

哒嗪酮类药 J-894 对血小板激活时钙流动的影响

白建平 汪 钟¹ (大同 037008 大同医学专科学校药理室 ¹100005 医学科学院基础医学研究所)

摘要 目的: 探讨 J-894 对血小板功能的影响是否与钙有关。方法: 用荧光钙离子指示剂观察 J-894 对血小板胞浆游离钙的影响。结果: J-894 通过减少钙内流和释放明显抑制比凝血酶引起的血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 剂量与效应相关。J-894 对钙内流的抑制比对钙释放的抑制作用强。结论: J-894 抗血小板聚集可能主要是抑制钙内流。

关键词 凝血酶; 血小板; 钙; J-894

ABSTRACT **AIM:** To find out if the effect of J-894 on platelet function is related to calcium. **METHOD:** Using quin-2 fluorescence technique. **RESULTS:** J-894 markedly inhibited the rise of $[Ca^{2+}]_i$ in platelet induced by thrombin in a dose dependent manner through decreasing both calcium influx and calcium release. The inhibition of calcium influx by J-894 is stronger than its inhibition of calcium release. **CONCLUSION:** The inhibitory effects of J-894 on platelet aggregation may be mainly due to an inhibition of Ca^{2+} influx.

KEY WORDS Thrombin, Platelets, Calcium, J-894

一般认为血小板浆游离钙的提高是血小板活化的起始因素^[1]。先前的实验证明无论体内或体外给药, J-894 均能明显抑制 ADP 或凝血酶诱导的家兔血小板聚集。为了探讨 J-894 对血小板功能的影响是否与钙有关, 本实验观察了 J-894 对凝血酶激活的血小板胞外钙内流及胞内储存钙释放的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂

J-894 由上海第二军医大学药理学系孙常晟教授提供; quin-2, 毛地黄皂甙, DTPA, Hepes, PGI_2 , 凝血酶为 Sigma 公司产品; EGTA 由北京化学药品商店购买。

1.2 仪器

HITACHI 850 Fluorescence spectrophotometer.

1.3 方法

1.3.1 血小板的制备: 取健康成人血, 献血者要求在 10 天内未服过阿司匹林和类似药物。用 ACD(枸橼酸 0.47g, 枸橼酸钠 1.33g, 葡萄糖 3g, 100ml 蒸馏水)以 1:4(ACD: 血)的比例抗凝, 离心($200 \times g$, 10 min), 取上清为富含血小板血浆 (PRP)。在 PRP 中加入 PGI_2 ($0.2 \mu g/ml$) 以防止血小板聚集, 然后用 quin-2 ($15 \mu M$) 与 PRP 在 $37^\circ C$ 温育 30 min, 将温育后的 PRP 离心($1200 \times g$, 6 min)弃上清, 在血小板团块中加适量 Hepes 缓冲液 ($145 mmol/L$ -NaCl, $5 mmol/L$ -KCl, $1 mmol/L$ - $MgSO_4$, $10 mmol/L$ -Hepes, $10 mmol/L$ -glucose, PH 为 7.4) 制成血小板悬液, 将血小板计数调至 $1-2 \times 10^8/ml$, 再加入 DTPA ($0.1 mmol/L$), (用于螯合非 Ca^{2+} 二价金属离子, 以排

除荧光干扰), 然后置 $37^\circ C$ 待测 $[Ca^{2+}]_i$ ^[2-3]。

1.3.2 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定: 激发波长为 339nm, 发射波长为 492nm, 在 $1 mmol/L$ 外钙的存在下, 首先测定静息血小板和凝血酶激活的血小板的荧光强度 (F); 加入毛地黄皂甙 ($0.1 mmol/L$) 破膜, 测定 quin-2 与 Ca^{2+} 螯合达到饱和时的荧光强度 (F_{max}) 再加入 $MnCl_2$ ($4 mmol/L$) (可熄灭 quin-2 荧光) 测定血小板自身的荧光强度 (F_{min}); 经公式 1 计算 quin-2 自身的荧光强度 (F_{min}), 经公式 2 求出血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 。

$$F_{min} = F_{min} + 1/6(F_{max} - F_{min}) \quad (\text{公式 1})$$

$$[Ca^{2+}]_i = kd(F - F_{min}) / (F_{max} - F) \quad (\text{公式 2})$$

注: Kd (quin-2 与 Ca^{2+} 的解离常数) = $115 nM$

2 结果

2.1 凝血酶激活血小板时 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

静息血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $73.8 \pm 9.4 nmol/L$, 加入 $CaCl_2$ ($1 mmol/L$) 后, $[Ca^{2+}]_i$ 升为 $121.3 \pm 32.9 nmol/L$, 血小板经凝血酶激活后, $[Ca^{2+}]_i$ 增至 464.9 ± 139.2 (图 1)。

2.2 凝血酶激活血小板内钙释放的测定

在无钙介质中 (加入 EGTA 络和钙) 测的静息血小板 $[Ca^{2+}]_i$ 为 $51.1 \pm 5.9 nmol/L$, 经凝血酶激活后, $[Ca^{2+}]_i$ 增至 $73.0 \pm 8.2 nmol/L$ (图 2)。两者之差为 $21.9 \pm 9.9 nmol/L$, 此值为胞内钙的释放。

2.3 J-894 对凝血酶激活血小板时 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

与血小板在 $37^\circ C$ 下温育 10 min 的 J-894 (10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , $10^{-6} mol/L$) 对凝血酶激活血小板时 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加有明显抑制作用, 剂量与效应有关 (表 1)。

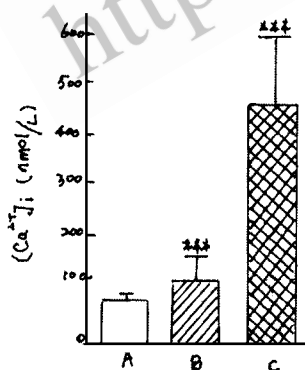


图 1 凝血酶激活血小板时 $[Ca^{2+}]_i$ 变化 ($n=7, \bar{x} \pm s$), * * * $P < 0.01$ 与静息血小板比, A. 静息; B. $CaCl_2$ ($1 mmol/L$); C. 凝血酶 ($0.3 \mu mol/L$)。

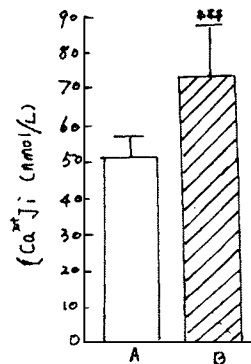


图 2 凝血酶对细胞内钙释放的影响 ($n=7, \bar{x} \pm s$) * * * $P < 0.01$ 与静息血小板比, A. 静息; B. 凝血酶 ($0.3 \mu mol/L$)。

表 1 J-894 对凝血酶激活血小板时[Ca²⁺]_i的影响

药物	剂量(mm ol/L)	例数	[Ca ²⁺] _i (nm ol/L) $\bar{X} \pm s$	抑制率%
对照	-	7	464.9±139.2	-
J- 894	10 ⁻⁹	6	375.8±88.0*	19.2
	10 ⁻⁸	6	292.6±77.9**	37.1
	10 ⁻⁷	6	246.2±67.5***	47.0
	10 ⁻⁶	6	125.8±24.9***	72.9

* P> 0.05 ** P< 0.05 *** P< 0.01

2.4 J-894 对凝血酶激活血小板时胞内钙释放的影响

小剂量(10⁻⁷mol/L) J-894 对凝血酶引起的血小板内钙释放无影响,当剂量增加到 10⁻⁶mol/L 时,明显抑制凝血酶引起的内钙释放(表 2)

表 2 J-894 对凝血酶激活血小板时胞内钙释放的影响

药物	剂量(mm ol/L)	例数	[Ca ²⁺] _i (nm ol/L) $\bar{X} \pm s$	抑制率%
对照	-	8	21.9±9.9	-
J- 894	10 ⁻⁷	4	18.4±3.1*	15.8
	10 ⁻⁶	4	9.5±0.6**	56.6

* P> 0.05 ** P< 0.05

3 讨论

本实验结果表明,加入 CaCl₂(1mmol/L), [Ca²⁺]_i 明显增加,这种情况下的钙内流称为基础钙漏,因为其不依赖激动剂,对大剂量的钙通道阻滞剂例如戊脉安不敏感。凝血酶引起血小板[Ca²⁺]_i 明显增加,这是胞外钙内流及胞内储存钙释放所引起。在胞外加入 1mmol/LEGTA 螯合胞外钙后,钙的内流极少,可被忽略,因此钙的任何变化可归于内钙释放入胞浆。在外钙缺乏的情况下,凝血酶引起血小板[Ca²⁺]_i 增加程度明显下降,这提示凝血酶使[Ca²⁺]_i 增加部分是通

过内钙释放,但主要是通过刺激钙内流。众所周知钙内流是通过电位依赖性通道调节,由于在人体血小板缺乏有电位依赖性通道的证据,因此,凝血酶似乎通过膜受体激活血小板,而引起钙内流。J-894 以剂量依赖方式明显对抗凝血酶引起的小血小板[Ca²⁺]_i 的增加,但需要较大的剂量才能抑制内钙的释放。本结果提示 J-894 对钙内流的抑制比对钙释放的抑制作用强。以往的研究证明钙通道阻滞剂可以抑制凝血酶引起的血小板钙内流^[4]。J-894 对钙内流的抑制作用类似于钙通道阻滞剂。所以,阻止钙内流可能是 J-894 抗血小板聚集的机制。此外,有资料表明钙从血小板内储库的释放可能通过 IP₃ 促发^[5], J-894 对血小板肌醇磷酸酯代谢的作用有待于进一步研究。

参考文献

- 1 汪 钟,于 润,张 宏等. 吡嗪类药物 Y-909 对凝血酶诱导的人血小板聚集和胞浆游离钙水平的影响. 中国药理学与毒理学杂志,1994,8(2): 150.
- 2 肖 东,顾振纶,白建平等. 槲皮素对血小板聚集和胞浆游离钙的影响. 中国药理学报,1995,16(3): 223.
- 3 郑淑秋,关永源,贺 华等. 蛋白激酶 C 与血管平滑肌 α₁ 肾上腺素受体触发 Ca²⁺ 内流的关系. 中国药理学与毒理学杂志,1995,9(3): 203.
- 4 Pales J, palacios-A raus L, Lopez A, Gual Effects of dihydropyridines and inotganic calcium blockers on agg regation and of intracellular free calcinm in platelets Biochim Biophys Acta1991;1064: 169.
- 5 Knezevic I, Dieter JP, Le, Breton GC. Mechanisb of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced aggregation in saponinperm eabilized platelets. J Pharm acol Exp Ther 1992; 260: 947.