

基于活血生物效价检测大黄中 10 个蒽醌类成分抗血小板聚集作用初步研究

谭 鹏^{1,2}, 张海珠³, 李 洋⁴, 张定堃⁴, 伍珊娜², 王伽伯², 肖小河², 牛 明^{2*}

1. 成都市食品药品检验研究院, 四川 成都 610045

2. 解放军第三〇二医院 全军中药研究所, 北京 100039

3. 大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000

4. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 运用生物效价测定方法评价大黄 *Rhei Radix et Rhizoma* 中 10 个蒽醌衍生物拮抗血小板聚集作用的强弱差异, 筛选可用于酒大黄饮片质量管控的指标性成分。方法 采用血小板聚集仪测定体外二磷酸腺苷 (ADP) 诱导的血小板聚集率, 计算 10 个蒽醌衍生物 (芦荟大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚) 不同浓度下的血小板聚集抑制率, 采用质反应生物效价软件计算生物效价; 采用分子对接软件计算得到大黄酸、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷与 P2Y₁₂ 蛋白受体在最佳结合时的估计抑制常数 (K_i), 以此验证生物效价测定结果的准确性。结果 活血效价测定结果显示, 大黄酸、大黄素的活血效价显著高于芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的活血效价; 大黄酸、大黄素的活血效价分别是阿司匹林活血效价的 5.02、5.15 倍, 表明大黄酸、大黄素拮抗 ADP 诱导的血小板聚集作用较强。芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的活血效价与阿司匹林的活血效价相当。芦荟大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O- β -D-葡萄糖苷的活血效价分别是阿司匹林活血效价的 4.13、4.46、9.31、5.46、7.80 倍, 表明 5 个结合型蒽醌糖苷拮抗 ADP 诱导的血小板聚集作用较强。分子对接结果显示, 大黄酸、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷对 P2Y₁₂ 蛋白有较高的亲和力, 二者的 K_i 分别为 5.73、2.51 μ mol/L, 表明大黄酸、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷在较低的浓度水平即可对 P2Y₁₂ 蛋白受体产生作用, 且大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷的活性强于大黄酸的活性, 这与实际测得二者的抗血小板聚集作用强度相符合。结论 大黄药材中 10 个蒽醌衍生物活血生物效价存在较大差异, 筛选得到大黄酸、大黄素可作为酒大黄炮制过程品质评价的监控指标。

关键词: 活血生物效价; 大黄; 蒽醌衍生物; 分子对接; 大黄酸; 大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)04-0859-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.017

Preliminary study on antiplatelet aggregation of 10 anthraquinones in *Rhei Radix et Rhizoma* based on bioassayTAN Peng^{1,2}, ZHANG Hai-zhu³, LI Yang⁴, ZHANG Ding-kun⁴, WU Shan-na², WANG Jia-bo², XIAO Xiao-he², NIU Ming²

1. Chengdu Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China

2. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

3. Department of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China

4. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To evaluate the ability of the antiplatelet aggregation of ten anthraquinone derivatives in *Rhei Radix et Rhizoma* by using bioassay method, and to screen for the indicators that can be used to control the quality of rhubarb wine processing product.

Methods Platelet aggregation instrument was used to determine the platelet aggregation rate induced by ADP *in vitro* and calculate the antiplatelet aggregation rates of 10 anthraquinone derivatives (aloe-emodin, rhein, emodin, chrysophanol, physcion, aloe-emodin-8-O- β -D-glucoside, rhein-8-O- β -D-glucoside, emodin-8-O- β -D-glucoside, chrysophanol-8-O- β -D-glucoside, and physcion-8-O- β -D-glucoside) at different concentrations. The biopotency was calculated by bioavailability software. In order to verify

收稿日期: 2017-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目资助(81403126); 国家科技基础性工作专项(2015FY111500-080); 成都市科技局项目(2016-HM01-00312-SF); 成都中医药大学重点实验室开放基金(2016302)

作者简介: 谭 鹏(1987—), 男, 中药学博士, 主要从事中药材质量标准研究。Tel: (010)66933323 E-mail: 2013tanpeng@sina.com

*通信作者 牛 明, 助理工程师, 主要从事中药品质评价和军事本草研究。Tel: (010)66933325 E-mail: nmbright@163.com

the accuracy of the bioassay results, the estimated inhibition constant of rhein and chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside in P2Y₁₂ protein receptor were determined by molecular docking software. **Results** The bioassay results showed that the antiplatelet potencies of rhein and emodin were significantly higher than those of aloe-emodin, chrysophanol and physcion. Compared with the antiplatelet biopotency of aspirin, the antiplatelet potencies of rhein and emodin were 5.02 and 5.15 times higher than that of aspirin, which indicated that rhein and emodin have strong inhibitory effect on ADP-induced platelet aggregation. However, the antiplatelet potencies of aloe-emodin, chrysophanol and physcion were equivalent of that of aspirin. The antiplatelet potencies of aloe-emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside, rhein-8-*O*- β -*D*-glucoside, emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside, chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside, and physcion-8-*O*- β -*D*-glucoside were higher 4.13, 4.46, 9.31, 5.46, and 7.80 times than that of aspirin, respectively, which indicated that the five anthraquinone glucosides had a strong ability to antagonize ADP-induced platelet aggregation. The results of molecular docking showed that P2Y₁₂ protein had different selectivity to 10 anthraquinone derivatives, especially for rhein, chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside, and the estimated K_i value were 5.73 and 2.51 μ mol/L, respectively, indicating that rhein, chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside produced a strong inhibitory effect on P2Y₁₂ protein at a lower concentration level. Moreover, the activity of chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside was stronger than rhein, which was consistent with their measured intensity of antiplatelet aggregation. **Conclusion** All results showed that there were some differences among antiplatelet potencies of 10 anthraquinone derivatives, and finally the screening of rhein, emodin can be used as evaluation indicators to control the quality of rhubarb wine processing product.

Key words: antiplatelet biopotency; *Rhei Radix et Rhizoma*; anthraquinone derivatives; molecular docking; rhein; chrysophanol-8-*O*- β -*D*-glucoside

大黄 *Rhei Radix et Rhizoma* 在我国具有悠久的药用历史^[1],《神农本草经》曰:“主下瘀血,血闭,寒热,破症瘕积聚,留饮,宿食,荡涤肠胃,推陈致新,通利水杀,调中化食,安和五脏,生山谷”^[2]。可见古人早已认识到大黄除了具有泻下通便作用之外,还具有较强的活血化瘀作用。尤其是利用黄酒炮制而成的酒大黄,由于活血化瘀效果显著,临床应用较多^[3]。然而作为大黄的重要功效之一,目前有关大黄活血化瘀的文献报道相对较少^[4-7],大黄中发挥活血化瘀功效的药效物质基础尚未完全阐释清楚,不同化学成分发挥的活血化瘀作用强弱差异也未见有文献报道。受困于此,目前对于不同来源的大黄药材活血化瘀功效强弱的评价、酒大黄的炮制工艺评价、酒大黄饮片的质量标准修订等尚未找到一个合理、有效的评价指标。

蒽醌衍生物是大黄药材中一类重要的化学成分,包括芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷等^[8],具有抗菌^[9-10]、抗炎^[11-12]、抗凝^[13]、抑制癌细胞^[14-16]等药理作用。基于课题组前期研究基础^[17],本研究重点探究大黄中 10 个具有代表性的蒽醌衍生物:芦荟大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄酸-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄酚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的活血效价强弱差异,并试图从化学结构差异的角度初步分析活血效价存在差异的原因,以期初步探明大黄活血化瘀的药效物质基础,为不同来源的大黄药材、酒大黄饮片的品质评

控(以活血化瘀功效为导向)提供一些实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Aggram 血小板聚集分析仪,美国 Helena 公司,配有镭射光学系统,检测波长 650 nm,四检测通道,硼硅玻璃比色管(7.67 mm×60 mm);L-550 台式低温高速离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;2.7 mL 一次性真空采血管(含有 0.109 mol/L 枸橼酸钠),美国 BD 公司;采血针(批号 150809),天津哈娜好医材有限公司;XS-205 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;移液枪,德国 Eppendorf 公司;超声仪(500 W, 40 kHz),南京新辰生物科技有限公司;Milli-Q 超纯水制备系统,美国 Millipore 公司。

1.2 药品与试剂

阿司匹林(批号 MKBT1587V,质量分数 98.1%)购买于 Sigma 公司;腺苷二磷酸(ADP,批号 2-15-551189,每瓶标示规格为冻干粉 200 μ mol)购买于美国 Helena Laboratories 公司;芦荟大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 141225,质量分数 98.61%)、大黄酸-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 141211,质量分数 98.35%)、大黄酚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 141220,质量分数 98.42%)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 141209,质量分数 98.45%)、大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(批号 131012,质量分数 98.41%)、芦荟大黄素(批号 13081602,质量分数 98.30%)、大黄酸(批号 14082403,质量分数 99.21%)、大黄素(批号 150522,质量分数 98.01%)、大黄酚(批号 14092204,质量分数 98.58%)、大黄

素甲醚(批号 140820, 质量分数 99.27%)对照品购买于成都普菲德生物科技有限公司; ACS 级二甲基亚砷(DMSO), 美国 Fisher 公司。

1.3 动物

SD 雄性大鼠, SPF 级, 体质量 240~260 g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK-(军) 2012-0004。

2 方法

2.1 葱醌单体活血效价的测定

2.1.1 贫血小板血浆(PPP)和富血小板血浆(PRP)的制备 选取体质量为 240~260 g 的 SD 雄性大鼠, 先用含有苯巴比妥钠(60 mg/kg)的生理盐水 ip 麻醉, 再用 2.7 mL 真空采血管从腹主动脉取血, 立即置于离心机内, 800 r/min、18 °C 模式下离心 15 min, 小心吸取上清液置于洁净的 5 mL EP 管内; 剩余血液重复操作 1 次, 小心吸取上清液置于前述 EP 管内, 得到 PRP; 剩余血液在 3 000 r/min 模式下离心 30 min, 小心吸取上清液置于另一支 5 mL EP 管内, 得到 PPP, 备用。PRP 和 PPP 需要保持在 18~25 °C 环境内, 并尽量减少扰动。

2.1.2 诱导剂的制备 取 ADP 冻干粉末, 准确加入 1.0 mL 去离子水, 轻轻振摇直至完全溶解, 作为诱导剂储备液。吸取适量储备液用生理盐水按照 1:3 的比例稀释储备液, 作为诱导剂工作液。复溶后的诱导剂储备液在 -80 °C 下可保存 3 个月; 诱导剂工作液应临用新配, 并在配制后 2 h 内使用。

2.1.3 供试品溶液的制备 准确称取各化合物对照品适量, 分别置于 5 mL 圆底 EP 管内, 用 50 μ L DMSO 溶解, 混匀, 精确吸取 20 μ L 加入到 480 μ L PPP 中, 轻轻吹打均匀, 作为供试品母液; 用空白 PPP 按照 1:8 的剂间比稀释, 作为供试品溶液。

2.1.4 血小板聚集率的测定 血小板聚集仪提前开机预热 30 min, 待预热完成后, 先用 PPP 样本 400 μ L 进行透光度调零, 每根玻璃比色管分别加入 PRP 125 μ L 和含药 PPP 100 μ L 混匀(空白组加入不含药的 PPP), 再加入一粒搅拌子, 将比色管置于预备通道内 37 °C 环境下预热 3 min, 再将玻璃比色管放入经过调零后的检测通道内, 加入 ADP 诱导剂 25 μ L, 迅速按下检测按钮进行检测, 待检测完毕后, 记录聚集波形和血小板最大聚集率。检测时限应在血液采集后 2 h 内完成, 检测室温环境应保持在 18~25 °C。

2.1.5 活血效价计算方法 活血生物效价指某一物质在一定剂量下拮抗血小板非正常聚集的生物

反应能力大小, 活血生物效价是与参照物质相比较而得到的一个相对值。生物效价检测法指在适宜条件下, 根据质反应平行线原理设计, 通过检测药物在体外对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集的抑制作用, 进而计算药物活性(效价)的方法。由于有拮抗血小板聚集的药物存在, 相对于空白组而言, 不同含药供试品溶液组的血小板最大聚集率会降低, 由此可以计算得到化合物对血小板聚集过程的最大抑制程度, 即抑制率。

抑制率 = (空白组最大聚集率 - 给药组最大聚集率) / 空白组最大聚集率

根据《药品生物检定》中简化概率单位法的原理计算活血效价^[18]。由于目前尚无用于活血生物效价测定的对照品, 实验中暂以国际公认的抗血小板聚集药物阿司匹林作为参照物质, 参考生物制品的效价设定, 阿司匹林对照品的活血效价赋值为 10 000 U/mol, 将每个化合物的 4 个测试浓度和相应的抑制率输入生物效价质反应计算软件, 计算不同化合物的生物效价和效价的可信限率(FL), 并进行可靠性检验。

2.2 生物效价测定方法学考察

2.2.1 精密度考察 取同一份芦荟大黄素供试品溶液, 按上述方法连续测定 6 次其对血小板聚集的抑制率, 计算活血效价。结果显示, 芦荟大黄素的活血效价平均值为 12 117 U·L/ μ mol, RSD 为 9.94%, 表明仪器的精密度较好。

2.2.2 重复性考察 准确称取同一批芦荟大黄素 6 份, 制成供试品溶液, 按上述方法测定, 计算活血效价。结果显示, 6 份芦荟大黄素供试品溶液的活血效价分别为 13 408、12 029、11 798、12 085、13 217、11 075 U·L/ μ mol, 平均效价值为 12 268 U·L/ μ mol, RSD 为 7.23%, 表明方法的重复性较好。

2.2.3 中间精密度考察 实验室 2 名不同实验人员在 2 个不同时间段内, 分别按上述方法重复测定 3 次, 计算芦荟大黄素供试品溶液活血效价平均值为 12 947 U·L/ μ mol, RSD 为 14.76%, 说明不同实验人员对测定结果影响较小。

2.3 大黄酸、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷与 P2Y₁₂受体的分子对接

采用 AutoDock 4.2.6 软件, 将大黄酸、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷分别与 P2Y₁₂受体进行分子对接, 计算出各自的估计抑制常数(K_i), 以此评价大黄酸、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷对 P2Y₁₂受体的亲和力大小。

2.4 统计学方法

利用 SPSS 22.0 软件的度量(可靠性)统计功能,分析不同待测成分不同测试浓度下抗血小板聚集活性测定结果的可靠性,以阿尔法值为评价指标:当阿尔法值大于 0.7 时,则可信度较好;当阿尔法值小于 0.5 时,可信度较差。

3 结果

3.1 10 个蒽醌化合物活血效价比较

3.1.1 血小板聚集率测定结果 根据上述方法分别测定含有不同浓度蒽醌衍生物的 PRP 在 ADP 诱导下的血小板聚集率,典型的含有芦荟大黄素的供试品溶液血小板聚集率波形图见图 1。

测定结果显示,大黄酸-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷在最大溶解浓度时,对 ADP 诱导的血小板聚集具有很强的拮抗效应;芦荟大黄素、大黄酸、大黄素等游离蒽醌在低浓度水平呈现出较强的拮抗血小板聚集作用。值得注意的是,芦荟大黄素、大黄酸、大黄素等游离蒽醌产生拮抗血小板聚集的起效浓度与阿司匹林拮抗血小板聚集的起效浓度(2.0 nmol/L)相当。

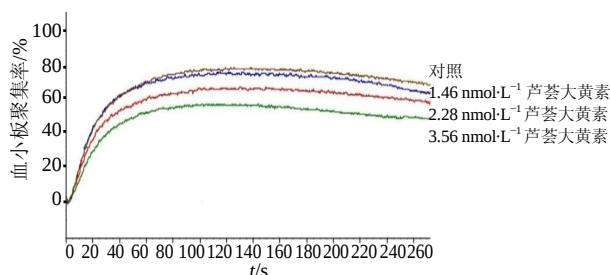


图 1 典型的含不同浓度芦荟大黄素供试品溶液抗血小板聚集波形图

Fig. 1 Typical oscillogram of antiplatelet aggregation rate with aloe-emodin in different concentrations

3.1.2 不同浓度药物对血小板聚集的抑制作用 测定 10 个蒽醌衍生物不同测试浓度时的血小板最大聚集率后,计算 10 个蒽醌衍生物在不同测试浓度时对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集的抑制率,结果见图 2。

3.1.3 各蒽醌衍生物活血生物效价的测定结果 根据上述测定法分别测得 10 个蒽醌化合物作用后的血小板最大聚集率,计算得到各蒽醌衍生物对 ADP 诱导血小板聚集的抑制率,将抑制率和测试浓

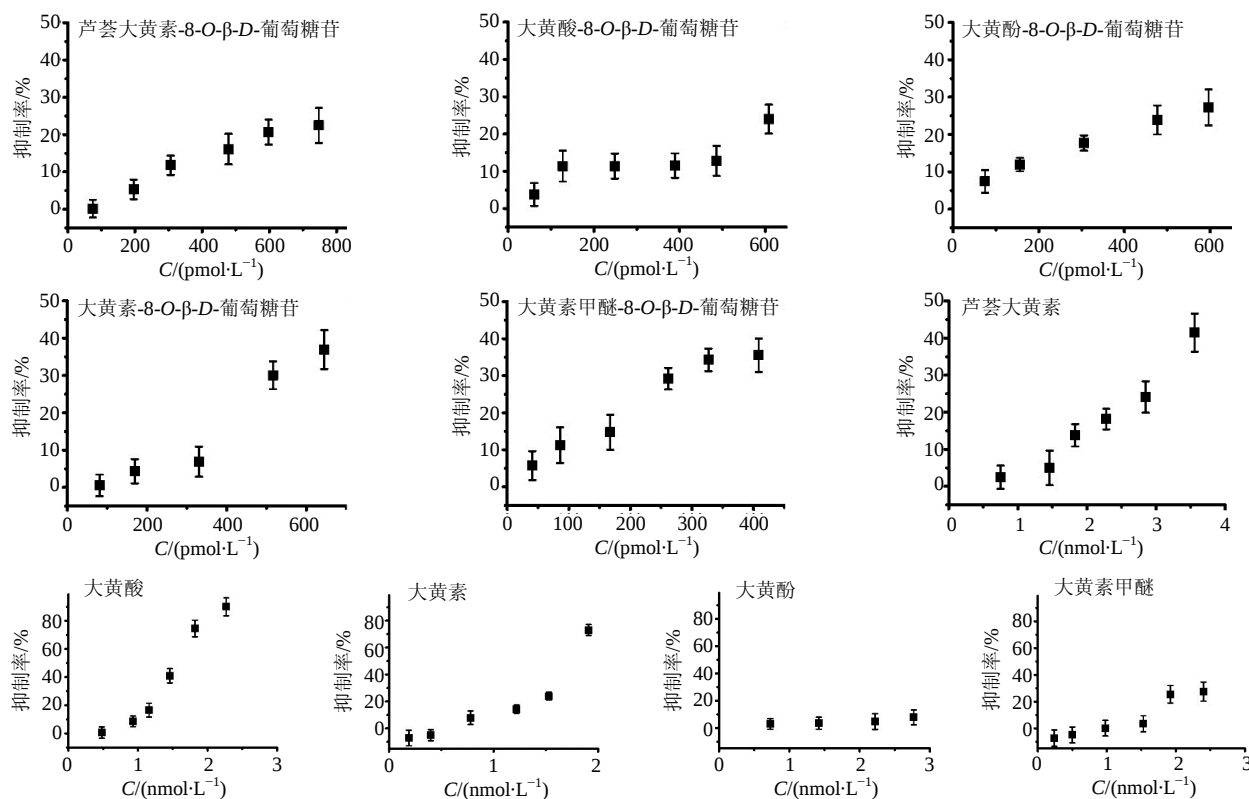


图 2 10 个蒽醌衍生物浓度与血小板聚集抑制率之间的关系

Fig. 2 Relationship between concentration of 10 anthraquinone derivatives and inhibition rate of platelet aggregation rate

度输入效价计算软件,得到各蒽醌衍生物的活血效价、决定系数(R)和 FL,结果见表 1。

表 1 10 个蒽醌衍生物活血效价测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Antiplatelet aggregation bioassay results of 10 anthraquinone derivatives ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	活血效价/ ($U \cdot L \cdot \mu mol^{-1}$)	R	FL /%
芦荟大黄素	12 117	0.672	24.11
大黄酸	50 214	0.635	13.49
大黄素	51 472	0.707	16.98
大黄酚	11 512	0.685	24.74
大黄素甲醚	16 417	0.631	19.05
芦荟大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷	41 280	0.717	14.73
大黄酸-8- O - β -D-葡萄糖苷	44 591	0.724	15.29
大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷	54 613	0.605	10.73
大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷	93 086	0.634	14.36
大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷	78 002	0.544	11.78

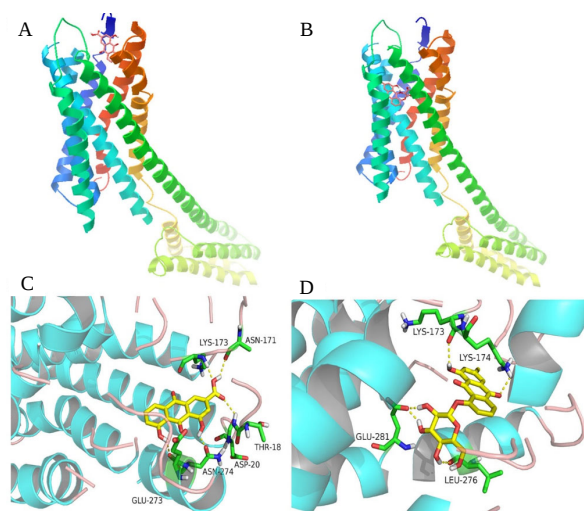
测定结果显示,大黄酸、大黄素的活血效价显著高于芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的活血效价,大黄酸、大黄素的活血效价分别是阿司匹林活血效价的 5.02 和 5.15 倍,表明大黄酸、大黄素拮抗 ADP 诱导的血小板聚集作用较强。芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的活血效价与阿司匹林的活血效价相当。值得注意的是,大黄酸的活血效价是大黄酚活血效价的 4.36 倍,表明大黄酸的活血作用显著强于大黄酚的活血作用。

测定结果显示,大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷的活血效价高于芦荟大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄酸-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄素-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8- O - β -D-葡萄糖苷的活血效价分别是阿司匹林活血效价的 4.13、4.46、5.46、9.31、7.80 倍,表明 5 个结合型蒽醌糖苷拮抗 ADP 诱导的血小板聚集作用较强。

3.2 大黄酸、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷与 P2Y₁₂ 受体分子对接结果

分子对接结果显示,大黄酸、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷对 P2Y₁₂ 受体有较高的亲和力,二者的 K_i 分别为 5.73、2.51 $\mu mol/L$,表明大黄酸、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷在较低浓度水平即可对 P2Y₁₂ 受

体产生抑制作用,且大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷的抑制能力强于大黄酸的抑制能力,这与上述实际测得二者的抗血小板聚集作用能力相符合。上述分析结果表明,通过与 P2Y₁₂ 受体结合可能是蒽醌衍生物发挥抑制血小板聚集的作用机制之一。大黄酸、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷与 P2Y₁₂ 受体结合位点侧视图见图 3。



A-P2Y₁₂-大黄酸复合物结构 B-P2Y₁₂-大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷复合物结构 C-P2Y₁₂ 蛋白与大黄酸绑定残基 D-P2Y₁₂ 蛋白与大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷绑定残基

A-cartoon representation of P2Y₁₂-rhein complex structure B-cartoon representation of P2Y₁₂-chrysophanol-8- O - β -D-glucoside complex structure C-key residues in P2Y₁₂ for rhein binding D-key residues in P2Y₁₂ for chrysophanol-8- O - β -D-glucoside binding

图 3 大黄酸、大黄酚-8- O - β -D-葡萄糖苷与 P2Y₁₂ 受体结合位点侧视图

Fig. 3 Side view comparison of ligand-binding sites of rhein and chrysophanol-8- O - β -D-glucoside in P2Y₁₂ receptor

4 讨论

血小板在血栓形成过程中发挥着关键作用,ADP 是血小板活化与聚集过程中的重要激动剂。血小板表面 ADP 受体属于嘌呤类受体,包括 P2Y₁ 和 P2Y₁₂ 受体, P2Y₁₂ 受体在数量上远远超过 P2Y₁ 受体^[19-21]。血小板致密体内含有大量 ADP,当血小板活化时释放大量 ADP,ADP 与 P2Y₁₂ 受体结合, P2Y₁₂ 受体与 Gi 蛋白耦联,抑制血小板的腺苷酸环化酶的活化,降低了血小板中环磷酸腺苷(cAMP)的水平,诱发血小板的聚集^[22]。因此 P2Y₁₂ 受体是抗血小板药物的重要靶点之一。P2Y₁₂ 受体抑制剂由于其具有很强的激活信号放大作用,不仅表现在对血小板聚集信号的放大,同时也放大随后的多步信号传导,包括血小板颗粒的释放和血小板促凝活

性的增强^[23]。该类药物与血小板的 ADP 受体特异性结合从而抑制血栓形成。目前临床上常用的抗血小板聚集药物噻氯吡啶、氯吡格雷和普拉格雷均为 P2Y₁₂ 受体拮抗剂。P2Y₁₂ 受体拮抗剂的结构类型主要有噻吩并吡啶类、腺嘌呤衍生物类、核糖基焦磷酸盐类和半胱氨酸白三烯类等^[24]。目前,已有文献报道合成了一系列蒽醌类衍生物^[25],再将其和 P2Y₁₂ 受体对接,发现其具有良好的 P2Y₁₂ 受体拮抗活性。本研究进一步验证了蒽醌衍生物能够有效阻断 ADP 诱导的血小板聚集。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄素等蒽醌衍生物具有相同的化学结构母核(1,8-二羟基蒽醌),均含有芳香平面大共轭结构,羟基分布于苯环两侧上,因而被称为大黄素型蒽醌。现有文献报道^[26-29],对蒽醌母核进行化学修饰,引入氨基、羟基、取代氨基或者阳离子成盐后其水溶性大大提高,药性增强。活血效价测定结果显示,大黄中 10 个蒽醌衍生物均表现出拮抗 ADP 诱导的血小板聚集的生物活性,但因取代基的不同或位置差异而表现出不同的活血生物活性强度。在母核中引入大极性基团(如羧基)或者形成中心对称结构(如大黄素),其拮抗血小板聚集的生物活性有所增强,效价测定结果显示大黄酸、大黄素的活血效价显著强于芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。当游离蒽醌衍生物中的 8 位羟基被葡萄糖基取代,糖苷键通过氧原子彼此连接起来,其空间构型为 β -型葡萄糖苷,它们的糖苷分别简称为 8-O- β -D-葡萄糖苷。结合型蒽醌糖苷的水溶性增大,对血小板的亲和力更强,增强了拮抗 ADP 诱导的血小板聚集的能力。活血效价测定结果显示,拮抗血小板聚集能力较弱的芦荟大黄素、大黄酚和大黄素甲醚在引入糖基形成相应的结合型蒽醌糖苷后,其活血效价分别增加至 41 280、93 086、78 002 U·L/ μ mol,相对于游离型苷元的活血效价分别增加了 3.41、8.09、4.75 倍。大黄素型蒽醌衍生物经过结构优化,有望筛选出高效低毒的抗血小板聚集药物。

活血化瘀是酒大黄的主要功效,炮制过程的有效评控对酒大黄饮片的品质至关重要。炮制不及或过之,则活血化瘀功效不佳。现有文献表明^[30],酒大黄炮制过程中结合型蒽醌糖苷逐渐转化成为游离型蒽醌,若炮制不及,则结合型蒽醌糖苷转化率不高,临床应用于活血化瘀时,蒽醌糖苷导致的致泻作用则成为副作用;若炮制太过,游离型蒽醌衍

生物受热太久而分解,反而降低活血化瘀作用强度。综上,建议可选择活血效价较强的大黄酸和大黄素(大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷具有较强的活血作用,但是课题组前期研究结果显示,其在不同基原的大黄中含量差异较大,在唐古特大黄中含量较高,在掌叶大黄中含量较低,批次之间含量差异较大,并且由于大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷的对照品目前难以获取,因此综合考虑暂时选取了大黄酸和大黄素作为监控指标)作为酒大黄炮制过程品质评价的监控指标。

参考文献

- [1] Rev G A, Stuart M D. *Chinese Materia Medica* [M]. Shanghai: American Presbyterian Mission Press, 1911.
- [2] 神农本草经 (卷四, 影印本) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1955.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 朱诗塔, 李新中, 文晓丽, 等. 大黄不同炮制品活血化瘀作用的比较研究 [J]. 药学实践杂志, 2010, 28(5): 354-355.
- [5] 隋峰, 闫美娟, 肖永庆, 等. 不同炮制法对大黄活血化瘀作用影响的比对研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 90-92.
- [6] 宋雨泽, 曾滨阳, 代春美, 等. 生物效价法测定大黄炮制品活血化瘀功效 [J]. 中成药, 2014, 36(9): 1921-1924.
- [7] 颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 等. 基于响应曲面分析法的不同配比桃仁-大黄活血化瘀效应相互作用研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3560-3567.
- [8] 毛春芳, 施忠, 罗琳, 等. HPLC 法同时测定大黄中芦荟大黄素等 11 种成分的量 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2400-2403.
- [9] Janeczko M, Małyk M, Kubiński K, et al. Emodin, a natural inhibitor of protein kinase CK2, suppresses growth, hyphal development, and biofilm formation of *Candida albicans* [J]. *Yeast*, 2017, 34(6): 253-265.
- [10] Azelmat J, Larente J F, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60(2): 342-346.
- [11] Han J W, Shim D W, Lee K H, et al. Anti-inflammatory effect of emodin via attenuation of NLRP3 inflammasome activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(4): 8102-8109.
- [12] Kim S J, Kim M C, Lee B J, et al. Anti-inflammatory activity of chrysophanol through the suppression of

- NF-kappaB/caspase-1 activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Molecules*, 2010, 15(9): 6436-6451.
- [13] Seo E J, Ngoc T M, Lee S M, *et al.* Chrysophanol-8-O-glucoside, an anthraquinone derivative in rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities [J]. *J Pharmacol Sci*, 2012, 118(2): 245-254.
- [14] Ma L S, Yang Y P, Yang H F, *et al.* Emodin suppresses the nasopharyngeal carcinoma cells by targeting the chloride channels [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.088.
- [15] Zhang L, He D, Li J Z, *et al.* Emodin targets mitochondrial cyclophilin D to induce apoptosis in HepG2 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.088.
- [16] 刘畅, 罗英花, 蒋雪园, 等. 大黄素对人肝癌 Huh7 细胞的凋亡作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(3): 367-371.
- [17] 张海珠, 谭鹏, 肖小河, 等. 基于活血生物效价和化学指纹图谱的大黄品质评价研究 [J]. *药学学报*, 2017, 52(3): 436-442.
- [18] 周海钧. 药品生物检定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [19] Zhang K, Zhang J, Zhao Q, *et al.* Structure of the human P2Y₁₂ receptor in complex with an antithrombotic drug [J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 115-118.
- [20] Zhang J, Zhang K H, Zhao Q, *et al.* Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor [J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 119-122.
- [21] Hollopeter G, Jantzen H, Vincent D, *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs [J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 202-207.
- [22] Dorsam R T, Kunapuli S P. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 340-345.
- [23] Goto S, Tamura N, Handa S, *et al.* Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y₁₂) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP Iba α induced by conditions of high shear rate [J]. *Circulation*, 2002, 105(21): 2531-2536.
- [24] 庄旭琴, 霍建丽, 孔毅, 等. 血小板 ADP 受体及其拮抗剂的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2010, 17(3): 278-282.
- [25] 董慧宇, 陈献华, 钟文英, 等. P2Y₁₂ 受体拮抗剂类抗血小板药物的研究新进展 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(12): 1406-1411.
- [26] Baqi Y, Atzler K, Müller C E, *et al.* High-affinity, non-nucleotide-derived competitive antagonists of platelet P2Y₁₂ receptors [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(12): 3784-3793.
- [27] 王振平. 新型葱醌衍生物的合成及抗癌活性研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
- [28] 伍晓春. 虎杖中主要葱醌类的提取、分离、修饰、改造及其生物活性的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2005.
- [29] Liu J B, Wu F Y, Chen C H. Design and synthesis of aloe-emodin derivatives as potent anti-tyrosinase, antibacterial and anti-inflammatory agents [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(22): 5142-5146.
- [30] 李会芳, 孙琴, 肖小河, 等. 大黄炮制后化学组分转移规律研究 [J]. *山西中医学院学报*, 2011, 12(6): 14-17.