

赤芍成分及其衍生物抗血小板聚集和调节氧化磷酸化作用的研究

北京中医学院中西医结合教研室生化组

王继峰 张家俊 陈文为

内容提要 本文报告赤芍成分和其衍生物 801、802 对 ADP 和胶原诱导的血小板聚集性均有不同程度的抑制作用,同时,还降低线粒体氧耗量(S_o)、磷/氧 (ADP/O) 和呼吸控制比 (RCI)。并发现上述药物的构效关系和量效关系,证实了血小板聚集性与能量代谢的相互关系。

赤芍是一种常用的活血化瘀药物,经实验证实:该药具有抗血小板聚集,增加纤溶活性和促进血栓溶解等作用⁽¹⁾。血小板许多生理功能都是消耗能量的过程,因此,研究血小板功能对 ATP 的依赖性,已成为人们感兴趣的问题⁽²⁾。有文献报道抗血小板聚集药物与调节血小板能量代谢的关系,如潘生丁、阿斯匹林、ticlopidine 等一些抗血小板聚集药物都具有抑制线粒体氧耗量和氧化磷酸化作用,并指出:减少能量生成是抗血小板聚集作用途径之一。为阐明中药抗血小板聚集性和线粒体能量代谢的相互关系,我们观察了赤芍提取成分及其两种衍生物 (801 和 802) 对 ADP 和胶原诱导的家兔血小板聚集与大鼠肝线粒体氧化磷酸化作用的影响。这方面工作尚未见到文献报道。由于制备血小板线粒体困难,本文参照 Leblondel, C 等人的方法,选用大鼠肝线粒体进行氧化磷酸化活性测定⁽³⁾。

材料和方法

一、血小板聚集性测定

1. 试剂和药物:赤芍成分和 801、802 由北京西苑医院分子医学研究室供给。ADP 为 Sigma 公司出品,胶原提取液由健康家兔主动脉制备 (100mg 湿组织/ml 生理盐水)。

2. 富血小板血浆制备和聚集性测定:按常规制备健康家兔 (2.0~2.5 kg) 富血小板血浆 (PRP) 和无血小板血浆 (PPP)。血小板聚集性测定用 Chrono-Log 聚集仪。以 PPP 调零点,准确吸取 PRP 0.45ml 移入测定小试管中,分别加入生理盐水或欲实验的药物 0.05ml,在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 预温 1 分钟后,加入诱导剂 ADP ($3 \mu\text{g}/\text{管}$) 或胶原 ($15 \mu\text{l}/\text{管}$),分别描记聚集波

峰高度(透光度)和药物对血小板聚集性的影响,以血小板聚集抑制百分数表示药物作用程度。

二、健康大鼠肝线粒体氧化磷酸化活性测定

试剂和线粒体制备按前文报道⁽⁴⁾,反应底物采用琥珀酸钠 5 mM + 鱼藤酮 $5 \mu\text{g}$; 加入 ADP 量为 $0.3 \sim 0.5 \mu\text{M}$ 。分别测定 (1) 氧耗量 (S_o , 以 $\text{natomes O} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白表示), (2) 磷/氧比值 (ADP/O 以下用 P/O 表示), (3) 呼吸控制率 ($\text{RCI} = S_o/S_u$) 等指标。线粒体悬液蛋白浓度为 $20 \sim 25 \text{mg/ml}$ 。实验数据均为 3~4 次重复实验的平均值。

结 果

一、三种药物对 ADP 诱导的家兔血小板聚集性的作用。赤芍成分、801、802 在终浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-3} \text{M}$ 时,均有不同程度地抑制 ADP 诱导的血小板聚集性的作用 (图 1)。

当药物终浓度均为 5 mM 时,与生理盐水比较,

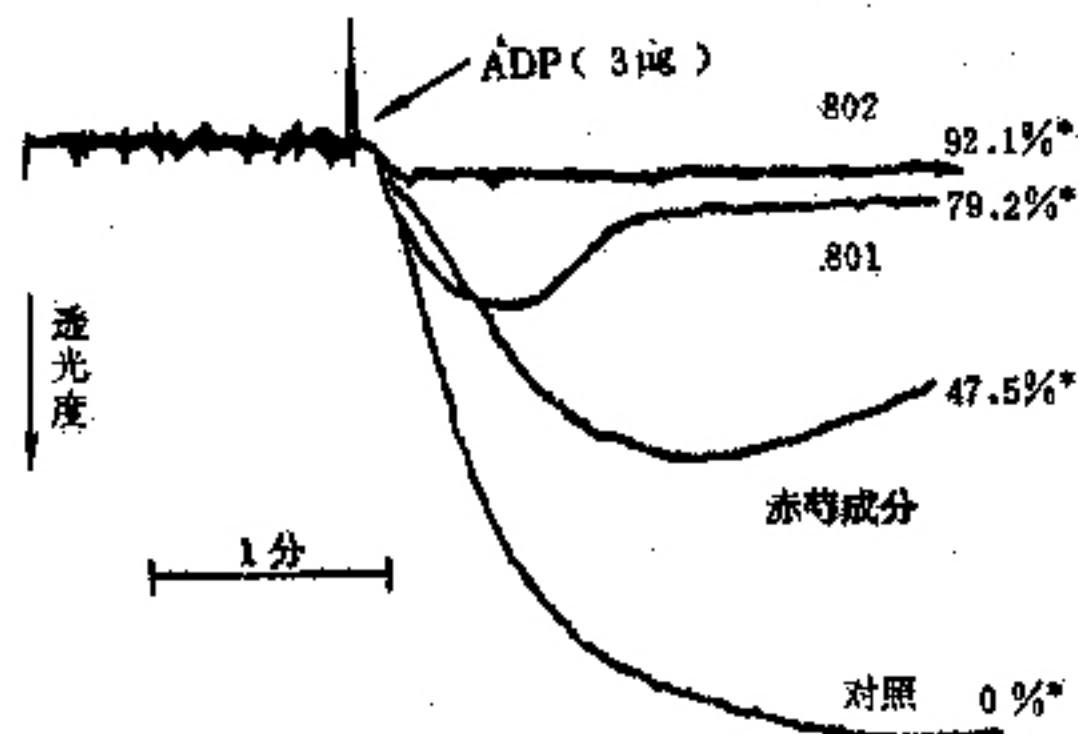


图1 赤芍800,801,802对 ADP 诱导的健康家兔血小板聚集性的影响(终浓度 5 mM)

* 血小板聚集抑制率(每组实验重复 3~4 次)

802 作用最强,抑制率为 92.1%,801 次之为 79.2%,赤芍成分最弱为 47.5%。在药物影响下,血小板聚集后又表现解聚作用,随时间延长,逐渐恢复到起始透光度。在上述浓度范围内,这类药物抗血小板聚集作用均表现有明显的构效关系。量效关系以赤芍 801 为例:终浓度为 1.25 mM 时,抑制率为 30.1%,2.5mM 时为 32.5%,5 mM 时为 79.2%。并随抑制率增加,解聚作用也较明显。赤芍成分和 802 也有类似结果(从略)。

二、三种药物对胶原诱导的家兔血小板聚集性的作用。血管壁胶原蛋白是体内诱导血小板的一种生理性诱导物,用胶原诱导血小板聚集作用是比较接近机体内环境的。当赤芍成分、801 和 802 终浓度为 $5 \times 10^{-4} \sim 5 \times 10^{-3} \text{M}$ 时,对胶原诱导的血小板聚集同样地表现出不同程度的抑制作用(图 2)。

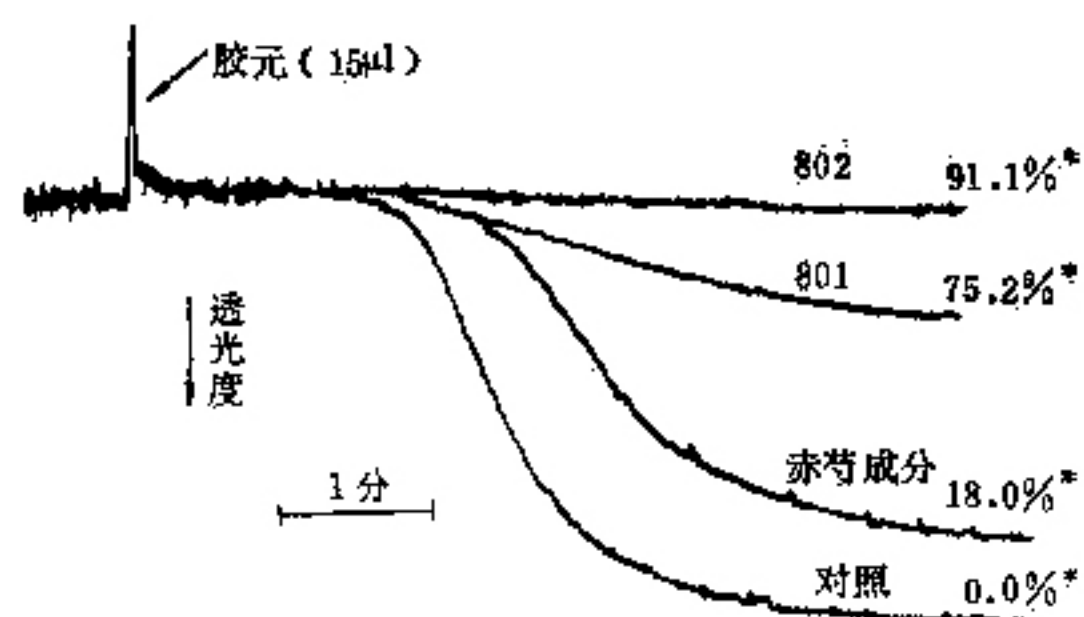


图 2 赤芍 800,801,802 对胶原诱导的健康家兔血小板聚集性的影响(终浓度 2.5mM)

* 血小板聚集抑制率(每组实验重复 3~4 次)

当药物浓度为 2.5 mM 时,以生理盐水为对照,802 作用最强,聚集抑制率为 91.1%,801 次之为 75.2%,赤芍成分最弱为 18.0%,与前一实验趋势相似。同时随药物浓度增加,聚集潜伏期延缓也较明显,但不论抑制作用强弱,解聚作用均不出现。这说明药物对两种不同诱导剂引起的血小板聚集作用是有差异的。在胶原诱导的实验中,药物作用也表现出明显的构效关系。量效关系以赤芍 801 为例,当药物终浓度为 0.625 mM 时,聚集抑制率为 27.6%,1.25 mM 时为 54.6%,2.5 mM 时为 75.2%,5 mM 为 91.5%。随药物浓度增大,抑制作用增强,聚集潜伏期的延缓也更加明显,但不出现解聚现象。赤芍成分和 802 也有类似的结果(从略)。

三、三种药物对大鼠肝线粒体氧化磷酸化作用的比较。将三种药物以不同浓度分别加入紧密偶联的线粒体基质液中,观察药物对线粒体氧化磷酸化的影响。以生理盐水为对照,实验结果表明 801、802 具有

不同程度降低肝线粒体氧耗量 (S_2),降低呼吸控制率,减少 P/O 比值等作用,并表现有明显的与抗血小板聚集性相一致的构效关系和量效关系。见附表。

附表 赤芍成分,801 和 802 对大鼠线粒体氧化磷酸化的作用($M \pm SD$)

药 物	氧耗量 毫克原子氧/ 分/毫克蛋白	磷/氧 (P/O)	呼吸控制比 (RCI)
赤芍成分			
0.0 μM	31.39 ± 1.20	1.48 ± 0.12	3.56 ± 1.27
62.5 "	31.30 ± 6.84	1.43 ± 0.13	3.55 ± 1.18
125.00 "	29.18 ± 3.73	1.42 ± 0.17	3.52 ± 0.68
250.00 "	29.14 ± 4.24	1.39 ± 0.29	3.02 ± 0.64
801			
0.0 μM	49.53 ± 5.98	1.58 ± 0.20	4.26 ± 1.18
62.5 "	48.36 ± 2.51	1.58 ± 0.16	4.08 ± 0.38
125.0 "	46.30 ± 7.10	1.52 ± 0.18	3.03 ± 0.22
250.0 "	39.68 ± 5.52	1.41 ± 0.27	2.04 ± 0.43
802			
0.0 μM	32.25 ± 0.54	1.60 ± 0.0	5.84 ± 0.89
62.5 "	30.20 ± 3.33	1.56 ± 0.09	4.23 ± 1.00
125.0 "	29.39 ± 1.93	1.31 ± 0.51	3.12 ± 0.99
250.0 "	20.71 ± 1.69	0	1.00

当药物终浓度为 250 μM 时,802 降低氧耗量作用最强,抑制率为 35.8%,801 次之为 19.9%,赤芍成分最弱为 7.2%。线粒体氧耗量减少,提示底物氧化或电子传递链受到抑制,最终减少能量生成。线粒体磷/氧 (P/O) 是反映合成 ATP 的效率,当以琥珀酸为底物时,紧密偶联线粒体的 P/O 值近于理论数值 2.0。在实验浓度范围内,赤芍成分、801 和 802 均有不同程度降低 P/O 值的作用,药物浓度为 250 μM 时,802 作用最强,线粒体呈现解偶联现象, P/O 为 0,801 次之,抑制率为 10.8%,赤芍成分作用最弱为 6.1%。呼吸控制比 ($\text{RCI} = S_3/S_4$) 反映了线粒体的偶联紧密程度。药物浓度为 250 μM 时,802 抑制作用最强, $\text{RCI} = 1$,抑制率为 82.9%,801 次之为 52.1%,赤芍成分为 15.2%。当上述实验改用谷氨酸 (5 mM) — 苹果酸 (5 mM) 为底物时,可获得相似的结果;若以维生素 C (5 mM) + TMPD (N, N, N', N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine, 四甲基替对苯二胺 250 μM) + 抗霉素 (Antimycin 5 μg) 为底物时,药物对氧耗量、RCI、P/O 值的影响均不显著(从略)。

总之,药物浓度在 0~250 μM 范围内,其调节线粒体氧化磷酸化作用与药物抗血小板聚集作用强度顺序是一致平行的。均为 802 > 801 > 赤芍成分,都具有明显的量效和构效关系。

讨 论

近年来,关于抗血小板聚集药物作用机理的研究报道很多⁽⁵⁾,对阐明药物抗血小板聚集作用原理不断地丰富。Holmsen等人较系统地研究了血小板功能与能量代谢的关系⁽⁶⁾,指出正常的能量生成是维持血小板生理功能的物质基础。ATP具有维持血小板对刺激的反应性;信息传导需要ATP;血小板激活后,启动和持续血小板功能也需要ATP,若血小板能量代谢受到干扰,ATP含量低于正常水平,则血小板一系列生理反应,如酸性水解酶分泌、花生四烯酸释放、致密颗粒分泌、 α -颗粒分泌,血小板聚集和形态改变依次受到抑制。许多实验资料证实血小板的能量代谢在其聚集性功能中的重要性。Leblondel等人曾研究某些抗血小板聚集药物对能量代谢的作用,指出药物降低氧耗量和氧化磷酸化解偶联作用是药物抗血小板聚集性重要环节之一⁽⁷⁾。

本文实验证实了赤芍成分及其衍生物801、802对ADP和胶原诱导的血小板聚集性均有抑制作用,同时也观察到这三种药物不同程度地抑制能量生成作用,符合前人关于血小板聚集是一种耗能过程的论点。

赤芍成分、801和802是母核相同,侧链含碳数不同的同系列化合物,其含碳数从多到少顺序为,802>801>赤芍成分。因此它们具有相同的生化药理作用,但结构中含碳数差异使它们之间作用强弱也有不同,并呈规律性变化。这种现象表明,随着药物分子碳数增多,亲脂性增加,作用亦更加明显,推测这种改变有利于药物与血小板膜受点结合或改变膜通透性,而发挥调节作用。

从以上结果扩大了我们对于中药抗血小板聚集作用原理的认识,在研究活血化瘀药物的综合效应时,除考虑血液凝固和纤维蛋白溶解,血液流变学,心血管功能、免疫功能和脂代谢等因素外⁽⁸⁾,也有必要开展活血化瘀药物对能量代谢方面的研究,这对全面阐明活血化瘀的实质将是有益的。

参 考 文 献

1. 陈文为,“活血化瘀”治则的实验研究——冠心 II 号方作用原理综述,新医药杂志 1978; 8: 52.
2. Kinolough-Rathbone R, et al. The effect of glucose on adenosine diphosphate -- induced platelet aggregation, J. Lab. Clin. Med 1970; 75: 780.
3. Leblondel G, et al. Effect of an inhibitor of platelets aggregation ticlopidine on energy transduction of rat liver mitochondria in vitro, Biochem Pharmac 1978; 27: 2099.
4. 邱洪发,等。气虚实质的探讨: 四种中药和生脉散对鼠肝线粒体(体外)氧化磷酸化的影响,中西医结合杂志 1981; 1(1): 36.
5. Vargaftig BB, et al. Present concepts on the mechanisms of platelets aggregation, Biochem Pharmac 1981; 30: 263.
6. Holmsen H, et al. Effects of antimycin and 2-deoxyglucose on adenine nucleotides in human platelets, Biochem J 1974; 144: 385.
7. Leblondel G, et al. Effect of inhibitors of platelets aggregation on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria in vitro, Biochem Pharmac 1979; 28: 913.
8. 徐理纳,活血化瘀药理研究的进展,生理科学资料 1981; 8: 1.

(上接 760 页)

33. 医科院药研所,研究活血化瘀药物联系中医药理论的初步尝试,新医药杂志 1976; (2): 33.
34. 山西省中医研究所冠心病实验室,红花制剂对实验性急性缺血缺氧性脑病的保护作用,新医学副刊——神经系统疾病 1977; (3): 179.
35. 黄正良,等,红花黄色素的药理研究,中草药 1984; (8): 34.
36. 徐绥绪,等,红花抗炎有效成分的研究,中药通报 1984; (1): 31.
37. 郑其岚,等,中药红花、细辛、罂粟壳、槐米的致突变性研究,河南医学情报 1983; 1: 1.
38. 黄正良,等,红花黄色素的毒理学研究,甘肃医药 1983; (4): 12.
39. 山西省人民医院内科,红花液治疗冠心病 30 例疗效分析,山西医药杂志 1973; 11—12: 24.
40. 山西省人民医院内科神经内科组,红花液静脉滴注治疗脑血栓—栓塞性疾病 95 例疗效观察,山西医药杂志 1977; (1): 26.
41. 沈阳医学院玲珑塔医院,红花注射液治疗血管性疾病,医学研究 1974; (1): 32.
42. 浙江大研地区医院,红花注射液降谷丙转氨酶的临床疗效报告,新医药通讯 1972; (1): 9.
43. 于启祥,等,红花酊在外伤中的应用,药学通报 1959; 11: 567.
44. 天津市天津医院,当归红花注射液治疗原因不明坐骨神经痛 87 例疗效观察,天津医药 1974; 7: 342.
45. 袁三衡,搽红花酊照射红外线治疗慢性腰痛疗效观察,中华理疗杂志 1981; 1: 22.
46. 李恩江,红花治疗扁平疣,广西卫生 1980; 1: 43.
47. 交通部北京铁路医院皮肤科,中药红花注射液局部封闭治疗神经性皮炎,新医学 1974; 12: 609.
48. 吴伯琨,等,红花眼药水治疗青少年近视眼 253 例(506 只眼)疗效初步观察报告,河北医药 1981; 3: 5.
49. 刘永德,等,红花液肌肉注射治疗突发性耳聋,中华耳鼻喉科杂志 1982; 1: 41.

Experimental Research of Yin-Yang Theory of Traditional Chinese Medicine (I)
—Effect of Mankshood, Bark of Chinese Cassia Tree and "Liu Wei Di Huang Fang"

on Arterial Pressure in Experimental Hypertensive Rats

Kuang Ankun (邝安堃), Gu Deguan (顾德官), et al

Shanghai Institute of Hypertension, Shanghai

The use of drugs of Yang and Yin nature to determine whether an experimental hypertensive rat belongs to Yang or Yin deficiency is an accepted method in Yin-Yang research. Theoretically, the Yang-invigorating drugs should be able to restore Yang deficiency and bring the blood pressure down. However they might deteriorate cases with Yin deficiency and elevate their blood pressure. Drugs of Yin nature should have the opposite action. This paper studied the influence of mankshood (root), bark of Chinese cassia tree and Liu Wei Di Huang Fang 六味地黄丸 (rehmannia, fruit of medicinal cornel, Chinese yam rhizome, oriental water plantain, root-bark of peony and tuckahoe) on the arterial blood pressure in both Skelton and Goldblatt hypertensive rats. The mankshood and bark of Chinese cassia tree have the property of restoring Yang and Liu Wei Di Huang Fang has that of nourishing Yin. It is found that the mankshood alone or together with bark of Chinese cassia tree markedly increased ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) the blood pressure of two-kidney Goldblatt hypertensive rats but decreased ($P < 0.01$) the blood pressure of Skelton hypertensive rats. This experiment suggested that the two-kidney Goldblatt hypertensive rats might be a model of Yin-Xu (Yin deficiency) and Skelton hypertensive rats might be that of Yang-Xu (Yang deficiency). However, the assumption needs further confirmation. (Original article on page 742)

The Effects of Extracts of Radix Paeoniae Rubra and Its Derivatives on Platelet Aggregation and Oxidative Phosphorylation of Mitochondria

Wang Jifeng (王继峰), Zhang Jiajun (张家俊), Chen Wenwei (陈文为)

Beijing College of TCM, Beijing

Radix Paeoniae Rubra, a common traditional Chinese drug with the action of promoting blood circulation and removing blood stasis, has been shown to be able to inhibit platelet aggregation, activate fibrinolysin, promote thrombolysis. This paper describes the influence of the extract of Radix Paeoniae Rubra and its two derivatives (801,802) on platelet aggregation induced by ADP or collagen and rat liver mitochondria oxidative phosphorylation in an attempt to explore the relationship between the anti-platelet aggregation effect and energy metabolism.

The experimental results show that: (1) The extract of Radix Paeoniae Rubra and 801, 802 can inhibit platelet aggregation induced by ADP or collagen in different degrees, counteract platelet aggregation induced by ADP and delay occurrence of platelet aggregation induced by collagen. The order of effectiveness of anti-platelet aggregation is: 802 > 801 > extract of Radix Paeoniae Rubra (final concentration $5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3} M$). The effect of these compounds show that there are dose-response and structure-response behaviours. (2) All these compounds can decrease rat liver mitochondria oxygen consumption (S_3), respiratory control index (S_3/S_4) and ADP/O ratio in different degrees to regulate energy production. The order of the effectiveness of these drugs in this respect is the same as the potency of their anti-platelet aggregation action. Therefore, it could be assumed that the regulation of energy metabolism by drugs is one of the ways to improve the physiological function of platelets. (3) The biochemical pharmacological action of the extract of Radix Paeoniae Rubra and its derivatives are related with the number of carbon increase, the hydrophobic properties will also increase, the effects of inhibition are more significant. These preliminary results help to throw more light on the mechanism of anti-aggregation of the Chinese medicinal herbs.

(Original article on page 745)

Effect of Alcoholic Extract of Prepared Radix Polygoni Multiflori on Preventing Atherosclerosis in Japanese Quail

Wang Wei (王巍), *Jing Houde (景厚德)

*Department of Geriatrics, Xiyuan Hospital, *Department of Pharmacology,*

Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing

Male Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) were divided into 3 groups and given atherosclerosis-inducing diet containing 1% cholesterol and 20% fat for 6 weeks. Different dosage of alcoholic extract of prepared Radix Polygoni Multiflori was given to different groups at the same time. Plasma HDL-C, TC, FC and TG concentrations were determined, and aortic atheromata were observed after sacrifice of the quails.

The results showed that the drug could raise plasma HDL-C/TC ratio, reduce plasma TC, FC, TG levels significantly, inhibit quail hyperlipidemia, and retard development of atherosclerosis. There was relationship between dosage and effect. The advantage of quail model lies in the short experimental cycle.

(Original article on page 748)