



RRPG89090078(28.P)

計畫編號：CCMP89-RD-034

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

川芎之活性生物鹼，tetramethylpyrazine
抑制血小板凝集反應的機轉探討

委託研究報告

計畫委託機關：台北醫學院醫學研究所

計畫主持人：許準榕

研究人員：許準榕

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

本研究報告僅供參考，不但表本署意見

目錄

內容	頁數
1. 中文摘要	3
2. 英文摘要	5
3. 前言	7
4. 材料與方法	9
5. 結果	14
6. 討論	16
7. 結論與建議	17
8. 參考文獻	18
9. 圖表	21

編號：CCMP89-RD-034

川芎之活性生物鹼, tetramethylpyrazine 抑制血小板凝集反應的機轉探討

許準榕教授

台北醫學院醫學研究所

摘要

Tetramethylpyrazine (TMPZ) 是傳統中藥川芎的主要活性成份。在本實驗中，我們將評估 TMPZ 的抗血小板能力。在人類的血小板中，TMPZ (0.5-1.5 mM) 可依劑量的相關性而抑制不同的血小板活化劑 (如 ADP, Collagen 和 U46619) 所引起的血小板凝集反應及 ATP 釋放反應。TMPZ (0.5 mM) 不會影響血小板細胞膜的流通性，即使濃度高到 1.5 mM 亦然。再者，TMPZ (0.5-1.5 mM) 可依劑量的相關性而抑制 collagen 所引起血小板 [³H] inositol monophosphate 的形成；另外，TMPZ (0.5-1.5 mM) 亦可依劑量的相關性而抑制 collagen 所引起血小板內鈣的釋放。再者，TMPZ (0.5-1.5 mM) 亦可抑制 collagen 所引起的 thromboxane A₂ 的合成。在較高的濃度 (1.0 mM), 我們亦發現 TMPZ 可干擾 FITC-triflavin 結合到血小板細胞膜糖蛋白受體 glycoprotein IIb/IIIa complex. Triflavin 是一種蛇毒蛋白 *Trimeresurus flavoviridis* 所純化出的 glycoprotein IIb/IIIa complex 的專一性拮抗劑。另一方面，TMPZ 在較低的濃度下 (50-200 μM), 我們發現 TMPZ 隨著時間及劑量的增加而可明顯的促進 nitrate 及 cyclic GMP 的產生。由本研究顯示 TMPZ 抗血小板凝集作用可能經由兩種作用機轉：(1) 在較低的濃度下 (50-200 μM), TMPZ 可促進血小板 NO 的釋放，導致 cyclic GMP 增加而降低細胞內鈣離子濃度。(2) 在較高的濃度下 (0.5-1.5 mM), TMPZ 可抑制血小板的 phosphoinositide 的分解以及 thromboxane A₂ 的合成，進而降低細胞內鈣離子而抑制血小板凝集反應。

關鍵詞: TMPZ, 血小板凝集, thromboxane A₂, phosphoinositide 分解, 一氧化氮。

Study of antiplatelet activity of TMPZ, an alkaloid from Chung-Chong

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 both platelet aggregation and ATP-release reaction induced by a variety of agonists (i.e., ADP, collagen and U46619). TMPZ (0.5 mM) did not significantly change the fluorescence of platelet membranes labeled with dipheylhexatriene (DPH), even at the high concentration (1.5 mM). Furthermore, TMPZ (0.5-1.5 mM) dose-dependently inhibited [³H] inositol monophosphate formation stimulated by collagen (5 µg/ml) in [³H] myoinositol loaded platelets. In addition, TMPZ (0.5-1.5 mM) also dose-dependently inhibited the intracellular free Ca⁺² rise of Fura 2-AM loaded platelets stimulated by collagen (5 µg/ml). Moreover, TMPZ (0.5-1.5 mM) inhibited thromboxane A₂ formation stimulated by collagen. At a higher concentration (1.0 mM), TMPZ has also been shown to influence the binding of FITC-triflavin to platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. Triflavin, a specific glycoprotein IIb/IIIa complex antagonist purified from *Trimeresurus flavoviridis* venom. On the other hand, TMPZ (50-200 µM) significantly increased production of nitrate and cyclic GMP formation in human platelets within a 15-min incubation period. It is concluded that the antiplatelet activity of TMPZ may possibly involve two pathways: (1) at a lower concentration (50-200 µM), TMPZ may activate the nitric oxide and

cyclic GMP formation. (2) at a higher concentration (1.0 mM), TMPZ is shown to inhibit phosphoinositide breakdown and thromboxane A₂ formation in human platelets.

Keywords: TMPZ, platelet aggregation, thromboxane A₂, phosphoinositide breakdown, nitric oxide.

壹、前言

在東方醫學中，中藥被廣泛地用於治療各類的疾病已有相當久的歷史。最近幾十年來，已有許多具生物活性的中藥成份陸續被分離、純化且其中有些中藥成份的藥理活性也已一一的被詳加研究。

Tetramethylpyrazine (TMPZ) 是由中藥“川芎” (*Ligusticum Wallichii* Franch) 中所萃取純化出具生物活性之生物鹼，而川芎本身在中國的傳統醫學治療上至少已使用 2,000 年以上，其英文名為 *Ligusticum Rhizome* 或 *Chuanxiong Rhizome*，屬於芎藭 (*Ligusticum Chuanxiong* Hort.) 的乾燥根莖。普遍用於促進血液循環及減緩疼痛 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977)。TMPZ 早期被確認源自於 *Bacillus Sultitis* 的代謝產物之一 (Jeffreys J.A.D., 1970)。在奈及利亞，TMPZ 亦由 *Jatropha Podagrica* 的根莖中被純化出來 (Ojewole, 1980)。然而，TMPZ 的萃取、純化以及化學結構的確立早於 1977 年就被報告出來 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977)。許多關於 TMPZ 及其原生藥在心血管效應的臨床試驗已於中國大陸研究。其中一項以 156 名患有急性缺血性腦血管疾病之病患為研究對象的臨床報告顯示，當給與 TMPZ (40-120 mg/day) 靜脈灌注 1-3 星期後，約有 90% 的病患可明顯改善其心臟負荷及吞嚥困難之症狀 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977)。再者，30 名患有心絞痛之病患以 TMPZ 治療，約 90% 的病患症狀減輕的情形 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977)。Lu et al (1978) 亦指出川芎之萃取物具有治療心絞痛的功效。Wang (1984) 也同樣證實 TMPZ 對於腦栓塞之病患，可改善其 nailfold 之微循環。因此，由以上研究報告可推論，TMPZ 對於缺血性之心血管疾病確有其特別的功效。而且 TMPZ 於臨床治療上並無顯著之副作用。Ho et al (1989) 的實驗中也提出了 TMPZ 可增加已休克之實驗 Mongolian gerbils 的存活率。

為闡明其作用機轉，另有研究報告指出，在動物實驗中 TMPZ 具有降血壓和抑制血小板凝集的作用 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1978; Ojewole, 1981)，並且能有效地降低動脈阻力而增加腦血管 (Zeng et al., 1982 ; Feng et al., 1988) 及冠狀動脈血流 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977 ; Dai and Bache, 1985) ; Dai 和 Bache (1985) 更進一步指出 TMPZ 在實驗狗上所誘發之低血壓效應主要來自全身性及

冠狀性血管的鬆弛作用，而這種效應在使用 β -blockers, ganglionic blockers 或 catecholamine depletion 藥物並不會有所改變。另外，TMPZ 亦有助於改善微循環及減低微血管的通透性 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977; Xue, 1989); 在其他的實驗中，TMPZ 可改善急性或慢性缺氧所造成的高血壓症狀 (Cai and Barer, 1989); 再者，TMPZ 可明顯地抑制 ADP 所誘發之血小板凝集反應 (Beijing Institute of Pharmaceutical Industry, 1977; Nie et al., 1985)。Liu 和 Sylvester (1990) 的研究指出，於老鼠動脈及靜脈栓塞的模式中投與 TMPZ 可減緩血栓的形成；由於 TMPZ 可抑制多種血小板凝集劑 (如 collagen, thrombin 和 ADP) 所誘發之血小板凝集反應，故其抑制血栓的形成可能與其抑制血小板的凝集反應有關。而 Hui et al (1987) 發現，TMPZ 本身亦是一種 α_2 -adrenergic 受體的部份活化劑。因此推測 TMPZ 抑制血小板凝集反應的作用機轉可能經由多種不同之途徑。

目前有研究報告指出，TMPZ 對於肺動脈的鬆弛作用為一種 endothelium-dependent 及 nitric oxide (NO)-mediated 的機轉 (Peng et al., 1996)。而 TMPZ 本身在化學結構上並不屬於 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 TMPZ 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，使細胞內鈣離子的濃度下降，進而抑制血管收縮反應。對血小板而言，若增加血小板內 NO 的含量，亦可明顯的抑制凝集反應。

因此，本計畫欲進一步探討 TMPZ 在人類血小板中活化 NO 的機轉：是經由刺激 cNOS 的活性 (activity) 亦或是直接增加 cNOS gene 的表現。最近有文獻報告指出，不只誘導型 NO 合成酵素的基因會被誘導產生；就連固定型 NO 合成酵素的基因亦會被誘導產生 (Silke et al., 1998)。因此本計畫將詳細的探討 TMPZ 抑制血小板凝集作用的機轉探討。

貳、材料與方法

一、實驗材料

中藥材川芎之 TMPZ 購自於 Aldrich (Milwaukee, MI)。本實驗以 dimethylsulfoxide (DMSO) 溶解 TMPZ 並於 -4°C 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 ($120\text{ g} \times 10\text{ min}$) 後取上層液 (富含血小板血漿) 加入 heparin (6.4 IU/ml), prostaglandin E_1 ($0.5\ \mu\text{M}$) 37°C 下溫浴 10 分鐘。再離心 ($500\text{ g} \times 10\text{ min}$)，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 4.5×10^8 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 ($2\ \mu\text{M}$)，於 37°C 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 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)、FITC 接合到 triflavin 的方法

將 triflavin (1 mg/ml) 溶解在 0.2 ml 的 sodium bicarbonate (0.1 M) 中；另外，將 FITC (1 mg) 溶在 DMSO (0.1 ml) 中，取 $20\ \mu\text{l}$ 的 FITC 溶液加入至 triflavin 溶液內，在室溫下反應 1 小時，並不時地搖動，而後再加入 $20\ \mu\text{l}$ 現調配好的 hydroxylamin (1.5 M ; pH 8.0 ~ 8.5) 使反應 30 分鐘；最後將 FITC-triflavin 的濃度調整為 1 mg/ml 。

(四)、FITC-triflavin 與血小板上 glycoprotein IIb/IIIa complex 結合的測定

製備人類血小板懸浮液，並調整血小板數目為 4.5×10^8 platelets/ml，取 0.9 ml 的血小板懸浮液置入試管中，分別加入不同濃度的 TMPZ 或 DMSO 溶液，使最後各管體積都調整為 1 ml，在 37°C 下溫浴後，避光加入 FITC-triflavin ($2 \mu\text{g/ml}$) 反應 2 分鐘，再加入 collagen ($5 \mu\text{g/ml}$)，8 分鐘後以 Flow Cytometer (Becton Dickinson, FACS-can Sys.) 測定，且每次收集 50,000 個血小板分析。

(五)、血小板細胞膜流動性的測定

將人血與抗凝血劑 A.C.D. (9:1 v/v) 混合，製備成血小板懸浮液，並調整其濃度為 4.5×10^8 platelets/ml，將 0.9 ml 血小板懸浮液置入試管內，加入 DMSO 溶液及不同濃度的 TMPZ，使管內液體的體積為持在 1 ml，反應的時間依實驗條件而定，而後再加入 diphenylhexatriene (DPH) $1 \mu\text{M}$ ，反應 10 分鐘；此步驟後皆需避光，接著以 3,200 r.p.m. 離心 10 分鐘，離心後所得之上清液將其移除，並以 PBS buffer 洗三次後，利用 Fluorescence spectrophotometer (Hitachi F4500, Japan) 測定其螢光強度 (excitation 為 363 nm；emission 為 400 ~ 600 nm)。

(六)、 $[^3\text{H}]$ -Inositol monophate 生成的測定

將以 A.C.D (1:9 v/v) 為抗凝劑的人類富含血小板血漿於室溫下離心 500 g 10 分鐘，除去上層液，將下層血小板顆粒懸浮於不含鈣離子及 BSA 的 Tyrode 溶液中，並外加 1 mM EDTA 及 $75 \mu\text{Ci/ml}$ 的 $[^3\text{H}]$ inositol。於 37°C 下溫浴 2 小時，再以 500 g 離心 4 分鐘，所得的血小板顆粒用含 BSA (3.5 mg/ml)，不含 EDTA 的 Tyrode 溶液懸浮之，然後稀釋至所須的濃度 ($5 \times 10^8/\text{ml}$)。將 1 ml 的血小板懸浮液加入經 silicone 包衣的 3.5 ml 小玻璃管中，並以小磁棒作每分鐘 1200 轉的攪拌並維持在 37°C 下，然後加入 5 mM LiCl 反應 2 分鐘，接著加入 TMPZ 或者等量的 DMSO 溶液 (對照組)，在 37°C 下反應，最後再加入血小板凝集劑 collagen ($10 \mu\text{g/ml}$) 引發凝集反應，6 分鐘後加入等體積 10% (w/v) 冰冷的 trichloroacetic acid (TCA) 以中止反應，接著以 1,000 g 離心 4 分鐘，所得上清液 (1 ml) 以乙醚 (10 ml) 抽取殘存的 TCA 三次，用 80°C 的熱水浴將殘存的乙醚趕走，用 1 N NaOH 調整 pH 值至 7~8，最後用蒸餾水調整體積至 4 ml，然後取 3.5 ml 加入含 Dowex-1 之陰離子交

換樹脂管柱中(50 % , w/v , 1 ml)以下列沖流液分別沖流出 [^3H]inositol, [^3H]glycerophosphoinositol, [^3H]IP₁, [^3H]IP₂ 和 [^3H]IP₃。

- (1) 15 ml myoinositol (5 mM)
- (2) 30 ml sod. tetraborate (5 mM) / sod. formate (60 mM)
- (3) 20 ml HCOON₄ (0.2 M) / HCOOH (0.1 M)
- (4) 20 ml HCOON₄ (0.4 M) / HCOOH (0.1 M)
- (5) 20 ml HCOON₄ (1.0 M) / HCOOH (0.1 M)

沖流液分別以試管收集(每管 1 ml)加入 counting solution (atomlight) 後, 以 Liquid Scintillation Counter (Beckman Model 2200)測定所含放射線的強度。由於 inositol bisphosphate (IP₂)及 inositol trisphosphate (IP₃) 的含量都很低。因此, 結果以 inositol monophosphate (IP₁)當做一指標, 代表全部 inositol phosphates 生成的量。

(七)、血小板細胞內 thromboxane B₂ 的測定

人類血小板懸浮液(0.4 ml, 4.5×10^8 /ml)與 TMPZ 先混合反應後, 加入 collagen (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)引發血小板活化, 反應進行 6 分鐘後, 加入 EDTA (2 mM) 和 indomethacin (50 μM)以終上 thromboxane 的生合成, 經由離心機 Sigma-201 M 在 14,000 r.p.m 下離心 3 分鐘, 取出上清液。上清液中所含的 thromboxane B₂ 的量利用 thromboxane B₂ EIA Kit 測定之。

(八)、細胞內 cyclic GMP 含量的測定

將血小板懸浮液先於 37°C, 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°C, 經離心後取上層液, 再以 cyclic GMP 的 EIA kits 來定量 cyclic GMP 的含量。

(九)、細胞內 NO 的含量測定

將血小板懸浮液 (3×10^8 /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°C 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，利用氮氣將 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。

(十)、血小板細胞內 ecNOS protein 表現的評估

(a) Western blot analysis

將富含血小板血漿 (PRP) 與 TMP 在含有 $0.1 \mu M$ tetrahydrobiopterin (BH_4), $1 \mu M$ FAD 及 $1.5 mM$ NADPH 等物質存在下混合反應 15 或 30 分鐘，接著在 3,600 r.p.m. 下離心 10 分鐘；除去上清液，將血小板顆粒利用 Tyrode 溶液清洗二次，最後用 1 ml 的溶解液 (1% SDS; 0.1% Triton X-100 和 10 mM Tris-HCl; pH 7.4) 外加一些 proteinase 的抑制劑 (如 PMSF, aprotinin, chymotrypsin, leupeptin) 溶解之；在 $4^\circ C$ 30,000 r.p.m. 下離心 60 分鐘，取出上清液。

(b) Immunoprecipitation analysis

將血小板懸浮液與 Tyrode 溶液或待測物 (TMP) 反應後，以免疫沉澱溶解液 (含 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 7.4 及 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0.2 mM PMSF; 0.5% NP-40) 溶解之；在 $4^\circ C$ 且 1,200 r.p.m. 下離心 30 分鐘；將離心後之上清液與抗體 (1 μg mouse monoclonal antibody against human ecNOS) 在 $4^\circ C$ 下反應 2 小時，接著加入 protein A (10 μg) 於 $4^\circ C$ 下反應 2 小時後，離心 3-5 分鐘；再以上述之溶解液清洗 3 次，加入 2x sample buffer，取出上清液。

將製備好之 protein 進行電泳試驗 (8% SDS-PAGE)，接著進行 Western blotting，使存在於膠片上的蛋白質轉印到 nitrocellulose (0.45 micron) 上，blotting buffer 其組成如下：25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.3；轉印的條件為 30 V, 40 mA 電泳下過夜反應。進行 blotting 後，取下 nitrocellulose 用蒸餾水稍加以浸潤，接著浸泡在含有 5% BSA, 1% Tween 20, 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.6 的溶液中 2 小時；再用蒸餾水洗滌，接著浸泡在含有一次抗體 (抗 human ecNOS peptide sequence

1030-1209; 1:250 dilution) 之上述溶液中，在室溫下輕微搖盪 1 小時；用含 1 % Tween 20, 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.6 的溶液加以浸泡洗滌 5 次；將此 nitrocellulose 浸泡在含有二抗體 (anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated antibody) 的溶液 (5 % BSA, 1 % Tween 20, 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.6) 中，在室溫下輕微搖盪 1 小時，用含 1 % Tween 20, 10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.6 的溶液加以浸泡洗滌 5 次；利用 Amersham 公司出產之 enhanced chemiluminescence (ECL) Western blot kit 將 nitrocellulose 上的 protein 呈色出來，再利用影像分析系統 (ScanMaker IIsp) 加以定量每一個 band 的相對強度。

(十一)、實驗數據皆以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm 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

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 $\mu\text{g/ml}$), prostaglandin endoperoxide analogue compound U46619(1 μM)所引起的凝集反應，同時 TMPZ 亦可抑制在 200 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$)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)。

在此濃度下，TMPZ 並不會影響血小板細胞膜的流動性(圖二)；即使將濃度提高到 1.5 mM 也沒有明顯的差異。這表示在此濃度下，TMPZ 對血小板並不會造成任何細胞膜滲透性(permeabilization)的改變。此外，TMPZ (0.5-1.5 mM) 亦隨著劑量的增加而明顯的抑制 collagen (5 $\mu\text{g/ml}$) 所引起 [^3H] inositol monophosphate 的生成(圖三)，而且在同樣的濃度下，亦會抑制 collagen 所引起的細胞內 thromboxane B_2 之形成(表一)。再者，在高濃度 (1.0 mM) 下，TMPZ 亦會明顯的影響 FITC-triflavin 與血小板表面之 glycoprotein (GP) IIb/IIIa complex 的結合(圖四)；Triflavin 是由 *Trimeresurus flavoviridis* 蛇毒中所純化的單鏈 peptide，對血小板細胞膜上的 GP IIb/IIIa 受體具有專一性的拮抗作用。由此結果似乎暗示著 TMPZ 在較高的濃度下可能會影響到血小板的 glycoprotein IIb/IIIa complex 以及 phosphoinositide breakdown 及 thromboxane A_2 的合成。

另一方面，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。由表二的結果顯示，未活化的血小板，其細胞內的 cyclic GMP 含量很低 ($7.98 \pm 0.49 \text{ pmol}/10^9 \text{ platelets}$)，在投入 nitroglycerin (200 μM)後，可明顯促使細胞內 cyclic GMP 濃度的增加 ($33.52 \pm 1.93 \text{ pmol}/10^9 \text{ cells}$)；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(表二)；此結果暗示似乎 cyclic GMP 的產生可能與 nitric oxide 有關。

接著，利用具相當敏感性的 ozone redox-chemiluminescence 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。由表三結果顯示，在加入 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) 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) (表三)。另一方面，TMPZ 的 solvent control 則不影響細胞內 nitrate 的合成(表三)。由此實驗結果顯示，TMPZ 抑制血小板凝集反應可能與活化 NO 而使 cyclic GMP 濃度增加進而抑制細胞內鈣離子移動，進而抑制血小板凝集反應有關。血小板不具細胞核，因此只有固定型的 NO 合成酵素 (constitutive NO synthase, cNOS) 而無誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase; iNOS)；此暗示著 TMPZ 活化 NO，可能是經由活化 cNOS 而來。進一步分析顯示 TMPZ 在低濃度下(50-200 μM)下，會明顯增加血小板 cNOS 的表現(圖五)。由我們的實驗顯示 TMP 在 50-200 μM 的濃度下可明顯的活化 cNOS，而促進 NO 的生成增加進而活化 soluble guanylate cyclase，導致 cyclic GMP 濃度增加，進而抑制血小板凝集反應。

由本研究顯示 TMPZ 抗血小板凝集作用可能經由兩種作用機轉：(1) 在較低的濃度下(50-200 μM)，TMPZ 可促進血小板 NO 的釋放，導致 cyclic GMP 增加而降低細胞內鈣離子濃度。(2) 在較高的濃度下(0.5-1.5 mM)，TMPZ 可抑制血小板的 phosphoinositide 的分解以及 thromboxane A_2 的合成，同時亦會影響 fibrinogen 結合到 glycoprotein IIb/IIIa complex 進而抑制血小板凝集反應。

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(inducible 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 (Radomski et al., 1990); 同時 Mehta 等人亦發現血小板含有 cNOS (1995); 由本實驗亦證實此點。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 cyclic GMP 含量增加，而 cyclic 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(cytoplasm)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(如 抑制血小板的 phosphoinositide 的分解以及 thromboxane A₂ 的合成；同時亦會影響 fibrinogen 結合到 glycoprotein IIb/IIIa complex)。

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，此凝集反應可與 NO、血小板糖蛋 IIb/IIIa complex（纖維蛋白原受体）及 cyclic GM thromboxane A₂ 的合成及 phosphoinositide 有關；我們將利用這些結果一步評估 TMPZ 在活體內抗血栓的作用。

陸、參考文獻

- Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Pharmacological studies on tetramethylpyrazine. *Chin Med J* 4: 319-322, 1978.
- Beijing Institute of Pharmaceutical Industry. Studies of active components of *Ligusticum Wallichii* Franch. II. Pharmacological studies on tetramethylpyrazine. *Chin Med J* 8: 464-466, 1977.
- Cai, Y.N. and Barer, G.R. Effect of ligustrazine on pulmonary vascular changes induced by chronic hypoxia in rats. *Clin Sci* 77: 515-520, 1989.
- Chen, L.Y. and Mehta, J.L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. *J Cardiovascular Pharmacol* 27: 154-158, 1996.
- Dai, X.Z. and Bache, R.J. Coronary and systemic hemodynamic effects of tetramethylpyrazine in the dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 7: 841-849, 1985.
- Feng, M.G., Feng, G.H. and Zhou, Q.G. Effects of methylhesperidin on coronary, renal and cerebral circulation in dogs. *Acta Pharmacol Sinica* 9: 548-550, 1988.
- Ho, W.K.K., Web, H.L., and Lee, C.M. Tetramethylpyrazine for treatment of experimentally induced stroke in Mongolian gerbils. *Stroke* 20: 96-99, 1989.
- Hui, K.K., Yu, J.L., Tse, E. and Borst, S. The effect of tetramethylpyrazine on the human platelet α_2 -adrenergic receptor adenylate cyclase system. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 58: 3-14, 1987.
- Jeffreys, J.A.D. 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* 8: 1091-1095, 1970.
- Li, H., Oehrlein, S.A., Wallerath, T., Ihrig-Biedert, I., Wohlfart, P., Ulshofer, T., Jessen, T., Herget, T., Forstermann, U. and Kleinert, H. Activation of protein kinase $C\alpha$ and/or ϵ enhances transcription of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Mol Pharmacol* 53: 630-637, 1998.
- Liu, S.Y. and Sylvester, D.M. Antithrombotic/antiplatelet activity of

- tetramethylpyrazine. *Thromb Res* 58: 129-140, 1990.
- Lu, C.S., Yin, H.M., Hung, Y.H., Pao, C. and Sung, C.F. Radix *Salvia Mitiorrhizae* and Rhizoma *Ligustici Wallichii* in coronary heart disease. *Chin Med J* 4: 43-46, 1978.
- 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.
- Murohara, T., Parkinson, S.J., Waldman, S.A. and Lefer, A.M. Inhibition of nitric oxide biosynthesis promotes P-selectin expression in platelets: role of protein kinase C. *Arterioscler Thromb Vascular Biol* 15: 2068-2075, 1995.
- Nie, S.Q., Xie, Z.C. and Lin, K.C. Effects of tetramethylpyrazine on membrane fluidity and electrophoretic mobility of platelets and relation to its antiaggregation effect. *Acta Pharmaceutica Sinica* 20: 689-692, 1985.
- Ojewole, J.A.O. and Odebiyi, O.O. Neuromuscular and cardiovascular actions of tetramethylpyrazine from the stem *Jatropha Podagrica*. *Planta Medica* 38: 332-338, 1980.
- Ojewole, J.A.O. Blockade of adrenergic and cholinergic transmissions by tetramethylpyrazine. *Planta Medica* 43: 1-10, 1981.
- Peng, W., Hucks, D., Priest, R.M., Ward, J.P.T. Ligustrazine-induced endothelium-dependent relaxation in pulmonary arteries via an NO-mediated and exogenous L-arginine-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 119:1063-1071, 1996.
- Radomski MW, Palmer RJ, Moncada S An L-arginine to nitric oxide pathway in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990, 87: 5193-5197.
- Sheu, J.R., Hung, W.C., Lee, Y.M. and Yen, M.H. Mechanism of inhibition of platelet aggregation by rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Eur J Pharmacol* 318: 469-475, 1996.
- Sheu, J.R., Kan, Y.C., Hung, W.C., Ko, W.C. and Yen, M.H. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of tetramethylpyrazine in human platelets. *Thromb Res* 88: 259-270, 1998a.
- Sheu, J.R., Kan, Y.C., Hung, W.C., Su, C.H., Lin, C.H., Lee, Y.M. and Yen,

- M.H. The antiplatelet activity of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*, is mediated through inhibition of phospholipase C. *Thromb Res* 92: 53-64, 1998b.
- Wang, W.J. Changes of nail fold microcirculation in 28 cases of acute cerebral thrombosis treated with Ligustrazine (original in Chinese). *Chin J Neurol Psychiatry* 17: 121-124, 1984.
- Xue, Q. Effect of Chuanxiongqin (tetramethylpyrazine) on microcirculatory perfusion in hamsters and capillary permeability in rat. *Proc Cams Punc* 4: 224-228, 1989.
- Zeng, G.Y., Zhou, Y.P., Zhang, L.Y. and Zhang, Y. Effects of tetramethylpyrazine on cardiac hemodynamics in dogs. *Acta Pharmaceutica Sinica* 17: 182-186, 1982.

表一 TMPZ 對血小板 thromboxane B₂ 形成的影響

Treatment	Thromboxane B ₂ (ng/ml)
Resting	6.3± 0.9 (4)
DMSO (0.5%)	8.1± 1.3 (4)
collagen	218.5± 31.4 (4)
+TMPZ 0.5 mM	111.8± 21.8* (4)
+TMPZ 1.0 mM	117.8± 17.4* (4)
+TMPZ 1.5 mM	90.3± 8.4** (4)

TMPZ (0.5, 1.0 and 1.5 mM) was added to human washed platelet suspension (4.5×10^8 /ml) 2 min before the addition of collagen (5 μ g/ml). The reaction was terminated 6 min after the addition of collagen and the platelet suspensions were collected for the determination of the thromboxane B₂ level. Data are presented as mean \pm S.E.M. (n). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ as compared with collagen (5 μ g/ml).

表二 TMPZ 對血小板 cyclic GMP 形成的影響

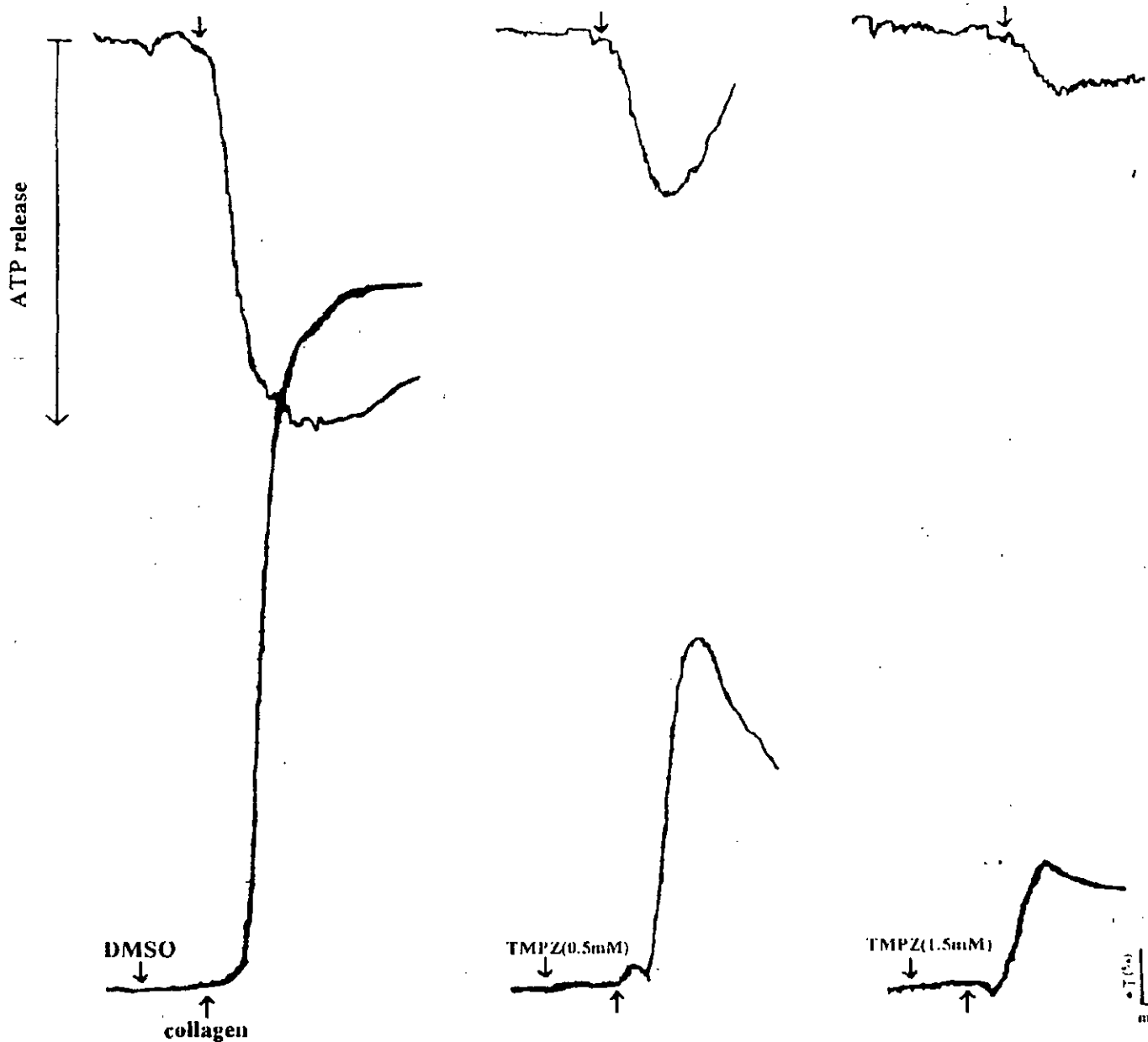
Drug	Dose	cyclic GMP (pmol/10 ⁹ cells)
resting		7.98 ± 0.49
nitroglycerin	200 μM	33.52 ± 1.93*
DMSO	0.5 %	8.68 ± 0.34
TMPZ	50 μM	26.73 ± 0.71*
	100 μM	27.82 ± 0.84*
	200 μM	38.37 ± 2.94*

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°C. 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.

表三 TMPZ 對血小板 nitric oxide 形成的影響

Drug	Dose	NO (μM)
resting		13.24 \pm 1.21
collagen	10 $\mu\text{g/ml}$	33.52 \pm 1.83*
DMSO	0.5 %	17.61 \pm 2.40
TMPZ	50 μM	32.16 \pm 2.15*
	100 μM	25.37 \pm 1.19*
	200 μM	32.24 \pm 1.52*

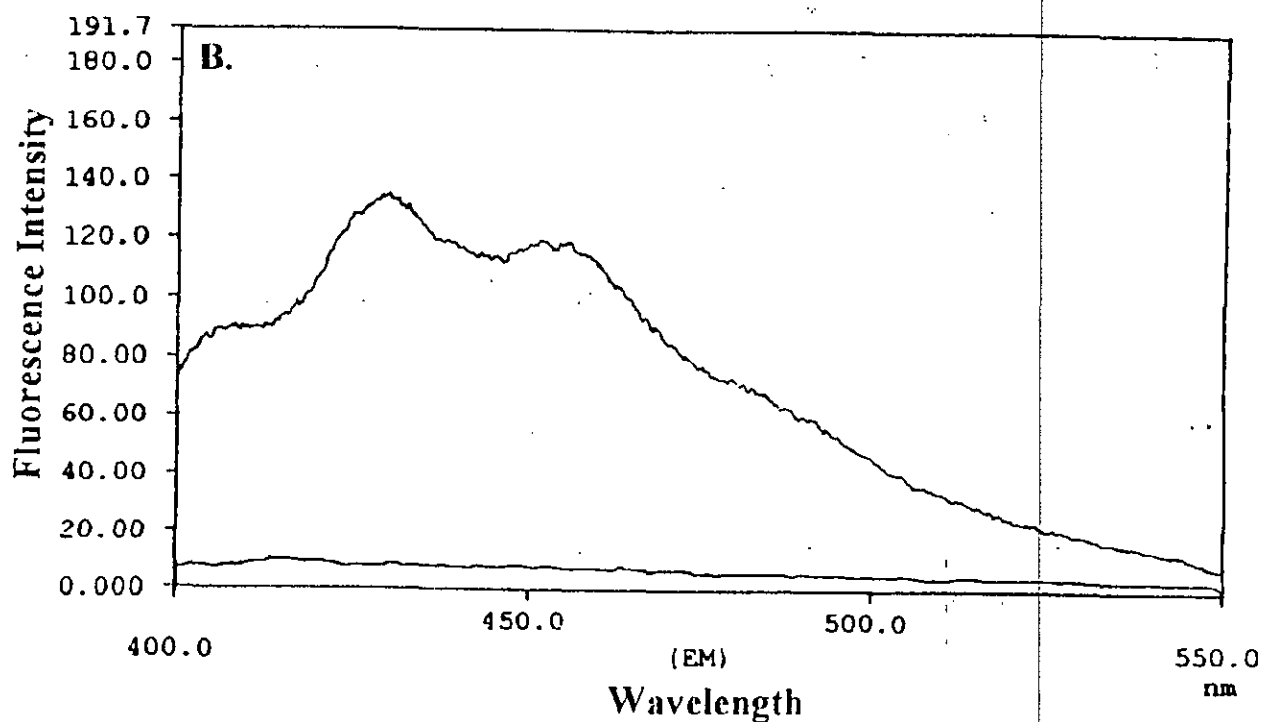
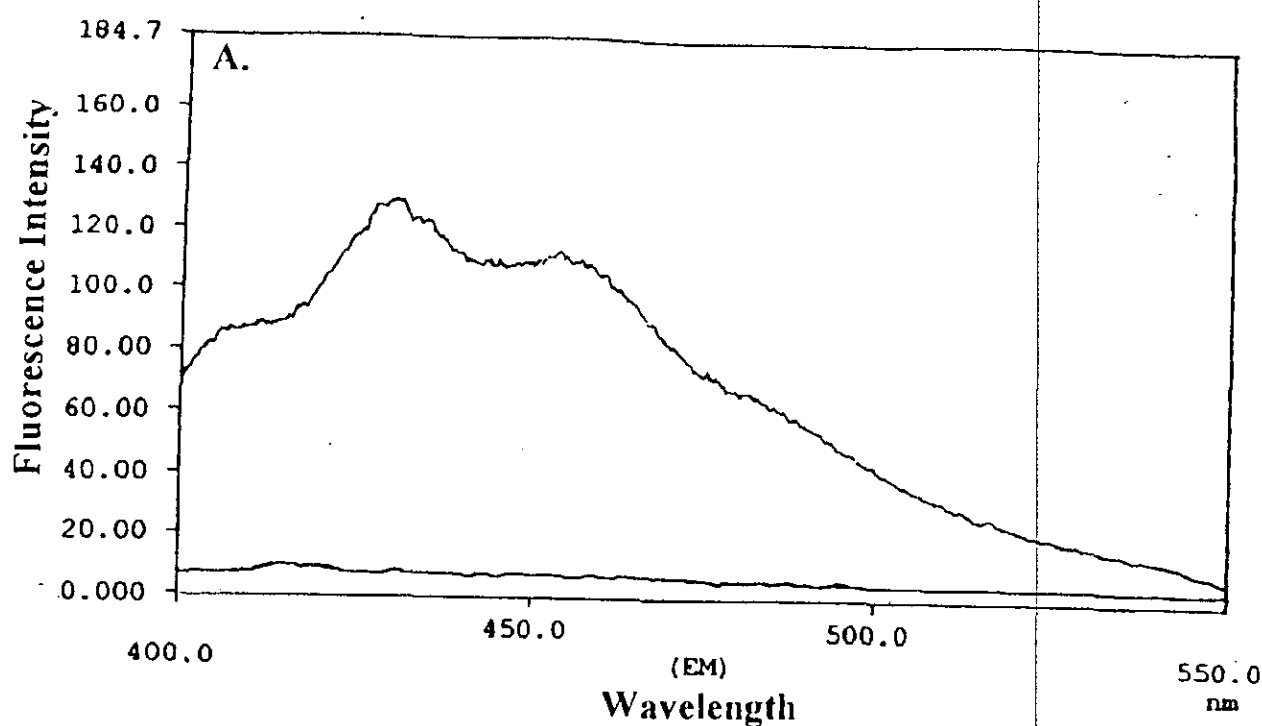
Washed human platelet suspensions were preincubated with various concentrations of TMPZ (50, 100, and 200 μM) or collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) for 15 min at 37°C. Addition of collagen in platelet suspensions was presented as a positive control. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 4). *: $P 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



圖一

TMPZ 抑制血小板凝集及 ATP 釋放反應的圖形

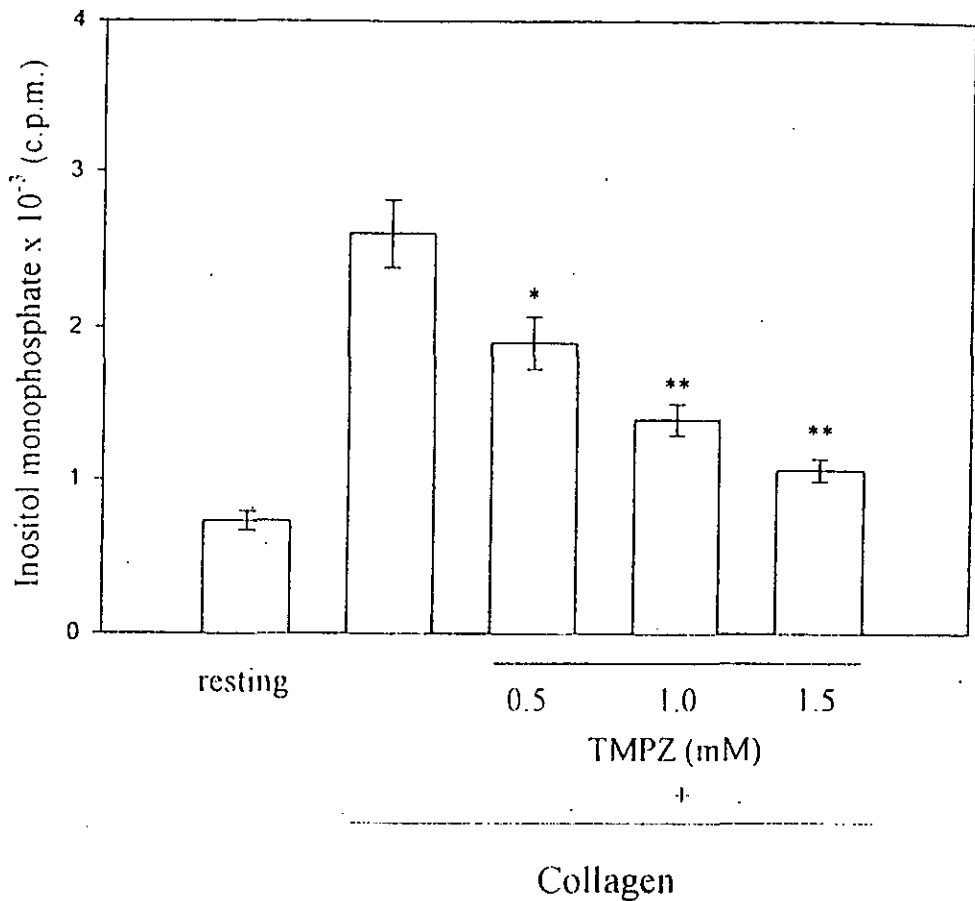
Typical patterns of inhibitory effect of TMPZ on platelet aggregation induced by collagen and ATP release of human washed platelet suspensions. Platelets ($4.5 \times 10^8/\text{ml}$) were preincubated with TMPZ (0.5, 1.5 mM) at 37°C for 2 min, then collagen ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) was added to trigger aggregation (upward tracing) and ATP release (downward tracing). Luciferin/luciferase mixture ($20 \mu\text{l}$) was added 2 min before the agonists in order to measure the ATP release reaction.



圖二

TMPZ 對血小板細胞膜流動性的影響

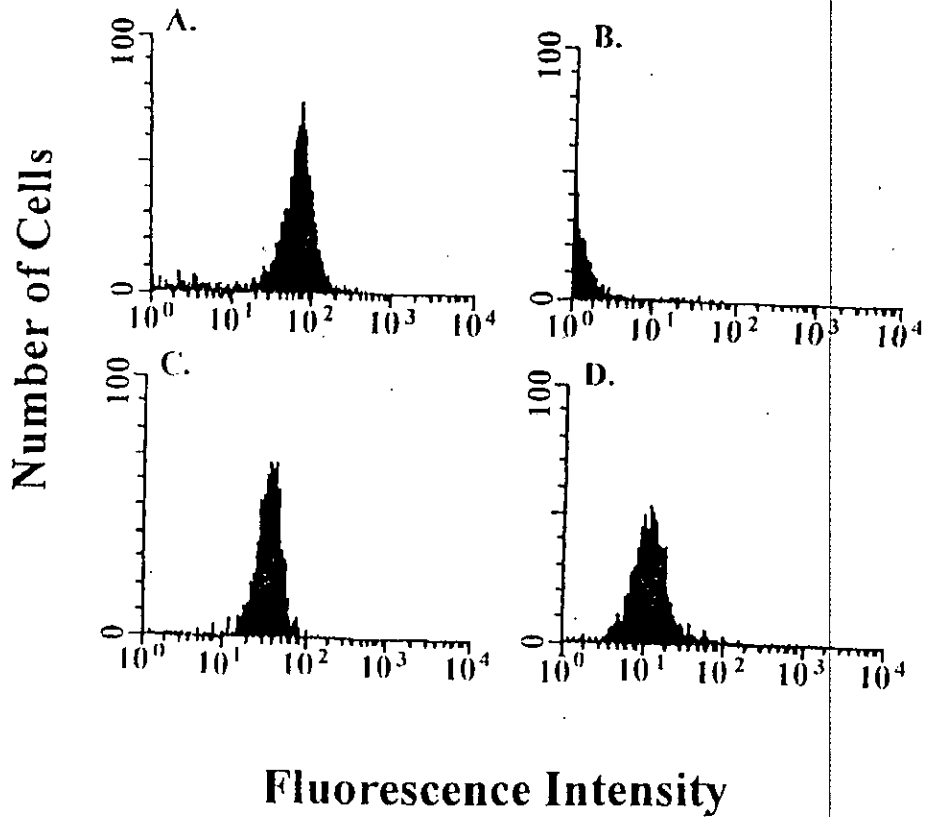
Fluorescence emission spectra of platelet membranes labeled with DPH (0.5 μM) in the presence of (A) DMSO (0.5 %) or (B) TMPZ (0.5 mM). The lower curve in each panel is a representative background spectrum of membranes without labeled DPH. The profile is a representative example of four similar experiments.



圖三

TMPZ 對 collagen 引起血小板 phosphoinositide 分解的影響

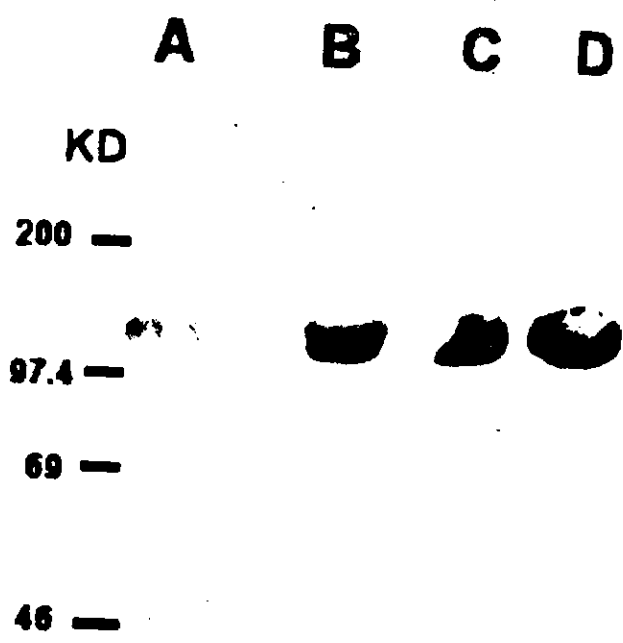
Effect of TMPZ on collagen-induced inositol monophosphate formation in human washed platelets. Platelets were labeled with [³H] inositol and stimulated with collagen (5 μg/ml) in the presence of various concentrations of TMPZ (0.5, 1.0 and 1.5 mM). Data are presented as means ± S.E.M. (n=4). *: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01 denote a significant difference compared with resting.



圖四

TMPZ 對 FITC-triflavin 結合到血小板 glycoprotein IIb/IIIa complex 的影響

Flow cytometric analysis of FITC-triflavin binding to human platelets in the absence or presence of various concentrations of TMPZ (0.5 and 1.0 mM). (A) The solid line represents the fluorescence profile of FITC-triflavin ($2 \mu\text{g/ml}$) in the absence of TMPZ; (B) in the presence of EDTA (10 mM) as the negative control, or in the presence of (C) TMPZ (0.5 mM) and (D) TMPZ (1.0 mM). The profile is a representative example of five similar experiments.



圖五
 TMPZ 刺激血小板表現 ec NO synthase 的情形

Western blot analysis of platelets with mouse monoclonal antibody against human ecNOS from the solvent control (0.5% DMSO)-treated for 30 min (lane A), TMPZ (50 μ M)-treated for 15 min (lane B), TMPZ (200 μ M)-treated for 15 min, and TMPZ (50 μ M)-treated platelets for 30 min (lane D). An equal amount of protein (10 μ g) was loaded onto each lane. This Western blot analysis is a representative example of four similar experiments.