

# 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮 对大鼠凝血功能和血小板聚集的影响

覃斐章<sup>1</sup>, 简洁<sup>2\*</sup>, 林兴<sup>1</sup>, 梁杏梅<sup>1</sup>, 黄仁彬<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

**[摘要]** 目的: 研究 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮(YLSC)对体内外血小板聚集和凝血功能的影响。方法: 将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组(含 0.5% DMSO 的生理盐水), YLSC 低、中、高剂量组(2.5, 5, 10 mg·kg<sup>-1</sup>), 阳性药阿司匹林组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)。尾静脉注射相应药物 1 周后, 腹主动脉采血, 分别加入二磷酸腺苷(ADP)、胶原和花生四烯酸(AA)诱导血小板聚集, 测定大鼠体内外血小板聚集率; 同时观察 YLSC 对大鼠凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血激酶时间(APTT)及凝血酶时间(TT)的影响。结果: 与对照组相比, YLSC 能显著抑制 ADP 和胶原诱导的大鼠体内、外血小板最大聚集率( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 最大抑制率分别为 38.4%, 42.5%, 对 AA 诱导的血小板聚集无明显抑制作用; YLSC 能显著延长大鼠血浆 TT, APTT (与对照组比较,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 对 PT 无显著影响。结论: YLSC 具有对抗血小板聚集和抗凝血作用。

**[关键词]** 17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮 YLSC; 血小板聚集; 凝血酶原时间; 活化部分凝血激酶时间; 凝血酶时间

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0242-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013130242

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1456.001.html>

**[网络出版时间]** 2013-04-25 14:56

**[收稿日期]** 20130208(002)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 0630002-2A); 广西中医药科技专项课题(GZKZ10-122); 2010 年广西研究生创新计划项目(2010105981007D35)

**[第一作者]** 覃斐章, 博士, 从事心血管药理研究, Tel: 13737096346, E-mail: feizhangqin@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*黄仁彬, E-mail: huangrenbin518@163.com; \*简洁, E-mail: jian-jielucky@yahoo.com.cn

- [4] 吴湘, 黄政德. 心痛舒片治疗气滞血瘀型不稳定型心绞痛 30 例疗效观察[J]. 湖南中医杂志, 2009, 25(5): 3.
- [5] 李鑫辉, 黄政德, 喻嵘, 等. 加味丹参饮对血瘀证家兔缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(4): 21.
- [6] 李鑫辉, 黄政德, 葛金文. 加味丹参饮对血瘀证兔心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(6): 37.
- [7] 李鑫辉, 黄政德, 葛金文. 加味丹参饮对血瘀证心肌缺血再灌注损伤家兔内皮细胞保护作用研究[J]. 中国药师, 2011, 14(1): 3.
- [8] 王庆高, 黄政德, 肖健, 等. 加味丹参饮预处理对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞的延迟保护作用及对蛋白激酶 C 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(10): 953.
- [9] 黄政德, 胡华, 田雪飞, 等. 心痛舒含药血清对乳鼠缺氧/复氧心肌细胞凋亡 Bcl-2、Bax 基因表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9): 56.
- [10] 谭琦. 加味丹参饮诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- [11] 段雪涛, 晋红宾, 易亚乔, 等. 栝楼薤白半夏汤预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤 JAK-STAT 细胞信号传导调节的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 147.
- [12] 刁玉晶, 赵明, 蒋鹏, 等. 参麦注射液对心肌缺血再灌注损伤大鼠 PECAM-1 表达的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(15): 1973.
- [13] 郭道华, 韦颖梅, 王小静, 等. 白芍总苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用及对 GRP78 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(5): 556.
- [14] 姜铁超, 邹颖刚, 于晓艳, 等. bFGF 在大鼠心肌纤维化中的表达[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(1): 33.
- [15] 姜铁超, 邹颖刚, 于晓艳, 等. bFGF 在大鼠心肌纤维化中的表达[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(1): 33.

[责任编辑] 聂淑琴

## Effect of 17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran Chalcone on Blood Coagulation and Platelet Aggregation

QIN Fei-zhang<sup>1</sup>, JIAN Jie<sup>2\*</sup>, LIN Xing<sup>1</sup>, LIANG Xing-mei<sup>1</sup>, HUANG Ren-bin<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Guilin Medical College, Guilin, 541004, China)

**[ Abstract ] Objective:** To investigate the inhibitory effects of 17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone (YLSC) on platelet aggregation and coagulation function in rats. **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into five groups: control group, aspirin group (10 mg·kg<sup>-1</sup>) and YLSC groups (2.5, 5, 10 mg·kg<sup>-1</sup>). YLSC and aspirin were administrated through sublingual vein for one week. Inhibition rates of platelet aggregation by YLSC *in vivo* and *in vitro* were determined in the model of platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP), collagen and arachidonic acid (AA). The anticoagulant effect of YLSC was evaluated by using thrombin time (TT), prothrombin time (PT), and activated partial thromboplastin time (APTT) assays. **Result:** Compared with the control group, YLSC could significantly inhibit platelet aggregation induced by ADP and collagen ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), but did not inhibit platelet aggregation induced by AA. YLSC significantly prolonged the TT and APTT in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Whereas, YLSC did not show significant prolonging effect in PT assays. **Conclusion:** YLSC can exert remarkable effects against platelet aggregation and coagulation.

**[ Key words ]** 17-methoxyl-7-hydroxyl-benzofuran chalcone; platelet aggregation; prothrombin time; activated partial thromboplastin time; thrombin time

玉郎伞 [*Millettia pulchra* (Benth.) Kurzvar. Laxior (Dunn) Z. Wei] 系蝶形花科植物疏叶崖豆的块根,是广西壮族的特色药材,具有补气、补血、提高免疫力和抗应激等功能<sup>[1]</sup>。17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮(YLSC)是从玉郎伞中提取的黄酮类新化合物,已授权2项国家发明专利(200710034771.2,200810073949)。笔者前期研究表明,YLSC有良好的心血管活性,能耐缺氧、清除自由基、对心肌缺血和缺血再灌注损伤有较强的保护作用,同时能缩短小鼠的凝血时间<sup>[2]</sup>。为进一步明确它在血液系统中的作用,评价它在血栓栓塞性疾病和心脑血管疾病中的应用,本实验观察了YLSC对大鼠体内和体外血小板聚集功能及凝血功能的影响。

### 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,体重180~220g,雌雄各半,试验动物生产许可证SCXK桂2009-0002,试验动物使用许可证SYXK(桂)2009-0004,由广西医科大学实验动物中心提供。

**1.2 仪器** LBY-NJ2型血液凝聚仪(北京普利生仪器中心);Model450型自动酶标仪(美国Bio-Rad公

司);MK4/HC血小板计数仪(美国Baker Instruments公司)。

**1.3 药物与试剂** YLSC由广西医科大学药理教研室提供(HPLC检测纯度98%,0.5% DMSO溶解,生理盐水稀释备用);注射用精氨酸阿司匹林(海南灵康制药有限公司,规格1g,批号20110904);二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP,北京索莱宝科技有限公司,批号120618);胶原(Sigma公司,批号H0721);花生四烯酸(AA,中国科学院上海生物化学研究所,批号120916);凝血酶原时间试剂盒(PT,批号120765)、活化部分凝血激酶时间试剂盒(APTT,批号112087)及凝血酶时间试剂盒(TT,批号120819)购自北京市帝科学仪器公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 2 方法

**2.1 体外血小板聚集实验** 取大鼠8只,腹主动脉采血,以3.8%的枸橼酸钠1:9抗凝,500 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,取上清得富血小板血浆(PRP),剩余部分3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清得贫血小板血浆(PPP)。用PPP调PRP中血小板计为 $3.5 \times 10^8$ /mL左右。取300  $\mu$ L PRP,分别加入低、中、高浓度

YLSC (终质量浓度为 2.5, 5, 10 mg·L<sup>-1</sup>), 阿司匹林 (终质量浓度为 10 mg·L<sup>-1</sup>) 和溶媒, 37 °C 温育 10 min 后, 用 PRP 调 0, PPP 调 100%, 除对照组外其余各组加入致聚剂 (ADP 终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>, 胶原终质量浓度为 50 mg·L<sup>-1</sup>, AA 终浓度为 0.3 mmol·L<sup>-1</sup>) 引起血小板聚集, 按比浊法 [3] 测定 10 min 血小板聚集率, 并计算血小板聚集抑制率。

$$\text{血小板聚集抑制率} = (\text{对照管血小板最大聚集率} - \text{给药管血小板最大聚集率}) / \text{对照管血小板最大聚集率} \times 100\%$$

**2.2 体内血小板聚集实验** 将 50 只大鼠随机分为 5 组: 对照组 (含 0.5% DMSO 的生理盐水), YLSC 低、中、高剂量组 (给药剂量分别为 2.5, 5, 10 mg·kg<sup>-1</sup>), 阳性药阿司匹林组 (10 mg·kg<sup>-1</sup>)。尾静脉注射给药, 每日 1 次, 连续 7 d。末次给药后 30 min 腹主动脉采血, 制备 PRP 和 PPP, 按 2.1 的方法测定血小板聚集率。

**2.3 对大鼠凝血功能的影响**<sup>[4]</sup> 大鼠 50 只, 随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为对照组 (含 0.5% DMSO 的生理盐水)、阳性药阿司匹林组 (5 mg·

kg<sup>-1</sup>)、YLSC 低剂量组 (2.5 mg·kg<sup>-1</sup>)、中剂量组 (5.0 mg·kg<sup>-1</sup>)、高剂量组 (10.0 mg·kg<sup>-1</sup>), 连续尾静脉 iv 给药 1 周, 末次给药 30 min 后, 腹主动脉取血, 以 3.8% 的枸橼酸钠 1:9 抗凝, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清用于测定 PT, APTT, TT。

**2.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 体外血小板聚集实验** YLSC 中、高剂量组均能有效的抑制 ADP 和胶原诱导的体外血小板聚集 (与对照组相比, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 其最大抑制率分别为 20.4% 和 30.9%。对 AA 引起的血小板聚集则无明显的抑制作用。见表 1。

**3.2 体内血小板聚集实验** YLSC 低、中、高剂量组均能有效的抑制 ADP 和胶原诱导的体内血小板聚集 (与对照组相比, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 其最大抑制率分别为 38.4% 和 42.5%。对 AA 引起的血小板聚集则无明显的抑制作用。见表 2。

表 1 YLSC 体外对 ADP, 胶原, AA 诱导的大鼠血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	ADP 10 μmol·L <sup>-1</sup>		胶原 50 mg·L <sup>-1</sup>		AA 0.3 mmol·L <sup>-1</sup>	
		最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率
对照	-	50.9 ± 4.6	-	53.8 ± 6.6	-	48.4 ± 3.9	-
YLSC	2.5	45.3 ± 4.9	11.0	42.6 ± 7.5 <sup>2)</sup>	20.8	47.6 ± 5.8	-
	5	42.7 ± 6.3 <sup>1)</sup>	16.1	40.3 ± 4.5 <sup>2)</sup>	25.1	47.3 ± 4.3	-
	10	40.5 ± 3.4 <sup>2)</sup>	20.4	37.2 ± 3.6 <sup>2)</sup>	30.9	50.7 ± 6.2	-
阿司匹林	10	39.7 ± 3.8 <sup>2)</sup>	22.0	30.5 ± 4.8 <sup>2)</sup>	43.3	14.6 ± 3.5 <sup>2)</sup>	69.8

注: 与对照组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01 (表 2~3 同)。

表 2 YLSC 对大鼠体内血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	ADP 10 μmol·L <sup>-1</sup>		胶原 50 mg·L <sup>-1</sup>		AA 0.3 mmol·L <sup>-1</sup>	
		最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率	最大聚集率	抑制率
对照	-	65.4 ± 7.2	-	57.8 ± 6.6	-	70.3 ± 8.6	-
YLSC	2.5	51.3 ± 4.9 <sup>1)</sup>	21.6	46.2 ± 5.3 <sup>2)</sup>	20.1	69.7 ± 7.5	-
	5	45.6 ± 5.8 <sup>2)</sup>	30.2	43.7 ± 6.5 <sup>2)</sup>	24.4	68.4 ± 8.2	-
	10	40.3 ± 3.8 <sup>2)</sup>	38.4	33.2 ± 4.3 <sup>2)</sup>	42.5	69.4 ± 5.7	-
阿司匹林	10	39.6 ± 2.7 <sup>2)</sup>	39.5	32.7 ± 5.9 <sup>2)</sup>	43.4	13.9 ± 2.8 <sup>2)</sup>	80.2

**3.3 对大鼠凝血功能的影响**<sup>[5]</sup> 结果表明, YLSC 可延长大鼠 TT 和 APTT, 与对照组相比差异具有显著性 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 对 PT 则无明显影响。见表 3。

### 4 讨论

血栓形成与血液凝固、血管内皮损伤、纤维蛋白

交联、红细胞沉着和血小板激活、血流阻滞等因素有关, 多发生于外伤和手术后期, 与某些病理过程如动脉粥样硬化、心脑血管疾病和糖尿病合并症也密切相关<sup>[5]</sup>。每年全世界约有 0.2% ~ 0.4% 的人因深静脉血栓或肺动脉栓塞需要接受抗凝或抗血栓治疗<sup>[6]</sup>。因此, 寻找安全有效的抗栓抗凝药物有重要

表3 YLSC对大鼠凝血功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )<sup>s</sup>

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	PT	APTT	TT
对照	-	10.6 ± 1.9	35.4 ± 4.3	22.3 ± 3.5
YLSC	2.5	11.3 ± 2.9	38.6 ± 5.2	25.3 ± 2.4 <sup>1)</sup>
	5	10.0 ± 3.5	40.9 ± 4.5 <sup>1)</sup>	28.3 ± 3.6 <sup>2)</sup>
	10	11.3 ± 2.4	45.6 ± 5.8 <sup>2)</sup>	34.9 ± 4.7 <sup>2)</sup>
阿司匹林	10	25.6 ± 3.0 <sup>2)</sup>	55.8 ± 6.9 <sup>2)</sup>	39.7 ± 4.9 <sup>2)</sup>

的临床意义。

止血是一个正常的生理过程,与血小板聚集和血液凝固有关。凝固过程可分为起始阶段和放大阶段,都会激活凝血酶,使纤维蛋白交联成网。血小板是形成血栓的关键因子,血小板能被机制不同的致聚剂(如胶原、凝血酶、肾上腺素、AA、ADP等)激活,放大血液凝固的过程。ADP通过作用于膜受体糖蛋白Ⅱb-Ⅲa,AA通过与环加氧酶作为中介物形成TXA<sub>2</sub>引起血小板聚集<sup>[7]</sup>。胶原主要是通过TXA<sub>2</sub>的形成,使细胞内游离钙离子([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)增多,促使Ca<sup>2+</sup>/钙调蛋白的轻链肌球蛋白磷酸化和胞质内diacylgly-cerol(DG)依赖的血小板磷酸化来诱导血小板聚集<sup>[8]</sup>。本实验观察到YLSC对体内外ADP和胶原诱导的大鼠血小板聚集均有抑制作用,对AA诱导的血小板聚集则无明显影响。提示YLSC对环加氧酶引起血小板激活途径影响不大,它的作用可能与抑制ADP释放有关。笔者前期的研究还发现,YLSC能抑制乳鼠心肌细胞L型钙通道mRNA和蛋白表达,减少心肌细胞内钙离子的浓度<sup>[9]</sup>。YLSC抗血小板聚集的作用是否与减少血小板内游离钙离子浓度有关,有待实验进一步验证。

血液凝固可由内源性和/或外源性凝血途径及它们的共同通路所启动。在临床的血液凝固检测试验中,PT用于评价外源性凝血途径,它的延长与凝血酶V,Ⅶ,X抑制有关;APTT和TT是评价内源性凝血途径的指标,APTT反映了血浆Ⅶ,Ⅸ,Ⅻ和von willebrand's factor(vWF)的水平;TT用来检测凝血的最后阶段,直接加入凝血酶,使纤维蛋白交联,反

映是否存在凝血酶抑制或纤维蛋白原异常<sup>[10]</sup>。笔者选择APTT,TT和PT作为检测指标,发现YLSC能剂量依赖性的延长APTT和TT,对PT无明显影响,提示YLSC主要影响内源性凝血途径和纤维蛋白的形成。

本实验结果显示YLSC对体内外的血小板聚集均有抑制作用,能延长TT,APTT,其作用机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准[S].南宁:广西科学技术出版社,1992:31.
- [2] 简洁.玉郎伞黄酮成分的单体分离与药效研究[D].广西医科大学,2009.
- [3] Born G R V. The aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal[J]. Nature, 1962, 194:927.
- [4] 周玖瑶,陈蔚文,黄桂英,等.三叶人字草止血作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(3):66.
- [5] 谢笑龙,龚其海,陆远富,等.钩藤碱对家兔血小板聚集及胞浆游离钙离子浓度的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2011,25(1):70.
- [6] Guoqiang Chen, Xianming Fei, Jie Ling. The effects of aminoglycoside antibiotics on platelet aggregation and blood coagulation[J]. Clin Appl Thromb-Hem, 2012, 18:538.
- [7] 费鲜明,周永列,祁金文,等.木瓜蛋白酶体外对血小板聚集的抑制作用[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(8):911.
- [8] J Eileen Bird, Xinkang Wang, Patricia L, et al. A platelet target for venous thrombosis? P2Y1 deletion or antagonism protects mice from vena cava thrombosis[J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 34:206.
- [9] 覃斐章.17-甲氧基-7-羟基-苯并呋喃查尔酮对心肌缺血的保护作用及机制研究[D].南宁:广西医科大学,2012.
- [10] 陈灵骏,罗顺德.异莲心碱抗血小板聚集和抗凝血作用[J].中国医院药学杂志,2011,31(15):1259.

[责任编辑 聂淑琴]