

冠心 II 号对家兔血小板磷酸二酯酶的影响

时其煌 张志荣 安 岩 朱国强 刘景生

(中国医学科学院基础医学研究所药理研究室)

为研究活血化瘀药北京冠心 II 号方的作用原理,我们曾观察到该方在体内及体外均有抑制二磷酸腺苷(ADP)和胶原诱导的血小板聚集的作用^[1],两次的实验结果^[2,3]又表明此方可使家兔血小板内 cAMP 含量提高,此作用能为前列腺素 E_1 (PGE_1) 增强,推测冠心 II 号的作用环节可能是抑制血小板 PDE 的活性。本文观察了冠心 II 号对家兔血小板 PDE 活性的影响,报告如下。

一、材料和方法

1. 试剂

- (1) 50 m M Tris 5 m M $MgSO_4$ 缓冲液 (pH7.5);
- (2) 蝮蛇毒 (广州中山医学院药理教研室提供)。以 50 m M Tris 缓冲液 (pH7.5) 稀释至 0.1 m g/10 μ l;
- (3) 2.5 m M 腺苷 (Light & Co Ltd. 英国);
- (4) 5 m M 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤 (1-methyl-3-isobutyl-xanthine) (简称 MIX);
- (5) 20 m M 甲酸铵;
- (6) 冠心 II 号提取液和紫草提取液。提取方法同前^[3],用 50 m M Tris 稀释。
- (7) 胰岛素 (北京药品生物制品鉴定所提供)。26 单位/毫克,以 0.05 N HCl 溶解后用 50 m M Tris 稀释;

2. 家兔血小板 PDE 的制备

健康家兔颈动脉以硅橡胶管插管取血,以 3.8% 枸橼酸钠 (9:1) 抗凝,离心 10 分钟 (1,000 转/分),分离含有血小板的血浆。用 Krebs 氏液将血小板洗涤二次。将洗净的血小板悬浮于适量的 Krebs 氏液,并加入少量苏来醇溶液。于 -78°C 将血小板悬浮液快速冻融三次后,于 4°C 离心 20 分钟 (10,000 转/分),取上清部分即为血小板 PDE 溶液。置 -20°C 保存。用 Lowry 氏法测定其蛋白质含量^[4] (一次提取液可保存二周)。

3. ^3H -cAMP 的纯化,方法参看文献^[5]。

4. PDE 活性的测定

试管内分别依次加入 50 m M Tris 5 m M $MgSO_4$ 溶液 100 μ l, 药液或 50 m M Tris 缓冲液 50 μ l, 纯化的 ^3H -cAMP 50 μ l (200,000 cpm)。再加 PDE 溶液 50 μ l, 置 30°C 水浴温孵 15 分钟后,即放入 100°C 水浴 75 秒钟,放冷后再加入蝮蛇毒 10 μ l, 30°C 温孵 10 分钟后,加入 740 μ l 2.5

本文 1980 年 6 月 10 日收到。

m M 腺苷溶液。把上述试管中的 1 ml 溶液加于 2×0.7 厘米的 QAE Sephadex A-25 柱, 待样品全部进入柱体滴完后, 再加 20 m M 甲酸铵溶液 4 ml。此时收集液共计 5 ml, 摇匀, 取其中 2ml, 加入甲苯 Triton (2:1) 闪烁液 9ml。用 FJ-353 型液体闪烁计数器测定各管的脉冲数。每样品作双管测定。以转换率表示 PDE 的活性。

$$\text{转换率}(\%) = \frac{(\text{样品管的脉冲数} - \text{空白管脉冲数})}{\text{总计数管脉冲数}} \times 100.$$

空白管为用 50 μ l 50 m M Tris 溶液代替 PDE 溶液。总计数为 50 μ l ^3H -cAMP 加 5ml 20m M 甲酸铵溶液, 取其中 2ml 加入 9ml 甲苯 Triton 闪烁液所测得的脉冲数。

二、结 果

1. 血小板 PDE 的浓度对 ^3H -cAMP 转换率的影响

以不同浓度的血小板 PDE 作用于一定量的 ^3H -cAMP, 测得的转换率代表酶的反应速度。结果表明酶的反应速度与酶的浓度成正比。以酶的浓度的对数为横坐标, 转换率为纵坐标可得一直线(图 1)。

将 PDE 溶液在 100°C 水浴加热 1 分钟后, 测其转换率均略小于 0, 平均在 -0.38 ± 0.09 , 表示 PDE 已失去活性。对各批提取的血小板 PDE 活性进行了测定, 其转换率为 25%—75% 之间。

2. 药物对家兔血小板 PDE 活性的影响

PDE 的激活剂胰岛素和咪唑分别在 1 mU/ml 和 0.1 m M 浓度时, 在 30°C 与 PDE 温孵 15 分钟后可使 PDE 活性比对照平均增加 22.8% 和 27.6%。而 PDE 抑制剂 MIX, 在 1 m M 浓度时, 在 30°C 与 PDE 温孵 15 分钟后, 能完全抑制 PDE 的活性。冠心 II 号提取液在最终浓度为 7.6 mg 生药/ml 时, 在同样的条件下, 与对照管相比, PDE 活性被抑制 87% (表 1)。而紫草提取液在 5.2mg 生药/ml 时, 对 PDE 活性无明显影响(对照管的转换率为 33.1%, 加药的测定管的转换率为 35.6%)。同时观察了冠心 II 号对蛇毒(5' 核苷酸酶)的影响, 在测定 PDE 活性时, 将冠心 II 号提取液与蛇毒同时加入, 测其转换率为 55.9%, 对照管的 PDE 的转换率为 57.5%, 而冠心 II 号提取液与 PDE 作用 15 分钟后, 测 PDE 的转换率为 2.6%, 此表示冠心 II 号提取液仅抑制 PDE, 对蛇毒无明显抑制作用。

3. 不同浓度的冠心 II 号对血小板 PDE 的影响

用不同浓度的冠心 II 号在 30°C 与血小板 PDE 温孵 15 分钟后测 PDE 活性, 结果表示冠

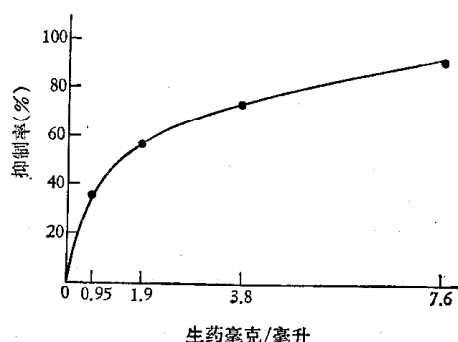
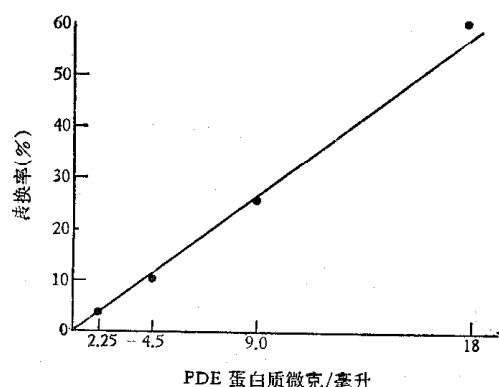


图 1 血小板 PDE 的浓度对 ^3H -cAMP 转换率的影响 图 2 不同浓度冠心 II 号对家兔血小板 PDE 的抑制作用

表1 药物对家兔血小板 PDE 活性的影响

处 理	药 物 浓 度	PDE 活 性 平均转换率%	平均抑制率, %	平均激活率, %
对 照 胰 岛 素	1 mU/ml	28.8 35.4		22.8
对 照 咪 唑	0.1 mM	25.0 31.7		27.6
对 照 MIX	1 mM	68.6 -0.6	100.8	
对 照 冠心 II 号	7.6 mg 生药/ml	29.7 3.8	87.0	

n = 3.

表2 不同浓度的冠心 II 号提取液对家兔血小板 PDE 活性的影响

药物浓度 mg 生药/ml	抑 制 率	统 计 学 处 理
	$\bar{X}(\%) \pm SD$	
7.6	91.3 $\pm$ 1.3	不同浓度间: $F = 18.0993$ $P < 0.005$
3.8	72.5 $\pm$ 3.8	
1.9	57.1 $\pm$ 7.0	批间 $F = 9.6899$ $P < 0.025$
0.95	35.8 $\pm$ 1.6	

n = 3.

心 II 号提取液对 PDE 的抑制作用随药物浓度降低而减弱, 统计学处理表示不同药物浓度对 PDE 抑制率间的差异非常显著 ($p < 0.005$). 但三批实验间的结果也有显著差异 (表 2). 以药物浓度的对数为横坐标, 对 PDE 的抑制率为纵坐标可得一曲线 (图 2).

三、讨 论

cAMP-PDE 的作用是水解 cAMP 为 5'cAMP 和磷酸, 它与环化酶共同调节细胞内 cAMP 的水平, 从而控制细胞的活动.

PDE 的测定方法很多^[6], 主要原理是以标记的或非标记的 cAMP 为底物, 与 PDE 作用后, 测定有多少 cAMP 被分解或测定 cAMP 的分解产物的量, 以此表示 PDE 的活性. 本方法用 ^3H -cAMP 为底物, 由 PDE 分解的 5'AMP, 再经蛇毒 (5' 核苷酸酶) 分解为 ^3H -腺苷, 通过 QAE Sephadex 柱层, 把 ^3H -cAMP 与 ^3H -腺苷分开, 根据测得 ^3H -腺苷的量表示 PDE 的活性. 在我们所用的 ^3H -cAMP 的浓度范围内, 不同浓度的 PDE 与其水解 cAMP 的作用呈直线关系. 用此方法观察了冠心 II 号的影响, 并和 PDE 抑制剂 MIX 及激活剂胰岛素和咪唑进行比较^[7], 结果表明, 用此法观察药物的作用比较敏感.

血小板的 cAMP-PDE 至少包括二种形式的酶^[6], 对 cAMP 的 K_m 值分别为 10^{-6} 和 $10^{-4}M$, 本实验测定的为总的 PDE 活性. 结果表明: 冠心 II 号对血小板 PDE 有抑制作用, 此作用与药物的浓度成正比关系. 因此证实了以前关于冠心 II 号对血小板作用环节的推测, 即冠心 II 号在抑制 ADP 诱导血小板聚集的剂量下, 使血小板内 cAMP 含量增高, 此作用为 PGE_1 所加

强,但与 MIX 无协同作用,所以认为冠心 II 号可能是抑制了血小板的 PDE 的活性^[3]。

实验结果还表明,冠心 II 号对 5' 核苷酸酶无明显影响。文献报道^[7] Zn^{++} 和 Cu^{++} 在 $10^{-3}M$ 浓度可抑制粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的 PDE 活性的 80%, 我们曾对冠心 II 号内所含各种离子进行了测定^[3], 并计算出在试验的酶反应系统中, 钙、镁、锌、铜的浓度均在 $10^{-7}M$ 范围内, 比文献报道的低 10,000 倍。本实验还选择对 ADP 诱导血小板聚集和血小板内 cAMP 含量无明显作用的紫草提取液进行观察, 结果表明: 紫草对血小板的 PDE 无抑制作用。

目前常用的一些血小板聚集抑制剂, 如潘生丁、咖啡因、罂粟碱等, 亦有使血小板 cAMP 增高和抑制血小板 PDE 的作用^[8]; 一些药物兼有扩张血管的作用。冠心 II 号除抑制血小板 PDE 的作用外, 也有扩张心脏血管的作用^[9], 与这类药物有类似之处。

本实验为冠心 II 号抑制血小板聚集和对血小板 cAMP 系统的作用原理提供了新的依据。细胞 cAMP 和 cGMP 存在于机体的各个部位, 对全身的功能起调节作用, 中药的作用往往是多方面的, 因此需要对中药在机体各组织的 cAMP 系统及 cGMP 系统进行广泛深入的研究, 以期更好地了解中医和中药作用原理。

致谢: 本文在金荫昌教授指导下进行。磷酸二酯酶的测定方法由美国迈阿密大学医学院生物化学系何仁杰教授传授, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] 中国医学科学院首都医院基础组药理研究室、内科心肾组, 心脏血管疾病, 1974, 2:259.
- [2] 中国医学科学院首都医院基础组、甘肃省新医药学研究所, 放射免疫分析及其它放射体外测定方法, 原子能出版社, 1976, 235.
- [3] 时其煌等, 冠心 II 号对家兔血小板内环磷酸腺苷含量的影响, 中国医学科学院学报(待发表).
- [4] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Raandall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 194(1951), 265.
- [5] 刘景生等, 环磷酸腺苷 (cAMP) 磷酸二酯酶 (PDE) 活性的测定及中药黄芪对小鼠肝脾 cAMP-PDE 活性的影响 (待发表).
- [6] Appleman, M. M., Thompson, W. J. & Russell, T. R., *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 1973, 3:65.
- [7] Mark Chasin & Harris, Don N., *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 1976, 7:225.
- [8] Vigdahl, R. L., Mongin, Jr. J. & Marquis, N. R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42(1971), 1088.
- [9] 中医研究院西苑医院, 活血化瘀冠心 II 号方药及有关资料汇编, 1976.