

API0134 对高脂血症家兔血栓形成及血小板信号转导物质的影响

王宏伟¹, 李树生², 赵华月³, 王国平⁴

(华中科技大学同济医学院 同济医院 1. 儿科, 2. 急诊科, 3. 心内科, 4. 同济医学院病理系, 湖北省武汉市 430030)

[主题词] 穿心莲成分; 血栓形成; 血小板聚集; 钙转运 ATP 酶; 三磷酸肌醇

[摘要] 建立高脂血症家兔动脉血小板依赖性血栓模型, 应用流式细胞术、放射免疫法及³H-肌醇掺合等检测方法观察穿心莲成分 API0134 对闭塞性血栓形成时间、血小板聚集功能、血小板胞浆游离 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 浓度以及血小板内环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷和三磷酸肌醇含量的影响。结果发现, API0134 能够显著延长闭塞性血栓形成时间和抑制血小板聚集。50 mg/kg API0134 的药理作用明显强于 5 mg/kg API0134。API0134 可显著抑制血栓形成所诱导的血小板内 [Ca²⁺]_i、[Mg²⁺]_i 和三磷酸肌醇浓度升高, 显著抑制血小板内环磷酸腺苷浓度降低。抑制作用与用药剂量有关。结果提示, API0134 具有较强的抗血栓形成和抗血小板聚集作用。抗血小板聚集的作用机制与调节血小板信号转导物质 [Ca²⁺]_i、[Mg²⁺]_i、环磷酸腺苷和三磷酸肌醇的平衡有关。

[中图分类号] R281.1

[文献标识码] A

Effects of API0134 on Thrombus Formation and Platelet Signaling in Rabbits with High Cholesterolemia

WANG Hong-Wei, LI Shu-Sheng, ZHAO Hua Yue, and WANG Guo-Ping

(Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[MeSH] API0134; Thrombosis; Platelet Aggregation; Ca²⁺-Transporting ATPase; Inositol Trisphosphates

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of API0134 on arterial thrombus formation and exploring the mechanism of anti-platelet aggregation. **Methods** An thrombus model of rabbits with high cholesterolemia was established; and the platelet aggregation function, intracellular ionized calcium [Ca²⁺]_i, intracellular ionized magnesium [Mg²⁺]_i, cAMP, cGMP and inositol trisphosphate (IP₃) in platelet were examined with Flow cytometer, radioimmunoassay, [³H] inositol incorporation and so on.

Results The occlusive thrombus formation time was lengthened and the platelet aggregation was inhibited significantly in API0134 group compared with model group. Meanwhile, the increase of platelet concentration of [Ca²⁺]_i, [Mg²⁺]_i, IP₃ in platelet induced by the thrombus formation were inhibited, and the cAMP concentration in platelet was increased markedly in API0134 treated group compared with control group. **Conclusions** API0134 exerts strong anti-thrombus and anti-platelet aggregation effects. The mechanism of anti-platelet aggregation is closely related to regulating the balance of intracellular [Ca²⁺]_i, [Mg²⁺]_i, cAMP and IP₃ in platelet.

Results The occlusive thrombus formation time was lengthened and the platelet aggregation was inhibited significantly in API0134 group compared with model group. Meanwhile, the increase of platelet concentration of [Ca²⁺]_i, [Mg²⁺]_i, IP₃ in platelet induced by the thrombus formation were inhibited, and the cAMP concentration in platelet was increased markedly in API0134 treated group compared with control group. **Conclusions** API0134 exerts strong anti-thrombus and anti-platelet aggregation effects. The mechanism of anti-platelet aggregation is closely related to regulating the balance of intracellular [Ca²⁺]_i, [Mg²⁺]_i, cAMP and IP₃ in platelet.

中药穿心莲成分 API0134 具有较强的抗血小板聚集和抗动脉粥样硬化药理作用^[1,2]。本实验通过建立家兔高脂血症血栓形成模型, 观察 API0134 的抗血栓作用及对血小板信号转导的影响, 旨在深入探讨其抗血小板活化和聚集机制。

1 材料与方法

1.1 材料

API0134 为色谱法分离的穿心莲有效成分, 由本院药剂科植化室提供, 质控标准见参考文献[3]。雄性健康大耳白兔 32 只, 体重 2.2~2.5 kg, 5~6 周龄, 购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。SPA-4 型多功能血小板聚集仪(上海科达仪器厂); EPICS-51 型流式细胞仪(美国 BD 公司); SN-682 型 γ 计数器(上海核福光电仪器厂)。

1.2 高脂血症模型建立

实验兔单笼基础饲料喂养 3 天, 次日晨空腹取耳静脉血查血清总胆固醇(total cholesterol, TC)。取血当日即在饲料中加 1% 胆固醇喂饲, 每兔每天 100 g/kg。实验第 14 天末, 取耳静脉血复查血清 TC。如

[收稿日期] 2001-01-30 [修回日期] 2002-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金(39870924)资助。

[作者简介] 王宏伟, 男, 1955 年 12 月出生, 河南省唐河县人, 医学博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化发生机制、脂肪细胞分化机制、川崎病冠状动脉损伤发生机制。获湖北省和武汉市科技进步二等奖各一项, 获中华医学会中青年优秀论文一等奖一次。共发表学术论文 40 余篇。李树生, 男, 1965 年 11 月出生, 湖北省武汉市人, 医学博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病防治, 血栓形成机制。赵华月, 女, 1921 年出生, 上海市人, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病和心力衰竭研究。

血清TC水平大于喂饲胆固醇前5倍以上,视兔高脂血症模型成功,成功率为100%。

1.3 实验分组

将32只高脂血症家兔随机分为4组,每组8只:对照组,即假操作组,复制血栓模型操作同模型组,但不给直流电刺激;④模型组,单纯复制血栓模型;⑤5 mg/kg API0134组,在复制血栓模型同时注射API0134 5 mg/kg 干预; 50 mg/kg API0134组,在复制血栓模型同时注射50 mg/kg API0134 干预。

1.4 抗动脉血小板依赖性血栓形成实验

4组家兔分别用3%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉。按Ubatuba法^[4]制备动脉血小板依赖性血栓形成模型。分离左侧颈动脉,使游离段长约1.5 cm,给药组分别自耳静脉注射5 mg/kg和50 mg/kg API0134及生理盐水。给药30 min后制造血栓模型,然后用两根不锈钢电极(电极直径1.5 mm,间距2.0 mm)将游离的动脉轻挑起,用2.0 mA直流电刺激10 min,然后将一半导体点温度计放置动脉远心端,距电流刺激点距离约6.5 mm,连续测量动脉表面温度。从电流开始刺激到温度突然下降的时间即为闭塞性血栓形成时间,表明此时动脉内形成血小板血栓。血栓形成后5 min,自兔心腔穿刺取血10 mL,常规分离血小板,以供实验检测用。

1.5 观察指标

1.5.1 闭塞性血栓形成时间 以闭塞性血栓形成时间的长短作为判定药物疗效的主要指标。

1.5.2 血小板聚集功能 按血小板聚集仪规程操作。诱聚剂血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)为Sigma公司产品。血小板聚集检测在取血后3 h内完成。

表1. API0134对家兔动脉血栓形成和血小板聚集的影响。

Table 1. Effects of API0134 on artery thrombus formation and platelet aggregation in rabbit ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$).

Groups	Thrombus formation time (min)	Thrombus formation Delay rate (%)	Platelet aggregation rate (%)	Aggregation inhibition rate (%)
Control	-		60.7 ± 6.3	
Model	21.4 ± 2.7	0	90.6 ± 8.5	0
5 mg/kg API0134	27.1 ± 2.4 ^a	26.6 ± 3.4	69.3 ± 4.7 ^a	23.5 ± 1.6
50 mg/kg API0134	33.8 ± 3.3 ^{bc}	57.9 ± 2.9	58.4 ± 5.2 ^{bc}	36.6 ± 1.9

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with model group; c: $P < 0.05$, compared with 5 mg/kg API0134 group.

2.3 API0134对细胞内[Ca²⁺]_i、[Mg²⁺]_i、环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷和三磷酸肌醇浓度的影响

与模型组相比,API0134显著抑制血栓形成所诱导的血小板内[Ca²⁺]_i、[Mg²⁺]_i和三磷酸肌醇(in-

1.5.3 细胞内环磷酸腺苷和环磷酸鸟苷浓度测定

cAMP、cGMP放射免疫试剂盒购自上海中医药大学同位素室。按试剂盒说明进行cAMP、cGMP测定。

1.5.4 细胞内三磷酸肌醇浓度测定 参照文献[4]的方法略加改进,血小板体外温育培养时间为3 h。放射标记物³H-肌醇和Dowex 1 × 8 Formate型微型层析柱为美国Sigma公司产品。

1.5.5 细胞内[Ca²⁺]_i、[Mg²⁺]_i浓度测定 参照文献[5]方法。分离的血小板浓度调至10⁹/L,分别以Ca²⁺-Fluo-3和Mg²⁺-Fluo-3荧光分子探针(USA, Sigma)标记血小板。应用EPICS-51型流式细胞仪检测单个细胞内游离[Ca²⁺]_i、[Mg²⁺]_i含量。所用激光波长488 nm,散射波长525 nm,激光能量100 mV。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 血浆总胆固醇水平比较

实验家兔喂饲胆固醇饲料前血浆TC为1.53 ± 0.27 mmol/L,喂饲胆固醇饲料14天后TC为10.69 ± 2.71 mmol/L,差异有极显著性($P < 0.01$)。

2.2 API0134对颈动脉血栓形成和血小板聚集的影响

5 mg/kg API0134及50 mg/kg API0134能明显延长闭塞性血栓形成时间,明显抑制血小板聚集。50 mg/kg API0134延长闭塞性血栓形成时间和抑制血小板聚集的作用强于5 mg/kg API0134(表1, Table 1)。

ositol triphosphate, IP₃)浓度升高,显著抑制血栓形成所诱导的血小板内cAMP浓度降低,50 mg/kg API0134的药理作用强于5 mg/kg API0134($P < 0.05$)。API0134对血小板内cGMP浓度无明显影响

(表 2, Table 2)。

表 2. API0134 对家兔血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ 、 $[Mg^{2+}]_i$ 、cAMP、cGMP 及 IP_3 浓度的影响。

Table 2. Effects of API0134 on concentration of $[Ca^{2+}]_i$, $[Mg^{2+}]_i$, cAMP, cGMP and IP_3 in rabbit platelets ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$).

Groups	$[Ca^{2+}]_i$ (FIU)	$[Mg^{2+}]_i$ (FIU)	cAMP (pmol/ 10^9)	cGMP (pmol/ 10^9)	IP_3 (C. P. M)
Control	18.64 ± 3.17	3.21 ± 0.77	21.33 ± 2.1	2.07 ± 0.31	84.4 ± 11.6
Model	194.43 ± 17.58 ^d	10.81 ± 2.69 ^c	10.7 ± 3.62 ^c	1.76 ± 0.45	410.7 ± 67.8 ^d
5 mg/kg API0134	60.78 ± 8.13 ^b	4.95 ± 1.15 ^a	15.79 ± 0.06 ^a	1.90 ± 0.74	280.1 ± 40.3 ^a
50 mg/kg API0134	27.17 ± 6.42 ^{bc}	3.72 ± 1.01 ^{bc}	22.54 ± 5.11 ^{bc}	2.13 ± 0.68	190.4 ± 26.7 ^{bc}

FIU: fluorescence intensity unit; C. P. M: radioactivity unit. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with model group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with control group; e: $P < 0.01$, compared with 5 mg/kg API0134 group.

3 讨论

本实验表明, API0134 具有较强的抗高脂血症家兔动脉血小板依赖性血栓形成作用和抗血小板聚集作用, 表现为显著延长闭塞性血栓形成时间, 对 PAF 诱导的血栓模型家兔血小板聚集抑制率达 36.6%。新近报道, API0134 具有较强的抗犬心肌梗死溶栓后再闭塞的作用, 溶栓后 72 h, API0134 对血液中促血栓形成的活性成分 GMP-140 等仍有强烈抑制作用^[7]。因此中药穿心莲成分 API0134 的抗血小板聚集、抗血栓形成的药理作用, 可能为冠心病和缺血性脑梗死的防治开辟新途径。

本实验室既往研究发现, API0134 能抑制 ADP、PAF、凝血酶、肾上腺素等诱聚剂诱导的血小板聚集^[1], API0134 抗血小板聚集作用是其抗血栓形成的主要机制之一, 但其抑制血小板聚集机制尚缺乏深入研究。

目前认为血小板内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 是血小板代谢和功能的重要信号转导物质。血小板内 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的浓度变化调控血小板糖蛋白 GP IIb-IIIa 受体的空间构型和功能, 与血小板的变形、聚集和释放密切相关^[8]。本结果显示, API0134 呈剂量依赖性地抑制血栓模型家兔血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ 、 $[Mg^{2+}]_i$ 浓度升高, 可能是 API0134 抗血小板活化和聚集的机制之一。

实验表明, API0134 能增加血小板内 cAMP 水平, 对 cGMP 含量无明显影响。cAMP 可通过抑制血小板胞浆 Ca^{2+} 浓度升高、肌球蛋白磷酸化和 TXA_2 的生成途径抑制血小板聚集功能^[8]。提示 API0134 抗血小板聚集与升高 cAMP 水平有关。

三磷酸肌醇 (IP_3) 是血小板内另一类重要的细

胞信号转导物质。凝血酶可显著提高血小板内 IP_3 的含量。 IP_3 作为第二信使, 促进胞内钙储存池钙离子的释放, 使胞内钙离子浓度升高, 导致血小板活化^[9]。本研究证实, API0134 能够显著抑制因兔血栓形成导致的血小板内 IP_3 水平升高, 用药剂量增大, 抑制作用增强。因此认为 API0134 抑制由凝血酶诱导的血小板聚集的机制可能与抑制血小板内 IP_3 水平增高有关。

总之, API0134 具有显著的抗高脂血症家兔颈动脉血小板依赖性血栓形成作用和抗血小板聚集作用。API0134 抗血小板聚集的作用机制与抑制血小板胞浆 $[Ca^{2+}]_i$ 、 $[Mg^{2+}]_i$ 和 IP_3 浓度升高以及与增高血小板内 cAMP 水平有关。

[参考文献]

- [1] 付良武, 赵华月, 熊一力, 等. API0134 对四种诱聚剂致血小板聚集的影响. 中国药理学通报, 1995, 11 (3): 209-212
- [2] 刘云海, 方华丰, 丁水平, 等. 穿心莲抗血小板聚集活性物质研究. 医药导报, 2001, 20 (1): 6-7
- [3] 王宏伟, 赵华月, 熊一力. API0134 抗动脉粥样硬化的实验研究. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5 (1): 37-40
- [4] Ubatuba FB. An animal model for the study of arterial thrombosis. *Bræ J Med Biol Res*, 1989, 22: 993-995
- [5] 李品兰. 三磷酸肌醇在 IL-2 诱导的 T 细胞增殖分化中的信息传递作用. 中国免疫学杂志, 1990, 6 (6): 338-340
- [6] Boston DR, Koyama T, Rodrigue Z-Larain J, et al. Effects of angiotensin II on intracellular calcium and contracture in metabolically inhibited cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 285: 716-719
- [7] 李树生, 赵华月, 郭志凌. 穿心莲有效成分 API0134 预防犬冠状动脉溶栓后再闭塞的实验研究. 中国循环杂志, 1999, 14 (1): 26-28
- [8] 阮长耿(主编). 血栓与止血. 第一版, 江苏科学技术出版社, 1994, 50-58
- [9] Pedreno J, Hurt-Camejo E, Wiklund O, et al. Low density lipoprotein (LDL) binds to a G-protein coupled in human platelets. Evidence that the proaggregatory effect induced by LDL is modulated by down-regulation of binding sites and desensitization of its mediated signaling. *Atherosclerosis*, 2001, 155 (1): 99-112

(此文编辑 文玉珊)