

# 東莨菪素對家兔血小板聚集性抑制之研究

劉淑鈴<sup>1</sup> 林立偉<sup>1</sup> 劉正雄<sup>2</sup> 謝明村<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中國醫藥學院 中國藥學研究所

<sup>2</sup> 中國醫藥學院 藥學系

## 摘 要

東莨菪素經由家兔靜脈注射 (2, 10, 50 mg/kg, i.v.) 或口服 (50, 100, 250 mg/kg, p.o.) 後，使用比濁法，分析對 ADP、AA、collagen 誘導的血小板聚集抑制效果，結果東莨菪素在靜脈注射與口服後，其抑制血小板聚集作用均呈現良好曲線變化，靜脈注射 5 分鐘後之抑制作用最強，口服則以 30 分鐘後對血小板聚集之抑制作用最強，且東莨菪素在一定濃度範圍內對血小板聚集抑制效果呈現劑量依賴關係，即血中濃度愈高，聚集抑制效果愈佳。靜脈注射東莨菪素後對 ADP、AA、collagen 血小板聚集最大抑制率平均值分別為 47.8，50.7，55.5 %；而口服東莨菪素對三種誘導劑最大抑制率平均值分別為 41.3，48.8，47.5 %。本研究獲致結論為東莨菪素經由家兔靜脈、口服給藥後，抽血進行體外分析，對 ADP、AA、collagen 誘導之血小板聚集有抑制效果，抑制大小分別與其血中藥物濃度、作用時間有關，且東莨菪素具有抑制血小板聚集的功能機轉與 ADP、AA、collagen 有關。

**關鍵詞：**東莨菪素、半體內實驗、血小板聚集、比濁法

---

聯絡作者：劉淑鈴

通訊處：台中市學士路 91 號 中國藥學研究所

電話：+886-4-22053366 ext. 1707

傳真：+886-4-22053958

E-mail: slliu@mail.cmc.edu.tw

收文日期：09/02/2002

收受日期：11/11/2002

## 前言

心、腦血管血栓是常見的疾病，而血栓病理改變又與血小板功能異常有密切關係<sup>(1)</sup>。已知 coumarin 類之化合物大都具有抗血小板凝聚的作用<sup>(2-4)</sup>，枸杞子成分，東莨菪素 (scopolin) 亦是具有 coumarin 的結構，其抗血小板聚集的作用，Okada 等人證實，藉由家兔體外試驗 (in-vitro)，東莨菪素對血小板聚集作用也有抑制的效果<sup>(5)</sup>，且作者曾探討東莨菪素之藥物動力學研究，獲得其血漿中藥物最高濃度、分佈體積、清除率等數據<sup>(6, 7)</sup>，但東莨菪素在體內對血小板的作用如何，則尚未見報導。

本研究擬進一步採用半體內 (semi-in-vivo) 試驗法，經由家兔靜脈、口服二種給藥途徑給予東莨菪素，待體內吸收分佈後，抽血離心進行體外比濁法實驗<sup>(8, 9)</sup>，觀察東莨菪素對 adenosine 5'-diphosphate (ADP)、arachidonic acid (AA)、collagen 三種血小板聚集誘導劑之抑制作用，探討東莨菪素聚集抑制率與血中藥物濃度之關係。

## 材料與方法

### 一、藥品與儀器

本研究所需藥品與試劑：ADP、AA、collagen (Helena BioSciences Co.)，稀釋液、白血球分類溶血液 (三東儀器)，東莨菪素 (TCI 東京化成)。儀器與設備：血小板聚集儀 (Helena BioSciences Co.)，自動血球分類計數器 (TOA Co.)，微量移液管，試管振盪器。

### 二、實驗方法

#### (一) 實驗前準備事項

家兔抽血後需在3小時內完全檢測完畢。血小板聚集測定儀、比濁管皆於測定前於37℃至少溫機20 min。聚集誘導劑 (ADP、AA、collagen) 實驗中均維持於2 - 6℃，且於實驗前才使用0.9%生理食鹽水稀釋調製，並於有效期限內使用完畢。

#### (二) 操作步驟

家兔採血前至少空腹8小時，且至少二週內未給任何藥物。用注射器取兔血，立即將血液放入採血管，內含 sodium citrate solution (0.129 M, 3.8%)，與血之比為1:9。輕輕搖晃均勻，將血液在室溫下，以1,000轉/分，離心10 min，吸出上層 platelet rich plasma (PRP)。餘下的血漿再以3,000轉/分，離心10 min，管中上清液即 platelet poor plasma (PPP)。血液檢品先置於有蓋的棕色尖嘴微量管內，使用自動血球分類計數器，測量PRP中血小板數，以PPP調PRP使血小板數在 $500 \times 10^3 \mu\text{L}$ 範圍。

血小板聚集測定儀先溫機20 min，使溫度到達37℃。接著取0.45 mL的PRP置於比濁管內。測定時先以0.45 mL PPP標本將記錄儀上的透光度調節到100%，然後將0.45 mL PRP標本放入測定孔，調節透光度為0%，加攪拌石，在37℃溫育3-5 min。隨後在PRP中加入0.05 mL聚集誘導劑：ADP (10  $\mu\text{M}$ )、AA (500  $\mu\text{g/mL}$ )、collagen (10  $\mu\text{g/mL}$ )，並於3小時內完成測定。觀察和比較 PRP 對照與給藥管在5min內最大聚集程度，計算藥物血小板聚集抑制率百分率，ratio of anti-platelet aggregation (%)：

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{MAX\% of control} - \text{MAX\% of sample}}{\text{MAX\% of control}} \times 100$$

MAX %: maximal intensity of platelet aggregation and agglutination.

#### (三) 半體內實驗

##### 1. 靜脈注射給藥

實驗時家兔先稱重記錄實際體重以便配製溶液。東莨菪素溶液之調配：每10 mg藥物以1 mL去離子水溶解，且每1 mL內含0.01 mL 1N NaOH助溶。靜脈給藥時經過0.22  $\mu\text{m}$ 濾膜過濾，成為東莨菪素注射溶液。分別給予2, 10, 與50 mg/kg三種不同劑量，每種劑量以8隻家兔為一組。家兔先以固定器固定之，再以70%酒精消毒並助血管擴張，隨即於給藥前先動脈抽取7.2 mL之對照組空白血液，由另一耳靜脈給藥後，分別於給藥後5, 30, 75, 150及300 min再分別由動脈抽取7.2 mL實驗組血液，置

於採血管中，輕輕搖晃均勻，待離心後依照操作步驟，進行分析與記錄。

## 2. 口服給藥

口服給藥是以胃管插入給藥，分別給予50, 100, 與250 mg/kg三種不同劑量，每種劑量以8隻家兔為一組。家兔先以固定器固定之，再以酒精消毒並助血管擴張，隨即於給藥前動脈抽取7.2 mL之對照組空白血液，口服給藥後，分別於給藥後10, 30, 60, 150及300 min再分別由動脈抽血，置於採血管中，輕輕搖晃均勻，待離心後分析之操作步驟如靜脈注射給藥，分析記錄給藥前後，血小板聚集性之抑制作用。其餘操作如同上述靜脈注射給藥方式。

## 三、數據處理及統計方法

將東莨菪素溶液依不同濃度、不同時間，給藥後之血小板聚集抑制率，與給藥前進行Paired t-test，統計並分析其間差異之顯著性，凡p值小於0.05，則認為其差異有統計意義。

## 結果

觀察家兔血小板聚集性採用Born氏比濁法(8, 9)，利用聚集測定儀，先測出對照組對ADP、AA、collagen誘導的曲線圖，得到血小板最大聚集百分率(MAX %)，例如分別為73.2, 88.6, 95.9 % (Fig. 1-top)，做為對照組，與給藥組分析比較。

東莨菪素家兔靜脈注射(2、10、50 mg/kg, i.v.)後，分別於5, 30, 75, 150及300 min抽血分析，結果對ADP、AA、collagen血小板誘導的聚集抑制呈現良好曲線變化，如(Fig. 1-middle)。靜脈注射東莨菪素，呈現劑量依賴關係，且以5 min時，得到最大血小板抑制率，平均值分別為47.8, 50.7, 55.5 %，與給藥前比較，其p值皆小於0.001。靜脈注射給藥前與給藥後所得數據如Table 1。

家兔口服東莨菪素50, 100與250 mg/kg後，分別於10, 30, 60, 150及300 min抽血分析，結果對ADP、AA、collagen誘導的聚集抑制率，亦呈劑量依賴關係，其抑制血小板聚

集作用呈現良好曲線變化，如(Fig. 1-bottom)。口服東莨菪素以30 min對血小板聚集之抑制效果最強，三種誘導劑之聚集抑制率平均值分別為41.3, 48.8, 47.5%。其次60 min的抑制率，可達37.4~45.3%，與給藥前聚集抑制率比較，其p值皆小於0.001，結果數據如Table 2。

另外，研究了東莨菪素對家兔血小板聚集的in-vitro試驗，結果在體外能抑制ADP、AA、collagen誘導的家兔血小板聚集，其IC<sub>50</sub>分別為0.526、0.409、0.436  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

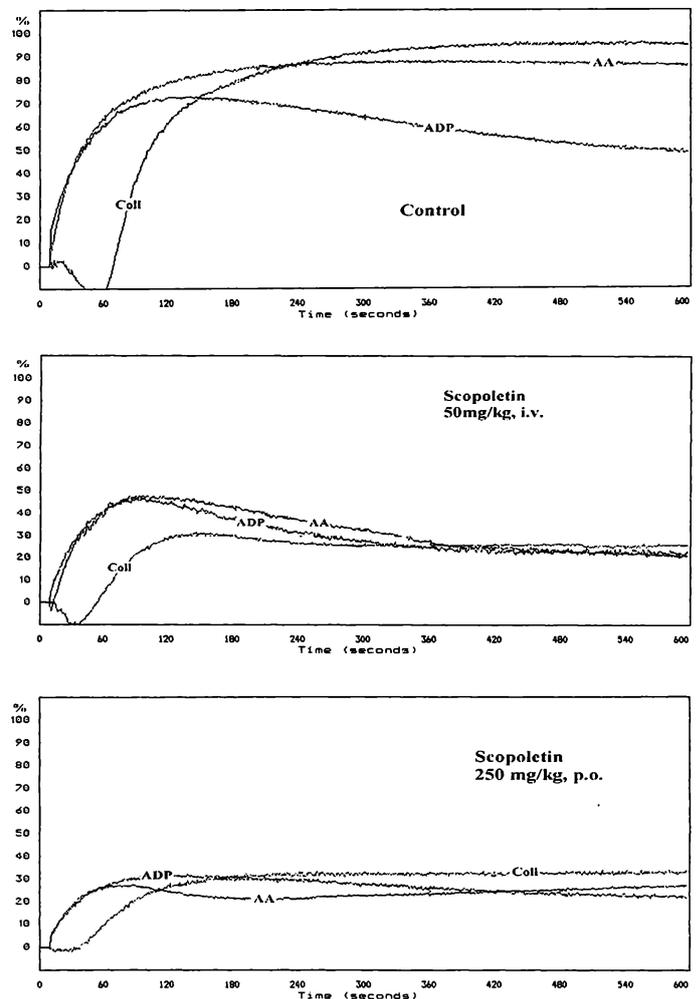


Fig 1. Maximal intensity and velocity of platelet aggregation induced by ADP (10  $\mu\text{M}$ ), AA (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and collagen (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in rabbit 4 at control (*top*), 5 min after scopoletin (50 mg/kg, i.v.) (*middle*) and 30 min after scopoletin (250 mg/kg, p.o.) (*bottom*). ADP: adenosine 5'-diphosphate, AA:arachidonic acid, Coll: collagen.

Table 1. Effect of scopoletin bolus intravenous injection on rabbits platelet aggregation induced by ADP, AA and collagen.

Drug	Dose (mg/kg)	Time (min)	ADP(10 $\mu$ M)		AA(500 $\mu$ g/mL)		Collagen(10 $\mu$ g/mL)	
			MAX(%)	Inhibition(%)	MAX(%)	Inhibition(%)	MAX(%)	Inhibition(%)
Scop	2	0	63.4 $\pm$ 10.1	—	81.1 $\pm$ 10.9	—	84.8 $\pm$ 7.8	—
		5	58.2 $\pm$ 9.8 <sup>c</sup>	8.1	75.8 $\pm$ 10.7 <sup>b</sup>	7.2	76.4 $\pm$ 10.0 <sup>c</sup>	10.2
		30	60.5 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	4.7	77.8 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>	4.0	77.4 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>	8.8
		75	60.5 $\pm$ 9.3 <sup>a</sup>	4.4	79.1 $\pm$ 9.3	2.2	79.7 $\pm$ 8.7	6.4
		150	61.1 $\pm$ 10.8 <sup>b</sup>	3.7	80.2 $\pm$ 10.6	1.0	82.2 $\pm$ 5.4	2.7
		300	62.3 $\pm$ 9.6	1.5	80.3 $\pm$ 9.8	0.8	83.9 $\pm$ 7.8	1.1
	10	0	65.1 $\pm$ 9.3	—	85.2 $\pm$ 10.6	—	90.8 $\pm$ 4.7	—
		5	49.2 $\pm$ 8.4 <sup>c</sup>	24.2	59.8 $\pm$ 8.9 <sup>c</sup>	29.5	67.0 $\pm$ 10.6 <sup>c</sup>	26.4
		30	54.3 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup>	16.2	67.03 $\pm$ 11.0 <sup>b</sup>	20.9	74.5 $\pm$ 9.3 <sup>c</sup>	18.1
		75	57.4 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>	11.5	73.7 $\pm$ 9.2	13.1	80.9 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>	10.9
		150	60.9 $\pm$ 10.3 <sup>b</sup>	6.7	76.9 $\pm$ 8.1 <sup>c</sup>	9.5	85.1 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	6.2
		300	62.7 $\pm$ 8.5	3.5	81.4 $\pm$ 9.0 <sup>b</sup>	4.2	88.8 $\pm$ 6.3	2.2
	50	0	68.6 $\pm$ 5.1	—	89.2 $\pm$ 4.0	—	91.5 $\pm$ 2.8	—
		5	35.8 $\pm$ 8.9 <sup>c</sup>	47.8	44. $\pm$ 8.4 <sup>c</sup>	50.7	40.7 $\pm$ 6.2 <sup>c</sup>	55.5
		30	45.6 $\pm$ 9.2 <sup>c</sup>	33.1	52.2 $\pm$ 3.8 <sup>c</sup>	41.4	52.5 $\pm$ 4.3 <sup>c</sup>	42.6
		75	53.1 $\pm$ 9.4 <sup>b</sup>	22.6	60.8 $\pm$ 4.8 <sup>c</sup>	31.7	60.4 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	34.0
		150	61.0 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	10.9	69.2 $\pm$ 8.8 <sup>c</sup>	22.4	70.8 $\pm$ 3.6 <sup>c</sup>	22.6
		300	62.2 $\pm$ 4.8 <sup>c</sup>	9.3	75.5 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>	15.3	79.0 $\pm$ 4.8 <sup>c</sup>	13.6

All values of platelet aggregation are expressed as mean  $\pm$  S.D., (n = 8). <sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001 compared with the group before i.v. application of scopoletin (0 min) by Paired t test. MAX (%): maximal intensity of platelet aggregation and agglutination, Inhibition (%) = (MAX % of control-MAX % of sample) / MAX % of control  $\times$  100, Scop: scopoletin, ADP: adenosine 5'-diphosphate, AA: arachidonic acid.

Table 2. Effect of scopoletin oral administration on rabbits platelet aggregation induced by ADP, AA and collagen.

Drug	Dose (mg/kg)	Time (min)	ADP(10 $\mu$ M)		AA(500 $\mu$ g/mL)		Collagen(10 $\mu$ g/mL)	
			MAX(%)	Inhibition(%)	MAX(%)	Inhibition(%)	MAX(%)	Inhibition(%)
Scop	50	0	62.2 $\pm$ 7.5	—	89.1 $\pm$ 4.9	—	91.2 $\pm$ 5.4	—
		10	61.7 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	5.0	86.7 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	2.7	86.6 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	4.9
		30	59.6 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	12.6	80.5 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	9.7	79.2 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	12.9
		60	56.0 $\pm$ 6.0 <sup>c</sup>	13.9	80.5 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	9.5	81.8 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	10.2
		150	57.7 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup>	11.1	82.8 $\pm$ 6.0	7.1	83.1 $\pm$ 5.5 <sup>b</sup>	8.8
		300	60.2 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	8.1	86.0 $\pm$ 5.0	3.5	87.9 $\pm$ 4.6	3.7
	100	0	63.1 $\pm$ 6.4	—	89.4 $\pm$ 3.7	—	92.3 $\pm$ 4.3	—
		10	57.0 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup>	9.4	82.9 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	7.2	84.3 $\pm$ 5.5 <sup>a</sup>	8.5
		30	45.8 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	27.3	69.83 $\pm$ 7.8 <sup>c</sup>	21.8	69.6 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>	24.5
		60	49.6 $\pm$ 7.1 <sup>c</sup>	21.5	70.4 $\pm$ 4.4 <sup>c</sup>	21.2	64.6 $\pm$ 3.2 <sup>c</sup>	29.9
		150	54.4 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	13.9	76.7 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	14.1	78.3 $\pm$ 3.3 <sup>c</sup>	15.1
		300	58.7 $\pm$ 5.3	6.8	83.2 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>	6.9	84.8 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	8.8
	250	0	67.3 $\pm$ 5.8	—	88.4 $\pm$ 3.9	—	92.0 $\pm$ 3.7	—
		10	52.5 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	21.7	72.2 $\pm$ 6.1 <sup>c</sup>	18.2	80.3 $\pm$ 6.6 <sup>b</sup>	12.6
		30	39.0 $\pm$ 5.2 <sup>c</sup>	41.3	45.2 $\pm$ 10.9 <sup>c</sup>	48.8	48.1 $\pm$ 9.5 <sup>c</sup>	47.5
		60	41.8 $\pm$ 4.3 <sup>c</sup>	37.4	48.5 $\pm$ 8.9 <sup>c</sup>	45.3	50.4 $\pm$ 11.3 <sup>c</sup>	44.1
		150	51.6 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>	22.7	63.7 $\pm$ 7.4 <sup>c</sup>	28.0	66.8 $\pm$ 5.1 <sup>c</sup>	27.3
		300	56.9 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	18.4	75.6 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	14.5	76.9 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup>	20.1

All values of platelet aggregation are expressed as mean  $\pm$  S.D., (n = 8). <sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, <sup>c</sup>p<0.001 compared with the group before oral administration (0 min) by Paired t-test. MAX (%): maximal intensity of platelet aggregation and agglutination, Inhibition (%) = (MAX % of control - MAX % of sample) / MAX % of control  $\times$  100, Scop: scopoletin, ADP: adenosine 5'-diphosphate, AA: arachidonic acid.

## 討 論

在in vitro試驗中，東莨菪素對ADP、AA、collagen誘導的家兔血小板聚集抑制效果，本研究所得之IC<sub>50</sub>分別為0.526、0.409、0.436 $\mu$ g/mL，與Okada等人所做結果：0.3、0.1、0.2 $\mu$ g/mL比較，要得到相同的抑制效果，本研究需要使用較高濃度，但二研究皆有證實東莨菪素體外試驗中對家兔血小板聚集確有抑制效果。

東莨菪素對ADP、AA、collagen誘導的血小板聚集作用，在靜脈注射後即可產生抑制效果，隨著劑量增加抑制效果亦增強；對ADP、AA、collagen誘導的聚集抑制率分別由8.1、7.2、10.2% (2 mg/kg) 增至47.8、50.7、55.5% (50 mg/kg)。根據以前的報告，東莨菪素靜脈注射後，以給藥後首次抽血分析而得之血中濃度為最高，而隨著時間增加，濃度亦漸消失<sup>(6)</sup>。同樣在本研究中，血小板聚集抑制效果亦隨著時間增加而減弱，如Table 1，表示東莨菪素靜注給藥之血小板聚集抑制作用與血中濃度有關。

口服給予東莨菪素，以30 min時對血小板聚集誘導劑的抑制效果最佳，接著隨著時間消逝對血小板的抑制效果亦隨之下降。已知口服東莨菪素後，血中濃度會隨著時間增加而逐漸代謝消失，所得藥物動力學參數t<sub>max</sub>為40 min<sup>(7)</sup>，故血小板聚集抑制效果亦與東莨菪素的血中濃度相關。口服給予東莨菪素至5小時，對collagen的抑制率仍有20.1%，Table 2。已有報告指出，具有coumarin結構之化合物，當給予大劑量飽和時，會影響血漿蛋白釋出的速度，而有代謝時間變長的現象<sup>(10)</sup>，本研究之東莨菪素亦具有coumarin的結構，所以給予大量(250 mg/kg, p.o.)對家兔血小板抑制效果亦有可能延長至5小時。

由以上的結果，可知對ADP、AA、collagen誘導的血小板聚集抑制作用，無論靜注或口服給予東莨菪素，其抑制作用皆分別與其血中濃度有關，但並非與其濃度成等比關係，其中給藥方式也會影響聚集抑制效果，雖然靜脈注射東莨菪素50 mg/kg在5min具有較高的血中濃度(39.1  $\mu$ g/mL)<sup>(6)</sup>與最大的血小板抑制率

(55.5%)；但口服給予東莨菪素250 mg/kg，在30 min時，其血中濃度平均值雖然很小(1.4  $\mu$ g/mL)<sup>(7)</sup>，但其最大的血小板抑制率亦接近50% (48.8%)。表示靜脈注射所致的家兔血中高濃度東莨菪素會抑制血小板聚集，但經由口服給予東莨菪素，在一定的作用時間後，如本研究，東莨菪素約在口服後30 min，亦會對血小板聚集產生不錯的抑制作用，故推測東莨菪素的高劑量與一定的作用時間，皆可影響血小板的聚集作用。

因thrombin會自行分解血小板，即在大量thrombin引起血小板的顆粒釋放功能消失與血小板無法維持其正常結構的情況下，即使顆粒無法釋放ADP，AA與ADP仍能繼續擁有其血小板的聚集作用，所以ADP的血小板的聚集作用是一獨立的作用機轉，ADP亦是血小板聚集誘導的首選之藥<sup>(11-13)</sup>。本研究中兔子口服或靜脈注射東莨菪素皆能對ADP誘發的血小板聚集產生抑制作用，但是影響血小板膜上ADP受體，還是影響血小板內顆粒成分的釋放，尚待進一步實驗證明。

當血小板激活時，則進行Arachidonate pathway，是血小板的膜磷脂酶A<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub>)作用生成的AA，AA經由環氧化酶(cyclooxygenase)代謝為前列腺素內過氧化物，在血小板中前列腺素內過氧化物經血栓素A<sub>2</sub>合成酶作用轉變為血栓素(thromboxane A<sub>2</sub>；TXA<sub>2</sub>)。TXA<sub>2</sub>的生物活性為誘導血小板聚集，降低血小板cAMP數量和收縮血管<sup>(13-16)</sup>。本研究發現東莨菪素對AA誘導的血小板聚集有抑制作用，因此，推測東莨菪素，對血小板聚集的抑制作用，可能與抑制AA的代謝途徑有關。

血小板膜上存在著各種受體，包括膠原受體(collagen receptor)，它們與相應的配體結合後，如collagen與collagen receptor結合，血小板被激活而發生形態變化、粘附聚集和釋放等系列反應<sup>(17-22)</sup>。最近研究指出glycoprotein VI (GPVI)在collagen誘導血小板的聚集和活化上扮演相當重要的角色，如果人們缺乏GPVI則會有出血之虞<sup>(23)</sup>。所以若東莨菪素對collagen誘導血小板的聚集有抑制效果，則可能直接與血小板膜上的GPVI接受器有關。由以上結

果，可知東莨菪素可抑制ADP、AA及collagen誘導的兔子血小板聚集，但對此三種誘導劑無明顯的選擇性，且對血小板聚集的兩條主要途徑<sup>(24)</sup>，即血小板內源性ADP釋放及血小板膜磷脂花生四烯酸的代謝產物TXA<sub>2</sub>皆有影響。

本研究觀察了東莨菪素對ADP、AA、collagen誘導的家兔半體內血小板的聚集作用，結果量效方面：靜脈以給予東莨菪素50 mg/kg；口服東莨菪素以250 mg/kg後對家兔血小板聚集之抑制效果最強。時效方面：靜脈以5 min，口服以30 min的血小板聚集抑制效果最強。故本研究完成了家兔體內給藥對血小板聚集的影響之量效與時效的關係。

血小板聚集誘導劑之濃度：ADP本實驗使用10  $\mu$ M<sup>(3)</sup>，有使用0.2 mmol/L、4  $\mu$ Mol/L、0.1 mg/mL、5  $\mu$ M與40  $\mu$ g/ $\mu$ L<sup>(24-30)</sup>。AA本實驗使用5 mg/mL，有使用750  $\mu$ Mol/L、0.3 mmol/L與2 mg/mL<sup>(26, 28)</sup>。Collagen本實驗使用10  $\mu$ M/mL<sup>(27)</sup>，有使用30  $\mu$ g/mL、0.2 g/mL、20  $\mu$ g/mL<sup>(3, 24, 28)</sup>。雖然誘導劑之使用濃度不同，但本實驗操作過程中所使用之誘導劑之劑量與濃度皆能聚集誘導成功，ADP、AA、collagen分別可達75、90、95%之抑制效果。

使用比濁法測定血小板聚集效率，必須使用PPP調整PRP，使血小板數在一定的範圍才可進行實驗的比較。而且依據不同動物，各自有最合適的濃度，如人類：20-25，兔子：40-50，大鼠60-70  $\times 10^4$  血小板/ $\mu$ L<sup>(26, 31, 32)</sup>，本研究前經多次預試驗，使用與Okada相同的濃度50  $\times 10^4$ / $\mu$ L進行比濁法實驗，而能得到最滿意的結果。

東莨菪素有抗炎，治療風濕性關節炎的作用<sup>(33-37)</sup>。因為人類風濕性關節炎和關節炎大鼠模型血液均處於濃、粘、聚的狀態，導致血液流動性下降<sup>(38-39)</sup>。抗炎藥物的篩選亦是利用對ADP誘導血小板聚集的模式，觀察藥物若具有抑制血小板聚集的效果，則可能通過降低血液粘度，通血脈，化瘀阻，來改善關節炎的血液流動性。故東莨菪素具有的血小板聚集抑制作用，不僅可改善血栓患者的病情，亦可治療風濕性關節炎的病人。

## 誌 謝

本研究由中國醫藥學院計畫(CMC89-CPS-05)提供經費。研究期間，承蒙醫技系同仁及嚴以聖老師技術指導，謹此致謝。

### 參考文獻

1. Ruggeri Z, Landolfi R. Platelet function and arterial thrombosis. *Ital Heart J.* 2001; 2(11): 809-810.
2. Chen Y, Wang T, Liang S, Teng C, Tzeng C. Synthesis and evaluation of coumarin alpha-methylene-gamma-butyrolactone: a new class of platelet aggregation inhibitors. *Chem Pharm Bull.* 1996; 44(8)1591-1595.
3. Okada Y, Miyauchi N, Suzuki K, Kobayashi T, Tsutsui C, Mayuzumi K, Nishibe S, Okuyama T. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem Pharm Bull.* 1995; 43(8)1385-1387.
4. Matano Y, Okuyama T, Shibata S, Hoson M, Kawada T, Osada H, Noguchi T. Studies on coumarins of a Chinese drug "qian-hu"; VII. Structures of new coumarin-glycosides of zihua qian-hu and effect of coumarin-glycosides on human platelet aggregation. *Planta Med.* 1986 (2)135-138.
5. Okada Y, Miyauchi N, Suzuki K, Kobayashi T, Tsutsui C, Mayuzumi K, Nishibe S, Okuyama T. Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation. *Chem Pharm Bull.* 1995; 43(8)1385-1387.
6. Liu S, Hsieh M, Liu C. Pharmacokinetics of scopoletin after intravenous administration in rabbits. *Chin Pharm.* 1999; 51(4) 245-254.
7. Liu S, Hsieh M, Liu C. Plasma scopoletin levels after a single dose oral administration in rabbits. *Chin Pharm.* 2000; 52(4) 203-210.

8. Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962a;194(4832)927-929.
9. Born G. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *Proc Physiol Soc*. 1962;(23-24)67-69.
10. Yacobi A, Lai C, Levy G. Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XXXI: effect of plasma protein binding on distribution kinetics of dicumarol in rats. *J Pharm Sci*. 1977;66(12)1741-1743.
11. Charo I, Feinman R, Detwiler T, Smith J, Ingberman C, Silver M. Prostaglandin endoperoxides and thromboxane A<sub>2</sub> can induce platelet aggregation in the absence of secretion. *Nature*. 1977; 269(5623)66-69.
12. Kinlough-Rathbone R, Chahil A, Packham M, Reimers H, Mustard J. Effect of ionophore A<sub>23</sub>, 187 on thrombin-degranulated washed rabbit platelets. *Thrombo Res*. 1975;7(3)435-449.
13. Kinlough-Rathbone R, Reimers H, Mustard J, Packham M. Sodium arachidonate can induce platelet shape change and aggregation which are independent of the release reaction. *Science*. 1976;192(4243)1011-1012.
14. Lapetina E, Chandrabose K, Cuatrecasas P. Ionophore A-23187- and thrombin-induced platelet aggregation: independence from cyclooxygenase products. *Proc Natl Acad Sci*. 1978;75(2)818-822.
15. Vargaftig B. Carrageenan and thrombin trigger prostaglandin synthetase-independent aggregation of rabbit platelets: inhibition by phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. *J Pharm Pharmacol*. 1977;29(4)222-228.
16. Vargaftig B, Zirinis P. Platelet aggregation induced by arachidonic acid is accompanied by release of potential inflammatory mediators distinct from PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>. *Nature - New Biology*. 1973;244(134)114-116.
17. Puett D, Wasserman B, Ford J, Cunningham L. Collagen-mediated platelet aggregation. Effects of collagen modification involving the protein and carbohydrate moieties. *J Clin Invest*. 1973;52(10)2495-2506.
18. Katzman R, Kang A, Beachey E. Collagen-induced platelet aggregation: involvement of an active glycopeptide fragment (alpha-CB5). *Science*. 1973;181(100)670-672.
19. Packham M, Guccione M, Chang P, Mustard J. Platelet aggregation and release: effects of low concentrations of thrombin or collagen. *Am J Physiol*. 1973;225(1)38-47.
20. Caen J, Legrand Y. Abnormalities in the platelet-collagen reaction. *Ann N Y Acad Sci*. 1972;(201)194-204.
21. Nossel H, Wilner G, Drillings M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by normal plasma. *J Clin Invest*. 1971;50(10)2168-2175.
22. Zucker M, ADP- and collagen-induced platelet aggregation in vivo and in vitro. *Thromb Diath Haemorr - Supplementum*. 1967;(26)175-184.
23. Jandrot-Perrus M, Busfield S, Lagrue A, Xiong X, Debili N, Chickering T, Le Couedic J, Goodearl A, Dussault B, Fraser C, Vainchenker W, Villeval J. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood*. 2000;96(5)1798-1807.
24. 田澤、高光耀、楊峻山、李玲玲、肖培根：狹序唐草中三類生物鹼對血小板聚集的影響。中草藥2000；31(11)：839-841。
25. 石晶、王中孝、盧旭輝：山楂與澤瀉抗血小板聚集的協同作用。中草藥1996；27(6)：350-352。
26. 喻晶、胡文淑：甲基蓮心鹼對兔血小板聚集功能的影響。藥學學報1997；32(1)：1-4。
27. Samama C, Eyraud D, Rouby J. Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 1995; 83(1)56-65.
28. 呂愛剛、李更生、洪素蘭、毛理納：川芎口

- 服液對兔血小板聚集的作用。中藥藥理與臨床1997；13(2):38-40。
29. 馮欣、劉鳳鳴：蒲黃有機酸對家兔血小板聚集性的影響。中國民間療法1999；6(6)：48-49。
  30. 卡慧敏、龔婕宁、馬健：六味地黃湯對家兔體外血小板聚集率的影響。中成藥2000；22(11)：789-791。
  31. 徐叔雲、卡如濂、陳修：藥理實驗方法學，人民衛生出版社，北京1982：pp1120-1134。
  32. 葛爭豔、林成仁、周亞傳、王敏、李連達：活血化癥經典古方對家兔血小板聚集性的影響。中國中西醫結合雜誌1994；14(8)：489-490。
  33. 葉惠珍、范椰新、劉植蔚、金怡順：丁公藤抗風濕有效成分的研究。中草藥1981；12(5)：5-7。
  34. Erazo S, Garcia R, Backhouse N, Lemus I, Delporte C, Andrade C. Phytochemical and biological study of *Radial lomatia HIRSUTA* (proteaceae). *J Ethnopharmacol.* 1997;(57) 81-83.
  35. Pistelli L, Bertoli A, Bilia AR, Morelli I. Minor constituents from *Bupleurum fruticosum* roots. *Phytochemistry* 1996; 41(6) 1579-1582.
  36. 饒高雄、孫漢董：龍眼獨活的化學成分。中國中藥雜誌1996；21(8)：482-483。
  37. Tanaka S, Ikeshiro Y, Tabata M, Konoshima M. Anti-nociceptive substances from the roots of *Angelica acutiloba*. *Arzneim.-Forsch.* 1977;27(11)2039-2045.
  38. 胡永紅、劉沛霖、葉望雲：雷公藤治療類風濕關節炎的血液流變學觀察。同濟醫科大學學報1985；14(6)：446。
  39. 樑文波、金正男、朴惠順：雷公藤對實驗性關節炎大鼠血液流變學的影響。中草藥1995；26(11)：589-591。

# Inhibitory Effects of Scopoletin on Rabbit Platelet Aggregation

Shu-Ling Liu<sup>1</sup>, Li-Wei Lin<sup>1</sup>, Cheng-Hsiung Liu<sup>2</sup>, Ming-Tsuen Hsieh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College

<sup>2</sup>Schools of Pharmacy, China Medical College

## ABSTRACT

Scopoletin has been described as having platelet aggregation inhibitory effects on rabbits. The platelet aggregation inhibitory effects of scopoletin were proved on rabbits *in vitro* using the turbidimetric method. In our laboratory, the inhibitory effects were compared with a control group on rabbit platelet aggregation induced by ADP, AA and collagen after intravenous or oral scopoletin were tested. After injection of scopoletin (2, 10 or 50 mg/kg, *i.v.*) at 5 minutes, the most potent inhibitory effects on rabbit platelet aggregation were exhibited. The mean values for *i.v.* of the max anti-platelet aggregation were 47.8%, 50.7% and 55.5 % for ADP, AA and collagen as platelet aggregation inducers, respectively. After administration of scopoletin (50, 100 or 250 mg/kg, *p.o.*) at 30 minutes, the most potent inhibitory effect on rabbit platelet aggregation was exhibited. The mean values for *p.o.* of the max anti-platelet aggregation were 41.3%, 48.8% and 47.5 % for ADP, AA and collagen as platelet aggregation inducers, respectively. In conclusion, the inhibitory effects of scopoletin on rabbit platelet aggregation were similar for both intravenous and oral administration. The effects of concentration on intravenous and effects of time on oral after scopoletin administration were observed on the rabbits. The degree of inhibitory effects was related to plasma concentration but not geometric progression. The mechanism of platelet aggregation effects of scopoletin was related to ADP, AA and collagen.

**Key words:** Scopoletin, semi-in-vivo, platelet aggregation, turbidimetric method

---

Received: 09/02/2002

Accepted: 11/11/2002

Reprint requests: Shu-Ling-Liu

Address: Institute of Chinese Pharmaceutical Science

China Medical College

91, Hsueh-Shih Rd., Taichung 404,

Taiwan, R.O.C.

Tel: +886-4-22053366 ext. 1707

Fax: +886-4-22053958

E-mail: slliu@mail.cmc.edu.tw