

丹参、三七的有效部位对正常大鼠血小板粘聚性及 TXA₂、PGI₂ 的影响

杨 佳¹, 张 毅¹, 秦彩玲¹, 孙有富¹, 谭洪根¹, 张淑运¹, 武桂兰¹, 刘 婷¹, 张伯礼²

(1 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700; 2 天津中医药大学, 天津 300193)

摘要: 观察了丹参、三七提取部位丹酚酸 B (Rb、Re、Rg) 对正常大鼠血浆血小板粘聚性及 TXA₂、PGI₂ 的影响。结果表明: 灌胃给药, 部位 Re 68mg/kg、Rg 108mg/kg 对 ADP 诱导正常大鼠血浆血小板聚集的作用显现出明显抑制作用; 部位 Rg 108mg/kg、丹酚酸 B 48mg/kg 可以明显抑制正常大鼠血浆血小板粘附性; 部位 Rb 112mg/kg 对血小板粘聚性均无明显影响; 部位丹酚酸 B 48mg/kg、Rg 108mg/kg 明显降低血浆 TXB₂ 的水平, 对 6-Keto-PGF_{1α} 均无明显影响; 部位 Rg 108mg/kg 亦明显降低 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的比值。提示: 推测丹参、三七有效部位丹酚酸 B、Rg 抑制正常大鼠血浆血小板粘聚性的作用机理可能与抑制 TXA₂ 的合成有关。

关键词: 丹酚酸 B; Rb; Re; Rg; 血小板聚集性; 血小板粘附性

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)05-0021-04

Effects of Active Fractions of Danshen or Sanqi on Platelet Adhesion, Aggregation and TXA₂, PGI₂ in Normal Rats

YANG Jia¹, ZHANG Yi¹, QIN Cai-ling¹, SUI You-fu¹, TAN Hong-gen¹, ZHANG Shu-yun¹,
WU Gui-lan¹, LIU Ting¹, ZHANG Bo-li²

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700, China; 2 Tianjing University of Traditional Chinese Medicine, Tianjing, 300193, China)

Abstract: We studied the effects of salvianolic acid B (Sal. B), Rb, Re and Rg fractions of Danshen or Sanqi on platelet aggregation and adhesion, TXA₂ and PGI₂ in normal rats. The results demonstrated that Re fraction (68mg/kg) and Rg fraction (108mg/kg), given orally, could markedly counteract ADP induced platelet aggregation. Rg fraction (108mg/kg) and Sal. B fraction (48mg/kg) could markedly inhibit platelet adhesion. Rb fraction (112mg/kg) have no effects on platelet aggregation and on adhesion. Rg fraction (108mg/kg) and Sal. B fraction (48mg/kg) could markedly decrease the level of TXA₂, but had little effect on 6-Keto-PGF_{1α}. Moreover, Rg fraction 108mg/kg could decrease the ration of TXB₂/6-Keto-PGF_{1α}, too. The results suggested that the inhibition effects on platelet aggregation and adhesion of Rg fraction (108mg/kg) and Sal. B fraction (48mg/kg) of Danshen or Sanqi might be closely related to its inhibition effect on the release of TXA₂ in normal rats.

Key words: salvianolic acid B (Sal. B); Rb; Re; Rg; platelet adhesion; platelet aggregation; TXB₂; 6-Keto-PGF_{1α}

中药复方具有多组分、多靶点、多途径整合的作用特点, 追踪其作用物质基础, 进一步分析作用机制, 是研究中药组方原理和配伍理论及研制新一代高效中药复方的重要思路之一。复方丹参方为药典收载的研制方, 主要由丹参、三七、冰片三味药组成, 三药配伍: 活血化瘀, 理气止痛, 芳香开窍。经多年

临床验证, 其疗效显著, 副作用小, 临床主要用于冠心病、胸闷、心绞痛。冠心病、心绞痛、动脉粥样硬化、血栓的形成过程中由于血管内皮破损、血流改变或受到化学物质刺激时, 血小板激活发生一系列相关联的变化即形态改变、粘附、聚集和释放。血小板活化诱导剂有多种, 包括: 血浆的蛋白酶, 如凝血酶; 血管壁的产物, 如: PGI₂; 血小板的产物 ADP、5-HT、TXA₂; 从多种细胞衍生的和来自血管的分子, 如 ADP、PAF。其中膜磷脂代谢物 TXA₂、PGI₂ 在影响血

小板功能上有重要作用, 临床研究表明冠状动脉痉挛、心绞痛、动脉粥样硬化等血栓性疾病与血浆 TXA₂、PGI₂ 的平衡失调有关。本实验室曾报道复方丹参方全方对正常家兔血小板粘聚性有明显抑制作用, 可以明显升高正常家兔血浆中 PGI₂ 的水平^[1]。经文献调研, 丹参、三七提取部位丹酚酸 B、Rb、Re、Rg 对血小板功能影响的研究, 多为体外实验(或静脉给药、十二指肠给药), 与中药传统口服方式不符。为了追踪有效部位, 本次实验采用半体内实验法, 经灌胃给药, 观察了复方丹参方中丹参、三七提取部位丹酚酸 B、Rb、Re、Rg 对正常大鼠血浆血小板粘聚性及 TXA₂、PGI₂ 的影响。

1 实验材料

1.1 药品及试剂 丹参(*Salviae Miltionhiza* Bge. 陕西商洛) 中提取部位丹酚酸 B, 纯度 75%, 得率 0.4%; 三七(*Panax notogiseng* (Burk.) F. H. Chen 云南文山) 中提取部位 Rb(三七皂甙 B₁、B₂、B₃), 得率 3% Re(三七皂甙 Re Rd), 得率 1.8% Rg(三七皂甙 Rg₁ Rg₂ Rg₃), 得率 2.8%, 由中国中医研究院中药研究所化学室提供; 阿司匹林肠溶片: 北京市燕京制药厂; 5'-腺苷二磷酸二钠盐: 上海丽珠东风有限公司产品; TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 放免药盒: 解放军总医院科技开发中心放免所。

1.2 动物 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 190~240g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2002-0003。

1.3 仪器 PA-3210 Aggrecoader, 日本京都第一科学株式会社生产; XSN-R II 型体外血栓形成及血小板粘附两用仪, 无锡县电子仪器二厂生产; 索福 ST21 台式高速冷冻离心机(美国); 光学显微镜, BH-2 OLYMPUS 日本制造; GC-911V 一放射免疫计数器, 中国科学技术大学科技实业总公司。

2 实验方法与结果

SD 大鼠, 按体重随机分为 6 组, 对照组、阿斯匹

林 100mg/kg 组、提取部位丹酚酸 B 48mg/kg、Rb 112mg/kg Re 68 mg/kg Rg 108 mg/kg 组, 每组 10 只。
①灌胃给药 3d, 每天一次, 对照组给等容量的蒸馏水, 最后一天给药 1h 后, 腹主动脉取血, 3.8% 枸橼酸钠溶液(9:1)抗凝, 800r/min 离心 10min, 制备富血小板血浆(PRP), 再 3000r/min 离心 15min, 制备贫血小板血浆(PPP), 以 ADP 诱导血小板聚集, 比浊法进行血小板聚集实验; ②灌胃给药 5d, 每天一次, 对照组给等容量的蒸馏水, 最后一天给药后 1h, 摘眼球取血, 2% EDTA-Na₂ 溶液(9:1)抗凝, 取 0.3mL 血于 5mL 玻璃球中, 置于血小板粘附仪上, 以 3.4r/min 旋转 15min, 在光学显微镜下数出粘附前、后血浆中血小板数; ③灌胃给药 5d, 每天一次, 对照组给等容量的蒸馏水, 最后一天给药后 1h, 摘眼球取血, 用消炎痛 EDTA-Na₂ 溶液(9:1)抗凝取血, 4℃ 3500r/min 离心 15min, 吸取血浆-20℃冰箱保存, 以放射免疫法测定血浆 TXB₂ 和 6-Keto-PGF_{1α} 的含量。

以各大鼠血小板最大聚集百分率计算血小板聚集抑制率:

血小板聚集抑制率% = $\frac{\text{对照组血小板聚集率}\% - \text{给药组血小板聚集率}\%}{\text{对照组血小板聚集率}\%} \times 100\%$

以大鼠血浆粘附前后血小板数, 计算血小板粘附率, 及血小板粘附抑制率:

血小板粘附率% = $\frac{\text{粘附前血小板数} - \text{粘附后血小板数}}{\text{粘附前血小板数}} \times 100\%$

血小板粘附抑制率% = $\frac{\text{对照组血小板粘附率}\% - \text{给药组血小板粘附率}\%}{\text{对照组血小板粘附率}\%} \times 100\%$

以组间比较 t 检验方法进行统计学处理, 结果见表 1。

以¹²⁵I-TXB₂ 和¹²⁵I-6-Keto-PGF_{1α} 的放免测定值, 计算 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 比值, 对各测定值及比值分别组间 t 检验进行统计处理, 结果见表 2。

表 1 丹参、三七提取部位对正常大鼠血浆血小板粘聚性的影响($\bar{x} \pm s$, n=10, %)

组别	剂量(mg/kg)	聚集率	聚集抑制率	粘附率	粘附抑制率
对照组		50.41 ± 7.40	—	21.81 ± 5.07	—
阿司匹林	100	35.26 ± 12.99 ¹⁾	30.05	15.61 ± 3.67 ²⁾	28.43
丹酚酸 B	48	42.64 ± 13.05	15.41	14.96 ± 5.95 ¹⁾	39.94
Rb	112	34.54 ± 17.92	31.48	17.19 ± 6.33	21.18
Re	68	36.61 ± 7.78 ²⁾	27.38	16.88 ± 7.44	22.60
Rg	108	26.77 ± 11.74 ²⁾	46.90	12.73 ± 7.98 ²⁾	41.63

注: 与对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.01

从表 1 结果可见:阿司匹林 100mg/kg 能明显对抗 ADP 诱导正常大鼠血浆血小板聚集性 ($P < 0.05$),明显降低血小板粘附性 ($P < 0.01$),部位丹酚酸 B 48mg/kg 可以明显抑制正常大鼠血浆血小板粘附性 ($P < 0.05$),部位 Re 68mg/kg 对 ADP 诱导正常

大鼠血浆血小板聚集性显现出明显抑制作用 ($P < 0.01$),部位 Rg 108mg/kg 既能明显对抗 ADP 诱导正常大鼠血浆血小板聚集性又能明显降低血小板粘附性 ($P < 0.01$,部位 Rb12mg/kg 对血小板粘聚性均无明显影响。

表 2 丹参、三七提取部位对正常大鼠血浆 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α}及 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α}的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	pg/mL		TXB ₂ /6-Keto-PGF _{1α}
		TXB ₂	6-Keto-PGF _{1α}	
对照组		4762.98 ± 1241.27	488.11 ± 372.61	12.23 ± 4.28
阿司匹林	100	341.41 ± 405.15 ³⁾	66.55 ± 18.54 ²⁾	3.28 ± 1.59 ³⁾
丹酚酸 B	48	3447.30 ± 1026.76 ¹⁾	342.89 ± 75.92	10.96 ± 3.42
Rb	112	3952.73 ± 1363.63	438.89 ± 175.59	9.36 ± 2.62
Re	68	4204.10 ± 1409.39	377.49 ± 110.77	11.24 ± 2.26
Rg	108	3153.23 ± 701.67 ²⁾	408.43 ± 135.26	8.04 ± 1.69 ²⁾

从表 2 可见:阿司匹林 100mg/kg 明显降低正常大鼠血浆 TXB₂ 的水平 ($P < 0.001$),明显降低血浆中 6-Keto-PGF_{1α} 的水平 ($P < 0.01$),亦明显降低 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的比值 ($P < 0.001$);部位丹酚酸 B 48mg/kg 明显降低血浆 TXB₂ 的水平 ($P < 0.05$);部位 Rg 108mg/kg 明显降低血浆 TXB₂ 的水平 ($P < 0.01$),对 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的比值亦明显降低 ($P < 0.01$)。这四种提取部位对血浆中的 6-Keto-PGF_{1α} 均无明显影响。

3 小结与讨论

丹参主要有效成分为水溶性成分酚酸类,其中丹酚酸 B 含量最高^[2];三七中活血主要有效成分为三七皂甙,其中主要含有 Rg Rb Re^[3]。在本实验中选取丹参、三七中主要的提取部位丹酚酸 B、Rb、Re、Rg 通过灌胃给药研究对正常大鼠血小板聚集性的影响。实验表明有效部位丹酚酸 B 48mg/kg 可以明显抑制正常大鼠血浆血小板粘附性,部位 Re 68mg/kg 对 ADP 诱导正常大鼠血浆血小板聚集的作用显现出明显抑制作用、部位 Rg 108mg/kg 既能明显对抗 ADP 诱导正常大鼠血浆血小板聚集性又能明显降低血小板粘附性,部位 Rb12mg/kg 对血小板粘聚性均无明显影响,阿司匹林 100mg/kg 既能明显对抗 ADP 诱导正常大鼠血浆血小板聚集性,又明显降低血小板粘附性。此实验结果初步为复方丹参方抑制血小板粘聚性作用的物质基础提供了一定的依据。部位丹酚酸 B 48mg/kg 明显降低血浆 TXB₂ 的水平;部位 Rg 108mg/kg 明显降低血浆 TXB₂ 的水平,亦明显降低 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的比值;这四种提取部位

对血浆中的 6-Keto-PGF_{1α} 均无明显影响。

目前认为, TXA₂ 是血小板释放的目前已发现的强的缩血管、诱导血小板聚集物质之一, PGI₂ 是血管壁内皮细胞释放的迄今所知最强的血管扩张剂和血小板聚集抑制剂^[4],它们之间的活性保持平衡是维持机体正常生理作用的关键。临床研究表明冠心病,心绞痛,动脉粥样硬化等疾病与血浆 TXA₂、PGI₂ 的平衡失调有关。阿司匹林是一种环氧化酶抑制剂,有报道其对血小板环氧化酶较血管壁环氧化酶敏感^[5]。认为小剂量阿司匹林抑制血小板的环氧化酶,使 TXA₂ 生成减少,不影响 PGI₂;大剂量阿司匹林也可抑制血管内皮细胞的环氧化酶,也可使 PGI₂ 的生成减少。本实验所用阿司匹林在 100mg/kg 剂量下对血浆中 TXA₂、PGI₂ 水平均有明显降低作用,对 TXA₂/PGI₂ 的比值亦有明显降低作用,推测在该剂量下阿司匹林可能对血小板和血管壁的环氧化酶均有作用。

对丹参提取部位丹酚酸 B、三七提取部位 Rb、Re、Rg 对 TXA₂-PGI₂ 系统影响的研究已有许多报道。本实验采用灌胃给药,提取部位丹酚酸 B 8mg/kg 显著降低血浆 TXB₂ 的水平 ($P < 0.05$),血浆 6-Keto-PGF_{1α} 的水平也下降,但没有显著性差异;部位 Rg 明显降低血浆 TXB₂ 的水平 ($P < 0.01$),明显降低 TXA₂/PGI₂ 的比值 ($P < 0.01$),血浆 6-Keto-PGF_{1α} 的水平也有下降,但没有显著差异。

总之,经本实验研究可以初步表明部位丹酚酸 B、Re、Rg 分别对 ADP 诱导的正常大鼠血浆血小板聚集性、粘附性表现出不同程度的抑制作用,初步为

证实复方丹参方对血小板粘聚性的抑制作用的有效部位提供了一定的实验依据。进一步对机理研究,实验结果表明部位丹酚酸 B 其抑制血浆血小板粘聚性的作用与 $\text{TXA}_2\text{-PGI}_2$ 系统有关,作用靶点推测在 TXA_2 。关于有效部位对于在病理状态下的血小板功能的影响,以及对其作用机理方面有待于更深入研究探索。

参考文献:

- [1] 秦彩玲,刘婷,张毅,等. 复方丹参方对正常家兔血浆血小板粘聚性及 $\text{TXA}_2\text{-PGI}_2$ 的影响[J]. 中国实验方

剂学杂志, 2002, 8(3): 18-19.

- [2] 李静,何丽一,宋万志. 丹参中水溶性酚酸类成分的薄层扫描法测定[J]. 药学学报, 1993, 28(7): 543-547.
- [3] 杨崇仁,周俊,田中治. 人参属植物的化学分类和资源利用[J]. 云南植物研究, 1988, 增刊 I: 47-62.
- [4] 张均田. 现代药理实验方法. 下册[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1143.
- [5] Burch JW, Lewis Baenziger N, Stanford N, et al. Sensitivity of fatty acid cyclooxygenase from human aorta to acetylation by aspirin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75: 5181.