

· 数据挖掘 ·

58 种活血化瘀类复方中成药抗血小板聚集 活性评价揭示的方剂配伍规律

孟燕芝^{1,2}, 王志龙^{1,2}, 苏骏成^{1,2}, 常连赢^{1,2}, 吕明^{1,2}, 朱彦^{1,2*}

(1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193;

2. 天津国际生物医药联合研究院 中药新药研发中心, 天津 300457)

[摘要] 目的:通过评价 58 种活血化瘀类复方中成药抗血小板聚集活性并探究其用药规律,为抗血小板现代中药的研发提供一定的实验依据。方法:使用高通量微孔板比浊法检测药物对由二磷酸腺苷(ADP),凝血酶诱导的血小板聚集反应的抑制作用。结果:有 41 种活血化瘀类复方中成药能不同程度(药物血小板抑制聚集率达 30%~98%)的拮抗 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集,其中有 18 种药物对诱导剂具有选择性。受试药物中,抗血小板聚集活性较高的复方多含有丹参、川芎、红花、三七、冰片等药味。活血化瘀类复方中成药多配伍补虚药、开窍药、止血药发挥其抗血小板聚集的作用。结论:活血化瘀类复方中成药可通过抗 ADP 和抗凝血酶的途径发挥抗血小板聚集作用,复方中配伍“理气”、“补气”、“开窍”等功效的药味或可增强其抗血小板聚集活性。

[关键词] 活血化瘀; 复方中成药; 抗血小板聚集; 配伍规律

[中图分类号] R287 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2016)24-0187-07

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2016240187

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0903.004.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:03

Evaluation of Anti-platelet Aggregation Activity and Compatibility Patterns of 58 Kinds of Compound Traditional Chinese Medicines for Promoting Blood Circulation and Removing Blood Stasis

MENG Yan-zhi^{1,2}, WANG Zhi-long^{1,2}, SU Jun-cheng^{1,2}, CHANG Lian-ying^{1,2}, LYU Ming^{1,2}, ZHU Yan^{1,2*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. Research and Development Center of Chinese Medicine, Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the anti-platelet aggregation activities of the Chinese patent medicines (CPM) for promoting blood circulation and removing blood stasis, explore the medication rules, and provide certain experimental basis for the development of anti platelet drugs. **Method:** High-throughput microwell turbidimetric method was used to detect drug response to platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP) and thrombin. **Result:** The 41 kinds of tested Chinese patent medicines (CPM) showed antagonistic effect in different degrees (inhibitory rate of 30%~98%) on platelet aggregation induced by ADP or thrombin. 18 kinds of CPM among them showed selectivity for the inducers. Formulation analysis revealed that highest anti-platelet aggregation activities were demonstrated by the CPM containing ingredients of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Chuanxiong Rhizoma*, *Carthami Flos*, *Notoginseng Radix et Rhizoma*, and *Borneolum Syntheticum*.

[收稿日期] 20160127(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274128);国家国际科技合作专项(2013DFA31620)

[第一作者] 孟燕芝, 硕士, 从事心血管药理学研究, Tel: 18322596853, E-mail: mengyanzhiyanzi@163.com

[通讯作者] * 朱彦, 博士, 教授, 从事心血管药理学研究, Tel: 15822700439, E-mail: yanzhu.harvard@iCloud.com

Furthermore, the CPMs with promoting blood circulation character were more frequently combined with those of multi-tonic medicine, resuscitation medicine and hemostatic medicine to achieve more potent inhibitory effects on platelet aggregation. **Conclusion:** The compound CPMs for promoting blood circulation and removing blood stasis can achieve anti-platelet aggregation activity by anti-ADP and antithrombin means. The medicines with ‘Qi-regulating’, ‘Qi-tonifying’ and ‘resuscitation’ efficacy may strengthen the activity of anti-platelet aggregation.

[**Key words**] promoting blood circulation and removing blood stasis; Chinese patent medicine; anti-platelet aggregation; compatibility law

由血栓引起的心脑血管疾病是世界范围内导致死亡的主要原因之一,血小板在生理性止血和病理性血栓形成过程中发挥着重要作用^[1-2]。抗血小板聚集药物具有抑制血小板的黏附、聚集和释放功能,抗血小板治疗有助于减少心脑血管不良事件的发生^[3],成功降低血栓疾病的死亡率和发病率^[4]。现阶段临床广泛使用的抗血小板治疗化学药物(如阿司匹林,氯吡格雷和整合素 $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ 拮抗剂等)出现的药物抵抗、易出血、非特异性选择等副作用^[5]使得人们急需开发药效强、副作用小的抗血小板药物。联合用药在抗栓药物临床试验上已成为主要趋势,氯吡格雷/阿司匹林联合用药大型临床试验初期结果表明联合用药可以增进疗效、降低副作用^[6-7]。另一项以氯吡格雷、阿司匹林和 PAR-1 拮抗剂 SCH-530348 共用的三药联合用药二期临床试验结果表明联合用药使心血管事件和心肌梗死(MI)指标分别降低了 46% 和 52%^[8]。中医学认为血栓形成是“血脉不通,血行失度,血凝而不流,血气不至”所致,属“血瘀证”范畴,对血瘀证的治疗常用活血化瘀法。活血化瘀中药在治疗血瘀证方面具有悠久的历史^[9],相关研究表明,活血化瘀类中药可通过拮抗血小板异常活化而有效干预血栓的形成^[10]。中药复方经过加减配伍使其具有多组分、多靶点、

多效应的治疗特点,除传统方药外,复方丹参滴丸等现代制剂取得了显著的成绩^[11-16]。良好的发展前景使市场上活血化瘀类复方中成药品种繁多、质量参差不齐,文献报道中临床和单一制剂研究占据了较大比例,缺乏基础研究和制剂间的横向比较。

本研究采用比浊法,利用微孔板和离体血小板建立的高通量筛选方法对 58 种活血化瘀类复方中成药进行抗血小板聚集活性评价并分析其用药规律,挖掘中成药资源,为抗血小板现代中药的研发提供实验依据。

1 材料

健康 SD 雄性大鼠,200 ~ 220 g,SPF 级,购于军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK-(军)2007-004。

药物来源于《中国药典》2015 年版一部及药源网、找药网等网络途径。遴选原则:①药品说明书功效主治中含有“活血化瘀”相关字样;②经国家食品药品监督管理局(CFDA)网站查询,具有国家批准文号;③药品主要成分为 2 味或 2 味以上中药复方。于天津市各大正规药店购买得到符合上述遴选条件的药物共计 58 种(本试验操作均在药物保质期内完成),其基本信息见表 1。

表 1 58 种活血化瘀类复方中成药

Table 1 58 Chinese patent medicines for promoting blood circulation and removing blood stasis

No.	药物名称	主要成分	生产厂家	批号
C-1	参松养心胶囊	人参、麦冬等	北京以岭药业有限公司	1108021
C-2	康尔心胶囊	三七、人参等	长春银诺克药业有限公司	20110311
C-3	抗栓胶囊	当归尾、丹参等	哈尔滨大洋制药股份有限公司	110901
C-4	利脑心胶囊	丹参、川芎等	吉林敖东延边药业股份有限公司	1110002
C-5	脑络通胶囊	丹参、川芎等	四川泰华堂制药有限公司	120101
C-6	芪蒴强心胶囊	黄芪、人参等	石家庄以岭药业股份有限公司	111202
C-7	天丹通络胶囊	川芎、丹参等	山东凤凰制药股份有限公司	1109224
C-8	通心络胶囊	人参、水蛭等	石家庄以岭药业股份有限公司	110939
C-9	心可宁胶囊	丹参、三七等	吉林金宝药业股份有限公司	110601
C-10	心可舒胶囊	丹参、葛根等	山东沃华医药科技股份有限公司	110202
C-11	心脑康胶囊	丹参、赤芍等	长春银诺克药业有限公司	20120104

续表 1

No.	药物名称	主要成分	生产厂家	批号
C-12	血府逐瘀胶囊	桃仁(炒)、红花等	天津宏仁堂药业有限公司	B03020
C-13	步长脑心痛胶囊	黄芪、赤芍等	陕西步长制药有限公司	111186
C-14	灯盏生脉胶囊	灯盏细辛、人参等	云南生物谷灯盏花药业有限公司	20120905
C-15	逐瘀通脉胶囊	水蛭、桃仁等	哈药集团三精千鹤制药有限公司	20121002
C-16	脑安胶囊	川芎、当归等	辽源誉隆亚东药业有限责任公司	120101
C-17	血栓心脉宁胶囊	川芎、槐花等	吉林华康药业股份有限公司	120910
C-18	正心泰胶囊	黄芪、葛根等	贵州百祥制药有限责任公司	20120701
C-19	复方血栓通胶囊	三七、黄芪等	广东众生药业股份有限公司	120821
T-1	丹七片	丹参、三七	天津同仁堂集团股份有限公司	B89001
T-2	复方丹参片(北京)	丹参、三七等	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂	12126606
T-3	复方丹参片(云南)	丹参、三七等	云南白药集团股份有限公司	20110477
T-4	冠脉宁片	丹参、没药(炒)等	长春万德制药有限公司	20120202
T-5	活血通脉片	鸡血藤、桃仁等	云南维和药业股份有限公司	120367
T-6	精制冠心病片	赤芍、川芎等	河南华茸堂药业有限公司	211002
T-7	脑得生片	三七、川芎等	哈尔滨华雨制药集团有限公司	20120302
T-8	脑血栓片	红花、当归等	吉林龙泰制药股份有限公司	20111101
T-9	消栓通络片	川芎、丹参等	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂	1124634
T-10	心可舒片	丹参、葛根等	山东沃华医药科技股份有限公司	110606
T-11	养心氏片	黄芪、人参等	青岛国风药业股份有限公司	110616
T-12	脂降宁片	山楂、制何首乌等	通化金恺威药业有限公司	120103
T-13	冠脉通片	枸杞子、何首乌等	天津同仁堂集团股份有限公司	82001
T-14	荷丹片	荷叶、丹参等	南昌济顺制药有限公司	20121006
T-15	通脉降脂片	笔管草、川芎等	吉林百姓堂药业有限公司	20120401
T-16	血府逐瘀片	桃仁、红花等	陕西海天制药有限公司	120801
D-1	复方丹参滴丸	丹参、三七等	天津天士力制药股份有限公司	111123
D-2	芪参益气滴丸	黄芪、丹参等	天津天士力制药股份有限公司	120509
P-1	华佗再造丸	川芎、吴茱萸等	广州奇星药业有限公司	1426
P-2	活心丸	人参、灵芝等	广州白云山制药总厂	1120001
P-3	人参再造丸	人参、蕲蛇(酒炙)等	吉林天强制药有限公司	111201
P-4	消栓再造丸	血竭、赤芍等	北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂	1013528
P-5	血府逐瘀丸	柴胡、当归等	药都制药集团股份有限公司	120413
P-6	通脉养心丸	地黄、鸡血藤等	天津中新药业集团股份有限公司同仁堂制药厂	B107253
P-7	心宝丸	洋金花、人参等	广东心宝制药有限公司	20120501
P-8	益心丸	红参、牛角尖粉等	广东万年青制药有限公司	110905
G-1	乐脉颗粒	丹参、川芎等	四川川大华西药业股份有限公司	120114
G-2	通脉颗粒	丹参、川芎等	修正药业集团股份有限公司	111110
G-3	血府逐瘀颗粒	柴胡、当归等	江苏晨牌药业有限公司	110926
G-4	稳心颗粒	党参、黄精等	山东步长制药股份有限公司	120821
G-5	丹芍通脉颗粒	丹参、红花等	成都恩威药业有限公司	1111002
I-1	丹红注射液	丹参、红花	菏泽步长制药有限公司	13081025
I-2	香丹注射液	丹参、降香	湖北天圣康迪制药有限公司	20120404
I-3	疏血通注射液	水蛭、地龙	牡丹江友搏药业有限责任公司	11111122
I-4	醒脑静注射液	天然麝香、冰片等	大理药业股份有限公司	1112091
I-5	脉络宁注射液	金银花、牛膝等	金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂	20111006
I-6	血必净注射液	红花、赤芍等	天津红日药业股份有限公司	1207161
I-7	参麦注射液	红参、麦冬	正大青春宝药业有限公司	1107201
I-8	参附注射液	红参、附片	雅安三九药业有限公司	110804

注: C. 胶囊剂; T. 片剂; D. 滴丸剂; P. 丸剂; G. 颗粒剂; I. 注射液。

ADP,葡萄糖,氯化钠,碳酸氢钠,氯化镁,磷酸二氢钾,氯化钙(Sigma 公司,批号分别为 01905-1G-F, V900392-500G, S5886-1KG, S5761-500G, M8266-100G, P5655-500G, C5610-500G);凝血酶,柠檬酸,柠檬酸钠,Tris-base(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 T4698-1KU, C8610, C8532-500G, T8060-5KG);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20150371)。

Flex Station 3 型多功能读板机(美国 Molecular Devices 公司);S20P 型 pH 仪,1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);ZLXS5003Y 型纯水/超纯水系统(美国 Millipore 公司),RC6+ 型落地式冷冻离心机(美国 Thermo 公司),HYC-260 型药品保存箱(青岛海尔公司),HG211 型微量移液器(德国 Eppendorf 公司),96 孔培养板(美国 Corning 公司)。

2 方法

2.1 药物的配制 胶囊剂取内容物,片剂、浓缩丸等用研钵研为粉末,蜜丸用剪刀剪碎,颗粒剂不作处理。所有药物根据不同剂型经上述方法处理后用超纯水超声提取,提取液室温 1 万 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,吸取上清为母液制成储备药液。所有母液按新版“天津中医药大学-滨海组分库命名规则”进行条形码编辑,加入中成药名称信息打印条形码,使用“海尔生物样本库资源管理信息系统”录入天津中医药大学滨海组分库保存备用,用时稀释(注射液取适量原液稀释)。根据徐叔云主编的《药理学实验方法》^[17]中“大鼠的等效剂量 = 人口服剂量/体重 $\times 6.3$ ”(人体重 60 kg)计算储备药液浓度,储备药液浓度 = 人单日口服剂量/60 kg $\times 6.3$ (10 倍)。

2.2 血小板的制备 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,用装有 10% ~ 15% ACD 溶液(38 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸,75 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠,124 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)的 10 mL 无菌注射器以腹主动脉分叉处向近心端 1 ~ 3 mm 处穿刺取血。全血室温 200 $\times g$ 离心 10 min,取上清分离得富血小板血浆(PRP)。PRP 800 $\times g$ 离心 10 min 后将血小板重悬于 Buffer A 溶液(130 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸钠,9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠,6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖,0.9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁,0.81 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-base, pH 7.4)中调节血小板密度为 1×10^8 个/mL。

2.3 抗血小板聚集高通量活性筛选 实验设置阳性组,反应体系为血小板 100 μL + 阿司匹林 50 μL + 激动剂 50 μL ;因中药大多有颜色固设置背景组排除药物颜色对实验的影响。除激动剂外将血小

板等加入透明 96 孔板(每组设置 3 个复孔)放入多功能酶标仪中,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温震荡孵育 10 min。待血小板与药物充分反应融合,取出加入含钙激动剂(ADP,凝血酶终浓度分别为 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.5 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)恒温震动,每隔 45 s 读数 1 次,期间震荡 20 s,连续监测 30 min 内各孔吸光度 A,检测波长 405 nm。实验分组及反应体系建立见表 2。

表 2 抗血小板聚集反应体系

组别	血小板	待测药	Buffer A	激动剂
空白	100	-	100	-
阳性	100	-	50	50
实验	100	50	-	50
背景	-	50	150	-

2.4 数据处理 使用 Flex Station 3 多功能读板机自带 Softmax Pro v5.2 软件导出实验数据至 Office Excel 中分析各孔各个时间点的 A,根据公式聚集率 $_t = (A_{t=0} - A_t) / A_{t=0} \times 100\%$ ^[18];抑制聚集率 = (最大聚集率_{阳性组} - 最大聚集率_{实验组}) / 最大聚集率_{阳性组} $\times 100\%$ ^[19]分别计算血小板聚集率、药物抑制聚集率,并计算出各组平均值和标准差。实验数据采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理,数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

58 种活血化瘀类复方中成药拮抗 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集活性见表 3。结果显示,受试药物中有 41 种复方中成药能不同程度的拮抗(药物血小板抑制聚集率达 30% ~ 98%)由 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集,也有部分药物没有表现出抗血小板聚集的作用。其中,芪苈强心胶囊、天丹通络胶囊、心可舒胶囊、血栓心脉宁胶囊、复方丹参片(云南)、消栓通络片、心可舒片、冠脉通片、荷丹片、乐脉颗粒、香丹注射液、脉络宁注射液这 12 种复方对 2 种激动剂诱导的血小板抑制聚集率均达到了 50% 以上,说明这些复方含有的多组分可通过不同途径发挥其抗血小板聚集作用。脑络通胶囊、稳心颗粒、醒脑静注射液、血必净注射液、参麦注射液这 5 种复方仅对 ADP 诱导的血小板聚集反应有较好的拮抗作用(对 ADP 抑制聚集率 60% 以上,凝血酶 30% 以下);心脑康胶囊、脂降宁片、血府逐瘀颗粒、复方丹参滴丸、活血通脉片、通脉颗粒、脑得生片、参松养心胶囊、华佗再造丸、正心泰胶囊、精制冠心病片、脑血栓片、康尔心胶囊这 13 种复方仅对凝血酶诱导

的血小板聚集有较好的抑制作用(对凝血酶抑制聚集率 60% 以上,ADP 30% 以下)。这 18 种复方表现

出对诱导剂的选择性,说明其可通过对应单一靶点拮抗血小板聚集。

表 3 58 种活血化癥类复方中成药血小板抑制聚集率($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Inhibitory rate on platelet aggregation by 58 Chinese patent medicines for promoting blood circulation and removing blood stasis ($\bar{x} \pm s, n=3$)

No.	ADP	凝血酶	No.	ADP	凝血酶	No.	ADP	凝血酶
C-1	14.13 ± 10.69	74.07 ± 8.92	T-2	30.34 ± 3.62	93.70 ± 0.42	P-4	16.02 ± 3.77	4.73 ± 0.74
C-2	26.77 ± 5.75	89.05 ± 1.18	T-3	71.93 ± 1.28	94.86 ± 0.80	P-5	13.06 ± 4.19	13.16 ± 2.60
C-3	28.01 ± 4.21	-11.91 ± 2.49	T-4	36.80 ± 4.64	95.11 ± 0.28	P-6	40.05 ± 0.82	-2.00 ± 0.55
C-4	-4.45 ± 3.34	10.58 ± 3.02	T-5	7.52 ± 2.79	89.67 ± 0.41	P-7	15.48 ± 0.53	-1.28 ± 0.40
C-5	81.88 ± 3.46	-2.85 ± 2.86	T-6	23.88 ± 5.87	94.04 ± 0.20	P-8	10.24 ± 1.56	-0.83 ± 0.41
C-6	85.17 ± 1.41	63.79 ± 4.48	T-7	8.79 ± 3.39	66.19 ± 3.82	G-1	81.88 ± 0.94	83.59 ± 0.63
C-7	65.46 ± 6.15	74.99 ± 1.63	T-8	26.42 ± 2.71	94.69 ± 0.09	G-2	8.03 ± 4.24	97.38 ± 0.05
C-8	4.46 ± 2.95	-3.91 ± 1.01	T-9	80.98 ± 2.81	90.79 ± 0.58	G-3	-5.93 ± 2.76	89.80 ± 0.03
C-9	43.83 ± 7.14	92.78 ± 0.21	T-10	92.01 ± 0.87	93.12 ± 0.42	G-4	61.85 ± 8.92	7.45 ± 0.58
C-10	88.32 ± 0.76	94.29 ± 0.27	T-11	19.91 ± 1.88	-0.11 ± 1.42	G-5	40.08 ± 0.81	71.48 ± 5.09
C-11	-10.98 ± 3.00	89.44 ± 1.02	T-12	-6.53 ± 6.79	69.54 ± 3.07	I-1	40.12 ± 5.35	96.37 ± 0.04
C-12	23.18 ± 3.54	1.97 ± 1.75	T-13	80.05 ± 1.14	87.89 ± 1.21	I-2	86.78 ± 0.97	96.70 ± 0.28
C-13	25.08 ± 3.64	0.84 ± 0.81	T-14	62.42 ± 1.15	90.10 ± 0.53	I-3	-4.97 ± 2.50	-2.22 ± 0.25
C-14	45.34 ± 2.10	87.27 ± 1.39	T-15	13.33 ± 1.24	3.89 ± 0.36	I-4	61.43 ± 13.96	18.07 ± 0.71
C-15	41.61 ± 1.34	28.58 ± 1.14	T-16	8.67 ± 1.23	-2.83 ± 0.52	I-5	92.93 ± 1.37	93.70 ± 1.96
C-16	33.55 ± 0.74	0.97 ± 0.48	D-1	6.91 ± 2.17	76.22 ± 1.30	I-6	63.59 ± 1.96	20.70 ± 0.93
C-17	69.64 ± 1.89	94.37 ± 0.96	D-2	24.31 ± 5.15	25.47 ± 1.28	I-7	66.18 ± 4.62	18.49 ± 0.95
C-18	22.30 ± 2.46	93.86 ± 0.51	P-1	19.38 ± 1.60	83.78 ± 0.90	I-8	49.14 ± 3.71	15.97 ± 2.63
C-19	24.57 ± 0.52	24.66 ± 1.88	P-2	2.31 ± 0.39	1.08 ± 0.75			
T-1	16.92 ± 2.80	42.83 ± 3.54	P-3	4.09 ± 4.77	11.68 ± 1.12			

有 36 种复方对至少一种激动剂的抑制率超过 50%,按照《中药学》^[20]对这 36 种复方中成药说明书中包括的所有中药(73 味)按照功效进行分类(17 种),对使用频次相对较高的单味中药及中药种类的应用情况归纳汇总见表 4,5。结果显示,具有较强活性的复方中成药一般含有丹参、川芎、红花、三七、冰片等药味。活血化癥类复方中成药发挥其抗血小板聚集的作用多配伍补虚药、开窍药、止血药加以应用。

4 讨论

活血化癥类复方中成药是在中医药理论指导下具有疏通血脉、祛除瘀血作用的现代化药物,其处方组成多由古(经)方发展而来,用药规律有迹可循。作为人类治疗心血管疾病的重要武器,活血化癥类复方中成药已广泛应用于临床,而且新的品种和剂型不断涌现,治疗领域不断拓展^[21-24]。本研究利用

表 4 36 种抗血小板阳性药物中出现频次 ≥ 10 的中药

Table 4 Herbs with frequency ≥ 10 in 36 kinds of anti-platelet positive medicines

No.	名称	类别	频数/次
1	丹参	活血化癥药	28
2	川芎	活血化癥药	16
3	红花	活血化癥药	14
4	三七	止血药	11
5	冰片	开窍药	11
6	山楂	消食药	9
7	赤芍	清热药	9
8	人参	补虚药	8
9	葛根	解表药	8
10	何首乌	补虚药	6

微孔板和离体血小板建立的抗血小板聚集药物高通量活性筛选方法^[25-26]对 58 种市售活血化癥类复方

表 5 36 种抗血小板阳性药物中药种类应用频次统计
Table 5 Statistics on application frequency of herbs in 36 kinds of anti-platelet positive medicines

No.	类别	频数/次	No.	类别	频数/次
1	活血化瘀药	83	10	安神药	5
2	补虚药	43	11	收涩药	4
3	开窍药	17	12	利水渗湿药	4
4	止血药	17	13	祛风湿药	4
5	清热药	16	14	化痰止咳平喘	3
6	理气药	12	15	温里药	2
7	解表药	11	16	攻毒杀虫止痒	2
8	消食药	9	17	泻下药	1
9	平肝息风药	7			

中成药在抗血小板聚集方面的活性进行评价,整个检测过程均可由 Flex Station 3 多功能读板机完成,实验方法高效、准确,可用于大样本的药物抗血小板聚集作用高通量活性筛选,为药物的进一步开发和临床应用提供数据支持。

已知 ADP 可通过结合血小板膜受体,抑制腺苷酸环化酶,引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,激活血小板,提高血小板磷脂酶 A_2 活性,促进血小板内花生四烯酸代谢,增加血栓素 A_2 的生成与活性,诱导血小板聚集^[27]。凝血酶能够通过受体结合增加内源性 ADP 释放,引起血小板聚集。本实验采用 ADP 和凝血酶这两种诱导剂检测市售 58 种活血化瘀类复方中成药对血小板聚集的作用,其中有 12 种药物对这两种诱导剂引起的血小板聚集均有较强抑制作用,提示其作用机制可能与其阻断体内 ADP 诱导血小板的黏附、聚集、活化,进而抑制血小板花生四烯酸的代谢有关。本研究结果为后续各药物作用机制研究提供了大致方向,也为研究开发新型抗血小板药物提供了更加丰富的品种。

丹参作为传统活血化瘀类中药,在治疗心血管疾病方面已被广泛运用^[28]。现代研究表明,丹参含有多种抗血小板聚集作用的成分,如丹酚酸 A 可通过抑制 PI3K 信号通路拮抗血小板聚集^[29],丹酚酸 B 直接作用于胶原受体 $\alpha 2\beta_1$ 抑制血小板黏附^[30]。评价的 58 种活血化瘀类复方中成药中丹参出现在 38 种复方中,在 36 种抗血小板聚集活性较强的复方中丹参被使用 28 次,而在 18 种抗血小板聚集活性较弱的复方(对 2 种诱导剂的抑制聚集率均在 30% 以下)中丹参仅出现 7 次,说明丹参在活血化瘀类复方组方中的重要性,可进一步开发其抗血小

板聚集活性。分析发现,丹参在复方中多配伍川芎、红花、三七、冰片、山楂、赤芍、葛根等药味发挥药效。在含有葛根的 12 种复方制剂中,有 6 种制剂对凝血酶诱导的血小板聚集抑制率达到了 80% 以上,其中 5 种制剂的抑制聚集率超过 90%,而这 12 种复方对 ADP 诱导的血小板聚集反应抑制率多在 30% 以下,提示葛根可能对凝血酶诱导的血小板聚集具有较好的抑制作用,有望开发成选择性拮抗剂。有文献报道^[31-32],葛根可通过抑制凝血酶受体 mRNA 表达拮抗凝血酶诱导的血管平滑肌增殖,但在 CNKI 中并未检索到葛根对凝血酶诱导的血小板聚集反应影响的相关文献,需进一步研究确定。吕明等^[33]采用网络药理学方法分析了 224 种活血化瘀类复方中成药的配伍规律和抗血栓作用机制,结果发现含丹参、川芎、红花的活血化瘀类中成药抑制血栓形成主要与其抑制炎症反应有关,并且多具有较好的抗血小板聚集作用,抗炎和抗血小板的联合应用,也为指导活血化瘀类中成药临床用药和新药开发提供了较好的指导意义。

中医传统气血理论认为“气为血之帅”,即“气”具有生血、行血、摄血的功能。本实验结果显示,在对 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集反应抑制率均达到 50% 以上的 12 种复方制剂中,有 9 种制剂为“气-血药”(复方具有“理气”、“补气”等功效,或含有对应的药味),在全部 42 种“气-血”药中,有 26 种对至少一种激动剂的抑制率超过 50%,这与中医传统气血理论相吻合,从实验角度说明气药行气加强活血其机制或许在于其抗血小板聚集作用。其中使用频率较高的“气药”依次为人参、黄芪、木香。此外,12 种活性较强的复方中,有 5 种为“窍-血药”(复方具有“开窍”、“通窍”等功效,或含有对应的药味),在全部 23 种“窍-血药”中,有 14 种对至少一种激动剂的抑制率超过 50%。使用频率较高的“窍药”依次为冰片、石菖蒲、麝香。可见“理气”、“补气”、“开窍”等功效的药味或可增强活血化瘀类复方中成药抗血小板聚集的活性。

[参考文献]

[1] Franco A T, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer[J]. Blood, 2015, 126(5): 582-588.

[2] Furie B, Furie B C. Mechanisms of thrombus formation [J]. N Engl J Med, 2008, 359(9): 938-949.

[3] 刘玥,殷惠军,史大卓,等. 活血化瘀中药与抗血小板治疗[J]. 科学通报, 2014, 59(8): 647-655.

[4] Baigent C, Kappelle L J, Algra A, et al.

- Antithrombotic trialists' collaboration. Collaborate meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients [J]. *Brit Med*, 2002, 324 (12): 71-86.
- [5] Michelson A D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(2): 154-169.
- [6] Gurbel P A, Tantry U S. Combination antithrombotic therapies [J]. *Circulation*, 2010, 121(4): 569-583.
- [7] Sabatine M S, Cannon C P, Gibson C M, et al. Effect of clopidogrel pretreatment before percutaneous coronary intervention in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with fibrinolytics: the PCI-CLARITY study [J]. *JAMA*, 2005, 294(10): 1224-1232.
- [8] Becker R C, Moliterno D J, Jennings L K, et al. Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo controlled phase II study [J]. *Lancet*, 2009, 373(15): 919-928.
- [9] 徐大鹏. 活血化瘀中药之药理研究 [J]. *科技与企业*, 2012, 21(15): 358.
- [10] 夏敏. 活血化瘀中药抗血栓作用研究进展 [J]. *中医药导报*, 2012, 18(4): 83-87.
- [11] 王炳岐. 步长丹红注射液获中国中药首个专利金奖 [J]. *世界中医药*, 2011(1): 91-92.
- [12] 常连赢, 朱彦, 高秀梅. 丹红注射液抗血栓作用研究进展 [J]. *天津中医药大学学报*, 2013, 32(4): 246-249.
- [13] 丹扬. 天士力复方丹参滴丸顺利通过美国 FDA II 期临床试验 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 29(2): 1121.
- [14] 商洪才. 芪参益气滴丸对心肌梗死二级预防的临床试验研究通过专家组验收 [J]. *天津中医药*, 2010, 27(4): 266.
- [15] 陈景瑞, 魏静, 朱利洁, 等. 芪参益气滴丸对心血管系统疾病的药理作用研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(2): 434-437.
- [16] 齐广平. 血府逐瘀胶囊治疗冠心病心绞痛的疗效和安全性 [J]. *中国继续医学教育*, 2015, 7(3): 249-250.
- [17] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 202.
- [18] Born G V. Aggregation of blood platelets by diphosphate and its reversal [J]. *Nature*, 1962, 194 (4832): 927-929.
- [19] 范莉, 濮润, 赵海誉, 等. 红花抗 ADP 诱导的血小板聚集活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(9): 1242-1244.
- [20] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 1-8.
- [21] 王万杰, 郑燕林, 周绿绿. 穴位注射联合复方丹参片治疗视神经萎缩临床观察 [J]. *四川中医*, 2015, 33(9): 178-180.
- [22] 柳占彪, 许放, 张少卓, 等. 复方丹参滴丸对大鼠肝纤维化治疗作用的组织病理学影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 246-248.
- [23] 胡倩倩. 云南白药联合宫颈环形电切术治疗慢性宫颈炎 82 例 [J]. *河南中医*, 2015, 35(4): 859-861.
- [24] 孟磊, 陈浩, 汤水福, 等. 活血化瘀类中成药在动静脉内瘘成形术后的应用 [J]. *光明中医*, 2006, 21(9): 79-80.
- [25] Moran N, Kiernan A, Dunne E, et al. Monitoring modulators of platelet aggregation in a microtiter plate assay [J]. *Anal Biochem*, 2006, 357(1): 77-84.
- [26] Bednar B, Condra C, Gould R J, et al. Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists [J]. *Thromb Res*, 1995, 77(5): 453-463.
- [27] 王明星. 脑心舒胶囊的药效物质基础及药效学实验研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2008.
- [28] 杨志霞, 林谦, 马利. 丹参对心血管疾病药理作用的文献研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(2): 93-96.
- [29] Huang Z S, Zeng C L, Zhu L J, et al. Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(6): 1383-1393.
- [30] Wu Y P, Zhao X M, Pan S D, et al. Salvianolic acid B inhibits platelet adhesion under conditions of flow by a mechanism involving the collagen receptor alpha2beta1 [J]. *Thromb Res*, 2008, 123(2): 298-305.
- [31] 许轶洲, 李佩璋, 王宁夫, 等. 葛根素对血管平滑肌细胞增殖及 Bcl-2 蛋白和凝血酶受体 mRNA 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(2): 123-126.
- [32] 许轶洲, 王宁夫, 李佩璋, 等. 葛根素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(7): 476-479.
- [33] 吕明, 王泰一, 田晓轩, 等. 网络药理学分析揭示的常用活血化瘀中药抗炎-抗血栓作用 [J]. *药学学报*, 2015, 50(9): 1135-1141.

[责任编辑 邹晓翠]