

穿心莲黄酮对血小板活化反应的抑制作用及机理研究*

韩谷鸣 姚倩 李洪莲 王永平

内容提要 目的:探讨穿心莲黄酮抑制血小板活化反应的途径和可能机理。方法:观察穿心莲黄酮对二磷酸腺苷(ADP)、肾上腺素、花生四烯酸(AA)、凝血酶诱导的血小板聚集、血栓素 B_2 (TXB₂) 释放、P-选择素(GMP-140)及血小板内环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)水平的影响。结果:(1)穿心莲黄酮可明显抑制 ADP、AA、肾上腺素诱导的血小板聚集,并呈明显的正相关;(2)穿心莲黄酮可明显降低凝血酶诱导的 GMP-140 水平;(3)穿心莲黄酮可明显抑制 AA 诱导的血小板 TXB₂ 的释放,并可明显升高血小板内 cAMP 的含量,对 cGMP 含量无明显影响。结论:穿心莲黄酮具有较强的抑制血小板活化反应和抗血栓形成的作用,升高血小板内的 cAMP 水平可能为其作用机理之一。

关键词 穿心莲黄酮 血小板活化 花生四烯酸 cAMP

Inhibitory Effect of Panicoon on Platelet Activation and Its Mechanism HAN Guming, YAO Qian, LI Honglian, et al *Xuzhou Geriatrics Institute, Jiangsu (221003)*

Objective: To explore the inhibitory pathway and the possible mechanism of panicoon on platelet activation. **Methods:** The effect of panicoon on platelet aggregation, thromboxane B_2 release, P-selectin (GMP-140) count, levels of cyclic AMP and cyclic GMP induced by ADP, epinephrine, arachidonic acid (AA) or thrombin were observed. **Results:** (1) Panicoon significantly inhibits platelet aggregation induced by ADP, arachidonic acid and epinephrine in a dose-dependent manner; (2) It reduces the P-selectin number on platelet surface which was stimulated by thrombin; (3) It inhibits TXB₂ release induced by AA and increases the platelet cyclic AMP level, while cyclic GMP level was not changed. **Conclusion:** Panicoon shows a potent inhibition on platelet activation and antithrombotic effect. The mechanisms seem to be related with the elevation of platelet cyclic AMP.

Key words Panicoon, platelet activation, arachidonic acid, cyclic AMP

血栓性疾病是临床上最常见的疾病之一,血小板在血栓形成中具有极其重要的作用,研究和寻找抗血栓药物已成为当前关注的课题。穿心莲黄酮为含多甲氧基、羟基的黄酮化合物⁽¹⁾,据报道含羟基黄酮对花生四烯酸(AA)环氧化酶代谢途径有抑制作用⁽²⁾;穿心莲草水煎液可明显抑制二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板一相和二相聚集⁽³⁾。本研究通过观察不同浓度穿心莲黄酮液对血小板活化反应的抑制作用,探讨穿心莲黄酮抗血小板活化作用的可能途径和机理。

材料和方法

1 材料

1.1 药物和试剂 穿心莲叶购自安徽阜阳,由徐州市药品检验所鉴定。穿心莲黄酮液由本实验室提

取、测定,用 0.05mol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液配制 20 μ g/ml、30 μ g/ml、40 μ g/ml 3 种不同浓度的穿心莲黄酮液(以下称低、中、高浓度),生药含量分别为 333 μ g/ml、500 μ g/ml、667 μ g/ml。血栓素 B_2 (TXB₂)、P-选择素(GMP-140)药盒由苏州医学院血栓室提供(放免法)。环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)药盒由上海中医药大学同位素室提供(放免法)。

1.2 诱导剂 ADP、AA 均为 Sigma 公司产品,肾上腺素(武汉制药厂产品)、凝血酶(南京大学药业公司产品)均用 0.05mol/L (pH 7.4)磷酸盐缓冲液(PBS)配制。

1.3 仪器 Am-3 型电脑血小板聚集仪为江苏丹阳电子研究所产品。FMJ-182 型免疫 γ 计数器为上海原子能研究所日环仪器厂产品。

2 方法

2.1 血小板液制备 5 名健康人外周血用 3.8%

* 江苏省科委资助项目(BJ91065)

江苏省徐州市老年病研究所(江苏 221003)

枸橼酸钠抗凝,按常规方法离心分离富血小板血浆 (PRP), 3500r/min, 离心 10min, 得贫血小板血浆 (PPP)。

2.2 抑制血小板聚集试验 取 PRP 和 PPP 入聚集杯中,在等量 PRP 中分别加入 PBS 对照和低、中、高浓度的穿心莲黄酮液,孵育 5min;再分别加入终浓度为 ADP 2mmol/L、AA 176mg/L、肾上腺素 5mmol/L 3 种诱导剂,记录血小板聚集曲线和最大聚集率。

2.3 抑制 GMP-140 作用 制备 PRP,用 PBS 缓冲液洗 PRP 3 遍,计数血小板。取血小板数为 2.5×10^6 的 PRP,分别加入 PBS 对照和低、中、高浓度的穿心莲黄酮液,孵育 5min 后,分别加入终浓度为 0.5u/ml 的凝血酶孵育 3min,再分别加入 GMP-140 单克隆抗体,反应 30min;PBS 缓冲液洗 3 遍,用 γ 计数器测量,计数血小板的 GMP-140 数目。

2.4 对血小板释放血栓素 A_2 (TXA₂) 及血小板内 cAMP、cGMP 作用 制备 PRP,计数和调整血小板数目至 20 万/ μ l,分别加入 PBS 对照和低、中、高浓度的穿心莲黄酮液,孵育 5min;再分别加入终浓度为 176mg/L 的 AA 3 μ l,记录聚集曲线和最大聚集率;立即 3500r/min,离心 10min,取上清液稀释 1000 倍,测定 TXB₂ 含量。在沉淀中加入 300 μ l PBS 缓冲液,低温冻溶 5 次,破坏血小板,测定 cAMP、cGMP 含量。

3 统计学方法 组间比较用方差分析。

结 果

1 穿心莲黄酮对血小板聚集抑制作用比较 见表 1。低、中、高浓度的穿心莲黄酮液均可明显抑制 ADP、AA、肾上腺素诱导的血小板聚集 ($P < 0.01$),抑制作用与剂量呈明显正相关 ($r = 0.998, 0.996, 0.988, P < 0.05, P < 0.01$);ADP 诱导的血小板聚集穿心莲黄酮半抑制浓度 (Ic₅₀) 为 23.3mg/L, AA 诱导的 Ic₅₀ 为 19.8mg/L, 肾上腺素诱导的 Ic₅₀ 为 21.4mg/L;高浓度穿心莲黄酮液对 ADP、AA、肾上腺素诱导的血小板聚集的抑制率分别为 77.38%、96.62%、92.67%。

表 1 穿心莲黄酮对不同诱导剂诱导的血小板聚集抑制作用比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ADP(2mmol/L)	AA(176mg/L)	肾上腺素(5mmol/L)
PBS 对照	60.87 $\pm$ 6.46	78.80 $\pm$ 13.07	68.23 $\pm$ 10.49
穿心莲黄酮低	37.68 $\pm$ 9.06 *	38.90 $\pm$ 8.50 *	37.09 $\pm$ 8.35 *
中	26.80 $\pm$ 7.68 * Δ	17.85 $\pm$ 6.20 * Δ	16.73 $\pm$ 6.90 * Δ
高	13.77 $\pm$ 5.87 * Δ $\blacktriangle$	2.66 $\pm$ 2.66 * Δ $\blacktriangle$	5.00 $\pm$ 3.69 * Δ $\blacktriangle$

注:与 PBS 对照组比较, * $P < 0.01$;与低浓度组比较, $\Delta P < 0.01$;与中浓度组比较, $\blacktriangle P < 0.01$;每组样本数为 5

2 穿心莲黄酮对血小板 GMP-140 的作用 5 份

标本 GMP-140 为 (792 $\pm$ 89) 分子数/血小板,凝血酶刺激后 GMP-140 水平为 (9377 $\pm$ 1775) 分子数/血小板;低、中、高浓度穿心莲黄酮液加凝血酶刺激的 GMP-140 水平分别为 (5961 $\pm$ 1070)、(3351 $\pm$ 783)、(2013 $\pm$ 403) 分子数/血小板,均明显低于凝血酶刺激不加药物组 ($P < 0.01$),抑制率分别为 36.43%、64.26%、78.53%,抑制率与药物剂量呈明显正相关 ($r = 0.983, P < 0.05$)。

3 穿心莲黄酮对 AA 诱导的 TXB₂ 释放及血小板内 cAMP、cGMP 的影响 见表 2。不同浓度穿心莲黄酮液 TXB₂ 水平均明显低于 PBS 对照组 ($P < 0.01$),穿心莲黄酮剂量与 TXA₂ 释放量呈明显的负相关 ($r = -0.992, P < 0.01$);低、中、高浓度穿心莲黄酮对 TXA₂ 的抑制率分别为 32.40%、53.92%、68.01%;不同浓度的穿心莲黄酮均可明显升高血小板内 cAMP 水平 ($P < 0.01$),对 cGMP 含量无明显影响 ($P > 0.05$)。

表 2 穿心莲黄酮对 AA 诱导的 TXB₂ 释放及血小板内 cAMP、cGMP 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TXB ₂ (μ g/L)	cAMP(nmol/L)	cGMP(nmol/L)
PBS 对照	864.5 $\pm$ 167.9	2.54 $\pm$ 0.38	0.89 $\pm$ 0.14
穿心莲黄酮低	584.4 $\pm$ 156.6 *	3.68 $\pm$ 0.45 *	0.88 $\pm$ 0.20
中	398.4 $\pm$ 119.7 * Δ	3.96 $\pm$ 0.51 *	0.92 $\pm$ 0.18
高	276.6 $\pm$ 68.3 * Δ $\blacktriangle$	5.65 $\pm$ 0.78 * Δ $\blacktriangle$	0.93 $\pm$ 0.21

注:与 PBS 对照组比较, * $P < 0.01$;与低浓度组比较, $\Delta P < 0.01$;与中浓度组比较, $\blacktriangle P < 0.01$;每组样本数为 5

讨 论

血小板活化作用是引起动脉粥样硬化、动脉血栓形成的关键因素。血小板在各种诱导剂的作用下可以发生各种活化反应,根据活化反应的强弱,可以将诱导剂分为弱诱导剂如 ADP、肾上腺素,强诱导剂如凝血酶,花生四烯酸则介于两者中间。穿心莲黄酮不仅能抑制弱诱导剂 ADP、肾上腺素诱导的血小板一相、二相聚集,而且能抑制花生四烯酸诱导的血小板聚集、TXA₂ 释放及强诱导剂凝血酶刺激的血小板 GMP-140 水平,且这些抑制作用与黄酮剂量呈明显的相关关系。TXA₂ 是花生四烯酸环氧化酶重要的代谢产物,具有强烈的收缩血管和促进血小板聚集作用;GMP-140 已被归类为细胞粘附因子,既在血小板活化、粘附中起关键作用,又在多形核白细胞、单核细胞游向内皮,维持其在内皮游动,最终粘附于内皮这一过程起决定性作用。而且 GMP-140 是目前所知反映血小板活化与释放反应最特异的标志物^[4]。本研究结果表明穿心莲黄酮是一种较特异、多途径、强烈的血小板活化抑制剂,

并可能具有抑制细胞粘附的作用。

各种诱导剂作用于血小板时首先与其特异的受体相作用,通过共同途径第二信使,促使血小板活化。cAMP、cGMP 是细胞内信息传递的第二信使,血小板内 cAMP 增加时血小板的敏感性降低,已经证明很多抗血小板药物是通过增加血小板内 cAMP 的水平来抑制血小板的聚集活化。穿心莲黄酮能够抑制多种诱导剂对血小板的活化反应,升高血小板内 cAMP 的水平,表明穿心莲黄酮不可能通过作用于某一种诱导剂的特异受体,而是通过增加 cAMP 生成这一共同途径实现抑制血小板的活化反应。另据报道穿心莲黄酮抑制血小板聚集的机理可能与抑制钙调蛋白的活力有关^[5]。提示穿心莲黄酮抑制血小板活化反应是多途径的。

参 考 文 献

1. 北京医学院. 中草药成分化学. 北京: 人民卫生出版社, 1980; 306—308.
2. 林启寿. 中草药成分化学. 北京: 科学出版社, 1977: 312—315.
3. 谭 获, 唐锦治. 穿心莲抗血小板聚集功能研究. 中西医结合杂志 1989; 9(9): 540—542.
4. 许丹焰. P-选择素在心血管疾病中的研究进展. 国外医学生理病理科学与临床分册 1997; 17(3): 252—254.
5. 聂 磊, 周世豪, 许教文, 等. 穿心莲有效成分 APIO134 抗血小板聚集的机理. 中山医科大学学报 1994; 15(2): 100—103.

(收稿: 1999-07-20 第 2 次修回: 2000-03-03)

复方丹参注射液佐治肺炎支原体肺炎 38 例

刘学工 张积平 张淑芳 韩金粉

1994 年 9 月—1998 年 8 月,我们在常规抗炎治疗的基础上加用复方丹参注射液佐治肺炎支原体肺炎患儿 38 例,并与常规治疗的 43 例作对照,现报告如下。

临床资料 所有病例为在我院诊断为肺炎支原体肺炎的住院患儿,符合临床诊断标准(左启华主编. 儿科学. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 189),同时血冷凝集试验 $\geq 1:32$ 。以上病例单盲随机(单住院为丹参组,双日为对照组,忽略天气影响)分为两组。丹参组 38 例,男 21 例,女 17 例,年龄 3~13 岁,平均 (8.24 ± 2.61) 岁;病程 6~19 天,平均 (10.11 ± 3.28) 天。均有咳嗽,多为刺激性咳嗽,胸痛 7 例,痰带血丝 1 例。伴发热 21 例,8 例肺内可闻及干湿性罗音,均有明显 X 线改变,多呈片状阴影或肺门影增大,下肺易见。其中双侧病变 13 例,右侧 18 例,左侧 7 例。对照组 43 例,男 25 例,女 18 例,年龄 3~12 岁,平均 (8.26 ± 2.23) 岁;病程 5~23 天,平均 (10.14 ± 3.66) 天。均有咳嗽,胸痛 15 例,伴发热 29 例,12 例肺内可闻及干湿性罗音,均有明显 X 线改变。其中双侧病变 15 例,右侧 22 例,左侧 6 例。两组患儿在性别、年龄、病程、病情轻重程度等方面无显著性差异。

治疗方法 两组患儿均给予红霉素(大连制药厂生产,批号: 940611) 25mg/kg 加入 5% 葡萄糖注射液 250~500ml 中静脉滴注,每天 1 次,连续用 10~14 天为 1 个疗程。疗程结束后,个别仍有轻微咳嗽者需再口服红霉素,每天 30mg/kg,分 4 次口服,约 1 周左右。丹参组在上述治疗同时予复方丹参注射液(上海第一制药厂生产,每支 2ml,含丹参、降香生药各 2g,批号: 940103) 0.3ml/kg 加入 10% 葡萄糖注射液 100ml 中静脉滴注,每天 1 次,疗程同前。观察并记录患儿相关症状及体征。

两组患儿在恢复期每 4~7 天复查胸片至正常。统计学方法: 率的比较用 χ^2 检验,组间均值比较用 t 检验。

结 果 (1) 疗效评定标准参照《小儿呼吸道疾病诊治经验与进展》(冯益真,李炳臣,石在新主编. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 175) 制定。治愈: 治疗 7 天,临床症状与体征消失;显效: 体温正常,肺部症状及体征明显好转;有效: 体温正常,肺部症状及体征好转;无效: 症状体征无改善或加重。(2) 两组总疗效比较: 丹参组治愈 8 例 (21.1%), 显效 17 例 (44.7%), 有效 11 例 (28.9%), 无效 2 例 (5.3%), 愈显率 65.8%, 总有效率 94.7%; 对照组治愈 7 例 (16.3%), 显效 11 例 (25.6%), 有效 15 例 (34.9%), 无效 10 例 (23.3%), 愈显率 41.9%, 总有效率 76.7%。两组愈显率及总有效率比较均有显著性差异 ($\chi^2 = 4.64, P < 0.05; \chi^2 = 3.85, P < 0.05$)。(3) 两组症状及 X 线改善情况比较: 退热时间: 丹参组平均 (6.14 ± 1.59) 天; 对照组平均 (6.55 ± 1.64) 天, 两组比较无显著性差异。咳嗽基本消失时间: 丹参组平均 (9.95 ± 2.58) 天, 对照组平均 (12.23 ± 5.55) 天, 两组比较有显著性差异 ($t = 2.292, P < 0.05$)。X 线改变恢复正常时间: 丹参组平均 (15.61 ± 6.11) 天, 对照组平均 (18.79 ± 6.84) 天, 两组比较有显著性差异 ($t = 2.169, P < 0.05$)。

讨 论 肺炎支原体感染后,可通过直接侵犯及损伤免疫系统致病。红霉素可通过抑制蛋白质合成达到抗支原体作用,但不能对已经形成的直接损伤及免疫损伤起治疗作用。复方丹参的有效成分丹参酮 II-A 磺酸钠和丹参素能够扩张小血管,改善肺及毛细支气管微循环;能够调节机体免疫状态,抑制炎症介质释放,起到抗炎作用。本临床观察表明复方丹参注射液佐治肺炎支原体肺炎可明显缩短病程,提高疗效。

(收稿: 1999-11-17 修回: 2000-03-07)