

益心脑滴丸对血小板聚集、血栓形成及凝血作用的影响

岳媛, 窦丽丽, 畅瑞苗, 李晓妮*
(山西医科大学药学院, 太原 030001)

[摘要] **目的:**研究益心脑滴丸对血小板聚集、血栓形成及凝血作用的影响。**方法:**将 Wistar 大鼠随机分为 5 组, 分别为正常组、阿司匹林组、益心脑滴丸高、中、低剂量组(906, 453, 226 mg·kg⁻¹, ig)。分别由 ADP、凝血酶、CaCl₂ 诱导血小板聚集, 采用比浊法观察益心脑滴丸对大鼠血小板聚集率的影响; 通过毛细玻璃管法研究益心脑滴丸对血瘀模型大鼠凝血时间的影响, 同时评价滴丸对大鼠凝血酶原时间(PT)及凝血酶时间(TT)的作用; 采用大鼠动静脉旁路血栓形成法, 检测益心脑滴丸抗血栓的作用。**结果:**益心脑滴丸各剂量组均可明显抑制 ADP、凝血酶及 CaCl₂ 诱导的大鼠血小板最大聚集率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 能够不同程度延长大鼠 PT、TT 及凝血时间($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 益心脑滴丸高、中剂量能够抑制大鼠血栓形成, 减轻血栓质量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**益心脑滴丸可以对抗血栓形成, 具有抑制血小板聚集及抗凝血的作用。

[关键词] 益心脑滴丸; 血小板聚集; 凝血酶原时间; 凝血酶时间; 血栓形成

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0241-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070241

Effects of Yixiniao Dripping Pills on Platelet Aggregation and Thrombus Formation and Coagulability Activity

YUE Yuan, DOU Li-li, CHANG Rui-miao, LI Xiao-ni*
(College of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Yixiniao dripping pills on platelet aggregation and thrombus formation in rats, as well as the effects on coagulability activity. **Method:** The Wistar rats were divided into normal control group, aspirin group, Yixiniao dripping pills high, middle and low dose group (906, 453, 226 mg·kg⁻¹, ig, accordingly). The effects of Yixiniao dripping pills on platelet aggregation *in vivo* were

[收稿日期] 20120905(017)

[基金项目] 山西省科技厅社会发展项目(20120313016-4); 太原市科技局社会发展项目(12016924)

[第一作者] 岳媛, 在读硕士研究生, 从事中药药效物质基础研究

[通讯作者] * 李晓妮, 教授, 硕士生导师, 从事中药复方物质基础及质量标准的研究, Tel: 0351-4690114, E-mail: ninili1235@163.com

- [2] Roman G C. Facts, myths, and controversies in *Vascular dementia* [J]. *J Neuro Sci*, 2004, 226(1/2): 49.
- [3] 赵宽林, 方季斌, 李东培. 大鼠血管痴呆模型制作 [J]. *中国医科大学学报*, 2002, 31(3): 166.
- [4] Zea Longa E, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [5] 胡久略, 贺又舜, 张超云, 等. 补肾醒脑方对血管性痴呆大鼠血管内皮生长因子、白介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(5): 190.
- [6] Wang Y Q, Guo X, Qiu M H, et al. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion [J]. *J Neuro Sci Res*, 2007, 85(1): 75.
- [7] Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(1): 14.
- [8] Yanpallewar S U, Hota D, Rai S, et al. Nimodipine attenuates biochemical behavioral and histopathological alterations induced by acute transient and long-term bilateral common carotid occlusion in rats [J]. *Pharmacol Res*, 2004, 36(5): 143.

[责任编辑 邹晓翠]

measured by the model induced by ADP, thrombin and CaCl_2 . Coagulation time in acute blood stasis rat models was determined by the glass capillary method and the effects were also evaluated on prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) in these groups. The inhibitory action of Yixinnao dripping pills on the thrombus formation was investigated by the model of artery-vein bypass thrombosis. **Result:** Yixinnao dripping pills in the high, middle and low dose could significantly inhibit platelet aggregation induced by ADP, thrombin and CaCl_2 , respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It could also lengthen coagulation time, TT and PT in different degree ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Moreover, Yixinnao dripping pills ($906, 453 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) could markedly restrain thrombus formation, reduce thrombus weight ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Yixinnao dripping pills showed the function of anti-thrombosis, and exerted the effects on inhibition of platelet aggregation and coagulability.

[**Key words**] Yixinnao dripping pills; platelet aggregation; prothrombin time; thrombin time; thrombus formation

益心脑滴丸处方是临床经验方,由黄芪、三七、红花、栀子、冰片 5 味药材组成,具有补中益气、活血化瘀之功效,临床主要用于高血压、冠心病、动脉粥样硬化等心脑血管疾病的治疗^[1]。血栓形成是大多数心脑血管疾病的病理生理基础,血栓栓塞性疾病常伴有血液黏度增高,血小板聚集活性增高,凝血时间缩短等现象^[2]。为此,本实验对益心脑滴丸抗血小板聚集、抗凝血及抗血栓作用进行了考查,初步说明其抗血栓性疾病的疗效,为临床用药提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 益心脑滴丸,按处方比例称取黄芪、三七、红花、栀子 4 味药材进行渗漉,将浸膏粉末与 β -环糊精包合冰片粉末按比例混合均匀,按 PEG 4000 : PEG 6000 质量比 1 : 2,中间体:基质为 1 : 2,75 °C 保温,滴距 10 cm,滴速 30 滴/min,制冷温度 10 °C,滴制成丸。制得的滴丸,质量差异限度及有效成分含量均符合 2010 年版《中国药典》规定。国家发明专利号 200910175348.3,由山西医科大学药学院提供。阿司匹林肠溶片(批号 20101001,山西医科大学制药厂),二磷酸腺苷(ADP,批号 A8290, Sigma 公司),凝血酶原时间测定试剂盒(PT,批号 20120612)及凝血酶时间测定试剂盒(TT,批号 20120612),均购自南京建成生物工程研究所;凝血酶冻干粉(批号 10811009,珠江生物特区生物化学制药厂),盐酸肾上腺素注射液(批号 10020241,北京市永康药业有限公司),氯化钙(批号 090327,天津市中泰化学试剂有限公司)。

1.2 仪器 LBY-NJ2 型血液凝聚仪, LBY-N6B 血流变仪(北京普利生仪器中心); Labor aggregometer-153 型双道血小板聚集仪(德国 Labor GmbH Hanburg 公司); TGL-16M 台式高速冷冻离心机(长

沙湘智离心机仪器有限公司)。

1.3 动物 健康成年 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,由山西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(晋)2009-0004。

2 方法

2.1 对大鼠血小板聚集率的影响^[3] 大鼠 40 只,随机分为 5 组,每组 8 只,分别为空白对照组(ig 给予等量生理盐水)、阳性对照组(阿司匹林 $16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig)、益心脑滴丸高、中、低剂量组($906, 453, 226 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig),各组动物连续给药 7 d。末次给药 1 h 后,ip 戊巴比妥钠麻醉。腹主动脉采血,取 4.5 mL 加入含有 0.5 mL 3.8% 枸橼酸钠溶液的硅化离心管中,轻轻混匀,900 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液即得富血小板血浆(PRP),剩余部分 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液即得贫血小板血浆(PPP),PRP 呈乳白色,PPP 呈透明的淡黄色。取 PRP 250 μL ,加入血小板聚集仪,37 °C 温育 5 min。在测试通道中插入 PPP,调零后,换入 PRP,分别加入 25 μL 的 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP 溶液,30 μL 的 25 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 凝血酶及 30 μL 的 1% CaCl_2 诱导血小板聚集,按比浊法测定血小板聚集率,记录最大聚集率。

2.2 对大鼠凝血功能的影响^[4] 取血 3 mL 置含有 3.8% 枸橼酸钠溶液(比例为 9 : 1)的硅胶离心管中,将血与抗凝剂轻轻混匀,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 制备血浆。取血浆 0.2 mL,加入到血浆凝血酶原时间试剂盒及凝血酶时间试剂盒,用凝血仪测定血浆凝血酶原时间(PT)、及凝血酶时间(TT)。

2.3 对急性血瘀大鼠凝血时间(CT)的影响^[5] 采用毛细玻璃管法测定急性血瘀大鼠全血凝血时间。于第 6 天给药后 50 min 后,所有实验动物分别由 sc 肾上腺素注射液 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,共 2 次,2 次时间间隔为 4 h,在 2 次注射之间(即前后各间隔 2 h)将大

鼠浸入冰水中 5 min,处置后停食,次晨给药 1 h 后,用玻璃毛细管眼眶取血,从血液流入管中开始计时,每隔 30 s 折断两端毛细管,缓慢向左右拉开,直至出现血凝丝时停止计时,所得时间即为 CT。

2.4 对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响^[6] 大鼠 40 只,随机分为 5 组,按照 2.1 中方法与剂量每组连续 ig 7 d,末次给药 1 h 后,ip 戊巴比妥钠麻醉,固定。分离右颈总动脉和左颈外静脉。在聚乙烯管中放入 1 根 6 cm 长的 4 号手术线,以肝素生理盐水 ($50 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 充满聚乙烯管。当管的一端插入静脉后,从另一端注入肝素 ($50 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) 抗凝,再插入右颈总动脉。放开动脉夹,血流从右颈总动脉经聚乙烯管流入左颈外静脉。血流开放 15 min 时终止血流,取出丝线称重,总质量减去丝线质量即为血栓湿重。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行处理,定量指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布资料采用 *t* 检验,偏态分布资料采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血小板聚集率的影响 与空白对照组相比,益心脑滴丸高、中、低剂量组和阿司匹林组最大聚集率均明显小于对照组 ($P < 0.05$),结果提示益心脑滴丸可显著抑制 ADP,凝血酶, CaCl_2 诱导的大鼠血小板聚集。见表 1。

表 1 益心脑滴丸对 ADP,凝血酶, CaCl_2 诱导血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	血小板最大聚集率/%		
		ADP	凝血酶	CaCl_2
空白对照	-	44.6 ± 3.4	29.8 ± 1.7	35.6 ± 2.4
阿司匹林	16	$27.9 \pm 2.1^{2)}$	$17.7 \pm 2.3^{2)}$	$21.6 \pm 3.2^{2)}$
益心脑滴丸	906	$29.3 \pm 2.8^{2)}$	$19.8 \pm 1.9^{2)}$	$21.9 \pm 2.8^{2)}$
	453	$31.1 \pm 2.0^{2)}$	$21.7 \pm 2.6^{2)}$	$23.7 \pm 1.5^{2)}$
	226	$33.7 \pm 2.7^{2)}$	$24.9 \pm 1.8^{1)}$	$25.8 \pm 1.7^{2)}$

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 对大鼠凝血功能的影响 益心脑滴丸高、中剂量组和阿司匹林组均可延长大鼠 PT 和 TT,与对照组相比差异具有显著性 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对急性血瘀大鼠凝血时间 (CT) 的影响 与对照组比较,益心脑滴丸高、中、低剂量组和阿司匹林组对大鼠凝血时间均有显著影响,提示益心脑滴丸能够延迟血瘀症大鼠血凝时间 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响 益心脑

表 2 益心脑滴丸对大鼠凝血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	PT	TT
空白对照	-	8.1 ± 1.6	19.4 ± 1.8
阿司匹林	16	$12.8 \pm 2.1^{2)}$	$23.5 \pm 0.9^{2)}$
益心脑滴丸	906	$11.4 \pm 1.3^{2)}$	$23.8 \pm 1.5^{2)}$
	453	$10.9 \pm 2.3^{1)}$	$22.3 \pm 1.9^{1)}$
	226	$9.4 \pm 1.1^{1)}$	20.4 ± 2.5

表 3 益心脑滴丸对大鼠凝血时间 (CT) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	CT/s	延长率/%
空白对照	-	108.6 ± 8.9	-
阿司匹林	16	$147.8 \pm 11.5^{2)}$	36.0
益心脑滴丸	906	$150.9 \pm 12.7^{2)}$	38.9
	453	$131.6 \pm 9.8^{2)}$	20.8
	226	$119.5 \pm 11.8^{1)}$	10.1

滴丸中、高剂量组和阿司匹林组血栓质量均明显减轻,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 益心脑滴丸对大鼠体外血栓形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	血栓湿质量/mg	抑制率/%
空白对照	-	38.7 ± 2.1	-
阿司匹林	16	$20.8 \pm 1.4^{2)}$	46.3
益心脑滴丸	906	$22.5 \pm 1.8^{2)}$	41.8
	453	$27.8 \pm 2.2^{1)}$	28.2
	226	35.9 ± 1.6	7.2

4 讨论

血栓性疾病是一类严重危害人类健康和生命的疾病,血栓形成导致血管堵塞,病变血管血液供应或回流受阻,造成组织器官缺血缺氧或充血,而心脏与大脑是对缺氧缺血敏感的器官,且侧枝循环差,所以血栓性疾病常见心肌梗死和脑梗死等心脑血管疾病^[7]。

血栓形成与血管内膜损伤、血小板功能及凝血系统被激活相关。血小板的活化、黏附、聚集在血栓形成和动脉粥样硬化等病理过程中发挥重要作用^[8]。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 TXA_2 的生成与活性,诱导血小板聚集^[9]。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。而血小板聚集又与血小板内钙浓度有密切关系,其实质是依赖于 Ca^{2+} 的纤维蛋白原桥连过程。外源性 Ca^{2+} 使细胞内 Ca^{2+} 增加,从而促进血小板聚集^[10]。本实验通过采用

ADP、CaCl₂ 和凝血酶 3 种诱导剂检测益心脑滴丸对血小板聚集的作用,结果表明,药物对于 3 种诱导剂引起的血小板聚集均有抑制作用,提示其作用可能通过阻断体内 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的机制有关。

凝血是机体重要的生理过程,凝血酶时间(TT)和凝血酶原时间(PT)可分别反映内源性凝血系统和外源性凝血系统的功能状况^[11]。PT 的延长或缩短主要反映了机体凝血因子 II, V, VII, X 和 I 的血浆水平降低或增高^[12]。APTT 和 TT 的延长或缩短分别反映凝血因子 XI, XII, 前激肽释放酶 V, II 和 I 的血浆水平降低或增高^[13]。本实验研究发现益心脑滴丸高、中、低剂量组能够不同程度地延长大鼠的 TT、PT 及凝血时间,表现出抗凝血作用。

本实验研究表明益心脑滴丸具有抗凝血作用,能够有效抑制血小板的聚集,防止血栓的形成,这对于防止心肌梗死、脑缺血以及动脉硬化的发展均有益处,对治疗和预防心脑血管系统疾病具有重要的药理学作用。本实验结果为益心脑滴丸对防治心脑血管疾病作用机制的进一步研究提供了科学依据。

[参考文献]

[1] 侯晓峰,杨兴鑫,畅瑞苗,等. 正交试验法优选益心脑滴丸制备工艺[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(2):43.

[2] 王辉,刘刚,罗顺德. 莲心碱对血小板聚集、凝血功能和血栓形成的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(6):768.

[3] 王欢,唐于平,郭建明,等. 当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):75.

[4] 蒋海峰,宿树兰,欧阳臻,等. 乳香、没药提取物及其配伍对血小板聚集与抗凝血酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):160.

[5] 仇锦春,廖清船,张永,等. 香丹注射液对急性血瘀模型大鼠血液流变性及血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,17(4):137.

[6] Xie X L, Wu M, Wu Q, et al. Effects of isorhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis[J]. Chin Phar J,2008,43(4):280.

[7] 苏梅,崔涛,吴德松,等. 祛瘀通脉胶囊活血化瘀作用的实验研究[J]. 云南中医中药杂志,2011,32(1):54.

[8] Zimmerman G A, Weyrich A S. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets; new pathways to altered phenotype and function[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2008,28(1):17.

[9] 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:长春中医药大学硕士学位论文,2008.

[10] 周卫,宿树兰,刘培,等. 蒲黄-五灵脂药对在少腹逐瘀汤活血化瘀效应中的贡献[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):179.

[11] 李芳,孔祥鹏,陈佩东,等. 蒲黄炭对血瘀大鼠血液流变性、凝血时间及舌象特征的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):154.

[12] 梁进权,宓穗卿,王宁生. 水蛭-虻虫配伍的抗凝血和抗血小板聚集的作用[J]. 中药材,2009,32(9):1347.

[13] 方显明,谢金鲜,韩邦志,等. 经血宁胶囊醇提物凝血作用的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):140.

[责任编辑 聂淑琴]