

· 实验研究 ·

芦丁抑制家兔血小板激活因子诱导血小板活化作用的实验研究*

陈文梅 金 鸣 吴 伟 李金荣 臧宝霞 朴永哲

内容提要 目的:观察芦丁对家兔血小板激活因子(PAF)诱导血小板聚集、5-羟色胺(5-HT)释放、血小板内游离钙离子浓度的影响及其机理。方法:以比浊法测定家兔洗涤血小板(WRP)聚集率,邻苯二甲酰(OPT)荧光分光光度法测定 5-HT 含量,以 Fura-2 荧光分光光度法测定血小板内游离钙离子浓度的变化。结果:芦丁体外呈浓度依赖性抑制 PAF(9.55×10^{-9} mol/L)诱发的 WRP 聚集、5-HT 释放作用,IC₅₀ 分别为 0.73、1.13 mmol/L,同时 68.3、136、274、545 μ mol/L 芦丁剂量依赖地抑制 PAF(4.78×10^{-10} mol/L)引起的血小板内游离钙浓度增高。结论:芦丁可抑制 PAF 诱导的血小板聚集、5-HT 释放及血小板内游离钙浓度增加。

关键词 芦丁 血小板聚集 血小板激活因子 5-羟色胺 游离钙

Experimental Study on Inhibitory Effect of Rutin against Platelet Activation Induced by Platelet Activating Factor in Rabbits CHEN Wen-mei, JIN Ming, WU Wei, et al *Beijing Institute of Heart, Lung and Vascular Diseases, Beijing (100029)*

Objective: To explore the inhibitory effect and mechanism of rutin against platelet activating factor (PAF) induced platelet aggregation, 5-HT release and intra-platelet free calcium concentration. **Methods:** The rate of washed rabbit platelet (WRP) aggregation was measured by turbidimetry and O-phthaldialdehyde (OPT) fluoro-spectrophotometry (FSPM) was used to determine 5-HT content. The intraplatelet free calcium concentration was measured with Fura-2/AM FSPM assay. **Results:** Rutin in vitro was concentration-dependently inhibiting PAF(9.55×10^{-9} mol/L) induced WRP aggregation, the IC₅₀ of 5-HT release was 0.73, 1.13 mmol/L respectively and the intraplatelet free calcium concentration elevation evoked by PAF(4.78×10^{-10} mol/L) were inhibited by 68.3, 136, 274, 545 μ mol/L of rutin dose-dependently. **Conclusion:** Rutin could inhibit PAF induced platelet aggregation, 5-HT release and the increase of intraplatelet free calcium.

Key words rutin, platelet aggregation, platelet activating factor, 5-HT, free calcium

芦丁(rutin)又名芸香甙,为一来源很广的黄酮醇甙化合物。已发现芦丁具有降低毛细血管通透性、抗炎、抗病毒、镇痛、抗氧化等多方面药理活性。我室发现红花的水溶性成分红花黄色素具有抗血小板激活因子(platelet activating factor, PAF)作用,为一新的 PAF 受体拮抗剂^[1,2]。芦丁为红花所含成分,与红花黄色素结构有类似之处,故我们观察了芦丁对 PAF 诱导的血小板聚集、释放及血小板内游离钙离子浓度的影响,以探讨红花活血化瘀的作用机理。

材料与方法

1 药品与试剂 芦丁为上海试剂二厂产品,以二甲基亚砜(DMSO)配制。PAF 购自 Sigma 公司,银杏总内酯(Ginkgolide)由南京药科大学姜凤昌教授提供,总内酯含量 81.4%,其中 Ginkgolide A 含量 39.6%,Ginkgolide B 含量 39.9%,Ginkgolide C 含量 2.0%。邻苯二甲酰(OPT)购自北京市化学试剂公司,用 1% 无水乙醇溶液加入 10 mol/L HCl 配成 0.05% 溶液,褐色瓶 4℃ 保存,1 个月内使用。5-羟色胺硫酸肌酐购自 Sigma 公司,其标准存储液浓度 60 mg/L,4℃ 保存,临用前稀释为 500 μ g/L 标准应用液,以分析纯经重蒸馏的 DMSO 将 Fura-2/AM 购自 Sigma 公司配成 1 mmol/L 存

* 国家自然科学基金课题(No. 39670884),北京市跨世纪科技人才工程及北京市高科技实验室课题资助项目

北京市心肺血管疾病研究所药理研究室(北京 100029)

储液,分装后 -30°C 避光保存,Triton X-100 为 FARCO CHEMICAL SUPPLIES 产品,其余试剂均为国产分析纯。

2 动物 新西兰大耳白兔,雄性,体重 $(2.0 \pm 0.5) \text{ kg}$,购自国家药品监督管理局药品检验所,为一级合格动物。

3 仪器 Chrono-log 型血小板聚集仪;日本 HITACHI F-2000 型荧光分光光度计。

4 实验方法

4.1 洗涤血小板悬液制备 参照文献⁽³⁾方法,兔耳正中动脉取血,ACD(柠檬酸钠 85 mmol/L ,柠檬酸 71 mmol/L ,葡萄糖 110 mmol/L)与全血以 $1:6$ 体积比抗凝, $30 \times \text{g}$ 离心 5 min ,取上清液富含血小板血浆(PRP) $500 \times \text{g}$ 离心 5 min ,弃上清,沉淀的血小板以 $\text{pH } 7.4$ 血小板洗涤液($\text{NaCl } 300 \text{ mmol/L}$, $\text{EDTA } 4 \text{ mmol/L}$, $\text{Tris } 5 \text{ mmol/L}$)洗涤两次,最后将血小板混悬于 $\text{pH } 7.4$ TT-牛血清白蛋白台氏液(TTBSA 溶液, $\text{KCl } 2.62 \text{ mmol/L}$, $\text{MgCl}_2 1.0 \text{ mmol/L}$, $\text{NaCl } 137 \text{ mmol/L}$, $\text{CaCl}_2 1.3 \text{ mmol/L}$, $\text{Tris } 10 \text{ mmol/L}$,葡萄糖 5.6 mmol/L , 0.25% 牛血清白蛋白(BSA))中即为兔洗涤血小板(WRP)。以 TTBSA 调节血小板浓度为 $2.5 \times 10^{11}/\text{L}$ 。

4.2 血小板聚集性测定 实验分为 DMSO 对照管、银杏总内酯管及不同剂量芦丁管。取上述 WRP $180 \mu\text{l}$ 分别加入 DMSO、银杏总内酯或芦丁各 $10 \mu\text{l}$,加入 $1.91 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ PAF- 0.25% BSA-生理盐水 $10 \mu\text{l}$, 37°C 下描记聚集曲线,计算血小板聚集率及药物对血小板聚集抑制率(I),以观察芦丁对 PAF 诱导血小板聚集的抑制作用。

$$I = [(100\% - \text{加药管血小板聚集率}) / \text{DMSO 管血小板聚集率}] \times 100\%$$

4.3 血小板释放 5-HT 的测定 参照文献⁽⁴⁾方法,按上述兔血小板聚集性测定方法进行血小板聚集反应,反应混合液 $500 \times \text{g}$ 离心 10 min ,取上清 0.3 ml 为测定样品,并平行测定 $0.3 \text{ ml } 500 \mu\text{g/L}$ 5-HT 标准溶液。各实验管分别依次加入 TTBSA 0.7 ml 、 100% 三氯乙酸 0.3 ml 混匀, $1500 \times \text{g}$ 离心 20 min ,取上清,各加入 OPT/HCl 液混匀,沸水浴煮 10 min ,冰水冷却 10 min ,各加三氯甲烷 2 ml 混匀, $1500 \times \text{g}$ 离心 20 min ,各取上清 1 ml 测定荧光。荧光激发波长 $\text{Ex } 360 \text{ nm}$,发射波长 $\text{Em } 475 \text{ nm}$ 。记录各测定管的荧光值。每一剂量芦丁保护实验分别以该浓度芦丁的 TTBSA 稀释液 0.3 ml 为本底荧光对照管,依上述测定方法平行操作,芦丁保护管测定数据与同浓度芦丁本底荧光对照管数据相减,以校正芦丁的自身荧光。最后根据标准管和

各样品管的荧光值计算出各管的 5-HT 的含量。

4.4 血小板内游离钙离子浓度的测定 参照文献⁽⁵⁾方法,依洗涤血小板悬液制备法制得血小板沉淀,用 $\text{pH } 7.4$ Hepes 缓冲液($\text{NaCl } 145 \text{ mmol/L}$, $\text{KCl } 5 \text{ mmol/L}$, $\text{MgSO}_4 1 \text{ mmol/L}$,葡萄糖 5 mmol/L ,Hepes 10 mmol/L , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 0.5 \text{ mmol/L}$,BSA 0.25%)混悬。调整血小板浓度为 $3.5 \times 10^{11}/\text{L}$ 。向血小板混悬液中加入 Fura-2/AM,使终浓度为 $2 \mu\text{mol/L}$, 37°C 恒温振摇 40 min 。用 Hepes 缓冲液洗涤两次, $500 \times \text{g}$ 离心 5 min ,分离洗涤液后加 Hepes 缓冲液悬浮,即得 Fura-2 负载血小板悬液。实验分对照管,银杏总内酯管及不同浓度的芦丁保护管。测定时取 Fura-2 负载血小板悬液 0.56 ml ,加入 0.1 mol/L CaCl_2 $6 \mu\text{l}$ 。各实验管分别加入 DMSO、银杏总内酯或各种不同浓度的芦丁 $10 \mu\text{l}$, 37°C 预热 3 min 后放入比色池,设荧光激发波长 Ex 为 340 nm 及 380 nm ,发射波长 Em 为 510 nm ,记录时间扫描曲线,于第 $20 \sim 30 \text{ s}$ 之间加入 $1.91 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ PAF 0.25% BSA 生理盐水 $15 \mu\text{l}$,继续记录时间扫描曲线。设静息状态 $\text{Ex } 340 \text{ nm}$ 、 380 nm 荧光强度分别为 $F_{r340 \text{ nm}}$ 、 $F_{r380 \text{ nm}}$,加入 PAF 后相应荧光强度分别为 $F_{p340 \text{ nm}}$ 、 $F_{p380 \text{ nm}}$ 。因芦丁干扰使荧光数据偏低,故按下法对芦丁管测定值进行校正:设 $\Delta F_{340 \text{ nm}} = (\text{DMSO 管 } F_{r340 \text{ nm}} - \text{各芦丁管 } F_{r340 \text{ nm}})$, $\Delta F_{380 \text{ nm}} = (\text{DMSO 管 } F_{r380 \text{ nm}} - \text{各芦丁管 } F_{r380 \text{ nm}})$, $F_{E340 \text{ nm}} = (\text{各芦丁管 } F_{p340 \text{ nm}} + \Delta F_{340 \text{ nm}})$, $F_{E380 \text{ nm}} = (\text{各芦丁管 } F_{p380 \text{ nm}} + \Delta F_{380 \text{ nm}})$ 。由于双波长测定法测得两波长数据之比 $F_{340 \text{ nm}}/F_{380 \text{ nm}}$ 与血小板内游离 Ca^{2+} 浓度呈平行关系⁽⁶⁾,我们以 DMSO 管的 $F_{r340 \text{ nm}}/F_{r380 \text{ nm}}$ 对应静息状态下血小板内游离钙含量,DMSO 管的 $F_{p340 \text{ nm}}/F_{p380 \text{ nm}}$ 对应 PAF 刺激后血小板内游离钙含量,测定加入芦丁后 $F_{E340 \text{ nm}}/F_{E380 \text{ nm}}$ 对应该状态下血小板内游离钙含量,以反映药物的作用。本实验数据均为同一动物同次取血 3 管平行测定所得均值。

5 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理用方差分析。

结 果

1 芦丁对 PAF 诱导血小板聚集的影响 见表 1。芦丁体外给药能明显抑制 PAF($9.55 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$)诱导的兔血小板聚集,并呈剂量依赖性。低剂量芦丁(0.20 、 0.41 mmol/L)不能抑制 PAF 所致的聚集作用,高剂量芦丁(0.82 、 1.23 、 1.64 mmol/L)则有明显抑制 PAF 的作用。 IC_{50} 为 0.73 mmol/L 。

2 芦丁对 PAF 诱导血小板释放 5-HT 的影响
见表 2。PAF 诱导的聚集反应后测定上清液 5-HT 含量,发现芦丁抑制 PAF(9.55×10^{-9} mol/L)诱导血小板释放 5-HT 的作用呈明显的量效关系。其 IC_{50} 为 1.13mmol/L。

3 芦丁对 PAF 诱导血小板内游离钙离子浓度的影响
见表 3。结果表明,芦丁为 68.3、136、274、545 μ mol/L 时分别使 F_{E340nm}/F_{E380nm} 降低到 3.00、2.65、2.38、2.26,提示该药可剂量依赖性地缓解 PAF(4.78×10^{-10} mol/L)诱导血小板内游离钙离子浓度升高。

表 1 芦丁对 PAF 诱导血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	聚集率(%)	抑制率(%)
对照	3	49.1 $\pm$ 8.4	
银杏总内酯	3	22.1 $\pm$ 4.1 *	55.0
芦丁	3	42.9 $\pm$ 5.2	12.6
	3	41.6 $\pm$ 6.2	15.3
	3	29.4 $\pm$ 5.2 *	40.1
	3	6.8 $\pm$ 1.7 *	86.1
	3	7.3 $\pm$ 1.7 *	85.2

注:与对照组比较,* $P<0.01$;下表同
表 2 芦丁对 PAF 诱导血小板释放 5-HT 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	5-HT(μ mol/L)	抑制率(%)
对照	3	5.68 $\pm$ 0.12	
银杏总内酯	3	2.44 $\pm$ 0.09 *	56.8
芦丁	3	5.42 $\pm$ 0.08 *	4.5
	3	4.70 $\pm$ 0.07 *	16.8
	3	3.21 $\pm$ 0.08 *	43.6
	3	2.26 $\pm$ 0.09 *	60.5

表 3 芦丁对 PAF 诱导血小板内游离钙离子浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	F_{E340nm}/F_{E380nm}
对照	3	6.28 $\pm$ 0.63
银杏总内酯	3	3.44 $\pm$ 0.39 *
芦丁	3	3.00 $\pm$ 0.07 *
	3	2.65 $\pm$ 0.07 *
	3	2.38 $\pm$ 0.04 *
	3	2.26 $\pm$ 0.01 *

讨 论
本实验结果表明,芦丁不仅对 PAF 诱导的血小板聚集、释放均有明显的抑制作用,同时还抑制 PAF 激活血小板内游离钙浓度升高。目前认为 PAF 为血小板激活的第 3 条途径。PAF 是迄今发现的最强的血小板聚集激活剂,它可由血小板、白细胞、内皮细胞等多种细胞产生并具有广泛的生物活性,在许多疾病过程中起介导作用,与组织缺血再灌注损伤、冠心病、动脉粥样硬化、脑血管疾病等诸多心脑血管疾病密切相关。因细胞内钙离子参与血小板功能调节,钙作为一

种始动因子触发其聚集和释放功能。细胞内钙离子升高又激活血小板,促进其聚集、释放反应。导致血液循环障碍进一步发展。本实验结果提示芦丁可能通过抑制 PAF 所致血小板内钙离子内流而使血小板活化受到抑制,从而起到保护心血管的作用。

芦丁在植物界中分布非常广泛,有研究证明芦丁可以抑制低密度脂蛋白脂质过氧化作用⁽⁶⁾,提高机体在缺血再灌注中清除氧自由基的能力,抑制氧自由基介导的生物膜损害⁽⁷⁾。而 PAF 在动脉粥样硬化形成、缺血再灌注损伤的发生发展和转归中具有重要作用。所以研究芦丁抗 PAF 作用可以为芦丁的应用提供指导。本实验结果表明,芦丁抗 PAF 作用与 PAF 受体拮抗剂银杏总内酯的作用相似。所以我们推测芦丁的作用部位最可能在血小板膜上,它可能竞争性地抑制 PAF 与其受体的结合,拮抗 PAF 的生物效应。但这一推测还有待于受体结合实验结果的支持。

芦丁为中药红花的重要成分,红花是活血化瘀药,具有活血通经、祛瘀止痛的功效。临床常用红花制剂治疗冠心病、心绞痛、脑血栓及血管性疾病,红花缓解循环障碍疗效可能与芦丁抗 PAF 效应有关。我室前期的研究工作已证明红花的水溶性成分红花黄色素有抗 PAF 的作用⁽¹⁾,芦丁为黄酮醇甙化合物,水溶性较差,为红花醇提物所含成分,研究其抗 PAF 作用的机理亦可为红花的研究和开发提供理论指导。

参 考 文 献

1. 陈文梅,金 鸣,吴 伟,等. 红花黄色素抑制血小板激活因子诱导的血小板活化作用的研究. 中国药学杂志 2000 ;35 (11):741—744.
2. 金 鸣,吴 伟,陈文梅,等. 红花总黄色素体外抑制血小板激活因子受体结合作用的研究. 中国药学杂志 2001 ;36 (3):167—169.
3. LaLau Keraly C , Delautier D , Delebassee D , et al. Inhibition by ticlopidine of PAF-acether induced in vitro aggregation of rabbit and human platelets. Thromb Res 1984 ;34:463.
4. 侯永生,杨淑和,刘作芳,等. 血小板内及血浆中 5-羟色胺的荧光测定方法. 中国医科大学学报 1984 ;13 (3):44—47.
5. 房 祥,汤显良,郭兆贵. Fura-2 荧光比值法测定血小板胞浆内游离钙浓度. 湖南医科大学学报 1993 ;18 (2):209—211.
6. 阎道广,周 玫,陈 媛. 芦丁、槲皮素对已受到 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 氧化修饰的低密度脂蛋白的抑制作用. 第一军医大学学报 1995 ;15 (2):103—106.
7. 卢明珍,卢彦珍,王黎敏. 芦丁对大鼠缺血再灌注心肌保护作用的研究. 山西临床医药杂志 1999 ;8 (1):10—12.

(收稿 2001—03—20 修回 2001—06—21)