

吗啉环和哌嗪环类衍生物的抗血栓作用及其分子机制

陈冬梅, 陈 凯, 汪 海*

(军事医学科学院 毒物药物研究所 北京 100850)

摘要: 目的 研究吗啉环和哌嗪环类衍生物对血栓形成的影响及分子机制。方法 利用小鼠尾动脉血栓模型, 观察新化合物对血栓形成的影响。结果 化合物 MOPMC, 2FBMPC, MPTMBC, DMHPPP 和 PPVP 在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可显著降低成栓率; 而结构类似的化合物 MAPC, 4C3FBMOC, mTBMPC, MONVP 和 MPNVP 对血栓形成均无明显影响; 化合物 DMHPPP 对凝血系统和血小板聚集功能无显著影响, 但可升高血浆中 t-PA 和 PGI_2 含量, 降低 PAF-1 的活性和 TXA_2 的含量。结论 吗啉环和哌嗪环类化合物可激活血管内皮细胞乙酰胆碱作用靶标而对抗血栓形成。

关键词: 血管内皮细胞; 乙酰胆碱; 血栓; 角叉菜胶

中图分类号: R972.7; R965

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2003)09 - 0641 - 05

Antithrombotic effects of morpholine and piperazine ring derivatives and their molecular mechanism

CHEN Dong-mei, CHEN Kai, WANG Hai*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: **Aim** To investigate the antithrombotic effects of morpholine and piperazine ring derivatives and their mechanisms. **Methods** In isolated rat aorta precontracted with norepinephrine (NE), the vasodilatory effects of compounds with novel structure were investigated. Mice was given kappa-carrageenin ip and kept at the temperature of (20 - 21) °C. **Results and Conclusion** Active candidate compounds including MOPMC, 2FBMPC, MPTMBC, DMHPPP and PPVP were shown to antagonize thrombosis at the dose of $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ through activating the endothelial target for acetylcholine; while the contrasting compounds MAPC, 4C3FBMOC, mTBMPC, MONVP and MPNVP showed no significant effect on the tension of isolated aorta strips or significant antithrombotic effects at the same dose. The antithrombotic mechanism of novel compounds is not relevant to hemostatic systems or functions of platelet aggregation directly, but they can promote endothelial cells to release tissue-type plasminogen activator (t-PA) and inhibit the activity of plasminogen activator inhibitor-1 (PAF-1).

Key words: endothelial cell; acetylcholine; thrombosis; carrageenin

血管内皮细胞(EC)合成内皮素、血栓素 A_2 、内皮细胞源性舒张因子(EDRF)等调节血管张力;合成前列环素(PGI_2)、血小板活化因子(PAF)而调节血小板的功能;合成组织型纤溶酶原激活物(t-PA)、纤溶

酶原激活物抑制剂(PAF-1)等调节纤溶活性^[1,2]。病理状态下, EC 功能紊乱, 抗血栓作用减弱^[3-7]。在血栓形成的早期, 动脉的近心端乙酰胆碱(ACh)诱发的内皮依赖性血管舒张反应显著降低, 血管内皮细胞乙酰胆碱靶标(ETA)的功能极度低下^[8,9]。ETA 有无可能作为抗血栓药物作用的新靶标? 目前尚无相关的文献报道。本文旨在阐明激活 ETA 与抗血栓形成之间的关系, 为寻找并发展以血管内皮细胞为靶标的新型抗血栓药物提供实验依据。

收稿日期: 2002-09-05

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(GI99805112); 北京赛德维康医药研究院新药研究基金项目

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 66932651, Fax: 86 - 10 - 68211656,

E-mail: wh@nic.bmi.ac.cn

材料与方法

动物 Wistar 大鼠, ♀ ♂兼用, 体重 200 ~ 250 g; 豚鼠, 体重(300 ± 50) g; 昆明小鼠, ♂, 体重 18 ~ 22 g。均由军事医学科学院实验动物中心提供。

药品与试剂 化合物 MOPMC, 2FBMPC, MPTMBC, DMHPPP, PPVP, MAPC, 4C3FBMOC, mTBMPC, MONVP 和 MPNVP 均由军事医学科学院毒物药物研究所合成室提供; 科石酸钾钠去甲肾上腺素(武汉制药厂); Kappa 型角叉菜胶(Sigma 公司), 凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血酶时间(aPTT)测定试剂盒(福建太阳生物技术公司), PAF-1 活性测定试剂盒(上海医科大学分子遗传学研究室), 血栓素 B₂(TXB₂)和 6-酮-前列腺素 F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})放免测定试剂盒(解放军总医院东亚放射免疫研究所)。

离体血管环实验^[10] Wistar 大鼠断头取胸主动脉, 置于 Krebs-Ringer 营养液(mmol·L⁻¹: NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 11.0, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, 葡萄糖 11.1, EDTACa-Na₂ 0.026, pH 7.4)中, 切成 5 mm 的动脉环, 置于 37 °C 恒温浴槽内, 持续通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气。平衡 60 min 后, 以 0.62 mol·L⁻¹ 去甲肾上腺素预收缩血管, 加入 1 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 被评筛化合物, 观察血管张力的变化; 对有舒血管作用的化合物, 用棉棒擦去内皮, 并用 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ ACh 检验内皮完整性。若内皮完整时能诱发血管舒张反应, 而去内皮后不能诱发舒血管反应, 则此化合物的作用为内皮依赖性舒血管作用。

小鼠尾动脉血栓模型的制备^[11] 小鼠 ip 角叉菜胶 5 mg·kg⁻¹ 后, 饲养于(20 ± 1) °C, 3 ~ 4 h 后尾尖部逐渐出现紫绀并向尾根部扩展, 逐渐变黑, 于血栓启动前 24 和 1 h 分别给予化合物 MOPMC, MAPC, 2FBMPC, 4C3FBMOC, MPTMBC, mTBMPC, DMHPPP, MONVP, PPVP 和 MPNVP 1.0 mg·kg⁻¹, 48 h 后统计成栓率和血栓长度。

血小板最大聚集率的测定 Wistar 大鼠 iv DMHPPP, 2 h 后于下腔静脉采血, 800 r·min⁻¹ 离心 10 min, 得富血小板血浆(PRP), 将下层 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 得贫血小板血浆(PPP), 将 PRP 放置 1 ~ 2 h 后测定血小板最大聚集率(MAR); 用 PPP 测定 TT, PT 和 aPTT。

TT, PT, aPTT 及 tPA 含量和 PAF-1 活性的测定 Wistar 大鼠尾 iv 受试药后 2 h, 下腔静脉采血, 4 °C, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上层血浆。依试

剂盒说明测定 TT, PT, aPTT 和 PAF-1 活性, 用 ELISA 法测定 tPA 含量。

TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 的含量测定 在血栓模型上, 给受试药后 48 h, 动物眼球采血, 4 °C, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取血浆用放免法测定 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 的含量。

统计学处理 成栓率的统计用 χ^2 检验, 其他数据均用成组 *t* 检验。

结果

1 血管内皮细胞活性与血栓形成之间的关系

化合物 MOPMC, 2FBMPC, MPTMBC, DMHPPP 和 PPVP(最大舒张率在 51.6% ~ 84.3%) 均诱发舒血管反应, 而去内皮标本的舒张率在 3.5% ~ 13.9%, 二者相比均有显著差异, 表明其舒血管作用为内皮依赖性; 并且这些化合物在 1.0 mg·kg⁻¹ 均可使成栓率显著降低, 将其列入阳性化合物; 而结构类似, 但对血管张力无明显影响的 5 个化合物 MAPC, 4C3FBMOC, mTBMPC, MONVP 和 MPNVP(最大舒张率在 0 ~ 9%, 1.0 mg·kg⁻¹, ip) 均对血栓形成无明显影响, 将其列入阴性化合物(表 1, 2)。说明, 选择性激活 ETA 诱发内皮依赖性舒血管反应的化合物均具有抗血栓作用。

2 吗啉环和哌嗪环类新衍生物抗血栓形成的作用特征

2.1 对血栓形成的预防学作用

于血栓启动前 24 和 1 h 分别给予化合物 MOPMC, 2FBMPC, MPTMBC, DMHPPP 和 PPVP 1.0 mg·kg⁻¹, 可使血栓发生率较模型组显著降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$, $n = 19 \sim 40$); 而结构类似的化合物 MAPC, 4C3FBMOC, mTBMPC, MONVP 和 MPNVP 则对成栓率和血栓长度均无显著影响($P > 0.05$, $n = 12 \sim 64$), DMHPPP 在 0.25 ~ 4.0 mg·kg⁻¹, PPVP 在 0.25 ~ 4.0 mg·kg⁻¹, 可对抗血栓形成(表 2)。

2.2 对血栓形成的治疗学作用

DMHPPP 在 0.25 ~ 4.0 mg·kg⁻¹, 分别于血栓启动后 1, 3 和 24 h 各给药 1 次; 6, 8 和 24 h 各给药 1 次; 12, 14 和 24 h 各给药 1 次; 24, 26 和 30 h 各给药 1 次。上述 4 种治疗性给药方案结果表明, 在血栓发生 1 ~ 6 h 内分别 3 次给予治疗药物, 与模型组相比, 可使成栓率和血栓长度均显著降低; 在血栓发生 12 h 后 3 次给予治疗药物, 与模型组相比, 成栓率无显著改变, 1.0 ~ 4.0 mg·kg⁻¹ 组血栓长度显著降低; 而在血栓发生 24 h 后 3 次给予治疗药物, 与模型组

相比,成栓率无显著改变,仅 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组血栓长度显著降低($P < 0.01$)。表明 DMHPPP 的抗血栓作

用呈时间依赖性,血栓启动后 1~6 h 内给药效果最佳(表 3)。

Table 1 Structure activity of morpholine and piperazine ring derivatives in isolated aorta strips in rats

| Compound | Chemical structure | Endothelium dependent maximal relaxational rate/ % | Relaxational rate induced by endothelium denuded aorta strip/ % | Antithrombotic effect |
|----------|--------------------|--|---|-----------------------|
| MOPMC | | $52 \pm 25(9)$ | $3.5 \pm 1.0(5)^{**}$ | + |
| MAPC | | $0(5)$ | - | - |
| 2FBMPC | | $58 \pm 26(6)$ | $6 \pm 4(5)^{**}$ | + |
| 4C3FBMOC | | $0(5)$ | - | - |
| MPTMBC | | $60 \pm 20(6)$ | $7 \pm 3(5)^{**}$ | + |
| mTBMPC | | $0(4)$ | - | - |
| DMHPPP | | $84 \pm 17(8)$ | $6 \pm 6(8)^{**}$ | + |
| MONVP | | $4.8 \pm 2.3(4)$ | - | - |
| PPVP | | $69 \pm 24(8)$ | $14 \pm 7(7)^{**}$ | + |
| MPNVP | | $9.0 \pm 2.3(4)$ | - | - |

The data is expressed as $\bar{x} \pm s (n)$. $^{**} P < 0.01$ vs endothelium dependent relaxational rate in endothelium intact aorta strips in rats

3 吗啉环和哌嗪环类新衍生物抗血栓作用可能的分子机制

3.1 对凝血系统功能和血小板聚集功能的影响

DMHPPP 在 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, TT, PTR, aPTT 和 MAR 分别为 $(44 \pm 12) \text{ s} (n = 8)$, $(1.02 \pm 0.11) \text{ s} (n = 9)$, $(29 \pm 10) \text{ s} (n = 7)$ 和 $(42 \pm 14) \% (n = 10)$; 分别与正常对照组的 $(38 \pm 9) \text{ s} (n = 15)$, $(1.21 \pm 0.28) \text{ s} (n$

$= 15)$, $(27 \pm 4) \text{ s} (n = 15)$ 和 $(43 \pm 16) \% (n = 15)$ 相比无显著差异($P > 0.05$) (PTR 为受试血浆与对照血浆的 PT 比值)。

3.2 对血管内皮细胞分泌的活性物质的影响

对 tPA 含量和 PAI-1 活性的影响 DMHPPP $0.06 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tPA 含量与正常对照组相比分别升高了 11.2%, 8.7%, 12.0% 和 7.1% ($P < 0.01$,

$n = 10 \sim 16$), 表明 DMHPPP 可促进 EC 释放 tPA; PAF1 活性与对照组相比分别降低了 16.3%, 11.9%, 7.9% 和 6.6% ($P < 0.01$, $n = 5 \sim 14$), 表明 DMHPPP 可抑制 EC 分泌的 PAF-1 活性(表 4)。

Table 2 Effects of morpholine and piperazine ring derivatives(ip) on mouse tail thrombosis induced by carrageenin at the dose of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

| Drug | Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | Rate of thrombosis/ % | | Length of thrombosis/ mm | |
|----------|---|-----------------------|------|--------------------------|----------------|
| | | Control | Drug | Control | Drug |
| Aspirin | 25 | 88 | 32** | 16 ±13(44) | 6 ±5(16)** |
| | 50 | 88 | 28** | 16 ±13(44) | 9.6 ±2.2(11)** |
| MOPMC | 1.0 | 80 | 33** | 11 ±12(64) | 4 ±8(13) |
| MAPC | 1.0 | 80 | 74 | 11 ±12(64) | 5.8 ±2.8(14) |
| 2FBMPC | 1.0 | 80 | 52* | 11 ±12(64) | 8 ±7(10) |
| 4C3FBMOC | 1.0 | 80 | 65 | 11 ±12(64) | 5 ±6(13) |
| MPTMBC | 1.0 | 80 | 60* | 11 ±12(64) | 7 ±8(12) |
| mTBMPC | 1.0 | 80 | 70 | 11 ±12(64) | 6 ±5(14) |
| DMHPPP | 0.25 | 88 | 38** | 16 ±13(44) | 7 ±6(15)* |
| | 1.0 | 88 | 32** | 16 ±13(44) | 9 ±6(14)* |
| | 4.0 | 88 | 42** | 16 ±13(44) | 3.7 ±2.5(17)** |
| MONVP | 1.0 | 88 | 60 | 11 ±12(64) | 7 ±6(12) |
| PPVP | 0.25 | 88 | 58** | 16 ±13(44) | 13 ±11(23) |
| | 1.0 | 88 | 58** | 16 ±13(44) | 12 ±12(21) |
| | 4.0 | 88 | 65** | 16 ±13(44) | 10 ±8(26)** |
| MPNVP | 1.0 | 80 | 70 | 11 ±12(64) | 13 ±6(14) |

The data is expressed as $\bar{x} \pm s (n)$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. The control is referred to thrombotic model groups

Table 3 Experimental therapeutic effects of DMHPPP on mouse tail thrombosis induced by carrageenin

| DMHPPP / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | Rate of thrombosis/ % | Length of thrombosis/ mm | |
|--|-----------------------|--------------------------|-----------------|
| | | Control | Treatment |
| A | 100 | 60** | 24.7 ±2.6(20) |
| | 100 | 60** | 11.5 ±1.8(12)** |
| | 100 | 60** | 8.6 ±1.5(12)** |
| B | 100 | 65** | 24.7 ±2.6(20) |
| | 100 | 60** | 11.3 ±1.4(13)** |
| | 100 | 60** | 11.0 ±1.3(20) |
| C | 100 | 75* | 11.0 ±1.3(20) |
| | 100 | 75* | 6.0 ±1.2(12)* |
| | 100 | 30** | 11.0 ±1.3(20) |
| D | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 11.0 ±1.3(20) |
| | 100 | 85 | 6.6 ±1.8(19)* |
| E | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| F | 100 | 95 | 11.0 ±1.3(20) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| | 100 | 100 | 5.2 ±2.5(6)* |
| G | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| H | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| I | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| J | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| K | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| L | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| M | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| N | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| O | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| P | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| Q | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| R | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| S | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| T | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| U | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| V | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| W | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| X | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |
| Y | 100 | 100 | 10.8 ±0.9(20) |
| | 100 | 95 | 6.6 ±1.8(19)* |
| | 100 | 85 | 11.0 ±1.3(20) |
| Z | 100 | 85 | 4.8 ±2.7(17)** |
| | 100 | 95 | 12.1 ±1.7(19) |
| | 100 | 95 | 8.3 ±1.0(19) |

DMHPPP 0.25 - 4.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip was given at 1, 3 and 24 h (A), 6, 8 and 24 h (B), 12, 14 and 24 h (C), and 24, 26 and 30 h (D), after administration of carrageenin at the dose of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. $n = 6 - 20$, $\bar{x} \pm s (n)$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control. The control is referred to thrombotic model groups

Table 4 Effects of DMHPPP on plasma values of tPA and PAF-1 two hours after intravenous injection in rats

| Drug | Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | tPA/ % (control) | PAF-1/ $\text{AU} \cdot \text{mL}^{-1}$ |
|---------|--|------------------|---|
| Control | | 100 ±6(11) | 18.89 ±0.18(13) |
| DMHPPP | 0.06 | 111 ±5(10)** | 15.8 ±1.0(5)** |
| | 0.25 | 109 ±4(16)** | 16.6 ±0.5(8)** |
| | 1.0 | 112 ±11(10)** | 17.4 ±0.8(12)** |
| | 4.0 | 107 ±7(11)** | 17.6 ±0.8(12)** |

$n = 5 - 16$, $\bar{x} \pm s (n)$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

对 TXB_2 含量的影响 DMHPPP 0.25 ~ 4.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, TXB_2 含量与模型组相比分别降低了 80.1%, 66.3% 和 44.4% ($P < 0.01$, $n = 12 \sim 13$)。表明 DMHPPP 可抑制血栓形成过程中 EC 合成并分泌促栓物质 TXA_2 的代谢物 TXB_2 ; PPVP 0.25 ~ 4.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, TXB_2 含量与模型组相比分别降低了 22.6%, 66.7% 和 77.5% ($P < 0.01$, $n = 11 \sim 12$), 表明 PPVP 也可抑制血栓形成时 EC 合成并分泌 TXB_2 (表 5)。

Table 5 Effects of DMHPPP and PPVP on plasma values of TXB_2 and 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ in mouse tail thrombosis induced by carrageenin at the dose of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

| Drug | Dose / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ | $\text{TXB}_2 / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|---------|--|--|--|
| Normal | | 322 ±39(13) | 368 ±59(12) |
| Control | | 824 ±90(12)** | 324 ±42(12)* |
| DMHPPP | 0.25 | 164 ±29(12)**## | 425 ±55(12)*## |
| | 1.0 | 278 ±29(12)**## | 423 ±71(12)*## |
| | 4.0 | 458 ±49(12)**## | 462 ±63(12)**## |
| PPVP | 0.25 | 638 ±80(12)**## | 356 ±77(12) |
| | 1.0 | 274 ±26(11)**## | 274 ±26(12)# |
| | 4.0 | 185 ±44(12)**## | 344 ±52(12) |

$n = 11 - 13$, $\bar{x} \pm s (n)$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control

对 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 含量的影响 DMHPPP 0.25 ~ 4.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 含量与模型组相比分别升高了 31.2%, 30.6% 和 42.6% ($P < 0.01$, $n = 12$) (表 5)。表明 DMHPPP 可通过激活 EC, 促进 EC 合成并分泌 PGI_2 的稳定代谢物 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, 从而抑制血栓形成过程中血小板的聚集, 并舒张血管平滑肌。

讨论

本实验结果表明, 化合物 MOPMC, 2FBMPC,

MPTMBC, DMHPPP 和 PPVP 可激活 EC 诱发内皮依赖性舒血管作用,并可显著降低成栓率;而结构类似的 MAPC, 4C3FBMOC, mTBMPC, MONVP 和 MPNVP 对血管张力无明显影响,不激活 EC,且对血栓形成也无明显影响,表明 MOPMC 等阳性化合物的抗血栓作用与激活 EC 密切相关。本研究室近几年研究表明:既激活 M 受体又激活 ETA 的槟榔碱在 $0.1 \sim 4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可剂量依赖性地对抗血栓形成;而相同条件下,只激活 M 受体而不激活 ETA 的毛果芸香碱在剂量高达槟榔碱 40 倍时仍无抗血栓作用^[13],表明槟榔碱激活 ETA 可对抗血栓形成,而与 M 受体的激活作用无关。本实验中的化合物 MOPMC, 2FBMPC, MPTMBC, DMHPPP 和 PPVP 是根据槟榔碱的化学结构改造合成的开环类似物,它们特异性作用于 EC,激活 ETA,而不激活 M 受体,其抗血栓作用的机理与槟榔碱相似,其中 DMHPPP 和 PPVP 的抗血栓强度比阿司匹林强 500 ~ 1 000 倍和 100 ~ 200 倍。

新化合物抗血栓分子机制研究表明,其抗血栓作用并非通过直接影响凝血系统和血小板的聚集,而通过促进 EC 释放 t-PA 和 PGI_2 ,抑制 PAF-1 的活性,抑制 EC 合成并释放 TXA_2 而实现。 t-PA 主要由 EC 合成,通过形成 t-PA -纤溶酶原与纤维蛋白的三元复合物,增加 t-PA 与纤溶酶原的接触,也使激活的纤溶酶结合在复合物上,而不被 α_2 -抗纤溶酶灭活。另外 EC 也大量分泌 PAF-1,血浆 PAF-1 水平的升高已被视为血栓的独立危险因素,本研究表明,新衍生物可抑制 PAF-1 活性而抗血栓。

EC 摄取血液中的花生四烯酸(AA),经环氧合酶代谢途径生成 PGI_2 。 PGI_2 可通过激活位于平滑肌细胞及血小板的 IP 受体并激活腺苷酸环化酶(AC)而介导血管平滑肌舒张,抑制血小板聚集和粘附; PGI_2 的前体物 PGH_2 ,若经血小板内代谢则合成释放 TXA_2 ,后者是强烈的血管收缩剂和血小板聚集剂。 $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ 之间的动态平衡是调控血管壁紧张度、血小板功能及血管壁细胞迁移生长的重要因素。本研究表明,新衍生物可促进 EC 释放 PGI_2 ,抑制其合成并分泌 TXA_2 。综上所述,新衍生物的抗血栓作用与其激活 EC 密切相关。提示 EC,包括 ETA,为该衍生物抗血栓作用的直接靶标。

目前现有的抗血栓药物按作用机理可分为抗凝血药、抗血小板药和纤维蛋白溶解药。各类药物虽有不同程度的作用效果,但不良反应也日趋明显;或

半衰期太短,或无法口服及出血、过敏反应和溶栓后再栓死等副作用限制其广泛应用。因此,研究有效、安全、具有新作用机制的抗血栓药物具有重要意义。本研究表明,DMHPPP 具有预防和治疗血栓形成双重作用特征,在血栓启动后 24 h 内呈时间依赖性地治疗血栓形成,其治疗时间窗较溶栓药 t-PA 明显变宽;小鼠急性毒性实验表明,DMHPPP 的毒性范围在 $400 \sim 800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,安全范围广,又为小分子化合物,具有较好的发展前景。

References:

- [1] Key NS. Scratching the surface: endothelium as a regulator of thrombosis, fibrinolysis, and inflammation [J]. *J Lab Clin Med*, 1992, **120**(2): 184 - 186.
- [2] Gross PL, Aird WC. The endothelium and thrombosis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2000, **26**(5): 463 - 478.
- [3] Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction [J]. *Ann Med*, 2000, **32**(5): 293 - 304.
- [4] Dawson S, Henney A. The status of PAF-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review [J]. *Atherosclerosis*, 1992, **95**(2): 105 - 117.
- [5] Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis [J]. *FASEB*, 1994, **8**(15): 1279 - 1284.
- [6] Boulanger CM. Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31**(1): 39 - 49.
- [7] Shimokawa H. Endothelial dysfunction: a novel therapeutic target. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31**(1): 23 - 37.
- [8] Nene S, Gelabert HA, Moore WS, et al. Exposure to thrombus diminishes endothelial derived relaxation in the rabbit carotid artery [J]. *J Surg Res*, 1999, **87**(1): 51 - 56.
- [9] Reil TD, Moore WS, Kashyap VS. The effects of thrombosis, thrombectomy and thrombolysis on endothelial function [J]. *Eur J Vas Endovasc Surg*, 2000, **199**(2): 162 - 168.
- [10] Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle [J]. *Br J Pharmacol*, 1988, **93**(3): 515 - 524.
- [11] Bekemeier H, Hirschelmann R, Giessler AJ. Carrageenin-induced thrombosis in the rat and mouse as a test model of substances influencing thrombosis [J]. *Biomed Biochim Acta*, 1984, **43**(3): 347 - 350.
- [12] Li MS, Hai W. Pharmacological characteristics of the endothelial target for acetylcholine [J]. *Life Sci*, 2002, **70**(11): 1285 - 1298.
- [13] Chen DM, Mu SF, Wang H. Antithrombosis through activating endothelial target for acetylcholine and its molecular mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2002, **18**(5): 527 - 531.