

基于活性筛选和靶标网络预测的蒲黄和赤芍选择性抑制血小板聚集作用

王潇毅^{1,2}, 田晓轩^{1,2}, 张砚¹, 吴红华^{1,2}, 王跃飞^{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:探讨常用活血化瘀中药抗血小板活性的激动剂选择性及可能的作用通路。方法:通过体外高通量血小板聚集实验系统评价24种常用活血化瘀中药醇提取物抗二磷酸腺苷(ADP)和凝血酶诱导的血小板聚集活性;通过Ingenuity Pathway Analysis(IPA)预测代表性药物蒲黄与赤芍已知单体成分的作用靶点,并加以验证。结果:蒲黄抗ADP,凝血酶诱导血小板聚集的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为55.27,300.60 mg·L⁻¹;赤芍抗ADP,凝血酶诱导血小板聚集的IC₅₀分别为336.20,101.60 mg·L⁻¹。IPA预测提示,蒲黄与赤芍有可能通过调节Ca²⁺,环磷酸腺苷(cAMP)和一氧化氮(NO)水平抑制血小板聚集。实验发现,蒲黄可明显抑制ADP对血小板内Ca²⁺的升高(P<0.05,P<0.01);赤芍可显著提高凝血酶导致血小板内NO浓度降低(P<0.01);蒲黄、赤芍均不能逆转ADP,凝血酶引起的血小板内cAMP浓度降低。结论:蒲黄和赤芍醇提取物分别具有选择性抗ADP和凝血酶诱导的大鼠血小板聚集活性。与IPA预测相符,蒲黄可降低血小板内钙离子水平,赤芍可提高血小板内NO浓度,可能分别激活嘌呤能P₂Y₁受体下游的Gq亚基/磷脂酶C(PLC)/三磷酸肌醇(IP3)和磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)通路抑制血小板聚集。

[关键词] 蒲黄;赤芍;二磷酸腺苷;凝血酶;Ingenuity Pathway Analysis;选择性抗血小板聚集

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0120-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017010120

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160906.0933.064.html>

[网络出版时间] 2016-09-06 9:33

Selective Inhibitory Effect of Typhae Pollen and Paeoniae Radix Rubra on Platelet Aggregation Based on Activity Screening and Target Network Prediction

WANG Xiao-yi^{1,2}, TIAN Xiao-xuan^{1,2}, ZHANG Yan¹, WU Hong-hua^{1,2}, WANG Yue-fei^{1,2}, ZHU Yan^{1,2*}

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the selective inhibitory effect of the Chinese medicines with functions of promoting blood circulation and removing blood stasis on platelet aggregation, and explore the underlying mechanism. **Method:** Ethanol extracts of 24 kinds of common promoting blood circulation and removing blood stasis Chinese medicines were evaluated for adenosine diphosphate (ADP) and thrombin-induced platelet aggregation activity by using *in vitro* high throughput platelet aggregation assay. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was used to predict and verify the potential targets of the known monomer components in representative herbs Typhae Pollen and Paeoniae Radix Rubra. **Result:** The IC₅₀ of Typhae Pollen on platelet aggregation induced by

[收稿日期] 20160120(009)

[基金项目] 国际科技合作专项(2013DFA31620);国家自然科学基金项目(81274128,81303144,81202798)

[第一作者] 王潇毅,硕士,从事中药抗血小板聚集机制研究,Tel:13920996027,E-mail:1169484004@qq.com

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

ADP and thrombin was 55.27, 300.60 mg·L⁻¹ respectively, while the IC₅₀ of Paeoniae Radix Rubra was 336.20, 101.60 mg·L⁻¹ respectively. IPA prediction showed that Typhae Pollen and Paeoniae Radix Rubra inhibited platelet aggregation probably by regulating the calcium mobilization (Ca²⁺), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and nitric oxide (NO) levels. The results showed that Typhae Pollen could significantly inhibit the level increase of Ca²⁺ in platelet stimulated by ADP ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Paeoniae Radix Rubra could significantly increase the level decrease of NO in platelet induced by thrombin ($P < 0.01$). Both of Typhae Pollen and Paeoniae Radix Rubra could not reverse the level decrease of cAMP induced by ADP or thrombin. **Conclusion:** The ethanol extracts of Typhae Pollen electively inhibited the platelet aggregation induced by ADP, while the ethanol extracts of Paeoniae Radix Rubra selectively inhibited the platelet aggregation induced by thrombin. As the prediction by IPA, Typhae Pollen could decrease the level of Ca²⁺ and Paeoniae Radix Rubra could increase the level of NO, and they could inhibit the platelet aggregation probably by activating Gq/phospholipase C (PLC) /inositol triphosphate (IP3) of P₂Y₁, and phosphatidylinositide-3-kinases (PI3K) /Akt/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathways respectively.

[Key words] Typhae Pollen; Paeoniae Radix Rubra; adenosine diphosphate; thrombin; Ingenuity Pathway Analysis; selective inhibition of platelet aggregation

血小板是血液的重要组成部分,参与体内正常凝血途径。但血小板功能异常可诱发缺血性疾病^[1]。血小板聚集与其表面上的 G 蛋白偶联受体 (GPCRs),特别是二磷酸腺苷 (ADP) 受体、凝血酶受体激活关系密切,抗血小板新药的研发也多围绕 GPCR 受体拮抗剂展开,如嘌呤能受体 (P₂Y₁₂) 的拮抗剂替卡格雷等,蛋白酶激活受体-1 (PAR-1) 拮抗剂沃拉帕沙等^[2]。但单体抗血小板药物的临床应用伴随着药物抵抗作用和增加出血风险等副作用^[3]。活血化瘀中药抗血小板作用确切,可改善血瘀证中血小板异常活化所产生的病理效果^[4],但其选择性抗血小板作用鲜有报道。中药成分复杂,药效成分与靶点间存在极其复杂的网络关系,采用复杂的网络模型分析中药多成分-多靶点的作用关系并加以实验验证,已成为研究中药药效机制的新模式。吴钉红等^[5]利用分子对接法结合网络分析了清热类药物治疗冠心病的机制;牛旭艳等^[6]用 Ingenuity 通路分析软件 (IPA) 网络构建和基因组学方法研究黄柏等治疗热证类风湿性关节炎机制。本实验选取丹参、川芎、赤芍等 24 种常见活血化瘀中药醇提物,以 ADP,凝血酶作为激动剂评价其抗血小板活性,利用 IPA 建立起血小板活化网络模型并预测选择性抗血小板中药的作用靶点,加以实验验证,为选择性抗血小板中药新药开发及其药效机制研究提供新思路。

1 材料

1.1 仪器 Ex1808 型全自动酶标仪 (美国 Biotech 公司), Flexstation3 型多功能读板机 (美国 Molecular

Devices 公司), RC6 + 型落地式离心机 (美国 Thermo 公司), S20P 型 pH 仪 (瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药材与试剂 24 种中药饮片均购自于河北省安国市药材公司,药材由天津中医药大学李天祥教授鉴定为正品。分别称取上述药材 500 g,以 70% 乙醇用冷浸法和回流法制得,提取液合并,减压旋转蒸发制得浸膏,相当于生药 1 g·mL⁻¹,称取浸膏,用超纯水配成质量浓度为 20 g·L⁻¹ 储备液备用。

ADP,凝血酶,前列环素 E₁ (PGE₁),福司可林 (Forscolin),乙酰胆碱酯酶 (AChE) (美国 Sigma 公司,批号分别为 BCBN7489V, SLBM3981V, BCBN9112V, SLBF5617V, BCBC9786V); 替卡格雷 (美国 Selleck Chemicals 公司,批号 S4079); 水蛭素 (上海吉尔生化有限公司,批号 P151210-JC472675); Fluo-3^{AM} (北京索莱宝科技公司,批号 1503625); cAMP Rat 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (美国 Cayman chemical 公司,批号 581001); Griess Reagent System 试剂盒 (美国 Promega 公司,批号 0000118730)。

1.3 动物 36 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,购于天津那瑞增生物公司,合格证号 SCXK (津) 2009-0004。

1.4 网络分析软件与数据库 IPA 软件 (<http://www.ingenuity.com>), 中药整合数据库 (TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid>), TCMDatabase@Taiwan (<http://tcm.cmu.edu.tw>)。

2 方法

2.1 活血化瘀中药抗血小板活性筛选^[7-8] 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血,抗凝,

1 270 r·min⁻¹离心 10 min 得富血小板血浆 (PRP), 2 650 r·min⁻¹离心, 除上清, Tyrode 缓冲液重悬血小板, 调整其密度为 1 × 10⁸ 个/mL。ADP 25 μmol·L⁻¹, 凝血酶 0.5 U·mL⁻¹, Ca²⁺ 2 mmol·L⁻¹, 替卡格雷 1 μmol·L⁻¹, 水蛭素 20 μmol·L⁻¹, 中药醇提物质量浓度 200 mg·L⁻¹。药物与血小板孵育 10 min, 再加入含 Ca²⁺ 的激动剂 ADP 或凝血酶反应 30 min, 酶标仪温度 37 °C, 检测波长 405 nm, 动力学检测 30 min, 间隔 45 s。

$$\text{抑制率} = (\text{最大聚集率}_{\text{空白组}} - \text{最大聚集率}_{\text{药物组}}) / \text{最大聚集率}_{\text{空白组}} \times 100\%$$

2.2 蒲黄、赤芍抗血小板聚集的量效关系 蒲黄、赤芍醇提取物质量浓度为 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 mg·L⁻¹, 加药与反应同 2.1 项, 采用酶标仪测定并计算其浓度, 得到抗 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集的量效曲线, 并计算半数抑制浓度 (IC₅₀)。

2.3 IPA 预测蒲黄、赤芍作用靶点^[9] 从 TCM-ID^[10], TCMDatabase@Taiwan^[11] 数据库整理出蒲黄和赤芍中单体信息并结合 Pubchem 数据库, 附上对应的 Pubchem CID 上传至 IPA 工作界面。将 IPA 所识别的单体添加到血小板活化通路中, 将单体信息定义为 A, 通路靶点信息定义为 B, 利用 IPA “Path Explore” 功能分析二者作用关系。

2.4 血小板钙内流实验^[12-13] 按 2.1 项富集得 PRP, 加入 PGE₁ 至 1 μmol·L⁻¹, 2 650 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, Tyrode 缓冲液重悬血小板, 避光加入 Fluo-3^{AM} 至 5 μmol·L⁻¹, 37 °C 孵育 30 min, 加入相应药物, 蒲黄质量浓度 25, 50, 100 mg·L⁻¹, 赤芍 50, 100, 200 mg·L⁻¹, U73122 浓度 5 μmol·L⁻¹, 37 °C 孵育 15 min, 2 650 r·min⁻¹离心 5 min, 弃上清, Tyrode

缓冲液再重悬。置于多功能读板机中自动加入 Ca²⁺ (2 mmol·L⁻¹), ADP (25 μmol·L⁻¹) 或凝血酶 (0.5 U·mL⁻¹), 设检测波长 488, 525 nm, Flex 模式, 读板间隔 1.5 s。以初始荧光值为 100%, 最大荧光值/初始荧光值得到荧光强度比 (RFU%)。

2.5 血小板内 cAMP 含量检测^[14-15] 按 2.1 项得血小板, 加入蒲黄、赤芍, 质量浓度同 2.4 项, 加入 Forskolin 10 μmol·L⁻¹, 与血小板孵育 10 min, ADP 和凝血酶浓度同 2.4 项, 室温孵育 10 min, 0.1 mol·L⁻¹HCl 裂解血小板, 4 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清, 按照试剂盒说明书操作。

2.6 血小板内 NO 含量检测^[16-17] 按 2.1 项得血小板, 加入蒲黄、赤芍, 质量浓度同 2.4 项, 加入 AchE 2 μmol·L⁻¹, 与血小板孵育 40 min, ADP 和凝血酶浓度同 2.4 项, 室温孵育 20 min, 取上清, 按照试剂盒说明书操作。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件, 计量结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间显著性采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; IC₅₀ 结果运用 Graphpad 5.0 处理、计算。

3 结果

3.1 活血化瘀中药对血小板聚集活性的影响 将抑制率 ≥ 50% 定义为强抗血小板活性。有强抗 ADP 诱导的血小板聚集中药活性由强到弱依次为苏木、虎杖、蒲黄、红景天、鸡血藤、泽兰; 强抗凝血酶的依次为泽兰、虎杖、红景天、鸡血藤、赤芍、大黄。对 ADP, 凝血酶诱导均有强抑制活性的为虎杖、鸡血藤、泽兰、红景天; 仅对 ADP 诱导有强抑制活性的为苏木、蒲黄; 仅对凝血酶诱导有强抑制效果的为赤芍、大黄。见表 1。

表 1 24 种中药醇提物对 ADP 和凝血酶诱导的大鼠血小板聚集影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of ethanol extracts of 24 kinds of Chinese herbs on platelet aggregation induced by ADP and thrombin ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

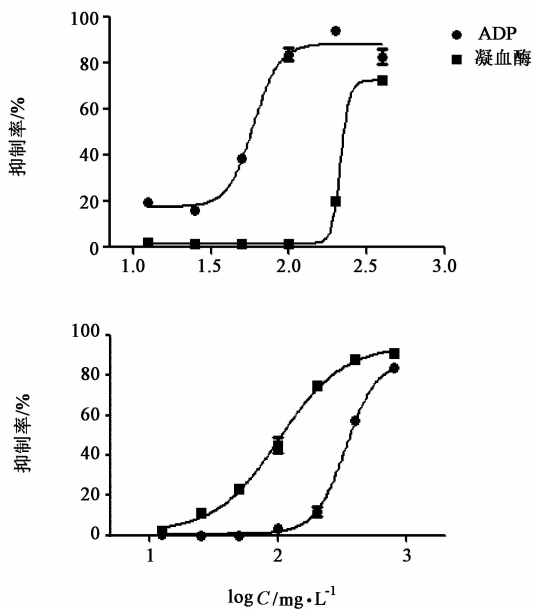
组别	ADP		凝血酶	
	最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率
空白	68.08 ± 3.55	-	89.01 ± 1.14	-
替卡格雷/水蛭素	4.25 ± 0.51 ²⁾	93.76 ± 0.75	32.18 ± 6.89 ²⁾	63.84 ± 7.74
郁金	63.55 ± 2.57	6.65 ± 3.77	86.55 ± 1.64	2.76 ± 1.84
益母草	65.12 ± 3.49	4.34 ± 5.12	86.96 ± 1.30	2.31 ± 1.46
枳壳	61.94 ± 4.56 ²⁾	9.02 ± 6.70	86.74 ± 1.69	2.54 ± 1.90
丹参	51.78 ± 4.61 ²⁾	23.93 ± 6.77	59.11 ± 4.65 ²⁾	33.59 ± 5.22
大黄	52.51 ± 0.58 ²⁾	22.87 ± 0.85	23.21 ± 4.64 ²⁾	73.93 ± 5.21
虎杖	6.95 ± 1.24 ²⁾	89.80 ± 1.81	6.39 ± 2.25 ²⁾	92.82 ± 2.53
茜草	50.77 ± 5.56 ²⁾	25.42 ± 8.17	85.69 ± 1.69	3.73 ± 1.89
赤芍	46.36 ± 1.37 ²⁾	31.90 ± 2.01	21.88 ± 4.66 ²⁾	75.42 ± 5.23
三七	60.70 ± 4.83 ²⁾	10.84 ± 7.10	80.58 ± 3.26 ²⁾	9.47 ± 3.66

续表 1 %

组别	ADP		凝血酶	
	最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率
鸡血藤	11.90 ± 1.01 ²⁾	82.52 ± 1.48	10.19 ± 2.19 ²⁾	88.55 ± 2.46
莪术	71.49 ± 4.46	-5.02 ± 6.55	88.08 ± 5.45	1.05 ± 6.12
泽兰	28.63 ± 1.35 ²⁾	57.95 ± 1.99	3.67 ± 0.74 ²⁾	95.88 ± 0.83
延胡索	59.32 ± 3.71 ²⁾	12.86 ± 5.45	88.38 ± 5.37	0.70 ± 6.03
夏天无	61.90 ± 4.02 ¹⁾	9.07 ± 5.90	88.54 ± 5.95	0.53 ± 6.69
薤白	69.40 ± 2.35	-1.95 ± 3.45	87.76 ± 5.83	1.41 ± 6.55
当归	68.47 ± 2.56	-0.58 ± 3.76	88.42 ± 5.59	0.66 ± 6.27
红花	59.25 ± 1.87 ²⁾	12.96 ± 2.74	90.95 ± 1.34	-2.18 ± 1.50
川芎	50.47 ± 1.02 ²⁾	25.86 ± 1.50	89.01 ± 1.46	0.00 ± 1.64
牛膝	63.62 ± 1.95 ¹⁾	6.55 ± 2.87	89.10 ± 1.60	-0.10 ± 1.79
红景天	9.38 ± 1.17 ²⁾	86.21 ± 1.72	9.74 ± 0.48 ²⁾	89.05 ± 0.54
三棱	50.70 ± 3.78 ²⁾	25.53 ± 5.55	69.87 ± 4.90 ²⁾	21.50 ± 5.51
苏木	6.89 ± 2.18 ²⁾	89.88 ± 3.21	67.08 ± 3.78 ²⁾	24.64 ± 4.25
蒲黄	8.99 ± 1.62 ²⁾	86.79 ± 2.38	89.97 ± 1.33	-1.08 ± 1.50
骨碎补	47.36 ± 3.64 ²⁾	30.44 ± 5.34	53.82 ± 2.37 ²⁾	39.53 ± 2.66

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 蒲黄、赤芍醇提取物抗不同激动剂诱导血小板聚集活性的量效关系 蒲黄抗 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集 IC_{50} 为 55.27, 300.60 $mg \cdot L^{-1}$; 赤芍的分别为 336.20, 101.60 $mg \cdot L^{-1}$ 。表明蒲黄、赤芍对 ADP 和凝血酶诱导的大鼠血小板聚集有选择性抑制作用。见图 1。



A. 蒲黄; B. 赤芍

图 1 蒲黄、赤芍提取物对 ADP, 凝血酶诱导的血小板聚集影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of Typhae Pollen and Paeoniae Radix Rubra ethanol extracts on platelet aggregation induced by ADP or thrombin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 IPA 预测蒲黄和赤芍作用靶点 分别整理出蒲黄、赤芍中化合物 109,219 个,与血小板活化通路有关的化合物分别为 18,29 个,预测出抑制血小板聚集靶点 13,18 个。统计预测靶点与化合物的作用频次,二者最有可能通过调节 Ca^{2+} , cAMP, NO 这 3 个第二信使水平抑制血小板聚集。化合物与这 3 个靶标关系见表 2。

3.4 蒲黄、赤芍对血小板内钙的影响 与空白组比较,ADP 和凝血酶均能显著提高血小板内钙离子水平 ($P < 0.01$);与 ADP 组比较,蒲黄 (25, 100 $mg \cdot L^{-1}$) 能明显降低血小板内钙离子水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);赤芍不能降低血小板内钙离子浓度抑制凝血酶诱导的血小板聚集。见图 2。

3.5 蒲黄、赤芍对血小板内 cAMP 水平影响 与空白组比较,ADP 能明显降低血小板内 cAMP 水平 ($P < 0.05$),凝血酶组不能显著降低血小板内 cAMP 水平;与 ADP 组比较,蒲黄、赤芍均不能提高血小板内 cAMP 水平。见图 3。

3.6 蒲黄、赤芍对血小板内 NO 水平影响 与空白组比较,ADP 和凝血酶均能显著降低血小板内 NO 水平 ($P < 0.01$);与 ADP 组比较,蒲黄所选浓度均不能提高 NO 水平;与凝血酶组比较,赤芍各浓度均能显著性的提高 NO 水平 ($P < 0.01$),且呈现剂量依赖性,抑制抗血小板聚集。见图 4。

4 讨论

活血化痰中药的抗血小板作用已经得到充分

表 2 预测分子靶标与对应化合物

Table 2 Predicted molecular targets and corresponding compounds

分子靶标	蒲黄	赤芍
Ca ²⁺	quercetin, stearic acid, lactic acid palmitic acid, adenine, pyruvic acid	linoleic acid, arginine, lauric acid, oleic acid, palmitic acid, gallic acid, pentadecylic acid, valproic acid, citric acid, myristic acid, propyl gallate, octanoic acid, linalool, eugenol, acetovanillone
camp	nicotinic acid, hypoxanthine monopalmitin, palmitic acid tyramine, adenine	arginine, hydroxyamphetamine palmitic acid, dibutyl phthalate valproic acid, oleanolic acid oleylamine
no	mannitol, quercetin-3-o-rutinoside isorhamnetin, kaempferol, naringenin	astragalin, catechin, apigenin kaempferitrin, betulinic acid, pyrogallol

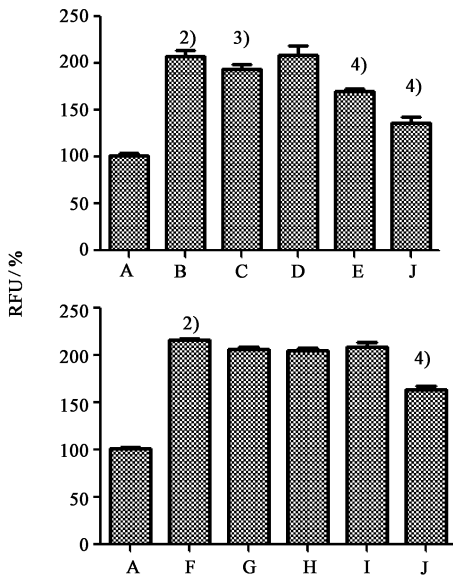


图 2 蒲黄、赤芍对血小板胞内钙的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A. 空白组; B. ADP 组; C ~ E. 蒲黄 (25, 50, 100 mg·L⁻¹) 组; F. 凝血酶组; G ~ I. 赤芍 (50, 100, 200 mg·L⁻¹) 组; J. U73122 组; K. Forscolin 组; L. AchE 组。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 ADP 组和凝血酶组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (图 3, 4 同)

图 3 蒲黄、赤芍对血小板内 cAMP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Typhae Pollen and Paoniae Radix Rubra on Ca²⁺ level in platelet ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

验证。本实验系统评价了 24 种中药醇提物抗血小板聚集活性,发现部分中药抗血小板作用具有激动剂选择性。苏木、蒲黄仅对 ADP 诱导的血小板聚集具有强抑制作用;赤芍、大黄仅对凝血酶诱导的血小板有强抑制作用。IC₅₀ 进一步证实了蒲黄、赤芍抗血小板作用存在激动剂选择性。蒲黄具有止血、化瘀、利尿功效;赤芍有清热凉血、散瘀止痛功效。蒲黄总黄酮、有机酸可改变家兔血液流变性和抑制 ADP 诱导的血小板聚集^[18-19], 其成分异鼠李苷可显著抑制 ADP 诱导的大鼠血小板聚集,并延长复钙时间^[20]。赤芍活性成分为赤芍总苷,具有抑制大鼠血小板聚集、延长凝血酶原及凝血酶时间的功能^[21-22]。

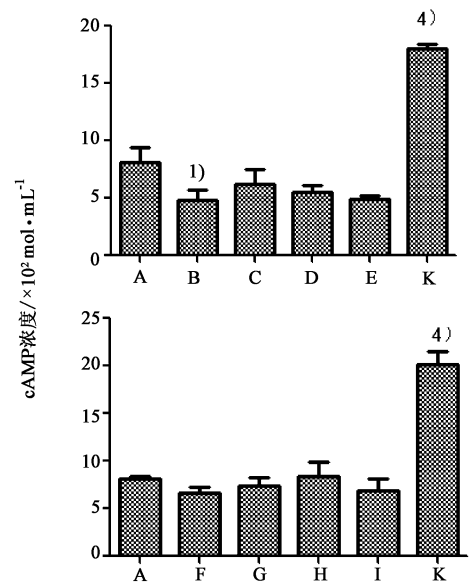


图 3 蒲黄、赤芍对血小板内 cAMP 水平的影 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of Typhae Pollen and Paoniae Radix Rubra on cAMP level in platelet ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

IPA 是新兴的生物信息学分析软件,其优势在于收录和及时更新大量通路信息和相关靶点信息,收集自影响因子 (IF) 在 3 以上的文章和 Pubchem, Genbank 等权威数据库资料,预测信息较为可靠真实^[23]。中药中成分复杂,其药效机制研究困难,通过 IPA 预测结合实验验证可降低研究难度、增加准确性。本实验用 IPA 建立血小板活化的网络,搜集蒲黄和赤芍单体信息与所建网络关联,基于频次统计预测出二者最可能作用靶标为 Ca²⁺, cAMP 和 NO。实验结果表明,蒲黄明显抑制 ADP 诱导的血小板内 Ca²⁺ 的升高,赤芍显著提高凝血酶激活血小板所致 NO 水平降低作用,蒲黄、赤芍对 cAMP 水平均没有调节作用。ADP 受体 P₂Y₁₂ 与抑制性 G 蛋白 (Gi) 偶联,当血小板激活后,会抑制腺苷酸环化酶 (AC),降低 cAMP 水平;P₂Y₁ 与 Gq 偶联,可激活

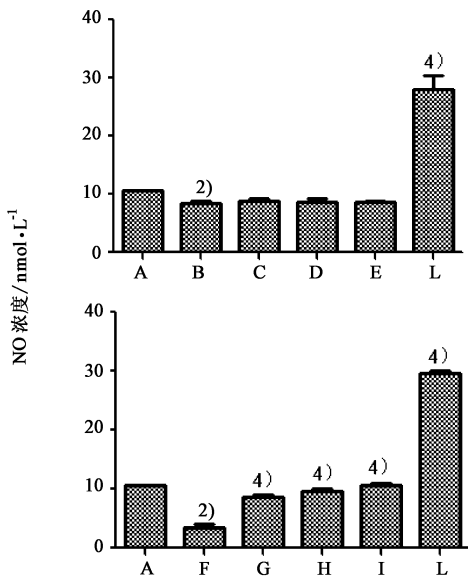


图 4 蒲黄、赤芍对血小板内 NO 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig.4 Effect of Typhae Pollen and Paeoniae Radix Rubra on NO level in platelet($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂酶Cβ(PLCβ),提高血小板内钙浓度,也可激活磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt),提高 NO 水平发挥抑制血小板作用,结果提示蒲黄可能作用于 P₂Y₁ 下游 Gq 亚基/磷脂酶 C(PLC)/三磷酸肌醇(IP₃)通路。凝血酶受体 PAR-1 和 PAR-4 均与 Gq 偶联,凝血酶可抑制 AC 活性^[24-25]。此外 PAR-4 还与 G_{12/13} 偶联^[26],在血小板活化时也会激活 PI3K/Akt 通路^[27]。结果表明,赤芍对 Gq/PLC/IP₃ 通路无影响,但可能通过影响 PI3K/Akt/eNOS 通路抑制血小板聚集。上述结果反映出预测的准确性,但是同样存在以下不足,IPA 收录分子信息来源于 IF ≥ 3.0 的文章,使得一些药效成分未被识别,如赤芍中的赤芍苷;中药中各化合物含量不同,IPA 所收录化合物信息与其含量无相关性,这就将含量不同的化合物产生的影响视为相同。

综上所述,蒲黄和赤芍醇提物分别具有选择性抗 ADP 和凝血酶诱导的大鼠血小板聚集活性。与 IPA 预测相符,蒲黄可降低血小板内钙离子水平,赤芍可提高血小板内 NO 浓度,可能分别激活 P₂Y₁ 下游的 Gq/PLC/IP₃ 和 PI3K/Akt/eNOS 通路发挥抗血小板聚集作用。

[参考文献]

[1] Michelson A D. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010,9(2):154-169.
[2] 张倩,陈岑,杨丰庆,等. 激动剂诱导血小板活化机制及抗血小板药物研究进展[J]. 中国药科大学学报,

2014,45(6):632-648.
[3] Feher G,Feher A,Pusch G,et al. Clinical importance of aspirin and clopidogrel resistance [J]. World J Cardiol, 2010,2(7):171-186.
[4] 陈可冀,薛梅,殷惠军. 血小板活化与冠状动脉粥样硬化性心脏病和血瘀证的关系[J]. 首都医科大学学报,2008,29(3):266-269.
[5] 吴钉红,丘小惠,朱伟,等. 网络药理学方法探讨清热中药治疗冠心病作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2011,26(5):1004-1008.
[6] 牛旭艳,李健,吕诚,等. 类风湿性关节炎热证“药-证对应”机制的网络药理学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):299-303.
[7] 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.
[8] XIANG B, ZHANG G, REN H, et al. The P₂Y₁₂ antagonists, 2MeSAMP and cangrelor, inhibit platelet activation through P₂Y₁₂/Gi-dependent mechanism [J]. PLoS One,2012,7(12):e51037.
[9] 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.
[10] CHEN X, ZHOU H, LIU Y B, et al. Database of traditional Chinese medicine and its application to studies of mechanism and to prescription validation [J]. Br J Pharmacol,2006,149(8):1092-1103.
[11] CHEN C Y. TCM Database @ Taiwan: the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening in silico [J]. PLoS One, 2011, 6(1):e15939.
[12] Schaeffer J, Blaustein M P. Platelet free calcium concentrations measured with fura-2 are influenced by the transmembrane sodium gradient [J]. Cell Calcium, 1999,10(2):101-113.
[13] Kamruzzaman S M,Endale M,Park S C,et al. Inhibitory effects of Bulnesia sarmienti aqueous extract on agonist-induced platelet activation and thrombus formation involves mitogen-activated protein kinases [J]. J Ethnopharmacol,2010,130(3):614-620.
[14] ZHANG W, Colman R W. Thrombin regulates intracellular cyclic AMP concentration in human platelets through phosphorylation/activation of phosphodiesterase 3A [J]. Blood, 2007, 110(5): 1475-1482.
[15] YU S M,Tsai S Y,KUO S C,et al. Inhibition of platelet function by A02131-1, a novel inhibitor of cGMP-specific phosphodiesterase, *in vitro* and *in vivo* [J].

Blood, 1996, 87(9):3758-3767.

[16] 崔玉英,唐朝枢,耿彬. 束缚应激大鼠血小板及血管内膜的 L-精氨酸/一氧化氮合酶/一氧化氮通路下调[J]. 北京大学学报:医学版, 2006, 38(3):231-235.

[17] Ozüyan B, Gödecke A, Küsters S, et al. Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation [J]. Thromb Haemost, 2005, 93(6):1161-1167.

[18] 杨慧玲,李军. 蒲黄总黄酮对家兔血液流变学参数和血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17):244-246.

[19] 冯欣,刘凤鸣. 蒲黄有机酸对家兔血小板聚集性的影响[J]. 中国民间疗法, 1999, 7(6):48-49.

[20] 高全荣,田景民. 蒲黄的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2001(S1):25-29.

[21] 陆小华,马骁,王建,等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4):595-602.

[22] 王琳琳,丁安伟. 赤芍总苷对大鼠血瘀症模型的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(6):552-554.

[23] Calvano S E, Xiao W, Richards D R, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans [J]. Nature, 2005, 437(7061):1032-1037.

[24] Stalker T J, Newman D K, Ma P, et al. Platelet signaling [J]. Handb Exp Pharmacol, 2012, 210(210):59-85.

[25] Kauskot A, Hoylaerts M F. Platelet receptors [J]. Handb Exp Pharmacol, 2012, 210(210):23-57.

[26] Pandey D, Goyal P, Bamburg J R, et al. Regulation of LIM-kinase 1 and cofilin in thrombin-stimulated platelets [J]. Blood, 2006, 107(2):575-583.

[27] LI Z, Delaney M K, O'Brien K A, et al. Signaling during platelet adhesion and activation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(12):2341-2349.

[责任编辑 张丰丰]

《中国实验方剂学杂志》2016 年度优秀论文获奖名单

题目	作者	单位	刊期
苦参碱凝胶剂的制备及体外释药特性考察	徐和,戴领,沈成英,白金霞,申宝德,袁海龙	成都中医药大学药学院	201401
炎琥宁联合阿奇霉素治疗小儿支原体肺炎的疗效及安全性的 Meta 分析	罗钦宏,梁锦枝,黄艳琼,古子娟	广州中医药大学	201401
肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的变化及柴疏四君子汤的作用	赵荣华,谢鸣,李聪,张敬升,刘进娜,王帮众	北京中医药大学基础医学院	201402
中药联合抗风湿药治疗类风湿性关节炎活动期的临床观察	马进,陈岷,李获,陈璐,卢喆	四川省人民医院	201405
多枝雾水葛化学成分	刘旭阳,谢郁峰,张慧,刘天竹,文畅,郭丽冰	广东药学院中药学院	201406
复方血栓通胶囊抗血栓作用的实验研究	聂勇胜,文思,刘静,黄萍,吴清和,操红缨	广州中医药大学	201408
女贞子化学成分与药理作用研究进展	刘亭亭,王萌	天津中医药大学	201414
柴蝎丹参汤对气滞血瘀型不稳定型心绞痛患者炎症细胞因子的影响	黄柳向,程丑夫,王敏	湖南中医药大学第一附属医院	201501
桃红四物汤对早期闭合性骨折祛瘀生新作用的初步探讨	季兆洁,韩岚,彭代银,陈卫东,李珊珊,周贞贞,朱光宇	安徽中医药大学药学院,等	201503
黄芪药材中黄芪甲苷 UPLC_ELSD 含量测定方法的优化	刘和平,彭招华,张润容,黄静,黄文漳,曹晖	丽珠医药集团国家中药现代化工程技术研究中心	201505

注:2016 年获奖论文产生自 2014—2015 年发表的较高被引论文(年总被引频次前 100 名),经责任编辑推荐,平衡不同栏目,同行编委评选,编委会年会通过并公布。按刊出时间排序。