

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*

董竞成¹ 李明¹ 吴淦桐² 周建军³

内容提要 目的:观察银杏内酯拮抗血小板活化因子(PAF)加血小板能收缩豚鼠肺条的作用和拮抗 PAF 破坏 β -肾上腺素受体的作用。方法:对离体豚鼠肺条进行张力测定。结果:PAF 加入血小板活化液后能引起豚鼠肺条的强烈收缩,50%抑制浓度(IC_{50})达到 $4.69 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$,而单纯血小板溶液的肺条收缩作用则相对较弱, IC_{50} 仅为 $6.66 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,两组差异显著($P < 0.05$);预先在血小板活化液中加入银杏内酯,则 PAF 和血小板混合液的肺条收缩作用明显减弱($P < 0.05$)。PAF 能减少肺组织 β -肾上腺素受体的数量,使 β -受体激动剂的舒张作用减弱,50%有效浓度(EC_{50})由 $1.38 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 增至 $6.25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($P < 0.05$),PAF 的这一作用同样能被银杏内酯拮抗($P < 0.05$)。结论:银杏内酯是一种有希望的 PAF 拮抗剂,有可能用于支气管哮喘的治疗。

关键词 银杏内酯 血小板活化因子 肺条 血小板 拮抗剂

Experimental Study on Antagonism of Ginkgolides Against Effect of Platelet-Activating Factor on Lung Strip of Guinea Pigs Dong Jing-cheng, LI Ming, WU Gan-tong, et al. Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200040)

Objective: To investigate the action of ginkgolides antagonizing the contraction of guinea pigs' lung strip induced by the mixture of platelet-activating factor (PAF) and platelets and its effect of preventing the PAF caused damage of β -adrenergic receptors. **Methods:** The contraction of guinea pigs' isolated lung strip was measured. **Results:** The mixture of PAF and platelet could produce a serious contraction of lung strip, the IC_{50} reached $4.69 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, while the contraction induced by PAF alone was relatively mild, its IC_{50} only $6.66 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, the difference between them was significant ($P < 0.05$). When the platelets were preincubated with ginkgolides for 10 minutes in Tris-Tyrode's buffered saline, the effects of PAF and platelets mixture were significantly inhibited ($P < 0.05$). Exposure of guinea pigs' lung strip to PAF in vitro resulted in a loss of β -adrenergic receptors and weakened its responses to isoproterenol, a receptor activating factor, the EC_{50} would be increased from $1.38 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ to $6.25 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$, $P < 0.05$. This effect of PAF could also be inhibited by ginkgolides ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ginkgolides is a promising PAF antagonist, and might be used in treating bronchial asthma.

Key words ginkgolides, platelet-activating factor, lung strip, 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介质,实验表明 PAF 能引起气管收缩⁽¹⁾,还能破坏肺组织的 β -肾上腺素能受体,使 β -肾上腺素和其受体的亲和力下降,减弱扩张气

管的作用。另外,许多早期研究观察均表明从银杏叶中提取的银杏内酯是一种活性较强的 PAF 受体拮抗剂,能拮抗 PAF 的许多生物活性作用,可望用于治疗支气管哮喘^(2,3)。通过体外实验观察银杏内酯对 PAF 作用的影响,为银杏内酯的临床应用提供理论依据。

材料和方法

1 动物 健康豚鼠,雌雄各半,体重(294.7 ± 18.6)g;健康 Wistar 大鼠,雄性,体重(200 ± 50)g,均由

* 国家中医药管理局重点资助课题(No. 95A2132)

1. 上海医科大学华山医院(上海 200040); 2. 上海医科大学基础药理教研室; 3. 中国科学院上海药物研究所

上海医科大学动物部提供。

2 药品和试剂 PAF:美国 Sigma 公司产品。银杏内酯:中国科学院上海药研究所提供。异丙肾上腺素:上海天丰药厂产品。抗凝溶液(ACD)的配制:枸橼酸三钠 2.5g、枸橼酸 1.37g、葡萄糖 2.21g 加入 100ml 的三蒸水中溶解。Krebs-Henseleit 溶液的配制:KCl 350mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 140mg、NaCl 6.9g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 280mg、 KH_2PO_4 160mg、 NaHCO_3 2.1g、Glucose 1g 加入 1000ml 的三蒸水中溶解。Tyrode's gelatin no Calcium(TG- NoCa^{2+})液的配制:KCl 1.95mg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 12.5mg、NaCl 8g、 NaHCO_3 1.015g、Glucose 1g、EDTA 76.07mg、Gelatin 2.5mg 加入 1000ml 的三蒸水中溶解,1N HCl 调 pH6.5。Tris-Tyrode's BSA(TTB-SA)液的配制:KCl 195mg、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 212.5mg、NaCl 8g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 191mg、Tris 1.21g、Glucose 1g、BSA 2.5g 加入 1000ml 的三蒸水中溶解,用 1N 的 HCl 调 pH 至 7.4 备用。

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

4 方法

4.1 肺条的制作及其张力测定 参照 Marroy 等方法⁽⁴⁾,将正常豚鼠击头处死,取出肺组织,选双侧肺下叶,沿长轴剪取 $0.3\text{cm} \times 0.3\text{cm} \times 2\text{cm}$ 长条,将肺条悬吊于盛有 37°C Krebs-Henseleit 溶液,容积为 20ml 的浴槽中,下端固定于浴槽底部,上端连接于张力换能器上,同时向浴槽中通入 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体,前负荷 1g 左右,平衡 1h 后,以累积剂量法向浴槽中加入不同的药物。

4.2 分组 取豚鼠 60 只,随机分成单纯 PAF 缩肺条组(A组)、PAF 和血小板缩肺条组(B组)、 10^{-6}mol/L 银杏内酯拮抗 PAF 和血小板缩肺条组(C组)、单纯异丙肾上腺素作用组(D组)、 $0.382\mu\text{mol/L}$ PAF 影响异丙肾上腺素作用组(E组)和 10^{-6}mol/L 银杏内酯拮抗 $0.382\mu\text{mol/L}$ PAF 影响异丙肾上腺素作用组

(F组),每组 10 只豚鼠样本。

4.3 大白鼠血小板的制备 从大白鼠颈动脉取血 10ml,ACD(1:6)抗凝,混匀后 500r/min 离心 15min,取上清液——富含血小板血浆(PRP),将 PRP3500r/min 离心 15min,弃上清,再用 TG- NaCa^{2+} 液 3~4ml 吹打分散血小板,室温静置 15min 后,3500r/min 离心 15min,弃上清,最后用 TTB-SA 溶液悬浮血小板,将血小板浓度调至 $(2\sim3) \times 10^8$ 细胞/ml 并静置 30min 后备用。

5 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 加血小板混合液缩肺条作用比较 见表 1。

以累积剂量法向浴槽中加入不同浓度的 PAF 所引起的肺条收缩作用较为有限,如 A 组收缩率仅为 19.40%, IC_{50} 为 $6.66 \times 10^{-4}\text{mol/L}$;如果先把不同浓度的 PAF 放进浓度为 2×10^{-8} 细胞/ml 的血小板孵化液 200ml 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(B组),则肺条收缩作用明显增强,收缩率为 99.99%, IC_{50} 达到 $4.69 \times 10^{-7}\text{mol/L}$,二者比较差异显著($P < 0.05 \sim 0.01$)。

2 银杏内酯拮抗 PAF 加血小板混合液的肺条收缩作用 见表 1。

B 组 PAF 加血小板的混合液具有十分显著的肺条收缩作用,但 C 组预先把 $1 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 的银杏内酯加进血小板孵化液中,然后再将不同浓度的 PAF 放入加有银杏内酯的血小板孵化液中,这种经银杏内酯处理的 PAF 加血小板混合液的肺条收缩作用显著下降, IC_{50} 为 $1.13 \times 10^{-4}\text{mol/L}$,和不加银杏内酯组比较有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。

3 不同浓度 PAF 对异丙肾上腺素舒张肺条作用的影响 见表 2。

预先向浴槽中加入 $0.0382\mu\text{mol/L}$ 的 PAF,再以

表 1 各组收缩肺条作用的比较 (%)

组别	肺条数	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}
A	10	0.02	2.00	10.00	12.10	19.40
B	10	0.01	10.60 [△]	50.40 ^{△△}	87.90 ^{△△}	99.99 ^{△△}
C	10	0.01	1.00 [*]	6.30 [*]	7.10 [*]	20.30 [*]

注:与 A 组比较,^{*} $P > 0.05$;与 A 组和 C 组分别比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

表 2 各组舒张肺条作用的比较 (%)

组别	肺条数	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}
D	10	0.01	10.10	84.50	89.10	93.40	99.99
E	10	0.01	5.10	28.70 [△]	53.10 [△]	57.20 [△]	64.30 [△]
F	10	0.01	7.40	57.60	82.40 [*]	88.20 [*]	95.70 [*]

注:与 D 组比较, * $P > 0.05$; 与 D 组和 F 组分别比较, $^{\Delta} P < 0.05$

累积剂量法加入异丙肾上腺素(D 组), 异丙肾上腺素的舒张肺条作用仅受轻度影响, EC_{50} 为 2.68×10^{-6} mol/L; 但 E 组预先向浴槽中加入 $0.382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 则异丙肾上腺素的肺条舒张作用受到明显影响, EC_{50} 为 4.25×10^{-6} mol/L, 舒张率为 64.30%, 和 D 组比较, $P < 0.05$; 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进一步下降, EC_{50} 仅为 6.25×10^{-6} mol/L。

4 银杏内酯拮抗 $0.382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF 对异丙肾上腺素舒张肺条作用的影响 见表 2。

F 组预先加 1×10^{-6} mol/L 的银杏内酯加入浴槽, 然后将 $0.382 \mu\text{mol/L}$ 的 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, 则异丙肾上腺素的肺条舒张作用仍保持正常, 其作用和不加银杏内酯与 PAF 组(D 组)比, EC_{50} 分别是 2.89×10^{-6} mol/L 和 1.38×10^{-6} mol/L, $P > 0.05$ 。

讨 论

近年来的研究表明支气管哮喘是一种以嗜酸性细胞浸润为主的气道过敏性炎症(Airway Allergic Inflammation, AAI)性疾病, 而 AAI 是导致患者气道高反应性(Bronchial Hyperresponsiveness, BHR)的重要原因, PAF 则是引起 AAI 和 BHR 的重要介质。抗 PAF 治疗是哮喘治疗学的一个新方向^[5]。注射或吸入 PAF 能引起嗜酸性细胞在肺内浸润, 也能引起持续的非特异性的 BHR, 吸入 PAF $3 \sim 200 \mu\text{g}$ 所引起的支气管收缩作用比吸入乙酰甲胆碱强 37 倍^[6,7]。PAF 许多作用的产生和血小板的存在密切相关, 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^[8], 本研究也证明了这一点, 单纯 PAF 缩肺条作用的 EC_{50} 仅为 6.66×10^{-4} mol/L, 作用微弱, 而加血小板孵化液后的 EC_{50} 达到 4.69×10^{-7} mol/L, 作用明显增强($P < 0.05$)。本结果还表明在加 PAF 前先加银杏内酯, 血小板孵化液的缩肺条作用便明显减弱, EC_{50} 增至 1.13×10^{-4} mol/L,

和不加银杏内酯组相比, 差异显著($P < 0.05$), 这一结果揭示银杏内酯阻断了 PAF 和血小板膜上 PAF 受体的结合, 使血小板的激活受到影响, 不能释放介质引起肺组织收缩, 这一结果和作者在豚鼠气管条上的研究结果相一致^[2]。

Barquet 等的工作表明, PAF 能引起鼠脑组织 β_2 -肾上腺素能受体的减少^[9], Devendra 等的工作提示 PAF 能使肺组织的 β -肾上腺素受体减少^[10], 本结果表明预先加 $0.0382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 异丙肾上腺素的舒张作用仅受轻微影响, EC_{50} 为 2.68×10^{-6} mol/L, 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受到明显影响, EC_{50} 为 2.45×10^{-6} mol/L, 和不加 PAF 组相比差异较大($P < 0.05$); 如果预先加 $3.82 \mu\text{mol/L}$ PAF, 则异丙肾上腺素的作用大受影响, EC_{50} 为 6.25×10^{-6} mol/L, 而不加 PAF 组为 1.38×10^{-6} mol/L, 两组相比差异显著($P < 0.05$)。上述结果提示 PAF 能使肺组织的 β -肾上腺素受体减少, 且剂量越大, 破坏越严重。另外, 本结果还表明, 预先加 1×10^{-6} mol/L 的银杏内酯加进浴槽, 然后加 $0.382 \mu\text{mol/L}$ 的 PAF, 则异丙肾上腺素的舒张作用得到保护, EC_{50} 为 2.89×10^{-6} mol/L, 和对照组 1.38×10^{-6} mol/L 相比, 差异不大, 这一结果和 Devendra 等报告相似^[10], 提示银杏内酯能对抗 PAF 对 β -肾上腺素受体的破坏作用。上述结果和作者在豚鼠气管条上的研究结果也相一致^[2]。

总之, PAF 能激活血小板, 使之释放某些介质而致肺组织收缩, 而银杏内酯能通过和 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内酯加以拮抗, 银杏内酯是一种有希望的 PAF 受体拮抗剂, 有可能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 (下转 502 页)

尸厥这一传统医学的证候群,为现代医学中的精神病,昏迷,假死,临床死亡,脑死亡及死亡定义等概念的发展与形成描绘了一幅轮廓。“人身脉皆动而形无知也”的混沌概念中,内涵着睁眼、语言、运动与脑干等反射及生命指征,反映了大脑皮层、脑干及全脑的病变与功能。尸厥候中也指出了病情变化的动态指标:“身温而汗”示入腑,“唇正青身冷”示入脏。至于耳内“循循有如哨之声”,同样反映了尸厥患者机体的器质与功能性变化,对昏迷的分级及监护当有重要的指标价值。

客观性耳鸣患者较少见,易被漏诊或误诊,甚或忽视了严重病变而贻误病情。我国先贤对客观性耳鸣诊断与预后价值的重视,虽未上升到一定的理论水平,但丰富的临床实践,敏锐的认识能力,以及集思广益的治学学风,实为后学留下了一份宝贵的医学遗产。

西方医学对客观性耳鸣的记载也较少见;1886 年俄国的福列金(R. Vrejen)把耳鸣分为主观与客观性两类,并指出后者乃因听器或其他系统病变所致。1885 年德国的贝佐德(Bezold)把鼓膜煽动声称为“鼓室音”。1873 年鲁姆鲍尔德(Rumbard)介绍了具有客观性耳鸣的咽鼓管异常开放症。1925 年德国丹克尔(Denker A)把咽鼓管开放症纳入教科书。我国赵宗录(1933)、甘智林(1958)等也相继报告,并强调这种耳鸣平卧时减轻,直立与劳动时加重^[3,4]。如果把中国与西方文献描述客观性耳鸣的时间作比较,前后相差何止千年。

尸厥候,“华脉”等所介绍的三条客观性耳鸣案例,

都与现代医学归纳的客观性耳鸣特点有不谋而合之处。尸厥候患者出现客观性耳鸣,可能因为咽鼓管关闭的肌肉、软组织及软骨等的张力降低,使其持续性关闭或括约变成经常性的开放或松弛,呼吸气流及其与周壁的摩擦音,经过异常开放的咽鼓管进入鼓室。具“华脉”征患者出现这种耳鸣,可能因病理性血管或心脏杂音引起。耳中蚂蚁战斗之声,十分类似摩擦或弹绷指甲时发出的响声,可能是听骨肌、咽鼓管肌与咽上缩肌阵挛之故。

我国古籍中有关客观性耳鸣的记载虽然简略,但都与客观性耳鸣的特点分别吻合。这些资料可以说明,中国传统医学十分重视客观性耳鸣的临床价值,在古籍中早就有了记载,堪称开创耳鸣临床医学应用研究的先河。

参 考 文 献

1. 巢元方. 诸病源候论. 第一版. 北京:人民卫生出版社, 1982: 126.
2. 黄竹斋. 关中历代名医传(上). 陕西卫生志 1985;1:23-40.
3. 甘智林, 穆怀廉, 聂瑞增. 耳咽管异常开放. 中华耳鼻喉科杂志 1958;6:462.
4. 何永照. 姜泗长主编. 耳科学. 第一版. 上海:上海科技出版社, 1983:580-583.

(收稿:1996-08-09)

(上接 483 页)

- factor induces a platelet - dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. Eur J Pharmacol 1980;60:185-187.
2. 董竞成, 李明, 石志芸, 等. 银杏内酯拮抗血小板活化因子部分体外作用的实验研究. 中国中西医结合杂志 1995;15(10):606-608.
 3. Touray C, Etienne A, Barquet P. Inhibition of antigen - induced lung anaphylaxis in the guinea - pig by BN52021, a new specific PAF - acether receptor antagonist isolated from ginkgobiloba. Agent Act 1986;17:371-373.
 4. Murray MA. Cromakalin - induced relaxation of guinea - pig isolated trachealis: antagonism by glibenclamide and by phentolamine. Br J Pharmacol 1989;98:865-868.
 5. Clark TJH. Asthma. third edition. London: Chapman and Hall

Medical, 1993:182-183.

6. Cuss FM, Dixon CMS, Barnes PJ. Effect of inhaled platelet - activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. Lancet 1986;2:187-189.
7. Rubin AE, Smith LJ, Patterson R. Effect of platelet - activating factor(PAF) on normal human airways. Am Rev Resp Dis 1986;133(suppl):A91-93.
8. Barnes PJ. Mediators and asthma. Br J Hosp Med 1985;34(6):339-402.
9. Barquet P, Etienne A, Clostre F. Down - regulation of beta - 2 adrenergic receptors by PAF - acether antagonist BN52021. Prostaglandins 1985;30:721-724.
10. Devendra P. Ginkgolides——chemistry, biology, pharmacology and clinical perspectives. J R Prous Science Publishers, S A 1988:356-360.

(收稿:1997-02-05 修回:1997-05-12)