

当归及其成分阿魏酸对大鼠血小板聚集和5-HT释放的影响

尹钟洙 张凌云 徐理纳

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

提要 本文报告当归及其成分阿魏酸对大鼠血小板聚集性和5-HT释放反应的影响。结果表明, 当归水剂在试管内当浓度为200~500 mg/ml, 阿魏酸0.4~0.6 mg/ml时抑制ADP和胶原诱导的大鼠血小板聚集。静脉注射当归20 g/kg 5分钟后对ADP和胶原诱导的大鼠血小板聚集有明显的抑制作用。阿魏酸钠0.2 g/kg和0.1 g/kg静脉注射时分别抑制ADP和胶原诱导的大鼠血小板聚集。

用³H-5-HT标记血小板, 观察血小板聚集和释放反应的关系。当归水剂500 mg/ml和阿魏酸钠1~2 mg/ml对凝血酶诱导的血小板聚集有明显抑制作用, 同时也抑制³H-5-HT从血小板中释放。

当归 [*Angelica sinensis*(Oliv)Diels] 为中医常用的养血活血药。当归注射剂对血栓闭塞性脉管炎⁽¹⁾和急性脑血栓-栓塞性疾病⁽²⁾有较好的疗效, 并能增加病人⁽³⁾和麻醉动物⁽⁴⁾的外周血流量。当归水剂在试管内有抑制二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集作用⁽⁵⁾。我所植化室进行了当归的化学研究, 分离提取了阿魏酸, 后又制成钠盐。本文药理实验结果表明阿魏酸是当归抑制血小板聚集的主要成分之一。根据血小板内标记5-HT释放和内源性5-HT释放相一致⁽⁶⁾, 用³H-5-HT标记血小板, 以凝血酶作释放诱导剂, 进一步观察了当归和阿魏酸抑制血小板聚集作用和血小板释放反应的关系。

材 料

动物为体重180~200克的雄性大鼠。

当归针剂由本所植化室提供。所用当归产于甘肃, 其针剂制备方法同前⁽⁷⁾。阿斯匹林和阿魏酸为市售, 实验前溶于10%乙醇中。阿魏酸钠由本所植化室合成。

抗凝剂为3.8%枸橼酸钠溶液和ACD(0.065 M枸橼酸、0.085 M枸橼酸钠和2%葡萄糖)⁽⁸⁾。血小板聚集诱导剂为ADP和胶原溶液⁽⁹⁾, 释放反应诱导剂为凝血酶, 实验前均用生理盐水配成一定浓度于冰箱内保存。

参照Jenkins⁽¹⁰⁾方法, 将血小板悬浮于改良台氏液(8 g NaCl, 0.01 g CaCl₂, 1.0 g 葡萄糖, 0.05 g NaH₂PO₄·H₂O, 0.1 g MgCl₂·6 H₂O和0.35 g 明胶, 溶解于1000 ml蒸馏水)中。

³H-5-HT为硫酸盐, 为Radiochemical centre. Amersham出品, 溶于无水乙醇, 分装于安瓿中, 蒸干乙醇后存于低温冰箱。实验前用生理盐水配成10 μCi/ml溶液。闪烁液为甲苯闪烁液(0.4% PPO、0.01% POPOP的甲苯溶液)。

方法和结果

(一) 当归和阿魏酸对血小板聚集性的影响

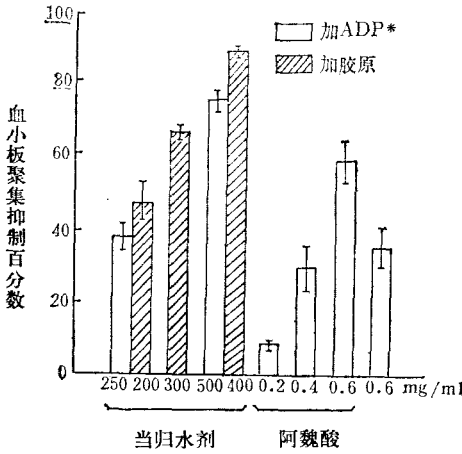


图 1 当归、阿魏酸和阿斯匹林在试管内对大鼠血小板聚集的抑制作用
* ADP 最终浓度为 5 μg/ml

诱导的大鼠血小板聚集程度明显低于对照管，血小板聚集抑制百分数分别为 38 和 75。图 2 为一次实验的客观记录。当归 200、300 和 400 mg/ml 对胶原诱导的血小板聚集抑制百分数分别为 48、66 和 88。阿斯匹林 0.6 mg/ml 对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集抑制百分数为

将大鼠戊巴比妥钠麻醉后，从腹主动脉取血制备血小板血浆⁽⁹⁾，以 ADP 和胶原作为血小板聚集剂，进行血小板凝集实验。将盛多血小板血浆的比浊管放入血小板凝集计的比浊槽内，槽周围以 37°C 流动水保持恒温。血浆中加入凝集剂后在不断搅拌下，血小板发生聚集，此时血浆的光密度随着血小板聚集而下降。光密度的变化经换能和放大、记录于 XWG-100 AB 型电子电位差计上。体内外给药方法同前⁽⁹⁾。药物作用以血小板聚集抑制百分数表示，即

$$\frac{\text{对照管聚集}\% - \text{给药管聚集}\%}{\text{对照管聚集}\%} \times 100\%$$

当归及阿魏酸在试管内对大鼠血小板聚集的抑制作用如图 1 所示。当归 250 和 500mg/ml 使 ADP

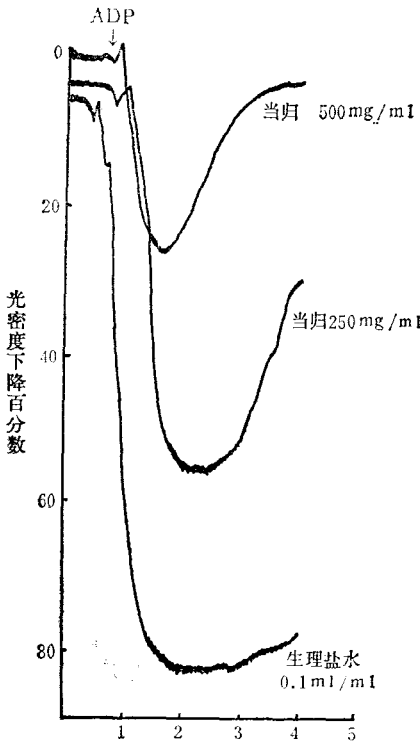


图 2 当归在试管内对 ADP (5 μg/ml) 诱导的大鼠血小板聚集的抑制作用

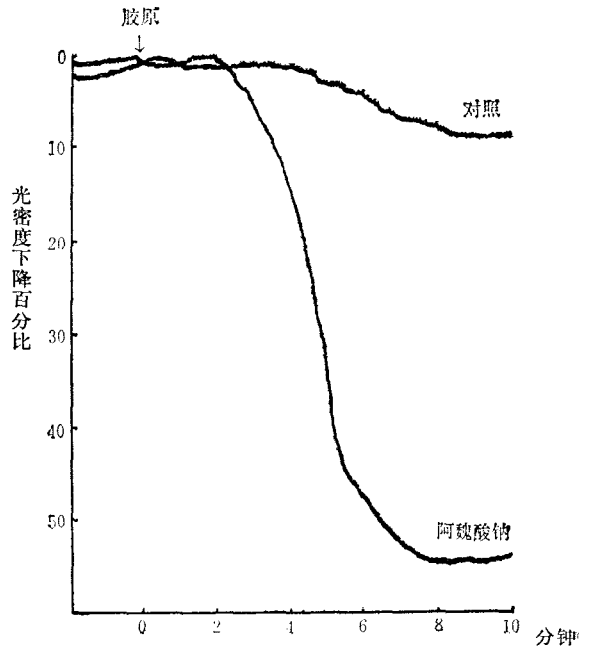


图 3 阿魏酸钠(100 mg/kg)静脉注射后 5 分钟对胶原诱导的血小板聚集性的影响

36. 阿魏酸 0.4~0.6 mg/ml 显著地抑制 ADP 诱导的血小板聚集, 血小板聚集抑制 50% 的浓度 (I_{D50}) 为 0.56 mg/ml, 说明阿魏酸在试管内对 ADP 诱导的大鼠血小板聚集抑制作用比阿斯匹林强。

给大鼠静脉注射当归 20 g/kg (对照组动物注射等容量的生理盐水) 5 分钟后取血做血小板凝集实验。结果如表 1 所示, 当归组平均聚集百分数均低于对照组, 两组差别显著。说明当归针剂静脉给药也能抑制 ADP 和胶原诱导的血小板聚集。静脉注射阿魏酸钠 0.2 g/kg 5 分钟后对 ADP 诱导的血小板聚集有抑制作用。给药组血小板平均聚集 30%, 明显低于对照组的 50% ($P < 0.05$)。阿魏酸钠 0.1 g/kg 静脉注射对胶原诱导的血小板聚集也有明显抑制作用。

表 1 当归及阿魏酸钠静脉注射对大鼠血小板聚集的抑制作用

药 物	促聚物	剂 量 (g/kg)	血小板平均聚集% ± 标准误		聚集抑制 %	P 值
			对照组 (鼠数)	给药组 (鼠数)		
当 归	ADP	20.0	37 ± 4.5(5)	8 ± 0.4(5)	87.9	<0.001
	胶原	20.0	37 ± 1.9(3)	25 ± 2.7(3)	33.0	<0.05
阿魏酸钠	ADP	0.2	50 ± 4.5(6)	30 ± 5.5(6)	38.0	<0.05
	胶原	0.1	44 ± 9.2(4)	8 ± 1.2(4)	81.6	<0.02

(二) 当归和阿魏酸对血小板释放反应的影响

1. 按 Ardlie⁽¹¹⁾法并稍加修改, 以 1/6 血量的 ACD 溶液抗凝制备大鼠混合血小板血浆。每毫升血浆中加入 0.4~0.5 μ ci 3 H-5 HT 生理盐水溶液, 在 37°C 保温 30 分钟。将标记的血小板血浆在室温下以 3000 转/分离心 15 分钟, 弃上清液, 加生理盐水至原体积, 重新悬浮血小板。以 500 转/分离心 5 分钟, 移出上清液, 弃残渣 (红白细胞)。离心后的血小板生理盐水悬液以 3000 转/分离心 10 分钟, 弃上清液, 加适量的改良台氏液、重新悬浮血小板。为了去除混在血小板中残留的红白细胞, 血小板悬液在低速 (500 转/分) 下离心 5 分钟。移出血小板悬液, 用改良的台氏液调至一定浓度 (5~7 百万/ml)。以凝血酶作为聚集和释放诱导剂, 进行血小板凝集和释放实验。加凝血酶于血小板悬液后 5 分钟将比浊管放在冰水中终止反应。在冷冻离心机以 15000 转/分离心 10 分钟。取 0.1 ml 上清液于闪烁杯内, 在红外灯下烤干, 加 10 ml 甲苯闪烁液, 在液体闪烁计数器计数。

洗净血小板对 ADP 和凝血酶诱导的血小板聚集和正常血小板相近似, 如图 4 所示。

每次实验给药管和对照管各做 4~5 只管, 用 t 测验判断药物作用。当归及阿魏酸钠对凝血酶诱导的血小板聚集和释放反应的影响见表 2。

表 2 当归及阿魏酸钠对凝血酶诱导的血小板聚集性和释放反应的影响

药 物	最终浓度 (mg/ml)	最大聚集百分数	上清液脉冲数 (cpm/0.1ml)
当 归	0	92 ± 0.7	639 ± 80
	400	17 ± 2.8***	132 ± 11**
阿 魏 酸 钠	0	92 ± 2.7	685 ± 78
	2	11 ± 2.0***	232 ± 59**

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

由表可知,凝血酶可以诱导洗净的大鼠血小板聚集和 5-HT 自血小板的释放。当归水剂 400 mg(按生药计算)/ml 和阿魏酸钠 2 mg/ml 都能明显抑制凝血酶诱导的血小板聚集,对照组和给药组间有非常显著的差别 ($P < 0.001$)。在当归和阿魏酸钠抑制血小板聚集作用的同时,上清液内的脉冲数较对照管明显降低,差别很明显 ($P < 0.01$),说明当归和阿魏酸钠抑制 ^3H -5 HT 自血小板释放。

2. 另取标记血小板悬液 1 ml 加于预先加了药物或生理盐水的试管内,在 37°C 保温 2 分钟。然后加 0.1 ml 凝血酶溶液,继续保温 8 分钟后立刻取出试管,室温下离心,分离血小板。上清液倒入另一只试管内。于离心后的血小板沉淀物中加入 1 ml 1% 月桂酸硫酸钠⁽¹²⁾以悬浮血小板。分别测定上清液和血小板悬液的比放射性。按公式

$$\frac{\text{血小板外放射性}}{\text{血小板内外总放射性}} \times 100\%, \text{求释放率。}$$

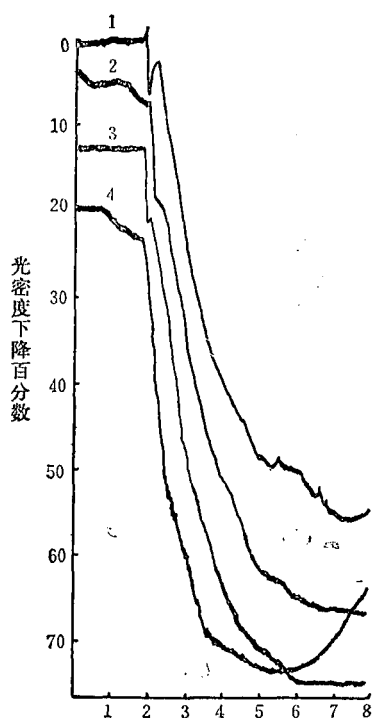


图 4 正常和洗净血小板对 ADP 和凝血酶诱导的聚集反应

1. 正常血小板加凝血酶($25 \mu\text{g}/\text{ml}$)
2. 正常血小板加 ADP($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)
3. 洗净血小板加凝血酶($25 \mu\text{g}/\text{ml}$)
4. 洗净血小板加 ADP($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)

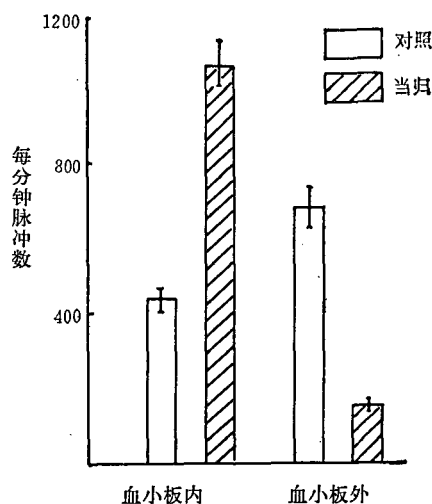


图 5 当归水剂 500 mg/ml 对凝血酶诱导的血小板释放反应的影响

预先加有生理盐水的对照管 ^3H -5 HT 血小板悬液,经与凝血酶温浮后, ^3H -5 HT 自血小板内释放出来,血小板外每分钟脉冲数高于血小板内的相应值,三次实验平均释放率为 69%(见表 3)。阿魏酸钠 1 mg/ml 和 2 mg/ml 释放率分别为 26.8% 和 16.2%,与对照管比较有明显差别,如表 3 所示。结果表明阿魏酸钠明显抑制凝血酶诱导的 5-HT 释放,降低 ^3H -5 HT 释放率。

当归水剂对凝血酶诱导的血小板释放反应的影响见图 5。对照组 ^3H -5 HT 释放率为 54%,当归组为 11%,两组差别显著,表明当归 (500 mg/ml) 对血小板中 ^3H -5 HT 的释放

表 3 阿魏酸钠对凝血酶(25 μ g/ml)诱导的大鼠血小板³H-5HT 释放率的影响

最终浓度 (mg/ml)	血小板内 cpm 均数 \pm SE	血小板外 cpm 均数 \pm SE	释放率 (%)
0	256 \pm 12	544 \pm 49	69.1
1.0	519 \pm 62	185 \pm 36	26.8
2.0	651 \pm 115	119 \pm 11	16.2

有明显抑制作用。

讨 论

我所自甘肃当归中分离出阿魏酸(ferulic acid)、丁二酸(succinic acid)、菸酸(nicotinic acid)、尿嘧啶(uracil)、腺嘌呤(adenine)、正丁烯基酰胺内酯(butylidenephthalide)和藁本内酯(ligustilide)等七种成分。初步研究表明阿魏酸是当归中抑制血小板聚集的成分。当归中阿魏酸含量约为 0.03%，从量效关系看，阿魏酸并不是当归抑制血小板聚集的唯一有效成分。

本实验进一步证明当归和阿魏酸抑制血小板聚集系通过抑制血小板释放反应。在某些药活性方面，当归及其成分阿魏酸和阿斯匹林有相似之处⁽¹³⁾。阿スピ林的抗炎作用和抑制血小板聚集有关。中西美智夫⁽¹⁴⁾等报道非甾体抗炎药有抑制血小板聚集作用，并能阻止血小板中致炎物质(5-HT 和组织胺)的释放，进而防止炎症的继续发展。当归有抑制血小板聚集⁽⁵⁾和抗炎作用⁽¹³⁾。我们认为，当归治疗血栓闭塞性脉管炎的作用原理可能和当归及阿魏酸抑制血小板聚集和血小板中 5-HT 释放有关系。这一看法有待于临床进一步研究证实。

近年来 Anthony⁽¹⁵⁾等报道，偏头痛发作时病人血小板中 5-HT 明显下降，与此同时血小板聚集性增加。鉴于当归和阿魏酸有抑制血小板聚集和 5-HT 释放等作用，因此可以考虑以当归和阿魏酸试用于某些因血小板功能异常而引起的偏头痛。

参 考 文 献

1. 湖北医学院附属第二医院外科当归室等：当归注射剂对血栓闭塞性脉管炎的临床疗效观察。新医药学杂志(11):35, 1977
2. 北京友谊医院神经内科：50 例急性脑缺血性疾病应用当归注射液临床观察，神经系统疾病进展。中华医学会北京分会神经精神科学会内部资料(1):43, 1978
3. 中国医学科学院药物研究所活血化瘀治则研究组等：当归注射液对血栓闭塞性脉管炎患者外周血液循环的作用。新医药学杂志(11):38, 1977
4. 周远鹏等：当归对犬血流动力和心肌代谢的影响。药学报 14:156, 1979
5. 中国医学科学院药物研究所活血化瘀治则研究组：研究活血化瘀药物联系中西医药理论的初步尝试。新医药学杂志(2):33, 1976
6. 寮隆吉等：血小板の放出反応，日本血液学会雑誌，37:77, 1974
7. 徐理纳等：当归对麻醉狗外周血管的扩张作用。中华医学杂志 50:80, 1980
8. Aster R H, et al: Platelet sequestration in man, I method, *J clin Investigation* 43:843, 1964
9. 尹钟珠等：冠心 II 号方及其单味药对大鼠血小板聚集功能的影响。新医药学杂志。(12):37, 1977
10. Jenkins C S P, et al: Interaction of polylysin with platelet. *Blood* 37:395, 1977
11. Ardlie N G, et al: Adenosin diphosphate induced platelets aggregation in suspension of washed rabbit platelets. *Brit J Hemat* 19:7, 1970
12. Snaeddon JM, et al: Effect of selective proteolysis on the accumulation of 5-Hydroxytryptamin by rat blood platelets. *Brit J Pharmacol* 52:237, 1974
13. 田中重雄ほか：‘当帰’(*Angelica acutiloba*, KITAGAWA)エキスのマウスにおける Writhing および毛細管透過性におよぼす影響(鎮痛および抗炎症作用)。薬学雑誌(91):1093, 1971
14. 中西美智夫等：抗炎症薬に関する研究(第 18 報) 2-Amino-3-ethoxycarbonyl-6-benzyl-4.5.6.7-tetra-hydrothieno(2.3-c)pyridine(Y-3642)の Histamine 游離に対する作用。药学雑誌 91:921 1971

15. Agnoli A, et al: *Platelet aggregation in the pathogenesis of cerebrovascular disorders*. p 81 Springer-
verlag Berlin New York 1977

THE EFFECT OF DANG-GUI (*ANGELTICASINENSIS*) AND ITS INGREDIENT FERULIC ACID ON RAT PLATELET AGGREGATION AND RELEASE OF 5-HT

Yin Zhongzhu, Zhang Lingyun and Xu Lina

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

ABSTRACT

Dang-Gui (*Angelica sinensis*) has been used for the treatment of thromboangiitis obliterans and acute cerebral thrombotic diseases with favorable results. In this paper the effect of Dang-Gui and its ingredient ferulic acid on platelet aggregation and 5-HT release reaction in rats is reported.

In *vitro* studies, rat platelet aggregation induced with adenosine diphosphate or collagen was inhibited by the aqueous extract of Dang-Gui (200~500mg/ml) and by synthetic ferulic acid (0.4~0.6mg/ml).

Intravenous injection of Dang-Gui at a dose of 20 g/kg inhibited rat platelet aggregation. An inhibitory effect on platelet aggregation was also observed when sodium ferulate was administered intravenously at doses of 0.1~0.2g/kg.

The aqueous extract of Dang-Gui (500mg/ml) and sodium ferulate (1~2mg/ml) were shown to inhibit aggregation and release of ³H-5-HT labelled rat platelets induced by thrombin.

The therapeutic effect of Dang-Gui in the treatment of cerebral thrombosis and thromboangiitis obliterans seems to be related to the inhibition of platelet aggregation and release of 5-HT from platelets.