

· 实验研究 ·

全三七片抗血小板聚集作用及优势分析研究

郭 琰¹,周铭涛¹,龚吕东¹,钟承志¹,李 婷¹,颜 宏¹,张海元¹,吴德松¹,叶雨佳²,
张金艳³,崔 涛¹,朱兆云¹

(1 云南省药物研究所/云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室,昆明 650111; 2 昆明医科大学
附一院心内科分/子生物学实验室,昆明 650032; 3 中国中医科学院西苑医院基础研究室,北京 100091)

[摘要] **目的:**评价三七创新新药全三七片的抗血小板聚集作用及其作用优势。**方法:**采用人富血小板血浆和洗涤血小板,检测全三七片对不同血小板激活剂诱导的血小板聚集率和 Ca^{2+} 浓度;采用大鼠富血小板血浆,对比全三七片和三七提取物对二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集率;通过注射 80% 乙醇建立胃出血模型大鼠,考察全三七片与阿司匹林对便潜血的影响;通过小鼠凝血实验和大鼠凝血四项的检测,观察全三七片的止血作用。**结果:**全三七片可以剂量依赖性地抑制 ADP、凝血酶、U46619、胶原、anti-CD9 诱导的人血小板聚集率(均 $P < 0.01$)和 Ca^{2+} 释放($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);可以抑制 ADP 诱导的大鼠血小板聚集率($P < 0.01$),且作用明显优于传统三七提取物;全三七片以及和阿司匹林联合用药均可降低胃出血模型大鼠的便隐血等级(均 $P < 0.05$),而单用阿司匹林则未见显著性差异($P > 0.05$);全三七片还可显著缩短小鼠的凝血时间和大鼠的活化部分凝血活酶时间,具有一定的止血作用。**结论:**三七创新药物全三七片具有显著的抗血小板聚集作用,具有多途径、多靶点的作用特点,且因其出色的止血作用还可以降低出血风险,是一种安全、有效的抗血小板新药。

[关键词] 全三七片;血小板聚集; Ca^{2+} ;胃出血;凝血作用

[中图分类号] R965.1;R975.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)18-1874-08

Antiplatelet effect and advantage analysis of Quansanqi tablets

GUO Yan¹, ZHOU Ming-tao¹, GONG Lü-dong¹, ZHONG Cheng-zhi¹, LI Ting¹, YAN Hong¹,
ZHANG Hai-yuan¹, WU De-song¹, YE Yu-jia², ZHANG Jin-yan³, CUI Tao¹, ZHU Zhao-yun¹

(1 Yunnan Institute of Materia Medica/Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China; 2 Laboratory of Molecular Cardiology, Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China; 3 Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the anti-platelet aggregation effect and advantages of Quansanqi tablets (PSQ), an innovative new drug of Panax notoginseng. **Methods:** Human platelet-rich plasma and washed platelets were used to detect the platelet aggregation rate and calcium ion concentration induced by different platelet activators; rat platelet-rich plasma was used to compare the platelet aggregation rate induced by ADP in PSQ and Panax notoginseng extract; gastric bleeding model rats were established by injecting 80% ethanol to investigate the effects of PSQ and aspirin on fecal occult blood; the hemostatic effect of PSQ was observed by mouse and rat coagulation test. **Results:** PSQ could dose-dependently inhibit ADP, thrombin, U46619, collagen and reduce anti-CD9-induced human platelet aggregation rate ($P < 0.01$) and Ca^{2+} release ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); it could inhibit ADP-induced rat platelet aggregation rate ($P < 0.01$), with significantly better effect than Panax notoginseng extract.

[基金项目] 云南省重大科技专项资助项目(2019ZF016)

[作者简介] 郭琰,男,高级工程师,博士,主要从事中药药效活性及机理和新药研究。E-mail:guoyan1@ynby.cn。

[通讯作者] 朱兆云,女,中国工程院院士,正高级工程师,主要从事中药资源(民族药方向)研究工作。E-mail:zzy1370@163.com。

PSQ could reduce the fecal occult blood grade in gastric bleeding model rats ($P < 0.05$), while aspirin could not ($P > 0.05$); it could also significantly shorten the coagulation time in mice and APTT time in rats, indicating certain hemostatic effect. **Conclusion:** PSQ has significant anti-platelet aggregation effect through multiple ways with multiple action targets, and can also reduce the risk of bleeding because of its excellent hemostatic effect, which is a safe and effective new antiplatelet drug.

[Key words] Quansanqi tablets; platelet aggregation; Ca^{2+} ; gastric bleeding; coagulation

血小板是血液循环中的一种无细胞核颗粒。正常状态时,血小板以非活化、圆形、平滑的状态在血液中循环,但在血管内皮损伤或某些生理病理刺激因子作用下,血小板会迅速活化,最终导致血小板聚集^[1]。急性冠脉综合征、缺血性中风的共同病理学基础是血小板异常激活引起动脉血栓形成,抗血小板治疗是必要的^[2]。此外,经皮冠状动脉介入术(PCI)是治疗动脉狭窄或闭塞的主要手段,但支架作为血管内异物,本身就有激活血小板和诱发血栓形成的风险,为防止支架内血栓形成,需长期或终身服用抗血小板药。虽然现有抗血小板药物疗效被肯定,但仍存在抗血栓效果不够满意以及抵抗和出血等不良反应。因此,继续寻找抗血小板和抗血栓效果稳定、出血不良反应小的新型抗血小板药,有望进一步降低冠心病的死亡率^[3]。

三七为五加科人参属植物 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. chen], 是我国的名贵中药材,主产地在云南地区^[4]。《中华人民共和国药典》2020 年版记载:三七味甘、微苦,性温,具有散瘀止血、消肿定痛的功效。而现代研究发现:三七具有降血脂、降血压、保护血管内皮、抗血小板聚集等多重心血管保护作用^[5-7],人食用三七粉(三七根茎)可预防心血管疾病^[8-10]。目前最畅销的三七类药物是血塞通,其主要成分是以三七根茎提取得到的三七总皂苷^[11]。而三七其他部位(包括茎叶和花)同样具有显著的药理活性^[12],但未得到合理的利用,存在资源浪费的现象。为充分整合三七全株资源,充分发掘三七的临床应用价值,课题组在朱兆云院士的带领下,通过人用经验和配伍比例活性筛选,研发出三七创新药物-全三七片,已获得国家发明专利和药品监督管理局颁发的临床试验批件。本文采用不同激活剂诱导人血小板聚集,全面探讨全三七片的抗血小板聚集作用。并通过与三七提取物在抗血小板聚集作用上的对比,与阿司匹林在胃出血模型上的作用差异,以及全三七片的止血作用研究,揭示全三七片抗血小板聚集的作用优势,为全三七片的新药开发提供

科学依据。

材料与方法

1 动物

SPF 级 ICR 小鼠,18 ~ 20 g,雄性,共 50 只;SPF 级 SD 大鼠,180 ~ 220 g,雄性,共 140 只;购自北京斯贝福生物技术有限公司和华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证:SCXK(京)2019-0010 和 SCXK(京)2020-0004。动物分别饲养于云南省药物研究所和北京西苑医院动物房 SPF 级环境,动物饮水、进食自由,温度:20 ℃ ~ 26 ℃,湿度:40% ~ 70%,每天光照 12 h。

2 人单采血小板

本研究使用的人单采血小板由昆明市血液中心提供。血小板来自体检符合献血者规定的 20 ~ 50 岁健康的志愿者,其中女性处于非月经期。献血者献血前 2 周末服用抗血小板及抗凝药物。分离后的血小板经检验合格,于 21 ℃ ~ 25 ℃ 恒温震荡储存。本研究符合赫尔辛基宣言,获得昆明医科大学附属第一医院伦理委员会的批准。献血者均签署知情同意书并给予一定的营养补助。

3 试剂

水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20190524);生理盐水(昆明南疆制药有限公司,批号:C180619A,C190201);羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20160602);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:20171229);枸橼酸钠(西陇科学股份有限公司,批号:1901211);乙二胺四乙酸(EDTA,中国上海生工公司,货号:A600107-0500);4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES,中国上海生工公司,货号:A600264-0001);二磷酸腺苷(ADP, Sigma 公司,批号:SLBN0134V,SLBV4399;U46619(EMD 密里博公司,批号:3213990);胶原(collagen,美国 Chromon-log 公司,货号:385);凝血酶(thrombin,美国 Chromon-log 公司,货号:386);anti-CD9(美国 BD 公司,货号:555371);钙离子荧光

探针(Fluo-3, AM,北京索莱宝科技有限公司,货号:F8841);腺苷三磷酸双磷酸酶(apyrase, Sigma 公司,货号:A6535);便隐血(OB)试剂(珠海贝索生物技术有限公司,批号:2019061);活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)及凝血酶原时间(PT)测定试剂盒(赛科希德生物有限公司,批号分别为 R12D18K4, R31D1814, R4D18E3 及 R10D19A5);阿司匹林(Sigma 公司,批号:SLBV2290);云南白药胶囊(云南白药集团股份有限公司,批号:ZJB1905)。

4 仪器

电子数显卡尺(桂林广陆数字测控有限公司,量程:0~150 mm);JJ-2000 型电子天平(江苏常熟市双杰测试仪器厂);PL203 电子分析天平(上海梅特勒公司);Practum224 SQP 电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司生产];Chrono-Log700-2 血小板聚集仪(美国 Chrono-Log 公司生产);荧光分析仪(美国 Thermo 公司);台式低温冷冻离心机(美国 Thermo 公司);ELGA LA613 超纯水机[英国 ELGA Lab Water/VWS(UK) Ltd 公司];超低温冰箱(-80℃,青岛海尔特种电器有限公司);普通冰箱(合肥美菱股份有限公司生产);血液分析仪(济南汉方医疗器械有限公司和中国迈瑞公司);SF-8100 全自动凝血测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司生);TDL-5 台式低速大容量离心机(江苏金坛市医疗仪器厂);恒温水浴箱(上海恒科学仪器有限公司);恒温震荡箱(中国精宏公司)。

5 供试品

全三七片(PSQ)有效活性成分是 PSQ 浸膏粉,制备工艺如下:将三七花、三七茎叶、三七(含剪口、荆条和主根)按照一定比例混合,用乙醇回流提取 3 次,滤过,滤液减压浓缩,滤过,滤液过大孔树脂柱,依次用水、乙醇溶液洗脱,水洗脱液浓缩至一定密度后醇沉,收集醇沉沉淀;乙醇洗脱液浓缩后与醇沉沉淀合并,减压干燥,粉碎,即得 PSQ 浸膏粉。经含量测定结果显示:PSQ 浸膏粉中含有 30% 左右的三七皂苷、10% 左右的三七多糖和 1% 左右的三七总黄酮。

三七提取物,自制,批号:20200426。制备工艺如下:三七主根加乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,滤液合并后减压浓缩,浓缩至无醇味,静置,滤过,滤液过大孔树脂柱,依次用水、乙醇溶液洗脱,弃去水洗脱液,收集乙醇洗脱液,减压浓缩,干燥粉碎

即可。三七提取物与 PSQ 浸膏粉对比,在含量上主要缺少三七地上部分的皂苷和黄酮以及三七多糖。

本研究的体外研究采用的是 PSQ 浸膏粉(批号:20190826,2019111804)。使用生理盐水或 PBS 配制成相应浓度。体内研究采用 PSQ 混合粉(模拟全三七片,由 PSQ 浸膏粉与空白辅料按 2:1 的比例混合而成,批号:20190910),根据三七临床使用量为 9 g,并结合 PSQ 浸膏粉的提取率,本研究小鼠实验使用的 PSQ 剂量为 0.35,0.7 和 1.4 g·kg⁻¹,相当于三七临床等效剂量、2 倍剂量和 4 倍剂量。胃出血大鼠实验使用的 PSQ 剂量为 0.9 和 1.8 g·kg⁻¹,相当于三七临床 4 倍剂量和 8 倍剂量。凝血四项大鼠实验使用的 PSQ 剂量为 0.25,0.5 和 1.0 g·kg⁻¹,相当于三七临床等效剂量、2 倍剂量和 4 倍剂量。

6 PSQ 对不同激活剂诱导人洗涤血小板聚集的影响^[13]

6.1 人洗涤血小板的制备 取 1 mL 25℃ 恒温震荡储存的人单采血小板于 1.5 mL 离心管中,加入终浓度为 5 mmol·L⁻¹ 的 EDTA 及 0.1 U·mL⁻¹ 的 Apyrase,400×g 室温下离心 10 min;离心后的人血小板弃上清,在细胞沉淀中加入 1 mL 的 Tyrode's Buffer B,5 mmol·L⁻¹ EDTA,0.1 U·mL⁻¹ Apyrase 轻吹匀,400×g 室温下离心 10 min;用 Tyrode's Buffer A 重悬再次离心后的血小板,将血小板计数调整为 150×10⁹·L⁻¹~250×10⁹·L⁻¹。70×g 25℃ 震荡储存,洗涤后的血小板在 1 h 内使用。

6.2 血小板最大聚集率的检测 总体系 400 μL 检测,测试杯通道加入搅拌棒,精密吸取定量为 150×10⁹·L⁻¹~250×10⁹·L⁻¹ 的人洗涤血小板加入测试杯通道,温育 5 min,各给药组加入对应受试药物,空白对照组加入等量的生理盐水,混匀,温育 10 min;用 PBS(加入与待测样本相同的药物,消除药物自身颜色影响)调零,放入测试通道对照。加入不同浓度的血小板激活剂,实时监测并记录血小板聚集曲线 10 min,测定血小板聚集的最大聚集率。洗涤血小板实验共分为 3 组,分别为空白对照组(生理盐水)、PSQ 低浓度组(0.25 mg·mL⁻¹)和 PSQ 高浓度组(1 mg·mL⁻¹),每个实验组重复 6 次。

7 PSQ 对不同激活剂诱导人富血小板血浆聚集的影响

直接采用人单采血小板进行血小板聚集实验,将血小板 800×g 离心 10 min,使用 Tyrode's Buffer A 重悬并定量为 150×10⁹·L⁻¹~250×10⁹·L⁻¹。血小

板最大聚集率的检测方法同“6.2”项。富血小板实验共分为3组,分别为空白对照组(生理盐水)、PSQ低浓度组(ADP和凝血酶诱导:0.1 mg·mL⁻¹、U46619和胶原诱导:0.25 mg·mL⁻¹、anti-CD9:1 mg·mL⁻¹)和PSQ高浓度组(ADP和U46619诱导:1 mg·mL⁻¹、胶原诱导:5 mg·mL⁻¹、凝血酶和anti-CD9诱导:10 mg·mL⁻¹)。每个实验组重复6次。

8 PSQ对不同激活剂诱导人洗涤血小板Ca²⁺释放的影响^[14]

洗涤血小板中加入5 μg·mL⁻¹的Fluo-3, AM。37℃下孵育20 min后加入0.1 U·mL⁻¹的Apyrase和5 mmol·L⁻¹的EDTA,400×g常温离心10 min,去上清。离心后的血小板呈橘红色,Tyrod's Buffer A重悬血小板并调整血小板数量为500×10⁹·L⁻¹。将Ca²⁺探针标记成功的血小板置入96孔黑色平底板。实验分组:空白对照组(生理盐水)和PSQ不同浓度组(0.25,1和10 mg·mL⁻¹),孔内加入不同浓度PSQ和空白对照(生理盐水),37℃孵育10 min。荧光分析仪检测未活化的血小板Ca²⁺释放基线,待释放曲线稳定后加入血小板激活剂,并实时检测Ca²⁺释放曲线,检测时间约为5~10 min。选取Ca²⁺释放RFU峰值为检测样品的Ca²⁺释放量,每个实验组检测4次,空白对照组血小板Ca²⁺释放为对照组,激活剂诱导不同浓度的PSQ孵育的血小板Ca²⁺释放为检测组,计算各个检测组血小板Ca²⁺动员量与对照组的比率。

9 PSQ与三七提取物抗血小板聚集作用对比研究

SPF级雄性SD大鼠5只,3.5%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,采入3.8%枸橼酸钠采血管中,抗凝的血液样本800×g离心15 min,取上层液即得富血小板血浆(PRP),将吸取PRP后剩余血液继续以3000×g离心15 min,取上层液即得贫血小板血浆(PPP)。

血小板最大聚集率的检测方法同“6.2”项。采用的诱导剂为ADP,实验分组为:空白对照组、PSQ不同浓度组(1和5 mg·mL⁻¹)和三七提取物不同浓度组(1和5 mg·mL⁻¹)。血小板抑制率=(空白对照组的最大聚集率-给药组的最大聚集率)/空白对照组的最大聚集率×100%。

10 PSQ对乙醇诱导的胃出血模型大鼠便潜血的影响^[15]

10.1 造模与分组 SPF级雄性SD大鼠84只,按体重随机分为7组,分别为空白对照组(空白辅

料)、模型对照组(空白辅料)、PSQ混合粉低剂量组(0.9 g·kg⁻¹)、PSQ混合粉高剂量组(1.8 g·kg⁻¹)、阿司匹林低剂量组(40 mg·kg⁻¹)、阿司匹林高剂量组(80 mg·kg⁻¹)和PSQ+阿司匹林组(1.8 g·kg⁻¹+80 mg·kg⁻¹),每组12只。各组均按10 mL·kg⁻¹体重灌胃(ig)给药,qd,连续14 d,d15给药后3 h,各组大鼠均ig给予80%乙醇(10 mL·kg⁻¹)造模。造模后3 h再次ig给药一次。大鼠一直给药至实验结束。

10.2 指标检测 分别于造模d3和d4给药1 h后,采用试纸法进行大鼠便隐血的检测,参考便隐血(OB,匹拉米洞半定量检测法)试剂的使用说明书进行评分。

11 PSQ对小鼠凝血时间的影响

SPF级雄性ICR小鼠50只,按体重随机分为5组,分别为空白对照组(空白辅料)、PSQ混合粉低剂量组(0.35 g·kg⁻¹)、PSQ混合粉中剂量组(0.7 g·kg⁻¹)、PSQ混合粉高剂量组(1.4 g·kg⁻¹)和云南白药组(1.4 g·kg⁻¹),每组10只。各组小鼠按照20 mL·kg⁻¹,ig给予相应供试品,qd,连续7 d。末次给药后1 h,小鼠内眦静脉丛取血,迅速将血滴于洁净载玻片两端,每端各1滴,立即用秒表计时,每隔30 s用洁净针头自血滴的边缘轻轻挑动1次,仔细观察有无血丝出现,直至能挑起肉眼可见的血丝为止,此即为小鼠凝血时间。

12 PSQ对大鼠凝血四项的影响

SPF级雄性SD大鼠50只,按体重随机分为5组,分别为空白对照组(空白辅料)、PSQ混合粉低剂量组(0.25 g·kg⁻¹)、PSQ混合粉中剂量组(0.5 g·kg⁻¹)、PSQ混合粉高剂量组(1.0 g·kg⁻¹)和云南白药组(1.0 g·kg⁻¹),每组10只。各组小鼠按照20 mL·kg⁻¹,ig,给予相应供试品,qd,连续7 d。末次给药后1 h自腹主动脉取血,分离制备血浆,按照试剂盒说明,用全自动凝血测试仪测定血浆样本中APTT,FIB,TT及PT。

13 数据处理

所有数据用均数±标准差/标准误表示。应用SPSS统计软件进行单因素方差分析统计,两两比较,假定方差齐者用LSD检验,方差不齐采用Dunnett's T3检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1 PSQ对不同激活剂诱导人洗涤血小板聚集的影响

与空白对照组比较,PSQ与人洗涤血小板在

37 ℃下孵育 10 min 后加入不同种类的血小板膜蛋白激活剂,PSQ 可以剂量依赖性地抑制 ADP、凝血酶、U46619、胶原、anti-CD9 诱导的血小板聚集率(均 $P < 0.01$)。详见表 1。

表 1 PSQ 对多种激活剂诱导的人洗涤血小板聚集的影响 % , $\bar{x} \pm s, n = 6$

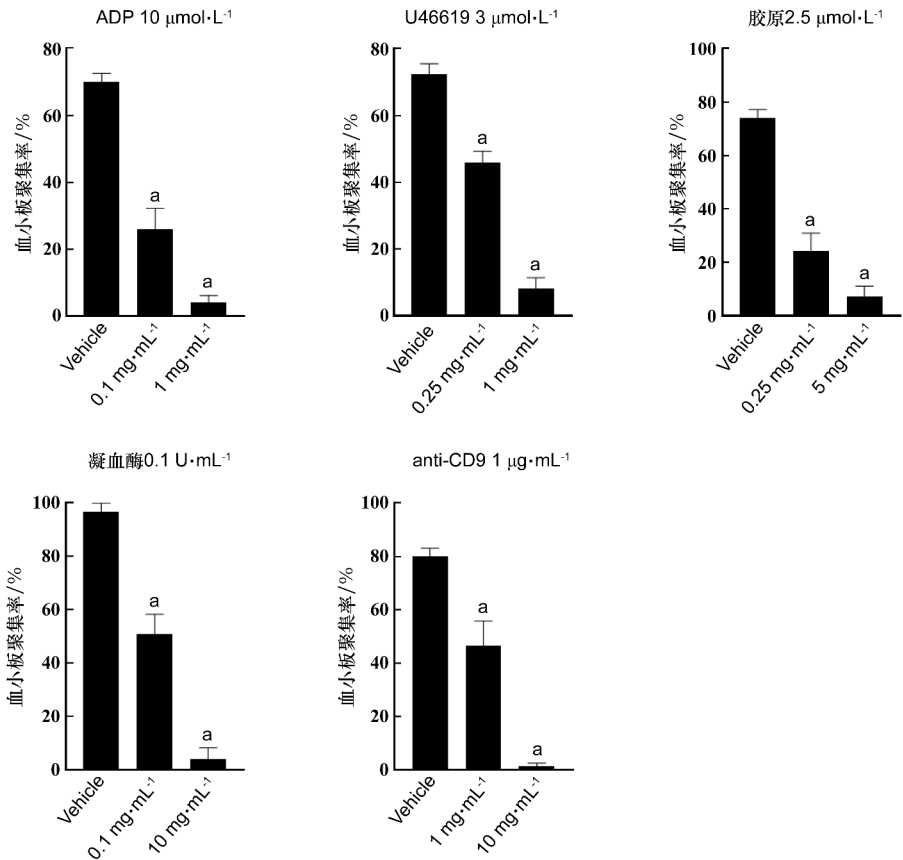
诱导剂	聚集率		
	空白对照	PSQ(0.25 mg·mL ⁻¹)	PSQ(1 mg·mL ⁻¹)
ADP(10 μmol·L ⁻¹)	47.5 ± 6.0	21.7 ± 3.1 ^a	3.3 ± 2.1 ^a
U46619(3 μmol·L ⁻¹)	91.7 ± 1.7	19.2 ± 8.8 ^a	1.7 ± 1.7 ^a
胶原(2.5 μg·mL ⁻¹)	71.7 ± 1.1	40.2 ± 5.3 ^a	6.7 ± 1.1 ^a
凝血酶(0.05 U·mL ⁻¹)	80.8 ± 3.3	43.3 ± 4.2 ^a	5.1 ± 5.0 ^a
Anti-CD9(1 μg·mL ⁻¹)	82.5 ± 1.7	64.2 ± 3.3 ^a	8.3 ± 4.6 ^a

与空白对照组比较,a: $P < 0.01$

2 PSQ 对不同激活剂诱导人富血小板血浆聚集的影响

与空白对照组比较,PSQ 与人单采血小板在 37 ℃下孵育 10 min 之后加入不同种类的血小板膜

蛋白激活剂,PSQ 不同浓度(0.1 ~ 10 mg·mL⁻¹)可以剂量依赖性地抑制 ADP、凝血酶、U46619、胶原、anti-CD9 诱导的血小板聚集率(均 $P < 0.01$)。详见图 1。



与空白对照组比较,a: $P < 0.01$

图 1 PSQ 对不同激活剂诱导的人富血小板血浆聚集的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 PSQ 对不同激活剂诱导人洗涤血小板 Ca^{2+} 释放的影响

与空白对照组比较,PSQ 浸膏粉与人洗涤血小板在 37 ℃ 下孵育 10 min 后加入不同种类的血小板

膜蛋白激活剂,ADP、凝血酶、U46619、胶原和 anti-CD9 均可刺激血小板 Ca^{2+} 释放,PSQ 浸膏粉可以剂量依赖性的抑制不同激活剂诱导的 Ca^{2+} 释放 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。详见表 2。

表 2 PSQ 对多种激活剂诱导的人洗涤血小板 Ca^{2+} 释放的影响

$\bar{x} \pm s, n = 6$

激活剂	空白对照	PSQ (0.25 mg·mL ⁻¹)	PSQ (1 mg·mL ⁻¹)	PSQ (10 mg·mL ⁻¹)
ADP (10 μmol·L ⁻¹)	1.00	0.39 ± 0.11 ^b	0.2 ± 0.14 ^b	0.03 ± 0.03 ^b
U46619 (3 μmol·L ⁻¹)	1.00	0.55 ± 0.17 ^a	0.36 ± 0.13 ^b	0.34 ± 0.16 ^b
胶原 (2.5 μg·mL ⁻¹)	1.00	0.86 ± 0.08	0.47 ± 0.10 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
凝血酶 (0.05 U·mL ⁻¹)	1.00	0.45 ± 0.09 ^b	0.34 ± 0.13 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
Anti-CD9 (1 μg·mL ⁻¹)	1.00	0.37 ± 0.06 ^b	0.29 ± 0.06 ^b	0.03 ± 0.03 ^b

与空白对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

4 与三七提取物的抗血小板聚集作用的对比

与空白对照组比较,PSQ 和三七提取物与大鼠富血小板血浆在 37 ℃ 下孵育 10 min 后加入 ADP 诱导剂,PSQ 高剂量组和三七提取物高剂量组可以显著降低 ADP 诱导的血小板聚集率 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与三七提取物高剂量组比较,PSQ 高剂量组可以显著降低血小板聚集率 (均 $P < 0.01$),提示 PSQ 的抗血小板聚集作用明显优于三七提取物。详见表 3。

表 3 不同三七制品对 ADP 诱导正常大鼠

血小板聚集的影响 $\bar{x} \pm s, n = 6$

组别	终浓度/mg·mL ⁻¹	聚集率/%	抑制率/%
空白对照	—	52.8 ± 3.0	—
PSQ 低剂量	1	48.8 ± 4.7	7.5
PSQ 高剂量	5	19.2 ± 7.6 ^{bc}	63.6
三七提取物低剂量	1	51.8 ± 4.2	1.9
三七提取物高剂量	5	43.3 ± 4.7 ^a	18.0

与空白对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与三七提取物高剂量组比较, c: $P < 0.01$

5 对乙醇诱导的胃出血模型大鼠便潜血的影响

与正常对照组比较,造模后 d 3 和 d 4,模型对照组大鼠便隐血等级显著升高 ($P < 0.05$),提示模型造模成功。与模型对照组比较,PSQ 混合粉各剂量组可以显著降低大鼠的便隐血等级 (均 $P < 0.05$),其中 PSQ 混合粉高剂量组大鼠的便隐血等级为 0;阿司匹林各剂量组大鼠的便隐血等级未见显著性差异 (均 $P > 0.05$);而 PSQ 混合粉和阿司匹林联合用药组大鼠的便隐血等级亦显著降低 ($P < 0.05$)。详见表 4。

表 4 PSQ 对乙酸致胃出血模型大鼠便隐血

等级的影响 $\bar{x} \pm s, n = 12$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	便隐血等级	
		造模后 d 3	造模后 d 4
正常对照	—	0 ± 0	0 ± 0
模型对照	空白辅料	2.73 ± 1.27 ^a	2.33 ± 1.37 ^a
PSQ 低剂量	0.9	1.09 ± 1.22 ^b	0.91 ± 1.22 ^b
PSQ 高剂量	1.8	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ²⁾
阿司匹林低剂量	0.04	2.56 ± 1.24	1.55 ± 1.21
阿司匹林高剂量	0.08	2.43 ± 1.62	1.63 ± 1.60
PSQ + 阿司匹林	1.8 ± 0.08	0.82 ± 1.25 ^b	0.33 ± 0.49 ^b

与正常对照组比较, a: $P < 0.05$; 与模型对照组比较, b: $P < 0.05$

6 PSQ 对小鼠凝血时间的影响

与空白对照组比较,PSQ 混合粉各剂量组小鼠的凝血时间显著缩短 (均 $P < 0.01$),且呈一定的剂量依赖性。详见表 5。

表 5 PSQ 对玻片法致小鼠凝血时间的影响

$\bar{x} \pm s, n = 10$

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凝血时间/s
空白对照	—	148.8 ± 29.2
PSQ 低剂量	0.35	106.1 ± 16.9 ^a
PSQ 中剂量	0.7	78.2 ± 13.8 ^a
PSQ 高剂量	1.4	61.0 ± 16.7 ^a
云南白药	1.4	58.0 ± 13.9 ^a

与空白对照组比较, a: $P < 0.01$

7 PSQ 对大鼠凝血四项的影响

与空白对照组比较,PSQ 混合粉低剂量和高剂

量组大鼠的 APTT 显著缩短 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 PT, TT 和 FIB 无显著性差异 ($P > 0.05$)。

提示, PSQ 混合粉可促进内源性凝血功能。详见表 6。

表 6 PSQ 对大鼠凝血四项的影响 $\bar{x} \pm s, n = 8 \sim 10$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	凝血四项			
		PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照	0.33	11.95 $\pm$ 0.33	13.03 $\pm$ 1.27	20.18 $\pm$ 0.94	1.64 $\pm$ 0.12
PSQ 低剂量	0.25	11.71 $\pm$ 0.28	11.16 $\pm$ 1.13 ^a	20.45 $\pm$ 3.06	1.96 $\pm$ 0.43
PSQ 中剂量	0.5	12.48 $\pm$ 0.47	11.45 $\pm$ 2.51	19.65 $\pm$ 1.51	1.74 $\pm$ 0.23
PSQ 高剂量	1	11.9 $\pm$ 0.33	9.82 $\pm$ 0.99 ^b	19.90 $\pm$ 1.14	1.58 $\pm$ 0.24
云南白药	1	12.05 $\pm$ 0.52	11.09 $\pm$ 1.91 ^a	19.05 $\pm$ 0.79	2.21 $\pm$ 0.78 ^b

与空白对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

讨 论

冠心病是因冠状动脉发生粥样硬化, 使血管内狭窄或发生阻塞, 从而导致心肌细胞缺血缺氧的心脏疾病。冠心病最常见的死亡原因是发生动脉血栓性栓塞或相关并发症, 动脉粥样硬化斑块不稳定是动脉血栓形成的主要病理基础, 血小板在破损斑块的黏附聚集及动脉血栓形成过程中发挥了“扳机”作用^[16-17]。PCI 手术是治疗冠状动脉狭窄和栓塞的有效治疗手段, 可以起到立竿见影的效果。但为了防止支架内血栓形成, 需长期或终身服用抗血小板药。在现有心血管疾病治疗指南中, 服用阿司匹林或氯吡格雷等抗血小板药都是必需的^[18]。然而, 近年来随着相关研究的逐渐深入, 阿司匹林也在走下神坛^[19]。哈佛大学和牛津大学的临床研究报告都显示, 阿司匹林在血栓形成的预防作用并不足以抵消其带来的出血不良反应, 阿司匹林仅将严重心脑血管疾病的风险降低了 12%, 却将发生大出血概率提高了 29%。因此, 继续寻找安全、有效的抗血小板新药迫在眉睫。

陈可冀院士的一篇文章中指出“活血化瘀中药具有明确的抗血小板及抗动脉粥样硬化的临床疗效, 从传统活血化瘀中药中筛选出高效、低副作用的抗血小板药物近年来引起国内外学者的极大关注”^[20]。三七作为我国的传统活血化瘀中药, 在抗血小板聚集方面的研究也是屡见不鲜^[21-22], 且大多集中于三七总皂苷或其主要皂苷成分^[23]。而三七其他部位(三七茎叶及三七花)中主要成分的抗血小板聚集作用报道较少。全三七片创新性地整合了三七全株资源, 将三七花、三七茎叶、三七主根按一

定比例配伍, 以三七(主根、筋条、剪口)为君, 取其散瘀、定痛、补虚之功; 以三七茎叶为臣, 取其活血、养血安神之效; 以三七花为佐, 取其清热、生津之效, 以应对长期服用三七的温燥之虞。以上药味合用, 可以更好地发挥三七活血散瘀之功效。此外, 三七具有“止血不留瘀”的特点, 活血散瘀又兼有止血作用, 善于应对各种出血, 尤以有瘀滞者为宜, 对减少出血不良反应大有裨益。现代研究同样发现, 三七具有止血和活血的双重功效^[24], 相较于其他活血化瘀中药可能具有一定的优势。

血小板聚集率可较好地反映血小板的活化程度^[25]。血小板的活化与其表面受体的激活直接相关, 阿司匹林和氯吡格雷通过抑制血小板表面的 TXA₂ 受体和 P₂Y 受体起到抗血小板聚集的作用^[26-27]。在本研究中, 全三七片对 ADP、凝血酶、U46619、胶原和 anti-CD9 等多种血小板激活剂均具有显著的抑制作用, 但对不同激活剂诱导的血小板聚集的抑制剂量和强度有所区别。此外, 胞浆内 Ca²⁺ 浓度在血小板活化过程中发挥重要作用^[28], 激活剂刺激血小板表面受体后, 使血小板上的 PLC 蛋白活化, 水解生成 IP₃, IP₃ 激活内质网上的 IP₃R 受体释放 Ca²⁺ 到胞浆中, Ca²⁺ 浓度升高一方面激活肌球蛋白轻链酶, 进而改变血小板的细胞骨架结构, 另一方面促进多种钙依赖蛋白酶的作用, 使血小板释放反应增加, 参与血栓形成^[29-31]。本研究发现全三七片可以抑制不同激活剂诱导的细胞内 Ca²⁺ 浓度, 可能是其抗血小板聚集的作用机制之一。以上结果提示全三七片的抗血小板聚集作用是多途径、多靶点的整合调节作用。

在本研究中, 全三七片抗血小板聚集的优势分

析:首先,我们与单纯使用三七的提取物进行了对比研究,结果发现,全三七片主要活性成分的抗血小板聚集作用明显优于传统三七提取物。其次,临床上阿司匹林的不良反应主要是胃出血。我们利用反向思维,建立大鼠的胃出血模型,结果发现,全三七片对胃出血模型大鼠具有较好的治疗作用,而阿司匹林则没有,此外,二者合用同样可以改善胃出血状况,也揭示了二者联合用药的可能性和优势。最后,结合凝血实验和相关指标检测发现,全三七片同时具有较好的止血作用,可能与促进内源性凝血功能有关。

三七创新药物全三七片具有显著的抗血小板聚集作用,具有多途径、多靶点的作用特点,且因其出色的止血作用还可以降低出血风险,是一种安全、有效的抗血小板新药。全三七片新药的开发不仅可以弥补阿司匹林等抗血小板药物在心血管疾病治疗和预防应用中的不足,还可以充分利用三七全株资源,促进三七产业的发展。

[参 考 文 献]

- [1] LINDEMANN S, KRÄMER B, SEIZER P, *et al.* Platelets, inflammation and atherosclerosis[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5 (Suppl 1): S203 – S211.
- [2] HUILCAMAN R, VENTURINI W, FUENZALIDA L, *et al.* Platelets, a key cell in inflammation and atherosclerosis progression[J]. *Cells*, 2022, 11(6): 1014.
- [3] 卢忠仁. 抗血小板药: 现状、挑战及趋势[J]. 中山大学学报(医学版), 2018(4): 481 – 492.
- [4] HUANG YD, CHENG JX, SHI Y, *et al.* Panax notoginseng: a review on chemical components, chromatographic analysis, P. notoginseng extracts, and pharmacology in recent five years[J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(10): 2584 – 2596.
- [5] DUAN L, XIONG XJ, HU JY, *et al.* Panax notoginseng saponins for treating coronary artery disease: a functional and mechanistic overview[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 702.
- [6] XU Y, TAN HY, LI S, *et al.* Panax notoginseng for inflammation-related chronic diseases: a review on the modulations of multiple pathways[J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(5): 971 – 996.
- [7] XU CC, WANG WW, WANG B, *et al.* Analytical methods and biological activities of Panax notoginseng saponins: recent trends[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 236: 443 – 465.
- [8] JI C, ZHANG Q, SHI R, *et al.* Determination of the authenticity and origin of Panax notoginseng: a review[J]. *J AOAC Int*, 2022, 105(6): 1708 – 1718.
- [9] 卢淑立, 冯妍, 高杰, 等. 三七提取物在心血管疾病临床应用中的研究进展[J]. 中国全科医学, 2021, 24(5): 539 – 545.
- [10] 张洪权. 三七提取物在心血管疾病中的作用机制[J]. 当代医学, 2022, 28(13): 190 – 192.
- [11] WANG CG, DENG XQ, WANG ZY, *et al.* PNS protects brain against ischemic injury by acting as an antagonist for AGE/RAGE signaling[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(10): e532.
- [12] WANG T, GUO R, ZHOU G, *et al.* Traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of Panax notoginseng (Burk.) F. H. Chen: a review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 188: 234 – 258.
- [13] YIP J, ALSHAHRANI M, BEAUCHEMIN N, *et al.* CEACAM1 regulates integrin α IIb β 3-mediated functions in platelets[J]. *Platelets*, 2016, 27(2): 168 – 177.
- [14] YE YJ, WAN W, WANG J, *et al.* The CEACAM1-derived peptide QLSN impairs collagen-induced human platelet activation through glycoprotein VI[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2020, 84(1): 85 – 94.
- [15] 李杰, 崔淑香, 周玲, 等. 瓦松提取物对实验性胃溃疡的治疗作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(4): 388 – 391.
- [16] DAVI G, PATRONO C. Platelet activation and atherothrombosis[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(24): 2482 – 2494.
- [17] AUKRUST P, HALVORSEN B, UELAND T, *et al.* Activated platelets and atherosclerosis[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(9): 1297 – 1307.
- [18] 《中国血栓性疾病防治指南》专家委员会. 中国血栓性疾病防治指南[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(36): 2861 – 2888.
- [19] US PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE, DAVIDSON KW, BARRY MJ, *et al.* Aspirin use to prevent cardiovascular disease: us preventive services task force recommendation statement[J]. *JAMA*, 2022, 327(16): 1577 – 1584.
- [20] 刘玥, 殷惠军, 史大卓, 等. 活血化瘀中药与抗血小板治疗[J]. 科学通报, 2014, 59(8): 647 – 655.
- [21] 梁慧慧, 张世亮. 基于网络药理学探究人参-三七药对改善无症状性心肌缺血作用机制[J]. 世界中医药, 2022, 17(2): 167 – 171.
- [22] WANG MM, XUE M, XU YG, *et al.* Panax notoginseng saponin is superior to aspirin in inhibiting platelet adhesion to injured endothelial cells through COX pathway *in vitro*[J]. *Thromb Res*, 2016, 141: 146 – 152.
- [23] QI HY, HUANG YL, YANG Y, *et al.* Anti-platelet activity of panaxatriol saponins is mediated by suppression of intracellular calcium mobilization and ERK2/p38 activation[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 174.
- [24] 武琦, 林娟, 刘耀晨, 等. 基于网络药理学的三七传统功效作用机制研究[J]. 中草药, 2020, 51(14): 3717 – 3727.
- [25] HARRISON P, MACKIE I, MUMFORD A, *et al.* Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function[J]. *Br J Haematol*, 2011, 155(1): 30 – 44.
- [26] SANTILLI F, BOCCATONDA A, DAVI G. Aspirin, platelets, and cancer: the point of view of the internist[J]. *Eur J Intern Med*, 2016, 34: 11 – 20.
- [27] WANG L, OSTBERG O, WIHLBORG AK, *et al.* Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets[J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(2): 330 – 336.
- [28] YADAV P, BEURA SK, PANIGRAHI AR, *et al.* Platelet-derived microvesicles activate human platelets via intracellular calcium mediated reactive oxygen species release[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2023, 98: 102701.
- [29] 郭寒, 杨威, 夏成, 等. 血小板与钙离子信号的研究进展[J]. 动物医学进展, 2019, 40(1): 84 – 87.
- [30] 黄玲芳, 张二云, 高波, 等. 血小板信号转导及相关抗血小板药物的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2014(3): 378 – 383.
- [31] 何杰, 刘槿, 王菁, 等. 从血小板探讨血瘀证与肿瘤化疗耐药的关系及活血法作用机制[J]. 世界中医药, 2023, 18(3): 440 – 444.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-05-14