

槲皮素对花生四烯酸诱导人血小板化学发光的影响

顾振纶, 谢梅林, 钱曾年

(苏州医学院药理教研室, 苏州 215007, 中国)

R 963

Effect of quercetin on chemiluminescence of human platelets induced by arachidonic acid

GU Zhen-Lun, XIE Mei-Lin, QIAN Zeng-Nian
(Department of Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007, China)

ABSTRACT Arachidonic acid (AA)-induced platelet chemiluminescence (CL) was measured with a lumiphotometer. Quercetin remarkably inhibited the CL, the IC_{50} of quercetin was $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. When quercetin plus aspirin, which inhibits only cyclooxygenase, was added, the inhibitory rate of platelet-CL obviously increased ($P < 0.01$). On the other hand, the quercetin had a scavenging effect on superoxide anion radical using alkaline sodium dithionite solution generation. The IC_{50} was $20.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. In addition, superoxide dismutase of $0.1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ inhibited the platelet-CL by 97.8%, while mannitol, a hydroxyl radical scavenger, only by 43.3% at a concentration of $80 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. These results suggest that the mechanism of the inhibiting AA-induced platelet-CL by quercetin was associated with scavenging the superoxide anion radical directly and with inhibiting the cyclooxygenase.

KEY WORDS blood platelets; arachidonic acids; quercetin; aspirin; superoxide dismutase; mannitol

摘要 花生四烯酸(AA)可诱导血小板产生CL, 槲皮素(Que)对其有显著的抑制作用, 其 IC_{50} 为 $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与阿司匹林合用, 则抑制作用更明显($P < 0.01$)。Que对产生 $O_2^{\cdot-}$ 的碱性连二亚硫酸钠发光体系也有明显抑制作用, IC_{50} 为 $20.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。提示Que对AA诱导血小板CL的抑制作用与其直接清除 $O_2^{\cdot-}$, 抑制环加氧酶有关。

关键词 血小板; 花生四烯酸类; 槲皮素; 阿司匹林; 超氧化物歧化酶; 甘露醇

超氧化物歧化酶

Received 1991-05-27

Accepted 1992-08-18

花生四烯酸(AA)可诱导血小板CL⁽¹⁾和聚集, AA诱导血小板CL系AA经环加氧酶和脂氧酶代谢后产生的自由基($O_2^{\cdot-}$, $OH \cdot$ 及 H_2O_2)所致⁽²⁾, 但何种为原发自由基, 尚未定论⁽³⁻⁵⁾。槲皮素(quercetin, Que)为天然的黄酮类化合物, 在体内具有抑制血小板聚集⁽⁶⁾等作用。本文一方面利用特异性的自由基清除剂, 探讨AA代谢中的原发自由基, 另一方面通过测定Que对AA诱导血小板CL及对产生 $O_2^{\cdot-}$ 的碱性连二亚硫酸钠发光体系的影响, 阐明Que抑制血小板聚集的作用机制, 为Que用于防治血栓栓塞性疾病提供理论根据。

MATERIALS AND METHODS

Que为棕黄色粉末, 北京化工厂生产, 临用时先用少量二甲基亚砜(Me_2SO)溶解, 然后用pH 7.4磷酸缓冲液(PBS) $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 调至所需浓度, Me_2SO 的终浓度为1%, AA系Sigma产品, 用无水乙醇稀释至所需浓度, luminol系Merck产品, 用改良台氏液溶解, 加少许三乙胺助溶, 最后用盐酸 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 调节pH为7.4, SOD由本院放射损伤教研室提供, 阿司匹林系南京制药厂产品, 甘露醇由常熟制药厂生产, 连二亚硫酸钠, 上海硫酸厂出品。人全血由苏州市中心血站提供, 发光光度计(DG3030), 华东电子管厂制造。

按本室常法⁽⁶⁾制备血小板悬液, 用CL法⁽⁷⁾测定由AA诱导的血小板CL强度, 用碱性连二亚硫酸钠发光体系⁽⁸⁾测定Que的抗 $O_2^{\cdot-}$ 能力, 按相对法⁽⁹⁾计算实验结果。

RESULTS

SOD和甘露醇对AA诱导血小板CL的影响 SOD和甘露醇均能抑制AA诱导血小板的CL, 随着药物浓度的增加, 发光强度逐渐减弱, 抑制发光也逐渐递增, 且等量浓度的SOD作用较甘露醇为强(Tab 1)。

Tab 1. Effects of SOD, mannitol, quercetin, and aspirin on CL of human platelets induced by AA. $n=6-8$. $\bar{x}\pm s$, * $P>0.05$, ** $P<0.05$, * $P<0.01$ vs control group. **** $P<0.01$ vs aspirin.**

	Intensity of CL/ CPS	Inhibitory rate/ %
SOD, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$		
0	23.1 \pm 7.2	
0.01	23.1 \pm 6.8	0*
0.1	18.4 \pm 7.8	20.3*
1	13.0 \pm 4.0	43.7***
10	9.2 \pm 4.4	60.2***
100	0.5 \pm 0.2	97.8***
Mannitol, $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$		
0	23.6 \pm 6.9	
40	16.4 \pm 6.0	29.0**
80	13.1 \pm 3.7	43.3***
Aspirin, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		
0	18.0 \pm 1.8	
8.125	16.9 \pm 1.6	6.1*
32.5	12.5 \pm 2.7	30.6***
Quercetin, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
0	15.6 \pm 2.6	
0.2	15.4 \pm 3.1	1.3*
3.125	5.2 \pm 1.4	66.7***
Aspirin, $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ + Quercetin, $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		
0	17.6 \pm 2.9	
8.125+0.2	9.5 \pm 2.0	46.7***
32.5 +0.2	6.6 \pm 1.9	62.5***

Que 对 AA 诱导血小板 CL 的影响 Que 可显著抑制 AA 诱导的血小板 CL, 其终浓度分别为 0.2, 0.78, 3.125, 12.5, 50 及 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发光抑制随着药物浓度的增加而增加, IC_{50} 为 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 当 Que 的浓度为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制 100%。由此表明 Que 对 AA 诱导血小板的 CL 具有较强的抑制作用 (Fig 1)。1% Me_2SO (12.9 \pm 0.4) 对 AA 诱导血小板的 CL 无明显影响, 与 PBS (12.5 \pm 4.3) 相比, 差别不显著 ($P>0.05$)。

Que 对碱性连二亚硫酸钠发光体系的影响 Que 的终浓度分别是 6, 12, 24, 48 和 96 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其 IC_{50} 为 20.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明 Que 对碱性连二亚硫酸钠发光体系具有明显抑制作

用, 而 1% Me_2SO (1365 \pm 71) 对碱性连二亚硫酸钠发光体系无明显影响, 与 PBS (1313 \pm 52) 相比, 无显著差别 ($P>0.05$) (Fig 1)。

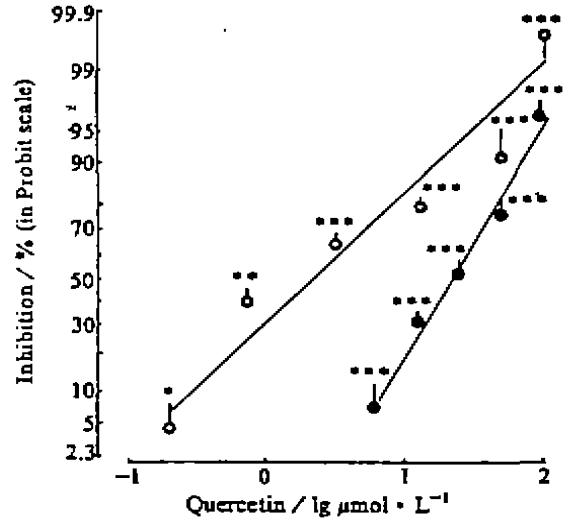


Fig 1. Effects of quercetin on CL of human platelets induced by AA (\circ , $n=6$) and alkaline sodium dithionite solution (\bullet , $n=6$). The IC_{50} were 3 and 20.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively, when inhibition of control groups were 0%. $\bar{x}\pm s$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, * $P<0.01$ vs control group.**

Que 加阿司匹林对 AA 诱导血小板 CL 的影响 阿司匹林 8.125 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 Que 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制发光分别为 6.1% 和 1.3%, 当两者合用时, 抑制上升到 46.7%, 阿司匹林浓度为 32.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 抑制发光 30.6%, 当与 Que 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 合用时, 抑制上升到 62.5%。上述结果提示 Que 和阿司匹林具有协同作用 (Tab 1)。

DISCUSSION

AA 诱导血小板 CL⁽¹⁰⁾ 的主要过程如 Fig 2. SOD 和甘露醇分别是 O_2^- 和 $\text{OH} \cdot$ 自由基的特异性清除剂, 实验证明, 当 SOD 浓度为 0.1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, 可完全抑制由 AA 诱导的血小板 CL, 而甘露醇的浓度为 SOD 的 800 倍时, 其抑制发光仅为 43.3%。由此推测 AA 代谢途径

中产生的原发自由基很可能是 $O_2^{\cdot-}$, 其他自由基可能是继发产生的。

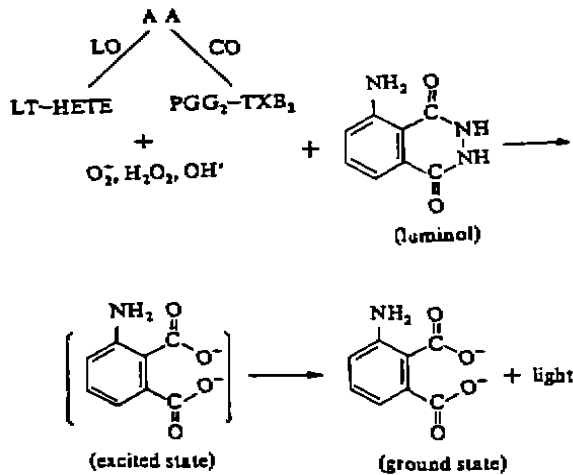


Fig 2. Scheme of platelet-CL induced by AA.

Que 对 AA 诱导的血小板 CL 具有显著的抑制作用 ($IC_{50} = 3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时也能抑制单产生 $O_2^{\cdot-}$ 的碱性连二亚硫酸钠发光体系 ($IC_{50} = 20.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). 从 IC_{50} 看, Que 对 AA 诱导血小板的发光体系的作用较对连二亚硫酸钠发光体系的作用为强, 前者约为后者的 6 倍, 提示 Que 抑制 AA 诱导血小板 CL 的作用机制除有直接清除该体系中的 $O_2^{\cdot-}$ 外, 对 AA 代谢途径中的代谢酶亦有抑制作用. Alcaraz 等⁽¹¹⁾ 认为 Que 对脂氧酶有抑制作用. 本文将 Que 与环加氧酶抑制剂—阿司匹林合用, 可明显提高对血小板的抑制发光百分率. 由此表明 Que 可加强阿司匹林对环加氧酶的抑制作用.

综上所述, Que 抑制 AA 诱导血小板的 CL, 与其抑制 AA 代谢途径中 $O_2^{\cdot-}$ 的产生或对 $O_2^{\cdot-}$ 的直接清除作用有关, 这可能是 Que 抑制血小板聚集的又一作用机制.

ACKNOWLEDGMENT 本院化学教研室提供 DG3030 发光光度计.

REFERENCES

- 1 Peden D, Van Dyke K, Pekoe G, Castranova V. Temporal sequence of chemiluminescence and aggregation of human neutrophils and platelets after stimulation by arachidonic acid. *Microchem J* 1983; 28 : 91-8.
- 2 Van Dyke K, Van Dyke C, Peden D, Jones G, Castranova V, Brestel E, et al. Luminol-dependent chemiluminescence analysis of human platelets. *Microchem J* 1980; 25 : 514-23.
- 3 Kuehl FA Jr, Humes JL, Egan RW, Ham EA, Beveridge GC, Van Arman CG. Role of prostaglandin endoperoxide PGG₂ in inflammatory processes. *Nature* 1977; 265 : 170-3.
- 4 Schreiber J, Eling TE, Mason RP. The oxidation of arachidonic acid by the cyclooxygenase activity of purified prostaglandin H synthase: spin trapping of a carbon-centered free radical intermediate. *Arch Biochem Biophys* 1986; 249 : 126-36.
- 5 Kulkreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59 : 612-9.
- 6 Gu ZL, Qian ZN, Wang ZY, Xie ML, Xu X, Wang YQ, et al. Pharmacological studies on leaves of Apocynum Hendersonii (Hook. F) Woodson—their effect on aggregation of blood platelet. *Chin Trad Patent Med* 1989; 11(11) : 28-30.
- 7 Xu FB, Sun XM. Influence of antiaggregatives on chemiluminescence of platelet induced by arachidonic acid. *J China Pharm Univ* 1987; 18 : 264-7.
- 8 Wong YK, Huang S, Wong NY. Generation of superoxide anion radical using alkaline sodium dithionite solution. *Prog Biochem Biophys* 1989; 16 : 209.
- 9 Xie ML, Qian ZN, Gu ZL, Hu TX. Study on the anti-free-radical effects of quercetin and some Chinese herbs extracts. *Acta Acad Med Suzhou* 1989; 9 : 278-80.
- 10 Mills EL, Gerrard JM, Filipovich D, White JD, Quie PG. The chemiluminescence response of human platelets. *J Clin Invest* 1978; 61 : 807-14.
- 11 Alcaraz MJ, Hout JRS. Effects of hypolaetin-8-glucoside and related flavonoids on soybean lipoxygenase and snake venom phospholipase A₂. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1985; 278 : 4-12.