

文章编号:1001-6880(2016)11-1797-05

# 茜草炭对急性血瘀模型大鼠抗凝血倾向的活性部位筛选

王海丽,陈毅,肖林焱,薛露,单鸣秋,张丽,丁安伟\*

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,南京 210023

**摘要:**筛选茜草炭抗凝血作用有效部位,以急性血瘀模型大鼠为研究对象,云南白药为阳性药,除空白组外,其余各组均 ih 盐酸肾上腺素加冰水浴复制大鼠急性血瘀模型,考察茜草炭各极性部位对血瘀模型大鼠体外血栓、血液流变学、内/外源性凝血系统、血小板系统以及纤溶系统的影响。结果表明茜草炭正丁醇部位具有较强的抗凝血作用,可显著降低急性血瘀模型大鼠体外血栓干重,中、低切黏度,纤溶酶原激活物抑制物、血栓素含量,升高纤溶酶原激活物、6-酮-前列腺素含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。其他极性部位对急性血瘀模型大鼠抗凝血作用不及正丁醇部位。结果显示正丁醇部位为茜草炭抗急性血瘀模型大鼠凝血倾向的活性部位。

**关键词:**茜草炭;抗凝血;部位筛选;急性血瘀模型

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.020

## Screening of Effective Parts in Rubiae radix et rhizome Carbonisatum with Resisting Coagulation Tendency in the Acute Blood Stasis Model Rat

WANG Hai-li, CHEN Yi, XIAO Lin-yan, XUE Lu, SHAN Ming-qi, ZHANG Li, DING An-wei\*

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** The goal of this research was to screen of effective parts in Rubiae radix et rhizome Carbonisatum with resisting coagulation tendency. The acute blood stasis model in rats were established with subcutaneous injection of high-dose adrenaline hydrochloride and being soaked in ice-water, using Yunnan Baiyao powder as positive drug. The effect of different polar fractions on hemorheology, external thrombus, blood platelets system and fibrinolytic system in acute blood stasis model rats were observed. The results showed that the n-butanol fraction had the highest effect in resisting coagulation tendency which both significantly decreased the whole blood viscosity in medium and low shear rate, the wet weight and dry weight of external thrombus, significantly decreased the content of PAI-1 and TXB<sub>2</sub>, increased the t-PA and the 6-keto-PGF<sub>1α</sub> content ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The effect of resisting coagulation tendency in other polar parts were lower than that of n-butanol fraction. Hence, the n-butanol fraction were the effective fractions in resisting coagulation tendency.

**Key words:** Rubiae radix et rhizome Carbonisatum; resisting coagulation tendency; fraction screening; acute blood stasis model

茜草炭由中药茜草按炒炭法炮制而成<sup>[1]</sup>,临床主要用于治疗多种出血症,如咯血、血痢、血尿、衄血、崩漏等<sup>[2-5]</sup>。前期研究发现茜草炭对急性血瘀模型大鼠有良好的化瘀止血作用,且止血作用强于化

瘀作用,茜草炭能够显著缩短内/外源性凝血酶时间,增加血小板聚集<sup>[6]</sup>;高浓度茜草炭能够增强机体纤溶性,提高 t-PA 活性<sup>[7]</sup>;1,3-二羟基蒽醌为现今已确定的茜草炭止血成分<sup>[8]</sup>,但其抗凝血物质基础及作用机制仍待揭示。因此,本文以急性血瘀模型大鼠为研究对象,筛选茜草炭抗凝血有效部位,为深入研究茜草炭抗凝血物质基础及作用机制提供依据。

收稿日期:2016-03-14 接受日期:2016-05-18

基金项目:国家自然科学基金(81473348);江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2014);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A070)

\* 通讯作者 Tel:86-25-85811523;E-mail:awding105@163.com

# 1 仪器与材料

## 1.1 仪器与试剂

MR-16型多环血栓检测仪(上海高新技术研究所);HANGPING FA1104N型1/10电子天平(上海精密科学仪器有限公司);SA-5000型半自动血流变测试仪(北京中勤世帝科学仪器有限公司);LG-PABER-I型半自动凝血分析仪(北京世帝科学仪器公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);352型酶标仪(芬兰Labsystems Multiskan MS)。

羧甲基纤维素钠(批号20140806);枸橼酸钠(批号F20110506);水合氯醛(批号20150126)均购自国药集团化学试剂有限公司。凝血四项试剂盒:凝血酶时间(TT,批号STY20301-53);凝血酶原时间(PT,批号STY20101-89B);活化部分凝血活酶时间(APTT,批号STY20201-61);血浆纤维蛋白原(FIB,批号STY20401-65);二磷酸腺苷(ADP粉剂1瓶,ADP缓冲液10mL/瓶)均购自北京中勤世帝生物技术有限公司。ELISA试剂盒:血栓素(TXB<sub>2</sub>,批号SBJ-R0548);6-酮-前列腺素(6-keto-PGF1 $\alpha$ ,批号SBJ-R0288);纤溶酶原激活物(t-PA,批号SBJ-R0585)和纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1,SBJ-R0574)均购自南京森贝伽生物科技有限公司。

## 1.2 实验药品

茜草购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学吴启南教授鉴定为茜草科植物茜草*Rubia cordifolia* L.的干燥根和根茎。茜草炭按2015年版《中国药典》(一部)有关要求炒制而成。云南白药(云南白药集团股份有限公司,批号:Z53020798);盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司,批号10150304)。

## 1.3 动物

SPF级SD大鼠雌、雄各半,体重180~220g,购自上海杰思捷实验动物有限公司,合格证号SCXK(沪)2013-0006。

# 2 实验方法

## 2.1 供试品制备

茜草炭1630g,加10倍量95%乙醇回流提取2次,每次2h,趁热过滤,残渣加10倍量水回流提取2次,每次2h,趁热过滤后合并4次滤液并浓缩,趁热硅藻土1:1拌样,置减压真空干燥箱55℃烘干。采用系统溶剂提取法对上述干燥药粉进行提取,减

压真空干燥,分别得石油醚部位浸膏16.3g(得率1.00%)、乙酸乙酯部位浸膏28.1g(得率1.72%)、正丁醇部位浸膏34.1g(得率2.09%)、水部位浸膏213.3g(得率13.09%)。

用0.5%CMC-Na溶液将云南白药粉末、茜草炭各极性部位浸膏研匀并稀释至实验所需浓度。

## 2.2 动物分组及给药

SD大鼠,雌、雄各半,70只,按体重随机分为7组,分别为空白组、模型组、云南白药组、石油醚部位组、乙酸乙酯部位组、正丁醇部位组、水部位组。各组给药计量均按临床给药计量2倍折算,即云南白药0.25g/kg,茜草炭不同极性部位均为2.5g/kg(按生药量计)。各给药组按10mL/kg给药量ig相应药物,空白组与模型组ig等量0.5%CMC-Na溶液,每日2次,连续给药8d。

## 2.3 急性血瘀模型复制

参照文献<sup>[6,9]</sup>,第7d给药后禁食,除空白组于皮下注射生理盐水,其余各组于背部两侧皮下注射盐酸肾上腺素,2次,间隔4h,注射剂量为0.8mL/kg,并于第一次ih2h后,除空白组,其余各组大鼠均浸入0~2℃冰水中,冰浴5min。

## 2.4 指标测定

第8d正常给药40min后,各组大鼠10%水合氯醛麻醉,颈动脉取血,分装1.5mL非抗凝血,测定体外血栓;余血3.8%枸橼酸钠1:9抗凝,1mL全血分装测定全血黏度,剩余全血以800r/min离心10min,得PRP,测定ADP诱导的血小板聚集率;余血再以3000rpm离心10min,得PPP,测定内/外源性凝血功能指标(TT、PT、APTT、FIB),ELISA法测定TXB<sub>2</sub>、6-keto-PGF1 $\alpha$ 、t-PA和PAI-1水平。

## 2.5 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件对数据进行双样本t检验及方差分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

# 3 实验结果

## 3.1 对急性血瘀模型大鼠体征的影响

空白大鼠毛发光泽,精神饱满,反应敏捷,耳廓平整,淡粉色,爪趾光滑,淡红色,眼睛光亮;模型大鼠毛发无光泽,精神萎靡,反应迟钝,耳廓肿胀,耳缘瘀斑明显,红色,爪趾肿胀,紫红色,眼睛黯淡无光,眼角出血。

### 3.2 对急性血瘀模型大鼠体外血栓湿重、干重的影响

与空白组比较,模型组大鼠体外血栓湿重、干重显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较,茜草炭各极性部位均具有降低模型大鼠体外血栓湿

重趋势,除了石油醚部位,茜草炭其他极性部位均显著降低体外血栓干重( $P < 0.05$ ),其中乙酸乙酯部位作用效果最显著,正丁醇部位次之,两者作用效果无统计学差异,见表1。

表1 茜草炭不同极性部位对体外血栓湿重、干重的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 The effect of different polar fractions of carbonized *R. cordifolia* compound on external wet weight and dry weight of Thrombos ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	Dose (g/kg · d)	Wet weight (g)	Dry weight (g)
空白组 Normal group	-	0.4726 ± 0.0953	0.1093 ± 0.0269
模型组 Model group	-	0.5770 ± 0.0621 *	0.1424 ± 0.0109 **
云南白药组 Yunnan Baiyao group	0.5	0.4950 ± 0.0722 #	0.1132 ± 0.0143 ##
石油醚部位组 Petroleum ether fraction group	5	0.5796 ± 0.0826	0.1351 ± 0.0273
乙酸乙酯部位组 Ethyl acetate fraction group		0.5042 ± 0.1107	0.1206 ± 0.0207 #
正丁醇部位组 N - butanol fraction group		0.5121 ± 0.0939	0.1235 ± 0.0223 #
水部位组 Water fraction group		0.5724 ± 0.0572	0.1289 ± 0.0086 #

注:与空白组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。下同。

Note: Compared with normal group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with model group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ . Same as below.

### 3.3 对急性血瘀模型大鼠全血黏度的影响

与空白组比较,模型组大鼠各切变黏度均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,石油醚部位与正丁醇部位可显著降低中、低切黏度( $P < 0.05$ ),具有

降低高切黏度趋势;乙酸乙酯部位与水部位对模型大鼠全血黏度影响弱,且乙酸乙酯部位对模型大鼠低切黏度无改善作用,见表2。

表2 茜草炭不同极性部位对血瘀模型大鼠血液流变性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 The effect of different polar fractions of carbonized *R. cordifolia* compound on hemorheology of blood stasis rat ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	Dose (g/kg · d)	Hemorheology (mPa · s)			
		200 s <sup>-1</sup>	30 s <sup>-1</sup>	5 s <sup>-1</sup>	1 s <sup>-1</sup>
空白组 Normal group	-	3.97 ± 0.60	5.06 ± 0.67	8.17 ± 1.21	17.16 ± 3.91
模型组 Model group	-	5.14 ± 0.38 **	6.70 ± 0.56 **	11.05 ± 1.20 **	23.81 ± 3.31 **
云南白药组 Yunnan Baiyao group	0.5	4.48 ± 0.74 #	5.68 ± 0.93 #	9.09 ± 1.48 ##	18.80 ± 3.17 ##
石油醚部位组 Petroleum ether fraction group	5	4.73 ± 0.45	6.03 ± 0.53 #	9.76 ± 0.84 #	20.45 ± 2.00 #
乙酸乙酯部位组 Ethyl acetate fraction group		4.79 ± 0.92	6.40 ± 1.07	11.19 ± 1.57	25.51 ± 3.42
正丁醇部位组 N - Butanol fraction group		4.78 ± 0.32	6.04 ± 0.50 #	9.60 ± 1.17 #	19.69 ± 3.45 #
水部位组 Water fraction group		5.18 ± 0.33	6.57 ± 0.45	10.52 ± 0.90	21.77 ± 2.42

### 3.4 对急性血瘀模型大鼠凝血四项及血小板聚集率的影响

与空白组比较,模型组大鼠TT、PT、APTT显著延长,FIB含量升高,ADP%增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较,石油醚部位与乙酸乙酯部位可显著缩短TT、PT、APTT,升高FIB含量,乙酸乙酯作用效果强于石油醚部位( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );正丁醇部位与水部位作用效果不及乙酸乙酯部位,可显著缩短PT、APTT( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );除了正丁醇部位具有降低ADP%趋势,乙酸乙

酯部位显著升高ADP%( $P < 0.05$ ),其他部位均具有升高ADP%趋势,见表3。

### 3.5 对急性血瘀模型大鼠纤溶系统及血小板功能的影响

与空白组比较,模型组大鼠PAI-1、TXB<sub>2</sub>含量,TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF1 $\alpha$ 显著升高,t-PA、6-keto-PGF1 $\alpha$ 含量,t-PA/PAI-1显著下降( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与模型组比较,茜草炭各极性部位均可显著降低PAI-1、TXB<sub>2</sub>含量,其中石油醚部位功效最显著;显著降低TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF1 $\alpha$ ,其中正丁醇部位功效

表 3 茜草炭不同极性部位对血瘀模型大鼠凝血四项、血小板聚集率的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 3 The effect of different polar fractions of carbonized *R. cordifolia* compound on TT, PT, APTT, FIB and ADP% of blood stasis rat ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别 Group	Dose (g/kg · d)	TT (s)	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	ADP (%)
空白组 Normal group	-	22.87 ± 4.01	11.79 ± 1.36	13.55 ± 0.96	1.77 ± 0.11	22.35 ± 4.33
模型组 Model group	-	34.32 ± 4.49 **	14.54 ± 1.33 **	21.58 ± 2.58 **	4.34 ± 0.41 **	28.43 ± 6.80 *
云南白药组 Yunnan Baiyao group	0.5	25.47 ± 2.12 ##	10.03 ± 2.09 ##	16.10 ± 2.33 ##	4.90 ± 0.51 #	30.57 ± 3.44
石油醚部位组 Petroleum ether fraction group	5	30.03 ± 3.20 #	12.40 ± 0.76 ##	16.95 ± 3.27 #	4.83 ± 0.41 #	30.97 ± 0.86
乙酸乙酯部位组 Ethyl acetate fraction group		28.37 ± 4.12 #	12.08 ± 1.08 ##	15.17 ± 1.71 ##	5.03 ± 0.76 #	36.04 ± 4.88 #
正丁醇部位组 N - butanol fraction group		30.66 ± 3.73	12.60 ± 1.22 #	16.39 ± 2.04 ##	4.79 ± 0.62	27.87 ± 4.51
水部位组 Water fraction group		34.17 ± 3.47	13.07 ± 0.80 #	17.40 ± 2.38 #	4.69 ± 0.35	30.25 ± 5.55

最显著( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )；茜草炭各极性部位均可显著升高 t-PA/PAI-1 ( $P < 0.01$ )，除了乙酸乙酯部位，其他部位显著升高 6-keto-PGF1 $\alpha$  含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，除了正丁醇部位可显著升高 t-

PA 含量( $P < 0.01$ )，其他部位仅具有升高 t-PA 含量趋势，其中正丁醇部位对 6-keto-PGF1 $\alpha$ 、t-PA、t-PA/PAI-1 作用最显著，见表 4。

表 4 茜草炭不同极性部位对急性血瘀模型大鼠 PAI-1、t-PA、TXB<sub>2</sub> 及 6-keto-PGF1 $\alpha$  的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 4 The effect of different polar fractions of carbonized *R. cordifolia* compound on PAI-1, t-PA, TXB<sub>2</sub> and 6-keto-PGF1 $\alpha$  of blood stasis rat ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别 Group	Dose (g/kg · d)	PAI-1 (ng/L)	t-PA ( $\mu$ g/L)	t-PA/ PAI-1	TXB <sub>2</sub> (ng/L)	6-keto- PGF1 $\alpha$ (ng/L)	TXB <sub>2</sub> /6- keto-PGF1 $\alpha$
空白组 Normal group	-	419.87 ± 85.24	14.22 ± 2.98	34.89 ± 8.24	126.65 ± 30.96	261.41 ± 57.60	0.62 ± 0.20
模型组 Model group	-	851.62 ± 78.97 **	10.53 ± 2.04 *	12.71 ± 1.82 **	242.95 ± 25.30 **	209.74 ± 28.81 *	1.18 ± 0.23 **
云南白药组 Yunnan Baiyao group	0.5	639.44 ± 82.62 ##	12.06 ± 3.18	19.16 ± 5.41 ##	204.45 ± 28.11 ##	270.31 ± 34.63 ##	0.77 ± 0.13 ##
石油醚部位组 Petroleum ether fraction group	5	499.98 ± 29.69 ##	10.99 ± 2.76	22.00 ± 5.41 ##	154.82 ± 23.29 ##	180.08 ± 24.07 #	0.87 ± 0.13 ##
乙酸乙酯部位组 Ethyl acetate fraction group		507.04 ± 95.51 ##	10.15 ± 2.82	20.67 ± 6.99 ##	167.42 ± 32.54 ##	224.83 ± 47.37	0.77 ± 0.22 ##
正丁醇部位组 N - butanol fraction group		586.17 ± 42.32 ##	13.53 ± 1.05 ##	23.28 ± 2.97 ##	193.67 ± 10.77 ##	290.41 ± 28.04 ##	0.67 ± 0.05 ##
水部位组 Water fraction group		654.76 ± 102.34 ##	12.09 ± 2.28	18.75 ± 4.08 ##	188.63 ± 32.89 ##	278.03 ± 43.80 ##	0.68 ± 0.08 ##

## 4 讨论与结论

急性血瘀动物模型是根据“忧怒”、“寒邪”的血瘀病因而建立的动物模型，已知在暴怒的情况下，机体会分泌大量肾上腺素和其他激素，故给模型大鼠皮下注射盐酸肾上腺素模拟暴怒时机体状态，再施以冰浴，模拟“寒邪”侵袭，两者综合作用复制大鼠急性血瘀模型<sup>[10]</sup>。文献报道急性血瘀模型大鼠血液流变性呈粘、浓、凝、聚状态，即全血粘度增加，反映“粘”；红细胞压积(HCT)增高，反映“浓”；血浆和纤维蛋白比粘度增高，反映“凝”<sup>[11]</sup>。有学者通过比较常见大鼠血瘀证模型，亦发现肾上腺素致血瘀模

型大鼠血液呈高粘、高浓、高凝状态，血小板聚集率与纤维蛋白原含量显著增加<sup>[12]</sup>。急性血瘀模型大鼠造模成功后，除了上述表征外，亦会出现血管收缩，TXB<sub>2</sub> 表达增加，6-keto-PGF1 $\alpha$  表达下降，两者互相调节功能失衡<sup>[6,9]</sup>；机体纤溶性下降，PAI-1 表达增加<sup>[13]</sup>；同时体外血栓形成趋势增加<sup>[14]</sup>。但文献对急性血瘀模型大鼠内/外源性凝血系统指标 TT、PT、APTT 变化趋势并不一致，如 TT、PT、APTT 均延长<sup>[6]</sup>，TT、PT、APTT 均缩短<sup>[14]</sup>或有的延长有的缩短<sup>[12]</sup>，这可能与造模程度、外界环境、取血时间点等因素相关，后期需进一步研究。

本实验采用 ADR + 冰浴造模，该模型符合寒凝

血瘀的中医瘀血特征。造模后模型大鼠耳廓瘀斑、爪趾肿胀、眼角出血。指标检测结果显示,与空白组比较,模型大鼠体外血栓湿重、干重增加;血液高黏滞;FIB 含量与 ADP 诱导的血小板聚集率增加;TXB<sub>2</sub> 含量升高、6-keto-PGF1 $\alpha$  含量降低, TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF1 $\alpha$  升高, 可见 TXB<sub>2</sub> 与 6-keto-PGF1 $\alpha$  相互调节失去平衡, 血管收缩, 血小板聚集率增加, 机体形成血栓趋势增加;t-PA 含量降低, PAI-1 含量升高,t-PA/PAI-1 降低, 亦可见模型大鼠纤溶系统调节失衡, 纤溶性下降, 纤维蛋白溶解受阻, 微循环阻滞, 血栓形成趋势增加, 上述指标变化表明机体凝血倾向增加, 且符合上述文献报道, 说明造模成功。茜草炭不同极性部位对模型大鼠异常指标均表现出一定的调节作用, 其中乙酸乙酯部位对内/外源性凝血系统作用效果强, 可显著缩短模型大鼠 TT、PT、APTT, 增加 FIB 含量以及血小板聚集率, 可见乙酸乙酯部位通过影响内/外源性凝血酶、纤维蛋白原含量以及血小板聚集率达促凝效果, 同时该部位亦表现出一定的抗凝作用, 通过降低模型大鼠体外干重, 调节纤溶系统和血小板功能, 上述指标变化体现了乙酸乙酯部位具有双向调节作用, 但其抗凝作用不抵正丁醇部位;正丁醇部位可显著改善模型大鼠血栓形成趋势、全血高黏滞状态、修复血小板系统 TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF1 $\alpha$  与纤溶系统 t-PA/PAI-1 调节失衡, 具有降低 ADP% 趋势, 具有较好的抗凝效果。石油醚部位与水部位具有一定的抗凝功效, 但其作用远不及正丁醇部位。

综上所述, 正丁醇部位为茜草炭抗急性血瘀模型大鼠凝血倾向的活性部位, 该部位主要作用于血液系统、纤溶系统以及血小板系统, 通过改善模型大鼠血液高粘状态, 降低体外血栓形成趋势, 调节 t-PA/PAI-1、TXB<sub>2</sub>/6-keto-PGF1 $\alpha$  修复纤溶与血小板系统, 达抗凝血之效。目前茜草炭化学成分研究主要集中于炮制前后化学成分变化研究, 茜草炭发挥抗凝血作用的活性成分(群)以及化学成分与药效关联性还有待进一步研究。

## 参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 235.
- Zhang XH (张晓慧). Observation the efficacy of integrative treatment for 71 cases of bronchiectasis with acute infection. *J Sichuan Chin Tradit Med* (四川中医), 2014, 32(7): 95.
- Deng G (邓杲). Summarize and analysis the clinical experience of Professor Wang Xiuqin on treating hematuria. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine (北京中医药大学), MSc. 2013, 27-39.
- He PJ (和培举), Ding L (丁玲), Li Y (李莹). Experience of Professor Cai Fuyang using ZiYin Method to treat otolaryngology disease. *Tradit Chin Med Res* (中医研究), 2013, 26(8): 38.
- Xiao XL (肖晓玲). Deficiency dysfunctional uterine bleeding clinical observation of 56 cases ended consolidate collapse decoction. *J Pract Tradit Chin Intern Med* (实用中医内科杂志), 2014, 28(11): 48-50.
- Shan MQ (单鸣秋), Chen X (陈星), Li J (李娟), et al. Comparative study on the effect of Rubiae radix et rhizome and Rubiae radix et rhizome Carbonisatum in acute blood stasis model of rats. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39: 493-496.
- Geng QB (耿启彬), Huang HL (黄海龙), Weng ZF (翁壮峰), et al. Effects of *Rubia cordifolia* and Charred *R. Cordifolia* on coagulation-fibrinolytic system of normal rats. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2013, 19(13): 279-282.
- Zhang ZL (张振凌), Zhou Y (周艳), Huang XF (黄显峰). Study on hemostatic components of Charred *R. cordifolia*. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2007, 29: 1803-1805.
- Jia M (贾梅), Zheng CZ (郑传柱), Zhang L (张丽), et al. Screening of active fractions of Siwu Tang on acute blood stasis model rat. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2015, 21(16): 119-123.
- Li WX (李伟霞), Huang MY (黄美艳), Tang YP (唐于平), et al. Establishment and optimization of acute blood stasis rat model. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2011, 27: 1765-1770.
- Chen Q (陈奇). Research methodology of pharmacology of traditional Chinese Medicine. Beijing: The People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 1993: 564-565.
- Song CC (宋程程), Wang ZB (王志斌), Su B (苏斌), et al. Study on commonly used rat model of blood stasis syndrome. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2014, 37(2): 94-98.
- Sui ZY (隋在云), Liu J (刘瑾), Li XJ (李晓晶). Effect of Hirudo micropowder on hemorheology in rats with acute blood stasis. *Henan Tradit Chin Med* (河南中医), 2013, 33: 353-355.
- Zhou YC (周迎春), Guo LX (郭丽新), Wang SL (王世龙). Effect of active ingredients from the Herba Lycopi on thrombosis and blood coagulation function in acute blood stasis rats. *J Tradit Chin Med* (中医学报), 2013, 41(4): 22-24.