

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2012.02.011

·基础研究·

莫诺昔对二磷酸腺苷诱导兔血小板聚集钙离子的影响

艾厚喜¹, 左玮^{1,2}, 王晓锋^{2,3}, 张丽², 季晖², 陈乃宏³, 王文¹

[摘要] 目的 观察莫诺昔对二磷酸腺苷(ADP)诱导兔血小板聚集后 Ca^{2+} 浓度的影响。方法 利用钙离子荧光探针(Fura-2 AM)法, 通过记录 5 min 之内 Fura-2 在激发波长 340 nm 和 380 nm 处的荧光强度比值, 检测不同条件下 ADP 诱导血小板聚集后 Ca^{2+} 的变化。结果 与空白对照组相比, 莫诺昔能显著抑制由 ADP 诱导兔血小板聚集后 Ca^{2+} 的升高 ($P < 0.001$)。结论 莫诺昔可能通过降低 Ca^{2+} 的上升达到抗 ADP 诱导的兔血小板的聚集, 从而改善体外血液流变学。

[关键词] 莫诺昔; 血小板聚集; 钙; 兔

Morroniside Inhibiting Ca^{2+} after Platelet Aggregation Induced by Adenosine Diphosphate in Rabbits AI Hou-xi, ZUO Wei, WANG Xiao-feng, et al. Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of morroniside on Ca^{2+} in the condition of platelet aggregation in rabbits induced by adenosine diphosphate (ADP). **Methods** The mobilization of cytosolic-free calcium after platelet aggregation induced by ADP was detected by Ca^{2+} -sensitive fluorescent indicator, Fura-2 AM and time scan measurement. **Results** Compared with the controls, morroniside significantly inhibited the increase of Ca^{2+} induced by ADP ($P < 0.001$). **Conclusion** Morroniside acts as an effective platelet aggregative antagonist by inhibiting the increase of platelet Ca^{2+} .

Key words: morroniside; platelet aggregation; calcium; rabbits

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2012)02-0131-03

[本文著录格式] 艾厚喜, 左玮, 王晓锋, 等. 莫诺昔对二磷酸腺苷诱导兔血小板聚集钙离子的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(2): 131-133.

心脑血管疾病发病率在日益提高, 给社会和国家带来巨大负担, 抗血小板聚集药物在防治心脑血管疾病过程中起着重要作用。20 世纪 50 年代以后, 采用活血化瘀法治疗心脑血管疾病等取得引人注目的进展。研究活血化瘀中药的活性成分, 进而开发出新药, 是中药现代化研究的课题。

山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc) 是山茱萸科植物, 性微温, 味酸、涩, 归肝、肾经, 具有补益肝肾, 涩精固脱的作用。环烯醚萜苷是本室研究得到的山茱萸有效成分。对山茱萸环烯醚萜苷进一步分离, 得到莫诺昔(morroniside)。前期研究发现, 莫诺昔对 SH-SY5Y 神经细胞具有抗氧化、抗凋亡等保护作用^[1-4]; 莫诺昔能减小大鼠局灶性脑缺血再灌注模型脑梗死体积^[5], 抑制皮层脂质过氧化作用^[6]。此外, 莫诺昔能显著抑制二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和血小板活

化因子(platelet activation factor, PAF)诱导的兔血小板聚集的作用, 尤其对 ADP 的抑制作用选择性强^[7]。血小板聚集和胞浆中游离 Ca^{2+} 浓度的升高密切相关。本文通过体外研究莫诺昔在 ADP 诱导血小板聚集后对 Ca^{2+} 含量的影响, 进一步从分子角度探讨莫诺昔抗血小板聚集的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物 莫诺昔由本室从山茱萸中提取制备, 高效液相分析, 纯度约 98.5%。乙酰水杨酸(acetylsalicylic acid, ASA)为 SIGMA 公司产品, 用时用蒸馏水溶解, 以 0.1 mol/L NaHCO_3 调 pH 至 7.0 左右, 再加蒸馏水稀释到所需浓度。

1.2 试剂 ADP: SIGMA 公司, 配制成 7.5 mg/ml 储存液, 分装, -20°C 密封保存, 临用前稀释, 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$; Fura-2 AM: 美国 Quantikine 公司。

1.3 动物及仪器 新西兰大耳白兔: 体重 (3.0 ± 0.5)

基金项目: 1. “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-366); 2. 国家自然科学基金项目(30973893); 3. 北京市自然科学基金项目(7102077); 4. 北京市教委(PXM2011_014226_07_000071); 5. 2011 年北京市卫生系统高层次卫生技术人才。

作者单位: 1. 首都医科大学宣武医院, 北京市 100053; 2. 中国药科大学, 江苏南京市 210009; 3. 中国医学科学院药物所, 北京市 100050。作者简介: 艾厚喜(1956-), 男, 辽宁凤城满族自治县人, 主管技师, 主要研究方向: 神经药理、中药药理。通讯作者: 王文。

kg, SPF 级, 由北京开源兔业养殖场提供, 合格证号 SCXK(京)2006-0005; SC-2000 Microfuge 低温离心机: 美国 BECK-MAN 公司; IMT22 型全自动酶标仪 (LP400 型): 法国 Diagnostic Pasteur。

1.4 方法

1.4.1 血小板的制备^[8] 取新西兰大耳白兔, 用 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉缓慢注射麻醉, 固定于兔台上, 颈总动脉插管取血, 与 3.8%枸橼酸钠抗凝剂按 9:1(V/V)混匀。230 g 离心 10 min 后取上清液即富含血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP), 再将 PRP 800 g 离心 15 min, 得沉淀即血小板。

1.4.2 负载血小板悬液的制备 血小板经无钙 Hepes buffer 轻轻洗涤 2 次, 然后用无钙 Hepes buffer 重悬, 调血小板的密度为 $(400\sim500)\times10^9/L$; 加入终浓度 2 μM 的 Fura-2 AM, 37 $^{\circ}C$ 恒温避光振荡负载 1 h。

1.4.3 血小板 Ca^{2+} 的测定 经 500 g 离心负载血小板悬液, 取沉淀用无钙 Hepes buffer 轻轻洗涤 2 次, 去除多余的 Fura-2 AM; 再用无钙 Hepes buffer 重悬, 加入含钙 Hepes buffer, 使其 Ca^{2+} 终浓度为 1 mmol/L。然后加入各组药品溶液, 莫诺昔低、中、高剂量组分别 3 mg/ml、6 mg/ml、12 mg/ml, 空白对照组生理盐水, ASA 组 0.5 mg/ml。体外作用 5 min; 再加入 ADP(终浓度为 10 μM)诱导聚集。双波长荧光分光光度计上作荧

光测定, 固定发射波长于 510 nm, 采用改变波长的时间扫描, 激发波长分别固定在 340 nm 和 380 nm, 记录 5 min 内 Fura-2 在激发波长 340 nm 和 380 nm 处的荧光强度比值, 即 F_{340}/F_{380} 值^[9]。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计处理, 结果以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示。应用一般线性模型 (general linear model, GLM) 的重复测量和多变量过程对重复测量数据进行重复测量方差分析和多元方差分析, 并进行不同时间点和不同组间的两两比较。药物对 Ca^{2+} 浓度变化的影响用 F_{340}/F_{380} 比值对时间变化表示。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 球形检验 Mauchly 球形检验结果 $P>0.05$, 说明重复测量数据之间实际上不存在相关性, 资料满足 Huynh-Feldt 条件, 可以用重复测量设计资料的单变量方差分析处理资料。见表 1。

2.2 分析时间、分组因素的作用以及时间和分组之间的交互作用 个体内变异部分的计算结果显示, 时间因素对 Ca^{2+} 浓度有统计学意义 ($P<0.05$), 说明 Ca^{2+} 浓度有随时间变化的趋势; 时间和分组的交互作用有统计学意义 ($P<0.05$), 说明时间因素的作用随着分组的不同而不同。个体间变异部分有统计学意义 ($P<0.05$), 说明分组因素起作用。见表 2。

表 1 Mauchly 球形检验结果

主体内效应	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
时间	0.425	15.745	9	0.073	0.652	0.908	0.250

表 2 主体内效应的检验

项目		III 型平方和	df	均方	F	Sig.
时间	采用的球形度	0.149	4	0.037	44.666	0.000
	Greenhouse-Geisser	0.149	2.607	0.057	44.666	0.000
	Huynh-Feldt	0.149	3.632	0.041	44.666	0.000
	下限	0.149	1.000	0.149	44.666	0.000
时间&分组	采用的球形度	0.205	16	0.013	15.387	0.000
	Greenhouse-Geisser	0.205	10.427	0.020	15.387	0.000
	Huynh-Feldt	0.205	14.527	0.014	15.387	0.000
	下限	0.205	4.000	0.051	15.387	0.000
误差(时间)	采用的球形度	0.066	80	0.001		
	Greenhouse-Geisser	0.066	52.133	0.001		
	Huynh-Feldt	0.066	72.633	0.001		
	下限	0.066	20.000	0.003		

2.3 每个时间点上 5 个分组之间的两两比较 对 1~5 min 内 5 个时间点各组的 F_{340}/F_{380} 比值进行两两比较。

与空白对照组相比, 在 1~5 min 内 ASA 均能显著降低由 ADP 诱导血小板聚集引起的 F_{340}/F_{380} 比值的升高 ($P<$

0.001)。莫诺昔的低、中、高剂量组均能降低ADP诱导血小板聚集引起的 F_{340}/F_{380} 比值升高,并且具有浓度依赖性,其中中、高剂量组比ASA组的作用还强。说明莫诺昔可以显著降低ADP诱导兔血小板聚集后 Ca^{2+} 浓度的升高($P<0.001$)。见表3。

表3 不同时间点各组 F_{340}/F_{380} 值比较

组别	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min
空白对照组	1.91±0.04	1.92±0.02	1.91±0.02	1.96±0.03	1.93±0.03
低剂量组	1.93±0.05 ^a	1.88±0.02 ^b	1.80±0.03	1.71±0.03	1.64±0.03
中剂量组	1.38±0.03	1.38±0.02	1.34±0.02	1.32±0.01	1.29±0.01
高剂量组	1.01±0.02	1.00±0.00	0.99±0.01	0.99±0.01	0.98±0.01
ASA组	1.78±0.05	1.78±0.03	1.8±0.01	1.73±0.01	1.71±0.02

注: 各组与空白对照组比较, a: $P=0.467$, b: $P=0.007$, 其他 $P=0.000$ 。

3 讨论

血小板聚集和胞浆中游离 Ca^{2+} 浓度的升高密切相关。 Ca^{2+} 是血小板聚集和释放反应中重要的物质基础,作为活化信息的传递者通过活化磷脂酶 A_2 作用于磷脂产生血小板活化的主要介质如血栓烷等^[10-11]。静息的血小板胞质内的 Ca^{2+} 浓度为100 nmol/L,在刺激剂的作用下其浓度可增1000 nmol/L以上。胞质内 Ca^{2+} 浓度升高可引起血小板变形、分泌和聚集。 Ca^{2+} 可通过很多途径如 Ca^{2+} -降钙素依赖性蛋白激酶、 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶PLC、PLA和PKC激活血小板^[12]。

本文着重通过测定莫诺昔是否能够抑制ADP诱导血小板聚集后引起的 Ca^{2+} 的上升,探讨莫诺昔抗血小板聚集的可能机制。从实验数据来看,莫诺昔可以不同程度抑制ADP诱导兔血小板聚集后 Ca^{2+} 的上升。从分子机制证明莫诺昔可能通过这一机制,发挥兔体外抗血小板聚集的作用。但是体内抗凝机制十分复杂,涉及到多种因素,因此对于莫诺昔抗凝机制还有待于进一步做更详尽的研究。

[参考文献]

[1] Wang W, Huang WT, Li L, et al. Morroniside prevents peroxide induced apoptosis by induction of endogenous glutathione in human neuroblastoma cells [J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28: 293-305.

[2] Wang W, Sun FL, An Y, et al. Morroniside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against hydrogen peroxide induced cytotoxicity [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 613: 19-23.

[3] 王文,孙芳玲,安宜,等. 莫诺昔抑制过氧化氢诱导的SH-SY5Y神经细胞凋亡[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(5): 428-430.

[4] 孙芳玲,王文,安宜,等. 莫诺昔抑制过氧化氢诱导的神经细胞损伤作用[J]. 中国药物与临床, 2008, 8(11): 843-845.

[5] 刘秀平,许栋明,王文,等. 莫诺昔对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型脑梗死体积的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(10): 913-915.

[6] 李蕾,许栋明,王文,等. 莫诺昔抑制大鼠脑缺血再灌注模型皮层脂质过氧化作用的研究[J]. 中国康复理论与实践, 2009, 15(11): 1015-1016.

[7] 王晓锋,陈乃红,王文. 莫诺昔对家兔血小板聚集的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(11): 1029-1030.

[8] Lee HS. Antiplatelet property of Curcuma longa L. rhizome-derived ar-turmerone [J]. Bioresource Tech, 2006, (7): 1372-1376.

[9] Lee JJ, Jin YR, Lim Y, et al. Antiplatelet activity of carnosol is mediated by the inhibition of TXA_2 receptor and cytosolic calcium mobilization [J]. Vasc Pharmacol, 2006, 45: 148-153.

[10] 金云海,单春文. 花椒油素对兔血小板聚集的影响[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 186-187.

[11] 阮长耿. 血小板-基础与临床[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1987: 59-60.

[12] 金有豫. 血小板激活及其机制[M].//汪钟,郑植荃. 现代血栓病学. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997: 217-218.

(收稿日期:2011-08-22 修回日期:2011-11-14)