

Spiramine N-6 的抗血小板活性研究*

R973.2

沈志强¹⁾ 陈植和¹⁾ 聂晶磊²⁾ 郝小江²⁾(1) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650031;
2) 中国科学院昆明植物所, 昆明 650204)

摘要 采用 Born 氏比浊法观察了 spiramine N-6 在体外和体内对兔血小板聚集功能的影响。应用荧光分光光度法测定其对血小板 5-HT 释放反应的作用。结果: spiramine N-6 在体外选择性抑制血小板活化因子 (PAF) 诱导的血小板聚集, 并呈量效关系, 其 $IC_{50} = 26 \mu\text{mol/L}$; 2 mg/kg spiramine N-6 静注后明显抑制 PAF 和花生四烯酸 (AA) 诱导的血小板聚集, 最大抑制率于给药后 60, 30 min 分别为 $(50.4 \pm 4.4)\%$ 和 $(77.3 \pm 3.3)\%$ (与生理盐水组对照 $P < 0.05$); spiramine N-6 呈浓度依赖性减少 PAF 和 AA 引起血小板 5-HT 的释放, 其 IC_{50} 分别为 $33.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $64.7 \mu\text{mol/L}$ 。结果表明 spiramine N-6 是一种较强的抗血小板聚集剂。

关键词 粉花绣线菊, Spiramine N-6, 血小板活化因子, 花生四烯酸, 血小板聚集, 5-HT
中图分类号 R 91

粉花绣线菊 (*spiraea japonica* L. f) 植物在民间主要用于消炎、止痛^[1]。Spiramine N-6 是从粉花绣线菊植物中纯化的一种 C_{20} 生物碱, 是否具有抗血小板活性未见报道, 为寻找抗血小板药的新药源和开辟治疗因血小板功能异常所致血栓性疾病的新途径, 本实验就 spiramine N-6 对血小板聚集和释放功能进行了探讨, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

动物: 健康家兔 2.0 ~ 3.0 kg, 雌雄均用, 由昆明医学院动物科提供。

药品及试剂: spiramine N-6 由中国科学院昆明植物所提供, 溶于生理盐水并用 0.5 mol/L HCl 调 pH 值至 6.0。血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 均系 Sigma

公司产品。PAF 溶于含 0.25% 小牛血清蛋白的 Tris - NaCl 缓冲液中, pH 7.6; AA 溶于无水乙醇中, 用前以 1% Na_2CO_3 稀释成 0.5% 的工作液。

仪器: SH-93 型智能血液凝聚仪, 上海生化仪器厂生产; RF-5000 型荧光分光光度计, 日本岛津公司产品。

1.2 方法

富血小板血浆 (platelet - rich plasma, PRP) 和贫血小板血浆 (platelet - poor plasma, PPP) 的制备: 自兔颈动脉采血, 以 3.8% 枸橼酸钠抗凝 (血与抗凝剂的体积比为 9:1), 收集于硅化的离心管中, 室温下分别经 1 000 和 3 000 r/min 离心 10 min, 得 PRP 和 PPP。试验过程中, PRP 中的血小板数控制在 5×10^8 cell/L。

血小板聚集性试验: (1) 体外实验: 按 Born 氏法进行^[2]。诱聚剂终浓度分别为 PAF 7.2 nmol/L, AA 0.35 mmol/L, ADP 3 $\mu\text{mol/L}$ 。

* 云南省应用基础研究基金资助项目

血小板聚集抑制率按下式计算:

聚集抑制率 = $[(\text{对照管聚集}\% - \text{样品管聚集}\%) / \text{对照管聚集}\%] \times 100\%$

(2) 体内试验: 兔分两组, 每组 5 只。一组经取耳缘静脉注入 2 mg/kg 的 spiramine N-6, 一组注入等体积的生理盐水作为对照。给药前采血 1 次, 给药后分别于 10, 30, 60, 90 和 120 min 自颈动脉取血制备 PRP 和 PPP。观察体内给药后药物对血小板聚集功能的影响, 测定方法同体外试验。

血小板 5-HT 释放反应测定: 参照万海英^[3]等方法, 兔分两组 (生理盐水和给药组), 每组 5 只, 药物与 PRP 于 37℃ 温育 5 min 后分别加入 PAF 或 AA 诱导血小板聚集, 5 min 后以 1 mol/L HCl 终止反应, 并提取 5-HT, 应用 RF-5000 型荧光分光光度计测定其浓度, 并与 5-HT 标准管对照。

2 结果

体外试验: spiramine N-6 对 PAF 诱导的血小板聚集有明显的抑制作用, 并呈量效关系, $IC_{50} = 26 \mu\text{mol/L}$, 对 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集无明显抑制作用 (与对照组比较 $P > 0.05$), 见表 1。

体内实验: 2 mg/kg spiramine N-6 静脉给药后, 对 PAF 诱导的血小板聚集作用表现为。给药后 30 min 即有明显的抑制作用, 抑制率为 $(38.3 \pm 2.2)\%$ (与生理盐水组比较 $P < 0.05$), 于 60 min 达最大抑制作用, 抑制率为 $(50.4 \pm 4.4)\%$, 至 90 min 时仍有作用, 到 120 min 时则无明显抑制作用 (与生理盐水组比较 $P > 0.05$)。与体外不同的是, spiramine N-6 静注后还显著抑制 AA 诱导的聚集, 给药后 10 min 即有很强的抑制作用, 抑制率为 $(77.3 \pm 3.3)\%$, 药效持续到 90 min 后于 120 min 减弱 ($P > 0.05$)。此外, spiramine N-6 静注后 60 min 和 90 min 对 ADP 也有一定的抑制作用, 见表 2。

表 1 Spiramine N-6 体外对 PAF, AA 和 ADP 诱导血小板聚集功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	血小板聚集率 (%)		
	PAF	AA	ADP
对照	47.3 ± 3.3	64.3 ± 4.0	55.0 ± 0.1
8.75	43.0 ± 1.5	63.4 ± 4.0	52.5 ± 3.5
17.5	32.0 ± 4.4*	61.0 ± 8.8	52.7 ± 2.5
35.0	17.7 ± 5.0*	61.1 ± 3.9	63.5 ± 0.7
70.0	7.0 ± 2.9*	61.3 ± 4.2	49.0 ± 1.4
140.0	3.7 ± 2.5*	63.3 ± 5.7	52.0 ± 2.8

* $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 2 Spiramine N-6 静注后对 PAF, AA 和 ADP 诱导血小板聚集功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别与诱导剂	不同时间血小板聚集抑制率 (%)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
PAF					
Saline	2.5 ± 1.0	2.6 ± 2.3	3.5 ± 1.2	3.6 ± 2.1	4.2 ± 1.7
Spiramine N-6	3.8 ± 2.4	38.3 ± 2.2	50.4 ± 4.4	40.9 ± 7.1*	7.4 ± 5.7
AA					
Saline	3.2 ± 1.4	2.3 ± 0.6	2.4 ± 1.6	2.8 ± 2.5	1.9 ± 0.5
Spiramine N-6	75.8 ± 1.7*	77.7 ± 3.3*	65.3 ± 3.7*	49.6 ± 3.4*	19.4 ± 5.2
ADP					
Saline	3.6 ± 1.6	2.5 ± 1.3	2.9 ± 3.3	4.2 ± 1.5	4.3 ± 1.4
Spiramine N-6	4.4 ± 0.8	12.4 ± 3.5	24.3 ± 8.0*	29.9 ± 4.1*	7.9 ± 1.8

* $P < 0.05$, 与生理盐水组比较。

Spiramine N-6 对 5-HT 释放反应的影响: Spiramine N-6 呈浓度依赖性明显减少 PAF 和 AA 引起的血小板 5HT 释放, 其 IC_{50} 分别为 $33.5 \mu\text{mol/L}$ 和 $64.7 \mu\text{mol/L}$ 。见表 3。

表 3 Spiramine N-6 体外对 PAF 和 AA 引起血小板 5-HT 释放反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	5-HT (ng/ 10^9 Platelets)	
	PAF	AA
生理盐水	786 ± 75	576 ± 58
10	692 ± 72	537 ± 26
20	$423 \pm 35^*$	482 ± 36
40	$318 \pm 34^*$	$302 \pm 23^*$
80	$202 \pm 29^*$	$256 \pm 29^*$
160	$102 \pm 17^*$	$113 \pm 15^*$

* $P < 0.05$, 与生理盐水组比较。

3 讨论

目前认为, 血小板活化主要有 PAF, AA 和 ADP 3 条途径^[4]。本试验选用 PAF, AA 和 ADP 作为诱导剂, 分别代表这 3 条血小板活化途径。结果表明, spiramine N-6 体外呈浓度依赖性明显抑制 PAF 诱导的血小板聚集; 静注后, spiramine N-6 显著抑制 PAF 引起的聚集, 提示 spiramine N-6 对 PAF 具有较高的选择性。与体外不同的是, spiramine N-6 还明显抑制 AA 诱导的聚集, 高浓度时对 ADP 也有一定的抑制作用。提示 spiramine N-6 在体内对血小板活化的 3 条途径均有显著的抑制作用。我们推测 spiramine N-6 抗血小板作用是否与血管内皮细胞产生的前列环素和血小板内 Ca^{2+} 水平变化有关, 值得深入研究。

血小板激活后释放 5-HT, 后者进一步促进血小板的活化聚集^[5]。本实验结果表明, spiramine N-6 均呈浓度依赖关系减少 PAF 和 AA 引起的血小板 5-HT 释放, 提示 spiramine N-6 的抗血小板活性与其抑制血小板释放功能密切相关。

血小板聚集异常在血栓性疾病的发生发展过程中起着重要的作用^[6]。粉花绣线菊植物在云南省资源丰富, 本研究为我省开发新药源和寻找抗血小板与防治血栓性疾病的新药研究提供了有用资料和科学依据, 同时提示 spiramine N-6 是一种较强的抗血小板活性生物碱, 值得进一步研究开发。

参 考 文 献

- 1 江苏医学院. 中药大辞典. 上海: 科学技术出版社, 1993. 1117~4057.
- 2 Born G V R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature, 1962, 194: 927
- 3 Wan H Y, Chen H, Xi X D, et al. Fluorophotometry for platelet 5-HT. Jiangsu Medicine, 1985, 11: 24
- 4 Vermylen J, Badenhorst P N, Deckmyn H, et al. Normal mechanisms of platelet function. Clinics in Haematology, 1983, 12: 107
- 5 Davies T, Davidson M M L, McClenaghan M D, et al. Factors affecting platelet cyclic GMP levels during aggregation induced by collagen and by arachidonic acid. Throm Res, 1976, 9: 387
- 6 Ogletree M L. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A_2 . Fed Proc, 1987, 46: 133

(1998-06-05 收稿)

A Study of Anti - platelet Activity of Spiramine N - 6

Shen Zhiqiang¹⁾ Chen Zhihe¹⁾ Nie Jinglei²⁾ Hao Xiaojiang²⁾

(1) Yunnan Pharmacological Laboratories of Natural Products, Kunming Medical College, Kunming 650031; 2) Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

Abstract Born's method was used to study the effects of spiramine N-6 on rabbit platelet aggregation in vitro or in vivo. With fluorophotometry, influence of spiramine N-6 on 5-HT release from platelets was observed. The results showed that in vitro spiramine N-6 selectively inhibited platelet-activating factor (PAF)-induced platelet aggregation in concentration-dependant manner, with $IC_{50} = 26 \mu\text{mol/L}$; spiramine N-6 2 mg/kg iv significantly suppressed PAF- or arachidonic acid (AA)-induced aggregation, with the maximal inhibitory rate $(50.4 \pm 4.4)\%$ or $(77.3 \pm 3.3)\%$ at 60 or 30 min after iv respectively. Spiramine N-6 concentration-dependant decreased platelet 5-HT release stimulated by PAF or AA, with the IC_{50} value of $33.5 \mu\text{mol/L}$ or $54.7 \mu\text{mol/L}$ respectively. The results demonstrated that spiramine N-6 is a comparatively potent anti-platelet agent.

Key words *Spiraea japonica* L f, Spiramine N-6, Platelet-activation factor, Arachidonic acid, Platelet aggregation, 5-HT

链球菌致热外毒素的提取及生物活性检测 (摘要)

研究生 李玉叶 导师 王朝凤

(昆明医学院第一附属医院皮肤科, 昆明 650032)

关键词 链球菌, 外毒素, 生物活性检测

中图分类号 R 378.1

以牛心脑培养基培养 A 群链球菌, 用乙醇沉淀法提取外毒素, 通过发热试验、促进内毒素休克试验, 证明所提

取外毒素为 SPE.

(1998-10-20 收稿)