

舒脑欣滴丸与华法林钠抗凝血相互作用研究

丰 博¹, 王金磊², 庄朋伟^{1*}, 刘 丹², 佟永领², 张艳军^{1*}

1. 天津中医药大学中药学院 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193

2. 天津中新药业集团有限公司第六制药厂, 天津 300401

摘 要: **目的** 考察舒脑欣滴丸单独或与华法林钠联合应用时抗凝血作用及对血小板聚集的影响。**方法** 采用比浊法, 体外测定对照组和舒脑欣滴丸低、高剂量(4.54、22.70 mg/mL)组的小血小板聚集率; 体内实验设对照组, 舒脑欣滴丸低、高剂量(45.36、90.72 mg/kg)组, 华法林钠(临床等效剂量 0.4 mg/kg)组, 联合给药低、高剂量(舒脑欣滴丸 45.36、90.72 mg/kg+华法林钠 0.4 mg/kg)组。大鼠 ig 给予舒脑欣滴丸及华法林钠 3 d, 腹主动脉取血, 分离血小板, 采用比浊法测定血小板聚集率; 分离血清利用半自动凝血仪测定实验各组活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT)。**结果** 与对照组比较, 舒脑欣滴丸体外具有较强的抗血小板聚集作用, 在体内抑制血小板聚集作用随剂量的增大而略有增加。并且舒脑欣滴丸可以显著延长 APTT、PT 和 TT; 与单独用药组比较, 联合给药组对血小板聚集作用影响不明显, 但可显著延长大鼠 APTT、PT 和 TT。**结论** 舒脑欣滴丸具有一定抑制血小板聚集和抗凝血作用; 与华法林钠联用能够协同增强抗凝血作用。

关键词: 舒脑欣滴丸; 华法林钠; 血小板聚集; 凝血; 联合用药

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)16-2445-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.16.018

Interaction of Shunaixin Dripping Pill and Warfarin sodium on anticoagulant applications

FENG Bo¹, WANG Jin-lei², ZHUANG Peng-wei¹, LIU Dan², TONG Yong-ling², ZHANG Yan-jun¹

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. The Sixth Chinese Drugs Factory of Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300401, China

Abstract: Objective To study the anticoagulant effect of Shunaixin Dripping Pill (SDP) alone or in combination with Warfarin sodium on platelet aggregation and provide the experimental support for the clinical safety of medication. **Methods** Experiments were carried out in control group, low-dose SDP group, high-dose SDP group (45.36 and 90.72 mg/kg), and Warfarin sodium (clinical equivalent dose 0.4 mg/kg) group, Combined administration with low-dose SDP and high-dose SDP groups + clinical equivalent dose of Warfarin sodium. We determined the platelet aggregation rate of rats in the control group, low-dose SDP group, and high-dose SDP group *in vitro* by turbidimetry. We made iac administration of SDP and Warfarin sodium for 3 d, and took abdominal aortic blood for separating the platelets and used nephelometry for determining platelet aggregation rate; We separated serum and used semi-automatic coagulation analyzer to test APTT, PT, and TT. **Results** Compared with the control group, SDP had the strong anti-platelet aggregation *in vitro* and could inhibit the increase of platelet aggregation *in vivo* slightly with the dose increasing. SDP could prolong APTT, PT, and TT; Compared with the single drug group, the combination therapy had no obvious effect on the platelet aggregation but could significantly extend the APTT, PT, and TT. **Conclusion** SDP has some inhibition on platelet aggregation with anticoagulant effect; Combined with Warfarin sodium, SDP has a synergistic interaction on anticoagulant effect with Warfarin sodium.

Key words: Shunaixin Dripping Pill; Warfarin sodium; platelet aggregation; blood coagulation; combined administration

舒脑欣滴丸由当归和川芎 2 味药材组成, 具有 欣滴丸对急性缺血性中风有治疗作用, 其机制可能理气活血、化瘀止痛的作用^[1-3]。已有文献报道舒脑 与抑制血小板活化、聚集, 干预内源性凝血途径有

收稿日期: 2014-10-17

基金项目: 天津市科技创新专项资金项目: 舒脑欣滴丸大品种系统开发 (08FDZDSH01405); 长江学者和创新团队发展计划资助 (IRT 14R41)

作者简介: 丰 博 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理。Tel: 15102210731 E-mail: 407352747@qq.com

*通信作者 张艳军 E-mail: zyjsunye@163.com

庄朋伟 E-mail: zhuangpengwei@163.com

关^[4-6]。华法林为临床常用抗凝血药^[7-11]，为考察临床上2种药物同时应用时是否会导致出血风险，本研究考察了舒脑欣滴丸与华法林联合应用对血小板聚集的影响及抗凝血作用，为保障临床安全用药提供实验基础。

1 材料

1.1 药品与主要试剂

舒脑欣滴丸（批号 672023，天津中新药业集团股份有限公司第六中药厂）；华法林钠片（批号 201003KA 齐鲁制药有限公司）；凝血酶、ADP、氯化钙、3.2%枸橼酸钠、柠檬酸、柠檬酸钠、葡萄糖、NaCl、NaHCO₃、MgCl₂、KH₂PO₄、Tris-base（Sigma）；水合氯醛（天津市瑞金特化学品公司）；活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）、凝血酶时间（TT）试剂盒（Stago）。

1.2 仪器

Molecular Device Flexstation 3 酶标仪，STAGO 半自动凝血仪。

1.3 实验动物

雄性 SD 大鼠，体质量 180~220 g，购于北京华阜康生物科技股份有限公司，许可证号 SCXK（京）2009-0015。

2 方法

2.1 对血小板聚集的影响

2.1.1 舒脑欣滴丸体外对血小板聚集的影响 取 SD 大鼠，水合氯醛麻醉，腹主动脉取血 9 mL，放入盛有 ACD（柠檬酸 73 mg、柠檬酸钠 221 mg、葡萄糖 223.3 mg，加超纯水至 10 mL）1 mL 的离心管中摇匀，2 750 r/min 离心分离纯血小板。舒脑欣滴丸用水溶解，超声 30 min，离心 10 min。实验分为对照组，舒脑欣低、高剂量（4.54、22.70 mg/mL）组；将实验各组分离的血小板用 buffer A（NaCl 761 mg、柠檬酸钠 294 mg、NaHCO₃ 75.6 mg、葡萄糖

108 mg、MgCl₂ 8.55 mg、KH₂PO₄ 11 mg、Tris-base 121.1 g，加超纯水至 100 mL）稀释成适当浓度，使吸光度值在 1 左右。在此基础上，对照组加 50 μL buffer A，给药各组加入 50 μL 舒脑欣滴丸水溶液，37 ℃孵育 30 min，加 50 μL 的激动剂（凝血酶或 ADP），测定吸光度值，计算血小板最大聚集率和聚集抑制率^[9-12]。

2.1.2 血小板体内聚集率的测定 取 36 只 SD 大鼠，随机分为 6 组，分别为对照组，华法林钠片组（临床等效剂量 0.4 mg/kg），舒脑欣滴丸低、高剂量（45.36、90.72 mg/kg）组，联合给药低、高剂量（舒脑欣滴丸 45.36、90.72 mg/kg+华法林钠 0.4 mg/kg）组，每组 6 只。各组大鼠按给药体积 10 mL/kg 分别 ig 给予相应药物，连续 3 d，末次给药 1 h 后，水合氯醛麻醉大鼠，腹主动脉取血 9 mL，按照“2.1.1”项方法测定，计算血小板最大聚集率和聚集抑制率^[12-13]。

2.2 对大鼠 APTT、PT、TT 的影响

动物分组及给药方法同“2.1.2”项，末次给药 1 h 后，水合氯醛麻醉大鼠，腹主动脉取血 9 mL，放入盛有 3.2%枸橼酸钠 1 mL 的离心管中摇匀；按试剂盒说明处理血样，并进行 APTT、PT、TT 的测定^[9-10]。

2.3 统计方法

SPSS 17.0 软件处理数据，数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用 *t* 检验。为了定量表征两药的协同作用，引入协同作用系数，具体定义为两药联合作用下 APTT、PT、TT 的值与两药单独作用下 APTT、PT、TT 的值的比值的比值^[14]。

3 结果

3.1 舒脑欣滴丸体外对血小板聚集的影响

舒脑欣滴丸低、高剂量均有明显降低经凝血酶或 ADP 诱导的血小板聚集的作用，与对照组比较，差异显著（*P* < 0.01）。舒脑欣滴丸低剂量和高剂量的抗血小板聚集作用差异不明显，见表 1。

表 1 舒脑欣滴丸对凝血酶或 ADP 诱导的体外血小板聚集的影响（ $\bar{x} \pm s$, *n* = 6）

Table 1 Effect of SDP on *in vitro* platelet aggregation induced by thrombin and ADP ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	凝血酶		ADP	
		最大聚集率/%	聚集抑制率/%	最大聚集率/%	聚集抑制率/%
对照	—	84.50 ± 3.92	—	64.01 ± 5.88	—
舒脑欣滴丸	4.54	31.07 ± 4.12**	63.2 ± 4.86	0.96 ± 5.91**	98.5 ± 0.51
	22.70	30.07 ± 3.61**	64.4 ± 7.91	0.95 ± 6.13**	98.5 ± 4.25

与对照组比较：***P* < 0.01

***P* < 0.01 vs control group

3.2 舒脑欣滴丸与华法林钠对大鼠体内血小板聚集的影响

对凝血酶或 ADP 诱导的血小板聚集, 除舒脑欣滴丸低剂量组外, 其余各给药组均有明显抑制作用, 与对照组比较, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。

联合给药低剂量组有明显降低血小板聚集的作用, 与舒脑欣滴丸低剂量组比较, 显著差异 ($P<0.05$), 与华法林钠组比较无明显差异。联合给药高剂量组有降低血小板聚集作用, 与舒脑欣滴丸高剂量组和华法林钠组比较, 差异均显著 ($P<0.05$), 见表 2。

表 2 舒脑欣滴丸与华法林钠对凝血酶或 ADP 诱导的大鼠体内血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Effect of SDP and Warfarin sodium on *in vivo* platelet aggregation induced by thrombin and ADP ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凝血酶		ADP	
		最大聚集率/%	聚集抑制率/%	最大聚集率/%	聚集抑制率/%
对照	—	73.65±5.97	—	60.22±4.67	—
华法林钠	0.4	66.78±6.43 ^{*Δ}	9.33±7.59	28.83±4.92 ^{**Δ}	52.16±5.08
舒脑欣滴丸	45.36	72.67±5.28 [#]	1.33±11.55	62.62±3.85 [#]	-3.91±17.55
	90.72	69.11±5.66 ^{*Δ}	6.16±5.19	57.08±5.14 ^{*Δ}	12.16±9.14
联合给药	45.36+0.4	66.29±6.55 [*]	9.99±9.71	28.56±4.35 ^{**}	52.57±6.85
	90.72+0.4	63.22±5.75 [*]	14.16±3.69	20.62±4.55 ^{**}	65.76±2.57

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与联合给药低剂量组比较: [#] $P<0.05$; 与联合给药高剂量组比较: ^Δ $P<0.05$
^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs low-dose combined administration group; ^Δ $P<0.05$ vs high-dose combined administration group

3.3 舒脑欣滴丸与华法林钠联用抗凝血作用

3.3.1 舒脑欣滴丸与华法林联用对 APTT 的影响 除舒脑欣滴丸低剂量组外, 其余各给药组能明显延长 APTT, 且与对照组比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。联合给药低剂量组能明显延长 APTT, 与舒脑欣滴丸低剂量组比较, 差异显著 ($P<0.01$), 与华法林钠组比较无明显差异。联合给药高剂量组能明显延长 APTT, 与舒脑欣滴丸高剂量组和华法林钠组比较, 差异显著 ($P<0.01$)。联合给药低、高剂量组的协同系数 <1 , 说明两药没有发挥协同作用。结果见表 3。

3.3.2 舒脑欣滴丸与华法林联用对 PT 的影响 除舒脑欣滴丸低剂量组外, 其余各给药组能明显延长 PT, 且与对照组比较, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。联合给药低剂量组能明显延长 PT, 与舒脑欣滴丸低剂量组比较, 差异显著 ($P<0.01$), 与华法林钠组

比较无明显差异。联合给药高剂量组能明显延长 PT, 与舒脑欣滴丸高剂量组和华法林钠组比较, 差异显著 ($P<0.01$)。联合给药低剂量组的协同系数 <1 , 说明两药没有发挥协同作用。联合给药高剂量组的协同系数 >1 , 说明两药发挥协同作用。结果见表 3。

3.3.3 舒脑欣滴丸与华法林联用对 TT 的影响 各给药组能明显延长 TT, 且与对照组比较, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。联合给药低剂量组能明显延长 TT, 与舒脑欣滴丸低剂量组和华法林钠组比较, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。联合给药高剂量组能明显延长 TT, 与舒脑欣滴丸高剂量组和华法林钠组比较, 差异显著 ($P<0.01$)。联合给药低剂量组的协同系数 <1 , 说明两药没有发挥协同作用。联合给药高剂量组的协同系数 >1 , 说明两药发挥协同作用。结果见表 3。

表 3 舒脑欣滴丸与华法林钠对大鼠 APTT、PT、TT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 3 Effect of SDP and Warfarin sodium on APTT, PT, and TT of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	APTT/s	PT/s	TT/s
对照	—	17.63±1.59	18.78±1.22	33.18±1.00
华法林钠	0.4	28.33±1.30 ^{**ΔΔ}	40.31±2.59 ^{**ΔΔ}	37.82±1.54 ^{**#ΔΔ}
舒脑欣滴丸	45.36	18.00±1.64 ^{##}	18.47±1.33 ^{##}	37.92±1.80 ^{*##}
	90.72	25.90±1.23 ^{*ΔΔ}	23.60±2.21 ^{*ΔΔ}	42.60±1.28 ^{*ΔΔ}
联合给药	45.36+0.4	30.30±1.36 ^{**}	40.27±2.64 ^{**}	40.60±1.40 ^{**}
	90.72+0.4	46.85±1.06 ^{**}	104.90±2.86 ^{**}	103.45±3.30 ^{**}

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与联合给药低剂量组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与联合给药高剂量组比较: ^{ΔΔ} $P<0.01$
^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs low-dose combined administration group; ^{ΔΔ} $P<0.01$ vs high-dose combined administration

4 讨论

血小板聚集率升高时,血小板容易聚集形成血栓,其数值越高,形成血栓的可能越大^[15-16]。舒脑欣滴丸由当归和川芎2味药材组成,大量文献报道川芎嗪具有明显的抑制血小板聚集的作用^[17-19],本实验研究发现,在离体实验中舒脑欣滴丸具有明显抑制血小板聚集的效果,这与文献报道一致。在整体动物实验中随着舒脑欣滴丸剂量的增大,其抗血小板聚集作用也呈现出逐渐增强的趋势,在整体动物实验中未表现出很强的抗血小板聚集作用,这可能与整体动物实验中药物的有效浓度难达到离体实验的药物浓度有关。舒脑欣滴丸与华法林钠联合给药对血小板聚集的协同作用不明显。

在体内凝血实验中,APTT反映血浆中凝血因子VIII、XI和IX的水平,是内源性凝血系统的筛选指标。PT反映血浆中凝血因子I、II、V、VII、X的水平,是外源性凝血系统较敏感和常用的筛选指标。TT通常用来观察血中抗凝物质是否增多。本实验研究发现,随着舒脑欣滴丸剂量的增加,可以明显延长APTT、PT、TT。与华法林钠组比较,联合应用时APTT、PT、TT显著增加。低剂量时协同系数<1,高剂量时协同系数>1。结果提示,舒脑欣滴丸与华法林钠联合用药具有协同抗凝血作用。

参考文献

- [1] 王欢,唐于平,郭建明,等.当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):73-77.
- [2] 万晓青,张伟.当归对血液系统的药理作用研究进展[J].中草药,2009,40(12):6-8.
- [3] 胡晶,吴宏.当归多糖对小鼠外周血造血细胞动员作用的研究[J].中草药,2006,37(12):1835-1838.
- [4] 张军平,徐媛媛,徐士欣,等.舒脑欣滴丸治疗急性缺血性中风73例临床观察[J].中医杂志,2013,54(9):758-761.
- [5] 项耀祖,商洪才,张伯礼.抗血小板中药研究进展[J].中草药,2008,39(2):290-294.
- [6] Zhuang P W, Jiang Y B, Zhang Y J, *et al.* Induction of angiogenesis and neurogenesis by serum from rats treated with Shunaoxin Dropping Pills [J]. Chin Herb Med (CHM), 2011, 3(1): 41-46.
- [7] Redman A R. Implications of cytochrome P450 2C9 polymorphism on warfarin metabolism and dosing [J]. Pharmacotherapy, 2001, 21(2): 235-242.
- [8] 郑策,梅丹.影响华法林抗凝血作用的有关因素[J].药物不良反应杂志,2007,9(4):256-260.
- [9] 蔡为荣,谢亮亮,汤坚.仙人掌多糖结构分析及抗凝血活性研究[J].安徽农业科学,2012,40(4):2310-2314.
- [10] 赵锐,郭彩霞,张鸥,等.玉米芯多糖及其硫酸酯抗凝血活性及其机制[J].吉林大学学报:医学版,2012,38(1):62-66.
- [11] Holbrook A M, Pereira J A, Labiris R, *et al.* Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions [J]. Arch Intern Med, 2005, 165(10): 1095-1106.
- [12] Xing Y C, Jing L, Tang Y Z, *et al.* ACE and platelet aggregation inhibitors from *Tamarix hohenackeri* Bunge (host plant of *Herba Cistanches*) growing in Xinjiang [J]. Pharmacog Magaz, 2014, 10(38): 111-116.
- [13] 张姐,金城,骆骄阳,等.姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓作用研究[J].中草药,2011,42(10):2070-2073.
- [14] 晏琼,商澎,吴建勇.生物与非生物诱导子协同作用对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响[J].中国中药杂志,2006,31(3):188-190.
- [15] 吴小平,刘放.抗血小板聚集药物研究进展[J].西北药学杂志,2009,24(4):327-329.
- [16] 郭辉,刘媛,胡玉龙.抗血小板药物研究进展[J].中国药物与临床,2007,7(9):694-695.
- [17] 杨锐,魏文宁,王爱莲,等.川芎嗪对血小板聚集三条激活途径的抑制及解聚作用的探讨[J].中国血液流变学杂志,1995,5(1):4-7.
- [18] 宋书辉,徐旭,于冰,等.当归总苯酐活血化瘀作用的实验研究[J].中草药,2012,43(5):952-956.
- [19] 杨铁虹,商澎,梅其炳,等.当归多糖硫酸酯对凝血和血小板聚集的作用[J].中草药,2002,33(11):1010-1013.