

# 阿魏酸钠对大鼠血小板丙二醛生成的影响

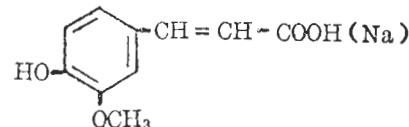
尹钟洙、王建平、徐理纳 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 用荧光法和比色法测定血小板丙二醛(MDA)量。SF 在终浓度 0.5 和 1 mg/ml 时抑制 AA 诱导的大鼠血小板 MDA 生成, 当浓度为 0.2 和 1 mg/ml 时也能抑制胶原诱导的大鼠血小板聚集和 MDA 生成。口服给 SF 600 mg/kg 对胶原诱导的 MDA 生成有抑制作用。上述结果表明 SF 抑制血小板聚集和释放反应作用可能与抑制血小板前列腺素代谢, 即抑制 TXA<sub>2</sub> 生成有关。

**关键词** 丙二醛; 阿魏酸钠; 血栓素 A<sub>2</sub>; 花生四烯酸; 血小板

阿魏酸是当归有效成分之一。它抑制 ADP 和胶原诱导的大鼠血小板聚集和凝血酶诱导血小板 5-HT 释放反应<sup>(1)</sup>。上述血小板聚集和释放反应与血小板通过花生四烯酸(arachidonic acid, AA)代谢产生前列腺素内过氧化物 PGG<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub> 和血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)有关。TXA<sub>2</sub> 为不稳定化合物, 有很强的血小板聚集作用, 可以直接转化成 TXB<sub>2</sub>。PGH<sub>2</sub> 不仅合成 TXA<sub>2</sub>, 也部分转化成 MDA (malondial-

dehyde) 等稳定代谢产物<sup>(2)</sup>。MDA 的生成量可以反映 TXA<sub>2</sub> 生成。因此我们用比色法和荧光法测定血小板聚集时 MDA 的含量, 并观察了阿司匹林等药物的影响。



Sodium ferulate

## 材 料

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)由本所植化室合成, 临用前用生理盐水溶解。吲哚美辛(消炎痛, indomethacin)为市售胶囊, 用前以 NaHCO<sub>3</sub> 配制。阿司匹林(ASA)和咪唑(imidazol)均为市售品。血小板丙二醛合成诱导剂 AA 为南京生物化学制药厂产品, 实验前以 1 N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液配成 33 mM 浓度的溶液。胶原悬液为美国 Sigma 厂生产的不溶性牛肌腱胶原粉, 用盐水溶液磨成匀浆, 离心后取上清液使用。

**MDA 显色剂:** 硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA, cp) 800 mg 溶于 10 ml 20% NaOH 溶液中, 用 70% 高氯酸调 pH 至 7.4, 加重蒸水 100 ml, 最后加 7% 高氯酸 50 ml.

**标准 MDA 溶液:** 按比色法<sup>(3)</sup>, 取 1,1, 3,3-tetramethoxy-propane (纯度>98%, 法国 Fluka 产) 8.2 μl 于棕色管内, 加 2-4 滴浓 HCl 水解, 加重蒸水稀释至 5 ml, 相当于 10 mM MDA 标准液.

**MDA 提取液:** 10% TCA-HCl 溶液为 2.5 N HCl 溶液中含有 10% 三氯醋酸. 酸性正丁醇为重蒸正丁醇 1000 ml 中加 85 μl 分析纯 HCl 而得.

**仪器:** 72 型分光光度计及日立 MPF-4 荧光分光光度计.

## 方 法

**比色法测 MDA** 将大鼠麻醉后取血制备混合血小板血浆, 经离心后弃去血浆, 用冷磷酸缓冲液悬浮血小板, 调血小板数为  $2-3 \times 10^8/\text{ml}$ , 按文献(4)法稍加修改进行 MDA 测定. 取 1 ml 血小板悬液于反应管内, 加药液或对照液, 37°C 温育 5 min, 立即加 AA 0.66 mM 继续保温, 5 min 时加 TBA 停止反应, 置沸水中 15 min, 显色后使其冷却并离心, 取上清液, 在 532 nm 测定 OD 值. 于另一试管中加 TBA, 再加 AA 作为空白管, 同上法处理测 OD 值. 将对照管和给药管 OD 值减去空白管 OD 值, 然后进行统计学处理. 已知 MDA-TBA 反应物在 532 nm 时消光系数为 13.6 μM, 以此求 MDA 相应 μM 数.

**荧光法测 MDA** 按微量 TBA 荧光法<sup>(5)</sup>, 将标准 MDA 溶液稀释为不同浓度加入反应管内, 加等容量 TBA 试剂. 同上法加热显色, 并用 3 ml 正丁醇提取 MDA-TBA 反应物, 在  $\lambda_{\text{ex}} 532 \text{ nm}$ , 和  $\lambda_{\text{em}} 553 \text{ nm}$  测定其相对荧光强度, 并减去溶剂空白荧光值, 以相对荧光强度和相对 MDA 浓度作标准曲线.

按文献(1)制备大鼠混合血小板血浆, 调血

小板数为  $2-3 \times 10^8/\text{ml}$ . 按文献(6)法, 取 0.4 ml 血小板血浆置于比浊管内, 加 0.05 ml 对照液或药液于 37°C 保温 2 min 再加 0.05 ml 400 μg/ml 胶原液进行血小板聚集实验. 5 min 后立即取出反应液, 加于含有 0.5 ml TCA-HCl 溶液的离心管内, 振摇, 离心. 取 0.5 ml 上清液于反应管内, 加 0.5 ml TBA 试剂, 置沸水中, 同前法用正丁醇提取, 测定相对荧光强度. 另取 0.4 ml 贫血小板血浆, 同上法处理, 测定相对荧光强度作为空白对照. 对照管和给药管荧光值减去空白值, 按标准曲线求相应 MDA 量.

于每组 4 只大鼠分别口服对照溶液, SF 600 mg/kg 和 ASA 200 mg/kg, 经 2 h 后取血制备血小板血浆, 进行血小板聚集实验和 MDA 测定.

## 结 果

**比色法测定 SF 对 AA 诱导的大鼠血小板 MDA 生成的影响** 如表 1 所示, SF 在终浓度 0.5 和 1 mg/ml 时, MDA 值均比对照组低, 有明显差异. 用消炎痛 0.1 mg/ml 后 MDA 值与对照组比也有明显差异. SF 在剂量 0.5 和 1 mg/ml 与吲哚美辛在剂量 0.1 mg/ml 时抑制 MDA 产生分别为 31, 46 和 30%, 表明 SF 的作用比吲哚美辛弱.

**荧光法测定 SF 对胶原诱导的大鼠血小板 MDA 生成的影响** 标准 MDA 与 TBA 反应后, 正丁醇提取物的相对荧光强度与 MDA 浓

Tab 1. Effects of sodium ferulate and indometacin on malondialdehyde (MDA) formation of rat washed platelets induced with arachidonic acid at 37°C for 5 min.  $\bar{x} \pm SD$ , \*\*\* $p < 0.01$

	Concn (mg/ml)	MDA (μM)	Inhibition of MDA formation
Control	0	0.58 ± 0.12	
Sodium ferulate	0.5	0.40 ± 0.09***	31%
	1.0	0.32 ± 0.11***	46%
Indomethacin	0.1	0.41 ± 0.12***	30%

度成正比，MDA量越高相对荧光强度越大。0.25 nm MDA与TBA反应后，在 $\lambda_{ex}$  515 nm 和 $\lambda_{em}$  565 nm 分别扫描时，波长为553 nm时发射光相对强度最大，532 nm时激发光相对强度为最大，与文献<sup>(4)</sup>报道相符，见图1实线。大鼠血小板聚集物先用TCA-HCl提取，再与TBA反应后的正丁醇提取物进行同上法扫描时如图1虚线所示，最大发射光波长 $\max \lambda_{em}$  和最大激发光波长 $\max \lambda_{ex}$  与标准MDA相同，表明血小板聚集时产生MDA。

SF终浓度0.05, 0.2和1 mg/ml时明显抑制胶原诱导的MDA生成。如表2所示，

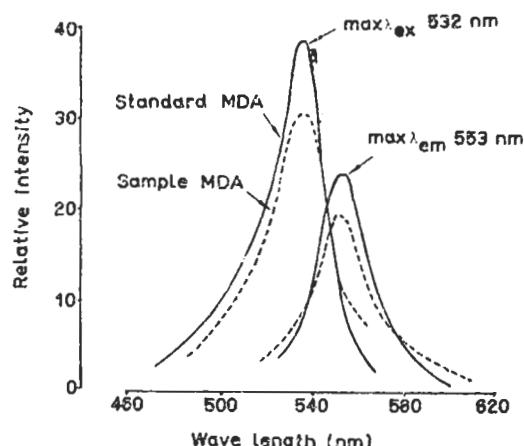


Fig 1. Scanning the excitation wave length with the emission wave length at 565 nm, scanning the emission wave length with the excitation wave length at 515 nm, when MDA reacted with TBA.

MDA生成抑制率分别为57, 67和95%，相应浓度下胶原诱导的血小板聚集抑制率分别为9、19和93%。咪唑1 mg/ml时对血小板聚集无抑制作用而对MDA生成抑制达98%。以上结果表明，SF在试管内1 mg/ml对血小板聚集和MDA生成有明显抑制作用，0.05 mg/ml对血小板聚集无抑制作用。但对MDA生成有明显抑制作用。因此小剂量SF的作用类似咪唑。

**口服SF和ASA能抑制胶原诱导的血小板MDA生成** 对照组MDA生成为 $91 \pm 10 \text{ pmol}$ ，SF组为 $60 \pm 7 \text{ pmol}$ ，ASA组为 $6 \pm 1 \text{ pmol}$ ，给药组和对照组比较均有明显差异。阿魏酸钠的作用比阿司匹林弱；相应的血小板聚集%分别为41±2, 39±3和25±6，SF与对照无明显差异，ASA则与对照比较有明显差异。

## 讨 论

本实验通过测定血小板MDA生成观察血小板前列腺素代谢及药物的影响。血小板聚集时产生的MDA可以反映TXA<sub>2</sub>的生成。本实验表明，SF 0.05 mg时，对血小板MDA生成有明显抑制作用，但对聚集无明显影响；而1 mg SF对MDA生成和血小板聚集均有明显抑制。此结果提示，低浓度SF对胶原诱导的血小板聚集不抑制，但对MDA生成有抑制，

Tab 2. Effect of sodium ferulate on rat platelet MDA formation induced by collagen (*in vitro*).  $\bar{x} \pm SD$ , \*  $p > 0.05$ , \*\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$

	Concn mg/ml	Platelet aggregation (%)	Inhibition of aggregation (%)	Platelet MDA (pmol)	Inhibition of MDA formation (%)
Control	0	$39.1 \pm 1.2$		$85 \pm 12$	
Sodium ferulate	0.05	$35.6 \pm 1.6^*$	8.7	$36 \pm 13^{**}$	57
	0.20	$31.6 \pm 0.6^{**}$	19.0	$28 \pm 4^{***}$	67
	1.00	$2.6 \pm 0.3^{***}$	93.0	$4 \pm 9^{***}$	95
Imidazole	1.00	$44.0 \pm 4.0^*$	—	$2 \pm 2^{***}$	98

这可能由于抑制了 AA 代谢有关，至于影响了环氧酶还是 TXA<sub>2</sub> 合成酶，有待研究。另一方面 MDA 与 TBA 反应不仅与环氧酶系有关，在脂氧酶作用下产生的脂质过氧化物也有 TBA 反应，故 MDA 生成只能部分反映血小板前列腺素代谢。胶原诱导血小板 AA 游离，SF 对 AA 游离是否有抑制作用进而减少了 MDA 产生，也有待研究。我们认为阿司匹林或吲哚美辛直接抑制了环氧酶，因此抑制血小板聚集和 MDA 生成有平行关系。本实验表明 SF 抑制胶原诱导血小板聚集和 MDA 生成不平行，说明 SF 作用不同于阿司匹林。本实验室曾以生物测定法测定大鼠血小板 TXA<sub>2</sub> 样物质及颈动脉壁 PGI<sub>2</sub> 样物质的生物活性，观察到大鼠口服 SF 后以胶原诱导的血小板聚集性及 TXA<sub>2</sub> 活性明显受到抑制，但 PGI<sub>2</sub> 活性则无明显抑制作用<sup>(7)</sup>，大鼠口服 ASA 后上述三项指标均明显抑制。上述结果说明 SF 抗血小板作用机理不同于 ASA。至于 SF 抑制血小板 MDA 生成究竟系作用于哪种酶系，有待研究。本实验

口服 SF 未观察到对血小板聚集的抑制作用，这可能是用以产生 MDA 的胶原浓度较以往实验为高的缘故。

## 参 考 文 献

- 尹钟洙、张凌云、徐理纳。当归及其成分阿魏酸对大鼠血小板聚集和 5-HT 释放的影响。药学学报 1980; 15 : 321
- 塚田理康。プロスタグラデインと血小板凝集。现代医療 1977; 9 : 187
- Smith JB, Ingerman CM, Silver MJ. Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets. *J Lab Clin Med* 1976; 88 : 167
- 大熊 稔。血小の脂質代謝と血小板功能。日本血液学会誌 1976; 33 : 628
- Yagi K. Micro-determination of lipoperoxide in blood plasma or serum. *Vitamin* 1975; 49 : 403
- 前田淳子、坪井俊纪、藤谷武一、门河敏明、清水當尚。實驗的高脂症モルモットにおける血小板機能の亢進。日本薬理学雑誌 1982; 80 : 105
- 徐理纳、徐德成、张白嘉、王润玲。阿魏酸钠抗血小板聚集作用机理研究——对 TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> 平衡的影响。中国医学科学院学报 1984; 6 : 414

*Acta Pharmacologica Sinica* 1986 Jul, 7 (4) : 336-339

## Effect of sodium ferulate on malondialdehyde production from platelets of rats

YIN Zhong-zhu, WANG Jian-ping, XU Li-na

(Inst Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

**ABSTRACT** Sodium ferulate (SF) 0.5 and 1 mg/ml exhibited inhibitory effect on rat platelet malondialdehyde (MDA) production induced by arachidonic acid. Sodium ferulate 0.2 and 1.0 mg/ml inhibited both platelet aggregation and platelet MDA formation induced by collagen. Intragastrical gavage with SF 600 mg/kg inhibited platelet MDA formation. These results

indicated that the inhibitory effect of SF on platelet aggregation and release reaction may be due to the inhibition of platelet prostaglandin metabolism or TXA<sub>2</sub> formation.

**KEY WORDS** malondialdehyde; sodium ferulate; thromboxane A<sub>2</sub>; arachidonic acid; blood platelets