文章编号:1000-5404(2007)14-1419-03

论著

曲狗草止血作用及初步安全性评价

王秀琴,罗向东,伍素华 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要 目的 探讨曲狗草氯仿-水相提取物的止血作用及初步安全性评价。**方法** 通过家兔局部创面(皮肤、肝脏、股动脉)止血实验,评价曲狗草氯仿-水相提取物的止血作用;用LD_{50}、皮肤刺激性实验和皮肤过敏试验,及动物的肝肾组织形态学,观察药物的安全性。**结果** 该水相提取物的局部创面止血时间明显短于空白对照组($P<0.01$)。LD_{50}为483.08 mg/kg。在一次性大剂量(300 mg/kg)以下用药,病理组织形态学观察肝、肾等重要脏器未见异常变化;10%曲狗草氯仿-水相提取物,对实验动物完整皮肤及破损皮肤均无刺激性、过敏性及毒性反应。**结论** 曲狗草氯仿-水相提取物具有良好的创面止血作用;该提取物毒性低,副作用小,用药安全可靠。

关键词:曲狗草氯仿-水相提取物;止血时间;安全评价
中图法分类号:R282.71;R285.5 **文献标识码**:A

Hemostatic effects and safety evaluation of *QuGouCao*

WANG Xiu-qin, LUO Xiang-dong, WU Su-hua (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the hemostatic effects and safety of the *QuGouCao* chloroform-water extract. Methods The hemostatic property of the extract was studied by applying the extract soaked gauze to the local wound surface of skin, liver and femoral artery in rabbits. LD_{50} test in Kuming mice was performed and the tissues of liver and kidney were collected for routine histochemical examination. The skin stimulus in rabbits and the sensitivity test in guinea pigs were conducted. Results The hemostatic time of wounds was obviously shorter ($P<0.01$) than that of blank group control. LD_{50} was 483.08 mg/kg. The liver and kidney of toxicated mice were normal when the extract less than 300 mg/kg. 10% *QuGouCao* chloroform-water extract had no stimulation effect on the intact skin or damaged skin as well as caused no allergic or toxic reaction. Conclusion The *QuGouCao* chloroform-water extract has good hemostatic effect on the local wound surfaces. It is of low toxicity, few side effects and safety.

Key words: *QuGouCao* chloroform-water extract; hemostatic time; safety evaluation

曲狗草系云贵高原一种多年生草本植物,属蓼科植物(*Polygonaceae*)类,性苦、涩、平,其根茎可入药,民间常用于跌打损伤、外伤止血等伤病的治疗,但目前尚少见对其进行止血等药效学方面的实验研究报道。我们前期对曲狗草初提物进行体内外凝血实验的比较研究,证明曲狗草水提初提物具有快速体内外促凝作用[1,2]。本实验对曲狗草水提初提物经氯仿萃取,对萃取后的水相提取物(以下称为:曲狗草氯仿-水相提取物)进行止血等药效学研究,并对其进行初步安全性评价,为其深入研究及以后开发利用奠定基础。

作者简介:王秀琴(1969-),女,河北省承德市人,博士研究生,主管药师,主要从事止血生物敷料方面的研究。电话:(023)65398407,E-mail:wangxq69@163.com
通讯作者:罗向东,E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-11-28;修回日期:2006-12-16

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 家兔30只,体质量2.5~3.0 kg,雌雄不拘;昆明种小鼠160只,雄性,体质量(25±5)g;豚鼠12只,雌雄不拘,体质量250~300 g,均由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物 曲狗草(一种草药的简称):由云贵高原民间采集。

1.1.3 主要仪器及试剂 日本进口旋转蒸发仪、LDZS2自动平衡离心机(北京医用离心厂)、电热恒温水浴槽由本所提供。

1.2 实验方法

曲狗草氯仿-水相提取物的制备[3]:采用液-液萃取法。曲狗草粗粉100 g,用1 000 ml去离子水室温下浸泡4~6 h,90 ℃水浴箱恒温浸提1 h 30 min,过滤取上清;水浴3次,合并3次

上清液，离心（8 000 r/min，30 min），旋转蒸发浓缩至糊状约200 ml，加200 ml氯仿萃取，静置过夜。次日摇匀后离心（4 000 r/min，30 min），倒入分液漏斗中，静置2 h，分层倒入大培养皿内，有机溶剂层自然挥干，水层放入60 ℃烤箱内烘干，得氯仿萃取纯化后水相提取物。

凝血时间缩短率＝对照组血凝时间－给药组血凝时间/对照组血凝时间×100%。

1.2.1 局部创面止血试验 待试药设氯仿-水相提取物用药组、生理盐水对照组。敷料制备：取2%氯仿-水相提取物、生理盐水溶液浸泡过的纱布，体表创面止血用2.5 cm×2.5 cm浸有药液纱布2层；肝脏创面止血用1.5 cm×1.5 cm浸有药液纱布2层；股动脉切开止血用1.5 cm×1.5 cm浸有药液纱布4层。

1.2.1.1 体表创面止血 家兔6只，戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉，无菌条件下备皮，在兔背部左右两侧切除3个2 cm×2 cm大小全皮肤层，暴露肌肉层，用手术刀片在肌肉层划“#”制造渗血、出血创面，分别在创面平铺供试药液、生理盐水纱布，约30 s揭开纱布观察出血情况，以后每隔30 s观察1次，观察指标以不出血为止，记录止血时间，观察止血效果，计算其平均止血时间。

1.2.1.2 肝脏创面止血 家兔6只，麻醉、备皮后，无菌下开腹，暴露肝脏，在肝表面切开长1 cm×0.5 cm，深3 mm大小肝组织，造成出血创面，擦去喷出的血液后，分别平放供试药液、生理盐水纱布，观察记录方法同1.2.1.1。

1.2.1.3 股动脉切开试验 家兔6只，麻醉后，钝性分离暴露股动脉，横剪血管周径1/3左右切口，擦去喷出血后，立即在局部分别放置供试药液纱布，稍加压，约1 min揭开纱布观察出血情况，以后每隔30 s观察1次，观察记录方法同1.2.1.1。每次测试后，用37 ℃生理盐水洗去残留药物，使切口重新出血，再测下一种药物。

1.2.2 半数致死剂量（LD_{50}）的测定[4] 将1%曲狗草氯仿-水相提取物过滤，在无菌超净台内抽滤成淡黄色、清亮的无菌溶液，4 ℃冰箱冷藏备用。将昆明种小鼠按曲狗草氯仿-水相提取物不同剂量（100、200、300、400、500、600、800、1 000 mg/kg）分为8组，每组20只。腹腔注射，一次性大剂量（按上述分组给药）用药1次，连续观察7 d。同时取肝肾做HE染色，进行常规组织形态学观察。观察小鼠的食欲、行为活动、对外界反应有无异常以及死亡等情况，特别要观察2 h内的动物中毒症状及死亡原因；计数小鼠死亡只数，计算死亡率，求出半数致死剂量（LD_{50}）。

1.2.3 皮肤刺激性实验[5,6] 将10%曲狗草氯仿-水相提取物抽滤成淡黄色、清亮的无菌溶液，4 ℃冰箱冷藏备用。取体质量2.5～3.0 kg健康家兔12只，分为提取物组和对照组，每组6只，分为完整皮肤和破损皮肤刺激性实验，戊巴比妥钠麻醉后进行手术。每只兔背部两侧先剪后化学法脱毛，范围每侧4 cm×6 cm大小；破损皮肤组每只动物以灭菌手术刀片，在去毛区划“#”字，以划破表皮渗血为度，左侧去毛区涂受试液0.2 ml，右侧涂生理盐水0.2 ml作对照，用消毒纱布覆盖，固定，每只动物分笼饲养，分1次给药和多次给药实验法。

1.2.3.1 急性刺激性实验 给药24 h后，用温水除去残留受试药，去除受试药后1、24、48、72 h肉眼观察，并记录涂抹部位有无红斑和水肿等变化。

1.2.3.2 多次给药刺激性实验 连续敷药7 d。于最后1次敷药24 h后，用温水洗净残留药物，观察去除受试药后1、24、48、72 h涂药部位皮肤情况，进行刺激性反应评分。

1.2.4 皮肤过敏实验[5,6] 取健康豚鼠12只，分为提取物组和对照组，每组6只，分为完整皮肤和破损皮肤过敏实验。破损皮肤组每只动物以灭菌手术刀片，在去毛区划“#”字，以划破表皮渗血为度。致敏接触：涂药方法同皮肤刺激性实验，在实验第1天涂药物持续作用6 h，第7天和第14天各重复1次，这一阶段为致敏接触。激发接触：于末次涂药致敏后第14天，在背部皮下方注射供试液0.02 ml，观察注射部位及周围皮肤反应，有无充血、水肿、硬结、坏死等反应，再次观察皮肤过敏反应情况，这一阶段为激发接触。

观察整个实验期间局部皮肤反应情况（有无发红、红斑及水肿），以及有无特殊情况和变态反应出现；观察动物食欲、行为活动、对外界反应有无异常。根据反应情况评分，求出各组动物平均分，计算出平均总分，不同剂量或不同用药次数的刺激强度进行差异显著性分析。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 11.0统计软件进行方差齐性检验，组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 对家兔局部创面的止血作用的影响

曲狗草氯仿-水相提取物较空白对照组明显缩短局部创面（皮肤、肝脏及股动脉）止血时间（$P<0.01$），见表1。

表1 氯仿-水相提取物对兔局部创面止血时间的影响

（t/s，$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	皮肤	肝脏	股动脉
空白对照组	85.19±3.87	86.1±3.05	109.21±6.27
提取物组	40.99±2.92[a]	54.12±3.42[a]	68.25±4.35[a]

a：$P<0.01$，与空白对照组比较

2.2 半数致死剂量

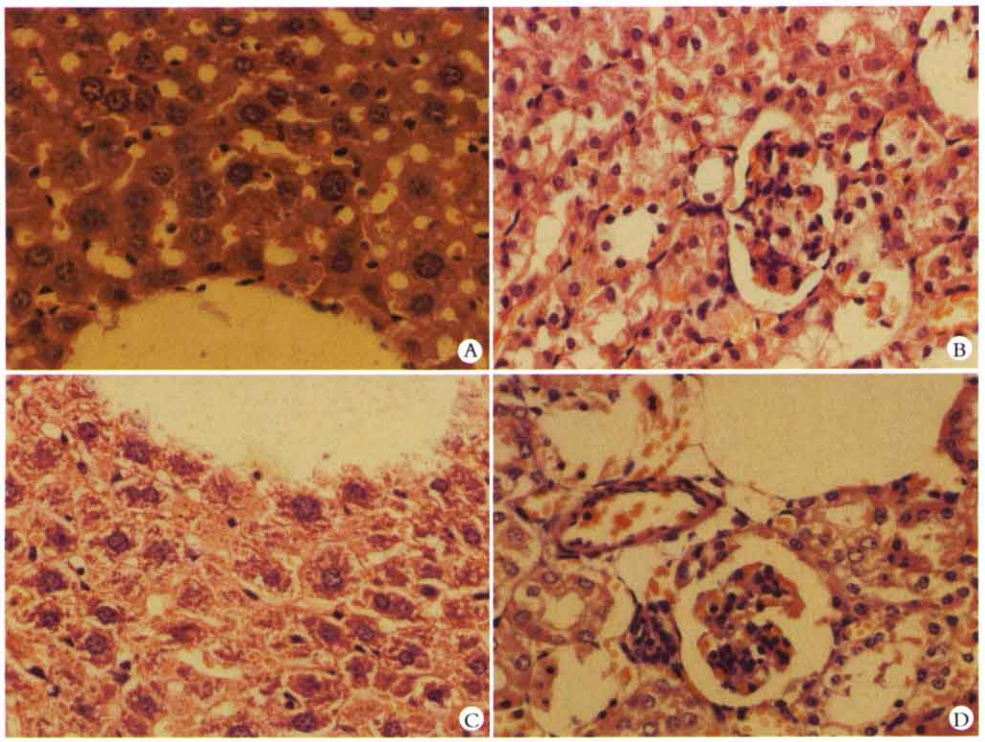
动物用药死亡率：300 mg/kg以下用药，动物死亡率为0；400、500、600、800、1 000 mg/kg用药死亡率分别为20%、50%、90%、100%、100%。由第四军医大学NOSA统计程序统计处理，LD_{50}为483.08 mg/kg。

2.3 肝、肾病理组织形态学观察

300 mg/kg以下用药：小鼠肝肾组织形态学镜下观察正常；300 mg/kg以上用药镜下观察：小鼠的肝细胞有程度不等的肿胀、充血、渗出等炎性表现，大剂量组个别肝小叶可见到局灶性坏死灶，肝脏损害较轻。500 mg/kg以上用药可见肾小球及肾小管上皮细胞嗜酸样变性、坏死，肾小管管腔内可见到管型，肾脏损害较重较肝脏，见图1。

2.4 急性刺激性实验及多次给药刺激性实验

提取物对完整皮肤无刺激性；破损皮肤1次性给药72 h，伤口干燥、结痂；多次给药后72 h，伤口明显脱痂。说明提取物能促进伤口愈合及止血作用，见表2。



A：正常小鼠肝脏；B：正常小鼠肾脏；C：1 000 mg/kg 曲狗草组小鼠肝脏；D：1 000 mg/kg 曲狗草组小鼠肾脏

图 1　小鼠肝、肾病理组织形态学变化　（HE ×400）

表 2　氯仿-水相提取物对家兔皮肤刺激性强度评分（n =6）

组别	一次性给药		多次给药	
	完整皮肤	破损皮肤	完整皮肤	破损皮肤
提取物组	0	0.06 ±0.10[a]	0	0.36 ±0.11[a]
对照组	0	0.28 ±0.92	0	2.10 ±1.10

a：P <0.01，与对照组比较

2.5　皮肤过敏实验

全身反应情况：两组豚鼠饮食、行为活动均正常，无特殊情况和变态反应出现，对外界反应均正常。局部皮肤反应情况：提取物组及对照组豚鼠皮肤无红斑和水肿形成，皮肤反应值皆为 0，致敏率为 0，无过敏反应。10% 曲狗草氯仿-水相提取物溶液对豚鼠皮肤无致敏性。

3　讨论

毒理研究是新药安全性评价的重要项目，为指导临床用药打下了基础。分为全身用药毒性实验、局部用药毒性实验、特殊毒理研究和药物依赖性实验 4 个部分。皮肤刺激实验用以观察皮肤接触药物后产生的刺激反应；皮肤过敏实验用以观察皮肤多次接触药物后机体免疫系统反映在皮肤上的表现。我们进行了全身用药毒性实验（LD_{50} 的测定）和局部用药毒性实验（皮肤刺激实验及皮肤过敏实验），以便进一步探讨曲狗草水相提取物的局部毒性大小。进行毒理实验的测定为其进一步实验研究，及其在将来的临床应用研究、药物剂量的选择及其安全性的评价奠定了基础。

本实验从体外、创面，对曲狗草氯仿-水相提取物进行止血研究；并对其进行初步安全评价；结果表明：其能显著缩短局部创面止血时间，充分体现了它的止血作用；对动物完整皮肤及破损皮肤均无刺激性、过敏性及毒性反应；在 300 mg/kg 以下用药，病理组织形态学观察未见肝、肾等重要脏器的损害；说明本药使用安全可靠，副作用小，毒性低，值得在临床上推广应用，但有待今后进一步的实验及多种动物的验证。本药来源广泛，物美价廉，为药进一步的开发利用奠定了基础。与对照组比较，促凝止血效果显著，有一定的优越性，但有待今后进一步的实验研究。

参考文献：

[1] 王秀琴，伍素华，苏踊跃，等. 部分中草药促凝作用筛选的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(23)：2149－2151.

[2] 王秀琴，伍素华，苏踊跃，等. 一种促凝血草药有效部位的初步确定及其凝血试验的研究[J]. 第三军医大学学报，2004，26(20)：1841－1844.

[3] 中国科学院上海药物研究所. 中药有效成分的提取与分离[M]. 上海：上海科学技术出版社，1983：10－12.

[4] 刘昌孝，孙瑞元. 药物评价实验设计与统计学基础[M]. 北京：军事医学科学出版社，1999：71－93.

[5] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 中药新药研究指南[M]. 北京：人民卫生出版社，1994：209.

[6] 何　映，李继洪，潘经媛，等. 马应龙麝香痔疮栓的临床前安全性评价[J]. 医药导报，2006，25(4)：285－286.

（编辑　龙　亮）