牡丹皮有效组分重组方对家兔血小板聚集及凝血功能的影响

郭齐[1a]，李连达[2]，郝伟[2]，赵乐[2]，齐向辉[1b*](1.江苏大学，a.基础医学与医学技术学院药理系，b.食品与生物工程学院，江苏 镇江 212013；2.中国中医科学院西苑医院，北京 100091)

摘要：目的 研究牡丹皮有效成分丹皮酚和芍药苷重组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响。**方法** 采用比浊法以及凝血时间的检测方法对各项指标进行测定。**结果** 丹皮酚和芍药苷配伍的高(丹皮酚 50 mg·kg^{-1}+芍药苷 12.5 mg·kg^{-1})、中(丹皮酚 25 mg·kg^{-1} + 芍药苷 6.25 mg·kg^{-1})、低(丹皮酚 12.5 mg·kg^{-1}+芍药苷 3.125 mg·kg^{-1})剂量组均能显著抑制胶原、二磷酸腺苷、花生四烯酸诱导的家兔血小板聚集；丹芍配伍高、中剂量组能明显延长血浆凝血酶时间及全凝血时间。**结论** 牡丹皮有效成分丹皮酚和芍药苷重组方对家兔血小板聚集和凝血功能均有改善作用，为其临床应用提供了理论依据。

关键词：牡丹皮；丹皮酚；芍药苷；血小板聚集

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2010)11-0967-04

Effects of Recombination of Effective Constituent of Cortex Moutan on Platelet Aggregation and Blood Coagulation in Rabbits

GUO Qi[1a], LI Lianda[2], HAO Wei[2], ZHAO Le[2], QI Xianghui[1b*](*1.Jiangsu University, a.School of Medical Science and Laboratory Medicine, b.School of Food and Biological Engineering, Zhenjiang 212013, China; 2.Xiyuan Hospital, Beijing 100091, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of effective constituent of Cortex Moutan on platelet aggregation and blood coagulation in rabbits. **METHODS** Each index was measured by turbidimetric method and blood coagulation time. **RESULTS** High-dosage, middle-dosage and low-dosage of the administration of paeonol and paeoniflorin(paeonol 50 mg·kg^{-1}+paeoniflorin 12.5 mg·kg^{-1}, paeonol 25 mg·kg^{-1}+paeoniflorin 6.25 mg·kg^{-1}, paeonol 12.5 mg·kg^{-1}+paeoniflorin 3.125 mg·kg^{-1}), can significantly depress blood coagulation in rabbits derived by the collogen, adenosine diphosphate, arachidonic acid. High-dosage and middle-dosage of the administration of paeonol and paeoniflorin prominently prolong the plasma thrombin time and clotting time. **CONCLUSION** Effective constituent paeonol and paeoniflorin of Cortex Moutan can improve the platelet aggregation and blood coagulation in rabbits, provide the theory for clinical application.

KEY WORDS: Cortex Moutan; paeonol; paeoniflorin; platelet aggregation

牡丹皮(Cortex Moutan)为毛茛科多年生落叶小灌木植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr.的干燥根皮，始载于《神农本草经》，列为中品。牡丹皮的研究始见于 1887 年，但直到 20 世纪 50 年代，牡丹皮的研究在化学和药理方面才有较大进展，特别是 50 年代以后，研究逐步深入，分离出大量的化合物，并且进行了药效学、代谢及毒理学研究，为牡丹皮的临床药效和安全用药提供了有力的依据[1]。丹皮酚(paeonol)和芍药苷(paeoniflorin)是牡丹皮中主要的药效成分，药理活性广泛，尤其在心血管疾病的治疗方面，二者均显示出良好的临床疗效。本室曾对牡丹皮进行心血管方面的药理研究。本研究在前期工作的基础上，观察丹皮酚和芍药苷配伍对家兔血小板聚集及凝血功能的影响，期望为二者

作者简介：郭齐，女，博士，讲师　Tel: 13921596598　E-mail: guoqi608@126.com　*通信作者：齐向辉，男，副教授　Tel: 13952892912　E-mail: qxh@ujs.edu.cn

配伍的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康大耳白兔 48 只，♂，体重 1.8~2.4 kg[北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证编号：SCXK(京)2007−0001]。

1.2 主要仪器

DT-2000 型电子天平(美国双杰兄弟有限公司)。BS634 型血小板聚集仪(北京生化仪器厂)。RS-20III 型低速冷冻离心机(日本 TOMY SEIKO COLTD)。400C 型血凝仪(美国 Fisher 公司)。

1.3 实验药物与试剂

丹皮酚(常州神马药业有限公司，含量：98.9%，批号：20070424)；芍药苷(常州神马药业有限公司，含量：98.9%，批号：20070523)；牡丹皮(北京同仁堂药店崇文门分店，批号：20090426)。阿司匹林肠溶片(北京曙光药业有限公司，25 mg·片$^{-1}$，批号：080511)。二磷酸腺苷(ADP)二钠盐(中国中科院上海生物化学研究所)，用生理盐水配制成 1.0 mmol·L^{-1} 的溶液，冷冻保存备用。花生四烯酸(AA，Fluka AG)，用 1.0 mmol·L^{-1} NaOH 配成钠盐，浓度为 5.0 g·L^{-1}，冷冻保存备用。胶原(KOKEN 公司) 100 μg·mL^{-1}。凝血酶时间(thrombin time，TT)测定试剂盒(批号：121042)、凝血酶原时间(prothrombin time，PT)测定试剂盒(批号：105105)、活化部分凝血酶原时间(activated partial thromboplastin time，APTT)测定试剂盒(批号：111026)、纤维蛋白原(fibrinogen，FIB)测定试剂盒(批号：1320171)均为上海太阳生物技术有限公司生产。

1.4 对家兔血小板聚集的影响

实验分组：空白对照组(生理盐水)、阿司匹林组(25 mg·kg^{-1})、牡丹皮汤剂组(含生药 616 mg·kg^{-1})、丹皮酚与芍药苷配伍高剂量组(丹皮酚 50 mg·kg^{-1}＋芍药苷 12.5 mg·kg^{-1})，即丹芍 A 组；丹皮酚与芍药苷配伍中剂量组(丹皮酚 25 mg·kg^{-1}＋芍药苷 6.25 mg·kg^{-1})，即丹芍 B 组；丹皮酚与芍药苷配伍低剂量组(丹皮酚 12.5 mg·kg^{-1}＋芍药苷 3.125 mg·kg^{-1})，即丹芍 C 组。上述各组均配成溶液灌胃给药，体积为 3 mL·kg^{-1}，对照组给予等体积生理盐水。各组动物连续给药 7 d，1 次·d^{-1}，末次给药 30 min 后，耳中动脉取血 5 mL，给予 9 倍血量的 3.8%枸橼酸钠抗凝；1 300 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清部分即富血小板血浆(PRP)，剩余部分 3 000 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清部分即贫血小板血浆(PPP)。按照 Born 氏比浊法[2]，将盛有 200 μL PRP 及一小磁棒的比浊管置于血小板聚集仪中，37 ℃保温 1 min，经 PRP 标定后，在搅拌情况下分别加入 3 种诱导剂(胶原、ADP、AA)诱导聚集，反应时间分别为 6，5，5 min，测定胶原(4.8 mg·L^{-1})、ADP(47.6 μmol·L^{-1})和 AA(782.0 μmol·L^{-1})诱导的血小板聚集率。依据聚集曲线及最大聚集率分析药物对血小板聚集的影响。血小板聚集抑制率计算公式如下：

$$\text{血小板聚集抑制率}=\frac{\text{聚集后PRP透光度}-\text{聚集前PRP透光度}}{\text{PPP透光度}-\text{聚集前PRP透光度}}\times 100\%$$

1.5 对家兔血浆 TT，PT，APTT，FIB 的影响

按“1.4”项下分组及给药。末次给药 30 min 后，耳中动脉取血 2 mL，给予 9 倍血量的 3.8%枸橼酸钠抗凝，2 500 r·min^{-1} 离心 10 min，取上清部分，按试剂盒说明测定 TT，PT，APTT 和 FIB。

1.6 对家兔全凝血时间的影响

按“1.4”项下分组及给药。末次给药 30 min 后，割破家兔耳缘静脉，擦干第 1 滴血，再取自然流出的血液 2 大滴，分开滴于一清洁玻片上(直径 4~5 mm)，自血液滴在玻片上开始计时，每隔 30 s 用 1 mL 注射器针头通过血滴并挑血液 1 次，如见针尖挑起纤维蛋白丝，停止计时，记录时间。挑动另一滴未挑过的血液作为对照，并以前一滴血作为结果报告[3]。

1.7 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 Levene's test 检验数据的方差齐性，方差齐则采用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)法进行多组间比较，若多组间比较有统计学差异，则采用 LSD 检验进行组间两两比较。方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验。$P<0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 以胶原为诱导剂对家兔血小板聚集率的影响

阿司匹林组、丹皮汤剂组以及丹芍配伍高、中、低剂量组均能明显降低胶原诱导的血小板聚集率，其抑制作用与空白对照组相比均具有统计学差异($P<0.01$)，且丹芍配伍高剂量组对血小板聚集的抑制作用明显强于丹皮汤剂组，二者相比具有统计学差异($P<0.01$)，中、低剂量组抑制血小板聚集的作用略强于丹皮汤剂组，但无统计学差异。见表 1。

表 1 牡丹皮有效组分重组方对胶原诱导家兔血小板聚集率的影响(n=8, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of recombination of effective constituent of Cortex Moutan on platelet aggregation produced by collogen in rabbits(n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	药前血小板聚集率/%	药后血小板聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
空白对照组	54.17±3.21	55.11±2.35	−1.96±3.34
阿司匹林组	54.36±3.46	20.03±6.08[1)]	63.54±8.59[1)]
丹皮汤剂组	55.92±3.44	41.53±3.92[1)]	25.77±4.55[1)]
丹芍 A 组	55.56±2.65	30.48±7.02[1)2)]	45.33±12.01[1)2)]
丹芍 B 组	55.65±5.30	39.26±3.50[1)]	29.22±5.69[1)]
丹芍 C 组	54.54±4.10	39.21±3.08[1)]	28.12±3.01[1)]

注：与空白对照组比较，[1)]P<0.01；与丹皮汤剂组比较，[2)]P<0.01

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with Cortex Moutan medicinal broth group, [2)]P<0.01

2.2 以 ADP 二钠盐为诱导剂对家兔血小板聚集率的影响

阿司匹林组、丹皮汤剂组以及丹芍配伍高、中、低剂量组均能明显降低 ADP 二钠盐诱导的血小板聚集率，其抑制作用与空白对照组相比均具有统计学差异(P<0.01)，且丹芍配伍高剂量组对血小板聚集的抑制作用明显强于丹皮汤剂组，二者相比具有统计学差异(P<0.01)，中、低剂量组抑制血小板聚集的作用与丹皮汤剂组相比无统计学差异。见表 2。

表 2 牡丹皮有效组分重组复方对 ADP 诱导家兔血小板聚集率的影响(n=8, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of recombination of effective constituent of Cortex Moutan on platelet aggregation produced by ADP in rabbits(n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	药前血小板聚集率/%	药后血小板聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
空白对照组	57.99±4.84	60.34±5.25	−4.17±5.93
阿司匹林组	58.86±3.73	20.63±5.70[1)]	65.17±8.11[1)]
丹皮汤剂组	58.91±3.77	40.23±3.17[1)]	31.22±9.52[1)]
丹芍 A 组	58.88±2.95	30.98±3.79[1)2)]	47.51±4.63[1)2)]
丹芍 B 组	58.31±4.12	30.88±3.95[1)]	33.32±4.71[1)]
丹芍 C 组	58.77±4.11	40.19±3.64[1)]	31.65±3.18[1)]

注：与空白对照组比较，[1)]P<0.01；与丹皮汤剂组比较，[2)]P<0.01

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with Cortex Moutan medicinal broth group, [2)]P<0.01

2.3 以 AA 为诱导剂对家兔血小板聚集率的影响

阿司匹林组、丹皮汤剂组以及丹芍配伍高、中、低剂量组均能明显降低 AA 诱导的血小板聚集率，其抑制作用与空白对照组相比均具有统计学差异(P<0.01)，且丹芍配伍高剂量组对血小板聚集的抑制作用明显强于丹皮汤剂组，二者相比具有统计学差异(P<0.01)，中、低剂量组抑制血小板聚集的作用与丹皮汤剂组相比无统计学差异。见表 3。

表 3 牡丹皮有效组分重组复方对 AA 诱导家兔血小板聚集率的影响(n=8, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of recombination of effective constituent of Cortex Moutan on platelet aggregation produced by AA in rabbits(n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	药前血小板聚集率/%	药后血小板聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
空白对照组	61.13±6.47	59.96±5.16	−1.96±3.34
阿司匹林组	60.68±7.23	25.44±5.50[1)]	63.54±8.59[1)]
丹皮汤剂组	61.84±6.95	41.55±3.42[1)]	25.77±4.55[1)]
丹芍 A 组	61.46±5.43	30.63±3.19[1)2)]	45.33±12.01[1)2)]
丹芍 B 组	60.53±5.21	38.16±3.08[1)]	29.22±5.69[1)]
丹芍 C 组	60.01±4.10	39.17±3.39[1)]	28.12±3.01[1)]

注：与空白对照组比较，[1)]P<0.01；与丹皮汤剂组比较，[2)]P<0.01

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with Cortex Moutan medicinal broth group, [2)]P<0.01

2.4 对家兔血浆 TT，PT，APTT，FIB 及全凝血时间的影响

与空白对照组相比，各药物组对家兔血浆 PT，APTT，FIB 均无统计学差异(P>0.05)，丹芍配伍高剂量组能明显延长血浆 TT 及全凝血时间，具有统计学差异(P<0.01)，丹芍配伍中剂量组同样具有统计学差异(P<0.05)。与丹皮汤剂组相比，丹芍配伍高剂量组在延长血浆 TT 方面也具有统计学差异(P<0.05)。见表 4。

3 讨论

血小板具有黏附、聚集和释放等功能，这与血小板具有止血和凝血作用有关，其在生理状态下至关重要。血小板在正常血液循环中处于静息状态。当血管内皮损伤或是血液在某些病理生理刺激因子的作用下，血小板发生黏附、聚集和释放等活化反应。正常的血小板活化是体内生理性止血的必需步骤，而病理性血小板活化与血栓性疾病相关。研究显示，患有栓塞性心脑系统疾病(如冠心病、心绞痛、心肌梗死)的诸多患者，其体循环中的血小板对 ADP、AA 诱导的聚集性显著增高[4]。因此，抑制血小板聚集的异常发生，对于血栓栓塞性心脑血管疾病的预防和治疗具有积极的意义。本研究显示，牡丹皮有效成分丹皮酚和芍药

表 4 牡丹皮有效组分重组复方对家兔血浆 TT，PT，APTT，FIB 及全凝血时间的影响(n=8，$\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effect of recombination of effective constituent of Cortex Moutan on plasm TT, PT, APTT, FIB in rabbits and clotting time(n=8，$\bar{x}\pm s$)

组别	TT/s	PT/s	APTT/s	FIB/g·L^{-1}	全凝血时间/s
空白对照组	14.58±0.68	6.56±0.40	21.68±1.40	18.37±1.78	384.38±33.81
阿司匹林组	15.28±0.91	6.54±0.51	22.33±1.96	16.39±1.76	451.63±51.28$^{2)}$
丹皮汤剂组	15.06±0.83	6.44±0.68	21.93±1.71	17.90±2.16	406.5±43.00
丹芍 A 组	16.09±0.71$^{2)3)}$	6.63±0.57	23.70±1.93	16.51±2.17	480.75±54.95$^{2)}$
丹芍 B 组	15.60±1.25$^{1)}$	6.55±0.41	21.38±2.12	17.65±1.94	431.88±41.09$^{1)}$
丹芍 C 组	15.38±1.07	6.45±0.42	21.48±1.95	17.97±2.21	404.25±48.21

注：与空白对照组比较，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01；与丹皮汤剂组比较，$^{3)}P$<0.05

Note: Compared with control group,$^{1)}P$<0.05,$^{2)}P$<0.01; compared with cortex moutan medicinal broth group,$^{3)}P$<0.01

苷配伍的高、中、低剂量组均能显著抑制胶原、ADP 二钠盐、AA 诱导的家兔血小板聚集(P<0.01)，且丹芍配伍高剂量组抑制血小板聚集的作用与丹皮汤剂组相比具有统计学差异(P<0.01)，提示丹皮酚和芍药苷配伍具有良好的抗血小板聚集作用。

冠状动脉或外周动脉血栓形成是各种疾病发生或死亡的主要原因[5]。虽然，血小板在动脉血栓形成开始阶段发挥重要作用，但是，血栓形成是凝血酶原以及溶血系统共同作用的结果[6]。近年来研究已证实，冠心病血瘀证存在着高凝血和低纤溶状态[7]，处于高凝状态的机体易于形成血栓[8]。目前国际上对抗凝药物普遍认同的检测指标为 TT，APTT 和 PT。凝血酶是作用于凝血过程中的一种蛋白，与游离的纤维蛋白原相结合从而将其演变为不可溶的纤维蛋白。凝血酶用于检测纤维蛋白原失调或血纤维蛋白过少等症状的诊断。TT 延长多为血浆纤维蛋白原减低或结构异常。PT 主要反映外源性凝血是否正常。APTT 凝血时间是指离体血液与异物表面接触到血液自然凝固所需要的时间。APTT 延长通常是由于Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ因子的缺乏，它是反映内源凝血系统整个凝血过程的筛选试验[9]。全血凝血时间涉及多种凝血因子，反映内源性凝血[3]。本研究发现，牡丹皮有效成分丹皮酚和芍药苷配伍的高、中剂量组均能延长家兔血浆 TT 和全凝血时间，具有统计学差异(P<0.05 或 P<0.01)，表明二者配伍具有一定的抗凝作用。

血小板聚集、血栓形成是心肌梗死、缺血性卒中、深静脉血栓等许多疾病的基本病理过程，近几十年来发病率逐渐升高，严重地危害着人类的健康。本实验显示出丹皮酚和芍药苷配伍抑制血小板聚集以及对凝血功能的优势作用，为研制开发新的防治心脑血管疾病的药物奠定理论基础。

REFERENCES

[1] WANG Z J, TANG L Y, HAO Y, et al. Chemical composition and pharmacological of Cortex Moutan [J]. World Notes Plant Med (国外医药 植物药分册), 2006, 21(4): 155-159.

[2] XU S, BIAN R L, CHEN X. Technology of Pharmacology Research (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People Health Publishing House, 2001: 1281-1282.

[3] XU Q C, JIAO J D, SUN H L, et al. Effect of lumbrukinase on the thrombosi and related hematology index in experimental animals [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2005, 36(9): 1367-1369.

[4] ZHANG Y Y, SUN W J, ZHANG Y F, et al. Effects of 4-chloro-7-hydroxy flavone derivatives on platelet aggregation in rabbit [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2000, 16(1): 230-231.

[5] ZHANG B, FENG Y, JIN L J, et al. Changes of platelet activation after percutaneous coronary intervention in diabetic patients [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2000, 16(9): 838-839.

[6] LOCKYER S, KAMBAYASHI J. Demonstration of flow and platelet dependency in a ferric chloride-induced model of thrombosis [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 33(5): 718-725.

[7] LI J, YUAN Z K. Stasis syndrome in coronary heart disease [J]. Chin J Integr Med Cardio/Cerebrovasc Dis (中西医结合心脑血管病杂志), 2006, 4(7): 613-615.

[8] LI QW, QIU J, MA J, et al. The change of clotting mechanism in patients with coronary heart disease and its clinical significance [J]. Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis (中华老年心脑血管病杂志), 2008, 10(4): 257-259.

[9] CHEN S P, HAN Y L, GUO W, et al. Study on the antithrombotic effect of fibrinolytic proteins from Scolopendra subspinipes mutilans [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2007, 23(8): 1088-1092.

收稿日期：2009-09-01