

- 51-54.
- [7] Muldner Von H, Zoller M. Antidepressive Wirkung eines auf den Wirkstoff fkomplex hypericin standardisierten *Hypericum* extractes [J]. *Drug Res*, 1984, 34() (8): 918-920.
- [8] Viletinck A J, DeBruyne T, Apers S, et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection [J]. *Planta Med*, 1998, 64(2): 97.
- [9] 梁颖华, 王冬梅, 杨得坡, 等. 贯叶金丝桃素及其衍生物的合成与神经药理学研究进展 [J]. *中草药*, 2007, 38(5): 789-791.
- [10] 赵晓虹, 梁剑平, 祝艳华, 等. 金丝桃素蛋白络合物体外抗 51 亚型禽流感病毒的活性研究 [J]. *中兽医医药杂志*, 2006, 3: 13-15.
- [11] 王曙阳, 梁剑平, 杨林西, 等. 金丝桃素对口蹄疫病毒的体外抗病毒实验 [J]. *中国兽医杂志*, 2006, 42(6): 6-9.
- [12] 殷震, 刘景华. *动物病毒学* [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [13] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 75(1-2): 55-63.
- [14] 王向阳, 刘志苏, 姜合作, 等. 金丝桃素体外抗巨细胞病毒效应的实验研究 [J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2005, 27(3): 304-306.
- [15] 中国医学科学院流行病防治研究所. 常见病毒病实验技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1978.
- [16] Park J, Doug S, Wannemuehler Y, et al. The role oxygen in the antiviral activity of hypericin and hypcrellin [J]. *Phytochem Phytobiol*, 1998, 68(4): 137-143.
- [17] 朱晓薇. 一种金丝桃光敏衍生物的抗病毒活性 [J]. *国外医药: 植物药分册*, 1997, 12(6): 273.
- [18] 常雅萍, 杨贵贞. 秘灵王提取物抗 DNA、RNA 病毒效应 [J]. *白求恩医科大学学报*, 1996, 22(5): 466-468.
- [19] Prince A M, Pascua I D. Strategier for evaluations of enveloped virus inactivation in red cell ancentres using hypericin [J]. *Phytochem Phytobioc*, 2000, 71: 188-195.

丹皮炭对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响

李 娴, 张 丽, 丁安伟 *

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

摘 要:目的 研究丹皮炭及其止血活性部位对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响。方法 以 SD 种大鼠为研究对象, 观察丹皮炭及其止血活性部位对 4,5-腺苷二磷酸二钠盐 (ADP) 和胶原诱导的大鼠血小板聚集率、血浆中血栓素 B_2 (TXB₂) 和 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}) 水平, 以及大鼠组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 及其抑制剂 (PAF1) 活性的影响。结果 丹皮炭及其止血活性部位均能提高 ADP 和胶原诱导的血小板聚集率; 提高大鼠血浆中 TXB₂ 的量而降低 6-keto-PGF_{1 α} 的量; 对大鼠血浆 t-PA 和 PAF1 活性无明显影响。结论 丹皮炭及其止血活性部位可能是通过调节 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 的量来增强血小板的聚集功能, 发挥止血、凝血作用; 而其对纤溶活性无显著影响。

关键词:丹皮炭; 血小板聚集; 血栓素 B_2 (TXB₂); 6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}); 纤溶活性

中图分类号:R286.31 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)02-0264-03

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 是中医临床常用中药之一, 始载于《神农本草经》, 列为中品, 已有两千余年的药用历史。元代始即将牡丹皮制炭后用于临床, 以治疗各种出血性疾病。长期的临床实践证明丹皮炭具有明显的止血作用, 可用于吐血、崩漏及其他多种出血病症, 疗效确切^[1]。然而目前国内外对丹皮炭止血机制的研究尚不深入。前期实验研究中已筛选确定出丹皮炭止血的主要活性部位, 并在此基础上对其止血机制进行了初步研究^[2], 本实验则着重通过 ELISA 法测定大鼠血浆中血栓素 B_2 (TXB₂)、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}) 水平以及大鼠组

织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 及其抑制剂 (PAF1) 活性, 探讨丹皮炭及其止血活性部位对大鼠血小板功能和纤溶活性的影响, 以期进一步揭示丹皮炭止血作用的机制。

1 材料

1.1 动物: SD 大鼠, 雄性, 体质量 (180 ± 20) g, 购自浙江省实验动物中心, 许可证号: SCXK (浙) 2003-0001。

1.2 药品与试剂: 云南白药为云南白药集团股份有限公司产品 (批号 20080209); CMC-Na: 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司; 4,5-腺苷二磷酸二钠盐 (ADP): 北京世帝科学仪器公司; 胶原: Sigma 公司;

* 收稿日期: 2009-08-20

基金项目: 国家“十一五”科技攻关项目 (2006BAI09B006-02); 2008 年江苏省研究生培养创新工程 (CX08B_2002)

作者简介: 李 娴 (1980—), 女, 博士研究生, 主要从事中药炮制与复方研究。Tel: 13611517960 E-mail: lixian0813@126.com

* 通讯作者 丁安伟 Tel: (025) 85811523 E-mail: awding105@163.com

ELISA 试剂盒、TXB₂、6-keto-PGF_{1α}、t-PA、PAF-1 均为武汉中美科技有限公司产品。

1.3 仪器:LG—PABER 血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司)、680 型酶标仪(Bio-Rad 公司)、离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.4 供试品制备:云南白药临床用量为 2 g,实验动物按临床用量 20 倍给药,即 0.667 g/kg。取云南白药粉末 6.67 g 加入 0.5% CMC-Na 200 mL 研磨均匀即得云南白药供试品。

牡丹皮药材购自安徽亳州,经南京中医药大学中药鉴定教研室吴启南教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。

丹皮炭(十灰散)临床用量为 9 g,实验动物按临床用量 20 倍给药,即 3 g/kg。取适量生品牡丹皮,280℃ 炒制 20 min,制成牡丹皮炭品。适当粉碎后过 200 目筛。取丹皮炭粉末 30 g,加入 0.5% CMC-Na 200 mL 研磨均匀即得丹皮炭品供试品。

取 30 g 丹皮炭粉末,按《中国药典》2005 年版中鞣质的提取方法进行提取,将提取液浓缩到 1 g/mL 后,加入 0.5% CMC-Na 200 mL 混匀即得丹皮炭鞣质供试品。

取适量丹皮炭粉末,以 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h;回收乙醇,用醋酸乙酯少量多次萃取后,回收醋酸乙酯;制备成丹皮炭的醋酸乙酯部位浸膏。取 1.58 g 浸膏(相当于 30 g 丹皮炭粉末)加入 0.5% CMC-Na 200 mL 混匀即得丹皮炭醋酸乙酯供试品。

取适量生品牡丹皮,适当粉碎后过 200 目筛,取生丹皮粉末 37.5 g(相当于 30 g 丹皮炭粉末)加入 0.5% CMC-Na 200 mL 研磨均匀即得丹皮生品供试品。

2 方法

2.1 血小板聚集功能的测定:取大鼠 60 只,雄性,体质量(180±20)g,随机分为 6 组,每组 10 只,分别为对照组(0.5% CMC-Na)、云南白药组、丹皮生品组、丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组、丹皮炭醋酸乙酯浸膏组。将各供试品分别按 2 mL/100 g 每天 ig 给药 1 次,连续 5 d。于第 5 天给药后 1 h,大鼠颈动脉插管取血 5.4 mL,加入盛有枸橼酸钠(3.8%)溶液 0.6 mL 的离心管内抗凝。以 800 r/min 离心 10 min,取上层液即为富血小板血浆(PRP);余下部分再以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液即为贫血小板血浆(PPP)^[3]。按 Born 比浊法^[4]测定血小板最大聚集率,分别精密吸取各组 PPP 和 PRP

各 300 μL 加入测试杯中,PPP 调透光率到 100%,PRP 在 37℃ 预温槽中预热 3 min 后加入诱导剂 ADP 10 μL(终浓度为 5 μmol/L)、胶原 15 μL(终质量浓度为 50 μg/mL)检测 5 min,记录最大聚集率。

2.2 TXB₂和 6-keto-PGF_{1α}的测定:取大鼠 60 只,分组及给药方法同 2.1 项。于末次给药 1 h 后,颈动脉插管取血 5.4 mL,加入盛有肝素(1%)溶液 0.6 mL 的离心管内抗凝。以 1 000 r/min 离心 15 min,分离血浆,严格按试剂盒说明书步骤操作,用 ELISA 法测定 TXB₂和 6-keto-PGF_{1α}水平。

2.3 t-PA 和 PAF-1 活性的测定:将 2.2 项中血浆按试剂盒说明书步骤操作,用 ELISA 法测定 t-PA 和 PAF-1 的活性。

2.4 统计学处理方法:采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 各组大鼠血小板聚集率:与对照组比较,丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组均明显提高 ADP 和胶原诱导的血小板聚集率($P < 0.05, 0.01$);丹皮炭醋酸乙酯浸膏对两者诱导的血小板聚集均无明显促进作用;而丹皮生品组与对照组比较,能明显抑制 ADP 和胶原诱导的血小板聚集率($P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 各丹皮炭供试品对大鼠血小板聚集的影响

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of tested samples of carbonized Cortex Moutan on platelet aggregation of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	血小板最大聚集率/%	
		ADP	胶原
对照	-	46.31 ± 8.82	45.97 ± 5.09
云南白药	0.667	59.14 ± 5.13 **	53.54 ± 7.17 *
丹皮生品	3.00	22.82 ± 7.33 **	27.43 ± 8.85 **
丹皮炭品	3.00	53.31 ± 4.97 *	51.06 ± 4.34 *
丹皮炭鞣质	3.00	58.38 ± 4.99 **	52.72 ± 4.41 **
丹皮炭醋酸乙酯浸膏	3.00	51.39 ± 3.64	50.42 ± 5.18

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 各组大鼠血浆中 TXB₂和 6-keto-PGF_{1α}的水平:丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组和丹皮炭醋酸乙酯浸膏组均能明显提高大鼠血浆中 TXB₂的量,与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)。丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组和丹皮炭醋酸乙酯浸膏组均降低大鼠血浆中 6-keto-PGF_{1α}的量,与对照组比较有统计学差异($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3 各组大鼠血浆中 t-PA 和 PAF-1 活性:丹皮炭及其止血活性部位、丹皮生品均对 t-PA 及 PAF-1

活性无影响。结果见表 2。

表 2 各丹皮炭供试品对大鼠血浆中 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 水平及 t-PA、PAF1 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 2 Effects of tested samples of carbonized Cortex Moutan on levels of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α}, and activities of t-PA and PAF1 in plasma of rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	TXB ₂ / (pg · mL ⁻¹)	6-keto-PGF _{1α} / (pg · mL ⁻¹)	t-PA/ (IU · mL ⁻¹)	PAF1/ (IU · mL ⁻¹)
对照	-	26.89 ± 14.30	12.08 ± 5.19	0.35 ± 0.07	0.04 ± 0.03
云南白药	0.667	45.77 ± 14.59 *	5.61 ± 2.90 *	0.24 ± 0.10 *	0.16 ± 0.12 *
丹皮生品	3.00	37.50 ± 13.30 *	8.31 ± 4.74 *	0.37 ± 0.02	0.04 ± 0.04
丹皮炭品	3.00	49.17 ± 15.70 *	6.46 ± 3.30 *	0.30 ± 0.09	0.10 ± 0.08
丹皮炭鞣质	3.00	58.23 ± 17.81 *	5.69 ± 3.14 *	0.35 ± 0.08	0.03 ± 0.02
丹皮炭醋酸乙酯浸膏	3.00	58.67 ± 24.74 *	6.32 ± 1.49 *	0.37 ± 0.09	0.01 ± 0.01

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group

4 讨论

目前国内外对牡丹皮药理作用的研究多集中于生品,对牡丹皮的炮制作用及丹皮炭止血机制还没有深入的研究。为探讨丹皮炭止血作用的机制,首先对丹皮炭止血作用主要活性部位进行药效学筛选研究,通过实验筛选确定其止血作用主要活性部位为丹皮炭鞣质部位以及醋酸乙酯部位;并初步探讨了其止血作用的部分机制^[2]。本实验则着重探讨了丹皮炭及其止血活性部位对大鼠血小板聚集性及 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 的量以及对 t-PA 及其抑制剂 PAF1 活性的影响,以期从血小板功能和纤溶活性方面阐述丹皮炭止血作用的机制。

通常正常止血与凝血过程包括血管壁、血小板和凝血因子等多方面的作用,其中血小板的吸附、聚集作用在止血初期具有重要意义^[5]。血栓素 A₂ (TXA₂) 是目前已发现的最强的缩血管物质与血小板聚集剂之一^[6]。前列腺素 I₂ (PGI₂) 则是较强的血小板功能的抑制剂,具有抑制血小板的黏附、聚集和释放反应,抑制血小板的促凝活性等作用^[7]。PGI₂ 和 TXA₂ 之间的动态平衡是维持正常止血功能的基础,血小板与血管壁接触时被激活,合成和释放 TXA₂ 并促进血小板聚集,而血管壁利用自身或外源性的花生四烯酸合成 PGI₂。由于 TXA₂ 和 PGI₂ 的半衰期很短,一般将 TXA₂ 和 PGI₂ 稳定的代谢产物 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 作为判断其浓度的指标^[8]。

在纤溶系统中,产生于血管内皮细胞 t-PA 及

其抑制剂 PAF1 发挥重要作用^[9]。t-PA 能选择性地激活纤溶酶原形成纤溶酶,继而催化纤维蛋白水解。PAF1 是 t-PA 活性主要的生理性抑制剂,PAF1 能快速与 t-PA 结合,形成 1:1 复合物而使 t-PA 失活。t-PA 与 PAF1 在纤溶系统激活过程中起着相互拮抗的作用^[10]。

本实验研究表明,丹皮炭及其鞣质部位均能明显提高 ADP 和胶原诱导的大鼠血小板聚集率,通过对 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 量的检测证实,丹皮炭及其鞣质部位均能明显提高大鼠 TXB₂ 的量,同时下调 6-keto-PGF_{1α} 的量。在对 t-PA 及 PAF1 活性的测定中发现,丹皮炭及其止血活性部位对大鼠 t-PA 及 PAF1 活性无影响,提示丹皮炭的止血作用机制与纤溶活性无关。因此推测丹皮炭可能是通过对 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 量的影响来实现对血小板活化作用的调节,血小板活化后增强血小板的聚集功能,起到止血作用。在本实验中还发现,丹皮生品能抑制 ADP 和胶原诱导的大鼠血小板聚集率,表现出对血小板功能的抑制作用即抗凝血作用。故推测丹皮炭发挥止血作用是否与其生品炭化后活物质降低或凝血物质增加有关,值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第 3 卷. 北京:化学工业出版社, 2002.
- [2] 李 娟, 张 丽, 丁安伟. 丹皮炭止血作用有效部位及作用机制研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1278-1280.
- [3] 徐叔云, 卞如钪, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002.
- [4] Born. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal [J]. Nature, 1962, 194(6): 927-929.
- [5] 王振义. 止血与血栓基础理论与临床 [M]. 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社, 1996.
- [6] 庞爱明, 阮长耿. 绿茶的主要成分表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 对血小板功能影响的研究 [J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14: 37-39.
- [7] 刘耀武, 马腾飞, 蒋新颖, 等. 盐酸戊乙奎醚对高黏血症大鼠微循环和血液流变性的影响 [J]. 中国微循环, 2006, 10: 415-419.
- [8] 汪保和, 皮亦华, 黄 畅, 等. 补肾通络方对阴离子化牛血清白蛋白致膜性肾炎大鼠高凝状态的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1095-1098.
- [9] 张晓平, 柳 春. TNF-α, t-PA/PAF1 在 2 型糖尿病血管并发症中的意义 [J]. 辽宁医学杂志, 2006, 20: 13-14.
- [10] 韩纪举, 魏 然, 陈 彬, 等. 血液 t-PA 和 PAF1 水平及活性与血液流变学指标的相关性分析 [J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14: 160-164.