

穿心莲有效成分 API₀₁₃₄ 抗血小板聚集的机理^①

聂磊^② 周世豪 许教文

(中山医科大学生物化学教研室, 广州, 510089)

傅良武

(同济医科大学同济医院心研所)

提 要 API₀₁₃₄ 是一种新的穿心莲有效成分, 为黄酮类化合物。体外研究证实 API₀₁₃₄ 能有效地抑制 ADP 诱导的人血小板聚集, 其半抑制浓度 (IC₅₀) 为 70 μg/ml; API₀₁₃₄ 能强烈的抑制钙调蛋白 (CaM) 的活力, IC₅₀ 为 34 μg/ml, 但其对 CaM 依赖性磷酸二酯酶 (PDE-I) 的基础活力无影响。在浓度增高时 API₀₁₃₄ 也能抑制 CaM 不依赖性磷酸二酯酶 (PDE-Ⅱ) 活力, IC₅₀ 为 240 μg/ml, 动力学分析的结果表明, API₀₁₃₄ 虽不能改变 PDE-Ⅱ 的表观 K_m 值但可降低 V_{max}。这就表明 API₀₁₃₄ 对 (PDE-Ⅱ) 的抑制为非竞争性。本文的结果提示, 抑制 CaM 和 PDE 活力可能是 API₀₁₃₄ 抗血凝的作用机理之一。

关键词 穿心莲; API₀₁₃₄; 血小板聚集; 钙调蛋白; 磷酸二酯酶

中图分类号 Q507; R285; R963

API₀₁₃₄ (*Andrographis paniculata* isolates-0134) 是国内外首次从穿心莲 (*Andrographis paniculata*) 中提取的有效成分, 为黄酮类化合物。动物实验表明该成分能明显升高血小板内 cAMP 水平, 具有很强的抗血栓作用^[1,2]。cAMP 水平的降低, 钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 的激活是血小板活化的必要因素, 磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 是降解 cAMP, 调节胞内 cAMP 水平的重要酶。本研究利用纯化的 CaM, 磷酸二酯酶 I 和 II (PD-I 和 PDE-Ⅱ) 在体外研究 API₀₁₃₄ 对它们的影响, 探讨 API₀₁₃₄ 抗血小板聚集作用的机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 血 清 健康成人, 1周内未服阿司匹林等抗凝药物, 肘静脉取血, 3.4% 枸橼酸

钠抗凝。

1.1.2 试 剂 API₀₁₃₄ 由同济医科大学提供, 层析纯; CaM 为本室制备, 电泳纯; PDE-I 和 PDE-Ⅱ, 本室制备, 比活性分别为 0.12U/mg 和 0.36U/mg, CaM 对 PDE-I 的激活活性为基础活性的 5.8 倍; cAMP, 上海生化所产品; PVA 为日本进口, 国内分装。

1.2 方 法

1.2.1 富含血小板血浆 (PRP) 的制备 取枸橼酸钠抗凝血, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清即为 PRP, 调血小板浓度至 18~25 万 /μl。

1.2.2 血小板聚集试验 取 0.2ml PRP 加入比浊杯内, 加 API₀₁₃₄ 溶液或溶剂 10 μl, 37℃ 预温育 5 min 后加诱导剂 10 μl, 血小板聚集测定采用 PRP-3 型自动平衡血小板聚集仪, 监测聚集 5 min, 诱导剂为 ADP。

1.3 CaM 和 PDE 活性测定 采用两步温育法^[3,4]。反应液中分别含 PDE-I 0.016 U,

① 本课题为校青年基金资助项目

② 第一作者 31岁, 男, 讲师(硕士)

PDE- I 0.02 U,其中 PDE- I 激活管加纯化法^[5]。测定酶反应液中无机磷时,取三氯醋酸沉淀蛋白质后的上清0.1ml,先用0.1mol/LNaOH调pH值,再行测定。

2 结果

2.1 API₀₁₃₄对人血小板聚集的影响

以25%乙醇为溶剂对照,API₀₁₃₄对血小板聚集的抑制程度随浓度增高而增大,但抑制呈双曲线,IC₅₀约为80 μg/ml(图1),这表明 API₀₁₃₄能显著地抑制血小板聚集,其效能高于对照药川芎嗪(IC₅₀约为250μg/ml)。

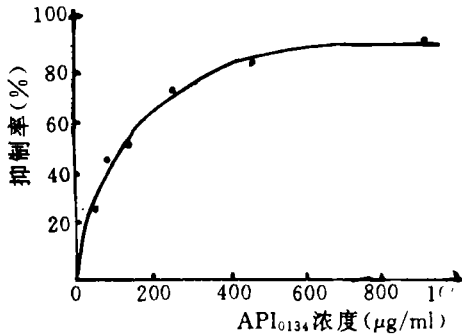


图1 API₀₁₃₄对ADP诱导人血小板聚集的抑制效应 (n=6)

CaM5 U。无机磷(Pi)测定采用孔雀绿染料 2.2 API₀₁₃₄对CaM和PDE- I活性的影响

PDE- I为CaM依赖性环核苷酸磷酸二酯酶,CaM能显著地激活PDE- I活性,因而成为检测CaM活性的工具酶。本室所建立的CaM-PDE- I系统,使用CaM特异性拮抗剂三氟拉嗪(TFP)检测,如图2所示,TFP对CaM的IC₅₀为9 μmol/L,与国内外报道相近。图3显示API₀₁₃₄对CaM激活PDE- I的活性具有强烈的抑制作用,IC₅₀为34μg/ml,对PDE- I基础活性(不加激活剂CaM和Ca²⁺)无影响(附表),提示API₀₁₃₄是作用于CaM,为CaM拮抗剂。

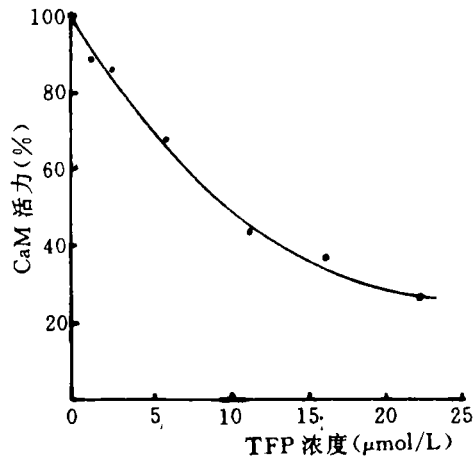


图2 TFP对CaM活力的抑制作用

附表 API₀₁₃₄对PDE- I基础活性的影响

API ₀₁₃₄ 浓度 (μg/ml)	PDE- I 基础活性 (Pi nmol/min)					$\bar{x} \pm s$	方差分析结果
	1	2	3	4	5		
125.0	3.50	3.40	3.28	3.54	3.22	3.39±0.14	F=1.02
62.5	3.36	2.96	3.10	3.46	3.24	3.22±0.20	
31.3	3.14	3.58	3.20	3.08	3.18	3.24±0.19	
15.6	3.50	3.12	3.16	3.42	3.10	3.26±0.19	P>0.05
7.8	3.08	3.28	3.06	3.16	3.34	3.18±0.12	
溶剂	3.44	3.36	3.38	3.40	3.08	3.33±0.14	

2.3 API₀₁₃₄对PDE- I活性的影响

PDE- I为CaM不依赖性环核苷酸磷酸二酯酶,与CaM相比较,在较高浓度时API₀₁₃₄对PDE- I也有抑制,其IC₅₀为240μg/

ml(图4)。动力学的研究表明,随着API₀₁₃₄浓度的增加,PDE- I的表观K_m值并未改变,但V_{max}减小(图5),即API₀₁₃₄对PDE- I的抑制作用属非竞争性;使用Dixon作图法求得

其抑制常数(Ki)为440 μg/ml。

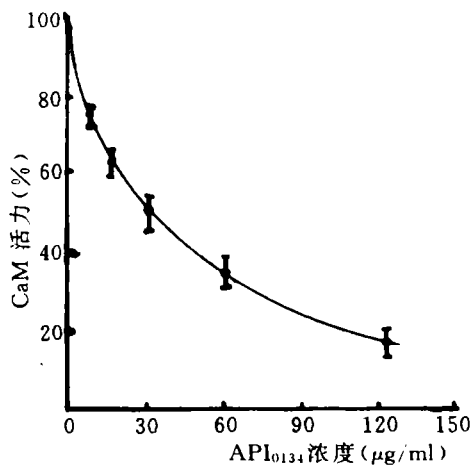


图3 API₀₁₃₄对 CaM 活力的抑制作用

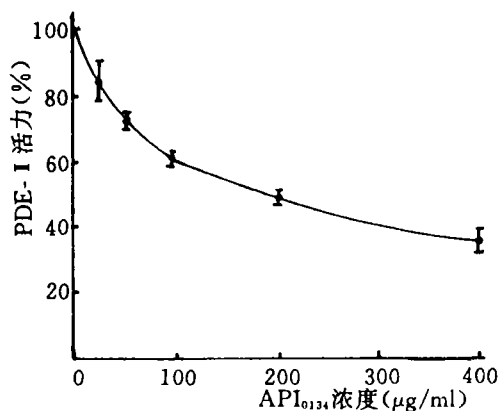


图4 API₀₁₃₄对 PDE-I 活力的抑制作用

3 讨论

血小板聚集是血栓形成的起始步骤。许多因素如5-HT, ADP 等可诱导血小板活化从而使血小板聚集。已知 ADP 是通过 cAMP 途径引起血小板活化的, 血小板内 cAMP 水平受腺苷环化酶和磷酸二酯酶活性比调控。PDE- I 和 PDE- II 是细胞内降解 cAMP 的主要磷酸酯酶, 显然这种酶的活性改变必将引起细胞内 cAMP 水平的升降。现知抗血小

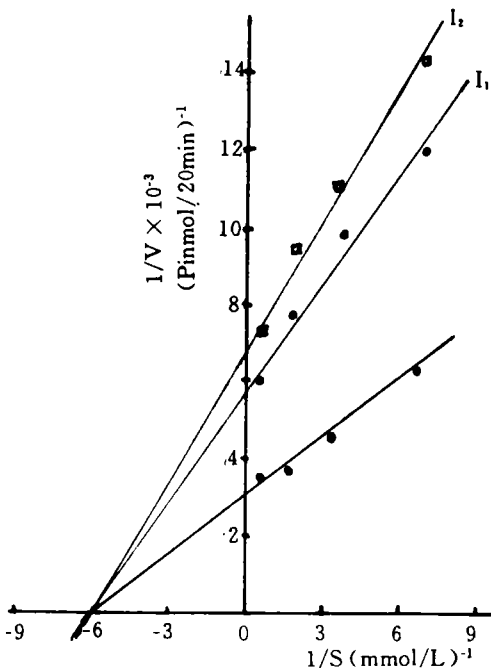


图5 API₀₁₃₄对 PDE- I 的表观 K_m 和 V_{max} 的影响 (Lineweaver-Burk 作图)

I₁, API₀₁₃₄ 浓度为 200 μg/ml; I₂, API₀₁₃₄ 浓度为 400 μg/ml

板聚集的药物均能升高血小板内 cAMP 水平, 而 cAMP 水平降低是血小板活化的必要因素。Zhao 和 Fang^[2] 已证实 API₀₁₃₄ 能明显升高血小板内 cAMP 水平。本文的实验结果表明, API₀₁₃₄ 能直接或间接降低 PDE 的活性, 从而使胞内 cAMP 降解减慢, 水平升高。此外, CaM 本身也直接参与了血小板的活化过程。现有资料表明^[6], 血小板内 Ca²⁺ 升高, 可激活依赖 CaM 蛋白激酶, 此激酶作用于肌球蛋白轻链激酶, 使其 20K 蛋白磷酸化, 从而引起血小板收缩, 变形颗粒集中与释放。所以, 抑制 CaM 活性能阻碍血小板伪足形成和活性物质的释放等活动。因此, 本文的结果提示, API₀₁₃₄ 抑制 CaM 和 PDE 活性可能是其抑制血小板聚集而具有抗血栓作用的机理之一。

参 考 文 献

- 1 谭 获,唐锦治.穿心莲抗血小板聚集功能的研究.中西医结合杂志,1989,9(9):540
 - 2 Zhao HY, Fang WY. Antithrombotic effects of *Andrographis Paniculata* nees in preventing myocardial infarction. Chinese Med J,1991,104(9):770
 - 3 Butcher KW, Sutherland EW. Adenosine 3, 5-phosphate in biological materials. J Biol Chem, 1962,237(4):1244
 - 4 Wei JW, Hickie RA. Increased content of calmodulin in Morris hepatoma 5123 t. c. (h). Biochem Biophys Res Commun, 1981,100:1562
 - 5 Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. Anal Biochem, 1987,161:45
 - 6 潘华珍.肌醇磷脂研究的进展.生理科学,1988,8(6):437
- (1993-05-07收稿 1993-11-12修回)

A STUDY OF THE ANTICLOTTING MECHANISM OF THE ACTIVE COMPONENT API₀₁₃₄ EXTRACTED FROM *Andrographis paniculata*

Nie Lei Zhou Shihao Xu Jiaowen

(Department of Biochemistry, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Fu Liangwu

(Department of Cardiology, Tong Ji Hospital, Tong Ji University of Medical Sciences)

API₀₁₃₄, a derivative of flavone, is an active component of *Andrographis paniculata*. The experiments in vitro demonstrated that API₀₁₃₄ inhibited human platelet aggregation and the IC₅₀ for the aggregation induced by ADP was about 70 μg/ml. The data showed that API₀₁₃₄ had potential inhibition on CaM, and the IC₅₀ was about 34 μg/ml. API₀₁₃₄ had no effect on the CaM-dependent phosphodiesterase (PDE- I) activity itself, however, inhibited the CaM-independent phosphodiesterase (PDE- I) activity with IC₅₀ of 240 μg/ml. The dynamical investigation showed that API₀₁₃₄ appeared not to affect the Km value of PDE- I, but brought about decrease of V_{max}, suggesting the inhibition was noncompetitive. These findings indicated that an increased cAMP level in platelets stimulated by API₀₁₃₄ resulted from the direct and indirect inhibition of PDE which hydrolyze the cAMP within the cells.

Key words *Andrographis paniculata*; platelet aggregation; calmodulin; phosphodiesterase; API₀₁₃₄