

麦角甾醇体外抗血小板聚集作用

冯利¹, 侯俊杰², 程似锦¹

(1. 长江职业学院生物医药学院, 武汉 430065; 2. 湖北省药品监督检验研究院, 武汉 430064)

摘要 目的 研究麦角甾醇的抗血小板聚集作用及机制。方法 采用家兔体外血小板聚集实验方法, 观察麦角甾醇对二磷酸腺苷($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、胶原蛋白($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、花生四烯酸($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和凝血酶($0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)诱导体外血小板聚集的抑制活性; 麦角甾醇与奥扎格雷、双嘧达莫、氯吡格雷和阿司匹林联合应用体外抗二磷酸腺苷($0, 1, 2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与纤维蛋白原($0, 1, 2, 4, 6, 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)诱导血小板聚集作用。结果 麦角甾醇对各诱导剂二磷酸腺苷、胶原蛋白、花生四烯酸、凝血酶抑制作用的半数抑制浓度(IC_{50} 值)分别为(19.3 ± 0.8), (23.4 ± 1.2), (26.7 ± 0.7), (32.9 ± 1.5) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。麦角甾醇抑制二磷酸腺苷及纤维蛋白原诱导聚集作用的协同相关性的线性最佳为双嘧达莫与氯吡格雷。结论 麦角甾醇能显著抑制血小板聚集及其功能活化, 为麦角甾醇资源的充分开发及研制新的抗血小板聚集药物提供实验依据。

关键词 麦角甾醇; 抗血小板聚集; 作用机制

中图分类号 R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1116-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.007

Anti-platelet Aggregation Activity of Ergosterol *in Vitro*

FENG Li¹, HOU Junjie², CHENG Sijin¹ (1. Department of Biological Medicine, Changjiang Polytechnic, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Institute For Drug Control, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the anti-platelet aggregation effect of ergosterol *in vitro* and explore the preliminary mechanism. **Methods** The anti-platelet aggregation activity of ergosterol was assessed *in vitro* on rabbit platelet aggregation. Different inducers, ADP ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), collagen ($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), arachidonic acid (AA, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and thrombin ($0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$), and blockers (ozagrel, dipyridamole, clopidogrel and aspirin) were applied to observe the potential targets of ergosterol, platelet aggregation induced by ADP ($0, 1, 2, 4, 6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) or fibrinogen ($0, 1, 2, 4, 6, 10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Results Ergosterol exhibited an obvious anti-platelet aggregation effect *in vitro* with IC_{50} values on different inducers (ADP, collagen, AA and thrombin) of (19.3 ± 0.8), (23.4 ± 1.2), (26.7 ± 0.7), (32.9 ± 1.5) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. **Conclusion**

Ergosterol can significantly inhibit aggregation and activation of platelet. It provides experimental basis for full exploration of ergosterol and development of novel anti-platelet aggregation drugs.

KEY WORDS Ergosterol; Anti-platelet aggregation; Mechanism

麦角甾醇(ergosterol)又称麦角固醇,主要存在于酵母菌、多孔真菌、真菌等菌类和某些植物中,是一种重要的甾醇物质和生产甾体激素药物的重要原料,具有广泛的生理作用^[1-2]。现代药理学研究表明麦角甾醇具有利尿、抗肿瘤、抗菌等多种生物活性^[3-7],但目前麦角甾醇及其衍生物对抗血栓药理作用研究笔者尚未见报道。为寻找更多的具有抗血栓的备选化合物及扩大药源,本课题组前期研究确定药用真菌猪苓中麦角甾醇为抗血小板聚集的活性物质,现拟以抗血小板聚集为研究切入点,在血小板聚集发生的生理过程,初步肯定麦角甾醇抗血栓作用,并对其抗血小板聚集作用

和机制进行探索,为麦角甾醇资源的充分开发及研制一种新的抗血小板聚集药物提供初步实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新西兰兔,体质量 $2.0 \sim 2.5 \text{ kg}$;雌雄各半,无特定病原体(SPF)级,均购自湖北省实验动物研究中心,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。动物饲养于湖北中医药大学中医药实验中心,饲养环境为常规日夜周期,室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(50 ± 2)%,单笼饲养,自由进食饮水。实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2012-0067。

1.2 实验仪器 560-CA 血小板聚集测试仪(美国 CHRONOLOG 公司),TGL-18C 飞鸽台式离心机(上海安亭飞鸽仪器有限公司),EL204 万分之一电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],HH-6 数显恒温水浴锅(金坛市医疗仪器厂),KQ3200B 型超声仪波清洗器(昆山市超声仪器厂),真空采血管(武汉成龙科贸有限公司)。

收稿日期 2016-12-15 修回日期 2017-01-20

作者简介 冯利(1981-),女,湖北武汉人,讲师,主治医师,硕士,研究方向:中药学研究。电话:027-87291066, E-mail: 15640564@qq.com。

通讯作者 程似锦(1978-),女,湖北武汉人,讲师,学士,研究方向:药物制剂、药理及制药工艺。E-mail: 1036670659@qq.com。

1.3 药物与试药

1.3.1 药物 阿司匹林片(德国拜耳制药公司,批号:20160122,规格:每片 100 mg),双嘧达莫片(广东华南制药厂,批号:101104,规格:每片 25 mg),氯吡格雷片(法国赛诺菲制药公司,批号:20150211,规格:每片 75 mg),注射用奥扎格雷钠(哈药集团生物工程有限公司,批号:20160819,每支 20 mg)。

1.3.2 试药 戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20141029,含量 > 99.0%);枸橼酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150412,含量为99.0%);二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)(芜湖华仁科技有限公司,批号 20150218,含量≥98.0%)、花生四烯酸(arachidonic acid,AA)(百灵威科技有限公司,批号:20150923,含量为 99.0%)、凝血酶(thrombin,THR)(武汉易泰科技有限公司,批号:20160322,含量为 99.0%)、胶原蛋白(collagen,COL)(武汉易泰科技有限公司,批号:20151011,含量为99.0%)、纤维蛋白原(fibrinogen,FIB)(上海宝曼生物科技有限公司,批号:20150527,含量为 99%)。麦角甾醇(西安万方生物科技公司,批号:20150201,含量>98%)。

1.4 麦角甾醇对不同诱导剂体外血小板聚集实验 取新西兰家兔,参考文献[8-12]方法进行,以 3%戊巴比妥钠(1.5 mL·kg⁻¹)麻醉,颈总动脉采血,3.8 %枸橼酸钠 1 : 9 抗凝,混匀,1 000 r·min⁻¹(r=15 cm)离心 10 min,取上清液,即为富含血小板血浆(PRP);剩余部分以 3 000 r·min⁻¹(r=15 cm)离心 20 min,即得贫血小板血浆(PPP)。取上述两种血浆,用 PPP 调零,以 PRP 为血小板供体。受试药物每浓度设 6 个平行样本。对照组 PRP 中加入等体积 0.9%氯化钠溶液。各组 PRP 于 37 ℃ 温育 10 min,分别加入 ADP(终浓度为 4 μmol·L⁻¹)、AA(终浓度为 1 mmol·L⁻¹)、THR(终浓度为0.5 U·mL⁻¹)、COL(终浓度为 4 μg·mL⁻¹)诱导血小板聚集,按比浊法(光学法)用血小板聚集仪测定血小板最大聚集率,计算曲线斜率即得血小板聚集率,血小板聚集抑制率(%)=(对照组血小板聚集率-给药组血小板聚集率)/对照组血小板聚集率×100%。

1.5 麦角甾醇与不同阻断剂联用 体外抗血小板聚集实验 取家兔颈动脉血样,参考文献[13-14]方法,制备 PRP、PPP(制备方法同“1.4”项)。将未洗涤 PRP 与奥扎格雷(4.5 mmol·L⁻¹)、氯吡格雷(1.2 mmol·L⁻¹)、阿司匹林(2.0 mmol·L⁻¹)、双嘧达莫(1.0 mmol·L⁻¹)在 37 ℃ 下孵育 20 min,再加入麦角甾醇(10 μmol·L⁻¹)继续孵育 10 min,测定加入 ADP(0,1,2,4,6 μmol·L⁻¹)、FIB(0,1,2,4,6,10 mg·mL⁻¹)诱导 3 min 后最大血小

板聚集率,观察其对不同阻断剂作用后对 ADP 与 FIB 诱发的血小板聚集的影响。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 版统计软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 Logit 法计算聚集半数抑制浓度(IC₅₀)。

2 结果

2.1 麦角甾醇对不同诱导剂体外血小板聚集作用影响 结果见图 1。研究结果显示麦角甾醇能有效抑制 ADP、COL、AA、THR 诱导的体外血小板聚集,且呈剂量依赖性抑制作用,表现出明显的抗血小板聚集作用。麦角甾醇对各诱导剂(ADP、COL、THR、AA)抑制作用见表 1,IC₅₀值分别为(19.3±0.8),(23.4±1.2),(26.7±0.7),(32.9±1.5) μmol·L⁻¹。由体外抗血小板聚集实验可知,其对不同诱导剂均存在明显抗诱导聚集作用,由图 1 可知麦角甾醇对 ADP 诱导的血小板聚集抑制最为明显,且浓度变化所引发的血小板聚集抑制作用变化也最为显著。

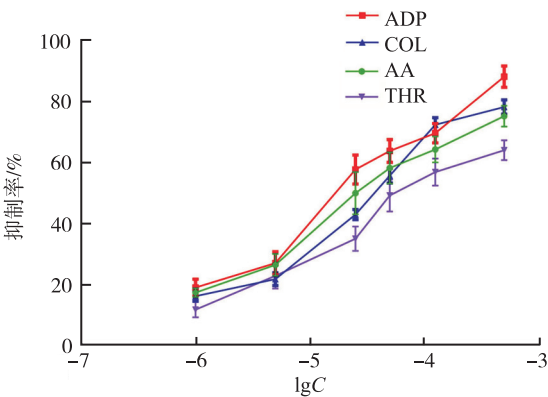


图 1 麦角甾醇抗 ADP、COL、AA、THR 的体外血小板聚集的量效关系曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.1 Curve of dose-effect relationship of ergosterol on platelet aggregation induced by ADP, COL, AA, and THR in vitro ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 1 麦角甾醇对 ADP、COL、AA、THR 诱导的体外血小板聚集的抑制作用

Tab. 1 Inhibition effects of ergosterol on platelet aggregation induced by ADP, COL, AA and THR in vitro

		$\bar{x} \pm s, n=6$	
诱导剂	浓度	IC ₅₀	95%CI
		(μmol · L ⁻¹)	
ADP	1 mmol · L ⁻¹	19.3±0.8	(5.3,37.7)
COL	0.5 U · mL ⁻¹	23.4±1.2	(20.3,29.6)
THR	4 μmol · L ⁻¹	26.7±0.7	(5.5,28.8)
AA	4 μg · mL ⁻¹	32.9±1.5	(28.2,38.1)

2.2 麦角甾醇与不同阻断剂联合应用抗血小板聚集作用结果 麦角甾醇与奥扎格雷(TXA₂ 抑制药)、阿司匹林(COX 环氧酶抑制药)、氯吡格雷(P2Y₁₂ 受体抑制药)、双嘧达莫(PDE 抑制药)联用于 ADP 诱导的体外抗血小板聚集作用,都能体现出其抑制作用。由于不同阻断剂的作用机制不同,因此可以根据抑制曲线的线性关系来评价其之间的相关性,线性关系即可预示出协同作用关系。结果见图 2,3。图 2 结果表明:麦角甾醇与上述阻断剂可能存在相似作用途径,量效曲线的线性关系反映其协同作用相关性大小,推测麦角甾醇抑制 ADP 诱导聚集作用的协同相关性依次为:双嘧达莫>氯吡格雷>奥扎格雷>阿司匹林。图 3 的结果表明:麦角甾醇与奥扎格雷、阿司匹林、氯吡格雷、双嘧达莫联用体外抗血小板聚集作用,都能体现协同作用,预示麦角甾醇于上述阻断剂可能存在相似作用途径,量效曲线的线性关系反映其协同作用相关性大小。因此,麦角甾醇抑制 FIB 诱导聚集作用的协同相关性依次为:双嘧达莫>氯吡格雷>阿司匹林>奥扎格雷。综合图 2 与图 3 结果分析麦角甾醇与阻断剂之间关系最为直接的为双嘧达莫与氯吡格雷,因此,推测麦角甾醇抑制血小板聚集的药理机制可能与 cAMP 和 P2Y₁₂ 受体相关。

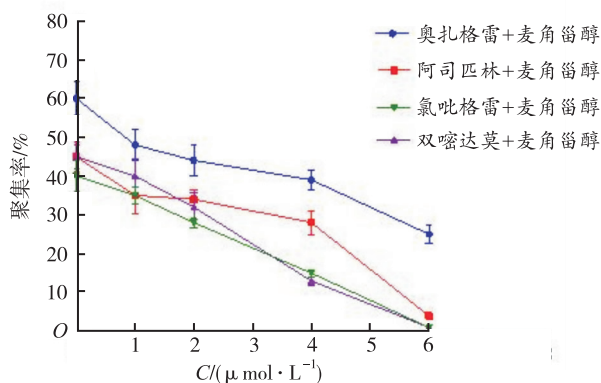


图 2 麦角甾醇与 4 种诱导剂联用体外抗 ADP 诱导血小板聚集作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Inhibition effects of ergosterol combined with four inducers on platelet aggregation induced by ADP in vitro ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

麦角甾醇在真菌中广泛存在,其药理活性多样,本实验探讨麦角甾醇的抗血小板作用及初步机制,设计市面常用的抗血小板药物与体内诱导聚集的主要活性物质,从正反两方面论证麦角甾醇的抗血小板活性与可能机制。由于 ADP 为常见诱导血小板聚集因素,抑

制 ADP 诱发的聚集可以降低较大的血栓形成风险^[15-16],此外 FIB 作用于血小板聚集的最后环节,因此对 FIB 的聚集抑制能具有一定说服力的实验依据。

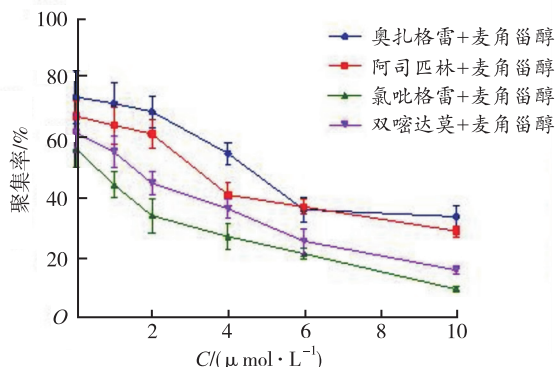


图 3 麦角甾醇与 4 种诱导剂联用体外抗 FIB 诱导血小板聚集作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.3 Inhibition effects of ergosterol combined with four inducers on platelet aggregation induced by FIB in vitro ($\bar{x} \pm s, n=6$)

本研究表明:麦角甾醇对家兔体外血小板聚集中表现出显著的抑制聚集作用,且能对多种血小板聚集诱导剂都体现出协同作用。实验拟从体外抗血小板聚集实验发现麦角甾醇对不同血小板聚集诱导剂抑制作用之间的差异,观察麦角甾醇对不同途径血小板聚集的影响。仅从麦角甾醇对各诱导剂的 IC₅₀ 值比较,其差异较少或不存在差异。但从整个浓度梯度所得出的量效曲线分析,反映麦角甾醇对 ADP 所引起的血小板聚集量效关系最为明显。因此,能从一定层面上说明其与 ADP 诱发的血小板聚集关系较其他诱导剂紧密。

麦角甾醇与上述阻断剂可能存在相似作用途径,特别对于 PDE 抑制剂及 P2Y₁₂ 受体抑制剂联用能体现出明显量效关系,说明其作用途径与 cAMP 及 P2Y₁₂ 受体关系密切。此外,上述实验可以反推测麦角甾醇对 P2Y₁₂ 受体抑制作用与 cAMP 变化可能存在较为直接关系。本实验结果表明麦角甾醇能显著抑制血小板聚集及其功能活化,且可能与 cAMP 含量变化及 P2Y₁₂ 受体有关,推测其可能为麦角甾醇抗血小板聚集作用的靶点。

综上所述,麦角甾醇具有较显著的抗血小板聚集活性,且对于血小板聚集发生的关键环节与主要诱导物质均有不同程度的抑制作用。由于实验条件有限,没有探讨麦角甾醇对凝血酶原时间、血栓素 A₂ 及血管内皮保护等的影响,由于机体在不同生理与病理情况下药物会有不同的作用趋势,因此有必要在病理动物模型进一步研究麦角甾醇的抗血小板作用及其药理机制。

参考文献

- [1] 白晨,张翼,黄铮宇,等.香菇中麦角甾醇生成维生素 D₂ 的光化反应实验设计[J].实验室研究与探索,2010,29(2):16-19.
- [2] 郭玮,罗琼,高虹,等.麦角甾醇对 S180 荷瘤小鼠肿瘤血管生成和 Bax、Bcl-2 表达的影响[J].营养学报,2015,37(6):569-573.
- [3] 曹龙辉,李晓娟,赵文红,等.麦角甾醇的研究进展[J].中国酿造,2014,33(4):9-12.
- [4] 王晓琴,赖政炀,黄秀丽,等.麦角甾醇在灵芝孢子油鉴别与质量评价中的应用[J].食品科技,2016,41(9):262-266.
- [5] 南春辉.麦角甾醇的研究进展[J].中国新技术新产品,2009(10):6-7.
- [6] 麻兵继,文春南,吴婷婷,等.麦角甾醇过氧化物的抑菌活性研究[J].食品研究与开发,2012,33(7):42-44.
- [7] 宋志伟,朴惠善.大型药用真菌对心血管作用的研究进展[J].中国现代中药,2006,(10):29-31.
- [8] 李秀芳,代蓉,李国花,等.天麻成分对羟基苯甲醛抗血小板聚集作用及急性毒性研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(3):317-320.
- [9] 任佳伟,宋玉.银杏叶有效成分抗血小板聚集和清除 DPPH 自由基的量效关系和协同作用[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(11):2367-2372.
- [10] 洪远林.中国川芎与日本川芎的生物碱成分和抗血小板聚集作用比较[D].成都:成都中医药大学,2015:51-55.
- [11] 李宝泉,李念光,冯锋,等.阿魏酸酯类衍生物的合成及抗血小板聚集活性[J].中国药科大学学报,2009,40(6):486-490.
- [12] 梁进权,宓穗卿,王宁生.水蛭、虻虫配伍的抗凝血和抗血小板聚集的作用[J].中药材,2009,32(9):1347-1350.
- [13] 丛悦.知母甾体皂苷抗血小板活性作用机制的研究[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2010:22-26.
- [14] 金云,谭诗云,张家明.质子泵抑制药和 H₂受体阻断药对氯吡格雷抗血小板作用的影响[J].医药导报,2016,35(5):501-504.
- [15] HOGBERG C, GIDLÖF O, DEFLORIAN F, et al. Farnesyl pyrophosphate is an endogenous antagonist to ADP-stimulated P2Y₁₂ receptor-mediated platelet aggregation[J].Thromb Haemost, 2012, 108:119-132.
- [16] 赵诗云,危玮,尹小明,等.喜炎平抗 ADP 诱导的血小板聚集作用的实验研究[J].实用中西医结合临床,2016,16(8):81-82.

Y-box 结合蛋白 1 与人肝癌耐药细胞 Bel-7402/ADM P 糖蛋白的相关性*

王姗姗¹, 汪选斌²

(湖北医药学院附属人民医院 1.药学部;2.中药药理实验室,十堰 442000)

摘要 目的 研究 Y-box 结合蛋白 1(YB-1)与人肝癌耐药细胞 Bel-7402/ADM 中 P 糖蛋白(P-gp)的关系,推测其诱导癌细胞产生耐药性的相关机制。**方法** 以浓度梯度递增联合大剂量间断冲击诱导法建立人肝癌耐药细胞株 Bel-7402/ADM;运用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测 YB-1、P-gp 在人肝癌耐药细胞株 Bel-7402/ADM 和相应敏感株 mRNA 含量;采用 Western blotting 检测 YB-1、P-gp 在两种细胞株的表达量;将 YB-1 siRNA 转染耐药细胞,检测转染前后 YB-1 和 MDR1 在 mRNA 水平和蛋白水平的变化。**结果** 多柔比星对 Bel-7402 和 Bel-7402/ADM 的半数抑制浓度(IC₅₀)值分别为(2.23±0.07)和(7.02±0.03) μmol·L⁻¹。耐药组 MDR1 mRNA 的表达量高于亲本细胞(P<0.01),YB-1 mRNA 的表达量也显著高于亲本细胞(P<0.01)。耐药组 P-gp 表达量高于亲本细胞(P<0.05),YB-1 表达量也显著高于亲本细胞(P<0.01)。耐药细胞转染 siRNA 后 YB-1 mRNA、MDR1 mRNA 的表达显著降低(P<0.01),YB-1、MDR1 蛋白水平较转染前显著降低(均 P<0.05)。**结论** YB-1 表达与 P-gp 表达密切相关,YB-1 与人肝癌耐药细胞株 Bel-7402/ADM 多药耐药相关。

关键词 多药耐药;P 糖蛋白;Y-box 结合蛋白 1

中图分类号 R969.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)10-1119-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.10.008

Correlation Between Y-box Binding Protein-1 Expression and P-Glycoprotein in Drug-resistant Hepatocellular Carcinoma Bel-7402/ADM Cells

WANG Shanshan¹, WANG Xuanbin² (1. Department of Pharmacy; 2. Laboratory of Chinese Herbal Pharmacology, Renmin Hospital Affiliated with Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

ABSTRACT Objective To explore the correlation between Y-box binding protein-1 (YB-1) and P-glycoprotein (P-gp) in drug-resistant hepatocellular carcinoma (HCC) Bel-7402/ADM cells, and speculate the related mechanism of drug resistance.