

单环刺螠糖胺聚糖抗大鼠血小板聚集效应研究

苗 飞,赵紫越,崔青曼*,袁春莹

天津市海洋环境保护与修复技术工程中心 天津市海洋资源与化学重点实验室

天津科技大学海洋与环境学院,天津 300457

摘要:本文研究了单环刺螠糖胺聚糖影响大鼠血小板聚集的效应与机制。采用比浊法测定大鼠血小板最大聚集百分率,双波长 Fura-2 荧光法测定大鼠血小板内钙离子浓度,激光扫描共聚焦显微镜检测了大鼠血小板中的钙离子水平;酶联免疫吸附法测定大鼠血小板内环磷酸腺苷(cAMP)、血浆血栓素 B₂(TXB₂)和 6 酮前列腺素 F1 α 及血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 的浓度。结果表明:单环刺螠糖胺聚糖能够显著降低大鼠血小板的最大聚集率($P < 0.01$),显著降低血小板内的钙离子浓度($P < 0.01$),显著升高大鼠血小板 cAMP 浓度($P < 0.01$),显著降低血浆中的 TXB₂ 浓度($P < 0.05$),显著升高大鼠血浆中的 6 酮前列腺素 F1 α 浓度($P < 0.01$),显著降低血小板膜糖蛋白的浓度($P < 0.05$)。该研究初步揭示了单环刺螠糖胺聚糖抗大鼠血小板聚集的机制,为该糖胺聚糖的进一步利用奠定科学基础。

关键词:单环刺螠;糖胺聚糖;抗血小板聚集效应

中图分类号:R961;S38

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.024

Anti-platelet Aggregation Effect of Glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* in Rats

MIAO Fei, ZHAO Zi-yue, CUI Qing-man*, YUAN Chun-ying

Tianjin Marine Environmental Protection and Restoration Technology Engineering Center; Tianjin Key Laboratory of Marine Resource and Chemistry; College of Marine & Environment, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457

Abstract: The effect and mechanism of glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* on platelet aggregation in rats were studied. The maximum aggregation percentage of platelets in rats was determined using turbidimetric method, and calcium ion concentration in rat platelets was determined using Fura-2 dual wavelength fluorescence method, and laser scanning confocal microscope was used to detect the level of calcium in rat platelets; Concentrations of rat platelets cAMP, plasma TXB₂, α -keto prostaglandin F1 α and platelet glycoprotein (GPIIb/IIIa) were determined with enzyme linked immunosorbent assay. The results showed that glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* could significantly reduce maximum aggregation rate in rat platelets ($P < 0.01$), significantly reduce calcium ion concentration in platelets ($P < 0.01$), significantly increase cAMP concentration in rat platelets ($P < 0.01$), significantly decrease the concentration of TXB₂ in plasma ($P < 0.05$), significantly increase 6 keto prostaglandin F1 α concentration in rat plasma ($P < 0.01$), and significantly decrease the concentration of platelet glycoprotein ($P < 0.05$). The mechanism of anti-platelet aggregation in rat of glycosaminoglycan from *U. unicinctus* was preliminarily revealed in this study, which laid a scientific basis for the further utilization of the glycosaminoglycan.

Key words: *Urechis unicinctus*; glycosaminoglycan; antiplatelet aggregation effect

血栓性疾病严重威胁人类的生命健康,其发病率高居各种疾病之首,且近年来还有渐增之势,为当代医学研究的重点和热点之一,通过血栓形成机制来研究新的抗血栓药物显得极为重要^[1]。血小板

是从骨髓成熟的巨核细胞胞质裂解脱落下来的小块胞质,主要生理功能是参与止血与血栓形成。血小板聚集不仅会促进血栓形成,同时也释放促炎细胞因子,刺激白细胞募集到内皮细胞,加重炎症反应。因此,抗血小板活化与聚集药物的研究已成为血栓性疾病研究领域的热点,对于新药开发与血栓相关疾病的防治具有重要意义^[2]。糖胺聚糖是蛋白聚

收稿日期:2018-01-29 接受日期:2018-05-23

基金项目:天津市自然科学基金重点项目(16JCZDJC33800)

* 通信作者 Tel:86-22-60601462; E-mail:cqm80@163.com

糖大分子中聚糖部分的总称,由糖胺的二糖重复单位组成,二糖单位中通常有一个是含氨基的糖,另一个是糖醛酸,并且糖基的羟基常常被硫酸酯化,具有抗氧化、抗凝血、抗肿瘤、降血糖等广泛的生物学功能^[3-6]。前期研究表明,单环刺蝟糖胺聚糖具有良好的抗氧化作用和很强的抗凝血作用^[7-9]。在此基础上,我们探讨了糖胺聚糖抑制大鼠血小板聚集的效应,旨在丰富血小板研究的基础资料,为该糖胺聚糖的进一步利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SD大鼠30只,体重 250 ± 20 g,雌雄各半,SPF级,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,SCXK-(军)2012-0004。

1.1.2 主要药品与试剂

单环刺蝟糖胺聚糖,由天津科技大学海洋生物活性物质利用研究室分离纯化,纯度97.32%,硫酸根含量为30.26%,糖醛酸含量为25.25%,氨基糖含量为7.58%;奥扎格雷钠,国药准字:H20052521,石家庄四药有限公司;大鼠血小板血栓素 B_2 (TXB₂)、大鼠血小板环腺苷酸(cAMP)、6-酮-前列腺素(6-keto-PGF1 α)酶联吸附免疫试剂盒,南京建成生物工程研究所,大鼠血小板膜糖蛋白(GP IIb/IIIa),上海语纯生物科技有限公司;钙荧光探针Fluo-4,AM和Fura-2,AM, Sigma公司。

1.1.3 主要仪器

Infinite 200 Pro多功能酶标仪(Tecan公司,瑞士);Allegra X-15R台式冷冻离心机(Beckman Coulter公司,美国);PAM-3型双通道血小板聚集仪(江苏丹阳无线电厂,中国);RF-5301荧光分光光度计(Shimadzu公司,日本);FV1000激光扫描共聚焦显微镜(Olympus公司,日本)。

1.2 实验方法

SD大鼠随机分为对照组、阳性对照组(奥扎格雷钠)和糖胺聚糖组,每组10只。尾静脉分别注射生理盐水、奥扎格雷钠(4 mg/kg)和糖胺聚糖(8 mg/kg)各0.5 mL。制备富血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP),测定血小板最大聚集率。

1.2.1 富血小板血浆(PRP)和贫血小板血浆(PPP)制备

尾静脉给药30 min后股动脉采血,以3.8%枸

橐酸钠抗凝(全血与抗凝剂比例为9:1),1500 rpm离心5 min,制备富血小板血浆(PRP),4000 rpm离心10 min制备贫血小板血浆(PPP)。

1.2.2 血小板聚集率测定

用PPP调PRP(血小板数为 5×10^9 /mL),以二磷酸腺苷作为诱导剂(终浓度为1 μ mol/L),孵育5 min,PAM-3型双通道血小板聚集仪进行血小板聚集试验,描记聚集曲线,计算血小板最大聚集百分率。

1.2.3 血小板环磷酸腺苷的测定

用PPP调PRP(血小板数为 1×10^9 /mL),取血小板悬液200 μ L置于塑料离心管中,加入二磷酸腺苷作为诱导剂(终浓度为1 μ mol/L),加入ENZO试剂盒提供的0.1 mol/L盐酸(200 μ L)处理,液氮37 $^{\circ}$ C反复冻融5次。室温离心(4000 rpm,10 min),吸取100 μ L上清液,按照试剂盒说明书测定血小板cAMP浓度。

1.2.4 双波长Fura-2荧光分光光度法测定大鼠血小板内钙离子浓度

参照文献^[10]并略加修改。血小板悬液与5 μ mol/L Fura-2, AM混匀,37 $^{\circ}$ C水浴避光孵育40 min,立即离心,弃上清,沉淀以无Ca²⁺的Hepes缓冲液洗两次,再用无Ca²⁺的Hepes缓冲液重新悬浮。负载后的血小板悬液中加入CaCl₂溶液(终浓度1 mmol/L)孵育10 min,调整血小板数为 5×10^9 /mL,用二磷酸腺苷刺激5 min,进行荧光测定。

激发波长分别固定在340 nm、380 nm,波宽5 nm,发射波长固定在510 nm,波宽5 nm,记录Fura-2在激发波长340 nm、380 nm处测得的荧光强度比值(F₃₄₀/F₃₈₀),然后加入20 μ L 20%的TritonX-100,测定R_{max},再加入20 μ L 0.5 mmol/L的乙二醇双(2-氨基乙基)醚四乙酸(EGTA),测定R_{min},根据比值法公式计算出血小板内[Ca²⁺]_i浓度。

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \times SFB$$

式中Kd为Fura-2/AM与Ca²⁺反应的解离常数,为224 nmol/L,R为各测定点F₃₄₀对F₃₈₀荧光强度的比值。R_{max}为加入TritonX-100使得Fura-2和钙离子结合达饱和时所测得的F₃₄₀/F₃₈₀,R_{min}为加入高于Ca²⁺浓度2~3倍的EGTA,使得Fura-2游离,测得的F₃₄₀/F₃₈₀。SFB为组成R_{min}和R_{max}的F₃₈₀之间的比值。

1.2.5 激光扫描共聚焦显微镜检测大鼠血小板内钙离子浓度的变化

取制备好的洗涤血小板悬液,加入 Fluo-4, AM 混匀,使 Fluo-4, AM 在血小板悬液中的终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$, 37°C 避光孵育 60 min, 4 000 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 血小板沉淀以 HEPES 缓冲液洗两次, 重新悬浮, 调整血小板浓度为 $4 \times 10^8/\text{mL}$, 37°C 复温 10 min, ADP 刺激后立即用激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.2.6 大鼠血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1 α} 的测定

富血小板血浆(血小板数为 $1 \times 10^9/\text{mL}$), 经 ADP 刺激后, 离心(4 000 rpm, 10 min), 分离上清血浆, 按照试剂盒说明书测定 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1 α} 浓度。

1.2.7 大鼠血小板 GP II b/III a 浓度的测定

富血小板血浆(血小板数为 $1 \times 10^9/\text{mL}$), 经 ADP 刺激后, 离心(4 000 rpm, 10 min), 将下层血小板沉淀冻融裂解, 10 000 rpm 离心 5 min, 取上层清液用 ELISA 试剂盒测定 GP II b/III a 浓度。

1.3 数据统计分析

所有实验数据均采用单因素方差分析。分析软件为 SPSS 17.0, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 糖胺聚糖对大鼠血小板聚集率的影响

以大鼠为实验材料, 生理盐水为空白对照, 奥扎格雷钠为阳性对照, 进行糖胺聚糖的抗血小板聚集率测定, 结果见表 1, 从表 1 看出, 与对照组相比, 糖胺聚糖组大鼠的血小板最大聚集百分率显著减小 ($P < 0.01$), 说明该糖胺聚糖具有明显的抗大鼠血小板聚集作用, 阳性对照药物奥扎格雷钠显著降低大鼠血小板最大聚集百分率 ($P < 0.01$), 但与糖胺聚糖组相比, 没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 1 糖胺聚糖对大鼠血小板聚集率的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of glycosaminoglycan on platelet aggregation rate in rats ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	血小板聚集率 Platelet aggregation rate (%)
对照组 Control	55.57 ± 7.76
奥扎格雷钠 Ozagrel sodium	$39.87 \pm 5.57^{**}$
糖胺聚糖 Glycosaminoglycan	$42.84 \pm 4.82^{**}$

注:与对照组比较, $^{**} P < 0.01$ 。

Note: Comparison with the control group, $^{**} P < 0.01$.

2.2 糖胺聚糖对大鼠血小板 cAMP 浓度的影响

大鼠血小板 cAMP 浓度测定结果见图 1, 与对照组相比, 单环刺蝟糖胺聚糖和奥扎格雷钠均能够显著升高大鼠血小板 cAMP 的浓度 ($P < 0.01$), 阳性药物的作用程度稍高于糖胺聚糖, 但没有达到显著性差异 ($P > 0.05$)。推测该糖胺聚糖可能通过升高血小板内 cAMP 含量而起到抑制血小板活化的作用, 从而抑制 ADP 诱导的血小板聚集。

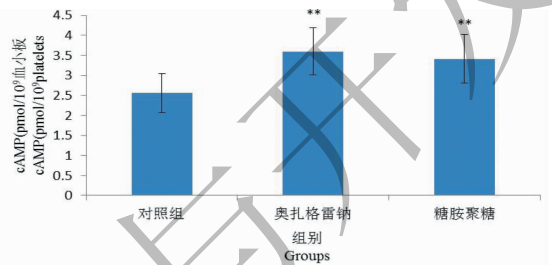


图 1 糖胺聚糖对大鼠血小板 cAMP 浓度的影响

Fig. 1 Effect of glycosaminoglycan on the cAMP concentration in rat platelets

注:与对照组比较, $^{**} P < 0.01$ 。

Note: Comparison with the control group, $^{**} P < 0.01$.

2.3 糖胺聚糖对大鼠血小板内钙离子浓度的影响

结果见图 2。从图 2 可以看出, 糖胺聚糖和阳性药物均能显著降低血小板内的钙离子浓度 ($P < 0.01$), 与阳性药物相比较, 糖胺聚糖降低血小板钙离子浓度的程度略高。推测糖胺聚糖可能通过促进大鼠血小板钙池内钙离子的释放和钙离子内流, 起到抗血小板聚集的作用。

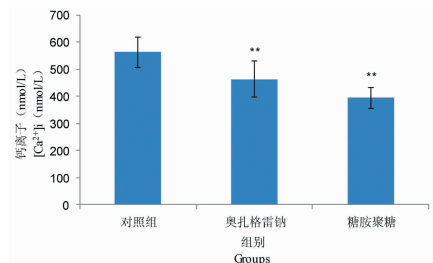


图 2 糖胺聚糖对大鼠血小板内钙离子浓度的影响

Fig. 2 The effect of glycosaminoglycan on the concentration of calcium ion in the rat platelets

2.4 激光扫描共聚焦显微镜观察

Fluo-4, AM 是一种新型的钙离子荧光探针, 穿透细胞膜进入细胞后被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo-4, 与细胞内钙离子结合后可以产生较强的荧光, 最大激发波长为 494 nm, 最大发射波长为 516

nm,根据其荧光强度即可测出血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度的变化。血小板负载钙离子探针 fluo-4, AM 后,激光扫描共聚焦显微镜观察,结果见图 3。从图 3 可以看出,对照组荧光强度很强,说明血小板内钙离

子浓度高,奥扎格雷钠组荧光强度远低于对照组,但高于糖胺聚糖组,说明三个处理组血小板内钙离子浓度的顺序是:对照组 > 奥扎格雷钠组 > 糖胺聚糖组,与 2.3 的结果一致。

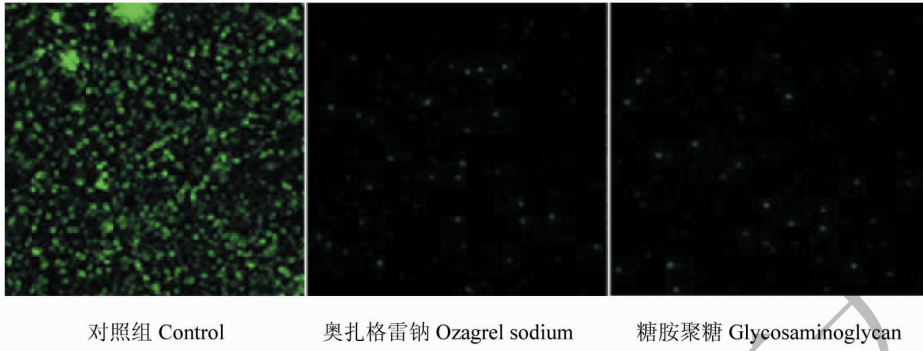


图 3 大鼠血小板的激光扫描共聚焦显微镜照片

Fig. 3 The laser scanning confocal microscope photo of rat platelets

2.5 糖胺聚糖对大鼠血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF1 α 浓度的影响

大鼠血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF1 α 浓度的测定结果见表 2。糖胺聚糖和奥扎格雷钠均能够显著降低血浆中的 TXB₂ 浓度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且奥扎

格雷钠降低血浆中的 TXB₂ 浓度的程度高于糖胺聚糖,但未达显著性水平 ($P > 0.05$);糖胺聚糖和奥扎格雷钠均能够显著升高血浆中的 6 酮前列腺素 F1 α 浓度 ($P < 0.01$),然而糖胺聚糖的作用程度略高于奥扎格雷钠,但未达显著水平 ($P > 0.05$)。

表 2 糖胺聚糖对大鼠血浆 TXB₂ 和 6-keto-PGF1 α 浓度的影响 ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of glycosaminoglycan on the concentrations of TXB₂ and 6-keto-PGF1 α in rats plasma ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	血栓素 B ₂ TXB ₂ (ng/L)	6 酮前列腺素 F1 α 6-keto-PGF1 α (ng/L)
对照组 Control	378.99 \pm 41.88	32.25 \pm 3.90
奥扎格雷钠 Ozagrel sodium	301.76 \pm 44.94 **	39.17 \pm 6.29 **
糖胺聚糖 Glycosaminoglycan	331.31 \pm 56.94 *	41.08 \pm 5.32 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Comparison with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

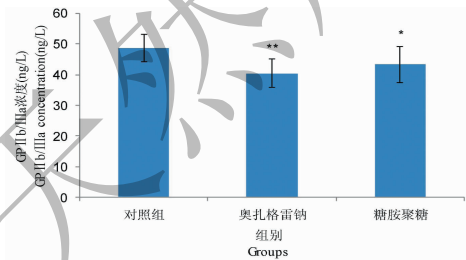


图 4 糖胺聚糖对大鼠血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 浓度的影响

Fig. 4 Effect of glycosaminoglycan on the concentration of membrane glycoprotein GPIIb/IIIa in rat platelets

2.6 糖胺聚糖对大鼠血小板糖膜蛋白 GP II b/III a 浓度的影响

研究证实,血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 与纤维

蛋白原等黏附蛋白结合是多种因素引起血小板聚集的不可缺少的最终共同途径^[11],所以测定大鼠血小板上的膜糖蛋白 GP II b/III a 具有重要意义。本研究的测定结果见图 4,由图 4 看出,奥扎格雷钠和糖胺聚糖均能够显著降低大鼠血小板糖膜蛋白 GP II b/III a 的浓度 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且奥扎格雷钠降低糖膜蛋白 GP II b/III a 浓度的程度高于糖胺聚糖,但未达显著性水平 ($P > 0.05$)。

3 讨论

血小板在血管损伤部位的血栓形成中发挥重要作用,尤其是动脉和微血栓形成,是心脑血管疾病的主要原因^[12]。血小板聚集是一个复杂的过程,它的激活主要是通过血小板粘附于损伤部位介导的,此

外,内源性激动剂如 ADP、胶原、凝血酶的作用和作为放大因子的 TXA₂ 释放等加速这一过程,这些激动剂通过血小板膜上的特异性受体促进血小板聚集^[13]。

血小板内的环磷酸腺苷(cAMP)是细胞内信号传递的第二信使,血小板聚集功能受到血小板内的cAMP含量调节,当cAMP含量增加,可以激活蛋白激酶,使蛋白磷酸化,兴奋钙泵并抑制Ca²⁺从储库中释放,从而抑制血小板的聚集^[14];钙离子在血小板活化过程中起到了关键作用,血小板的变形、聚集、释放反应都可由血小板胞浆游离钙离子浓度增高触发,血小板胞浆游离钙离子浓度的增高是血小板参与血栓形成的重要机制之一^[15]。本研究发现,单环刺蝟糖胺聚糖能够降低大鼠血小板内钙离子浓度,显著升高血小板cAMP浓度,从而抑制ADP诱导的血小板聚集,显著降低大鼠血小板聚集百分率。

TXA₂在血小板内血栓素合成酶的催化下生成,具有很强的聚集血小板与缩血管作用,是目前已发现的最强的缩血管物质与血小板聚集剂之一;PGI₂主要在血管壁内皮细胞生成,是较强的血小板聚集抑制剂,具有抑制血小板的黏附、聚集和释放反应,抑制血小板的促凝活性等作用,TXA₂和PGI₂之间的动态平衡是维持机体出凝血功能的基础^[16]。由于TXA₂和PGI₂不稳定,因此常将TXA₂和PGI₂稳定的代谢产物TXB₂和6-keto-PGF₁α作为判断其浓度的指标^[17,18]。血小板膜糖蛋白在血小板黏附聚集和释放反应中起着重要作用,当血小板受刺激活化时,血小板膜糖蛋白发生改变,GP II b/III a可直接反映血小板活化的状态,其分子数量增高成为血小板黏附性增高的主要原因,血小板膜糖蛋白GP II b/III a与血栓性疾病尤其是心血管疾病的发生发展有密切关系^[19]。本研究表明,单环刺蝟糖胺聚糖能够显著降低大鼠血浆TXB₂含量,显著升高6-keto-PGF₁α含量($P < 0.01$),显著降低血小板膜糖蛋白的浓度($P < 0.05$),表明该糖胺聚糖可能通过抑制血小板释放血栓素和促进血管内皮释放前列环素来实现对血小板聚集的抑制作用。关于单环刺蝟糖胺聚糖抑制大鼠血小板聚集的分子机制有待进一步研究。

参考文献

1 Sun CF(孙崇峰), Li SF(李石飞), Zhao Y(赵邑), et al. Chemical constituents from the fruits of *Rosa xanthine* Lindl

- and their effects on prothrombin time *in vitro* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 228-231.
- 2 Baigent C, Sudlow C, Collins R, et al. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients [J]. *BMJ*, 2002, 324: 71-86.
- 3 Li GJ(李广靖), Cui QM(崔青曼), Yuan CY(袁春营). Study on chemical composition and biological activities of glycosaminoglycan from *Patinopecten yessoensis* waste [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2012, 33: 134-136.
- 4 Chang N(常念), Wu H(吴皓), Wang LC(王令充), et al. Hypoglycemic effect of *Maetra veneriformis* extraction [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med* (南京中医药大学学报), 2009, 25: 277-280.
- 5 Hu XQ(胡雪琼), Wu HM(吴红棉), Liu ZY(刘芷筠), et al. Study on enzymatic preparation of glycosaminoglycan with anti-tumor activity from *Crassostrea rivularis* [J]. *Food Res Dev* (食品研究与开发), 2009, 30: 3-6.
- 6 Fan XP(范秀萍), Wu HM(吴红棉), Wang YN(王妮楠), et al. Free radical-scavenging activity of glycosaminoglycans from four seashells *in vitro* [J]. *Food Sci Tech* (食品科技), 2008, 33: 165-167.
- 7 Cui QM(崔青曼), Liu P(刘萍), Wang Y(王悦), et al. Preliminary study on the anticoagulation mechanism of glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* [J]. *Sci Tech Food Ind* (食品工业科技), 2015, 36: 337-340.
- 8 Yuan CY(袁春营), Liu P(刘萍), Han X(韩旭), et al. The study on composition structure and functional activity of glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* [J]. *Food Ind* (食品工业), 2014, 35: 181-183.
- 9 Liu P, Cui QM, Wang WY, et al. The effect of glycosaminoglycan from *Urechis unicinctus* on the protein C system and relevant factors expression of HUVECs [C]. Proceedings of the 2015 International Symposium on Computers & Informatics, 2015: 617-624.
- 10 Yang L(杨蕾), Xiu C(修春), Wang NS(王宁生). Effect of bornel on cytoplasmic free calcium level in rat platelets [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21(1): 1-3.
- 11 Ren X(任霞), Wang ZL(王字玲), Zhou H(周虹). Research progress on the structure and activation mechanism of platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa [J]. *Chin J Blood Transf* (中国输血杂志), 2005, 18: 159-161.
- 12 Hua YF, Feng HF, Ming YY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A [J]. *Thromb Res*, 2010, 126: 17-22.
- 13 Park JY, Hong M, Jia Q, et al. Pistacia chinensis methanolic

- extract attenuated MAPK and akt phosphorylations in ADP stimulated rat platelets *in vitro* [J]. *Evid-Based Compl Alt Med*, 2012, 7: 895729.
- 14 Li M(李敏). Advance in the mechanism of anti-platelet aggregation drugs[J]. *Cap Med*(首都医药), 2013, 9: 15-18.
- 15 Liu Y(刘玥), Yin HJ(殷惠军), Shi DZ(史大卓), *et al.* The use of Chinese medicinal herbs and formulas that activate blood circulation and antiplatelet therapies[J]. *Chin Sci Bull*(科学通报), 2014, 59: 647-655.
- 16 Pang AM(庞爱明), Ruan CG(阮长耿). The effect of epigallocatechin gallate (EGCG), main component of green tea on platelet function[J]. *Chin J Hemorheol*(中国血液流变学杂志), 2004, 14(1): 37-39.
- 17 Liu Q(刘茜), Song RP(宋睿璞), Chen GM(陈桂敏). Effect of the herbs for removing heat from blood to arrest bleeding in boye decoction on TXB₂ and 6-keto-PGF1 α in rats with bleeding caused by cold of insufficiency of spleen-stomach[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2012, 5: 172-174.
- 18 Wang Z(王珍), Yang JY(杨靖亚), Song SJ(宋书杰), *et al.* Effect of dencichine on coagulation and the hemostatic mechanism[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2014, 23: 356-359.
- 19 Wang CJ(王翠娟), Yang XT(杨晓亭), Mao XN(毛学妮). The relationship between platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa and cardiovascular disease[J]. *J Med Theory Pract*(医学理论与实践), 2013, 26: 303-304.
- (上接第 2142 页)
- 5 Zhao BW(赵博闻), Liu YQ(刘雨晴), Wu HG(吴海歌). Research progress on marine natural products and their anti-inflammation activity[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29: 1248-1255.
- 6 Huang H(黄晖), Li XB(李秀保), He JG(何建国), *et al.* Species diversity and distribution of gorgonian at Xuwen, Zhanjiang, Guangdong province [J]. *J Trop Ocean Ography*(热带海洋学报), 2007, 26(1): 60-67.
- 7 Gao C, Lin L, Long B, *et al.* A new diketopiperazine from the gorgonian coral *Menella kanisa* [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28: 473-476.
- 8 Gao CH, Wang YF, Li S, *et al.* Alkaloids and sesquiterpenes from the South China Sea gorgonian *Echinogorgia pseudosappo* [J]. *Mar Drugs*, 2011, 9: 2479-2487.
- 9 Thiagarajan V, Harder T, Qian PY. Relationship between cyprid energy reserves and metamorphosis in the barnacle *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica) [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, 280(1-2): 79-93.
- 10 Gao CH(高程海), Yi XX(易湘茜), Lin L(林琳), *et al.* The chemical constituents and structure-antifouling-activity relationships of PAEs from marine organisms [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25: 1320-1324.
- 11 Wang YL(王应莉). Study on chemical constituents from petroleum ether fraction of coral *Dendronephthya* sp. [D]. Guangzhou: Jinan University(暨南大学), 2009.
- 12 Shi LL(石磊岭), Ma GX(马国雷), Yang JS(杨峻山), *et al.* Chemical constituents from plant of *Pterocarpus tianschanica* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2016, 47: 223-226.
- 13 SciFinder: "Predicted NMR data calculated using Advanced Chemistry Development [DB]. Inc. (ACD/Labs) Software V11.01 (1994-2011 ACD/Labs)".
- 14 Luo YJ(罗娅君), Xiao XF(肖新峰), Wang ZL(王照丽). Study on chemical constituents of *Stenoloma chunsana* L. Ching [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2009, 40: 190-192.
- 15 Xu Q(徐谦), Li ZL(李振麟), Zhao YM(赵彦敏), *et al.* Chemical constituents from *Adenophorae Radix* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2016, 7: 58-61.
- 16 Kim DH, Oh YJ, Han KM, *et al.* Development of biologically active compounds from edible plant sources XIV. cyclohexylethanoids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum [J]. *Agric Chem Biotechnol*, 2005, 48: 35-37.
- 17 Wu H(吴皓), Li W(李伟), Zhang KW(张科卫), *et al.* Distinctive compound in Rhizome of *Pinellia ternata* [J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2003, 28: 836-839.