

槲皮素二硫酸酯二钠对猪血小板 F-肌动蛋白生成的影响[△]

广东医学院医用生化研究所(湛江 524023) 宋芝娟* 刘文 梁念慈 余戟** 莫丽儿**

摘 要 槲皮素二硫酸酯二钠是以槲皮素为原料合成的一种水溶性黄酮类化合物。采用曲拉通(Triton)沉淀法研究槲皮素二硫酸酯二钠与肌动蛋白微丝(F-肌动蛋白)生成间的关系,结果表明槲皮素二硫酸酯二钠可强烈抑制凝血酶诱导的猪血小板肌动蛋白的聚合,半数抑制率(IC₅₀)=30 μmol/L。结果提示槲皮素二硫酸酯二钠具有较强的抗血小板作用。

关键词 槲皮素二硫酸酯二钠 肌动蛋白微丝 血小板 抑制作用

槲皮素为天然的黄酮类化合物,因其在植物界分布较广,且具有广泛的药理作用而倍受重视。近年来对槲皮素深入研究的结果表明,槲皮素可抑制癌细胞脱氧核糖核酸(DNA)合成^[1],诱发DNA损伤^[2],抗自由基^[3],抑制多种与细胞生长调控有关酶的活性^[4~7]等作用。槲皮素可抑制人血小板聚集和钙的升高^[8],并对花生四烯酸诱导的化学发光有抑制作用^[9]。槲皮素的这种抗血小板作用,可用于防治血栓栓塞性疾病。但因其溶解性,机体难于吸收^[10]。为解决其溶解性问题,我们将槲皮素结构加以部分改造,合成了槲皮素二硫酸酯二钠。为探讨槲皮素二硫酸酯二钠对血小板的可能作用,我们以血小板中肌动蛋白为观察指标,研究两者的关系。血小板中肌动蛋白是血小板中细胞骨架蛋白之一,其有二种存在形式,即肌动蛋白单体(G)和肌动蛋白微丝(F),两者的相互转变对于血小板的功能有着较大的影响。我们的研究表明槲皮素二硫酸酯二钠可强烈抑制猪血小板中肌动蛋白的聚合。

1 材料与方法

1.1 材料:槲皮素二硫酸酯二钠由槲皮素与

硫酸在一定条件下反应而成(另文发表)。凝血酶、N-2-羟乙基派嗪-N'-2-乙磺酸(Hepes)、乙二醇双(2-氨基乙基)四乙酸(EGTA)购自Sigma公司。Triton X-100、β-巯基乙醇为Farco产品。丙烯酰胺,日本产。其余为国产分析纯或生化试剂。猪血购自湛江屠宰厂(高压电击处死猪后立即颈动脉取血,用ACD或EDTA缓冲液抗凝)。电泳装置采用Bio-Rad公司的快速垂直板电泳。

1.2 肌动蛋白聚合实验:方法参照Rosenbeg等^[11]。猪血用EDTA缓冲液[120 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 50 mmol/L EDTA, pH7.4, 0.1 volume]抗凝,室温160 g离心10 min,上清为富含血小板血浆(PRP),37℃保温90 min。取400 μL PRP,加20 μL不同浓度的槲皮素二硫酸酯二钠37℃保温15 min,加入10 μL凝血酶(终浓度为465 U/L)准确1 min,立即加入430 μL冰冷的Triton抽提液[2% Triton X-100, 10 nmol/L EGTA, 2 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L Tris和1 mmol/L 苯甲磺酰氟(PMSF), pH7.4],混匀后,4℃8 500 g离心4 min,弃去上清。沉淀用等量Tris缓

* Address: Song Zhijuan, Institute of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang

宋芝娟 1989年研究生毕业,获医学硕士学位。1992年晋升为讲师,于广东医学院生物化学教研室执教和从事科研工作。近年来主要从事有关血小板方面的生化药理学研究,现正在进行广东省卫生厅资助课题,槲皮素等物质对血小板中CKII活性的影响。1996年获湛江市科技进步二等奖一项,参加专著《细胞内信号传导系统——基础与临床》的编写,并获专利一项,同年光荣的作为广东省“千百十”工程院级重点教师。

[△] 本课题获广东省高教厅专款资助

** 广东医学院化学教研室

冲液(5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L $MgCl_2$, 50 mmol/L Tris, 0.5 mmol/L PMSF 洗涤一次, 沉淀加入 50 μ L 样品缓冲液[2%十二烷基硫酸钠(SDS), 5% β -巯基乙醇, 10%甘油, 62.5 mmol/L Tris, pH6.8], 100℃煮沸后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 浓缩胶 3%, 分离胶 10%, 每次加样 10 μ L。电泳完毕经考马斯亮蓝 R_{250} 染色后, 再脱色, 最后将肌动蛋白带剪下, 加入 25%吡啶水溶液洗脱 24 h。混匀后利用 721 分光光度计测定 605 nm 的吸收度($A_{605\text{ nm}}$), 计算肌动蛋白的相对含量(测定管的 $A_{605\text{ nm}}$ /总肌动蛋白的 $A_{605\text{ nm}}$), 所有数据均进行 t 检验。

2 结果与讨论

2.1 槲皮素二硫酸酯二钠对凝血酶诱导的肌动蛋白聚合的抑制作用: 槲皮素二硫酸酯二钠可抑制凝血酶(465 U/L)诱导的猪血小板肌动蛋白的聚合作用, 结果见图 1(A 和 B), 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

槲皮素二硫酸酯二钠可强烈抑制凝血酶诱导的猪血小板肌动蛋白的聚合, $IC_{50} = 30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。在一定浓度范围内这种抑制作用呈剂量效应关系。

2.2 讨论: 自 1959 年 Bettex-Galland 指出血小板中亦存在着“肌”蛋白后, 血小板中的肌动蛋白、原肌球蛋白和肌球蛋白等多种血小板的细胞骨架蛋白相继被提取。人血小板细胞骨架主要由 F-肌动蛋白、肌动蛋白结合蛋白和 α -辅肌蛋白组成^[11], 它们在 Triton 中不溶解。由它们组成的微丝在血小板的变形、颗粒释放、伸展和血管收缩中起着重要作用。由于血小板在血栓形成与止血等多种生理、病理过程中起着重要作用, 寻找一些抗血小板药物并研究它们可能的作用机理, 对防治某些危害人类生命严重的血栓栓塞性疾病有着广泛的理论及应用价值。

槲皮素及其衍生物具有抗血小板、抗自由基、抗癌防癌等多种生物活性及药理作用, 在植物界存在广泛, 且无毒无害。由此不难想

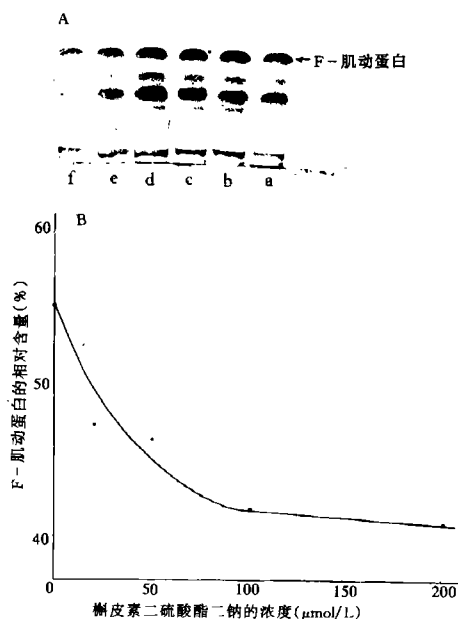


图1 槲皮素二硫酸酯二钠对凝血酶诱导的猪血小板肌动蛋白聚合的影响

A-SDS-PAGE 图谱

a-空白对照管(未加凝血酶) b-凝血酶对照管(465 U/L) c-f-测定管(槲皮素二硫酸酯二钠的浓度分别为 20, 50, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$)

B-不同浓度的槲皮素二硫酸酯二钠与 F-肌动蛋白相对含量间的关系

象槲皮素及其衍生物对人类预防和治疗血栓栓塞性疾病、肿瘤、衰老等有潜在价值。对槲皮素的药代动力学研究表明: 高剂量的槲皮素难以被胃肠道粘膜细胞吸收^[10]。另槲皮素在肠道可经细菌作用而被分解, 使药物在未吸收前即被部分破坏^[12]。如对槲皮素的化学结构进行改造, 使兼具槲皮素的作用, 又有抗细菌分解作用, 并可制成注射剂在临床上使用。有报道对槲皮素结构进行部分改造所成的水溶物——槲皮素磷酸酯钾能明显降低血液粘度、抑制血小板聚集及循环血栓形成^[13]。结果表明槲皮素二硫酸酯二钠可强烈抑制凝血酶诱导的猪血小板肌动蛋白聚集, $IC_{50} = 30\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。其制剂可望用于临床。

参考文献

- 肖显华, 等. 兰州大学学报(自然科学版), 1992, 28(2): 128
- 王肖萱, 等. 兰州大学学报(自然科学版), 1989, 25: 103

- 3 谢梅林,等. 现代应用药学,1992,9(1):1 (3):223
4 Cunningham B D, et al. Anticancer Drug Des, 1992, 7 9 顾振纶,等. 中国药理学报,1993,14(3):263
(5):365 10 赵维中,等. 中国药理学通报,1992,8(6):452
5 Shisheva A, et al. Biochemistry, 1992, 31(34):8095 11 Rosenbeg S, et al. J Cell Biol, 1981, 91:201
6 Graziani Y, et al. Eur J Biochem, 1983, 135:583 12 屠世忠. 国外医学药学分册, 1979, 4:200
7 Prajda N, et al. Life Sciences, 1995, 56(19):1587 13 吴毓秀,等. 山西医学院学报, 1993, 24(3):103
8 Xiao Dong, et al. Acta Pharmacologica Sinica, 1995, 16 (1996-07-31 收稿)

Effect of Disodium Quercetin Disulfate on the Formation of F-actin in Pig Platelet Induced by Thrombin

Song Zhijuan, She Ji, et al

Disodium quercetin disulfate is a water soluble quercetin derivative. By studying the relation between disodium quercetin disulfate and F-actin formation in pig platelets, it has been found that the derivative can strongly inhibit actin polymerization induced by thrombin with an $IC_{50}=10 \mu\text{mol/L}$, suggesting that disodium quercetin disulfate is a rather potent antiplatelet agent.

蝙蝠葛碱的抗氧化实验研究

咸宁医学院生化教研室(437100) 何丽娅* 李立中** 吴基良** 刘忠明
闵清** 郑敏** 陈姣娥***

摘要 采用大鼠海马缺血再灌注模型,观察蝙蝠葛碱的抗氧化作用。结果表明,蝙蝠葛碱能明显降低大脑海马结构组织中MDA的含量,显著提高SOD活力和GSH-PX活力,SOD/MDA比值和GSH/MDA比值显著升高,提示蝙蝠葛碱具有明显的抗氧化作用。

关键词 抗氧化 蝙蝠葛碱 大鼠

蝙蝠葛碱(dauricine, Dau)为防己科植物蝙蝠葛(又名山豆根)*Menispermum dauricum* D C. 根茎中提取的一种双苄基四氢异喹啉类生物碱。它具有与奎尼丁类似的药理作用,属于I类抗心律失常药^[1],能抗冠心病患者血小板聚集及血栓素的形成^[2]。但对抗氧化作用的研究,目前尚未见报道。现对蝙蝠葛碱的抗氧化作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 动物:24只Wister大鼠,雌雄不拘,体重210~230g,由本院动物室提供(购自湖北

医科大学动物饲养中心)。

1.2 药物和试剂:蝙蝠葛碱由陕西师范大学中心实验室提取惠赠,含量高于90%以上,用NaOH溶解,稀盐酸调pH值至7.0左右供实验之用;SOD试剂盒购自同济医科大学附属协和医院;还原型谷胱甘肽(GSH)为上海生物化学研究所产品;5,5'-硫代双(-二硝基苯甲酸)(TDNB)和硫代巴比妥酸(TBA)均为Fluka公司产品;1,1,3,3-四乙氧基丙烷(TEP)为Aldrich公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

* Address: He Liya, Dept. of Biochemistry, Xianning Medical College, Xianning

药理教研室 *组胚教研室

何丽娅 女,科室副主任,副教授。毕业于咸宁医学院医疗系,从事生物化学教学和科研工作已十余年之久。现为中国及湖北省生物化学与分子生物学学会会员。并先后参加和主持了多项省级以上科研课题的研究(主要为缺血再灌注方面的研究)。近年来在省级以上刊物上公开发表论文和省级以上学术会议上交流论文共40余篇,其中第一作者28篇(3篇获奖,2篇被某权威性学术刊物摘录)。作者于1997-04调往武汉科技大学医学院基础部生化教研室工作。