

3,4-二羟基苯乙酮对兔血小板功能的影响

汪 钟 高海泉 安 岩 朱国强 (中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

杨志明 (北京制药工业研究所, 北京 100020)

提要 3,4-二羟基苯乙酮(DHAP)在体外或在体内都明显抑制ADP、胶原和花生四烯酸(AA)诱导的兔血小板聚集,同时也明显抑制胶原和AA诱导的血小板释放5-HT和肝素中和因子,剂量与效应相关。在体外,PGE₁既加强对聚集的抑制,也增强DHAP升高

血小板cAMP作用。DHAP升高血小板cAMP可能是其抑制血小板功能的机理。

关键词 3,4-二羟基苯乙酮; 富含血小板血浆; 血小板聚集; [¹⁴C] 5-HT释放; 二磷酸腺苷; 胶原; 花生四烯酸; 血小板cAMP

1983年4月25日收稿 1983年12月19日修回

3,4-二羟基苯乙酮 (3,4-dihydroxyacetophenone, DHAP) 是从秃毛冬青 (*Ilex pubescens* Hook. et Arn. var. *glaber* Chang) 叶中分离的有效成分, 对冠心病心绞痛有改善作用。动物实验证实, DHAP 明显增加狗冠脉血流量, 降低冠脉阻力和心肌耗氧量⁽¹⁾。鉴于血小板在冠心病, 动脉粥样硬化发生发展中起着重要作用, 我们观察了 DHAP 对兔血小板功能的影响。

材料与方 法

DHAP 由北京制药工业研究所供给。ADP (西德 Mannheim GmbH)。花生四烯酸钠 (Sigma)。[¹⁴C]5-HT (Amersham)。胶原 (自制, 取 1 g 兔跟腱, 剪碎, 加 5 ml 生理盐水制成匀浆, 离心取上清液), 肝素钠 (145 U/mg, 郑州市畜产综合加工厂)。牛凝血酶 (100 U/支, 天津市生化制品厂)。PGE₁ (长春白求恩医科大学)。

血小板聚集仪 (BS 631 型, 北京生化仪器厂)。

测定血小板聚集

1. 体外实验 兔颈动脉放血, 3.8% 枸橼酸钠抗凝 (血为抗凝剂比为 9:1)。离心分离富含血小板血浆 (PRP, 200 × g, 8 min) 及贫血小板血浆 (PPP, 1200 × g, 10 min)。PRP 中血小板计数为 40 × 10⁷/ml 左右。每次实验前记录仪应调好零点, 并用 PRP 调至记录纸 10 格处, PPP 调至 90 格处 (记录纸全程为 100 格)。0.05 ml DHAP 或盐水与 0.45 ml PRP 于 37℃ 温育 15 min。含 DHAP 的 PRP 和对照 PRP 的 pH 均为 7.6。按比浊法⁽²⁾测定血小板聚集程度, 观察药物对 ADP (0.01 mM)、胶原 (10 μl) 或 AA (0.35 mM) 诱导血小板聚集的影响。

$$\text{聚集\%} = (\text{聚集格数}/80) \times 100$$

$$\text{聚集抑制\%} = [(\text{对照聚集\%} - \text{药物聚集\%})/\text{对照聚集\%}] \times 100$$

2. 体内实验 兔体重为 2 ± 0.25 kg, 将兔分为两组, 一组股 iv DHAP 60 mg/kg, 另

一组 iv 相同容量的生理盐水。注射前及注射后 10, 20, 30, 40 min 分别取血, 离心分离 PRP, 上述 3 种诱导剂全部采用阈剂量, 所谓阈剂量即引起兔至少产生 40% 以上聚集的最小剂量, 观察体内给药对 ADP (3-10 μM)、胶原 (0.6-4 μl) 或 AA (0.12-0.21 mM) 诱导血小板聚集程度的影响。注射药物与盐水前后 PRP 中血小板计数无明显差别。

血小板 [¹⁴C] 5-HT 释放反应测定 采用 [¹⁴C] 5-HT 标记 PRP, 然后用诱导剂诱导血小板释放 5-HT 的方法进行⁽³⁾, 每 ml PRP 中加入 [¹⁴C] 5-HT 生理盐水溶液 0.1 μCi, 37℃ 温育 25 min, 血小板对 [¹⁴C] 5-HT 的摄取率为 80% 左右。0.45 ml 含 [¹⁴C] 5-HT 的 PRP 与 DHAP 0.05 ml 或生理盐水再温育 15 min, 加入 ADP (0.01 mM)、胶原 (10 μl) 或 AA (0.35 mM) 于 37℃ 搅拌 5 min 后, 置冰浴内并加 5% EDTA 10 μl 终止反应, 离心 (12000 × g, 4 min) 取 0.1 ml 上清加入 10 ml 甲苯闪烁液计数, 即对照或药物计数; 取 0.5 ml 含 [¹⁴C] 5-HT 的对照 PRP, 离心 (12000 × g, 4 min), 然后再取 0.1 ml 上清加 10 ml 甲苯闪烁液计数为上清计数; 取 0.1 ml 含 [¹⁴C] 5-HT 的 PRP 加 10 ml 甲苯闪烁液计数为总计数。药物抑制血小板 [¹⁴C] 5-HT 的释放率按下列公式计算:

$$\text{摄取\%} = [(\text{总计数} - \text{上清计数})/\text{总计数}] \times 100$$

$$\text{释放\%} = [(\text{样品(对照或药物)计数} - \text{上清计数})/\text{总计数}] \times 100$$

$$\text{释放抑制\%} = [(\text{对照释放\%} - \text{样品释放\%})/\text{对照释放\%}] \times 100$$

血小板肝素中和活性 (heparin neutralizing activity, HNA) 测定 按肝素凝血酶凝固时间 (heparin thrombin clotting time, HTCT) 法⁽⁴⁾略加修改。DHAP 或生理盐水与 PRP 于 37℃ 温育 15 min, 然后在搅拌下分别加 ADP (0.01 mM), 胶原 (10 μl) 或 AA (0.35 mM) 搅拌 (1200 rpm) 5 min, 置冰浴 3 min 停止反应。离心沉淀血小板, 取 0.1 ml PPP 加入肝素 0.1 ml (0.06

U), 20 s 后加凝血酶 0.1 ml (1 U), 连续挑丝, 记录开始出现凝丝的 HTCT. 血小板释放 HNA 愈多, HTCT 愈短. 对照 PRP 的平均 HTCT 为 15 s 左右. 实验中所用凝血酶的纤维蛋白凝固时间为 6.9 ± 2.0 s. 观察 HTCT 的改变作为药物影响血小板释放 HNA 的指标.

血小板 cAMP 含量测定 血小板 cAMP 提取主要采用三氯醋酸法⁽⁵⁾. Eppendorf 微量试管下层放 0.2 ml 含 14% 蔗糖的 5% TCA, 中层为 0.3 ml 邻苯二甲酸二丁酯, 上层铺 1 ml 预先与 DHAP 或生理盐水温育 (37°C, 15 min) 的 PRP 或与 PGE₁ 温育 (37°C, 4 min) 的 PRP. 离心 (15000 × g, 4 min), 取上清, 用水饱和和乙醚提取 3 次, 弃乙醚, 最后取 300 μl cAMP 提取液在 50°C 水浴充氮蒸干. 用 150 μl Tris EDTA 缓冲液 (pH 7.5) 悬浮样品, 然后取 50 μl 按蛋白激酶结合法 (PKB)⁽⁶⁾ 测定 cAMP 含量 (pmol/ml PRP).

结 果

DHAP 对 ADP、胶原或 AA 诱导血小板聚集的影响

1. 体外实验 DHAP 明显抑制 ADP、胶原或 AA 诱导的血小板聚集, 抑制效应与剂量相关. 药物对 ADP、胶原诱导聚集的 ID₅₀ 分别为 460 与 52.0 μg/ml, 而对 AA 诱导聚集的 ID₅₀ 仅为 6.3 μg/ml (图 1). DHAP 与 PGE₁ 合并应用对血小板聚集的抑制作用明显大于单独用 DHAP 或 PGE₁ (图 2). 此外, DHAP 也明显提高 AA 诱导聚集的阈剂量, 对照组 AA 阈剂量为 0.39 ± 0.05 mM, DHAP 2.5, 5, 10, 20 μg/ml 与 PRP 温育后 AA 阈剂量分别升高到 0.44 ± 0.05 , 0.66 ± 0.08 , 0.88 ± 0.07 及 1.17 ± 0.20 mM. 除小剂量 2.5 μg/ml 与对照组相比无显著差异外, 其他 3 组的阈剂量均增加.

2. 体内实验 DHAP 体内给药对上述 3 种诱导剂引起的聚集也都有明显的抑制作用. 给药后 40 min 内对 AA 诱导的聚集完全抑制. 对胶原和 ADP 诱导的聚集随着给药时间的延

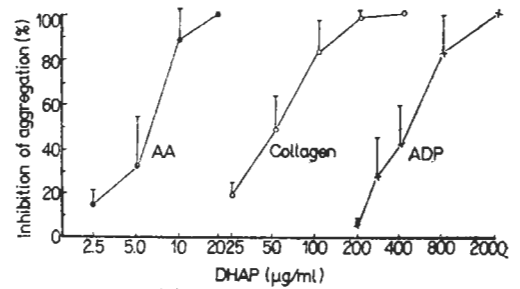


Fig 1. Inhibition of ADP, collagen or arachidonic acid (AA)-induced aggregation by dihydroxyacetophenone (DHAP). $\bar{x} \pm SD$ of 4-8 expts.

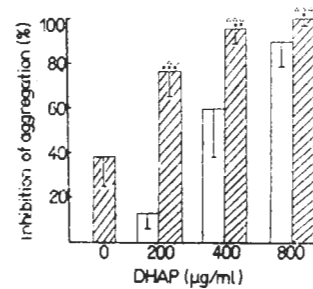


Fig 2. Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by DHAP with (▨) or without (□) PGE₁ 2 nM. $\bar{x} \pm SD$ of 4 expts. Compared with DHAP alone: ***p < 0.01, **p < 0.05, * p > 0.05. Compared with PGE₁ alone: $\Delta\Delta\Delta$ p < 0.01, $\Delta\Delta$ p < 0.05.

长而逐渐减弱甚至没有作用 (表 1). 对照组给盐水前后对 3 种诱导剂引起的聚集程度基本相似.

DHAP 对胶原或 AA 诱导的血小板 [¹⁴C] 5-HT 释放反应的影响 DHAP 明显抑制胶原或 AA 诱导的血小板释放 [¹⁴C] 5-HT 反应. 剂量与效应相关. 药物对胶原诱导血小板 5-HT 释放反应的 ID₅₀ 为 66 μg/ml, 对 AA 诱导的释放反应的 ID₅₀ 为 2.3 μg/ml (图 3). ADP 诱导血小板聚集时没有观察到 5-HT 的释放.

DHAP 对 ADP、胶原与 AA 诱导血小板释放肝素中和活性的影响 DHAP 对 ADP、胶原与 AA 诱导的血小板释放 HNA 都有不同程度的抑制效应. 随着药物剂量增加, HTCT 亦相应延长. 若将胶原加到预先与 DHAP 或生理盐水温育的 PPP 中, 其 HTCT 长短基本

Tab 1. Inhibition of aggregation (%) of ADP, collagen or arachidonic acid (AA)-induced rabbit platelet aggregation in 40 min after iv DHAP 60 mg/kg *in vivo*. \pm SD of 4 expts. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Inducer	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min
ADP	0	16 \pm 10**	13 \pm 12**	0	0
Collagen	0	100***	96 \pm 9***	84 \pm 32**	79 \pm 43**
AA	0	100***	100***	100***	100***

一致(表 2)。

Ca 对 DHAP 抑制 ADP 诱导血小板聚集的影响 DHAP 400 μ g/ml 明显抑制血小板聚集, 其抑制率为 77%, 0.5 mM CaCl_2 对 ADP 诱导的聚集基本没有影响. 但当 DHAP 与 CaCl_2 合并应用, DHAP 对血小板聚集的抑制率大大减弱, 提示 Ca 可能具有对抗 DHAP 抑制血小板聚集的作用(图 4)。

DHAP 对 PRP 中 cAMP 含量的影响

DHAP 0.2 与 2 mg/ml 都明显提高 PRP 中

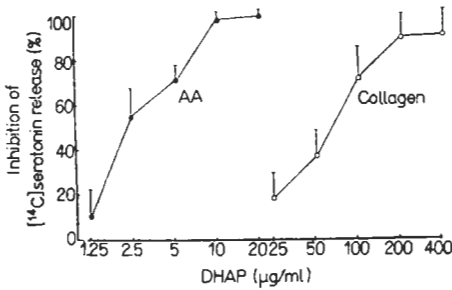


Fig 3. Inhibition of collagen or AA-induced $[^{14}\text{C}]$ serotonin release reaction by DHAP. $\bar{x} \pm$ SD of 3-6 expts.

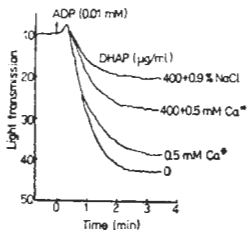


Fig 4. Record of an experiment illustrating the effect of 0.5 mM CaCl_2 on the inhibition of platelet-rich plasma (PRP) aggregation by DHAP 400 μ g/ml,

cAMP 水平. PGE_1 与 DHAP 合并应用, 明显加强 DHAP 增加 cAMP 水平的作用(图 5)。

Tab 2. Effect of DHAP on inhibition of ADP, collagen or arachidonic acid(AA)-induced release of platelet heparin neutralizing activity (HNA) in rabbit *in vitro*. $\bar{x} \pm$ SD of 5-8 expts. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Inducer	DHAP (μ g/ml)	Heparin thrombin clotting time (s)	
		Platelet rich plasma	Platelet poor plasma
ADP 0.01 mM	0	7.5 \pm 3.1	
	50	6.9 \pm 3.0*	
	100	8.5 \pm 3.8*	
	200	8.0 \pm 3.2*	
Collagen 10 μ l	0	13.2 \pm 1.6	12.6 \pm 2.7
	50	15.6 \pm 2.7***	13.1 \pm 3.1*
	100	16.3 \pm 3.6**	13.0 \pm 3.1*
	200	16.5 \pm 4.1**	12.0 \pm 2.4*
AA 0.35 mM	0	18.2 \pm 4.2	
	3	19.0 \pm 4.2*	
	5	20.1 \pm 4.2***	
	10	21.6 \pm 4.2***	
	20	23.2 \pm 6.0***	

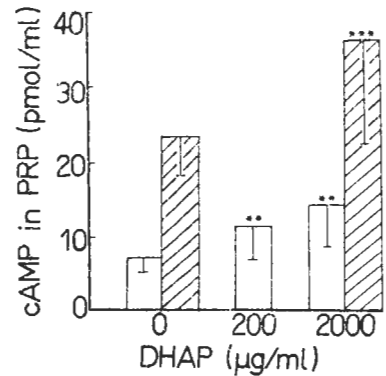


Fig 5. Effect of DHAP on cAMP in platelet-rich plasma (PRP) with (▨) or without (□) PGE_1 2 nM. $\bar{x} \pm$ SD of 7 expts. When DHAP is compared with control: ** $p < 0.05$. When DHAP (2 mg/ml) + PGE_1 (2 nM) is compared with DHAP (2 mg/ml): *** $p < 0.01$

讨 论

本文结果表明 DHAP 在体外能明显抑制 ADP 胶原与 AA 诱导的兔血小板聚集以及胶原、AA 诱导的血小板 5-HT 释放。药物抑制 AA 诱导的聚集和释放反应的 ID_{50} 最小,抑制胶原或 ADP 诱导聚集的 ID_{50} 分别为 AA 的 8 倍与 73 倍。提示 DHAP 可能对 AA 代谢有较强的选择性影响。ADP 不引起兔血小板释放 5-HT, Thomas 等⁽⁷⁾也报道 ADP 诱导兔血小板聚集时不伴有第二相反应。汪钟等⁽⁵⁾观察到 ADP 可以诱导人血小板释放 5-HT, 其释放率可达 50% 左右, 表明释放反应存在种属差异。

体内实验表明 DHAP 也能抑制 ADP、胶原与 AA 诱导的血小板聚集。与体外实验结果相似, 对 AA 的抑制率最强, 胶原其次, ADP 较弱, 提示 DHAP 不但在体外而且体内给药也同样具有抑制血小板聚集的作用。

用 HTCT 来反映 HNA 高低, 并提出 HNA 的高低也许能反映从激活的血小板中释放血小板因子 4 (PF4) 的活性⁽⁴⁾。急性心肌梗塞患者 HTCT 较正常人显著缩短⁽⁸⁾。冠心病患者的血小板聚集性、血浆中 β 血小板球蛋白 (β -thromboglobulin, β TG) 及 PF4 含量较正常对照增加; 某些冠心病病人还伴有血小板存活时间缩短⁽⁹⁾ 本文观察到 DHAP 抑制 ADP、胶原和 AA 诱导的血小板聚集及释放 5-HT、HNA, 提示 DHAP 对冠心病的有利作用可能与抑制血小板功能有关。

DHAP 0.2 或 2 mg/ml 明显升高血小板 cAMP 含量, 这与文献报道的某些药物抑制血小板聚集, 同时升高血小板 cAMP^(10,11) 相符。PGE₁ 既加强 DHAP 对血小板聚集的抑制作用, 也加强 DHAP 升高血小板 cAMP 水平的

效应。PGE₁ 抑制血小板聚集的机制之一是通过升高血小板 cAMP 含量。看来, 这也可能是 DHAP 抑制血小板聚集功能的主要机理。

某些 Ca 阻断剂如戊脉安对冠心病有效, 同时也抑制血小板聚集和释放, 外加 Ca 可对抗戊脉安抑制血小板释放 5-HT⁽¹²⁾。Ca 能部分逆转 DHAP 对血小板聚集的抑制作用, 提示 DHAP 对血小板功能的影响也可能与 Ca 有关。

综上所述, DHAP 升高血小板 cAMP 可能是抑制血小板功能的机制, 而抑制血小板功能可能又是 DHAP 治疗冠心病的机理之一。

致谢 金荫昌教授提供宝贵意见。

参 考 文 献

- 1 北京制药工业研究所、中国人民解放军第 157 医院。中草药 1980;11:358
- 2 Born GVR. *Nature* 1962;194:927
- 3 Jerushalmy Z, Zucker MB. *Thromb Diath Haemorrh* 1966; 15:413
- 4 O'Brien JR, Etherington M, Jamieson S, Lowford P. *Lancet* 1974;2:656
- 5 Wang Z, Roberts JM, Grant PG, Colman RW, Schreiber AD. *Thromb Haemost* 1982;48:301
- 6 中国医学科学院首都医院基础组、军事医学科学院、原子能研究所。放射免疫分析及其它放射体外测定方法。第 1 版。北京:原子能出版社, 1976:228
- 7 Thomas DP, Niewiarowski S, Ream VJ. *J Lab Clin Med* 1970;75:607
- 8 O'Brien JR, Etherington M, Jamieson S, Lowford P, Susser J, Lincoln SV. *J Clin Pathol* 1975;28:975
- 9 Alexander GG, Turpie MB, de Boer AC, Genton E. *Semin Thromb Hemostas* 1982; 8:161
- 10 Salzman EW. *N Engl J Med* 1972;286:358
- 11 Marquis NR, Becker JA, Vigdahl RL. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;39:783
- 12 Ikeda Y, Kihuchi M, Toyamak, Watonabe K, Ando Y. *Thromb Haemost* 1981;45:158

EFFECT OF 3, 4-DIHYDROXYACETOPHENONE ON RABBIT PLATELET FUNCTION

WANG Zhong, GAO Hai-quan, AN Yan, ZHU Guo-qiang

(*Inst Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*)

YANG Zhi-ming (*Inst Pharmaceutical Industries, Beijing 100020*)

ABSTRACT Platelet aggregation and serotonin release reaction were measured by recording light transmission and determining [^{14}C]serotonin released from the labelled platelets respectively. 3,4-Dihydroxyacetophenone (DHAP) inhibited rabbit platelet aggregation both *in vitro* and *in vivo*. The ID_{50} of DHAP in inhibiting platelet aggregation *in vitro* were 6.3, 52 and 460 $\mu\text{g}/\text{ml}$, induced by arachidonic acid (AA), collagen and ADP respectively. DHAP also inhibited platelet [^{14}C]serotonin release and heparin neutralizing activity induced by

collagen and AA in a dose-dependent manner. In addition, DHAP showed an additive effect with PGE_1 in inhibiting platelet aggregation and increasing platelet cAMP. Increasing platelet cAMP is likely the mechanism of inhibition of platelet function by DHAP.

KEY WORDS 3,4-dihydroxyacetophenone; platelet rich plasma; platelet aggregation; [^{14}C]serotonin release; ADP; collagen; arachidonic acid; cAMP