

## 粉防己碱对兔血小板聚集、血栓素 A<sub>2</sub> 合成及钙调素活性的影响

钱月明、黄钱华 (第三军医大学药理教研室, 重庆 630038)

**提要** 粉防己碱(Tet)在体外明显抑制 ADP、胶原和花生四烯酸(AA)诱导的兔血小板聚集, 不影响血小板利用外源性 AA 合成血栓素 A<sub>2</sub>, 但抑制胶原诱导血小板释放内源性 AA。Tet 抑制钙调素依赖性磷酸二酯酶活性, 且有证据表明这种抑制作用来源于 Tet 与钙调素竞争性对抗。

**关键词** 粉防己碱; 血小板聚集; 花生四烯酸类; 血栓素 A<sub>2</sub>; 钙调素

粉防己碱(tetrandrine, Tet)对兔血小板聚集和形态改变具有抑制作用<sup>(1)</sup>。由于 ADP 和

胶原激活血小板时不引起钙内流<sup>(2)</sup>, 所以 Tet 对血小板的抑制作用不能被钙通道阻滞作用所解释。本文观察 Tet 对钙调素活性的影响, 并分析 Tet 影响血小板聚集和血栓素 A<sub>2</sub> 合成的可能机理。

### Materials and methods

Tet 由浙江金华制药厂生产。花生四烯酸钠(AA)和 ADP 均由美国 Sigma 公司出品。胶原采用兔跟腱自制, 10 μl 可诱导兔血小板聚集 60-70%。钙调素由徐州医学院生物化学教研室分离提纯。 [<sup>3</sup>H]cAMP 系北京原子能所产

1987年6月11日收稿 1988年7月29日接受

品。眼镜蛇蛇毒由广西医学院蛇毒研究室制备。依赖钙调素的环核苷酸磷酸二酯酶由第三军医大学免疫研究室分离提取。血栓素 $B_2$ 放射免疫测定盒由中国医学科学院基础所制备。

**富含血小板血浆(PRP)制备** 兔颈动脉放血, 每9 ml血加3.8%枸橼酸钠1 ml抗凝, 离心分离PRP (200×g, 8 min)及贫血小板血浆(PPP, 1200×g, 10 min)用PPP调整PRP使血小板计数在 $4 \times 10^8$ /ml左右。

**血小板聚集测定** 加Tet或盐水0.05 ml于PRP 0.45 ml中, 1 min后, 分别以终浓度ADP(5  $\mu$ mol/L)、花生四烯酸(AA, 0.12 mmol/L)或胶原(10  $\mu$ l)为诱导剂, 按比浊法<sup>(3)</sup>在血小板聚集仪(BS 631型, 北京生化仪器厂)上测定血小板聚集。聚集%=(PRP聚集透光幅度/PPP透光幅度)×100%。聚集抑制%=(对照聚集%-药物聚集%)/对照聚集%。

#### PRP中血栓素 $B_2$ (TXB<sub>2</sub>)的提取及测定

取经Tet或生理盐水作用1 min的PRP 0.5 ml, 在37℃、连续电磁搅拌的条件下, 加胶原10  $\mu$ l或终浓度AA 0.12 mmol/L刺激血小板合成TXA<sub>2</sub>, 分别在5 min和2 min时将反应液加到盛有冰冷的HCl(终浓度0.01 mol/L)的试管内以终止反应, 反应液经离心(1200×g, 10 min), 取上清, 用重蒸乙酸乙酯提取TXB<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>的稳定代谢物), 经负压抽干后, 样品于-20℃保存待测, 保存时间不超过1个月。用放射免疫分析法测定TXB<sub>2</sub>, 根据标准曲线回归方程, 以结合率(%)的logit值求出TXB<sub>2</sub>量的对数值。

**血小板钙调素粗提液制备** PRP离心(1200×g, 15 min), 沉淀物用Tris液(含KCl 300, EGTA 1, EDTA 3 mmol/L)洗涤后离心, 此过程重复两次, 得Tris血小板悬液。将悬液制成匀浆并离心(100 000×g, 30 min), 取上清液进行热处理(95℃, 4 min), 冷却后再离心(100 000×g, 30 min), 上清液即为钙调素粗提液。用福林酚法测定粗提液中蛋白含量。Fig 1为标准钙调素和血小板钙调素粗提液

激活磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)的反应曲线, 两者对PDE的最大激活程度相同, 比较PDE在50%激活时所需的标准钙调素量和血小板钙调素粗提液量, 可以求得1  $\mu$ g血小板钙调素粗提液的作用相当于0.09  $\mu$ g标准钙调素的作用。

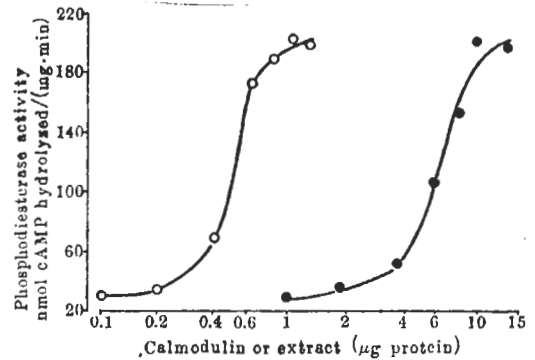
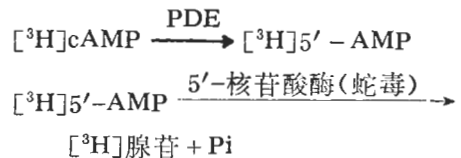


Fig 1. Activation of phosphodiesterase by calmodulin (○) and platelet calmodulin extract (●).

**钙调素依赖性PDE活性测定** PDE活性以在30℃的条件下每毫克蛋白每分钟水解cAMP的量表示(nmol cAMP/(mg·min)), 采用两步法<sup>(4)</sup>:



未反应的 $[^3\text{H}]\text{cAMP}$ , 用717阴离子交换树脂除去,  $[^3\text{H}]\text{腺苷}$ 用液体闪烁计数器(Rack-Beta-1217, Finland Wallac)测定。

## Results

**Tet对ADP、胶原或AA诱导血小板聚集的影响** Tet对ADP、胶原或AA诱导的血小板聚集均有明显的抑制作用, 其抑制效应呈剂量依赖性(Fig 2)。

**Tet对血小板合成TXA<sub>2</sub>的影响** 在37℃、连续电磁搅拌的条件下, 用胶原或AA刺激血小板合成TXA<sub>2</sub>(测定其稳定代谢产物TXB<sub>2</sub>), 测得两组TXB<sub>2</sub>量均比未刺激对照组

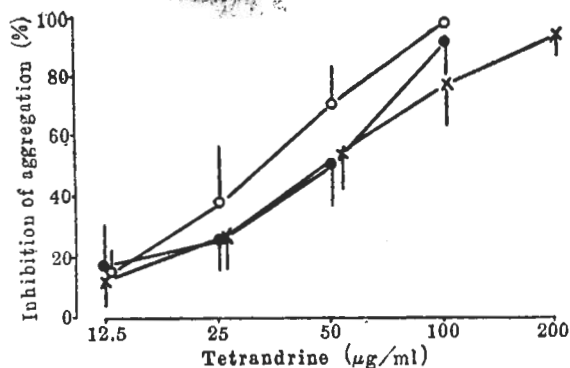


Fig 2. Inhibition of collagen (○), ADP (●) or arachidonic acid (×)-induced aggregation by tetrandrine.  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ .

TXB<sub>2</sub>量升高( $P < 0.01$ ),在上述同样的条件下,先用 Tet 100 μg/ml 作用于血小板 1 min 后再用胶原和 AA 刺激,与相同的刺激对照组相比, Tet 对 AA 诱导的 TXA<sub>2</sub> 合成无明显影响,而对胶原诱导的 TXA<sub>2</sub> 合成有抑制作用( $P < 0.01$ )(Fig 3)。

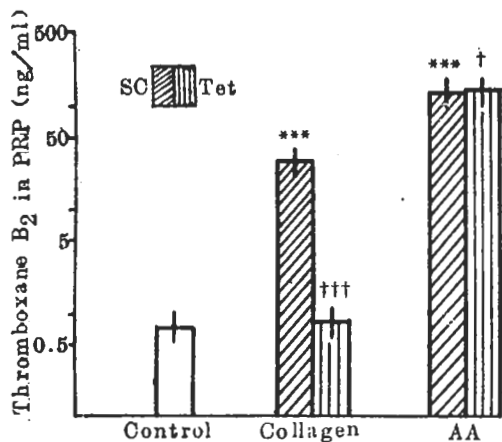


Fig 3. Effect of tetrandrine on collagen or AA-induced thromboxane synthesis in platelet-rich plasma (PRP).  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*\* $P < 0.01$  vs unstimulated control. † $P > 0.05$ , ††† $P < 0.01$  vs stimulated control (SC).

### Tet 对钙调素活性的影响

#### 1 Tet 对定量钙调素激活 PDE 的影响

以定量血小板钙调素粗提液作为 PDE 激活剂,并用标准钙调素作对照,实验分两组:(1)在 Ca<sup>2+</sup> 存在下,钙调素先与 Tet 作用,然后

加 PDE; (2)Ca<sup>2+</sup>, 钙调素和 PDE 混合后加 Tet. 在两组实验中, Tet 对钙调素依赖性 PDE 均有明显的抑制作用,且随着药物浓度的增大而增强。但两组之间相比, Tet 对第一组的作用强于第二组,随着 Tet 的浓度增大,其差异性更加明显( $P < 0.05-0.01$ )(Fig 4),实验还比较了 Tet 对血小板钙调素粗提液和标准钙调素的作用,两组间无显著性差异。

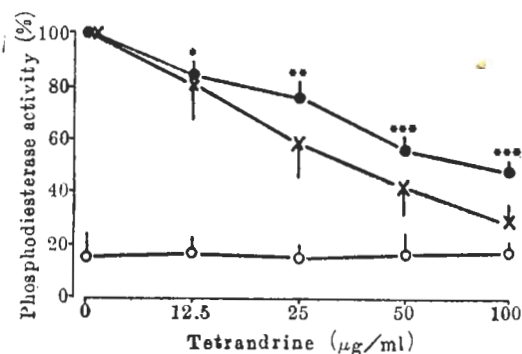


Fig 4. Effects of tetrandrine on basal phosphodiesterase (PDE) activity (○), Ca-calmodulin-PDE (●) and Ca-calmodulin (×).  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . When tetrandrine on Ca-calmodulin-PDE was compared with tetrandrine on Ca-calmodulin at the same concentration. \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ .

2 Tet 对 PDE 基础活性的影响 基础活性是指未经钙调素激活的 PDE 活性。Tet 12.5-100 μg/ml 对 PDE 基础活性无明显影响(Fig 4)。

3 定量 Tet 对不同量钙调素激活 PDE 的影响 Tet 30 μg/ml 使钙调素对 PDE 的激活作用减弱, PDE 的激活反应曲线呈现右移,在未给药对照组 PDE 达到最大激活时, Tet 组仅达最大激活的 50%,而增大血小板钙调素粗提液的量可以克服 Tet 的抑制作用,当粗提液超过 25 μg 时, PDE 基本达到最大激活(Fig 5)。

### Discussion

Tet 在体外能明显抑制 ADP、胶原或 AA 诱导的兔血小板聚集,其效应呈剂量依赖性,

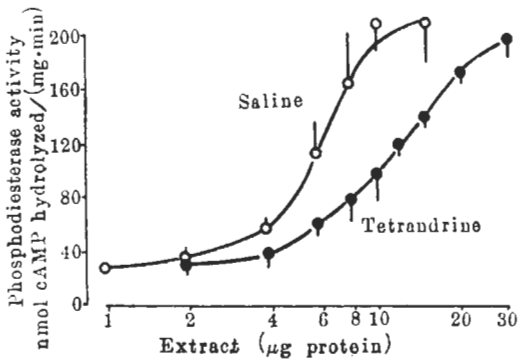


Fig 5. Effect of tetrandrine (30  $\mu\text{g/ml}$ ) on activation of phosphodiesterase by platelet calmodulin extract.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ .

而利用放射免疫分析法测定  $\text{TXB}_2$ , 发现 Tet 不影响血小板利用外源性 AA 合成  $\text{TXA}_2$ , 说明 Tet 不影响环氧酶和血栓素  $\text{A}_2$  合成酶的活性。但是 Tet 对胶原诱导的  $\text{TXA}_2$  合成有明显的抑制作用, 从而提示 Tet 抑制了胶原诱导内源性 AA 释放。

由于钙调素通过调节磷脂酶  $\text{A}_2$  活性而参与血小板 AA 释放过程<sup>(5,6)</sup>, 所以观察了 Tet 对钙调素活性的影响。证实, Tet 抑制钙调素依赖性 PDE 活性, 且具有以下特点: 1) 对 PDE 基础活性无明显抑制作用; 2) 当钙、钙调素和 PDE 形成复合物时, Tet 的抑制作用减弱; 3) 增加钙调素的量可以克服 Tet 的抑制作用。根据这三个特点我们认为 Tet 与钙调素有竞争性对抗作用。因此可以推测, Tet 抑制胶原诱导的 AA 释放可能是通过拮抗钙调素激活磷脂酶  $\text{A}_2$  而发挥作用, 与三氟拉嗪的作

用<sup>(5)</sup>相似。

钙调素在血小板聚集中亦起重要作用<sup>(7)</sup>, Tet 抑制血小板聚集可能与其拮抗钙调素有关。  $\text{TXA}_2$  是一种强烈的血小板聚集诱导剂, 其作用有赖于血小板内贮存钙的释放, 而钙的作用与钙调素紧密相关, 所以 Tet 抑制钙调素后, 即使血小板有  $\text{TXA}_2$  产生, 聚集反应仍受抑制。

## References

- 1 Qian YM, Huang YH. Effects of tetrandrine on rabbit platelet morphology and aggregation *in vitro*. *J Med Coll PLA* 1988; 3 : 140
- 2 Murer EH. The role of platelet calcium. *Semin Hematol* 1985; 22 : 313
- 3 Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194 : 927
- 4 Wallace RW, Tallant EA, Cheung WY. Assay of calmodulin by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphodiesterase. In: Means AR, O'Malley BW, ed. *Methods in enzymology*, vol 102. *Hormone action*, Part G. NY: Academic Press, 1983 : 39-47
- 5 Walenga RW, Opas EE, Feinstein MB. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases  $\text{A}_2$  and C in thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* 1981; 256 : 12523
- 6 Wong PYK, Cheung WY. Calmodulin stimulates human platelet phospholipase  $\text{A}_2$ . *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 90 : 473
- 7 White GC 2d, Levine SN, Steiner AN. Platelet calcium-dependent proteins: identification and localization of the calcium-dependent regulator, calmodulin, in platelets. *Am J Hematol* 1981; 10 : 359

*Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Jan; 10 (1) : 61-65

## Effects of tetrandrine on rabbit platelet aggregation, thromboxane $\text{A}_2$ generation and calmodulin activity

QIAN Yue-Ming, HUANG Yue-Hua

(Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

**ABSTRACT** The effects of tetrandrine (Tet) on platelet aggregation and thrombox-

ane  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) generation were studied in rabbit platelet-rich plasma (PRP) pre-

pared by centrifugation. The effects of Tet on calmodulin activity in platelet extracts were also investigated by measuring calmodulin-sensitive phosphodiesterase activity.

ADP, collagen or arachidonic acid (AA)-induced platelet aggregation was inhibited by Tet in a dose-dependent manner. TXA<sub>2</sub> generation in PRP treated by Tet was markedly decreased in collagen-induced group, but was not altered in AA-induced group, suggesting that the release of AA from platelet phospholipids stimulated by collagen

was blocked by Tet. Further experiments showed that the effects of Tet were related to its inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase activity. There was evidence that the effects originated from its anti-calmodulin properties instead of its direct action on phosphodiesterase.

**KEY WORDS** tetrandrine; platelet aggregation; arachidonic acids; thromboxane A<sub>2</sub>; calmodulin

\* \* \* \* \*