

# 甲基黄酮醇胺对兔血小板聚集的影响

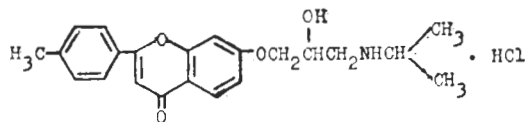
吴勇杰<sup>1</sup>、周尔凤、郝一彬 (山西医学院药理学教研室, 太原 030001)

**提要** 兔每天 im SIPI-549 30 mg/kg 共 5 d 后, 使 ADP 诱导的血小板聚集程度降低, SIPI-549 在体外抑制 ADP、凝血酶和胶原诱导的兔血小板聚集的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.15、0.29 和 0.04 mmol/L, SIPI-549 非竞争性拮抗 ADP 诱导血小板聚集的作用, 也抑制胶原诱导的血小板变形, 但使延迟相缩短。

**关键词** 甲基黄酮醇胺; 4'-甲基-7-(2-羟基-3-异丙胺基丙氧基)-黄酮酸盐; 普萘洛尔; 血小板聚集

甲基黄酮醇胺 (methylflavonolamine, SIPI-549) 是上海医药工业研究院新合成的化合物, 其化学名为 4'-甲基-7-(2-羟基-3-异丙胺基丙氧基)-黄酮酸盐<sup>1</sup>盐。SIPI-549 在体内、外对兔及大鼠实验性血栓形成有抑制作用, 能使兔血“雪暴(snow storm)”现象出现时间延长, 提示其可能对血小板功能有抑制作用<sup>(1)</sup>。本实验进一步研究了 SIPI-549 对腺苷二磷酸 (ADP)、凝血酶和胶原诱导的兔血小板聚集的

影响, 同时和类似物普萘洛尔 (propranolol, Pro) 作了比较。



4'-Methyl-7-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)-flavone hydrochloride (methylflavonolamine)

## 材料和 方法

甲基黄酮醇胺盐酸盐 (上海医药工业研究院) 体内给药时用蒸馏水溶解, 体外给药时溶于 5% 或 10% 乙醇中。Pro (北京制药厂) 溶于蒸馏水中。

**血小板聚集剂及其制备** 腺苷二磷酸钠 (Sigma) 溶于磷酸缓冲液 (pH 7.2) 中。凝血酶 (Sigma) 用生理盐水溶解。胶原悬液由兔主动脉壁制得<sup>(2)</sup>。将未稀释的胶原悬液每 100 μl 规

1986年3月28日收稿 1987年6月29日接受

<sup>1</sup> 现在兰州医学院药理学教研室, 兰州 730001

定为1单位,用不同浓度的胶原悬液诱导兔血小板聚集,将恰能使 $\Delta V_{\max}$ 产生最大值时的浓度作为诱导浓度<sup>(3)</sup>(终浓度40单位/L)。聚集剂均在0℃保存。

凡接触血小板的玻璃表面均用1%硅油甲苯溶液硅化。

**富含血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP)的制备** 兔 $2.6 \pm SD 0.3$  kg, ♀♂不拘。iv戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉后,自心脏取血。用枸橼酸钠(0.1 mol/L)溶液按1:9抗凝。将枸橼酸化血以 $90 \times g$ 离心8 min,吸取上层乳白色的PRP;剩余部分再以 $1200 \times g$ 离心20 min,管中上清液即少含血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。用PPP调PRP,使血小板计数为50-60万/mm<sup>3</sup>(供体外实验)或40-50万/mm<sup>3</sup>(供半体内实验)。PRP在18-20℃保存。

**血小板聚集试验** 按比浊法<sup>(4)</sup>,当PRP中加入上述聚集剂时,在搅拌的条件下,血小板发生聚集,PRP浊度下降,透光度增加,血小板聚集过程可由透光度变化反映出来。测定指标(图1)为:延迟相(lag phase)为加入聚集剂到透光度下降至最低点(或透光度增加的起点)的时间;透光度下降值为加入聚集剂后透光度

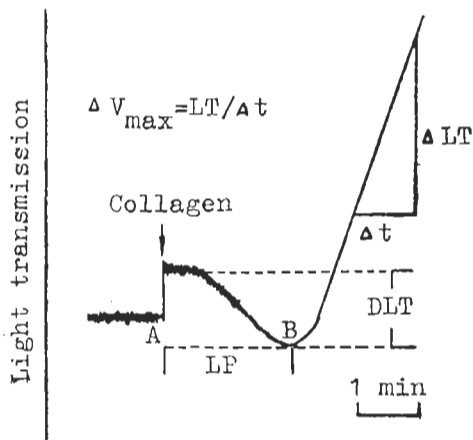


Fig 1. Measurement of lag phase (LP), decrease in light transmission (DLT) and maximal aggregation velocity ( $\Delta V_{\max}$ ). Increase in light transmission (LT) at A results from dilution by adding collagen ( $\downarrow$ ) and after B from platelet aggregation. t: time.

下降最大值,反映血小板变形程度<sup>(5,9)</sup>;血小板聚集快相为聚集波升段的直线部分对应的时间;在快相内取60 s,测相应聚集波幅度,求出每秒透光度增加的%,即最大聚集速度( $\Delta V_{\max}$ );血小板聚集程度为加入聚集剂后透光度增加的最大值。体外实验时,用25  $\mu$ l的聚集剂加入200  $\mu$ l PRP中诱发血小板聚集,药液(pH 6.0)及对照溶媒(5%、10%乙醇或生理盐水, pH 6.0)各25  $\mu$ l和聚集剂(ADP)同时或在加聚集剂(胶原或凝血酶)前3 min时加入PRP中。半体内实验时,用20  $\mu$ l聚集剂加入200  $\mu$ l PRP中诱导血小板聚集。

对每只兔的PRP标本按区组法随机操作,用t检验进行统计处理。

## 结 果

### 半体内对 ADP 诱导的血小板聚集的影响

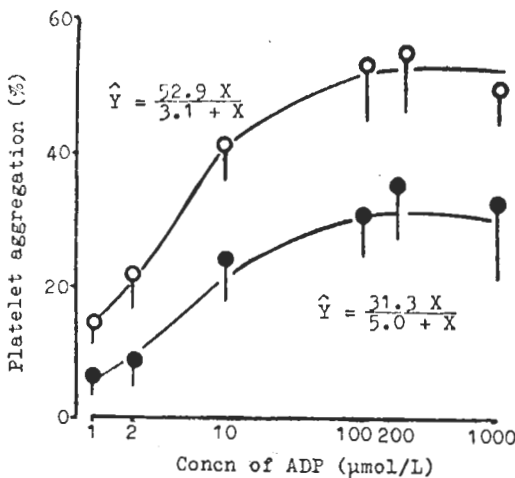
兔7只, im SIPI-549 30 mg/kg, 每天1次,连续5 d,分别于药前及第3次和第5次给药后1 h取血(未麻醉)3 ml制备PRP,用ADP 9  $\mu$ mol/L诱导测定血小板聚集。结果血小板聚集程度分别为 $52 \pm 9$ ,  $40 \pm 17$ 和 $31 \pm 12\%$ 。和药前比较,第3次给药后血小板聚集程度虽有所降低,但差别不显著( $p > 0.05$ );第5次给药后血小板聚集受到明显抑制,差别非常显著( $p < 0.01$ ),说明SIPI-549在体内对血小板聚集的抑制有时间依赖性。

**体外对 ADP 诱导的血小板聚集的影响** 结果见表1。SIPI-549 0.15-0.25 mmol/L时,ADP(2  $\mu$ mol/L)诱导的血小板聚集程度降低,与对照比较,差别非常显著。Pro 0.2 mmol/L对血小板聚集程度无显著性影响。

逐步递增ADP 1-1000  $\mu$ mol/L,做出ADP诱导血小板聚集的量-效曲线,加入SIPI-549 150  $\mu$ mol/L后,重复上述实验。结果ADP 100  $\mu$ mol/L可使血小板聚集程度达到最大。SIPI-549 150  $\mu$ mol/L能使ADP诱导的血小板聚集的最大反应降低,ADP浓度即使增至1000  $\mu$ mol/L也不能克服这种抑制效应(图2)。经

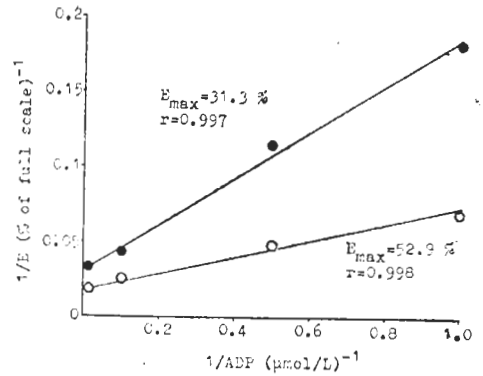
**Tab 1. Effects of methylflavonolamine (SIPI-549) and propranolol (Pro) on platelet aggregation induced by ADP or bovine thrombin.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs control (10% ethanol). n: PRP sample numbers.**

Drugs (mmol/L)	n	Platelet aggregation (% of full scale)	Inhibition (%)
Aggregation induced by ADP 2 $\mu\text{mol/L}$			
Control	7	30 $\pm$ 9	—
SIPI-549 0.15	6	15 $\pm$ 7***	50
0.20	7	7 $\pm$ 5***	78
0.25	7	4 $\pm$ 4***	87
Control	7	28 $\pm$ 8	—
Pro 0.20	7	26 $\pm$ 5*	—
Induced by thrombin 0.96 units/ml			
Control	5	53 $\pm$ 11	—
SIPI-549 0.25	5	36 $\pm$ 9**	32
0.30	5	17 $\pm$ 9***	53
0.35	5	13 $\pm$ 8***	64
0.40	7	2 $\pm$ 1***	96
Control	5	59 $\pm$ 4	—
Pro 0.35	5	55 $\pm$ 11*	—



**Fig 2. Inhibitory effect of methylflavonolamine (SIPI-549) on platelet aggregation induced by ADP with graded concentrations. SIPI-549 = 0 (○) or 150  $\mu\text{mol/L}$  (●). n = 4-5.**

加权非线性回归<sup>(10)</sup>求得 ADP 离解常数  $K_D$  (95%置信限)为 3.1(1.9-4.3)  $\mu\text{mol/L}$ 。按双倒数法做图,加和加不加 SIPI-549 都可得到一直线,两直线在纵座标上不能相交于一点(图 3),表明 SIPI-549 是 ADP 的非竞争性拮抗剂。按



**Fig 3. Antagonistic action of methylflavonolamine (SIPI-549) against ADP-induced platelet aggregation.  $E_i$ : extent of platelet aggregation. SIPI-549 = 0 (○) or 150  $\mu\text{mol/L}$  (●). n = 4-5.**

Lineweaver-Burk 方程求得 SIPI-549 在完整兔血小板上的离解常数  $K_A$  为 218  $\mu\text{mol/L}$ 。

#### 体外对凝血酶诱导的血小板聚集的影响

SIPI-549 0.25-0.40 mmol/L 对凝血酶诱导的血小板聚集有显著的抑制作用, 0.4 mmol/L 时抑制 96%。Pro 0.35 mmol/L 对凝血酶诱导的血小板聚集无显著性影响。SIPI-549 对凝血酶诱导的血小板变形无明显影响(表 1)。

#### 体外对胶原诱导的血小板聚集的影响

SIPI-549 能抑制胶原诱导的血小板变形, 使血小板聚集速度减慢, 聚集程度降低, 使延迟相缩短(表 2)。其抑制血小板聚集的最小浓度为 12.5  $\mu\text{mol/L}$  (5  $\mu\text{g/ml}$  PRP), 抑制血小板变形的浓度低于 6.3  $\mu\text{mol/L}$ 。Pro 200  $\mu\text{mol/L}$  能显著抑制胶原诱导的血小板聚集, 使聚集程度降低, 聚集速度减慢, 但使延迟相延长(表 2)。

#### 体外 $IC_{50}$ 的比较

表 1-2 的实验数据经直数回归后求得 SIPI-549 使 ADP (2  $\mu\text{mol/L}$ )、凝血酶 (0.96 单位/ml PRP) 和胶原 (40 单位/L PRP) 诱导的血小板聚集程度减低 50% 的终浓度  $IC_{50}$  分别为 0.15, 0.29 和 0.04 mmol/L。可见, SIPI-549 对胶原诱导的血小板聚集的抑制作用最强, 对 ADP 次之, 对凝血酶最弱。

#### 讨 论

Pro 有抗血小板作用<sup>(6,7)</sup>, 能使冠心病患者增高的血小板敏感性降低, 同时使运动耐受量

Tab 2. Effects of methylflavonolamine (SIPI-549) and propranolol (Pro) on rabbit platelet aggregation induced by collagen (40 units/L).  $\bar{x} \pm SD$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$  vs control (5% ethanol). n: PRP sample numbers.

Drugs	Concn ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	Lag phase (s)	Decrease in light transmission (% of full scale)	Maximal velocity of aggregation (% $\cdot\text{s}^{-1}$ )	Platelet aggregation (% of full scale)
Control	—	4	75 $\pm$ 20	4.9 $\pm$ 2.8	0.88 $\pm$ 0.24	77 $\pm$ 13
SIPI-549	6.3	5	53 $\pm$ 9**	1.0 $\pm$ 1.2***	0.62 $\pm$ 0.17*	65 $\pm$ 10*
	12.5	5	45 $\pm$ 7***	0.6 $\pm$ 0.7***	0.53 $\pm$ 0.19**	54 $\pm$ 18**
	25.0	6	44 $\pm$ 14**	0.5 $\pm$ 0.6***	0.53 $\pm$ 0.17**	55 $\pm$ 16**
	50.0	6	40 $\pm$ 13***	0.3 $\pm$ 0.5***	0.28 $\pm$ 0.19***	36 $\pm$ 17***
	100.0	6	37 $\pm$ 13***	0.1 $\pm$ 0.3***	0.16 $\pm$ 0.14***	23 $\pm$ 14***
	200.0	6	—	0.2 $\pm$ 0.3***	0.01 $\pm$ 0.01***	3 $\pm$ 3***
Control	—	6	70 $\pm$ 11	3.1 $\pm$ 2.1***	0.75 $\pm$ 0.13	75 $\pm$ 6
Pro	200.0	6	116 $\pm$ 42***	—	0.25 $\pm$ 0.21***	34 $\pm$ 20***

增加<sup>(6)</sup>。本实验证明, SIPI-549 是一个比 Pro 作用更强、更广谱的抗血小板化合物, 因而有必要对其进一步加以研究。

低浓度胶原诱导的血小板聚集在延迟相之后发生, 延迟相可能和血小板释放致聚集浓度的 ADP 或前列腺素及其代谢产物有关<sup>(8,9)</sup>, 消除 PRP 中的 ADP 或/和抑制血小板合成致聚集前列腺素及其代谢产物, 均可使延迟相延长<sup>(9)</sup>。SIPI-549 在抑制胶原诱导的血小板聚集的同时, 使延迟相缩短, 这与消除 ADP、阻断前列腺素代谢的影响完全不同, 因而可能尚有另一重要的、未被认识的影响延迟相的因素存在。

胶原诱导的血小板变形主要依赖于两种机制: 血小板释放的 ADP 和血小板中形成的花生四烯酸代谢产物前列腺素内过氧化物和血小板噁 A<sub>2</sub>, 仅消除 ADP 或阻断花生四烯酸代谢, 并不影响胶原诱导的血小板变形<sup>(9)</sup>。SIPI-549 可完全抑制胶原诱导的血小板变形, 提示其可能作用于某个重要环节而阻断了胶原诱导血小板变形的全部途径。

SIPI-549 对在体及离体实验性血栓形成有抑制作用, 对纤维蛋白血栓形成和血小板血栓形成有抑制作用<sup>(1)</sup>, 对多种诱导剂诱导的血小板聚集都有抑制作用。和 Pro 比较, 其抗血小板作用较强, 但毒性作用(未发表资料)较低, 是一个

有希望过渡到临床上的新的抗血小板化合物。

### 参 考 文 献

- 1 吴勇杰、周尔凤、郝一彬、汤允昭、万宝松。4'-甲基-7-(2-羟基-3-异丙胺基丙氧基)-黄酮酸盐对实验性血栓形成的影响。药学学报 1986, 21 : 744
- 2 尹钟珠、徐理纳、欧阳蓉。冠心 II 号方及其单味药对大鼠血小板聚集功能的影响。新医药学杂志 1977, 12 : 565
- 3 Evans G, Packham MA, Nishizawa EE, Mustard JF. The effect of acetylsalicylic acid (aspirin) on platelet function. *Blood* 1967, 30 : 550
- 4 Born GVR. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets. *J Physiol (Lond)* 1962, 162 : 67
- 5 Born GVR. Observation on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate. *Ibid* 1970, 209 : 487
- 6 Packham MA, Mustard JF. Clinical pharmacology of platelets. *Blood* 1977, 50 : 555
- 7 Websler BB, Gillick M, Pink J. Effects of propranolol on platelet function. *Ibid* 1977, 49 : 185
- 8 Haslam RJ. Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human platelets by thrombin and fatty acid. *Nature* 1964, 202 : 765
- 9 Packham MA, Guccione MA, Greenberg JP, Kinlough-Rathbone RJ, Mustard JF. Release of <sup>14</sup>C-serotonin during initial platelet changes induced by thrombin, collagen or A23187. *Blood* 1977, 50 : 915
- 10 Wilkinson GN. Statistical estimation in enzyme kinetics. *Biochem J* 1961, 80 : 324

**Effects of methylflavonolamine on platelet aggregation in rabbits**WU Yong-Jie<sup>1</sup>, ZHOU Er-Feng, HAO Yi-Bin*(Department of Pharmacology, Shanxi Medical College, Taiyuan 030001)*

**ABSTRACT** Effects of methylflavonolamine (SIPI-549, 4'-methyl-7-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)-flavone hydrochloride) on platelet aggregation in rabbits were studied by optical method. The  $IC_{50}$  values for SIPI-549 to inhibit platelet aggregation induced by ADP, thrombin and collagen were 0.15, 0.29 and 0.04 mmol/L, respectively. SIPI-549, which depressed the maximal response of platelets to ADP, acted as a non-competitive antagonist of ADP. Dynamic study on intact platelets showed that the dissociation constants of ADP and SIPI-549 were 3.1 and 218  $\mu$ mol/L,

respectively. SIPI-549 inhibited the change in shape of platelets and shortened the lag phase in the wave of platelet aggregation induced by collagen. Propranolol had no obvious effect on platelet aggregation induced by ADP and thrombin, but inhibited collagen-induced platelet aggregation. SIPI-549 (30 mg/kg)/d $\times$ 5 im into rabbits also inhibited ADP-induced platelet aggregation. It is concluded that SIPI-549 is a potent inhibitor of rabbit platelet aggregation *in vitro* and *in situ*.

**KEY WORDS** methylflavonolamine; 4'-methyl-7-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)-flavone hydrochloride; propranolol; platelet aggregation

<sup>1</sup> Now in *Department of Pharmacology, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730001*