

金銀花成份之藥理作用研究

國立成功大學

張文昌

摘要

分離自金銀花之多酚類化合物對血小板凝集、血小板前列凝素生合成及由過氧化氫導致之內皮細胞損傷等作用已被研究。在人類血小板凝集之抑制作用上，methyl caffeate，3,4-di-O-caffeoylquinic acid 及 methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid 皆有強烈的效果。它們主要是抑制在由 ADP 導致的血小板凝集之第二波上。至於在血小板中由 calcium ionophore A23187 所引起之前列凝素生合成，則以 methyl caffeate 和 methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid 具有最強的抑制效果。methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid 直接抑制血小板微粒體中花生四烯酸轉變成前列凝素，然而 methyl caffeate 對血小板微粒體中之前列凝素並沒有任何重要的作用。在預防過氧化氫導致所培養的內皮細胞損傷方面，protocatechuic acid，methyl caffeate，methyl chlorogenic acid 及 luteolin 具有明顯的作用。在血小板活性的抑制作用及過氧化氫導致細胞損傷之細胞的保護作用能夠解釋分離自金銀花之多酚類化合物在血管功能中所扮演的可能性角色。

介紹

金銀花之花苞或新開之花具有甜味並以金銀花之名使用在中國之中藥。這種藥可以清除潛伏性頭痛，退熱，解毒，抗炎等作用，因此在處方中用來治療一般的發熱疾病，痢疾，炎腫，癰，傳染性腫脹。它的化合物中含有數種多酚類化合物包括 chlorogenic acid，isochlorogenic acid，neochlorogenic acid，4-O-caffeoylquinic acid，4,5-dicaffeoylquinic acid，3,5-dicaffeoylquinic acid 及 3,4-dicaffeoylquinic acid 等 (1)。這些化合物有時被稱為 "caffetannins"。

血管內皮對氧化物損傷具極端敏感性，可促進發炎細胞中被活化的氧化代謝釋出 (2、3)。在多種環境之下過氧化氫是造成細胞嚴重損傷之一種重要的中間物。因此氧化性損傷在動脈硬化之發生可能扮演某一角色。

因動脈硬化而使內皮細胞損傷或使其功能不良，則血小板被活化而凝集。在這些由血小板生合成之產物中顯現出與血管穩定性有密切關係的是花生四烯酸之代謝物。花生四烯酸可轉變成 Thromboxane A₂(TXA₂)，它是一個對血小板凝集具有非常影響力之誘發劑及血管收縮劑(6)。

在目前的研究報告中，分離自金銀花之十個多酚類化合物對血小板凝集、血小板前列環素生合成及過氧化氫導致之內皮細胞損傷等作用已被研究。

材料及方法

化學物品

- Bovine- γ -globulin, adenosine 5'-diphosphate(ADP), arachidonic acid, calcium ionophore A23187
購自— Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.
- TXB₂ standard 購自— Ono Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan.
- Hydrogen peroxide 購自— E. Merck, Darmstadt, F.R.G.
- [51Cr]Sodium chromate(386mCi/mg) & [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-3H]thromboxane B₂(180C₁/mmol) 購自— NEN, Du Pont, USA
- Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) & fetal bovine serum(FBS) 購自— GIBCO, NY, USA.
- 其它皆使用高度純化之試劑。

試驗化合物

在本研究中所有的試驗化合物都是分離自我們的實驗室。十個多酚類化合物是分離自金銀花。它們是 Chlorogenic acid (LJ-1), protocatechuic acid(LJ-2), methyl caffeate (LJ-3), methyl chlorogenic acid (LJ-4), 3,5-di-O-caffeoylquinic acid (LJ-5), methyl 3,5-di-O-caffeoylquinic acid(LJ-6), 3,4-di-O-caffeoylquinic acid(LJ-7), methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid(LJ-8), rutin (LJ-9), luteolin(LJ-10)。它們的結構已用 NMR 確認，如圖一所示。

血小板凝集試驗

用從未服食任何藥物的人類自願者之血液加入 3.8% 檸檬酸鈉溶液 (9:1,v/v) 可維持二個星期。加入檸檬酸鈉溶液之血液在室溫下離心 $200 \times g$ 十分鐘可得到含血小板之血漿。一個 0.25ml 含血小板血漿之樣品在 37°C 之 NKK Hema Tracer 中因 25ul 的 ADP 而導致凝集。ADP 的最終濃度是 1×10^{-5} M。

血小板中內因性花生四烯酸轉變成 thromboxane

在 37°C 中五分鐘，人類血小板 (1×10^8 cells) 懸浮液在 1ml 不含鈣離子及鎂離子、內含 5.5mM 葡萄糖和 2mM 氯化鈣的磷酸鹽液 (pH 7.4) 中可被 3uM 鈣離子附著劑 A23187 (calcium ionophore A23187) 所激發。將血小板離心下來之後，在上清液內的 TXB_2 可藉由特殊的放射性免疫分析法偵測出。

血小板微粒體之配製

將血小板懸浮在 50mM Tris-HCl 緩衝液中並以型號 W-375 之超音波震盪器 (Heat System-Ultrasonics, Inc.) 震碎， $9,000 \times g$ 離心二十分鐘之後，使用 Beckman L8-80 超高速離心機將其上清液以 $105,000 \times g$ 再離心一小時。把所得的沈澱物懸浮在 50mM Tris-HCl 緩衝液中即為部份之微粒漿體。

血小板微粒體中 thromboxane 之生合成

此分析方法已出現在以前之報告中 (7)。每一個試驗管中含有： $5 \mu\text{g}$ 花生四烯酸 (arachidonic acid)，1uM 血紅素 (hemoglobin) 及 0.2mg 微粒體 (microsome) 在有或沒有試驗化合物之一毫升的 50mM Tris-HCl 緩衝液中，pH 7.4。在 37°C 中繼續培養十分鐘。快速的加入適量的 1N 鹽酸將培養之混合物的酸鹼值調至三可停止反應。再以五毫升的乙酸乙酯 (ethyl acetate) 將混合物中的主產物萃取出來。最後的有機層用氮氣使其蒸發至乾。由血小板微粒體所形成的 TXB_2 可由特殊的放射性免疫分析法偵測出。

蛋白質測定

蛋白質濃度可由 Lowry 等方法測定出 (8)。以牛血清蛋白 (fraction V) 為標準品。

TXB₂的放射性免疫分析法

TXB₂特殊的放射性免疫分析法與以前所報告之方法相同 (7)。繼續在室溫下培養，隨後並分離出沒有與被標定抗原形成鍵結之部分。抗血清、被標定抗原及標準品皆稀釋在含有 0.1 % gelatin 之 0.05M Tris-HCl, pH 7.5 的標準放射性免疫分析緩衝液中。所培養的混合物 (0.4 毫升) 中含有 0.2 毫升的標準品或樣品，0.1 毫升的抗血清 (最終稀釋，1:3000) 及 0.1 毫升 [³H]TXB₂ (約 10,000cpm)。繼續培養一小時。所有的樣品皆取二份放在 10*75mm 玻璃試管中。由 γ - 球蛋白加入覆有右旋醣之碳粉達到分離鍵結與無鍵結之抗原。 γ - 球蛋白及覆有右旋醣之碳粉之配製方法如下。牛的 γ - 球蛋白 (0.33 克) 先溶在 100 毫升中有 0.9 % 右旋醣之標準分析緩衝液中，然後加入碳粉 (3.3 克)，將此溶液攪拌一小時。在加入碳粉懸浮液之前，直接加一毫升的水到每一分析試管中。每一分析試管蓋上 Luckman LP/3S 之塞子，使 0.2 毫升碳粉懸浮液隔絕在管中。把試管上下震盪五次，靜置五分鐘後離心 100 × g 十分鐘。上清液中含有抗原抗體之鍵結在 LKB Rackbeta 之液態閃爍計數器中可被計數。

內皮細胞培養

如同以前之報告，內皮細胞分離自牛頸動脈 (9) 並維持在含有 10 % FBS 之 DMEM 中。目前實驗中是使用 15 到 25 代之細胞。

內皮細胞損傷試驗

如同先前之研究，內皮細胞之損傷可由 ⁵¹Chromium 之釋出加以判斷 (10)。生長培養液中單層細胞長滿 24 孔培養皿中並以 2uCi [⁵¹Cr]sodium chromate 標

記 18 小時。在 0.5 毫升 DMEM 中含有或沒有試驗化合物的細胞用 DMEM 沖洗二次後再以 2mM H_2O_2 處理六個小時。把培養的 DMEM 完全取走，則由受損細胞中釋出之 ^{51}Cr 放射活性可被 LKB 1282 Compugamma scintillation spectrophotometer 測定。結果以特殊之 ^{51}Cr - 釋出計算方式表示，如下： $(A-B)/(C-D)*100\%$ ，A 表示因試驗化合物之 ^{51}Cr - 釋出；B 表示自發性之 ^{51}Cr - 釋出；C 表示最大量的 ^{51}Cr - 釋出。自發性及最大量之釋出分別在細胞培養中使用溶媒及 0.1% Triton X-100 即可測出。

結果

多酚類化合物對血小板凝集之抑制作用

十個多酚類化合物對血小板凝集之作用研究是使用含血小板之血漿。並比較同時存在 aspirin 之作用。含血小板之血漿與試驗化合物在 37°C 培養三十分鐘，然後用 $1*10^{-5}M$ ADP 誘發血小板凝集。在十個化合物試驗中，LJ-3，LJ-7 及 LJ-8 具有強力抑制作用，而 LJ-1，LJ-4，LJ-5，LJ-6 及 LJ-10 沒有任何有意義的作用（表一）。它們的抑制作用與 aspirin 之抑制作用相似。LJ-7 所影響之典型的血小板凝集現象如圖二所示。在人類富含血小板之血漿中，由 ADP 導致之血小板凝集的第二波可被多酚類化合物隨其劑量而抑制。

多酚類化合物對血小板中形成 thromboxane 之作用

由於數種多酚類化合物可明顯的抑制 ADP 所導致之血小板凝集，接下來便研究多酚類化合物對血小板中形成 thromboxane 之作用。此研究中 thromboxane 由內因性花生四烯酸形成，血小板以試驗化合物先培養過後再以 calcium ionophore A23187 處理。如表二所示，LJ-2，LJ-3，LJ-7，LJ-8，及 LJ-9 在 $10^{-4} M$ 濃度時可明顯抑制由 calcium ionophore 引起之血小板 thromboxane 生合成。在所試驗的五個多酚類化合物中，LJ-3 及 LJ-8 具有最強效之作用。LJ-3 及 LJ-8 對 thromboxane 生合成具劑量性抑制作用，且其在 $10^{-6} M$ 濃度仍有明顯作用。

多酚類化合物對血小板微粒體中 thromboxane 生合成之作用

爲了研究多酚類化合物直接抑制 thromboxane 生合成之酵素活性，以血小板微粒體爲酵素來源。結果如圖三所示。LJ-8 由 10^{-6} M 到 10^{-4} M 濃度能明顯抑制血小板微粒體中 thromboxane 之生合成。而 LJ-3 由 10^{-6} M 到 10^{-4} M 濃度沒有任何明顯作用。LJ-7，LJ-2 及 LJ-9 則沒有明顯作用，它們只有在 10^{-4} M 濃度才有作用。

多酚類化合物對過氧化氫導致之內皮細胞損傷之保護作用

爲了研究多酚類化合物對過氧化氫導致之內皮細胞損傷之保護作用，在過氧化氫處理培養過程中有試驗化合物之存在。當細胞培養在過氧化氫中六個小時，可以觀察到約 45 % 的細胞損傷。在所試驗的十個多酚類化合物中，LJ-2，LJ-3，LJ-4 及 LJ-10 對內皮細胞損傷顯現出明顯的保護作用（表三），這種保護作用具劑量抑制性。

討論

本研究中，分離自金銀花 methyl caffeate(LJ-3),3,4-di-O-caffeoylquinic acid (LJ-7),methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid(LJ-8),rutin(LJ-9)，對 ADP 導致之血小板凝集有劑量性抑制作用（表一）。在富含血小板的人類血漿中，由 ADP 導致之凝集有二個波，因 ADP 所產生的凝集第二波已被認定與 thromboxane 之形成有關。所有多酚類化合物能抑制 ADP 導致之血小板凝集第二波的有效試驗如圖二所示。此結果令人想到 methyl caffeate,3,4-di-O-caffeoylquinic acid,methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic acid,及 rutin 也許可以防止血小板中 thromboxane 形成。接下來所研究的是在含有 2mM 鈣離子之緩衝液中多酚類化合物對由 calcium ionophore A23187 導致 thromboxane 生合成之作用。methyl caffeate (LJ-3) 和 methyl-3,4-di-O-caffeoylquinic acid(LJ-8) 對 calcium ionophore 刺激之 thromboxane 生合成具最強效的抑制，而 protocatechuic

acid(LJ-2),3,4-di-O-caffeoylquinic acid(LJ-7),rutin(LJ-9)則較無效用(表二)。將多酚類化合物對由 calcium ionophore A23187 導致 thromboxane 生合成之抑制作用效果與對由 ADP 導致之血小板凝集抑制作用相比較。因此 thromboxane 生合成的抑制性能解釋多酚類化合物在富含血小板之人類血漿中對 ADP 導致第二波凝集具有有效的抑制作用。

在血小板中, thromboxane 經由分布在細胞微粒體中之 PGH₂ 合成酵素及 thromboxane 合成酵素等 thromboxane 生合成酵素是由花生烯酸所形成。爲了研究在血小板 thromboxane 生合成中此抑制作用是由於直接抑制 thromboxane 生合成酵素的活性, 便研究在血小板微粒體中的 thromboxane 生合成。methyl 3,4-di-O-caffeoylquinic(LJ-8) 在 thromboxane 生合成酵素活性上具劑量抑制性。此酵素活性的抑制作用與 calcium ionophore 導致 thromboxane 形成之抑制作用幾成比例關係。然而 methyl caffeate(LJ-3) 在抑制 thromboxane 生合成酵素活性上並無任何明顯作用(圖三)。因此, 對 calcium ionophore 導致之 thromboxane 生合成抑制作用並未如預期般的抑制在 thromboxane 生合成酵素。也許是被血小板中細胞外鈣離子灌流所影響。未來研究將朝此方向發展。

以前曾證實了包括過氧化氫之活性氧能造成細胞毒素對內皮細胞的損傷(12)。由於氧化性損傷在粥動脈硬化上扮演某一角色, 培養中的內皮細胞暴露在過氧化氫之下能使用在研究其抑制血管內皮細胞中之氧化性損傷。在已研究的多酚類化合物試驗中, protocatechuic acid(LJ-4) 及 luteolin(LJ-10) 對過氧化氫所導致的細胞損傷具明顯的抑制性。細胞防護作用之藥理學上之機轉尚未被研究: 也許是由於一個抗氧化性的作用。在 catechins 之生物學上之作用之研究, 曾報告過一種抗氧化性之作用, 用過氧化油如 kimura 等來培育實驗用之大白鼠。報告了 chlorogenic acid 抑制 serum triglyceride, lipid peroxides, total cholesterol, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvate transaminase 跟肝脂質過氧化物一樣。

總括而言, 血小板活性及細胞防護的抑制作用對過氧化氫導致之細胞損傷也許可以解釋分離自金銀花之多酚類化合物在維持血管均衡上所扮演的可能性角色。