

见血青提取物止血作用的实验研究^Δ

赵颖*, 胡少南, 郑一敏, 胥秀英(重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2884-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.02

摘要 目的:研究见血青的止血、促凝血作用。方法:小鼠分别灌胃高、低剂量(4,2 g/kg)见血青水提取物、石油醚提取物、二氯甲烷提取物、水醇液提取物,每天1次,连续7 d后剪尾测定止血时间(BT);毛细管法测定凝血时间(CT)。大鼠分别灌胃高、低剂量(4,2 g/kg)见血青水提取物、石油醚提取物、二氯甲烷提取物、水醇液提取物,每天1次,连续7 d后颈总动脉采血,测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)含量。结果:高、低剂量见血青二氯甲烷提取物可显著缩短小鼠BT($P < 0.05$),低剂量见血青二氯甲烷提取物可显著缩短小鼠CT和大鼠APTT($P < 0.05$),高、低剂量见血青水提取物与石油醚提取物、二氯甲烷提取物、水醇液提取物可显著增加大鼠FIB含量($P < 0.05$)。结论:见血青具有较好的止血、促凝血作用,推测其作用机制可能与收缩血管、抑制纤溶酶活性、增加FIB含量有关。

关键词 见血青;止血;止血时间;凝血时间;纤维蛋白原

Study on the Hemostatic Effect of the Extracts from *Liparis nervosa*

ZHAO Ying, HU Shao-nan, ZHEN Yi-min, XU Xiu-ying(School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of *Liparis nervosa* on promoting hemostasis and blood coagulation. METHODS: The mice were given high-dose and low-dose(4,2 g/kg) aqueous extract, aether petrolei extract, dichloromethane extract, water extraction and alcohol precipitation of *L. nervosa* intragastrically once a day for consecutive 7 days. The bleeding time (BT) was determined by shearing tail method. Clotting time(CT) was determined by capillary tube method. The rats were given high-dose and low-dose(4,2 g/kg) aqueous extract, aether petrolei extract, dichloromethane extract, water extraction and alcohol precipitation of *L. nervosa* intragastrically once a day for consecutive 7 days. The blood samples were collected from carotid artery for the determination of prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time(APTT), thrombin time(TT) and fibrinogen(FIB). RESULTS: High-dose and low-dose dichloromethane extract of *L. nervosa* could shorten BT of mice significantly($P < 0.05$); CT and the APTT values were obviously shortened by low-dose dichloromethane extract($P < 0.05$), and FIB values were obviously increased by all of the extracts of *L. nervosa*($P < 0.05$). CONCLUSIONS: *L. nervosa* has an effect on promoting hemostasis and blood coagulation, and its mechanisms may be related with shrinking blood vessels, inhibiting plasmin activity and rising FIB content.

KEY WORDS *Liparis nervosa*; Hemostatic effects; Bleeding time; Clotting time; Fibrinogen

[18] 苏新.半夏愈伤组织的诱导和植株再生的研究[J].中国中药杂志,1989,14(11):656.

[19] 崔晓星,李晓洋,孟繁蕴.半夏快速繁殖技术的研究进展[J].中国农学通报,2009,25(1):51.

[20] 秦瑞珍.长时期保持高频率再生能力的同源四倍体水稻花粉无性系的建立[J].植物学报,1989,31(11):830.

[21] 李修庆,邓芙莲.胡萝卜人工种子的制作流程以及在有菌土壤中的发芽成苗[M].北京:北京大学出版社,1990:125.

[22] 孟树兰,董慧明,邓继武,等.马铃薯人工种子生产技术探索[J].中国马铃薯,2004,18(3):169.

[23] 张桂芳,黄松,刘宏源,等.铁皮石斛人工种子制作及影响因素研究[J].中草药,2011,42,(9):1812.

[24] 张苏锋.半夏人工种子的研究[J].信阳师范学院学报:自然科学版,1998,11(3):281.

[25] 薛建平,张爱民,盛玮,等.半夏人工种子贮藏技术的研究[J].中国中药杂志,2005,30(23):1820.

[26] 李西文,张晓柠,刘海涛,等.半夏有性繁殖研究[J].现代中药研究与实践,2006,20(5):59.

[27] 尹翠翠,张燕,张景华,等.秋水仙素诱导杂交四倍体及倍性鉴定[J].核农学报,2010,24(3):518.

[28] 张合成,吕增仁.多倍体与果树多倍体育种[J].河北果树,1990,(2):38.

[29] 孙静贤,丁开宇,王兵益.植物多倍体研究的回顾与展望[J].武汉植物学研究,2005,23(5):482.

[30] 申浩,吴卫,侯凯,等.不同施肥水平对川半夏产量和有效成分的影响研究[J].中国中药杂志,2011,36(8):963.

[31] 陈铁柱,周先建,张美,等.赫章半夏GAP规范化种植标准操作规程(SOP)[J].现代中药研究与实践,2011,25(2):8.

^Δ 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(No.2011CJ02);重庆理工大学科研启动基金资助项目(No.2010ZD07)

* 副教授,博士。研究方向:中药新药研发。E-mail: zhy@cqut.edu.cn

(收稿日期:2012-09-10 修回日期:2012-12-26)

见血青为兰科 Orchidaceae 羊耳蒜属 *Liparis* 脉羊耳兰 *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. 的全草^[1], 收载于《民间常用草药汇编》、《浙江民间常用草药》、《四川常用中草药》、《贵州药植目录》等书籍, 具有凉血止血、清热解毒的功效, 全草含脉羊耳兰碱。对见血青的研究始见于 Nishikawa K 等^[2-4]对脉羊耳兰碱的化学结构进行研究, 但见血青的药理学实验鲜有报道, 仅见于董艳芳等^[5-9]对见血青总生物碱和多糖的抑菌作用和抗氧化性的研究。现有文献^[7-9]报道, 咖啡酸和黄酮类化合物是凉血止血药小蓟、大蓟、大黄等的止血活性成分。为了更好地开发利用见血青这一民间常用中草药, 本研究制备了见血青的水提取物和不同极性部位, 研究其对小鼠出血时间(BT)、凝血时间(CT)的影响及对大鼠各项血液凝集参数的影响, 为进一步阐明见血青止血作用机制提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

CA-510型全自动凝血分析仪(日本希森美康株式会社); TDL-80-2B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); AUV-220D型电子天平(日本岛津公司)。

1.2 药材

见血青产自四川, 经重庆市中药研究院王昌华研究员鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

云南白药(云南白药集团股份有限公司, 批号: ZG12009); 水合氯醛(中国医药集团上海化学试剂公司); 生理盐水(重庆天圣制药股份有限公司); 凝血酶和凝血酶原时间(PT)测试盒、活化部分凝血活酶时间(APTT)测试盒、凝血酶时间(TT)测试盒(上海长岛生物技术有限公司)。

1.4 动物

SPF级昆明种小鼠200只, ♀♂兼半, 体质量(20±2)g; SPF级SD大鼠100只, 体质量(150±20)g, ♀♂兼半, 均由重庆市中药研究院实验动物中心提供[动物使用许可证号: SCXK(渝)20120006]。

2 方法

2.1 提取物的制备

见血青分别加水煎煮2次, 浓缩得见血青水提取物(得率为28.1%); 见血青经75%乙醇浸膏加水混悬后依次用石油醚、二氯甲烷萃取分别得见血青石油醚提取物(得率为11.1%)、二氯甲烷提取物(得率为8.2%)和水醇液提取物(得率为2.9%), 使用时加蒸馏水配成不同质量分数。

2.2 见血青提取物对小鼠BT的影响

2.2.1 分组与给药 将100只小鼠随机均分为10组, 即生理盐水组, 云南白药(2 g/kg)组, 见血青石油醚提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组, 见血青二氯甲烷提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组, 见血青水醇液提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组与见血青水提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组, 给药容积为0.2 ml/10 g, ig给药, 每天1次, 连续7 d。

2.2.2 BT的测定^[10] 采用断尾法。小鼠于末次给药1 h后, 用

解剖剪将距小鼠尾尖3 mm处横向剪断, 待血液自行溢出计时, 每30 s用滤纸吸去血滴1次, 直至血液自然停止所需的时间即为小鼠BT, 记录实验结果并计算缩短率。

2.3 见血青提取物对小鼠CT的影响

2.3.1 分组与给药 分组与给药同“2.2.1”项下方法。

2.3.2 CT的测定^[11] 采用毛细管法。小鼠于末次给药1 h后, 用内径1 mm、长15 cm的玻璃毛细管插入小鼠左眼内眦球后静脉丛取血, 血液注满后取出, 平放于桌面每隔30 s折断毛细管两端约0.5 cm, 并缓慢左右拉开, 观察折断处是否有凝血丝出现, 自血液流入毛细管内开始计时, 至凝血丝出现所需时间为该毛细管段CT, 取毛细管两端的平均值为小鼠CT, 计算缩短率。

2.4 见血青提取物对大鼠血液凝集参数的影响

2.4.1 分组与给药 将100只大鼠随机均分为10组, 即生理盐水组, 云南白药(2 g/kg)组, 见血青石油醚提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组, 见血青二氯甲烷提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组, 见血青水醇液提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组与见血青水提取物高、低剂量(4、2 g/kg)组, 给药容积为1 ml/100 g, ig给药, 每天1次, 连续7 d。

2.4.2 大鼠血液凝集参数的测定 大鼠于末次给药1 h后ip水合氯醛麻醉, 固定, 迅速剥离一侧颈总动脉, 以一次性注射器采血3.0 ml后立即移注入一次性真空采血管(枸橼酸钠抗凝), 轻轻颠倒摇匀后, 3 000 r/min离心10 min后取血浆, 采用凝固法按全自动凝血分析仪操作程序测定PT、APTT、TT、纤维蛋白原(FIB)含量。

2.5 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 数据以SPSS13.0软件处理。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 见血青提取物对小鼠BT、CT的影响

与生理盐水组比较, 见血青二氯甲烷提取物高、低剂量组小鼠BT显著缩短(P<0.05); 见血青二氯甲烷提取物低剂量组小鼠CT显著缩短(P<0.05)。见血青提取物对小鼠BT、CT的影响见表1。

3.2 见血青提取物对大鼠血液凝集参数的影响

与生理盐水组比较, 见血青二氯甲烷提取物低剂量组APTT显著缩短(P<0.05); 各给药组大鼠FIB含量均显著增加(P<0.05)。见血青提取物对大鼠血液凝集参数的影响见表2。

4 讨论

见血青作为民间常用止血中草药应用广泛, 但有关其化学成分和止血作用未见系统的实验报道。止血作用是一个复杂的生理过程, 影响止血的因素包括凝血因子、血管状态、血小板、纤溶系统、钙离子等。本研究制备了见血青的水提取物及不同极性部位提取物, 研究其对小鼠BT、CT的影响, 药效筛选实验结果显示, 高、低剂量见血青二氯甲烷提取物可显著缩短小鼠BT, 低剂量见血青二氯甲烷提取物可显著缩短小鼠CT, 推断二氯甲烷部位是见血青止血作用的有效部位。

表1 见血青提取物对小鼠BT、CT的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Effects of different extracts of *L. nervosa* on BT and CT in mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	BT,s	BT缩短率,%	CT,s	CT缩短率,%
生理盐水组		357.6±66.5		174.8±61.3	
见血青石油醚提取物高剂量组	4	315.2±57.7	11.9	152.2±35.0	12.9
见血青石油醚提取物低剂量组	2	321.8±50.3	10.0	140.3±32.7	19.7
见血青二氯甲烷提取物高剂量组	4	298.7±56.7*	16.5	147.1±45.4	15.8
见血青二氯甲烷提取物低剂量组	2	287.2±64.0*	19.7	123.0±25.8*	29.6
见血青水醇液提取物高剂量组	4	301.9±64.5	15.6	133.8±25.4	23.5
见血青水醇液提取物低剂量组	2	344.8±58.3	3.6	134.1±32.8	23.3
见血青水提取物高剂量组	4	351.7±43.2	1.6	132.7±29.9	24.1
见血青水提取物低剂量组	2	330.8±56.2	7.5	130.4±46.9	25.4
云南白药组	2	292.5±55.2*	18.2	128.9±29.6*	26.3

与生理盐水组比较: * $P<0.05$

vs.NS group: * $P<0.05$

表2 见血青提取物对大鼠血液凝集参数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Effect of different extracts of *L. nervosa* on blood coagulation parameters in rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,g/kg	PT,s	APTT,s	FIB,g/L	TT,s
生理盐水组		7.0±0.9	12.6±1.1	1.68±0.10	46.4±2.0
见血青石油醚提取物高剂量组	4	7.0±0.7	13.0±1.8	1.85±0.14*	45.6±2.5
见血青石油醚提取物低剂量组	2	6.7±0.4	12.6±0.8	1.85±0.17*	46.3±1.1
见血青二氯甲烷提取物高剂量组	4	7.5±0.6	11.7±1.2	1.81±0.11*	46.0±1.7
见血青二氯甲烷提取物低剂量组	2	7.1±0.5	11.1±0.9*	1.81±0.12*	46.0±0.6
见血青水醇液提取物高剂量组	4	6.8±0.8	12.8±2.4	1.86±0.15*	46.2±0.9
见血青水醇液提取物低剂量组	2	7.0±0.6	13.6±1.4	1.88±0.21*	46.4±1.0
见血青水提取物高剂量组	4	7.0±0.5	13.3±1.4	1.81±0.08*	46.7±1.0
见血青水提取物低剂量组	2	6.6±0.7	13.6±1.2	1.81±0.09*	47.0±3.4
云南白药组	2	7.6±0.7	12.7±1.2	1.84±0.21*	46.7±0.8

与生理盐水组比较: * $P<0.05$

vs.NS group: * $P<0.05$

凝血过程是一系列的酶促反应,其中包括内源性、外源性途径和共同通路,最后使FIB变为纤维蛋白,血液由溶胶状态转为凝胶状态^[1]。见血青提取物对大鼠各项血液凝集参数的影响实验结果表明,见血青水提取物和各极性部位高、低剂量组大鼠分别连续ig给药7d后,能明显增加FIB含量,但对PT、TT基本无影响,推断其促凝血作用可能与增加FIB含量、促进FIB转变为纤维蛋白的过程有关。在见血青各极性部位中仅二氯甲烷低剂量组APTT显著缩短,因此,见血青二氯甲烷部位在凝血过程中对内源性凝血系统中凝血因子的影响以及是否具有剂量依赖性还有待进一步研究。

止血类中草药在我国的应用有着悠久的历史,其止血、凝血机制具有多环节、多靶点的特点。笔者已从见血青中分离得到脉羊耳兰类生物碱和黄酮类成分,且脉羊耳兰类生物碱母核中含有类咖啡酸的结构存在,以上结果推断见血青的止血作用可能与凉血止血类中药大蓟、小蓟相似,是通过收缩血管、抑制纤溶酶活性、增加FIB含量来实现,但见血青止血作用也许是多成分通过多途径协同止血,其作用机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志:第18卷:兰科:二[M].北京:科学出版社,1978:71.
- [2] Nishikawa K, Hirata Y. Chemotaxonomical alkaloid studies I. Structure of nervosine[J]. *Tetrahedron Lett*, 1967(8):2591.
- [3] Nishikawa K, Hirata Y. Chemotaxonomical alkaloid studies II. Structure of kuramerine and kumokirine[J]. *Tetrahedron Lett*, 1967(8):2597.
- [4] Nishikawa K, Miyamura M, Hirata Y. Chemotaxonomical alkaloid studies structures of liparis alkaloids[J]. *Tetrahedron Lett*, 1969(13):2723.
- [5] 董艳芳,李伟阳,叶睿超,等.见血青总生物碱的抑菌活性和抗氧化性研究[J].四川大学学报:自然科学版,2010,47(3):669.
- [6] 董艳芳,陈法志,郭彩霞,等.见血青多糖的抑菌活性与抗氧化性[J].湖北农业科学,2012,51(12):2570.
- [7] 何希瑞,樊鹏程,李茂星,等.常用止血中药及其止血机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):217.
- [8] 许浚,张铁军,龚苏晓,等.小蓟止血活性部位的化学成分研究[J].中草药,2010,41(4):542.
- [9] 蒋秀蕾,范眷林,叶文才,等.大蓟化学成分的研究[J].中草药,2006,37(4):510.
- [10] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,2006:684.
- [11] 石磊,李昌勤,廉婷婷,等.见血飞对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J].中国药房,2010,21(47):4424.

(收稿日期:2013-03-19 修回日期:2013-04-29)

国家食品安全风险评估中心发布《中国居民反式脂肪酸膳食摄入水平及其风险评估》

本刊讯 2010年,多家主流媒体报道了反式脂肪酸存在很大的健康风险,称“反式脂肪酸是餐桌上的定时炸弹”,引起业内和公众的极大震动和相关部门的高度关注。鉴于大量摄入反式脂肪酸可以增加心血管疾病的危险性,为了解我国居民日常膳食摄入的状况,以便科学、准确地回应公众疑问,

并为主管部门制定相应管理措施提供依据,食品安全风险评估专家委员会将“我国居民反式脂肪酸摄入水平及其风险评估”定为2011年优先评估项目。经过近2年的系统研究,国家食品安全风险评估中心于2013年7月10日发布了《中国居民反式脂肪酸膳食摄入水平及其风险评估》。