

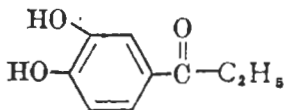
用荧光偏振技术研究 3,4-二羟基苯乙酮对血小板膜流动性的影响

石琳、秦正红、高苏祥 (苏州医学院药理学教研室, 苏州 215007)

提要 用荧光探针二苯基己三烯(DPH)标记血小板膜脂, 监测 DHAP 引起的荧光偏振度(P)变化, 用以分析血小板膜微观流动脂区微粘度($\bar{\eta}$)和流动度的变化。实验结果表明, DHAP 能抑制血小板的聚集性能, 并能降低血小板膜的流动性。

关键词 3,4-二羟基苯乙酮, 血小板聚集, 荧光偏振, 膜流动性, 1,6-二苯-1,3,5-己三烯

3,4-二羟基苯乙酮(3,4-dihydroxy acetophenone, DHAP, 青心酮)系秃毛冬青(*Ilex pubescens* Hook. et Arn. var. *glaber* Chang)的活性成分之一, 具有抑制血小板聚集和释放



反应、增加冠脉流量、降低心肌耗氧、改善心肌微循环和抑制血栓形成等作用⁽¹⁾。

血小板的粘附、聚集和释放反应, 与血小板膜的流动性密切相关, 膜流动性改变又明显影响血小板对致聚物质的反应性^(2,3)。DHAP 抑制血小板聚集的作用是否与 DHAP 改变血小板膜流动性有关, 迄今未见报道。本实验对上述问题进行了分析。

试剂和仪器

荧光探针 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH, Sigma) 以

四氢呋喃为溶剂配成 2 mM 母液, 避光冰箱中保存。临用前用 pH 7.2 的 PBS 稀释至 2 μ M。

DHAP 系北京制药工业研究所产品, 40 mg/2 ml 安瓿。批号 790320, pH 4.6。

荧光分光光度计岛津 RF-510 型。血小板聚集仪 BS-631 型, 北京生化仪器厂产品。

方 法

血小板聚集性测定 取兔动脉血制备富血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP)⁽⁴⁾。按比浊法测定血小板聚集性, 取兔 PRP 450 μ l 注入比浊管内, 分别加入 DHAP 100, 200, 400, 600 μ g/ml, 对照管加等容量 PBS, 37 $^{\circ}$ C 温育 5 min 后, 加致聚剂 ADP 10 μ g/ml, 置入血小板聚集仪描记光密度曲线, 连续描记 6 min。按公式[1]计算最大聚集率, 按公式[2]计算 5 min 有效解聚率及分析 DHAP 对血小板聚集速度的影响(即沿聚集曲线下降支最陡峭部分作切线, 读取切线与纵座标相交处的夹角度数), 聚集速度快则夹角度数小, 聚集速度慢则夹角度数增大。

荧光偏振度(P)的测量 用 DPH 标记血小板膜脂。取兔 PRP 用血小板洗涤液洗涤两次后用 PBS 悬浮。取血小板悬液与同容量 DPH 工作液混匀, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴中温育 5 min, 然后取出 3500 rpm 离心 10 min, 倾去上清液。下面的血小板经洗涤后用 PBS 重新悬浮至原体积,

$$\text{最大聚集率(\%)} = \frac{\text{聚集后 PRP 透光度} - \text{聚集前 PRP 透光度}}{\text{PPP 透光度} - \text{聚集前 PRP 透光度}} \times 100\% \quad [1]$$

$$\text{5 分钟有效解聚率(\%)} = \frac{\text{最大聚集率} - \text{加致聚剂后 5 min 聚集率}}{\text{最大聚集率} - \text{加致聚剂前的聚集率}} \times 100\% \quad [2]$$

即得 DPH 标记的血小板. 血小板数调整至 $1 \times 10^7/\text{ml}$. 取 DPH 标记的血小板悬液及 DPH 工作液, 用荧光分光光度计(装测偏振附件)描绘其激发光谱和发射光谱. 结果 DPH 工作液激发光谱的峰值为 370 nm, 发射光谱的峰值 430 nm(狭缝均为 10 nm); DPH 标记血小板后波峰蓝移, 激发波峰移至 363 nm, 发射波峰移至 428 nm(狭缝均为 5 nm), 荧光强度剧增, 比 DPH 工作液增强 50 倍以上, 提示 DPH 已插入血小板膜脂区.

P 测定时, 取 DPH 标记的血小板悬液 3 ml 放入荧光石英杯内, 分别加入 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DHAP, 37°C 温育 5 min 后测各标本管 P 的变化, 空白对照管以 PBS 代替药液, 测试系统 37°C 恒温, 未加滤光片. 结果按公式[3]求出仪器校正因子(G), 按公式[4]计算 P, 按公式[5]计算血小板膜微观流动脂区的微粘度($\bar{\eta}$)^(6,9,7).

$$G = I_{HV}/I_{HH} \quad [3]$$

$$P = (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) / (I_{VV} - G \cdot I_{VH}) \quad [4]$$

$$\bar{\eta} = 2P / (0.46 - P) \quad [5]$$

I_{VV} : 起偏器和检偏器的光振动面均为垂直方向时测得的荧光强度.

I_{VH} : 起偏器为垂直方向, 检偏器为水平方向时测得的荧光强度.

I_{HH} : 起偏器和检偏器均为水平方向时测得的荧光强度.

I_{HV} : 起偏器为水平方向, 检偏器为垂直方向时测得的荧光强度.

结 果

DHAP 对血小板聚集性的影响 体外实验的结果表明, DHAP 对 ADP 诱导的兔血小板聚集有抑制作用, 抑制聚集的效应与剂量相关($r = 0.99$, $p < 0.01$)即随着 DHAP 剂量增大抑制效应逐渐增强. 在聚集程度减弱的同时, 血小板聚集速度减慢, 5 min 有效解聚速度加快(表 1).

Tab 1. Effect of DHAP on platelet aggregation. 10 rabbits/group. $\bar{x} \pm \text{SD}$. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

| DHAP (mg/ml PRP) | Maximal aggregation rate (%) | Efficiency of 5-min deaggregation rate (%) | Speed of aggregation (0) |
|------------------|------------------------------|--|--------------------------|
| 0 | 41 ± 10 | 17 ± 11 | 20 ± 8 |
| 0.1 | 29 ± 9** | 67 ± 27*** | 24 ± 3** |
| 0.2 | 22 ± 11** | 98 ± 4*** | 28 ± 9*** |
| 0.4 | 14 ± 10*** | 100 ± 0*** | 29 ± 14*** |
| 0.6 | 8 ± 6*** | 100 ± 0*** | 37 ± 15*** |

DHAP 对血小板膜 P 的影响 取标记 DPH 的血小板悬液 3 ml, 分别加入不同剂量 DHAP 后, 血小板膜 P 和 $\bar{\eta}$ 明显增大, 提示 DHAP 能降低血小板膜的流动性(表 2).

Tab 2. Effect of DHAP on membrane fluidity of platelets. $\bar{x} \pm \text{SD}$. ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

| DHAP ($\mu\text{g}/\text{ml}$ PRP) | Degree of fluorescence polarization (P) | Microviscosity ($\bar{\eta}$) |
|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0 | 0.21 ± 0.02 | 1.69 ± 0.30 |
| 25 | 0.24 ± 0.04** | 2.33 ± 0.72** |
| 50 | 0.25 ± 0.03** | 2.47 ± 0.85** |
| 100 | 0.31 ± 0.05*** | 4.80 ± 0.09*** |
| 200 | 0.38 ± 0.04*** | 9.50 ± 1.90*** |

讨 论

实验结果表明: (1) DHAP 可抑制血小板的聚集性, 表现在血小板聚集程度减弱、聚集速度减慢, 5 min 有效解聚率加快. (2) DHAP 可降低血小板膜的流动性. 表现在加入 DHAP 后血小板膜的 P 和 $\bar{\eta}$ 值显著增大. 由于 P 的大小取决于荧光探针所在介质的微粘度, 介质微粘度增大, 荧光分子旋转扩散运动受到限制, 则 P 大, 提示其所在介质的流动性小. 反之, 微粘度小则 P 小, 提示所在介质流动性大. 据此分析 DHAP 增大血小板膜的 P 值, 表明在 DHAP 作用下血小板膜脂质微粘度增大, 血小板膜的流动性降低. 生物膜合适的流动性

是维持细胞膜正常功能的重要保证,物质转运、能量转换、信息传递、细胞识别以及细胞分裂增殖等。无不与膜的正常功能相关联。有人用红细胞和鼠成纤维细胞研究膜流动性改变对葡萄糖(G)转运的影响⁽⁸⁾,结果膜流动性轻度降低(10-20%),上述两种细胞膜对G的最大转运率(V_{max})增加,但膜流动性进一步降低时, V_{max} 反而进行性减少。在膜流动性增加时 V_{max} 同样出现进行性减少现象。又如改变细胞膜脂质流动性研究对膜蛋白磷酸化的影响⁽⁹⁾,也出现类似现象,即膜流动性轻度下降,膜蛋白磷酸化增加,当膜流动性进一步下降,膜蛋白磷酸化反而下降至零,并且显著改变细胞膜受体的结合率。上述事实提示膜流动性大幅度改变,无论增加或减弱,均可显著影响细胞膜的功能。血小板的粘附、聚集和释放功能,与血小板膜的流动性有关系⁽¹⁰⁾。在本实验中,由于抑制血小板聚集剂量的DHAP能显著增大血小板膜的P和 $\bar{\eta}$ 值,提示DHAP抑制血小板的聚集作用可能与它降低血小板膜的流动性有关。

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Mar; 7 (2) : 149-151

Effect of 3,4-dihydroxyacetophenone on membrane fluidity of platelet by fluorescence polarization analysis

SHI Lin, QIN Zheng-hong, GAO Su-xiang

(Dept Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

ABSTRACT 3,4-Dihydroxyacetophenone (DHAP) is one of the constituents of *Ilex pubescens* Hook. et Arn. var. *glaber* Chang. It has been found that DHAP inhibited the platelet aggregation *in vitro*. In the present paper we studied the relationship between the effects of DHAP on platelet aggregation and the change of membrane fluidity by measuring fluorescence polarization of platelet membrane labelled with 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH). The degree of fluorescence polarization was

致谢 北京制药工业研究所谭友庄同志提供3,4-羟基苯乙酮注射剂。

参 考 文 献

- 1 北京制药工业研究所, 中国人民解放军 157 医院。中草药 1980; 11: 358
- 2 Insel PA, Nirenberg P, Tumbull J, Shattil SJ. *Biochemistry* 1978; 17: 5269
- 3 Shattil SJ, Cooper AA. *Ibid* 1976; 15: 4832
- 4 石琳、吴婵群、高苏祥。苏州医学院学报 1982; (2): 1
- 5 Shinitzky M, Barenholz Y. *Biochim Biophys Acta* 1978; 515: 367
- 6 Yanovich S, Harris K, Sallan SE, Schlossman SF, Inbar M. *Cancer Res* 1978; 3: 4654
- 7 林兑椿、聂青松、薄惠卿、乔玉兰。生物化学与生物物理进展 1981; (6): 32
- 8 Steiner M. *Biochim Biophys Acta* 1981; 20: 4250
- 9 Hershkowitz M, Heron D, Samuel D, Shinitzky M. *Prog Brain Res* 1982; 56: 419
- 10 Margolis LB, Tikhonov AN, Vasilieva EYu. *Cell* 1980; 19: 189

increased by the treatment of DHAP at the doses which inhibited platelet aggregation. These results indicate that DHAP decreases the membrane fluidity of platelets, which is related to the inhibition of platelet aggregation.

KEY WORDS 3,4-dihydroxyacetophenone; platelet aggregation; fluorescence polarization; membrane fluidity; 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene