

芦丁拮抗血小板活化因子与受体结合的作用

金 鸣, 臧宝霞, 吴 伟, 陈文梅, 朴永哲, 李金荣

(北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院 药理研究室, 北京 100029)

摘 要:目的 观察芦丁对血小板活化因子 (PAF) 与受体结合的拮抗作用。方法 以放射配基结合试验观察 $[^3\text{H}]$ PAF 与家兔血小板受体特异性结合的作用; 体外以分光光度法测定 PAF 介导血小板黏附的强度; 以 Fura-2 荧光分光光度法测定 PAF 介导的兔多形核白细胞 (PMNs) 内钙离子浓度的升高。结果 芦丁可浓度依赖地抑制 1、2、4 nmol/L $[^3\text{H}]$ PAF 与血小板受体的特异性结合, 其 IC_{50} 分别为 7.3、8.7、17.2 mmol/L; 芦丁可明显抑制 PAF 介导的血小板黏附, IC_{50} 为 1.51 mmol/L; 芦丁浓度为 68.2~546 $\mu\text{mol/L}$ 时可浓度依赖地抑制 PAF 介导的 PMNs 内游离钙浓度的升高。结论 芦丁具有抗 PAF 作用, 为一种新的 PAF 受体拮抗剂。

关键词: 芦丁; 血小板活化因子 (PAF); 受体结合试验; 血小板黏附; 多形核白细胞 (PMNs)

中图分类号: R282.71; R286.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)03-0390-03

Inhibition of rutin on binding of platelet activating factor and receptor

JIN Ming, ZANG Bao-xia, WU Wei, CHEN Wen-mei, PIAO Yong-zhe, LI Jin-rong

(Department of Pharmacology, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases—Beijing

Anzhen Hospital of Capital University of Medical Science, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To observe the platelet activating factor (PAF)-receptor binding antagonistic effect of rutin. **Methods** The specific binding of $[^3\text{H}]$ PAF to rabbit platelet receptor was investigated by radio ligand binding assay (RLBA). Platelet adhesion induced by PAF was measured with spectrophotometry *in vitro*. Rabbit polymorphonucleocytes (PMNs) inner free calcium concentration increment of rabbit induced by PAF was assayed by Fura-2 fluorescent technique. **Results** The specific binding inhibition of rutin was found to be concentration-dependent, the IC_{50} of rutin in the concentrations of $[^3\text{H}]$ PAF 1, 2, 4 nmol/L was 7.3, 8.7, and 17.2 mmol/L, respectively. The PAF-induced reactions of rabbit platelet adhesion were inhibited by rutin in IC_{50} being 1.51 mmol/L. PMNs inner free calcium concentration increment induced by PAF was inhibited by rutin in the concentration of 68.2—546 $\mu\text{mol/L}$ in a concentration-dependent manner. **Conclusion** The specific receptor binding of PAF can be antagonized by rutin which is a new receptor antagonist to PAF.

Key words: rutin; platelet activating factor (PAF); receptor binding assay; platelet adhesion; polymorphonucleocytes (PMNs)

芦丁 (rutin) 别名云香苷、维生素 P, 是黄酮醇苷类化合物, 广泛存在于多种植物中。芦丁具有多种生物学活性, 可降低毛细血管通透性, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒、镇痛等作用。前期研究发现红花的水溶性成分红花总黄色素及其中含量较高的单体成分羟基红花黄色素 A 有拮抗血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 与受体结合的作用^[1,2], 为新的 PAF 拮抗剂; 又发现红花醇提物的几种成分, 如芦丁等有抗 PAF 的作用, 可抑制 PAF 介导的兔血小板聚集、5-羟色胺 (5-HT) 释放及血

小板内钙离子浓度升高^[3,4]。本实验观察了芦丁对 PAF 与兔血小板受体特异性结合的影响, 以期从细胞到分子水平阐明芦丁抗 PAF 的作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: 芦丁 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$, 纯度 > 98%, 中国药品生物制品检定所), 以二甲基亚砜 (DMSO) 配成所需浓度; 牛血清白蛋白 (BSA, 上海丽珠东风生物技术有限公司); $[^3\text{H}]$ PAF (Amersham 公司), 比活度 5.59×10^3 GBq/mmol, 浓度 6.62×10^{-6} mol/L 甲苯-乙醇 (1:1) 液, 加 3 倍体积无水

收稿日期: 2004-06-27

基金项目: 国家自然科学基金 (39670884); 北京市自然科学基金 (7013034)

作者简介: 金 鸣 (1957—), 男, 北京人, 北京市心肺血管疾病研究所-首都医科大学附属北京安贞医院药理研究室主任, 研究员, 硕士生导师, 1992 年 7 月博士毕业于北京中医药大学中西医结合生化专业, 研究方向为中药红花活血化瘀作用机制。
Tel: (010) 64456308 E-mail: jinzang@public3.bta.net.cn

乙醇配成 1.66×10^{-6} mol/L 储备液, -30°C 保存, 临用前加 pH7.4 无钙 TTBSA (NaCl 140 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, NaH_2PO_4 0.4 mmol/L, MgCl_2 2 mmol/L, NaHCO_3 12 mmol/L, Tris-HCl 10 mmol/L, dextrose 6.2 mmol/L, BSA 0.25%) 配成所需浓度; PAF (Sigma 公司), 储存液 -20°C 保存; 明胶 (gelatin, Sigma 公司); Fura-2/AM (Sigma 公司), 以 DMSO 配成 1 mmol/L 溶液, 分装后 -3°C 保存; 四氯四碘荧光素钠 (北京化工厂); 2,5-二苯基噁唑 (PPO, 香港 Fisher 公司); 1,4-双-[2-(5-苯基噁唑)]-苯 (POPOP, Fluka 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物: 新西兰家兔, 雄性, 体重 2~3 kg, 购自中国药品生物制品检定所, 为一级合格动物。

1.3 仪器: 美国 LKB Wallac 1219 RACKBETA 型液体闪烁计数器; 日本 HITACHI F-2000 型荧光分光光度计; Chrono-log 型血小板聚集仪, 美中互利公司; UV 755 B 型分光光度计, 上海分析仪器总厂; 24 孔聚苯乙烯细胞培养板, Corning Costar 公司。

2 方法

2.1 芦丁抑制 $[^3\text{H}]$ PAF 与兔洗涤血小板 (washed rabbit platelets, WRP) 受体特异性结合试验: 参照本室方法进行^[3]。家兔腹主动脉取血, ACD 抗凝, 制得 WRP 沉淀, 加入 pH7.4 无钙 TTBSA 溶液使血小板悬浮, 并调节血小板浓度 $3 \times 10^{11}/\text{L}$ 。冰浴加样, 取 WRP 悬液 0.17 mL, 加入不同浓度 (3.0~48.0 mmol/L) 的芦丁 10% DMSO 溶液 (药物管) 或 10% DMSO 溶液 (空白管) 各 0.01 mL、无钙 TTBSA 0.01 mL, 再加 $[^3\text{H}]$ PAF-无钙 TTBSA 溶液 0.01 L 为总结合反应管, 以 10 000 倍于 $[^3\text{H}]$ PAF 浓度的未标记的 PAF-无钙 TTBSA 溶液 0.01 mL 代替上述体系的无钙 TTBSA 为非特异性结合管, 此反应液混匀后 37°C 结合反应 20 min, 以红光 GF 系列玻璃纤维滤纸于细胞收集器迅速过滤反应液, 滤后以冷生理盐水冲洗滤纸 5 遍, 滤纸 80°C 烘 1 h 至干后, 取出各管对应的滤纸片分别置 5 mL 甲苯闪烁液 (0.4% PPO、0.02% POPOP 甲苯溶液) 中, 以 LKB 液体闪烁计数器测定各管放射性计数。计算各浓度芦丁抑制 $[^3\text{H}]$ PAF 与其受体特异性结合的抑制率。

抑制率 = (空白实验总结合管计数 - 芦丁实验总结合管计数) / (空白实验总结合管计数 - 芦丁实验非特异性结合管计数) $\times 100\%$

2.2 芦丁抑制 PAF 介导 WRP 黏附试验: 参照文

献方法^[1]制备 WRP-TTBSA 悬液, 调节 WRP 浓度为 $7 \times 10^{11}/\text{L}$ 。血小板黏附实验参照文献方法^[5]进行改进。实验分为溶剂空白孔、PAF 对照孔及药物孔, 于 24 孔细胞培养板的孔中, 分别加入 0.01 mL DMSO (溶剂空白孔与 PAF 对照孔) 或不同浓度芦丁 DMSO 溶液 (药物孔); 各加入 1.91×10^{-7} mol/L PAF-TTBSA 溶液 0.01 mL, 溶剂空白孔以等体积 TTBSA 溶液代替 PAF-TTBSA 溶液; 各孔分别加入 0.48 mL WRP 悬液后, 将此细胞培养板于 37°C 温育 5 min, 使 WRP 与细胞培养板壁黏附, 弃上清液, 各孔以磷酸盐缓冲液 (NaCl 145 mmol/L, Na_2HPO_4 6.7 mmol/L, NaH_2PO_4 3.3 mmol/L, 简称 PBS) 轻洗 3 遍后, 加入 0.25% 四氯四碘荧光素钠-PBS 溶液 0.5 mL, 37°C 染色 5 min, 再以 PBS 轻洗 5 遍; 各孔加入 PBS-无水乙醇 (1:1) 1 mL, 37°C 30 min 使黏附的血小板破膜; 吸取各孔中的破膜液于波长 570 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 PBS-无水乙醇做比色空白。

2.3 芦丁抑制兔多形核白细胞 (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) 内游离 Ca^{2+} 浓度的升高: PMNs 悬液制备参照文献方法^[6]进行改进。全血与 3% 明胶盐水溶液以 3:1 混匀沉降红细胞, 取上清液, $500 \times g$ 离心 5 min, 得 PMNs 沉淀, 将其中红细胞低渗破膜后, $500 \times g$ 再次离心 5 min, 沉淀洗涤后 Hepes^[6]缓冲液混悬并调整细胞数为 $3 \times 10^9/\text{L}$ 。改进文献方法^[3]测定细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。PMNs Fura-2 负载改为室温 40 min, 负载后 $500 \times g$ 离心 5 min。测定时取 Fura-2 负载的 PMNs-Hepes 悬液 569 μL 于石英比色皿中, 依次加入 0.1 mol/L CaCl_2 6 μL 、DMSO (PAF 对照管) 或不同浓度的芦丁 DMSO 溶液 (PAF + 药物管) 10 μL 、 1.9×10^{-6} mol/L PAF-Hepes 液 15 μL , 总体积 600 μL 。使用 HITACHI F-2000 荧光分光光度计测定 PMNs 内游离 Ca^{2+} 浓度的变化, 参照文献方法^[3]计算加入芦丁后 $F_{E340\text{nm}}/F_{E380\text{nm}}$ 值以对应该状态下 PMNs 内游离 Ca^{2+} 浓度。

2.4 数据处理: 用统计软件包 SPSS 10.0 以方差分析及 q 检验分析各组均值差异的显著性。

3 结果

3.1 芦丁抑制 $[^3\text{H}]$ PAF 与 WRP 受体的特异性结合: 芦丁可明显拮抗 $[^3\text{H}]$ PAF 与 WRP 受体特异性结合, 不同浓度芦丁抑制 1、2、4 nmol/L $[^3\text{H}]$ PAF 与受体的特异性结合均可见明显的量效关系。IC₅₀ 分别为 7.3、8.7、17.2 mmol/L。结果见表 1。

3.2 芦丁抑制 PAF 介导的 WRP 黏附: 芦丁可体外浓度依赖性地抑制 PAF 介导的 WRP 黏附作用: 其 IC₅₀ 为 1.51 mmol/L。结果见表 2。

3.3 芦丁抑制 PAF 介导兔 PMNs 内游离 Ca²⁺ 浓度升高: 与对照组比较, 芦丁 68.2 μmol/L 时即可明显降低 F_{E340}/F_{E380} 值, 提示芦丁可明显抑制 PAF (3.2×10⁻⁸ mol/L) 介导兔 PMNs 内游离 Ca²⁺ 浓度升高, 并呈浓度依赖性。见表 3。

表 1 芦丁对 [³H] PAF 与 WRP 受体的特异性结合的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 1 Inhibitory effect of rutin on [³H] PAF special binding to WRP receptor ($\bar{x} \pm s$, n=3)

[³ H] PAF / (nmol · L)	组别	芦丁 / (mmol · L ⁻¹)	总结合管 / Bq	非特异性结合管 / Bq	特异性结合抑制率 / %
1	对照	—	754 ± 44	—	—
	芦丁	3.0	646 ± 24 **	419 ± 12	32.1
		6.0	553 ± 41 ***	342 ± 4	48.8
		12.0	477 ± 16 ***	233 ± 12	53.1
		24.0	339 ± 14 ***	220 ± 11	77.6
2	对照	—	1 265 ± 40 ***	—	—
	芦丁	4.5	1 001 ± 42 ***	518 ± 33	35.4
		9.0	830 ± 13 ***	440 ± 19	52.8
		18.0	751 ± 36 ***	441 ± 49	62.4
		36.0	571 ± 9 ***	439 ± 13	84.0
4	对照	—	2 198 ± 66	—	—
	芦丁	6.0	1 935 ± 32	1 074 ± 11	23.3
		12.0	1 832 ± 178 **	1 039 ± 17	31.6
		24.0	1 382 ± 156 ***	849 ± 25	60.5
		48.0	919 ± 95 ***	658 ± 17	83.1

与对照组比较: ** P<0.01 *** P<0.001

** P<0.01 *** P<0.001 vs control group

表 2 芦丁对 PAF (3.82×10⁻⁹ mol/L) 介导的 WRP 黏附的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 2 Inhibitory effect of rutin on WRP adhesion induced by PAF (3.82×10⁻⁹ mol/L) ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	芦丁浓度 / (mmol · L ⁻¹)	WRP 黏附 (A ₆₇₀)	抑制率 / %
溶剂空白	—	0.041 ± 0.004	—
PAF 对照	—	0.311 ± 0.012	—
PAF+芦丁	0.92	0.219 ± 0.017 ***	34.1
	1.60	0.184 ± 0.011 ***	47.0
	2.67	0.112 ± 0.009 ***	73.7
	4.53	0.073 ± 0.003 ***	88.1
	7.71	0.063 ± 0.002 ***	91.9

与 PAF 对照组比较: *** P<0.001

*** P<0.001 vs PAF control group

4 讨论

PAF 为迄今所知最强的血小板激活剂及重要的炎症介质之一, 可由血小板、白细胞、内皮细胞等多种细胞合成, 它可作用于多种细胞受体, 产生广泛的生物效应。PAF 激活靶细胞膜上特异性受体, 受体偶联 G 蛋白, 激活磷脂酶 C (PLC), 可催化细胞

表 3 芦丁对 PAF (3.2×10⁻⁸ mol/L) 介导的兔 PMNs 内游离 Ca²⁺ 浓度升高的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 3 Inhibitory effect of rutin on PMNs [Ca²⁺]_i concentration increment induced by PAF (3.2×10⁻⁸ mol/L) ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	芦丁浓度 / (μmol · L ⁻¹)	F _{E340} /F _{E380}
PAF 对照	—	3.95 ± 0.052
PAF+芦丁	68.2	2.96 ± 0.053 ***
	136.5	2.66 ± 0.039 ***
	273.0	2.48 ± 0.012 ***
	546.0	2.36 ± 0.005 ***

与 PAF 对照组比较: *** P<0.001

*** P<0.001 vs PAF control group

膜上 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇水解产生三磷酸肌醇 (IP₃) 和二酰基甘油 (DG)。IP₃ 可诱导细胞内钙库释放 Ca²⁺ 并促使胞外 Ca²⁺ 内流, 引起细胞内 Ca²⁺ 浓度升高; DG 可激活蛋白激酶 C, 使靶蛋白磷酸化, 触发血小板、白细胞的黏附、聚集与释放, 促进血液循环障碍。血栓形成、动脉粥样硬化、炎症反应及缺血再灌注自由基损伤等诸多心脑血管疾病的发病过程均与 PAF 介导密切相关, 因此拮抗 PAF 的作用, 为目前缓解缺血性心脑血管疾病的重要途径。

本实验结果表明芦丁可浓度依赖地拮抗 PAF 与兔血小板膜受体的特异性结合, 抑制 PAF 介导兔血小板黏附与 PMNs 内游离 Ca²⁺ 浓度升高, 表明芦丁抗 PAF 的作用机制是通过抑制 PAF 受体活化, 进而阻断 PAF 诱发的反应, 芦丁为一种 PAF 受体拮抗剂。红花为常用活血化瘀药, 其提取物具抗血栓、抗心肌缺血、改善微循环、抗氧化等心血管药理作用。芦丁抑制 PAF 作用对红花活血化瘀作用具一定意义, 该成分为红花活血化瘀有效成分之一, 阐明红花成分抗 PAF 的作用机制对探讨红花活血化瘀作用的实质具有重要意义。

References:

- [1] Jin M. Study on the platelet activating factor receptor inhibition of safflower yellow [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(3): 167-169.
- [2] Zang B X. The antagonistic effect of hydroxysafflower yellow A against platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(9): 696-699.
- [3] Chen W M. Study on the inhibition effect of rutin against platelet activation induced by platelet activating factor [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(4): 283-285.
- [4] Chen W M. Study on the inhibition effect of flavones from *C. tinctorius* L. against platelet activation induced by platelet activating factor [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36(12): 881-885.
- [5] Wu W. Inhibition effect of flavones from *C. tinctorius* L. against PMNs aggregation and adhesion induced by platelet activating factor [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(10): 743-745.
- [6] Chen W M. Inhibition effect of quercetin against platelet and PMNs inner calcium level elevation induced by platelet activating factor [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(6): 455-456.