

· 实验研究 ·

银杏苦内酯拮抗血小板活化因子
部分体外作用的实验研究董竞成¹ 李 明¹ 石志芸¹ 沈自尹¹ 吴淦桐² 周建军³

内容提要 血小板活化因子(PAF)加入血小板孵化液后能引起离体气管条的强烈收缩, 50%抑制浓度(IC₅₀)达到 $6.14 \times 10^{-7} \text{mol/L}$, 而单纯 PAF 的气管收缩作用则较微弱(IC₅₀ 仅为 $6.32 \times 10^{-4} \text{mol/L}$), 两组差异显著($P < 0.05$); 预先在血小板孵化液中加银杏苦内酯, 则 PAF 和血小板混合液的缩气管作用明显减弱($P < 0.01$)。PAF 能减少肺组织 β -肾上腺素受体的数量, 使 β -受体激动剂的舒张气管作用减弱, 50%有效浓度(EC₅₀)由 $1.44 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 增至 $1.06 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ ($P < 0.05$), PAF 的这一作用同样能用银杏苦内酯拮抗($P < 0.05$)。提示银杏苦内酯是一种有希望的 PAF 受体拮抗剂, 能用于治疗哮喘。

关键词 银杏苦内酯 血小板活化因子 血小板 异丙肾上腺素 拮抗剂

Ginkgolides Antagonizing Some Effects of Platelet-Activating Factor in Vitro Dong Jing-Cheng, Li Ming, Shi Zhi-Yun, et al *Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)*

The mixture of platelet-activating factor (PAF) and platelets produced significant contraction of guinea pigs' bronchus, while the contraction induced by PAF alone was mild relatively, the IC₅₀ were $6.14 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ and $6.32 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ respectively. There was significant difference between these two groups ($P < 0.05$). When the platelets were pre-incubated with ginkgolides for 10 minutes in Tris-Tyrode's buffered saline, effects of the PAF and platelets mixture were significantly inhibited ($P < 0.01$). Exposure of guinea pigs' bronchus to PAF in vitro resulted in a loss of beta-adrenergic receptors and responses to isoproterenol, and this effect of PAF was prevented by prior incubation of the guinea pigs' bronchus with ginkgolides ($P < 0.05$). The results showed ginkgolides were a potent PAF antagonist.

Key words ginkgolides, platelet-activating factor, isoproterenol, platelet, antagonist

血小板活化因子(Platelet Activating Factor, PAF)是一种和许多疾病有关的磷脂性介质, 实验表明 PAF 能引起气管收缩⁽¹⁾, 还能破坏气管壁上的 β -肾上腺素能受体, 使 β -肾上腺素和其受体的亲和力下降, 扩张气管的作用减弱。另外, 研究表明从中药银杏叶中提取的银杏苦内酯是一种活性较强的 PAF 受体拮抗剂, 能拮抗 PAF 的许多生物活性, 治疗支气管哮喘^(2, 3)。本研究通过体外实验观察银杏苦内酯对 PAF 作用的影响, 为银杏苦内酯的临床应用提供理论依据。

材料与方法

1 药品和试剂 (1)PAF: 美国 Sigma 公司产品。(2)银杏内酯: 中国科学院上海药物研究所提供。(3)异丙肾上腺素: 上海天丰药厂产品。(4)抗凝溶液(ACD)的配制: 枸橼酸三钠 2.5 g、枸橼酸 1.37 g、葡萄糖 2.21 g 加入 100 ml 的三蒸水中溶解。(5)Krebs-Henseleit 溶液的配制: KCl 350 mg、MgSO₄ · 7H₂O 140 mg、NaCl 6.9 g、CaCl₂ · 2H₂O 280 mg、K-H₂PO₄ 160 mg、NaHCO₃ 2.1 g、Glucose 1 g 加入 1000 ml 的三蒸水中溶解。(6)Tyrode's gelatin no calcium (TG-NoCa²⁺)液的配

1. 上海医科大学附属华山医院(上海 200040); 2. 上海医科大学基础药理研究室; 3. 中国科学院上海药物研究所

制: KCl 195 mg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 212.5 mg、NaCl 8 g、 NaHCO_3 1.015 g、Glucose 1 g、EDTA 76.07 mg、Gelatin 2.5 mg 加入 1000 ml 的三蒸水中溶解, 1 N HCl 调 pH 至 6.5。(7) Tris-Tyrode's BSA (TT BSA) 液的配制: KCl 195 mg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 212.5 mg、NaCl 8 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 191 mg、Tris 1.21 g、Glucose 1 g、BSA 2.5 g 加入 1000 ml 的三蒸水中溶解, 用 1 N 的 HCl 调 pH 至 7.4 备用。

2 主要实验器材 (1) XWT-204 型台式平衡记录仪: 上海大华仪表厂生产。(2) LWA-20 型张力换能器: 上海复旦大学生产。

3 方法

3.1 分组 健康清洁级豚鼠 70 只, 由上海医科大学动物部提供, 体重 $294\text{ g} \pm 18.6\text{ g}$, 随机分成单纯 PAF(5 个剂量) 缩气管组、PAF(5 个剂量) 加血小板缩气管组、 10^{-6} mol/L 银杏苦内酯拮抗 PAF(5 个剂量) 加血小板缩气管组、单纯异丙肾上腺素(6 个剂量) 作用组、 $0.0382\text{ }\mu\text{mol/L}$ PAF 影响异丙肾上腺素(6 个剂量) 作用组、 $0.382\text{ }\mu\text{mol/L}$ PAF 影响异丙肾上腺素(6 个剂量) 作用组、 $3.82\text{ }\mu\text{mol/L}$ PAF 影响异丙肾上腺素(6 个剂量) 作用组和 10^{-6} mol/L 银杏苦内酯拮抗 $0.382\text{ }\mu\text{mol/L}$ PAF 影响异丙肾上腺素(6 个剂量) 作用组, 每组 10 只豚鼠。

3.2 气管平滑肌的分离及其张力测定 参照 Murroy 等^[4] 方法, 将正常豚鼠去头处死, 取出气管及肺组织, 分离气管平滑肌组织, 螺旋剪开, 制成 $2\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 左右的气管平滑肌条, 将气管条悬吊于盛有 37°C Krebs-Henseleit 溶液, 容积为 20 ml 的浴槽中, 下端固定于浴槽底部, 上端连接于张力换能器上, 同时向浴槽通入 95% 的 O_2 和 5% CO_2 的混合气体, 前负荷 1 g 左右, 平衡 1 h 后, 以累积剂量法向浴槽中加入不同的药物。

3.3 豚鼠洗涤血小板的制备 经颈动脉取血 10 ml, ACD(1:6) 抗凝, 混匀后 500 rpm 离心 15 min, 取上清液富含血小板血浆 (PRP), 将 PRP 3500 rpm 离心 15 min, 弃上清, 再用 TG

- NOCa^{2+} 液 3~4 ml 吹打分散血小板, 室温静置 15 min 后, 3500 rpm 离心 15 min, 弃上清, 最后用 TTBSA 溶液悬浮血小板, 将血小板浓度调至 $(2-3) \times 10^8\text{ cell/ml}$ 并静置 30 min 后备用。

4 统计方法 采用 logit 方法和直线回归法并进行回归直线间平行性差异性检验。

结 果

1 单纯 PAF 与 PAF 加血小板的混合液的缩气管作用比较 见表 1。以累积剂量法向浴槽中加入不同浓度的 PAF 所引起的气管条收缩作用较为有限, IC_{50} 为 $6.32 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$; 如果先把不同浓度的 PAF 放进浓度为 $2 \times 10^8\text{ cell/ml}$ 的血小板孵化液 200 ml 中, 然后再把这种 PAF 和血小板的混合液以累积剂量法加入浴槽中, 则气管条收缩作用明显增强, IC_{50} 达到 $6.14 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$, 二者相比, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2 银杏苦内酯拮抗 PAF 和血小板混合液的气管条收缩作用 见表 1。PAF 和血小板的混合液具有十分显著的气管条收缩作用, 但是, 预先将 $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 的银杏苦内酯加进血小板孵化液中, 然后再把不同浓度的 PAF 加入加有银杏苦内酯的血小板孵化液, 这种经银杏苦内酯处理的 PAF 和血小板的混合液的气管条收缩作用显著下降, IC_{50} 为 $4.06 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$, 和不加银杏苦内酯组比较有非常显著性差异 ($P < 0.001$)。

表 1 各组收缩气管条作用的比较 (%)

组 别	PAF 浓度 (mol/L)				
	3.82×10^{-9}	3.82×10^{-8}	3.82×10^{-7}	3.82×10^{-6}	3.82×10^{-5}
单纯 PAF	0.01	1	2.6	3.8	6.6*
PAF + 血小板	0.01	10.4	25	33.33	99.99 [△]
血小板+银杏内酯+PAF	0.9	1.8	3.2	8.1	18.2*

注: 与 PAF+血小板组比较, * $P < 0.05$; 与血小板+银杏内酯+PAF 组比较, $\Delta P < 0.01$; 每组均为 10 只动物; 银杏内酯浓度为 $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$

3 不同浓度 PAF 对异丙肾上腺素舒张气管条作

表 2 各组舒张气管条作用的比较 (%)

组 别	异丙肾上腺素浓度 (mol/L)					
	2.3×10^{-8}	2.3×10^{-7}	2.3×10^{-6}	6.9×10^{-6}	9.2×10^{-6}	11.5×10^{-6}
单纯异丙肾上腺素	0.01	2.9	33.9	62.4	83.7	99.99*
PAF + 异丙肾上腺素	0.01	0.01	3.5	37.8	38.5	60.4
银杏内酯+PAF+异丙肾上腺素	0.01	2.6	36	66.4	82.7	91.6 [△]

注: 与 PAF+异丙肾上腺素组比较, * $P < 0.05$; 与单纯异丙肾上腺素组比较, $\Delta P > 0.05$; 每组均为 10 只动物; PAF 浓度为 $0.382\text{ }\mu\text{mol/L}$; 银杏内酯浓度为 $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$

用的影响 实验表明预先向浴槽中加入 $0.0382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 再以累积剂量法加入不同浓度的异丙肾上腺素, 则异丙肾上腺素的舒张气管条作用仅受轻度影响, EC_{50} 为 $4.27 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, $P > 0.05$; 预先向浴槽中加入 $0.382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 则异丙肾上腺素的气管条舒张作用受到明显影响, EC_{50} 为 $5.13 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, $P < 0.05$; 如果预先向浴槽中加入 $3.82 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 则异丙肾上腺素的舒张作用显著下降, EC_{50} 仅为 $1.06 \times 10^{-5} \text{mol/L}$, 不加 PAF 组的 EC_{50} 为 $1.44 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 二组相比较差异显著, $P < 0.05$ 。

4 银杏苦内酯拮抗 $0.382 \mu\text{mol/L}$ PAF 对异丙肾上腺素舒张气管条作用的影响 见表 2。预先将 $1 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 的银杏苦内酯加进浴槽中, 然后将 $0.382 \mu\text{mol/L}$ PAF 加入浴槽, 再以累积剂量法加入不同浓度的异丙肾上腺素, 则异丙肾上腺素的气管条舒张作用仍保持正常, 其作用和不加银杏苦内酯组比, EC_{50} 分别是 $2.89 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 和 $1.30 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 作用基本相等, $P > 0.05$ 。

讨 论

近年来的研究表明抗 PAF 治疗是哮喘治疗学的一个新方向^[5]。PAF 许多作用的产生和血小板的存在密切相关; Barnes 等的研究表明 PAF 能与血小板膜上的特异性受体结合, 使血小板聚集并释放出活性物质, 引起支气管收缩、粘膜水肿、粘液分泌增加和炎性细胞趋化性增强。动物在去除血小板后可防止 PAF 对呼吸道的作用, PAF 引起的支气管收缩是依赖血小板而发挥作用的^[6,7], 本研究也证明了这一点, 单纯 PAF 缩气管条作用十分微弱, 而加血小板孵化液后收缩作用明显增强($P < 0.05$)。本研究的结果还表现在加 PAF 前先加银杏苦内酯, 血小板孵化液的缩气管作用便明显减弱, 和不加银杏苦内酯组相比, 差异极显著($P < 0.01$), 这一结果提示银杏苦内酯阻断了 PAF 和血小板膜上 PAF 受体的结合, 使血小板的激活受到影响, 不能释放介质引起气管平滑肌收缩, 当然, 具体作用机制还有待于深入研究。

Barquet 和 Devendra 等的工作提示 PAF 能使脑组织和肺组织的 β_2 -肾上腺素受体减少^[8,9] 本研究的实验表明预先加 $0.0382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 异丙肾上腺素的舒张作用仅受轻微影响, 和不加 PAF 组相比差异不大($P > 0.05$); 预先加 $0.382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 异丙肾上腺素的舒张作用则受到明显影响, 和不加组相比差异较大($P < 0.05$); 如果预先加入

$3.82 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 则异丙肾上腺素的作用大受影响, 两组相比差异显著($P < 0.05$)。上述结果提示 PAF 能使气管平滑肌的 β -肾上腺素受体减少, 且剂量越大, 破坏越严重。另外, 本研究还表明, 预先把银杏苦内酯加进浴槽, 然后加 PAF, 则异丙肾上腺素的舒张作用得到保护, 和对照组相比, 差异不大($P > 0.05$), 这一结果和 Devendra 等报告相似^[9]。提示银杏苦内酯对抗 PAF 对 β -肾上腺素受体的破坏作用。总之, PAF 能激活血小板, 使之释放某些介质而致气管平滑肌收缩, 而银杏苦内酯能通过和 PAF 受体结合而阻断这一作用; PAF 还能引起肺组织 β -肾上腺素受体数目的减少, 使 β -受体激动剂的作用减弱, PAF 的这一作用同样能用银杏苦内酯拮抗, 提示银杏苦内酯是一种有希望的 PAF 受体拮抗剂, 可望用于支气管哮喘的治疗。

参 考 文 献

1. Vargaftig BB, Lefort J, Chingnard M, et al. Platelet-activating factor induces a platelet-dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. *Eur J Pharmacol* 1980; 65: 185.
2. Kue-Hsiung Hsieh. Effects of antagonist, BN 52021, on the PAF, methacholine, and allergen-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Chest* 1991; 99(4): 877.
3. Touray C, Etienne A, Braquet P. Inhibition of antigen-induced lung anaphylaxis in the guinea-pig by BN 52021, a new specific PAF-acether receptor antagonist isolated from Ginkgo biloba. *Agent Act* 1986; 17: 371.
4. Murray MA. Cromakalim-induced relaxation of guinea-pig isolated trachealis: antagonism by globecetamide and by phentolamine *Br J Pharmacol* 1989; 98: 865.
5. Clark TJH. Asthma, third edition. London Chapman and Hall medical 1993: 182—231.
6. 董竞成, 李明, 石志芸, 等. 银杏内酯拮抗血小板活化因子对豚鼠肺条作用的实验研究. *实用诊断和治疗杂志* 1994; 8(4): 6.
7. Barnes PJ. Mediators and asthma. *Br J Hosp Med* 1985; 34(6): 339.
8. Barquet P, Etienne A and Clostre F. Down-regulation of beta-2 adrenergic receptors by PAF-acether antagonist BN 52021. *Prostaglandins* 1985; 30: 721.
9. Barquet P. Ginkgolides-Chemistry, Biology, Pharmacology and Clinical Perspectives. *J R Prous Science Publishers, S.A.* 1988: 356.

(收稿: 1994—09—05 修回: 1995—07—20)