文章编号:1000-5404(2006)21-2157-03

论著

新哒嗪酮类化合物抑制血小板聚集的研究

刘毅敏[1],章 军[1],王祥智[1],赵先英[1],成晓玲[2] (第三军医大学:[1]基础医学部化学教研室,[2]西南医院输血科,重庆 400038)

提 要:目的 观察不同浓度的6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)哒嗪酮类化合物对二磷酸腺苷(ADP)诱导血小板聚集的抑制作用。**方法** 将不同浓度的6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)哒嗪酮类化合物分别加入人富含血小板血浆(PRP)中,用多功能血小板聚集仪测定ADP诱导的血小板聚集作用。**结果** 该新哒嗪酮类化合物对ADP诱导血小板聚集有剂量依赖性抑制作用,其半数抑制浓度IC_{50}(μmol/L)分别为1.04、2.80、3.01、7.32。**结论** 6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)哒嗪酮类化合物具有较强的抑制ADP诱导的血小板聚集作用。

关键词:哒嗪酮;血小板聚集;二磷酸腺苷
中图法分类号:R331.143;R973.2 **文献标识码**:A

Study of new pyridazinones on inhibiting platelet aggregation

LIU Yi-min[1], QIN Jun[1], WANG Xiang-zhi[1], ZHAO Xian-ying[1], CHENG Xiao-ling[2] ([1]Department of Chemistry, College of Medicine, [2]Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the 6-(4-substituted benzamido phenyl) pyridazinones (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μmol/L) on ADP-induced platelet aggregation. **Methods** After 6-(4-substituted benzamido phenyl) pyridazinones at different concentration was added into the human platelet rich plasma (PRP), the ADP-induced platelet aggregation was measured by multifunctional platelet aggregation meter. **Results** The new 6-(4-substituted phenyl) pyridazinones could inhibit the ADP-induced platelet aggregation *in vitro* in a dose-dependent manner. The values of IC_{50} were 1.04, 2.80, 3.01 and 7.32 μmol/L respectively. **Conclusion** 6-(4-substituted benzamido phenyl) pyridazinones have potent activities against platelet aggregation induced by ADP *in vitro*.

Key words: pyridazinone; platelet aggregation; adenosine diphosphate

严重威胁人类生命健康的心脑血管疾病多数与血栓形成和血栓栓塞有着密切的联系,而血小板聚集在血栓形成中起着先导而关键的作用。二氢哒嗪酮类化合物在心脑血管系统疾病的治疗中有着广泛的药理作用,一些化合物不但具有强心[1,2]、降血压作用,而且还具有很强的血小板聚集抑制作用[3,4],对二磷酸腺苷(ADP)、花生四烯酸(AA)、血小板活化因子(PAF)和胶原(collagen)引起的血小板聚集均有抑制作用。目前深入从构效关系来研究二氢哒嗪酮类化合物的还不多。为进一步探讨二氢哒嗪酮类化合物的构效关系,以期寻找药理活性更强的血小板聚集抑制剂,本研究以6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)哒嗪酮类化合物对ADP诱导的人血小板聚集的抑制作用进行了研究。

作者简介:刘毅敏(1956-),女,重庆市人,硕士,副教授,主要从事医学分析化学方面的研究。电话:(023)68752216,E-mail:LYM@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-11-28;修回日期:2006-05-24

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

1.1.1 6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)哒嗪酮类化合物Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ(第三军医大学化学教研室提供),其化学名分别为6-[4-(苯甲氧基甲酰氨基)苯基]-5-甲基-4,5二氢-3(2H)哒嗪酮、6-[4-(4-苯甲酰氧苯)苯甲酰氨基苯基]-5-甲基-4,5二氢-3(2H)哒嗪酮、6-[4-(3-硝基-2-羧基)苯甲酰氨基苯基]-5-甲基-4,5二氢-3(2H)哒嗪酮、6-[4-(2-羧基)苯甲酰氨基苯基]-5-甲基-4,5二氢-3(2H)哒嗪酮;二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP,美国,Trinity biotech company);阿司匹林(ASP,华阴市锦前程化工有限公司);二甲亚砜(DMSO,成都科龙化工试剂厂)。

1.1.2 研究对象 健康成人20例无偿献血者,男女不限,年龄(34±6)岁,采血前2周未服用过阿司匹林等抗血小板聚集药物。

1.1.3 仪器 TYXN-96多功能智能血液凝聚仪(上海通用机电技术研究所);离心机(J2-MC Centrifuge, Beckman);血小板计数仪(希生美康F820,日本东亚株式会社)。

1.2 方法

1.2.1 制备富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP) 由

健康志愿者按常规肘静脉取血，用3.8%枸橼酸钠1:9(体积分数)抗凝混匀，于PVC离心管中，以1 000 r/min、20 ℃离心10 min，取上层淡黄色液体即PRP，剩余部分以5 000 r/min、20 ℃离心12 min，取上层清液为贫血小板血浆(PPP)，以PPP液调PRP液使PRP液的血小板数为$(1.5\sim2.0)\times10^8$/ml，备用。

1.2.2 血小板聚集测定 参考Born[5]比浊法测定血小板聚集性。血小板聚集仪于实验前预热15 min，按仪器操作方法用200 μl PPP调仪器。于比色杯中加入200 μl PRP和1 μl药物溶剂DMSO混匀，37 ℃温育5 min，搅拌30 s后，分别加入不同剂量的诱导剂ADP，记录5 min内血小板聚集曲线，观察5 min内最大聚集率，从而确定诱导剂的阈剂量。药物实验时，于比色杯中加入200 μl PRP，分别加入1 μl不同浓度的药物溶液，阳性药物对照为ASP，溶媒空白对照为DMSO溶液，37 ℃温育5 min，搅拌0.5 min后，加入终浓度为4.0 μmol/L的ADP，记录5 min血小板聚集曲线，观察5min内的聚集率和最大聚集率。所有样本的血小板聚集测定均在3 h内完成。

1.2.3 数据处理 血小板聚集抑制率(aggregative inhibition rate，AIR)按下式计算。用回归法计算抑制50%血小板聚集的相应药物浓度(IC_{50})，并以此比较不同药物对诱导剂ADP产生血小板聚集作用的大小。

$$聚集抑制率(\%)=\frac{空白对照聚集率-药物聚集率}{空白对照聚集率}\times100\%$$

1.3 统计学处理

结果数据以$\bar{x}\pm s$表示，使用SPSS软件，组间的显著性差异用t检验。

2 结果

2.1 化合物Ⅰ对ADP诱导人体外血小板聚集的影响

化合物Ⅰ可较强抑制ADP诱导的血小板聚集，而且呈剂量依赖性，随着药物浓度提高，对血小板聚集的抑制作用增强。其最大抑制率为83.7%，IC_{50}为1.04 μmol/L。与空白对照组比较，有显著性差异($P<0.01$)，结果见表1。

表1 化合物Ⅰ对ADP诱导的人血小板聚集的影响($n=6$)

组别	浓度(μmol/L)	5 min聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大聚集率(%$\bar{x}\pm s$)	最大抑制率(%)
空白组	—	61.6±7.6	63.8±7.3	—
化合物Ⅰ	0.5	38.8±7.0[a]	41.2±8.6[a]	35.4
	1.0	29.6±7.6[a]	31.4±8.9[a]	50.8
	2.0	22.7±6.6[a]	24.3±9.8[a]	61.9
	4.0	13.5±4.8[a]	15.8±6.9[a]	75.2
	8.0	9.1±4.2[a]	10.4±3.7[a]	83.7
阿司匹林	4.0	29.1±5.3[a]	32.6±6.0[a]	48.9

a：$P<0.01$，与空白组比较

2.2 化合物Ⅱ对ADP诱导人体外血小板聚集的影响

化合物Ⅱ可较强抑制ADP诱导的血小板聚集，而且呈剂量依赖性，随着药物浓度提高，对血小板聚集的抑制作用增强。其最大抑制率为74.9%，IC_{50}为2.80 μmol/L。与空白对照组比较，有显著性差异($P<0.01$)，结果见表2。

2.3 化合物Ⅲ对ADP诱导人体外血小板聚集的影响

化合物Ⅲ可较强抑制ADP诱导的血小板聚集，而且呈剂量依赖性，随着药物浓度提高，对血小板聚集的抑制作用增强。其最大抑制率为68.5%，IC_{50}为3.01 μmol/L。与空白对照组比较，有显著性差异($P<0.01$)，结果见表3。

表2 化合物Ⅱ对ADP诱导的人血小板聚集的影响($n=6$)

组别	浓度(μmol/L)	5 min聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大抑制率(%)
空白组	—	61.6±7.6	63.8±7.3	—
化合物Ⅱ	1.0	42.7±6.6[a]	44.8±7.1[a]	29.8
	2.0	34.2±7.9[a]	37.0±8.1[a]	42.0
	4.0	25.5±6.2[a]	28.6±8.6[a]	55.2
	6.0	18.9±6.0[a]	22.4±7.3[a]	64.9
	8.0	13.4±5.5[a]	16.0±5.7[a]	74.9
阿司匹林	4.0	29.1±5.3[a]	32.6±6.0[a]	48.9

a：$P<0.01$，与空白组比较

表3 化合物Ⅲ对ADP诱导的人血小板聚集的影响($n=6$)

组别	浓度(μmol/L)	5 min聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大抑制率(%)
空白组	—	63.3±8.8	67.9±6.6	—
化合物Ⅲ	1.0	44.2±5.8[a]	47.4±7.3[a]	30.2
	2.0	37.5±6.6[a]	39.7±5.5[a]	41.5
	4.0	28.6±6.1[a]	30.8±6.3[a]	54.6
	6.0	22.6±4.5[a]	24.8±4.8[a]	63.5
	8.0	18.1±6.3[a]	21.4±7.3[a]	68.5
阿司匹林	4.0	29.1±5.3[a]	32.6±6.0[a]	52.0

a：$P<0.01$，与空白组比较

2.4 化合物Ⅳ对ADP诱导人体外血小板聚集的影响

化合物Ⅳ可较强抑制ADP诱导的血小板聚集，而且呈剂量依赖性，随着药物浓度提高，对血小板聚集的抑制作用增强。其最大抑制率为53.0%，IC_{50}为7.32 μmol/L。与空白对照组比较，有显著性差异($P<0.05$)，结果见表4。

表4 化合物Ⅳ对ADP诱导的人血小板聚集的影响($n=6$)

组别	浓度(μmol/L)	5 min聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大聚集率(%，$\bar{x}\pm s$)	最大抑制率(%)
空白组	—	63.3±8.8	67.9±6.6	—
化合物Ⅳ	1.0	53.7±6.5[b]	56.4±8.1[b]	16.9
	2.0	48.9±7.0[a]	51.7±6.9[a]	23.8
	4.0	40.3±7.5[a]	43.2±7.5[a]	36.4
	6.0	36.4±7.2[a]	39.3±5.1[a]	42.1
	8.0	29.4±7.5[a]	31.9±8.5[a]	53.0
阿司匹林	4.0	29.1±5.3[a]	32.6±6.0[a]	52.0

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与空白组比较

3 讨论

ADP是诱导人体内血小板聚集的主要因素之一，提高环磷酸腺苷(adenosine cyclic monophosphate，cAMP)水平能有效地抑制ADP诱导的血小板聚集[6]。据研究二氢哒嗪酮类化合物抑制血小板聚集作用机制是能选择性的抑制心肌磷酸二酯酶Ⅲ(phosphodiesterase，PED)，从而抑制cAMP的水解，提高细胞内cAMP水平。二氢哒嗪酮类化合物与cAMP在化学结构和电性效应方面有一定的相似性，可与cAMP竞争PEDⅢ

的活性部位，抑制 cAMP 水解，从而提高细胞内 cAMP 水平，降低细胞内 ADP 浓度，抑制血小板聚集。

近年来国内外对二氢哒嗪酮类化合物作为心脑血管系统疾病药物的研究比较活跃，一些二氢哒嗪酮类化合物具有较强的抑制血小板聚集作用。为进一步探讨二氢哒嗪酮类化合物的构效关系，以期寻找药理活性更强的血小板聚集抑制剂，本研究试验的 6-(4-取代苯甲酰氨基苯基)二氢哒嗪酮类化合物是借助 CPK 分子模型及 ACD/ChemSketch 软件，计算了已报道的 100 多个具有药理活性的二氢哒嗪酮类化合物的结构参数，从分子的整体尺寸(长、宽)、以及平面性去探讨结构与活性的关系，基于对分子参数的认识，设计并合成的 4 个满足活性分子参数要求的新的目标化合物。这 4 个二氢哒嗪酮类化合物在 5 - 位上引入亲脂基团，6-位上连接芳香基，并通过共轭形成一定的区域性平面结构。体外药理试验结果表明，这 4 个二氢哒嗪酮类化合物均可明显抑制 ADP 诱导的人血小板聚集，并呈剂量依赖性，其中化合物 Ⅰ 对血小板聚集抑制作用最强，其 IC_{50} 为 1.04μmol/L。本结果可为研究二氢哒嗪酮类化合物的构效关系、开发防治心脑血管系统疾病的药物提供依据。

参考文献：

[1] BRISTOL J A, SIRCAR I, MOOS W H, *et al*. Cardiotonic agents. 1. 4,5-Dihydro-6-[4-(1H-imidazol-1-yl) phenyl]-3(2H)-pyridazinones: novel positive inotropic agents for the treatment of congestive heart failure[J]. J Med Chem, 1984, 27(9): 1099 - 1101.

[2] 朱　进，李连冬，王雅坤，等. 4,5-二氢-3(2H)-哒嗪酮衍生物的合成及抑制血小板聚集作用[J]. 中国药物化学杂志，2004，14(1)：23 - 26.

[3] 任海洋，吴秋业，宋炳生. 6-(4-取代乙酰氨基苯基)-4,5-二氢-3(2H)-哒嗪酮类化合物的合成及其对血小板聚集的抑制作用[J]. 华西药学杂志，2004，19(1)：19 - 21.

[4] 马　兵，阚启民，王　进，等. 哒嗪酮类新化合物 9612 的抗血小板聚集作用[J]. 沈阳药科大学学报，2000，17(6)：441 - 443.

[5] BORN G V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal[J]. Nature, 1962, 194(4832): 927 - 929.

[6] MOCHIZUKI N, UCHIDA S, MIYATA H. Cardiovascular effects of NSP-804 and NSP-805, novel cardiotonic agents with vasodilator properties[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1993, 21(6): 983 - 995.

(编辑　龙　亮)

(上接 2156 页)

表 1　Survivin 与喉鳞癌临床病理特征的关系

临床特征		例数	+	-	χ^2	P
分化程度	中、高分化	30	20	10	2.156	0.142
	低分化	13	7	6		
淋巴结转移	有	28	21	7	7.516	0.006
	无	15	6	9		
临床病理分期	Ⅰ + Ⅱ期	16	8	8	6.630	0.010
	Ⅲ + Ⅳ期	27	19	8		

2.3　Survivin 在喉鳞癌原发灶及其对应淋巴结转移灶中的表达

转移淋巴结中 survivin 蛋白阳性表达率(81.3%，13/16)显著高于相应喉鳞癌原发灶中 survivin 蛋白阳性表达率(69.0%)，差异有统计学意义($\chi^2 = 6.356$，$P < 0.05$)。

3　讨论

随着人们对细胞凋亡认识的逐步加深，新的观点认为肿瘤的发生发展亦是细胞凋亡的结果。Survivin 基因是一个新近发现的凋亡抑制基因[1]，具有强大的凋亡抑制功能，其异常表达与多种人类肿瘤的发生发展及预后密切相关[2]。

本研究显示，癌旁组织中不表达，survivin 在喉鳞癌组织中的阳性表达率为 62.8%，喉鳞癌中 survivin 表达率显著高于癌旁组织，提示 survivin 基因的表达发生在喉鳞癌恶性转化的早期，表明 survivin 基因与喉鳞癌的发生有关。Survivin 基因在喉鳞癌组织中的表达可能抑制了异常突变的细胞的凋亡，从而扰乱了细胞生长和凋亡途径，促使细胞逃离生长监控，导致肿瘤的发生。对 survivin 蛋白的检测可作为早期喉鳞癌的辅助诊断。Suga 等[3]对大肠组织从增生到癌变不同时期标本的 survivin 表达情况进行了研究，所得到的结论基本相似。

本研究证实，淋巴结转移组 survivin 蛋白阳性表达率显著高于无淋巴转移组；根据临床病理分期，Ⅰ + Ⅱ期组与Ⅲ + Ⅳ组期之间 survivin 蛋白阳性表达率差异有统计学意义；随临床分期增加及淋巴结的转移，survivin 蛋白阳性表达率逐渐升高。同时，本研究还表明，survivin 蛋白在喉鳞癌原发灶中阳性表达率显著低于转移灶中阳性表达率。提示 survivin 基因不但参与原位肿瘤形成过程的调节，促进其发展，可能还参与癌细胞转移过程的调节，在转移过程中发挥作用。Sarela 等[4]认为，在恶性肿瘤中，脱落的癌细胞因为 survivin 对凋亡的抑制而受到了保护，得以继续存活并分裂增殖，进而形成肿瘤邻近或远离部位的转移，从而引起预后不良。

Survivin 的异常表达与喉鳞癌的发生、发展密切相关，其在喉鳞癌中的高表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及临床病理分期密切相关，可能是影响喉鳞癌预后的重要分子指标。

关键词：喉肿瘤；Survivin；免疫组织化学
中图法分类号：R739.65　　文献标识码：B

参考文献：

[1] AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997, 3(8): 917 - 921.

[2] SALZ W, EISENBERG D, PLESCIA J, *et al*. A survivin gene signature predicts aggressive tumor behavior[J]. Cancer Res, 2005, 65(9): 3531 - 3534.

[3] SUGA K, YAMAMOTO T, YAMADA Y, *et al*. Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas[J]. Oncol Rep, 2005, 13(5): 891 - 897.

[4] SARELA A I, MACADAM R C, FARMERY S M, *et al*. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma[J]. Gut, 2000, 46(5): 645 - 650.

(编辑　陈聪连)