

# 紫锥菊提取物及酚酸化合物体外抗血小板聚集活性研究

齐海艳<sup>1</sup>, 陈新蕊<sup>2</sup>, 王诗寒<sup>2</sup>, 杜妍<sup>2</sup>, 裴月湖<sup>1,2\*</sup>, 甘春丽<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; <sup>2</sup> 哈尔滨医科大学药学院, 哈尔滨 150081

**摘要:** 为探究紫锥菊提取物及酚酸化合物体外抗血小板聚集活性, 体外抗血小板聚集实验采用 Born 比浊法, 以聚集抑制率和半数抑制浓度为指标评价。同时采用分子对接方法, 选择凝血因子 V(F5)、凝血因子 VIII(F8) 及凝血因子 XI(F11) 与酚酸类化合物进行虚拟对接, 研究其抗血小板聚集的分子作用靶点。结果表明化合物 S-1~S-10 及其提取物对体外 ADP 诱导的血小板聚集有抑制作用, 抑制率呈浓度依赖性, S-6 与靶点的结合位点更多, 选择性更强。紫锥菊中酚酸类化合物及其提取物在体外均显示出抗 ADP 诱导的血小板聚集活性, 为紫锥菊体内研究提供依据。

**关键词:** 紫锥菊; 酚酸类化合物; 凝血因子; 虚拟分子对接; 抗血小板聚集

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)5-0850-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.5.018

## Antiplatelet aggregation activities of phenolic compounds in *Echinacea purpurea* and its extract *in vitro*

QI Hai-yan<sup>1</sup>, CHEN Xin-rui<sup>2</sup>, WANG Shi-han<sup>2</sup>, DU Yan<sup>2</sup>, PEI Yue-hu<sup>1,2\*</sup>, GAN Chun-li<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

<sup>2</sup> School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

**Abstract:** Born turbidimetry was used to evaluate the aggregation inhibition rate and the half-inhibition concentration. The phenolic acid compounds in *Echinacea* and its extracts were resistant to platelet aggregation induced by 4,5-adenosine diphosphate (ADP). Using molecular docking method, coagulation factor V (F5), factor VIII (F8) and factor XI (F11) were selected for virtual docking with phenolic compounds to study their molecular targets for anti-platelet aggregation. The results showed that the 60% ethanol extract of *Echinacea* had inhibitory effect on ADP-induced platelet aggregation *in vitro*, and the inhibition rate was concentration-dependent. The chemically synthesized phenolic compounds all have anti-ADP-induced platelet aggregation activity, and the anti-platelet aggregation effects of three compounds were similar to those of ASA against platelet aggregation. Molecular docking studies showed that all compounds can be hydrogen bonded to the target compound, wherein the binding energy of the target to some of the compounds can be higher than 50% of the positive control. It was suggested that these may participate in the process of platelet aggregation and exert an inhibitory effect. Compound S-6 had more binding site with the target, more tight binding, stronger binding ability and better selectivity, and was expected to be a lead against platelet aggregation. The phenolic acids and their extracts in *Echinacea* showed anti-ADP-induced platelet aggregation activity *in vitro*, which provided a basis for the *in vivo* study of *Echinacea*.

**Key words:** *Echinacea purpurea*; phenolic compounds; coagulation factor; virtual molecular docking; antiplatelet aggregation

随着现代社会的发展和人口老龄化进程的加快, 血栓性疾病<sup>[1]</sup>已成为严重危害人类生命健康的头号疾病, 常见的如心绞痛、心肌梗死、脑梗死、血

栓性静脉炎等, 而且日趋严重。治疗和干预血栓性疾病成为当代医学研究的重点和热点之一, 其病因及发病机制十分复杂, 尚未完全阐明。目前认为血小板聚集<sup>[2]</sup>是引起血栓性疾病关键因素之一。到现在为止, 国际上预防和治疗血栓的常用药物包括抗血小板药物, 如阿司匹林; 抗凝血药物, 如华法林等; 纤维蛋白溶解药物, 如尿激酶(UK)等。

紫锥菊(*Echinacea purpurea* (L.) Moench)也称

收稿日期: 2018-07-31 接受日期: 2019-03-13

基金项目: 黑龙江省高等教育学会青年专项(16Q070); 黑龙江省卫生计生委科研课题(2018491); 黑龙江省博士后资助经费(LBH-Z18105)

\* 通信作者 Tel: 86-451-86685745; E-mail: chunligan@126.com, peiyuehu@vip.163.com

“松果菊”,为菊科(Compositae)松果菊属(*Echinacea*)多年生草本植物,原产于北美洲,已在我国引种成功<sup>[3]</sup>。紫锥菊提取物具有抗炎、抗病毒、免疫调节、抗癌、抑制念球菌感染、预防光照损伤皮肤等作用<sup>[4]</sup>。目前还有药理研究表明<sup>[5,6]</sup>,紫锥菊中酚酸类化合物具有不同程度的抗血小板聚集的活性。紫锥菊中的菊苣酸等成分其抗血栓作用至今没有研究报告。

目前对抗血栓的研究主要采用的是经典的体外抗凝血及抗血栓方法<sup>[7-12]</sup>,以血浆复钙时间、凝血酶时间、体外血栓溶解率及全血凝块容积率为指标,考察化合物体外抗凝血与抗血栓的活性。由于在体内凝血过程中,需要血小板和一系列凝血因子的共同参与,血小板为凝血因子V、VIII、IXa、Xa提供了磷脂表面,在Ca<sup>2+</sup>参与下激活凝血酶原激活物,进而激活凝血酶,完成凝血过程。在此基础上,本实验采用了Born比浊法<sup>[13,14]</sup>研究10个酚酸类化合物以及紫锥菊提取物体外抗ADP诱导的血小板聚集作用,并应用了分子对接的方法<sup>[15,16]</sup>,将酚酸类化合物与凝血因子进行对接。实验旨在研究紫锥菊酚酸类化合物及其提取物体外抗血小板聚集活性以及酚酸类

化合物与凝血因子的虚拟分子对接,为紫锥菊提取物体内抗血小板聚集活性的研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验动物

雄性SD大鼠(动物许可证号:SCXK(辽)2015-0001),体重220±10g,动物适应性饲养一周,温度21±2℃,湿度40%~45%,自由摄食和饮水,由沈阳药科大学动物中心提供。

#### 1.1.2 试剂与药品

乙醇(分析纯,天力化学有限公司);戊巴比妥钠(分析纯,阿拉丁试剂有限公司);枸橼酸钠(分析纯,阿拉丁试剂有限公司);阿司匹林(ASA)(分析纯,阿拉丁试剂有限公司);二甲基亚砜(DMSO)(分析纯,富宇精细化工有限公司);紫锥菊药材粗粉(益康中药堂);4,5-腺苷二磷酸二钠盐(ADP)(分析纯,美国sigma公司)。

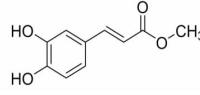
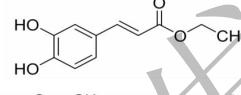
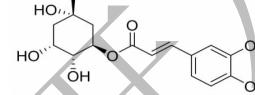
化合物S-1~S-10均由本实验室前期合成所得<sup>[17]</sup>,经过TLC、MS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR鉴定(如表1所示)。

表1 10个酚酸类化合物的化学名称及其结构

Table 1 The chemical names and structures of 10 phenolic compounds

编号 Number	名称 Name	结构 Structure
S-1	原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	
S-2	阿魏酸 Ferulic acid	
S-3	咖啡酸 Caffeic acid	
S-4	3,4-二乙酰咖啡酸 3,4-Diacetyl caffeic acid	
S-5	二乙酰菊苣酸酯 Diacetylendive acid	
S-6	菊苣酸 Chicory acid	
S-7	咖啡酸苯乙酯 Phenethyl caffeteate	

续表1(Continued Tab. 1)

编号 Number	名称 Name	结构 Structure
S-8	咖啡酸甲酯 Methyl caffeate	
S-9	咖啡酸乙酯 Ethyl caffeate	
S-10	绿原酸 Chlorogenic acid	

### 1.1.3 仪器与材料

HHS型电热恒温水浴锅(博讯实业有限公司医疗设备厂);RE-52AA旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);LC-400低速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);HC-2518R高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);LG-KOALA血小板凝集仪(北京Stellex科学仪器公司);AGBP210S电子天平(德国Satorius公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 富血小板血浆(PR P)和贫血小板血浆(PPP)的制备

未给药雄性SD大鼠,给予戊巴比妥钠(50 mg/kg, i. p. 0.08 mL/100 g)进行麻醉,右侧颈动脉取血5 mL,采用3.8%枸橼酸钠抗凝,全血与3.8%枸橼酸钠水溶液比例为9:1(v/v)混合。800 rpm离心10 min,取上层血浆,得到PRP,3 000 rpm继续离心10 min,取上层血浆,得到PPP。

### 1.2.2 供试品溶液的制备

取合成的酚酸类化合物S-1~S-10及ASA对照品适量,精密称量,DMSO溶解,配制成2、20、200 μmol/L的样品溶液,作为供试品溶液。

紫锥菊药材粗粉10 g加入50 mL 60%乙醇回流提取三次,每次30 min,合并提取液,浓缩,用DMSO溶解,配制成为1 mL含1 g的生药储备液,稀释成100、50、10 mg/mL三个浓度梯度,测定前用0.45 μm滤膜过滤,续滤液即为供试品溶液。

### 1.2.3 体外抗血小板聚集实验

将290 μL PRP加入比浊杯中,放入搅拌珠,分别加入5 μL DMSO以及供试品溶液,于37 °C预温口内预温1 min,之后加入ADP 5 μL(终浓度5 μmol/L),37 °C搅拌5 min,记录最大血小板聚集率。

以DMSO溶液作为空白对照溶液,以ASA溶液作为阳性对照溶液。

## 1.3 数据处理

血小板聚集百分率及聚集抑制百分率计算公式如下:

$$\text{聚集率}(\%) = (\text{PPP透光度} - \text{PRP聚集透光度}) / \text{PPP透光度} \times 100\%$$

$$\text{聚集抑制率}(\%) = (\text{溶剂对照组聚集率} - \text{给药组聚集率}) / \text{溶剂对照组聚集率} \times 100\%$$

采用SPSS 13.0统计软件对聚集抑制率进行线性相关分析,P<0.05表示差异有统计学意义,实验数据取三次独立实验数据的平均值。

采用Sigma Plot线性回归方程计算供试品的半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>),结果以x±SD表示。

## 1.4 酚酸类化合物与凝血因子分子对接

采用Discovery Studio 3.5以及RCSB Protein Data Bank数据库在建立对接体系的基础上模拟10种酚酸类化合物与凝血因子F5、F8、F11分子间的结合键和对接能。

## 2 结果

### 2.1 紫锥菊及其酚酸类化合物体外抗ADP诱导血小板聚集活性

#### 2.1.1 紫锥菊提取物体外抗血小板聚集活性

线性相关分析相关系数r=0.89,t=4.3445(P<0.05),紫锥菊提取物浓度与聚集抑制率存在线性相关关系。紫锥菊60%乙醇提取物对体外ADP诱导的血小板聚集有抑制作用,抑制率呈浓度依赖性(见表2)。

#### 2.1.2 酚酸类化合物外抗ADP诱导血小板聚集活性

体外实验结果显示:化学法合成的酚酸类化合

物均具有抗 ADP 诱导的血小板聚集活性,其中 3 个

化合物抗血小板聚集的作用与 ASA 抗血小板聚集

的作用相近,实验结果见表 3。

表 2 紫锥菊提取物体外抗 ADP 诱导的血小板聚集活性( $n=3$ )

Table 2 Effects of *E. purpurea* on the platelet aggregations induced by adenosine diphosphate (ADP) *in vitro* ( $n=3$ )

组别 Groups	浓度 Dose (mg/mL)	聚集抑制率 Inhibition % ( $x \pm SD$ )
阿司匹林 ASA	1.44	57.4 ± 7.5
低剂量紫锥菊提取物 Crebanine-L <i>Echinacea purpurea</i>	10	10.3 ± 3.7
中剂量紫锥菊提取物 Crebanine-M <i>Echinacea purpurea</i>	50	30.3 ± 4.2
高剂量紫锥菊提取物 Crebanine-H <i>Echinacea purpurea</i>	100	50.8 ± 5.6

注:与阳性对照相比, $P < 0.05$ 。

Note: Ratio of positive control,  $P < 0.05$ .

表 3 酚酸类化合物体外抗 ADP 诱导的血小板聚集活性( $n=3$ )

Table 3 Effects of phenolic compounds on the platelet aggregations induced by adenosine diphosphate (ADP) *in vitro* ( $n=3$ )

化合物 Compound	半数抑制浓度 IC <sub>50</sub> (μmol/L) ( $x \pm SD$ )	化合物 Compound	半数抑制浓度 IC <sub>50</sub> (μmol/L) ( $x \pm SD$ )
ASA	8.2 ± 0.1	S-6	15.6 ± 1.3
S-1	9.2 ± 1.2	S-7	14.4 ± 2.1
S-2	10.3 ± 0.8	S-8	25.2 ± 2.2
S-3	11.1 ± 1.5	S-9	19.8 ± 1.9
S-4	16.2 ± 0.9	S-10	13.7 ± 0.6
S-5	22.7 ± 0.4		

注:与阳性对照相比, $P < 0.05$ 。

Note: Ratio of positive control,  $P < 0.05$ .

## 2.2 酚酸类化合物与凝血因子分子对接

### 2.2.1 酚酸类化合物与 F5 蛋白对接

酚酸类化合物以及阳性药,分别与 F5 蛋白在相

同的条件下进行分子对接,得到对接结果(见图 1)以及对接评估数据(见表 4)。

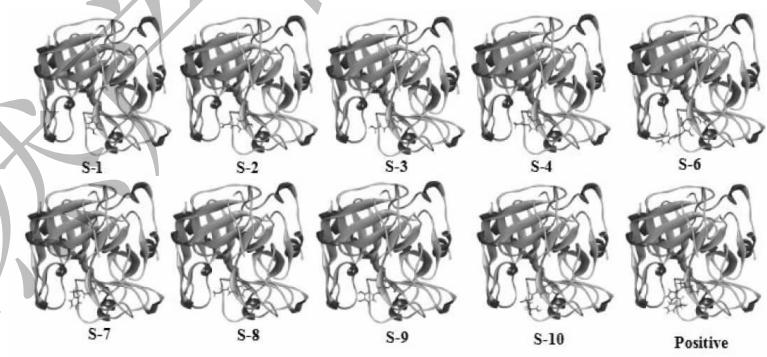


图 1 酚酸类化合物与 F5 分子的对接结果

Fig. 1 Molecular docking results of phenolic compounds and F5

以 D-苯丙氨酸-N-[ (2S,3S)-6-{[氨基(亚胺基)甲基]氨基}-1-氯-2-羟基己酸-3-基]-l-脯氨酰胺<sup>[18]</sup>作为阳性药,与 F5 进行分子对接,结果显示化合物可以全部进入到活性位点。阳性药与活性位点氨基酸 Asp562 (1 个)、Gly566 (1 个)、Ser568 (1

个)、Ser589 (1 个)以及 Gly591 (2 个)可以形成 6 个氢键,具体见表 4。同时化合物的化学结构位于整个活性位点,使得阳性药与 F5 蛋白紧密结合在一起,具体见图 2。

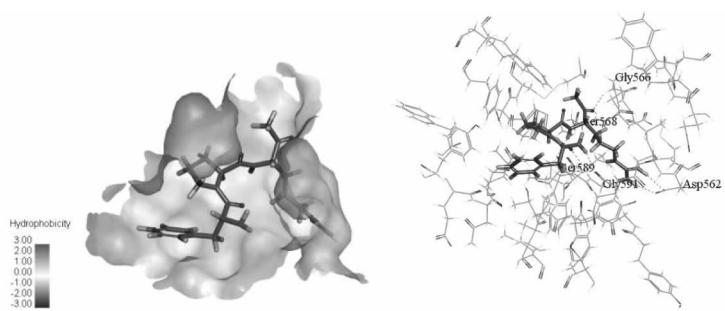


图 2 F5 与 Positive 分子对接结果分析

Fig. 2 Evaluation of docking results of Positive and F5

注:a. 左侧为化合物与活性位点的结合方式;b. 右侧为影响结合的因素:绿色虚线表示氢键,橘黄色表示共价键。

Note;a. The combination of the Positive and the active site;b. Factors for binding:green represents hydrogen bond,orange is covalent bond.

比较化合物与阳性药的对接结果,化合物 S-6 对 F5 的作用要比阳性药好,原因是化合物 S-6 化学结构位于整个活性位点,且与活性位点氨基酸

Trp455(1个)、Asp562(2个)、Ser589(1个)及 Gly591(2个)形成6个氢键,使得 S-6 与 F5 蛋白紧密结合(见图3,表4)。

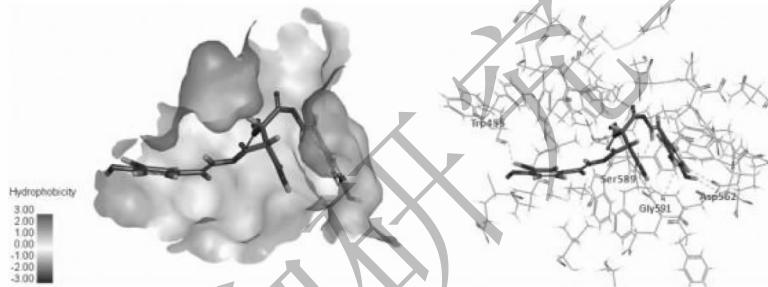


图 3 F5 与 S-6 分子对接结果分析

Fig. 3 Evaluation of docking results of S-6 and F5

表 4 化合物 S-6 和阳性对照药分别与 F5 形成氢键的氨基酸及氢键数目

Table 4 The number of amino acids and hydrogen bonds formed by hydrogen bonding between S-6/Positive and F5

名称 Name	Asp562	Ser589	Gly591	Gly566	Trp455
S-6	++	+	++	-	+
阳性药 Positive	+	+	++	+	-

注:-:无氢键;+:1个氢键;++:2个氢键

Note:-:no hydrogen bond;+:1 hydrogen bond;++:two hydrogen bonds

表 5 酚酸类化合物与 F5 对接结果评价

Table 5 Evaluation of docking results of phenolic compounds and F5

名称 Name	-CDOCKER 相互作用能 -CDOCKER interaction energy	名称 Name	-CDOCKER 相互作用能 -CDOCKER interaction energy
F5 与 S-1	23.2117	F5 与 S-7	29.6853
F5 与 S-2	32.5877	F5 与 S-8	32.038
F5 与 S-3	27.4082	F5 与 S-9	24.9291
F5 与 S-4	38.6729	F5 与 S-10	42.5493
F5 与 S-5	64.6671	F5 与 阳性药 Positive	62.5284
F5 与 S-6	40.6891		

化合物 S-2、S-4、S-7、S-8、S-10 与 F5 结合的能力要高于与阳性药结合能力的 50%, 而 S-1、S-3、S-9 的结合能力较小(见表 5), 结合的氢键情况见表 6。

表 6 酚酸类化合物与 F5 形成氢键的氨基酸及氢键数目

Table 6 The number of amino acids and hydrogen bonds formed by hydrogen bonding between phenolic compounds and F5

名称 Name	His406	Asp562	Ala563	Cys564	Glu565	Gly566	Gly591
S-1	-	-	-	-	+	+	++
S-2	-	-	-	-	+	-	-
S-3	-	-	-	-	-	-	-
S-4	-	+	-	-	-	-	-
S-7	-	+	+	-	-	-	-
S-8	-	-	-	+	-	-	-
S-9	-	-	-	-	-	-	-
S-10	-	-	-	-	-	-	+

### 2.2.2 酚酸类化合物与 F8, F11 对接

化合物与凝血因子 VIII(F8)和凝血因子 XI(F11)的分子对接方法同上。F8 的阳性药为(2R)-1-(2,4-苯氧基苯基)-3-[ (2E)-2-亚氨基-3-(2-哌啶-

1-乙基)-2,3-二氢-1H-苯并咪唑-1-基]丙-2-醇<sup>[19]</sup>、F11 的阳性药为 6-氨基甲酰基-N-苯基-4-(嘧啶-2-氨基)萘-2-甲酰胺<sup>[20]</sup>, 得到 F8(图 4) 和 F11(图 5) 对接结果。

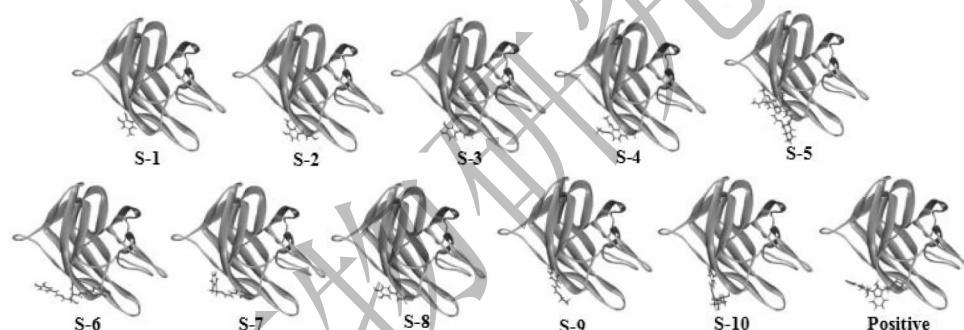


图 4 酚酸类化合物与 F8 分子的对接结果

Fig. 4 Molecular docking results of phenolic acid compounds and F8

由上述表和图可知, 同阳性药相比较, 化合物 S-5 和 S-6 与 F8 或者 F11 的作用都比阳性药强, 其余药物的作用均超过阳性药的 50%, 尤其是 S-6 能够更好的与 F5 结合。

### 3 结论

在凝血过程中, 凝血因子与血小板关联紧密, 协同完成凝血过程。为了更好的研究酚酸类化合物的抗血栓作用, 本实验进行了体外抗血小板与凝血因

表 7 化合物与 Coagulation factor VIII(F8)对接结果评价

Table 7 Evaluation of docking results of compound and Coagulation factor VIII(F8)

名称 Name	-CDOCKER 相互作用能 -CDOCKER interaction energy	名称 Name	-CDOCKER 相互作用能 -CDOCKER interaction energy
F8 与 S-1	18.721	F8 与 S-7	24.342 9
F8 与 S-2	21.960 7	F8 与 S-8	23.310 5
F8 与 S-3	19.795 4	F8 与 S-9	20.585 1
F8 与 S-4	23.446 7	F8 与 S-10	23.632 8
F8 与 S-5	41.393 9	F8 与 Positive	35.6886
F8 与 S-6	38.054 8		

表 8 化合物与 Coagulation factor XI(F11)对接结果评价

Table 8 Evaluation of docking results of compound and Coagulation factor XI (F11)

名称 Name	-CDOCKER 相互作用能 -CDOCKER interaction energy	名称 Name	-CDOCKER 相互作用能 -CDOCKER interaction energy
F11 与 S-1	29.849 2	F11 与 S-7	36.810 8
F11 与 S-2	32.837 2	F11 与 S-8	28.218 2
F11 与 S-3	29.493 3	F11 与 S-9	29.373 4
F11 与 S-4	36.411 8	F11 与 S-10	36.751 8
F11 与 S-5	64.153 6	F11 与 Positive	51.621 6
F11 与 S-6	59.155 1		

图 5 酚酸类化合物与 F11 分子的对接结果

Fig. 5 Molecular docking results of phenolic compounds and F11

子的分子对接两方面研究。

从体外实验结果看,检测的几种天然酚酸类化合物及合成中间体都显现出了抗血小板聚集作用(略低于对照药 ASA),就半数抑制浓度  $IC_{50}$ 来说,含有游离羧基的酚酸类活性普遍好于成酯化产物,可见羧基的游离对活性是重要的。这可能与羧基和血小板聚集过程中破坏膜表面电荷有关,亦或是增加了特定靶点的结合力。

另一方面,酚羟基的存在对活性的提高作用较大,但不能得出邻二酚羟基的存在使活性可能低于单个酚羟基化合物。分析酚羟基的存在,可与过氧自由基迅速反应,避免血小板活化,是其抗血小板聚集的机制之一。

结合体外实验结果,采用分子对接方法,选择与血小板凝聚相关的蛋白(F5、F8、F11)为靶点,对这些化合物进行虚拟对接。发现 S-1 ~ S-10 均可以与靶点以氢键的方式结合,其中靶点与部分化合物的相互结合能可高于与阳性对照物的 50%。提示这些化合物可能参与到血小板聚集的过程中,发挥抑制作用。化合物 S-6 与靶点的结合位点更多,结合

更紧密,结合能力更强,选择性更好,有望成为具有抗血小板聚集作用的先导物。

体外实验结果显示不能代表体内实验结果。因此,课题延续工作将围绕建立系统方法考察紫锥菊中几种天然酚酸类化合物抗血小板聚集活性,探讨作用机制,为筛选出疗效更好、副作用更小、生物利用度更高的治疗血栓栓塞性疾病药物奠定基础。

紫锥菊提取物及其酚酸类化合物在体外均显现出抗 ADP 诱导的血小板聚集活性,其中菊苣酸(S-6)抗血小板聚集活性较佳。分子对接研究显示菊苣酸(S-6)与凝血因子(V、VIII、XI)结合能力强于所用的三种阳性对照药,有望成为治疗血栓栓塞性疾病新药的先导化合物。

## 参考文献

- Ma XB. Progress in antithrombotic drugs [J]. Chin J Clin Rational Drug Use(临床合理用药杂志),2017,10:178-197.
- Han CF, Feng WH. Development of antiplatelet agents for thrombotic diseases [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志),2016,25:1363-1369.
- Bruni R, Brighenti V, Caesar LK, et al. Analytical methods

- for the study of bioactive compounds frommedicinally used *Echinacea* species [ J ]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 160: 443-477.
- 4 Chiou SY, Sung JM, Huang PW, et al. Antioxidant, antidiabetic, and antihypertensive properties of *Echinacea purpurea* flower extract and caffeic acid derivatives using *in vitro* models [ J ]. *J Med Food*, 2017, 20: 171-179.
- 5 Vimalanathan S, Schoop R, Suter A, et al. Prevention of influenza virus induced bacterial superinfection by standardized *Echinacea purpurea*, via regulation of surface receptor expression in human bronchial epithelial cells [ J ]. *Virus Res*, 2017, 233(7): 51-59.
- 6 Bojic M, Antolic A, Tomicic M, et al. Propolis ethanolic extracts reduce adenosine diphosphate induced platelet aggregation determined on whole blood [ J ]. *Nutr J*, 2018, 17(1): 52.
- 7 Ku SK, Yoon EK, Lee W, et al. Antithrombotic and antiplatelet activities of pelargonidin *in vivo* and *in vitro* [ J ]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39: 398-408.
- 8 Xie PY. Antithrombotic activity and mechanism of action of *Rubus*. spp. Blackberry and *Paeonia lactiflora* Pall [ D ]. Kaifeng: Henan University (河南大学), 2016.
- 9 Ren J. Study on antioxidant and antithrombotic effects of the ethanol extract of *Rose xanthina* Lindl. fruit [ D ]. Taiyuan: Shanxi Medical University (山西医科大学), 2017.
- 10 Zhu XF, Zhu XD, Wang JM, et al. Study on *in vitro* antioxidant, anticoagulant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of different extracts of *Lonicerae japonicae* from Fengqiu [ J ]. *J China Pharm* (中国药房), 2016, 27: 4804-4806.
- 11 Miao YL, Liu ZQ, Sun RX, et al. Preparation of anticoagulant peptide from casein and study on thrombolysis and anticoagulation *in vitro* [ J ]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药). 2016, 47: 1871-1881.
- 12 Xiao Z, Wang ZB, Cheng Y, et al. Bioassay method of anticoagulant research of yixintongluo capsule *in vitro* [ J ]. *Lab Anim Sci* (实验动物科学), 2017, 34, (3): 20-23.
- 13 Li X. Structure design and synthesis of 4-ethoxy-1, 3-Benzene-disulfonamide derivatives and anti-platelet aggregation activity *in vitro* [ D ]. Tianjin: Graduate School of Tianjin University of Technology (天津理工大学研究生院), 2016.
- 14 Huang ZQ, Wang TT, Liu XJ, et al. Synthesis and *in vitro* antiplatelet aggregation activity of 4-methoxy-1, 3-benzene-disulfonates [ J ]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2017, 27: 274-278.
- 15 Mphahlele MJ, Maluleka MM, Aro A, et al. Benzofuran-appended 4-aminoquinazoline hybrids as epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular docking studies [ J ]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33: 1516-1528.
- 16 Yang MD, Xu QX, Ye LB, et al. Synthesis, biological activity, computer aided drug design of alpha-pinene derivatives [ J ]. *Chin J Chin Master Med* (中国中药杂志), 2018, 43: 1001-1007.
- 17 Du Y, Gan CL, Zeng QX, et al. Synthesis of phenolic acids in *Echinacea purpurea* [ J ]. *J Harbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 2017, 51: 200-205.
- 18 Corralrodríguez Ma, Bock PE, Hernándezcarvajal E, et al. Structural basis of thrombin-mediated factor V activation: the Glu666-Glu672 sequence is critical for processing at the heavy chain-B domain junction [ J ]. *Bl*, 2011, 117: 7164-7173.
- 19 Liu Z, Lin L, Yuan C, et al. Rp2313-His2315 of factor VIII C2 domain is involved in membrane binding: structure of a complex between the C2 domain and an inhibitor of membrane binding [ J ]. *Bio Chem*, 2010, 85: 8824-8829.
- 20 Fjellström O, Akkaya S, Hans-Georg B, et al. Creating novel activated factor XI inhibitors through fragment based lead generation and structure aided drug design [ J ]. *PloS One*, 2015, 10: e0113705.

**致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!**

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社