

· 药理 ·

灯盏细辛、赤芍配伍对血栓形成 和凝血时间的交互作用

刘丽娜^{1,2}, 兰燕宇^{1,2}, 郑林^{1,2}, 李勇军^{1,2}, 黄勇^{1,2*}

(1. 贵阳医学院药学院, 贵阳 550004; 2. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究灯盏细辛和赤芍配伍对血栓形成和凝血时间的作用。方法: 以大鼠动静脉旁路血栓形成和小鼠凝血时间为考察指标, 采用正交实验设计和方差分析方法对灯盏细辛和赤芍配伍使用的药效数据进行统计学分析, 判断两药是否存在交互作用。结果: 两药单味及配伍对大鼠动静脉旁路血栓形成的抑制作用以及对小鼠凝血时间的延长作用均具有统计学意义, 配伍组对大鼠动静脉旁路血栓形成抑制存在交互作用($P < 0.05$), 对小鼠凝血时间延长亦存在交互作用($P < 0.01$)。结论: 灯盏细辛与赤芍两药合用对血栓形成和凝血时间具有明显的交互作用。

[关键词] 灯盏细辛; 赤芍; 血栓形成; 凝血时间; 交互作用

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)21-0157-04

Interaction of Compatibility of Erigeron Breviscapii and Radix Paeoniae Rubra on Thrombus Formation and Coagulation Time

LIU Li-na^{1,2}, LAN Yan-yu^{1,2}, ZHENG Lin^{1,2}, LI Yong-jun^{1,2}, HUANG Yong^{1,2*}

(School of Pharmacy, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, China;
Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the interaction of the compatibility Erigerontis Breviscapii and Radix Paeoniae Rubra on the thrombus formation and the coagulation time (CT). **Method:** The arteriovenous bypass thrombogenesis in rats and the CT in mice were as evaluation indicators to evaluate the interaction of the compatibility Erigerontis Breviscapii and Radix Paeoniae Rubra by orthogonal experimental design and variance analysis method, and then pharmacodynamic data were statistically analyzed and estimated whether the two kinds of medicines had interaction. **Result:** The different combinations of two kinds of medicines could remarkably inhibit the arteriovenous bypass thrombogenesis in rats and significantly prolong CT in mice. The compound compatibility had interaction. **Conclusion:** The compatibility of Erigeron Breviscapii and Radix Paeoniae Rubra has significant interaction on thrombosis and CT.

[Key words] Erigeron Breviscapus; Radix Paeoniae Rubra; thrombosis; coagulation time; interaction

[收稿日期] 20120605(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060335); 贵州省社会发展攻关计划项目(黔科合SY字[2011]3033号)

[第一作者] 刘丽娜, 硕士, 讲师, 从事中药物质基础和质量控制研究, Tel: 0851-6908468, E-mail: gylln815@126.com

[通讯作者] *黄勇, 硕士, 副教授, 从事中药药代动力学及新药研究开发, Tel: 0851-6908468, E-mail: mailofhy@126.com

在贵州民族地区常用灯盏细辛和赤芍组方治疗中风、偏瘫, 有较好的临床基础。课题组在前期研究中发现该组方对脑缺血再灌注模型具有明显的保护作用^[1], 但灯盏细辛、赤芍配伍的交互作用尚不明确。为进一步阐明灯盏细辛和赤芍组方配伍的科学性、合理性, 本研究在课题组前期研究工作基础上^[2], 通过灯盏细辛、赤芍提取物对大鼠旁路血栓形成和小鼠凝血时间的影响实验研究, 探讨两药合用对血栓形成和凝血时间的交互作用, 为该组方更

深层次开发提供科学依据。

1 材料与方

1.1 试剂与药物 灯盏细辛提取物:取灯盏细辛药材经水提醇沉酸沉得灯盏细辛提取物,取提取物和甘露醇加注射用水适量微热溶解,调 pH 7.0 ~ 7.5,加针用活性炭,补加注射用水至 150 mL,混匀,煮沸灭菌,装入已处理好的输液瓶中,密封,流通蒸气灭菌,冷藏 24 h,在无菌条件下用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,分装,灭菌,冷冻干燥,得棕黄色疏松状物,批号 110322,规格 55 mg/瓶,相当于 3 g 生药。

赤芍提取物:取赤芍药材经水提醇沉正丁醇萃取后回收正丁醇,残留物加 45% 乙醇溶解后上聚酰胺柱,用 45% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,残留物真空干燥,得赤芍提取物。取提取物和甘露醇加注射用水适量微热溶解后,同灯盏细辛提取物操作,得淡黄色疏松状物,批号 110322,规格 155 mg/瓶,相当于 4.5 g 生药。以上受试药物所用药材均由贵阳医学院药物研究开发中心生药学研究室龙庆德副教授鉴定:灯盏细辛为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* Hand. -Mazz 的干燥全草;赤芍为川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根。

注射用丹参(冻干),哈药集团中药二厂,规格 400 mg/瓶,批号 20100329。水合氯醛, A. R 级,中国医药集团上海化学试剂公司,批号 20080420。0.9% 氯化钠注射液,贵州科伦药业有限公司,批号 B100511N。

1.2 动物和仪器 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 250 ~ 350 g;健康昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g。均由贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黔)2002-0001。AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.3 实验设计 以灯盏细辛、赤芍为考察因素,以用药与不用药为考察水平设计正交设计因素水平表,见表 1,按照 $L_4(2^3)$ 正交设计进行试验设计。

表 1 辛芍配伍正交设计因素水平

水平	灯盏细辛/A	赤芍/B
1	不用药	不用药
2	用药	用药

1.4 对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响^[3-6] 大鼠随机分为 5 组,即对照组(等量生理盐水)、阳性药物组、灯盏细辛组、赤芍组和辛芍配伍组,给药剂量均为 0.62 g·kg⁻¹。以 10% 水合氯醛麻醉(300 mg·kg⁻¹, ip),仰位固定,分离右颈总动脉及左颈外静

脉。取 3 段聚乙烯管,其中两段管内径为 1 mm,长约 6 cm,中间段内径为 2 mm,长约 6.5 cm。在三段管的中段放入一根长约 5 cm 的 4 号手术线。用充满肝素(50 U·mL⁻¹)生理盐水的聚乙烯管的一端插入左颈外静脉,再将聚乙烯管的另一端插入右颈总动脉。手术完成立即静脉给药,30 min 后,打开动脉夹开放血流,持续 15 min 中断,迅速取出丝线,除掉浮血,精密称重,血栓重为总质量减去丝线重。

1.5 对小鼠凝血时间的影响(毛细玻璃管法)^[7-11]

小鼠随机分为 5 组,即对照组(等量生理盐水)、阳性药物组(注射用丹参,60 mg·kg⁻¹)、灯盏细辛组、赤芍组和辛芍配伍组(均为生药 1.25 g·kg⁻¹);尾静脉给药,容积 20 mL·kg⁻¹。给药后 30 min,以内径为 1 mm、长为 10 cm 的毛细玻璃管插入小鼠眼内眦球后静脉丛,深约 4 mm,轻轻转动后缩回。自血液进入管内开始计时,血液注满后取出毛细管,每隔 30 s 折断毛细玻璃管一小段,缓慢拉开观察折断处,有血凝丝出现所历时间即为血凝时间。

1.6 统计学处理 实验数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用正交 t 值法进行统计分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠动静脉旁路血栓形成的影响 结果见表 2。采取 $L_4(2^3)$ 正交设计对大鼠动静脉旁路血栓质量进行方差分析,见表 3。

表 2 辛芍配伍对大鼠动静脉旁路血栓质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	生药剂量/g·kg ⁻¹	血栓质量/mg
对照	-	18.23 ± 1.89
赤芍	0.62	15.34 ± 1.34 ²⁾
灯盏细辛	0.62	15.11 ± 1.22 ²⁾
辛芍配伍	0.62	10.12 ± 1.68 ²⁾
注射用丹参(冻干)	0.045	10.33 ± 1.98 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

从表 3 的结果直观分析,各因素影响顺序为 $A > B$,灯盏细辛对于血栓形成抑制效果的贡献略大于赤芍($A > B$);正交实验方差分析表明,灯盏细辛和赤芍均有显著影响($P < 0.001$),且两药合用存在明显的交互作用($P < 0.05$)。交互作用分析见表 4。

将不用药试验组作为基数(182.3),灯盏细辛药效 = (182.3 - 151.1),赤芍药效 = (182.3 - 153.4),灯盏 + 赤芍药效 = (182.3 - 101.2)。由于 (182.3 - 101.2) > (182.3 - 151.1) + (182.3 -

表 3 辛芍配伍的血栓质量 $L_4(2^3)$ 正交试验分析

组合号	组合情况			处方组成	Σx
	A(灯盏细辛)	B(赤芍)	$A \times B$		
I	1	1	1	NS	182.3
II	1	2	2	赤芍	153.4
III	2	1	2	灯盏细辛	151.1
IV	2	2	1	辛芍	101.2
T1	335.7	333.4	283.5	1:不用药,2:用药	
T2	252.3	254.6	304.5	N = 40, G = 4	
D(T2 - T1)	-83.4	-78.8	21.0	$Je = \Sigma s^2 / G = 2.420$	
J(均方)	173.9	155.2	11.0	$J = D^2 / N$	$f_{列} = \text{水平} - 1 = 1, f_{误} = N - G = 36$
F	71.87	64.16	4.56	$F = J / Je$	$F_{0.05(1,36)} = 4.11, F_{0.01(1,36)} = 7.40$
P	<0.001	<0.001	<0.05		$F_{0.001(1,36)} = 12.83$

153.4),故灯盏细辛与赤芍存在交互作用,说明两药合用具有交互作用^[14]。

据进行方差分析,见表6。

表 4 辛芍配伍抑制血栓形成的交互作用分析

交互作用分析	不用赤芍(Σx)	用赤芍(Σx)
不用灯盏(Σx)	182.3	153.4
用灯盏细辛(Σx)	151.1	101.2

表 5 辛芍配伍对小鼠凝血时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	生药剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	凝血时间/s
对照	-	128.05 ± 36.98
赤芍	1.25	167.11 ± 43.07 ¹⁾
灯盏细辛	1.25	140.01 ± 26.96
辛芍配伍	1.25	246.99 ± 40.09 ²⁾
注射用丹参(冻干)	0.06	208.01 ± 53.05 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

2.2 对小鼠凝血时间的影响(毛细玻璃管法) 结果见表5。采取 $L_4(2^3)$ 正交设计对小鼠凝血时间数

表 6 辛芍配伍的凝血时间 $L_4(2^3)$ 正交试验分析

组合号	组合情况			处方组成	Σx
	A(灯盏细辛)	B(赤芍)	$A \times B$		
I	1	1	1	NS	1 280
II	1	2	2	赤芍	1 670
III	2	1	2	灯盏细辛	1 400
IV	2	2	1	辛芍	2 470
T1	2 950	2 680	3 750	1:不用药,2:用药	
T2	3 870	4 140	3 070	N = 40, G = 4	
D(T2-T1)	920	1 460	-680	$Je = \Sigma s^2 / G = 2.420$	
J(均方)	21 160	53 290	11 560	$J = D^2 / N$	$f_{列} = \text{水平} - 1 = 1, f_{误} = N - G = 36$
F	15.26	38.43	8.34	$F = J / Je$	$F_{0.05(1,36)} = 4.11, F_{0.01(1,36)} = 7.40$
P	0.001	0.001	<0.01		$F_{0.001(1,36)} = 12.83$

从表6结果直观分析,各因素影响顺序为 $B > A$,赤芍对凝血时间延长效果的贡献大于灯盏细辛($B > A$);正交实验方差分析表明,赤芍和灯盏细辛均有显著影响($P < 0.001$),且两药合用(辛芍)存在明显的交互作用($P < 0.01$)。交互作用分析见表7。

将不用药试验组作为基数(1 280),灯盏细辛药效 = (1 400 - 1 280),赤芍药效 = (1 670 - 1 280),灯盏 + 赤芍药效 = (2 470 - 1 280)。由于(2 470 - 1 280) > (1 400 - 1 280) + (1 670 - 1 280),故灯盏细辛与赤芍存在交互作用,说明两药合用具有交互

作用^[12]。

经正交设计方差统计分析表明,灯盏细辛和赤芍单用与配伍使用对大鼠动静脉旁路血栓形成的抑制作用以及对小鼠凝血时间的延长作用均具有统计学意义,同时灯盏细辛和赤芍间存在显著的交互作用。

表 7 辛芍配伍延长凝血时间的交互作用分析

交互作用分析	不用赤芍(Σx)	用赤芍(Σx)
不用灯盏(Σx)	1 280	1 670
用灯盏细辛(Σx)	1 400	2 470

3 讨论

灯盏细辛和赤芍组方治疗中风、偏瘫在贵州民间地区具有广泛的应用基础。缺血性脑血管病属于祖国医学中风范畴,据文献报道血栓形成是缺血性脑血管病的一个重要诱发原因^[13-14]。脑血栓形成绝大部分是在动脉粥样硬化的基础上发生的,而血小板聚集在止血与血栓形成中具有关键作用^[13]。故本文以大鼠动静脉旁路血栓形成和小鼠凝血时间为考察指标,对该组方配伍进行进一步研究,以期为该组方的开发利用提供实验依据。

本文采用正交实验设计和方差分析方法对灯盏细辛、赤芍配伍应用的实验数据进行科学的统计分析,使得每次实验的因素及水平得到合理的安排,通过对实验结果的方差分析获得较为全面的信息,以利于找出各因素的主次地位及交互作用,寻找诸因素的最佳组合,适用于中药复方的组方配伍筛选研究^[15]。研究结果表明,灯盏细辛与赤芍对大鼠旁路血栓形成和小鼠凝血时间的影响均具有显著意义,两药合用有明显的交互作用。

[参考文献]

[1] 黄勇,王永林,兰燕宇,等.注射用辛芍对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用和对脑微循环血流量的影响[J].中国新药杂志,2008,17(2):119.

[2] 王永林,黄勇,郑林,等.注射用辛芍冻干粉针药味配伍作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(7):38.

[3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:560,481,57.

[4] 王北婴,李仪奎.中药新药研制开发技术与方法[M].上海:上海科技出版社,2001:681.

[5] 张均田.现代药理实验方法.下册[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:1216.

[6] 马勇,陈金飞,张允申,等.活血通络汤防治深静脉血栓形成的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):194.

[7] 徐先祥,刘青云,彭代银,等.赤芍总苷静脉给药抗血栓形成作用研究[J].中药药理与临床,2005,21(5):26.

[8] 钟正贤,陈晓军,陈学芬,等.抗血栓药材水提物的筛选研究(Ⅱ)[J].中医药学报,2006,34(3):11.

[9] 周芳,杨秀芬,仇霞.桂郁金醇提物对小鼠出血及凝血时间的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):143.

[10] 庞来详,王玉香,周柏玉,等.息风止痛口服液对小鼠出凝血时间及耐缺氧时间的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(1):93.

[11] 周怀梧.医药应用概率统计[M].上海:百家出版社,1990:258.

[12] 陈云华,张硕峰,孙健宁,等.杜仲红景天胶囊抗血栓形成与溶栓作用研究[J].北京中医药大学学报,2007,30(5):333.

[13] 蒲传强,郎森阳,吴卫平.脑血管病学[M].北京:人民军医出版社,1999:90.

[责任编辑 邹晓翠]