

当归总苯酐活血化瘀作用的实验研究

宋书辉^{1,2}, 徐旭¹, 于冰¹, 赵专友¹, 汤立达^{1*}

1. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193

摘要: **目的** 观察当归总苯酐在活血化瘀方面的功效。**方法** 大鼠 ig 给予当归总苯酐 (生药 1、2、4 g/kg), 观察当归总苯酐对大鼠实验性动脉血栓形成及血小板聚集功能的影响; 采用高分子右旋糖酐制备高黏血症大鼠模型, 观察当归总苯酐对大鼠血液黏度的影响; 观察当归总苯酐对大鼠凝血相关指标的影响。**结果** 当归总苯酐 (生药 1、2、4 g/kg) 能延长大鼠实验性动脉血栓的形成时间 ($P < 0.05$ 、 0.01); 降低高分子右旋糖酐所致的高黏血症大鼠全血、血浆、血清黏度 ($P < 0.05$); 抑制花生四烯酸 (AA)、腺苷二磷酸钠 (ADP)、胶原 (CG) 诱导的血小板聚集功能 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 明显延长大鼠凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT) ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 当归总苯酐具有显著的活血化瘀作用, 表现为延长实验性动脉血栓的形成时间; 改善高黏血症模型大鼠的全血及血浆黏度; 抑制血小板聚集功能; 影响凝血系统, 延长大鼠 TT、PT、APTT 等指标。

关键词: 当归; 当归总苯酐; 活血化瘀; 高黏血症; 血栓形成; 凝血系统

中图分类号: R286.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)05-0952-05

Effects of *Angelica sinensis* total phthalide on promoting blood circulation and removing blood stasis

SONG Shu-hui^{1,2}, XU Xu¹, YU Bing¹, ZHAO Zhuan-you¹, TANG Li-da¹

1. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of *Angelica sinensis* total phthalide (ASTP) on promoting blood circulation and removing blood stasis. **Methods** Rats were ig administrated with ASTP crude drug at doses of 1, 2, and 4 g/(kg·d), and the effects of ASTP on rats with experimental arterial thrombosis and platelet aggregation function were studied. Using the hyperviscosity rat model induced by polymer dextran preparation, the effects of ASTP on rat blood viscosity and coagulation related indexes were observed. **Results** ASTP crude drug 1, 2, and 4 g/(kg·d) could prolong the experimental arterial thrombosis time ($P < 0.05$, 0.01), reduce large molecular weight dextran-induced hyperviscosity of the whole blood, plasma, and serum viscosity in rats ($P < 0.05$), inhibit the effects of arachidonic acid (AA), adenosine diphosphate (ADP), and collagen (CG) on platelet aggregation ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001), and prolong the thrombin time (TT), prothrombin time (PT), and activate partial thromboplastin time (APTT) ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001). **Conclusion** ASTP has remarkable effect of promoting blood circulation and removing blood stasis, which is demonstrated as extension of experimental arterial thrombosis time, improvement the whole blood and plasma viscosity of hyperviscosity rat model, inhibition of platelet aggregation function, effect on the coagulation system, and prolongation of TT, PT, and APTT indexes in rats.

Key words: *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; *Angelica sinensis* total phthalide (ASTP); promoting blood circulation and removing blood stasis; hyperviscosity; thrombosis; coagulation system

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 是一种使用频率较高的中药, 素有“十方九归”之说, 至今仍

广泛应用于临床^[1]。祖国医学认为, 当归为血家之圣药, 应用于多种循环系统疾病的治疗。现代药理

收稿日期: 2011-11-18

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAI37B06)

作者简介: 宋书辉 (1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药理学。Tel: 13820010920 E-mail: book1121@163.com

*通讯作者 汤立达 Tel: (022)23006950 E-mail: tangld@tjpr.com

研究表明当归对血液系统有着广泛的影响。目前当归有效成分的研究多集中于当归多糖和挥发油成分^[2-3],通过对当归主要有效成分的研究,使当归的系列产物能达到整合资源、综合利用的目的。当归总苯酐为其主要的活血化瘀的有效部位^[4-6],相关研究已证实当归具有抗血小板聚集作用^[7-8]。本实验主要考察当归总苯酐在抗血栓形成、抗血小板聚集、改善血黏度、抗凝血活性等方面的药理作用,探讨其活血化瘀之功效,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

Wistar 大鼠,北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2007-0001。

1.2 药品及主要仪器

当归,产于甘肃岷县,由天津中医药大学中药研究院按照2010年版《中国药典》一部当归质量标准检验,符合规定。当归总苯酐(ASP,质量分数约为70%),自制(每克当归提取物相当于当归生药材20g),以1%聚山梨酯80配制成所需浓度的乳浊液。血塞通(批号20100202,规格50mg/粒),云南白药集团文山七花有限责任公司产品;腺苷二磷酸钠(ADP),Sigma公司产品;花生四烯酸(AA),ICM公司产品,以1mol/L Na₂CO₃溶液中和、溶解,并以Tris缓冲液稀释配制成20mmol/L的花生四烯酸钠溶液备用;胶原(CG,100mg/mL)自制;高分子右旋糖酐,相对分子质量 5.0×10^5 ,中国医学科学院血液病研究所科技公司产品,以生理盐水制成所需浓度;凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒,均由北京世帝科学仪器公司提供。

MODEL 540 血小板聚集仪,美国 Chrono-Log 公司。R80a 血黏度仪,Stellex 公司。PK121R 低温冷冻离心机,意大利 ALC 公司。BW—YLS—14B 型小动物血栓生成仪,上海软隆科技发展有限公司。LG—PABER 型凝血因子分析仪,北京世帝科学仪器公司。

2 方法

2.1 对大鼠实验性血栓形成的影响

Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,体质量(223±16)g,随机分为5组,每组10只。对照组 ig 1%聚山梨酯80乳浊液,当归总苯酐组 ig 当归总苯酐乳浊液,剂量分别为生药1、2、4g/kg,阳性对照组 ig 血塞通(50mg/kg)。每天给药1次,连续给药7d,给药体积均为5mL/kg。于末次给药后1h

大鼠 ip 给予 35%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,仰位固定,分离颈总动脉,将小动物血栓生成仪的电极置于颈总动脉上。记录从刺激开始至血栓形成所需时间,即为动脉血栓形成时间。

2.2 对大鼠血小板聚集功能的影响

雄性 Wistar 大鼠 50 只,体质量(304±41)g,分组方法、给药方式及给药剂量同“2.1”项,大鼠于末次给药后1h乙醚麻醉,腹主动脉取血,3.8%枸橼酸钠抗凝(3.8%枸橼酸钠与全血按1:9混匀)。500 r/min 离心 10 min 制备富血小板血浆 (PRP),3 000 r/min 离心 10 min 制备贫血小板血浆 (PPP)。以 PPP 调 PRP,使其血小板计数保持在 $3.5 \times 10^8 \sim 4.0 \times 10^8$ 个/mL。按比浊法测定血小板最大聚集率。取 250 μL PRP 加入比色杯中,置血小板聚集仪内 37℃温孵 10 min,以 PPP 调 100%,PRP 调零,在连续搅拌下加入诱导剂 ADP、AA、CG,其终浓度分别约为 5.3 μmol/L、0.5 mmol/L、9.5 mg/mL。

2.3 对高黏血症大鼠血液黏度的影响

Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量(311±19)g,除增设模型组外,其他分组方法、给药方式及给药剂量同“2.1”项。除对照外,各组大鼠于末次给药后30min,ip给予35%水合氯醛(350mg/kg)麻醉,经股静脉给予10%高分子右旋糖酐,1min内推注完毕,体积均为5mL/kg。给高分子右旋糖酐作用30min后,经腹主动脉取血8mL,其中5mL置肝素化试管抗凝,进行全血黏度测定及红细胞沉降率的测定后,2 000 r/min、25℃离心10min得到血浆,进行血浆黏度测定,剩余3mL全血室温静置30min后,经3 000 r/min、25℃离心10min得到血清,进行血清黏度测定。

2.4 对 TT、PT、APTT 的影响

Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,体质量(320±15)g,分组方法、给药方式及给药剂量同“2.1”项。大鼠经腹主动脉采血,3.8%枸橼酸钠与全血按1:9比例混合均匀,以2 500 r/min离心15min,用塑料移液管取出血浆,分别测定 TT、PT、APTT。

2.5 统计分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件单因素方差分析(ANOVA)和 SNK 法进行统计学分析。

3 结果

3.1 对大鼠实验性血栓形成的影响

当归总苯酐能剂量依赖性延长电刺激引起的大鼠动脉血栓形成时间($P < 0.05, 0.01$),结果见图1。

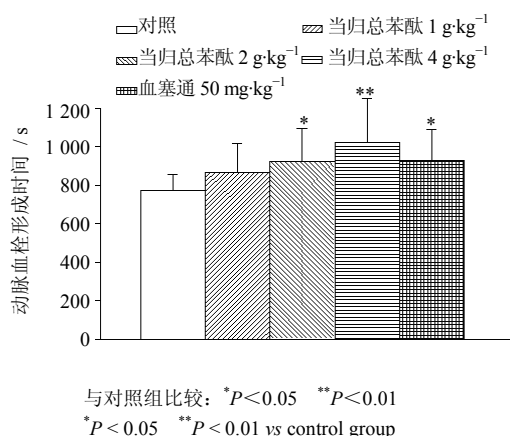


图 1 当归总苯酐对大鼠实验性动脉血栓形成时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 1 Effects of ASTP on experimental arterial thrombosis time of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.2 对大鼠血小板聚集功能的影响

当归总苯酐剂量依赖性抑制由 ADP、AA 和 CG 诱导的血小板聚集。随着当归总苯酐剂量的增加, 其对 ADP、AA 和 CG 诱导的血小板聚集的抑制率逐渐增加 ($P<0.05, 0.01, 0.001$)。血塞通 50 mg/kg 能明显抑制由 ADP、AA 和 CG 诱导的血小板聚集 ($P<0.05, 0.01$)。2 g/kg 当归总苯酐与 50 mg/kg 血塞通作用强度相当, 见图 2。

3.3 对高黏血症大鼠血液黏度的影响

3.3.1 对全血黏度的影响 结果见图 3。当归总苯酐可剂量依赖性抑制高分子右旋糖酐引起的全血黏度增加。在不同的切变率下, 当归总苯酐对增高的全血黏度的抑制率随剂量增加逐渐增加 ($P<0.05, 0.01$)。血塞通 50 mg/kg 也能不同程度地抑制不同切变率下全血黏度的增加 ($P<0.05$)。

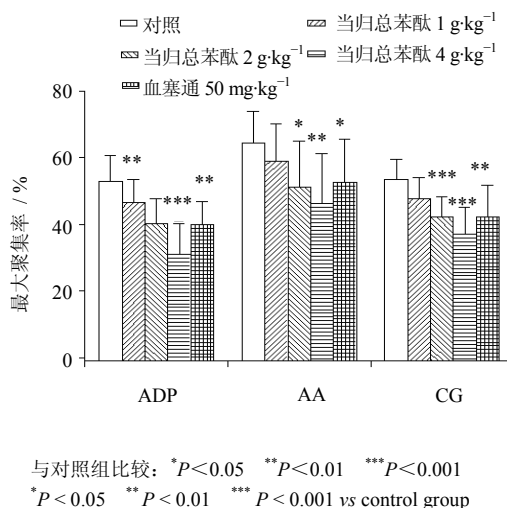


图 2 当归总苯酐对大鼠血小板聚集功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of ASTP on platelet aggregation in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

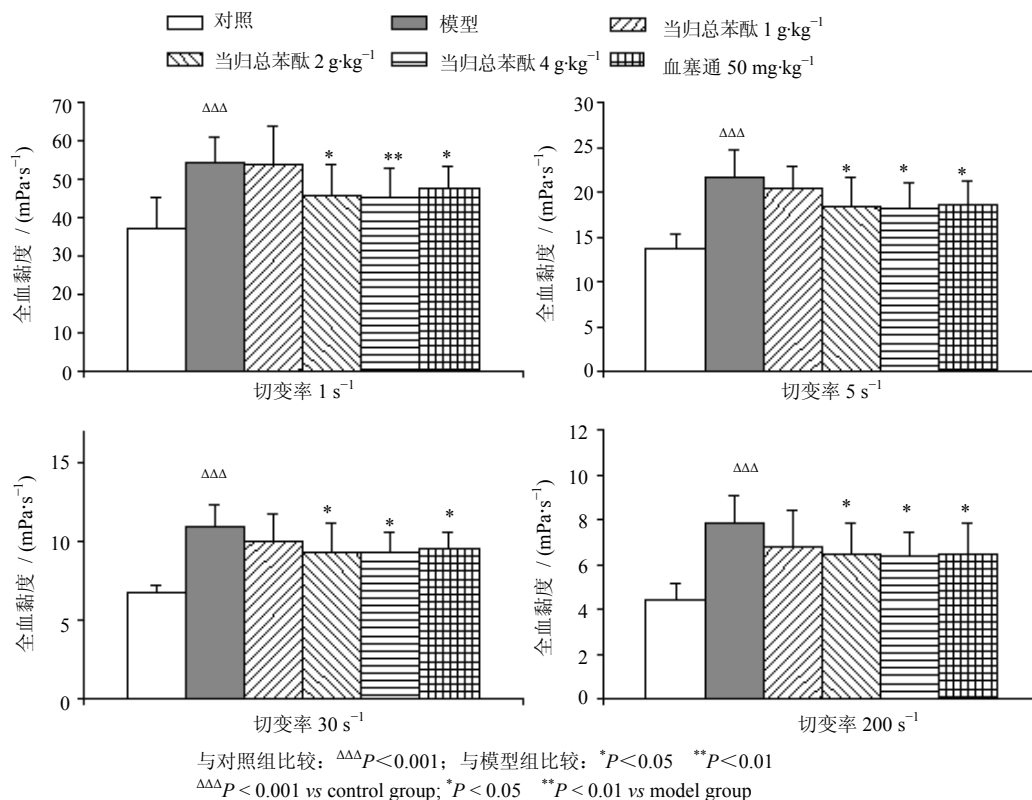


图 3 当归总苯酐对高黏血症大鼠全血黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effects of ASTP on blood viscosity of whole blood in hyperviscosity rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

3.3.2 对血浆黏度和血清黏度的影响 当归总苯酐能抑制高分子右旋糖苷引起的血浆黏度和血清黏度的增加。在切变率为 200 s^{-1} 时当归总苯酐对增高的血浆黏度和血清黏度的抑制率随剂量增加逐渐增加 ($P<0.05$)。血塞通 50 mg/kg 也能不同程度抑制血浆和血清黏度的增加,抑制率分别为 43.6% 、 39.2% ($P<0.05$)。结果见图 4。

3.3.3 对血沉的影响 当归总苯酐能抑制高分子右

旋糖苷引起的血沉的增加。当归总苯酐对增高的血沉的抑制率随剂量增加逐渐增加 ($P<0.05$ 、 0.01)；血塞通 50 mg/kg 也能抑制高分子右旋糖苷引起的血沉的增加,抑制率为 39.2% ($P<0.05$)，结果见图 5。

3.4 对大鼠 TT、PT、APTT 的影响

当归总苯酐连续给药 7 d, 随剂量增加, 对大鼠 TT、PT、APTT 均有延长作用 ($P<0.05$ 、 0.001)，结果见图 6。

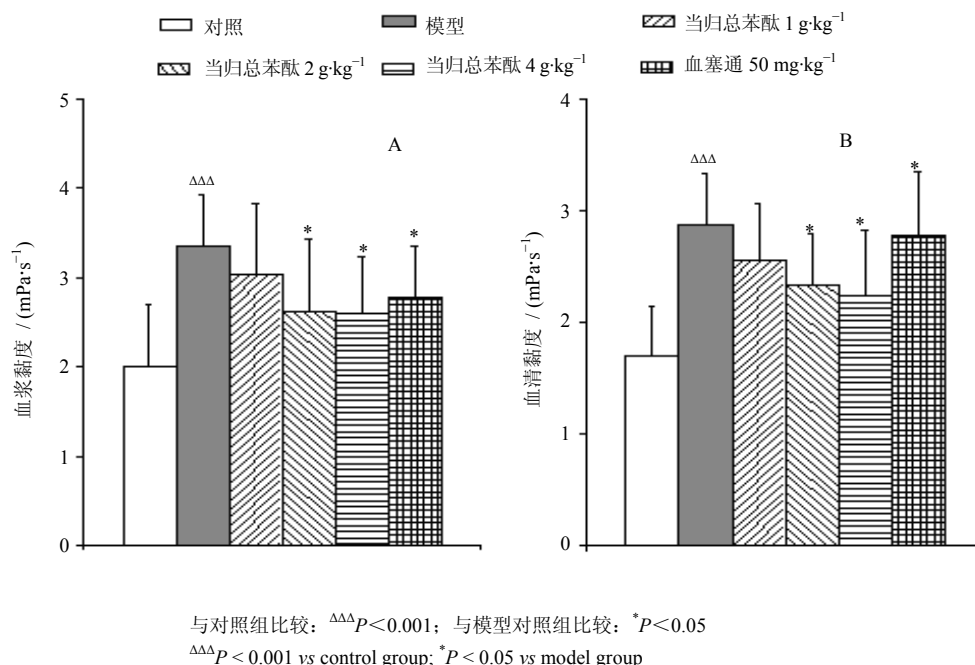


图 4 当归总苯酐对高黏血症大鼠血浆 (A) 和血清 (B) 黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 4 Effects of ASTP on plasma (A) and serum (B) viscosity in hyperviscosity rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

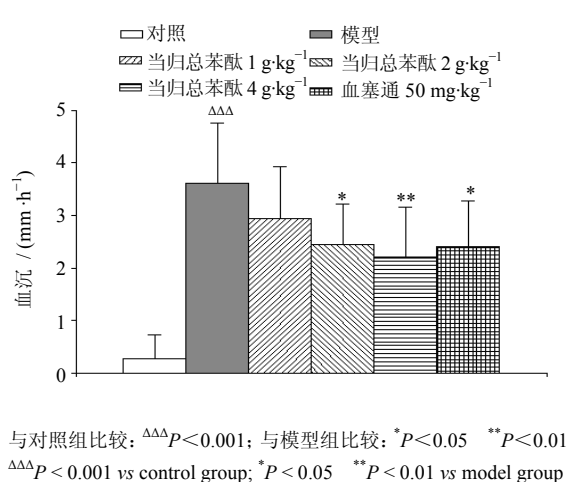


图 5 当归总苯酐对高黏血症大鼠血沉的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effects of ASTP on erythrocyte sedimentation in hyperviscosity rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

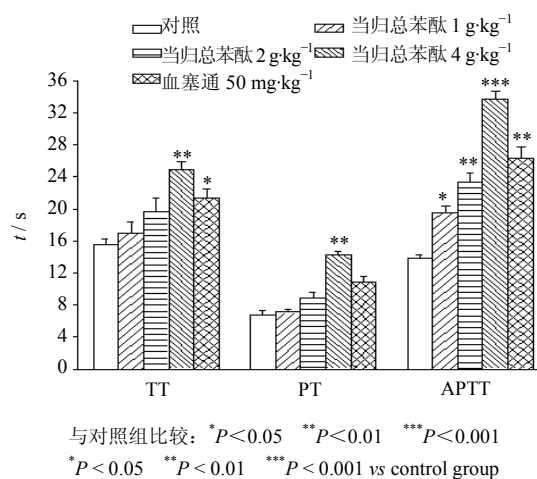


图 6 当归总苯酐对大鼠 TT、PT、APTT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effects of ASTP on TT, PT, and APTT in rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

4 讨论

当归具有广泛的药理作用,涉及机体的多个系统,本实验主要考察当归总苯酐的活血化瘀作用。当归中的挥发油、阿魏酸钠等成分具有相似的药理作用。当归中的挥发油成分可以通过改善血栓素 A_2 (TXA_2) 和前列环素 (PGI_2) 之间的平衡^[9-10],提高 TXA_2 与 PGI_2 的比值^[11],并能抑制血小板释放 5-HT^[12],有良好的抗血栓形成、抑制血小板聚集的作用。当归中的阿魏酸可以抑制 TXA_2 的生成与前列腺素的产生,抑制血小板聚集^[13];有研究已证实阿魏酸作用机制为保护血管内皮、清除自由基、增强血管内皮细胞功能、调节血管收缩、降低内皮素、平衡凝血机制、改善微循环等^[14],并抑制凝血系统,降低凝血活性,延长 APTT、PT、TT,对内源性的凝血途径的作用强于外源性途径,还可作用于纤溶系统,缩短优球蛋白溶解时间,促进纤溶过程^[15];当归改善血液黏度的作用又与其抗血栓形成、抗血小板聚集、抗凝血活性密切相关^[1,16-17],这些在本实验中也得到了验证。另外,有关构效关系的研究结果表明:当归抗凝血活性的高低与当归中有效成分的相对分子质量、硫酸根基团的取代度及取代位置有关^[18-20]。

本研究采用多个药理模型从动物实验性血栓模型、血小板聚集功能方面、高黏血症模型等方面证明当归总苯酐具有明显的活血化瘀作用,表现为抗血栓形成、抗血小板聚集功能、抗凝血活性和改善血液黏度等,其活血化瘀作用涉及多个环节、多个途径,在今后的研究中应当重点应用现代生物技术研究其活血化瘀的作用机制进行更深入系统的研究,有助于明确其针对多靶点作用的特点,为临床广泛应用提供实验基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 宋秋月,付迎波,刘 江,等. 当归的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 1900-1904.
- [3] 韦 炜,龚苏晓,张铁军,等. 当归多糖类成分及其药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134.
- [4] 龚苏晓,刘 毅,张铁军,等. 当归总苯酐的超临界 CO_2 萃取工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 448-452.
- [5] 裴 媛,谭初兵,徐为人,等. 当归苯酐类和萜类成分作用的虚拟评价 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 938-941.
- [6] Pei Y, Tan C B, Xu W R, et al. Virtual evaluation on the activities of phthalides and terpenoids from *Angelica sinensis* [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(3): 236-241.
- [7] Mei Q B, Tao J Y, Cui B. Advances in the pharmacological studies of radix *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (Chinese Dang-gui) [J]. *Chin Med J*, 1991, 104(9): 776-779.
- [8] 刘晓东,薛玉英,王广基,等. 大鼠灌胃川芎、当归及其复方后阿魏酸的药代动力学 [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(5): 448-451.
- [9] Yang C C, Han Y, Zhang A S, et al. Effect of *huangqi*, *danggui* and ligustrazine as medicines activating blood and eliminating stasis on the expression of plasminogen activator inhibitor 1 in HepG2 hepatocarcinoma cell strain [J]. *Rehabil Tradit Chin Med*, 2005, 19(9): 210-212.
- [10] 刘少平,董卫国,贺降福,等. 当归注射液对溃疡性结肠炎患者血小板功能状态的影响及其意义 [J]. 中国医师杂志, 2003, 7(5): 904-906.
- [11] 汪 钟,高友鹤,黄如松,等. 阿魏酸钠是一种血栓素 A_2 合成酶抑制剂 [J]. 中国药理学报, 1998, 9(5): 430-433.
- [12] 伊钟珠,张凌云,徐理钠,等. 当归及其成份阿魏酸钠对大鼠血小板聚集和 5-HT 释放的影响 [J]. 药科学报, 1980, 15(6): 263-265.
- [13] 齐振详,孙书梅,邢玉霞. 阿魏酸钠治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2008, 14(2): 122-123.
- [14] Amantea D, Nappi G, Bernardi G, et al. Post-ischemic brain damage: Pathophysiology and role of inflammatory mediators [J]. *FEBS J*, 2009, 276(1): 13-26.
- [15] 徐理钠,吁文贵. 阿魏酸钠对花生四烯酸代谢的影响 [J]. 药科学报, 1990, 25(6): 412-416.
- [16] 张明发. 阿魏酸抗动脉粥样硬化研究进展 [J]. 中草药, 1990, 21(1): 41-43.
- [17] 黄 芳,黄罗生,窦昌贵,等. 当归四逆汤活血化瘀作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(5): 31-33.
- [18] Alban S, Kraus J, Franz G. Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity [J]. *Arzneimittelforschung*, 1992, 42(8): 1005-1008.
- [19] Soeda S, Ohmagari Y, Shimeno H, et al. Preparation of over sulfated fucoidan fragments and evaluation of their antithrombotic activities [J]. *Thromb Res*, 1993, 72(3): 247-256.
- [20] Dace R, McBride E, Brooks K, et al. Comparison of the anticoagulant action of sulfated and phosphorylated polysaccharides [J]. *Thromb Res*, 1997, 87(1): 113-121.