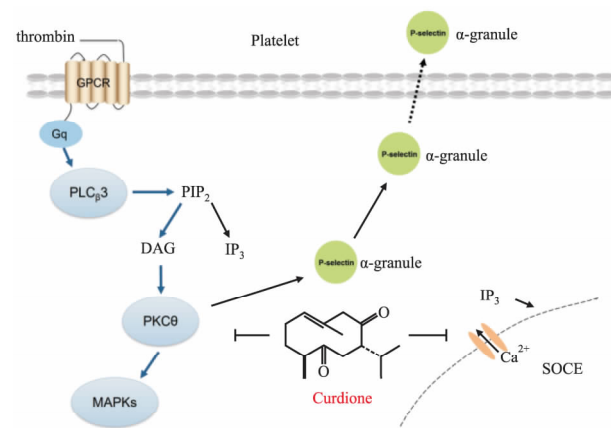


图7 莜术二酮抑制凝血酶诱导血小板活化的部分机制图

相关的机制有待进一步深入研究。

### 参考文献

- [1] Schaff M, Tang C, Maurer E, et al. Integrin  $\alpha 6\beta 1$  is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis [J]. *Circulation*, 2013, 128(5): 541–52.
- [2] Bynagari-Settipalli Y S, Cornelissen I, Palmer D, et al. Redundancy and interaction of thrombin and collagen-mediated platelet activation in tail bleeding and carotid thrombosis in mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(12): 2563–9.
- [3] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 中国医药科技出版社, 2015: 274–5.
- [4] Xia Q, Zhao K J, Huang Z G, et al. Molecular genetic and chemical assessment of *Rhizoma Curcumae* in China [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(15): 6019–26.
- [5] 王佳丽, 王秀, 夏泉, 等. 莪术油中3种倍半萜类化合物对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. *中成药*, 2014, 36(7): 1535–9.
- [6] Xia Q, Wang X, Xu D J, et al. Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential oil [J]. *Thromb Res*, 2012, 130(3): 409–14.
- [7] Berna-Erro A, Jardín I, Smani T, et al. Regulation of platelet function by orai, STIM and TRP [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 898: 157–81.
- [8] Wasiluk A, Kemona H, Mantur M, et al. Expression of P-selectin (CD62P) on platelets after thrombin and ADP in hypotrophic and healthy, full-term newborns [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013, 26(13): 1321–4.
- [9] Sandal M, Paltrinieri D, Carloni P, et al. Structure/function relationships of phospholipase C Beta [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2013, 14(8): 650–7.
- [10] Yang H, Xu S, Li J, et al. Potassium 2-(1-hydroxypropyl)-benzoate inhibits ADP-induced rat platelet aggregation through P2Y1-PLC signaling pathways [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2015, 388(9): 983–90.
- [11] Pook M, Tamming L, Padari K, et al. Platelets store laminins 411/421 and 511/521 in compartments distinct from  $\alpha$ - or dense granules and secrete these proteins *via* microvesicles [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(4): 519–27.
- [12] Oh W J, Endale M, Park S C, et al. Dual roles of quercetin in platelets: phosphoinositide-3-kinase and MAP kinases inhibition, and cAMP-Dependent vasodilator-stimulated phosphoprotein stimulation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 485262.
- [13] Lin K H, Kuo J R, Lu W J, et al. Hinokitiol inhibits platelet activation *ex vivo* and thrombus formation *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(10): 1478–85.

## Inhibition by curdione of thrombin-induced platelet activation and aggregation

Qiao Wenhao<sup>1</sup>, Zhang Dongling<sup>1</sup>, Zhao Yingli<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>College of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To clarify the mechanism of curdione-attenuated platelet activation through exploring the effects of curdione on thrombin-induced rat platelet activation and aggregation. **Methods** Platelet aggregation was measured with the electrical impedance method then the inhibition rate of curdione was calculated. Inhibitory effect of curdione on intracellular calcium concentration in platelets was detected by fluorescence spectrophotometry. The expression of P-selectin (CD62p) was measured by flow cytometry. The phosphorylation of PLC, PKC and MAPK proteins were detected by Western blot. **Results** The results showed that 0.3 U/ml thrombin-induced rat platelet aggregation was inhibited by 400  $\mu\text{mol/L}$  curdione effectively. The markers of platelet activation included the up-regulation of intracellular calcium mobilization  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and the expression of P-selectin (CD62p) were decreased by 50  $\mu\text{mol/L}$  or 100  $\mu\text{mol/L}$  curdione significantly. Meanwhile, Western blot results demonstrated that the phosphorylation of the PLC $\beta 3$ , PKC $\theta$  and MAPKs was also inhibited by curdione. **Conclusion** Curdione may inhibit thrombin-induced rat platelet activation and aggregation by inhibiting the PLC-PKC-MAPKs pathway, at least in part.

**Key words** curdione; thrombin; platelet activation and aggregation; PLC-PKC-MAPKs pathway