

一氧化氮阿司匹林对血小板聚集功能的影响

邢继军¹, Guojian Xie², Don Zhang², 丁列明^{2,3}, 苏安英¹, 柴锡庆¹, 王印祥^{2,3}, 王拥军⁴

(1. 河北工程技术学院附属医院神经内科, 河北省邯郸市 056001; 2. Beta Pharma Inc, USA;

3. 浙江贝达药业北京新药研发中心, 北京市 100176; 4. 北京天坛医院神经内科, 北京市 100050)

[关键词] 内科学; 一氧化氮阿司匹林对血小板聚集功能的影响; 比浊法; 血小板聚集; 一氧化氮阿司匹林; 阿司匹林; 诱导剂

[摘要] 目的 研究一种能缓慢释放一氧化氮的新型阿司匹林(BPF-1096)对血小板聚集功能的影响。方法 正常人富血小板血浆与药物在 37℃ 条件下温育 10 min 后, 采用比浊法测定不同诱导剂作用下血小板聚集率。结果 不同浓度条件下 BPF-1096 能够不同程度地降低由二磷酸腺苷、血小板活化因子、肾上腺素及瑞斯托霉素诱导的血小板聚集($P < 0.05$), 对花生四烯酸诱导的血小板聚集虽有降低但是无统计学意义; 在相同浓度条件下 BPF-1096 与阿司匹林抑制血小板聚集率的作用无显著性差异; 在不同浓度条件下 BPF-1096 对血小板聚集率不存在明显的浓度效应关系。结论 BPF-1096 作为一种新型的一氧化氮阿司匹林, 能够显著抑制二磷酸腺苷、血小板活化因子、瑞斯托霉素及肾上腺素等多种诱导条件下体外血小板聚集功能, 作用强度与传统阿司匹林疗效相当, 其对血小板的抑制作用强度无明显的浓度效应关系。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Antiplatelet Aggregation Effects of Nitric Oxide-Releasing Aspirin

XING Ji-Jun¹, XIE Guo-Jian², ZHANG Dong², DING Lie-Ming^{2,3}, WANG Yir-Xiang^{2,3}, and WANG Yong-Jun⁴

(1. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Hebei Engineering College, Handan 056001, China)

[KEY WORDS] Platelet Aggregation; Nitric Oxide-Releasing Aspirin; Aspirin; Inducer; Arachidonic Acid

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of BPF-1096, a nitric oxide-releasing aspirin, on platelet aggregation. **Methods** Platelet-rich plasma (PRP) samples was prepared from healthy adult volunteers. The antiaggregant effects of BPF-1096 were tested by a standard nephelometric technique after incubating the drug with platelet at 37℃ for 10 min. **Results** The platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP), platelet activating factor (PAF), adrenergic and restocetin was inhibited by BPF-1096 at different concentration ($P < 0.05$). BPF-1096 inhibited platelet aggregation induced by arachidonic acid in every concentration but did not show any significance ($P > 0.05$). BPF-1096 displayed inhibitory effects similar to ASA at the same concentration. BPF-1096 did not strengthen the inhibitory effects on platelet aggregation at high concentration. **Conclusions** As a newly nitric oxide-releasing aspirin, BPF-1096 can significantly inhibit platelet aggregation induced by adrenergic, restocetin, ADP and PAF in vitro; the antiaggregation effects was similar to Aspirin at the same concentration. BPF-1096 did not show the correlation between concentration and efficiency.

血小板的活化在缺血性卒中的发病过程中发挥重要作用, 阿司匹林作为血小板抑制剂广泛应用于缺血性卒中的防治并取得良好疗效, 两项大规模随机、前瞻性临床试验证实服用阿司匹林可以显著降低缺血性卒中的复发率和死亡率^[1,2]。但是在治疗过程中出现的胃溃疡、胃出血等消化道副作用, 极大的限制了其长期服用, 有研究报道即使服用较低剂量阿司匹林仍不能避免副作用的发生^[3,4]。一氧化氮(nitric oxide, NO) 是一种无色无味的小分子物

质, 在体内可作为细胞内和细胞间信使及神经递质, 具有抑制血小板功能、扩张血管改善微循环、保护胃肠粘膜等多种生理作用。近年来有研究者将 NO 供体基团通过酯键连接在阿司匹林母体上, 从而合成一种新型的、在体内可缓慢释放 NO 的一氧化氮阿司匹林(NO-Aspirin), 旨在通过两者的协同作用共同发挥抑制血小板功能、降低胃肠道损害的作用。BPF-1096 是一种具有新型取代基的阿司匹林衍生物, 与目前其它 NO-Aspirin 不同点在于不需要酯酶的水解来执行生物作用, 在有效释放 NO 的同时更好的保留了阿司匹林的生物活性。由于机体内多种病理生理刺激因素的改变都能激活血小板, 故本研究采用作用受体及途径不同的多种诱导剂活化血小板, 旨在通过测定正常人体外血小板聚集率的变化,

[收稿日期] 2004-08-21 [修回日期] 2005-09-30

[作者简介] 邢继军, 硕士研究生, 主要研究方向为脑血管疾病诊断及治疗, E-mail 为 xingjijun2003@sina.com。柴锡庆, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为老年痴呆。王拥军, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为脑血管疾病。

以初步探讨 BPF-1096 对血小板聚集功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

阿司匹林(分析纯)和 BPF-1096(分析纯)由浙江贝达药业有限公司北京新药研发中心提供,使用时以二甲基亚砜(DMSO)促溶后生理盐水调整至所需实验浓度。二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)(批号 50704,终浓度 12.5 $\mu\text{mol/L}$)、肾上腺素(批号 50700,终浓度 11 $\mu\text{mol/L}$)、花生四烯酸(批号 50706,终浓度 1.5 mmol/L)及瑞斯托霉素(批号 50705,终浓度 1 g/L)均为 Biopool 公司产品,使用前按照试剂说明书配制工作液;血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)(批号 P4904,终浓度 1.03 $\mu\text{mol/L}$)为 Sigma 公司产品,氯仿溶解后-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,临用时室温下融解以 0.25% BSA-NaCl 液稀释为工作液;BSA、DMSO、枸橼酸钠、草酸铵均为北京生物化学试剂公司产品;血小板聚集及血凝测试仪为北京世帝科学仪器公司 MODEL PAPER-1 型。

1.2 方法

血液标本取自正常成年献血者($n=30$),性别不限,近两周内未服用阿司匹林及其它可能影响血小板功能的药物,抽血前一天禁高脂食物;一次性采集晨起空腹静脉血 40 mL,3.8% 枸橼酸钠抗凝(抗凝剂与血液比例为 1:9),室温下以 1 000 r/min 离心 10

min,上清液即为富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP);室温下将剩余血以 3 000 r/min 离心 10 min,上清液即为去血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP);用草酸氨法对 PRP 进行血小板记数,必要时用 PPP 调整计数范围为 250~300 $\times 10^9/\text{L}$;实验分为阿司匹林组、BPF-1096 组及对照组,每组各取 PRP 300 μL 分别加入相应药物,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下温育 10 min;以花生四烯酸、瑞斯托霉素、PAF、ADP 及肾上腺素诱导血小板活化,测定 5 min 血小板聚集率;聚集抑制率=[(对照组抑制率-给药组抑制率) \div 对照组抑制率] $\times 100\%$;所有实验均在 PRP 制备后 2 h 内完成。

1.3 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 瑞斯托霉素诱导情况

BPF-1096 在 20 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率明显低于对照组($P < 0.05$),在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率虽然低于对照组但无显著性差异,BPF-1096 各浓度组间血小板聚集率无显著性差异。阿司匹林在三种浓度条件下血小板聚集率均显著低于对照组($P < 0.05$),且随浓度的增加进一步降低($P < 0.05$)。在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时阿司匹林组血小板聚集率明显低于 BPF-1096 组($P < 0.05$)。见表 1(Table 1)。

表 1. 瑞斯托霉素诱导血小板聚集 ($n=30$)

Table 1. Platelet aggregation induced by restocetin

分 组	20 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		150 $\mu\text{mol/L}$	
	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率
BPF-1096	59.6% \pm 23.8%	21.6%	48.5% \pm 29.3%	36.2%	66.6% \pm 22.1%	12.4%
阿司匹林	58.6% \pm 21.8%	22.9%	46.0% \pm 30.5%	39.5%	29.7% \pm 18.6%	60.9%
对照组	76.0% \pm 16.8%	—	—	—	—	—

2.2 肾上腺素诱导情况

BPF-1096 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率虽然低于对照组但无显著性差异,在 50 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率明显低于对照组($P < 0.05$),各浓度组间血小板聚集率无显著性差异。阿司匹林组血小板聚集率随着浓度的升高而降低,50 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率明显低于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时($P < 0.05$);三种浓度条件下阿司匹林组血小板聚集率均明显低于对照组($P < 0.05$)。在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时阿司匹林组血

小板聚集率明显低于 BPF-1096 组($P < 0.05$)。见表 2(Table 2)。

2.3 血小板活化因子诱导情况

BPF-1096 组在 20 和 150 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率明显低于对照组($P < 0.05$),50 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率虽然低于对照组但无显著性差异,且 BPF-1096 各浓度组间无显著性差异。在三种浓度条件下阿司匹林组血小板聚集率均明显低于对照组($P < 0.05$),阿司匹林各浓度组间无显著性差异。在相

同的浓度条件下, BPF-1096 组血小板聚集率与阿司匹林组比较无显著性差异。见表 3(Table 3)。

表 2. 肾上腺素诱导血小板聚集 ($n=30$)

Table 2. Platelet aggregation induced by adnephrin

分 组	20 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		150 $\mu\text{mol/L}$	
	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率
BPF-1096	59.2% \pm 20.2%	12.0%	34.2% \pm 24.1%	49.2%	47.2% \pm 18.0%	29.9%
阿司匹林	55.4% \pm 26.7%	17.7%	23.6% \pm 20.6%	64.9%	22.0% \pm 12.4%	67.3%
对照组	67.3% \pm 29.2%	—	—	—	—	—

表 3. 血小板活化因子诱导血小板聚集 ($n=30$)

Table 3. Platelet aggregation induced by PAF

分 组	20 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		150 $\mu\text{mol/L}$	
	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率
BPF-1096	30.7% \pm 19.4%	28.9%	38.4% \pm 21.3%	11.1%	24.4% \pm 19.7%	43.5%
阿司匹林	31.9% \pm 19.8%	26.2%	33.1% \pm 20.5%	23.4%	23.0% \pm 14.1%	46.8%
对照组	43.2% \pm 23.3%	—	—	—	—	—

2.4 二磷酸腺苷诱导情况

在三种浓度条件下 BPF-1096 组和阿司匹林组血小板聚集率均明显低于对照组 ($P < 0.05$); BPF-

1096 和阿司匹林各浓度组间比较无显著性差异; 在相同浓度条件下, BPF-1096 组与阿司匹林组血小板聚集无显著性差异。见表 4(Table 4)。

表 4. 二磷酸腺苷诱导血小板聚集 ($n=30$)

Table 4. Platelet aggregation induced by ADP

分 组	20 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		150 $\mu\text{mol/L}$	
	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率
BPF-1096	68.0% \pm 12.2%	14.4%	60.9% \pm 18.8%	23.3%	65.2% \pm 11.9%	17.9%
阿司匹林	65.2% \pm 14.6%	17.9%	62.1% \pm 19.1%	21.8%	53.8% \pm 13.4%	32.2%
对照组	79.4% \pm 14.4%	—	—	—	—	—

2.5 花生四烯酸诱导情况

BPF-1096 和阿司匹林组血小板聚集率随着浓度的升高而降低, 20 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组间比较差异无显著性, 但与 150 $\mu\text{mol/L}$ 组比较差异显著 ($P < 0.05$); BPF-1096 各浓度组血小板聚集率与对照组均无显著

性差异, 阿司匹林组仅在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时血小板聚集率明显低于对照组 ($P < 0.05$)。在 150 $\mu\text{mol/L}$ 时阿司匹林组血小板聚集率明显低于 BPF-1096 组 ($P < 0.05$)。见表 5(Table 5)。

表 5. 花生四烯酸诱导血小板聚集 ($n=30$)

Table 5. Platelet aggregation induced by arachidonic acid

分 组	20 $\mu\text{mol/L}$		50 $\mu\text{mol/L}$		150 $\mu\text{mol/L}$	
	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率	聚集率	抑制率
BPF-1096	85.8% \pm 6.5%	—	72.2% \pm 13.0%	9.2%	76.2% \pm 9.8%	4.2%
阿司匹林	76.1% \pm 8.0%	4.3%	63.8% \pm 24.1%	19.7%	9.9% \pm 3.1%	87.5%
对照组	79.5% \pm 10.3%	—	—	—	—	—

3 讨论

血小板活化在动脉血栓的形成过程中发挥重要作用, 机体内多种生理或病理刺激因子改变都能够激活血小板。血小板膜上多种糖蛋白作为血小板诱导剂的受体, 通过与相应配体结合而激活血小板, 因此通过测定不同诱导剂作用条件下血小板聚集率变化, 可以对血小板的功能进行评价。

本研究发现, BPF-1096 在较低浓度即可有效发挥抑制血小板聚集功能的作用, 能够明显抑制由瑞斯托霉素、血小板活化因子及 ADP 诱导的血小板聚集, 在较高浓度条件下, BPF-1096 可抑制由肾上腺素诱导的血小板聚集。BPF-1096 各浓度组间比较无显著性差异, 提示其抑制血小板聚集的作用与药物浓度无明显相关性。本研究还发现, BPF-1096 与阿司匹林在中、低浓度条件下对各种诱导剂诱导的血小板聚集作用相似, 说明在此浓度下二者对血小板功能的抑制作用相同。而在高浓度条件下, 对花生四烯酸、瑞斯托霉素、肾上腺素及 ADP 诱导的血小板聚集, 阿司匹林组的聚集结果明显低于 BPF-1096 组, 提示在高浓度条件下阿司匹林的抗血小板聚集作用略优于 BPF-1096。

传统阿司匹林在抑制血小板功能、预防缺血性卒中的发生具有重要的意义, 但是由于消化道出血、溃疡等副作用而极大的限制其长期服用。目前的 NO-Aspirin (NCX-4016、NCX-4215) 由一个阿司匹林母体结构通过酯键连接一个 NO 供体基团构成, 在动物及人体实验中显示出明显的胃肠保护作用, 与传统阿司匹林相比, 能够明显减少消化道出血及溃疡等副作用的发生^[5-8]。研究证实, NO-Aspirin 吸收进入人体后通过生物代谢缓慢释放一氧化氮分子, 通过抑制中性粒细胞的粘附及其活性^[9-11], 增加胃粘膜组织的血流量, 抑制 Caspase 活性从而抑制细胞凋亡等途径达到实现保护胃粘膜细胞的目的^[12-14]。由于 NO 供体基团的种类及位置对 COX1/COX2 的活性及释放 NO 的药物代谢动力学有着关键的影响, 因此目前的 NO-Aspirin 产品在发挥胃肠保护作用的同时, 也削弱了自身抑制血小板聚集功能、抑制活体血栓形成的作用。实验也证实, NCX-4215 和 NCX-4016 在抑制 TXB2 释放及血小板聚集功能等方面明显低于传统阿司匹林, 在体内的生物代谢产物水杨酸盐的含量也明显降低^[15]。分析其原因, 可能

是由于酯酶的竞争性脱乙酰基作用而导致其抗炎和抑制血小板功能的降低。BPF-1096 是一种具有新型取代基的阿司匹林衍生物, 与其它 NO-Aspirin 不同的是不需要酯酶的水解来执行它的生物作用, 在有效释放 NO 的同时能够更好的保留阿司匹林的生物活性。本研究证实, BPF-1096 作为一种新型的抗血小板药物, 与阿司匹林同样能够明显抑制多种活化条件下血小板的聚集功能, 在抑制血栓形成及缺血性疾病的防治过程中过程中将发挥重要作用。对于 BPF-1096 在发挥抗血小板功能的同时所具有的胃肠保护作用, 有待今后进一步进行研究。

[参考文献]

- [1] International Stroke Trial Collaborative Group (IST). A randomized trial of aspirin, subcutaneous heparin both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*, 1997, **349**: 1 569-581
- [2] Chinese Acute Stroke Trial Collaborative Group (CAST). Randomized placebo controlled trial of early aspirin use in 20000 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*, 1997, **349**: 1 641-649
- [3] Lee M, Cryer B, Feldman M. Dose effects of aspirin on gastric prostaglandins and stomach mucosal injury. *Am Intern Med*, 1994, **120**: 184-189
- [4] Dery S, Loke YK. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin: meta-analysis. *Br Med J*, 2000, **321**: 1 183-187
- [5] Wallace JL, Muscara MN, Mcknight W, Dickey M, Soldato PD, Cirino G. In vivo antithrombotic effects of a nitric oxide-releasing aspirin derivative, NCX-4016. *Thromb Res*, 1999, **93**: 43-50
- [6] Momi S, Emerson M, Paul W, Leone M, Mezzasoma AM, Del Soldato P, et al. Prevention of pulmonary thromboembolism by NCX-4016, a nitric oxide-releasing aspirin. *Eur J Pharmacol*, 2000, **397** (1): 177-185
- [7] Kato S, Suzuki K, Ukawa H, Konoike Y, Takeuchi K. Low gastric toxicity of nitric oxide-releasing aspirin, BCX-4016, in rats with cirrhosis and arthritis. *Dig Dis Sci*, 2001, **46** (8): 1 690-699
- [8] Fiorucci S, Santucci L, Gresele P, Faccino RM, Soldato PD, Morelli A. Gastrointestinal safety of NO-aspirin (NO-4016) in healthy human volunteers: a proof of concept endoscopic study. *Gastroenterology*, 2003, **124**: 600-607
- [9] Fiorucci S, Mencarelli A, Meneguzzi A, Lechi A, Morelli A, Del Soldato P, et al. NCX-4016 (NO-Aspirin) inhibits lipopolysaccharide induced tissue factor expression in vivo. *Circulation*, 2002, **106**: 3 120-125
- [10] Gaboury J, Woodman RC, Granger DN. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol*, 1993, **265**: H862-H867
- [11] Tashima K, Fujita A, Umeda M, Takeuchi K. Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing aspirin, NCX-4016, in the stomach of diabetic rats. *Life Sci*, 2000, **67** (13): 1 639-652
- [12] Fiorucci S, Del Soldato P. NO-aspirin: mechanism of action and gastrointestinal safety. *Dig Liver Dis*, 2003, **35** (Suppl 2): S9-S19
- [13] Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Kwiecien S, Sliwowski Z, Pajdo R, et al. Implications of reactive oxygen species and cytokines in gastroprotection against stress-induced gastric damage by nitric oxide releasing aspirin. *Intern J Col Dis*, 2003, **18** (4): 320-329
- [14] Fiorucci S, Antonelli E, Santucci L, Morelli O, Miglietti M, Federici, et al. Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived Aspirin is related to inhibition of ICE-like cysteine proteases in rats. *Gastroenterology*, 1999, **116**: 1 089-106
- [15] Wallace JL, Mcknight W, Del Soldato P, Baydoun AR, Cirino G. Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2 711-718

(此文编辑 文玉珊)