RRPG88BO0035 (23.P)

計畫編號：CCMP88-RD-027

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

吳茱萸之 rutaecarpine 和川芎之 TMPZ 活體抗血栓作用之評估及其個別作用機轉之探討

委 託 研 究 報 告

計畫委託機關：私立臺北醫學院

計畫主持人：許準榕

研究人員：許準榕 李承融

執行期間： 87 年 7 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP88-RD-027

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：PG88BO-0035

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

吳茱萸之 rutaecarpine 和川芎之 TMPZ 活體抗血栓作用之評估及其個別作用機轉之探討

委 託 研 究 報 告

計畫委託機關私立臺北醫學院

計畫主持人：許準榕

研究人員：許準榕 李承融

執行期間： 87 年 7 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

編號: CCMP88-RD-027

行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度委託研究計劃成果報告

吳茱萸之 rutaecarpine 和川芎之 TMPZ 活體抗血栓作用之評估及其個別作用機轉之探討

執行機構: 台北醫學院醫學研究所
計劃主持人:許準榕副教授
研究人員: 許準榕副教授，李承融
執行期限:87 年 7 月 1 日至 88 年 6 月 30 日

目錄

內容	頁數
1. 中文摘要	3
2. 英文摘要	5
3. 前言	6
4. 材料與方法	8
5. 結果	10
6. 討論	12
7. 結論與建議	13
8. 參考文獻	14
9. 圖表	16

編號：CCMP88-RD-027

吳茱萸之rutaecarpine和川芎之TMPZ活體抗血栓作用之評估及其個別作用機轉之探討

許準榕副教授

台北醫學院醫學研究所

摘要

在傳統中醫藥裡，吳茱萸在古老中國時已用它未成熟的乾燥果實來治療一些腸胃道方面的疾病：如腹部疼痛，痢疾(dysentery)及分娩後引起的大量出血(postpartum)、頭痛(headache)和月經異常停止(amenorrhea)等。由川芎中所萃取之有效生物鹼 tetramethylpyrazine (TMPZ)，可促進血液循環及減緩疼痛。TMPZ 早期源自於 Bacillus Sultitis 的代謝物，且它的萃取、純化和結構已於 1977 年被確立。在中國大陸，一般用於治療急性腦血管疾病，TMPZ (40-120 mg/day)以 i.v.注射體內 1-3 星期後，約有 90 %的病患有明顯的改善 myodynamic 和吞嗌困難。在人類的血小板懸浮液中，TMPZ 以劑量的相關性(0.5-1.5 mM)，隨著劑量的增加而明顯的抑制血小板凝集反應。TMPZ 可明顯的抑制由 collagen (5 μg/ml), prostaglandin endoperoxide analogue compound U46619(1 μM)所引起的凝集反應。TMPZ 抑制 ATP (20 μM), collagen (5 μg/ml)及 U46619 (1 μM) 所誘發的凝集反應，其 IC_{50} 分別為 0.8, 1.2 和 1.3 (mM)。因此利用螢光劑 (fura-2am)標定到血小板細胞內，再用 collagen 來活化血小板細胞內的鈣離子。由實驗結果顯示，在加入 collagen (5 μg/ml)後可明顯的使血小板細胞內的鈣離子由 30.5 ± 1.4 增加到 221.4 ± 8.5 (nM)。而這種明顯的鈣離子增加可明顯的被 TMPZ 所抑制。另一方面，由實驗結果顯示，未活化的血小板，其細胞內的 cyclic GMP 含量很低 (7.98 ± 0.49 pmol/10^9 platelets)，在投入 nitroglycerin (200 μM)後，可明顯促使細胞內 cyclic GMP 濃度的增加 (33.52 ± 1.93 pmol/10^9 cells);另一方面，由實驗結果顯示 TMPZ 在 50-200 μM 的濃度範圍內可明顯的增加細胞內 cycle GMP 的產生。再者，在 50-200 μM 的 TMPZ 存在下，血小板細胞內 nitrate 的量有明顯的增加 (50 μM, 32.16 ± 2.15; 100 μM, 25.37 ± 1.19;

200 μM, 32.24 ± 1.52)。由以上的實驗結果顯示，TMPZ 抑制血小板凝集反應可能是經由活化 NO，至於更詳細的作用機轉則需進一步再探討。Rutaecarpine 之前已被我們証實亦具有抑制血小板凝集反應的作用；本計畫發現，rutaecarpine 可明顯的降低小白鼠的死亡率。由本實驗結果顯示，rutaecarpine 的確可抑制 ADP 引起的急性肺栓塞反應。在 rutaecarpine 對大白鼠腸繫膜動脈出血時間的影響方面，發現在投與 rutaecarpine (25 和 50 μg/g) 的劑量後，會明顯延長 rutaecarpine 對大白鼠腸繫膜動脈的出血時間。由此結果證實 rutaecarpine 的確在活體內具有明顯抗血栓活性。

關鍵詞: TMPZ, rutaecarpine, 血小板凝集, 一氧化氮, 血栓

CCMP88-RD-027

In vitro and in vivo antithrombotic effect of rutaecarpine and TMPZ

Joen-Rong Sheu

Graduate Institute of Medical Sciences, Taipei Medical College

ABSTRACT

Tetramethylpyrazine (TMPZ) is the active ingredient of a Chinese herbal medicine. In this study, TMPZ was tested for its antiplatelet activities in human platelet suspensions. In human platelets, TMPZ (0.5-1.5 mM) dose-dependently inhibited platelet aggregation induced by a variety of agonists (i.e., ADP, collagen and U46619). In addition, TMPZ also dose-dependently inhibited the intracellular free Ca^{+2} rise of Fura 2-AM loaded platelets stimulated by collagen (5 μg/ml). Furthermore, TMPZ (50-200 μM) significantly increased production of nitrate and cyclic GMP in human platelets within a 15-min incubation period. These results show that TMPZ stimulates nitric oxide production in human platelets. Furthermore, we also found that rutaecarpine was also effective in reducing the mortality of ADP-induced acute pulmonary thromboembolism in mice when administered intravenously at doses of 25 and 50 μg/g. In addition, intravenous injection of rutaecarpine significantly prolonged bleeding time as compared with normal saline in severed mesenteric arteries of rats. These results indicate that rutaecarpine is a potent antithrombotic agent in in vivo.

Keywords: TMPZ, rutaecarpine, platelet aggregation, nitric oxide, thrombosis

壹、前言

在傳統中醫藥裡，吳茱萸在古老中國時已用它未成熟的乾燥果實來治療一些腸胃道方面的疾病：如腹部疼痛，痢疾(dysentery)及分娩後引起的大量出血(postpartum)、頭痛(headache)和月經異常停止(amenorrhea)等(1)。有些學者研究報告指出，吳茱萸會有一些明顯的中樞神經系統刺激作用(2)；短暫的高血壓作用(2)及促進肌肉收縮力和增加肌肉節律性的運動速率(3)。目前有一些屬於 quinazolinocarboline 的生物鹼亦從吳茱萸的未成熟果實中純化出來；如 rhetsinine，wuchuyine，rutaevine，dehydroevodiamine，evodiamine 和 rutaecarpine 等(4)；其中一些生物鹼的藥理活性也陸續被研究證實。舉例來說：evodiamine 在大白鼠的腸繫膜動脈中有明顯的血管鬆弛效果，其機轉可能透過活化血管上的鉀離子孔道(K^+ Channel activation) (5)；由川芎中所萃取之有效生物鹼 tetramethylpyrazine (TMPZ)，可促進血液循環及減緩疼痛(6)。TMPZ 早期源自於 Bacillus Sultitis 的代謝物(7)，且它的萃取、純化和結構已於 1977 年被確立。在中國大陸，一般用於治療急性腦血管疾病，TMPZ (40-120 mg/day)以 i.v.注射體內 1-3 星期後，約有 90 %的病患有明顯的改善 myodynamic 和吞嚥困難(8)。Lu et al.(9)指出，川芎的萃取物有助於治療心絞痛。另外，Wang (10)證明，TMPZ 在治療急性腦血管栓塞上，有助於改善 nail fold microcirculation 的情形，而且 TMPZ 本身沒有明顯的副作用。另有研究報告指出，TMPZ 具有降血壓和抑制血小板凝集的作用(11,12)，降低動脈阻力且增加腦血管(13,14)及冠狀動脈血流(15,16)。TMPZ 同時有助於促進 microcirculation 及減少微血管的通透性(15,17)。經由 Liu 和 Sylvester (18)的研究報告指出，TMPZ 於動物實驗中可抑制血栓的形成；由於 TMPZ 可抑制多種活化劑(如 collagen, thrombin 和 ADP)所誘發之血小板凝集(19)，故其抑制血栓形成的作用可能部分源自於其抑制了血小板的凝集。再者，Hui et al.(20)發現，TMPZ 本身亦是一種α_2-adrenergic 受體的部分活化劑。因此，推測 TMPZ 抑制血小板的凝集反應可經由其它途徑。由以上可看出，經由現代科學技術的研究，使得吳茱萸和川芎內含生物鹼的藥理活性逐漸被揭開。在止血的過程及血栓的病理學上，血小板扮演一個相當重要的角色。另外，血小板在血管血栓症(thromboembolism)中所扮演的角色，也是最常被研究的一環。常見的動脈血栓疾病如腦血栓、冠狀動脈血栓與腎血管疾病亦是世界各國常見的十大死因之一。因此，有效的抗血栓或者抗血小板藥物的發展是目前非常迫切需要的。

Rutaecarpine 是從吳茱萸未成熟的乾燥果實中所純化出來的生物鹼；最近的研究顯示 rutaecarpine 本身具有血管鬆弛效果，而其機轉被認為可能是 endothelial nitric oxide-dependent manner (21)；從結構上判斷，其本身不屬於 nitrovasodilator (結構本身含有 NO，當其進入體內後，會使分子上的 NO

釋放出來)的藥物。因此，有可能 rutaecarpine 本身會刺激內皮細胞釋放 NO，而 NO 再進一步活化 guanylyl cyclase 而增加細胞內 cyclic GMP 的含量進而抑制血管收縮。對血小板而言，若增加血小板細胞內 cyclic GMP 的含量，亦可明顯的抑制凝集反應。相似地，TMPZ 的結構亦不屬於 nitrovasodilator 的藥物。但目前有研究報告顯示，TMPZ 對肺動脈的鬆弛作用為 endothelium-dependent 及 nitric oxide-mediated 的機制(22)。因此，為進一步評估 TMPZ 和 rutaecarpine 在血小板凝集抑制中扮演的角色及其更詳細的機轉，是本計劃的研究重點。

貳、材料與方法

一、實驗材料

中藥材川芎之 TMPZ 及吳茱萸之 rutaecarpine 分別購自於 Aldrich (Milwaukee, MI) 和 Toray Tech. CO. Japan。本實驗以 dimethylsulfoxide (DMSO) 溶解 TMPZ 及 rutaecarpine 並於-4℃下儲存。

二、實驗方法

(一)、人類血小板懸浮液的製備

將抗凝血劑 acid/citrate/glucose (ACD) 與志願健康者的全血以 1:9 (v/v) 混合，經離心 (120 g x 10 min) 後取上層液 (富含血小板血漿)加入 heparin (6.4 IU/ml), prostaglandin E_1 (0.5 μM) 37℃下溫浴 10 分鐘。再離心 (500 g x 10 min)，取下層血小板，再用 Tyrode's solution 洗三次，最後將溶液調整成每 ml 含 $4.5x10^8$ 個血小板。

(二)、細胞內鈣離子的測定

以 3.8 % sodium citrate 為抗凝血劑與健康人血 1:9 (v/v) 之比例混合，在室溫下立即以 120 g 離心 10 分鐘，將所得上層液加入 fura-2/AM (5 mM) 和 PGE_1 (2 μM)，於 37℃下避光溫浴 1 小時，再加入 EDTA (2 mM)，並且一併溫浴 10 分鐘，再依照製備血小板懸浮液的方法製備懸浮液；經 fura-2/AM 處理過之血小板懸浮液在加入 TMPZ (50-200 μM)後與 Ca^{2+}作用產生的螢光 (Ex.339 nm, Em. 550 nm)以 fluorescence spectrophotometer 紀錄之；由此可知 TMPZ 與血小板內鈣離子的關係。

(三)、細胞內 cyclic GMP 含量的測定

將血小板懸浮液先於 37℃，1200 rpm 攪拌下溫浴 1 分鐘，加入 IBMX (100 μM) 反應 2 分鐘，隨後加入 nitroglycerin (200 μM) 或待測成份 (TMPZ) 反應 45 秒，隨即加入 10 mM EDTA 後，立刻煮沸 5 分鐘，並將之冷卻至 4℃，經離心後取上層液，再以 cyclic GMP 的 EIA kits 來定量 cyclic GMP 的含量。

(四)、細胞內 NO 的含量測定

將血小板懸浮液 ($3x10^8$/ml) 與 TMPZ (50-200 μM) 進行反應 (15 或 60 分鐘) 後，立即以 14,000 rpm 離心 5 分鐘，取上層液加入無水酒精 (1:2) 均勻混合，再於 4℃下冷藏 30 分鐘，最後以 14,000 rpm 離心 8 分鐘，取上層液待測。以上為待測物除去蛋白質的前處理。取 10 ml 的待測物打入反應槽中，以 VCl_3 當還原劑，將待測物中的 nitrate (NO_3) 和 nitrite (NO_2) 皆還原成 NO，利用氦氣將 NO 帶入一氧化氮分析儀 (Sievers Research Redox

Chemiluminescence Detector, Model NOA 280, Sievers CO. Ltd.) 中與臭氧反應，並偵測反應後釋出 600 nm 以上的螢光，最後以 sodium nitrate 做一標準曲線，計算 NO 的濃度。

(五)、Rutaecarpine 對小白鼠急性肺栓塞死亡試驗

經尾靜脈注射不同劑量的 rutaecarpine 於 3 分鐘後，將小白鼠固定於固定架上，並立即將 ADP (300 mg/kg) 20 ml 打入另一條尾靜脈中，觀察並紀錄小白鼠在 3 分鐘內的死亡率；對照組為注射等量的 normal saline 再打入 ADP，比較其相對死亡率。

(六)、測量老鼠腸繫膜動脈之出血時間

將老鼠麻醉做氣管插管，將股動脈和股靜脈分別做插管以分別測血壓和藥物投與。將腹腔沿中線剪開，將部份小腸拿出以呈現出腸繫膜動脈。利用 superinfusion 的方式，使生理食鹽水溶液通過並能濕潤腸繫膜動脈。選擇直徑約 150-200 mm 的腸繫膜動脈將之切斷，在顯微鏡下觀察出血時間。另外，投與 rutaecarpine (i.v bolus or i.v infusion) 後，切斷血管，看是否會延長出血時間。另外，分別收集老鼠的全血約 1 ml 用 heparin (0.2 U/ml) 當抗凝劑，以測定實驗前後血液黏稠度，紅血球，白血球，血小板，血紅素和血色素之變化。

(七)、實驗數據皆以平均值± 標準誤差 (mean± S.E.M.)表示。若有意義差別，再以 Newman-Keuls 方法比較各組間的差異性，若 $p<0.05$ 則表示有意義的差別。

參、結果

一、TMPZ 的抑制血小板凝集反應

在人類的血小板懸浮液中，TMPZ 以劑量的相關性(0.5-1.5 mM)，隨著劑量的增加而明顯的抑制血小板凝集反應(圖一)。TMPZ 可明顯的抑制由 collagen (5 μg/ml), prostaglandin endoperoxide analogue compound U46619(1 μM)所引起的凝集反應，同時 TMPZ 亦可抑制在 200 μg/ml 的纖維蛋白原(fibrinogen)存在下，由 ADP (20 μM)所誘發的血小板凝集反應。同時，我們亦發現 TMPZ 在抑制血小板凝集反應的同時，亦可抑制如 collagen 所誘發的 ATP 釋放反應。TMPZ 抑制 ATP (20 μM), collagen (5 μg/ml)及 U46619 (1 μM) 所誘發的凝集反應，其 IC_{50} 分別為 0.8, 1.2 和 1.3 (mM).

二、TMPZ 對血小板細胞內鈣離子移動的影響

TMPZ 抑制血小板凝集反應是否是因為抑制血小板細胞內鈣離子的移動所造成的；因此利用螢光劑 (fura-2am)標定到血小板細胞內，再用 collagen 來活化血小板細胞內的鈣離子 (因 ADP 在本實驗中反應較不明顯，故用 collagen 來作為活化劑)。由實驗結果顯示(圖二)，在加入 collagen (5 μg/ml)後可明顯的使血小板細胞內的鈣離子由 30.5 ± 1.4 增加到 221.4 ± 8.5 (nM)。而這種明顯的鈣離子增加可明顯的被 TMPZ 所抑制。TMPZ 在 0.5 mM，細胞內的鈣離子濃度為 151.8 ± 8.1 nM; 在 1.0 mM 時成 116.4 ± 9.8 nM;在 1.5 mM 細胞內鈣離子濃度只剩下 61.1 ± 5.5 nM (圖二)。因此，由本實驗顯示 TMPZ 可明顯的抑制 collagen 所誘發的細胞內鈣離子濃度的增加。

三、TMPZ 對血小板細胞內 cyclic GMP 的影響

血小板細胞內 cyclic GMP 濃度的增加，可明顯的抑制血小板凝集反應。因此我們亦欲進一步評估 TMPZ 是否可增加 cyclic GMP 的濃度進而抑制血小板凝集反應。由表一的結果顯示，未活化的血小板，其細胞內的 cyclic GMP 含量很低 (7.98 ± 0.49 pmol/10^9 platelets)，在投入 nitroglycerin (200 μM)後，可明顯促使細胞內 cyclic GMP 濃度的增加 (33.52 ± 1.93 pmol/10^9 cells);另一方面，由實驗結果顯示 TMPZ 在 50-200 μM 的濃度範圍內可明顯的增加細胞內 cycle GMP 的產生(表一)。

四、TMPZ 對血小板細胞內 nitrate 合成的影響

在本實驗中，利用具相當敏感性的 ozone redox-chemiluminescene detector 的方法來定量血小板細胞內 nitrate 合成的變化。在本實驗中以 nitrate 的量代表細胞內 NO 產生的情形。由表二結果顯示，在加入 collagen (10 μg/ml)

後，可明顯的增加 2.5 倍 nitrate 的合成。在 50-200 μM 的 TMPZ 存在下，血小板細胞內 nitrate 的量有明顯的增加 (50 μM, 32.16 ± 2.15; 100 μM, 25.37 ± 1.19; 200 μM, 32.24 ± 1.52) (表二)。另一方面，TMPZ 的 solvent control 則不影響細胞內 nitrate 的合成(表二)。

由以上的實驗結果顯示，TMPZ 抑制血小板凝集反應可能是經由活化 NO 而使 cylic GMP 濃度增加進而抑制細胞內鈣離子移動 (雖然此反應較難看出劑量-反應關係，但是 TMPZ 的確可增加此反應)，進而抑制血小板凝集反應，至於更詳細的作用機轉則需進一步再探討。

五、 Rutaecarpine 對減少小白鼠急性肺栓塞死亡的影響

Rutaecarpine 之前已被我們証實亦具有抑制血小板凝集反應的作用(23)；在本計劃中，我們擬進一步探討在活体動物模式中是否亦具有明顯抗血栓的作用。本實驗是採用急性肺栓塞的實驗模式，ADP (0.7 mg/g)打入小白鼠体內，ADP 會活化血小板，導致大量的血小板會堆積在肺動脈微血管中而使小白鼠呼吸衰竭而死亡，並計算其相對死亡率；同時計算在打入 rutaecarpine 後，是否會延長死亡時間或降低其死亡率。

由研究結果顯示(表三)，在打入 ADP (0.7 mg/g)後，在 21 隻老鼠中有 17 隻死亡，其死亡率為 81 %。在投與 rutaecarpine (25 和 50 μg/g)後，rutaecarpine 可明顯的降低小白鼠的死亡率分別由 81 % 降至 75 %和 35 % (表三)。由本實驗結果顯示，rutaecarpine 的確可抑制 ADP 引起的急性肺栓塞反應。

六、Rutaecarpine 對大白鼠腸繫膜動脈出血時間的影響

本實驗主要探討 rutaecarpine 對大白鼠腸繫膜動脈出血時間的影響。將暴露出的腸繫膜動脈切斷，在顯微鏡下觀察出血時間，並計算從出血到血流完全停止所須的時間。由實驗結果顯示(表四)，在投與控制組(solvent control)的溶液後，其出血時間(bleeding time)約 3.7 ± o.4 (min)。在投與 rutaecarpine (25 和 50 μg/g) 的劑量後，可明顯的延長出血時間，分別為 4.5 ± 0.6 (min) 和 5.7 ± 0.8 (min) (表四)。由本實驗結果顯示，rutaecarpine 因抑制血小板凝集反應而使得腸繫膜動脈出血時間明顯延長。

肆、討論

由上述的實驗結果得知，TMPZ 在 0.5-1.5 mM 的濃度下，可明顯的抑制 ADP，collagen 和 U46619 所誘發的血小板凝集反應，且由實驗結果得知，其抑制血小板凝集反應的作用機轉可能與 NO 有關。目前已知 nitric oxide 的 enzyme 可簡單分為兩種: 誘導型 NO 合成酵素(indicuble nitric oxide synthase ; iNOS) 及固定型 NO 合成酵素(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)。而血小板已知具有 L-arginine-NO 系統，且當血小板被活化後可明顯的增加 NO 的合成 (24);同時 Mehta 等人亦發現血小板含有 cNOS (25); 因此 TMPZ 增加血小板的合成是否與合成與活化 cNOS 有關，值得我們在進一步研究。因此，TMPZ 的抑制血小板凝集反應，至少有一個作用是經由活化 NO，而導致 NO 進一步活化 guanylate cyclase 而使 cylic GMP 含量增加，而 cylic GMP 含量增加，可促使細胞鈣離子被打回鈣的貯存場所 (calcium storage site)，而使細胞質(cytoplasma)內的鈣離子濃度下降而抑制血小板凝集反應。而 TMPZ 活化 NOS 的濃度遠低於其抑制血小板的濃度，此暗示著單單活化 NOS 並不足以抑制血小板凝集反應，可能尚需其他作用相配合。

另一方面，我們已証實 rutaecarpine (40-200 μM)抑制血小板凝集反應是經由抑制 thromboxane A_2 合成及 phosphoinositide breakdown 所引起。因此，在本計畫中我們欲進一步評估其在活体內是否一樣具有抑制血栓的活性。本計畫採用二種活体血栓動物模式：ADP-引起急性肺部栓塞以及測量腸繫膜動脈的出血時間；由結果顯示 rutaecarpine 可降低 ADP 所引起肺栓塞老鼠的死亡率及延長腸繫膜動脈的出血時間。Rutaecarpine 在活体內的抗血栓作用一方面除了它本身具有很強的抗血小板凝集活性外；另一方面它亦具有血管鬆弛作用，因為同時具有此二作用，因此在動物實驗中可是呈現良好的作用效果。

伍、結論與建議

本研究結果証實: TMPZ 可明顯抑制血小板凝集反應，此凝集反應可能與 NO 有關，至於其更詳細的作用機轉如對血小板醣蛋 IIb/IIIa complex（纖維蛋白原受体）及 cylic AMP, thromboxame A_2 的合成，細胞模流動性甚至 protein kinase C 的影響需進一步再仔細研究；另外，對於 rutaecarpine 在活体內抗血栓作用的評估，我們則擬以螢光染料(fluorescein sodium)來誘發血栓產生，其原理為 fluorescein sodium 當受光激發後，會釋放出一定的能量，而此能量能破壞血管內皮細胞而造成血小板附著上去而進一步導致 platelet plug formation；這個實驗模式更能接近活体內的真正血栓產生的原因。

陸、參考文獻

1. Li SC Pen-Tsao Kang Mu (republished by National Res. Inst. of Chin. Med., 1076, Taipei) 之 1596, Chapt 32, p.1064.
2. Liao JF, Chen CF, Chow SY Pharmacological studies of Chinese herbs. Pharmacological effects of Evodiae fructus. J Formos Med Assoc 1981, 120: 30-38.
3. Chen CF, Chen SM, Lin MT, Chow SY In vivo and in vitro atudies on the mechanism of the cardiovascular effect of Wu-Chu-Yu (Evodiae fructus). Am J Chin Med 1981, 1: 39-47.
4. Chang HM, But PPH Pharmacology and application of Chinese Materials Medica. 1987, vol. 1. (Word Scientific Publishing CO., Singapore) p.605.
5. Chiou WF, Chou CJ, Shum AYC, Chen CF The vasorelaxant effect of evodiamine in rat isolated mesenteric arteries: mode of action. Eur J Pharmacol,1992 215: 277-284.
6. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of Ligusticum Wallichii Franch. I. Extraction, isolation and Stucture identification of tetramethylpyrazine. Chin Med J 1977, 7: 420-421.
7. Jeffreys JAD The alkaloids of pereunial ryegrass (Lolium Perenne L.) IV. Isolation of a new base, perlolyrine. The crystal structure of its hydrobromide dihydrate and the synthesis of the base. J Chem Soc 1970, 8: 1091-1095.
8. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of Ligusticum Wallichii Franch. III. A report of the treatment of tetramethylpyrazine in 218 patients with ischemia cerebrovascular diseases. Chin Med J 1977, 8: 467-469.
9. Lu CS, Yin HM, Hung YH, Pao C, Sung CF Radix Salviae Mitiorrhizae and Rhizoma Ligustici Wallichii in coronary heart diseases. Chin Med J 1978, 4: 43-46.
10. Wang WJ Changes of nail fold microcirculation in 28 cases of acute cerebral thrombosis treated with Ligustrazine (original in Chinese). Chin J Neurol.Psychiatry, 1984, 17: 121-124.
11. Ojewole JAO Blockade of adrenergic and cholinergic transmission by tetramethylpyrazine. Planta Medica 1981, 43: 1-10.
12. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Pharmacological studies on tetramethylpyrazine. Chin Med J 1978, 4 : 319-322.
13. Zeng GY, Zhou YP, Zhang Y Effects of tetramethtlpyrazine on cardiac hemodynamics in dogs. Acta Pharmaceutica Sinica 1982, 17: 182-186.

14. Feng MG, Feng GH, Zhou QG Effect of methylhesperdin on coronary, renal and cerebral citculation in dogs. Acta Pharmaco Sinica 1988, 9: 548-550.
15. Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of Ligusticum Wallichii Franch. II. Pharmacological studies on tetramethylpyrazine. Chin Med J 1977, 8: 464-466.
16. Dai XZ, Bache RJ Coronary and systemic hemodynamic effects of tetramethylpyrazine in the dog. J Cardiovasc Pharmacol 1985, 7: 841-849.
17. Xue Q Effect of Chuanxionqin (tetramethylpyrazine) on microcirculatory perfusion in hamsters and capillary permeability in rat. Proc Cams Pumc 1989, 4: 224-228.
18. Liu SY, Sylvaster DM Antithrombotic/antiplatelet activity of tetramethylpyrazine. Thromb Res, 1990, 58: 129-140.
19. Ho WKK, Web HL, Lee CM Tetramethylpyrazine for treatment of experimentally induced stroke in Mongolian gerbils. Stroke 1989, 20: 96-99.
20. Hui KK, Yu JL,. Tse E, Borst S The effect of tetramethylpyrazine on the human platelet alpha$_2$-adrenergic receptor adenylate cyclase system. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1987, 8: 3-14.
21. Chiou WF, Chou CJ, Liao JF, Sham A.YC, Chan CF The mechaniam of the vasodilator effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. Eur J Pharmacol 1994, 257: 59-66.
22. Peng W, Hucks D, Priest RM, Ward JPT Ligustrazine-induced endothelium-dependent relaxation in pulmonary arteries via an NO-mediated and exogenous L-arginine-dependent mechanism. Br J Pharmaco 1996, 119: 1063-1071.
23. Sheu JR, Hung WC, Lee YM, Yen MY Mechanism of inhibition of platelet aggregation by rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. Eur J Pharmacol 1996, 318: 469-475.
24. Radomski MW, Palmer RJ, Moncada S An L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. Proc Nalt Acad Sci U.S.A. 1990, 87: 5193-5197.
25. Mehta JL, Chen L, Mehta P Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. J Lab Clin Med 1995, 25: 753-760.

柒、圖、表

表一 TMPZ 對血小板 cyclic GMP 形成的影響

Effect of TMPZ and nitroglycerin on cyclic GMP formation in washed human platelets.

Drug	Dose	cyclic GMP (pmol/10^9 cells)
resting	———	7.98 ± 0.49
nitroglycerin	200 μM	33.52 ± 1.93*
DMSO	0.5 %	8.68 ± 0.34
TMPZ	50 μM	26.73 ± 0.71*
	100 μM	27.82 ± 0.84*
	200 μM	38.37 ± 2.94*

Washed human platelet suspensions were preincubated with various concentrations of TMPZ (50, 100, and 200 μM) or nitroglycerin (200 μM) for 15 min at 37℃. Addition of nitroglycerin in platelet suspensions was presented as a positive control. Data are presented as means ± S.E.M. (n=4). *: $P < 0.001$ as compared with the DMSO group.

表二 TMPZ 對血小板 nitric oxide 形成的影響

Effect of TMPZ and collagen on NO production in washed human platelets.

Drug	Dose	NO (μM)
resting	———	13.24 ± 1.21
collagen	10 μg/ml	33.52 ± 1.83*
DMSO	0.5 %	17.61 ± 2.40
TMPZ	50 μM	32.16 ± 2.15*
	100 μM	25.37 ± 1.19*
	200 μM	32.24 ± 1.52*

Washed human platelet suspensions were preincubated with various concentrations of TMPZ (50, 100, and 200 μM) or collagen (10 μg/ml) for 15 min at 37℃. Addition of collagen in platelet suspensions was presented as a positive control. Data are presented as means ± S.E.M. (n = 4). *: $P < 0.001$ as compared with the DMSO group.

表三 **rutaecarpine** 對老鼠急性肺栓塞引起死亡的影響

Dose-response of rutaecarpine on the mortality in acute pulmonary thrombosis induced by intravenous injection of ADP in mice.

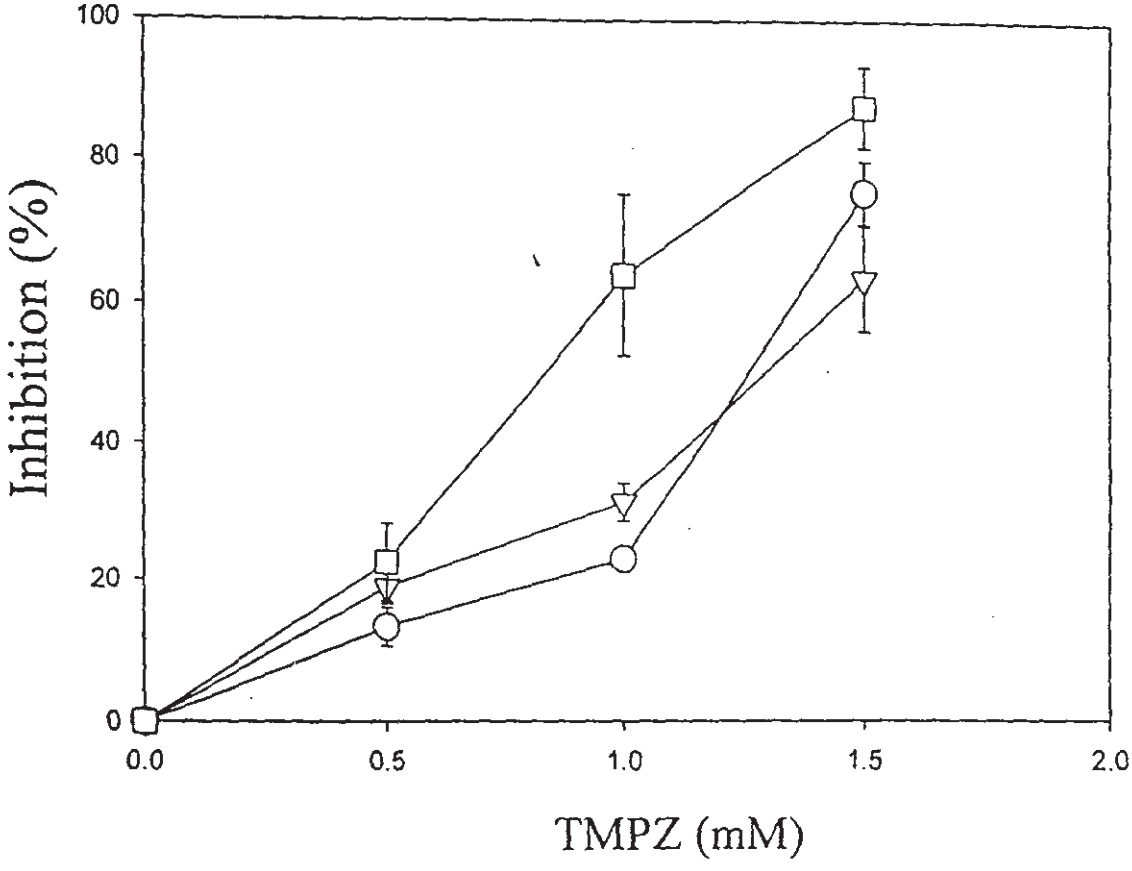
	Number of death	Total number	Mortality (%)
normal saline	0	5	0
ADP (0.7 mg/g)	17	21	81
+ rutaecarpine (μg/g)			
25	15	20	75
50	7	20	35

表四 **rutaecarpine** 對老鼠腸繫膜動脈出血時間的影響

Effects of rutaecarpine on bleeding time in mesenteric arteries of rats.

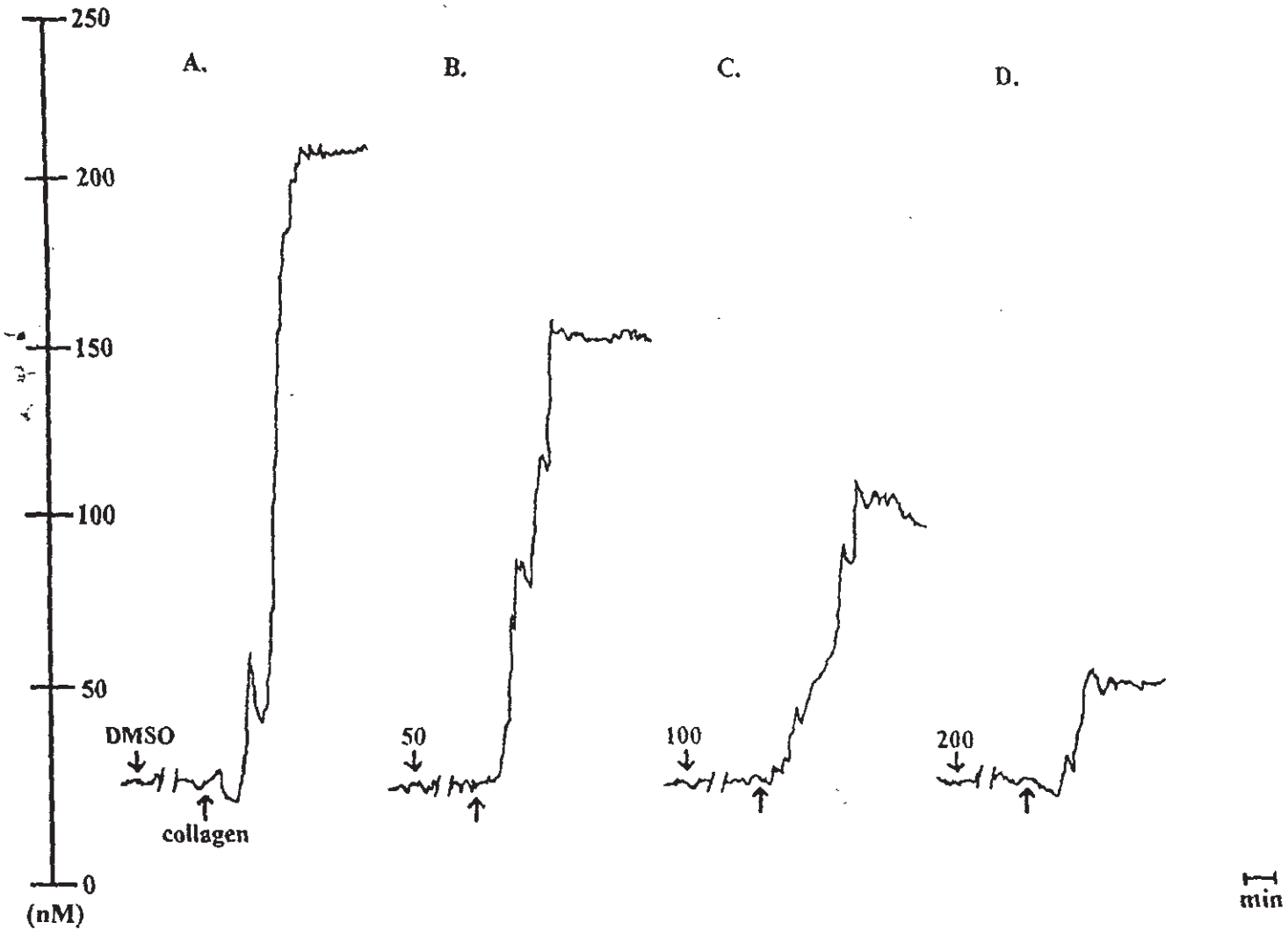
	Dose (μg/g)	Bleeding time (min)	n
Control	___	3.7 ± 0.4	5
Rutaecarpine	25	4.5 ± 0.6	5
	50	5.7 ± 0.8*	5

Data are presented as mean ± S.E.M. (n). *: $P < 0.05$ as compared with control group (normal saline).



圖一 TMPZ抑制血小板凝集反應的劑量反應曲線

Dose-inhibition curves of TMPZ on collagen (5 μg/ml, ○)-, U46619 (1 μM, ▽) and ADP (20 μM, □)-induced aggregation of human platelet suspensions. Human platelet suspensions were preincubated with various concentrations of TMPZ (0.5, 1.0 and 1.5 mM) at 37℃ for 2 min, and aggregation agonists were then added to trigger aggregation. Data are presented as percentage of the control (means± S.E.M., n=4-5)。



圖二 TMPZ 對血小板細胞內鈣離子的影響

Effect of TMPZ on collagen-induced intracellular Ca^{2+} mobilization of Fura 2-AM loaded human platelets. Platelet suspensions were incubated with Fura 2-AM (5 μM) at 37℃ for 30 min, followed by the addition of collagen (5 μg/ml) in the absence or presence of TMPZ (0.5, 1.0 and 1.5 mM), which was added 2 min prior to the addition of collagen.