DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.23.026
第26卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 23
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)23-2149-03

论著

部分中草药促凝作用筛选的实验研究

王秀琴,伍素华,苏踊跃,罗向东 (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 从药典已有记载或文献报道凝血效果较好的20多种促凝中草药,筛选出凝血时间最短,促凝效果最好的中草药。方法 用家兔体外凝血实验,对20余种具有止血作用的中药和民间草药初提物及有机溶剂萃取提取物的对比研究,观察了凝血时间(CT)(凝血板法,试管法)、凝血酶原时间(PT)、血浆复钙时间(RT)等指标。结果 发现采自云贵高原的一种多年生草本植物(简称HB)初提物及其氯仿萃取纯化后的水相提取物的凝血时间、凝血酶原时间、血浆复钙时间与空白对照组比较显著缩短($P<0.01$),并且凝血时间比研究中的其它中草药初提物和对比物明显缩短($P<0.01$)。结论 HB及氯仿萃取纯化后的水相提取物有明显的体外促凝血作用,氯仿萃取纯化后的水相提取物是其有效部位。

关键词:中草药;初提物;氯仿萃取水相提取物;凝血时间
中图法分类号:R282.71;R284 文献标识码:A

Experimental study and screening of some procoagulant herbs

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

Abstract: Objective To screen the herbs with rapid procoagulant effect from 20 kinds of herbs listed in the pharmacopeia and reported by other researchers. Methods Original extracts of more than 20 kinds of herbs were used in rabbit blood coagulation experiments. The coagulation time (CT), prothrombin time (PT), and recalcification time (RT) of the original extracts and organic solvent extracts from 20 kinds of herbs were investigated and compared. Results The CT, PT, AND RT of the original extracts and water-chloroform extracts from a kind of perennial herb (HB) on *Yunnan-Guizhou* plateau were shorter than those of the empty controls ($P<0.01$). The PT of the original extract from HB was significantly shorter than that of other herbs and controls ($P<0.01$). Conclusion HB extract and water-chloroform extract have obvious procoagulant effect *in vitro*. The water-chloroform extract from HB might be the effective fraction of this herb.

Key words: traditional Chinese medicine; original extract; water-chloroform extract; clotting time

我国地大物博,中草药具有悠久的历史。研制一种迅速止血,安全、经济、方便的中药创面止血药物和止血敷料,无论在平时的临床应用还是战时的现场急救,均具有重要的应用价值。HB(本研究从20多种促凝血草药中筛选出的一种草药的简称)采自云贵高原的一种多年生草本植物,性苦、涩、平,其根茎可入药,具有清热解毒、活血、通经、止痛的功效,常用于跌打损伤、骨折等伤病的治疗,但目前尚少见对其进行凝血等药效学方面的实验研究报道。本研究通过家兔体外凝血实验对20余种中草药进行筛选和比较研究,在出产自云贵高原的一种草本植物中,筛选到了具有快速凝血的有效部位,我们将在以后的研究中进一步研究其作用的有效成分和快速止血作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 家兔24只,体质量2.5~3.0 kg,雌雄兼用,由本院动物所提供。

1.1.2 药物 仙桃草、仙鹤草、白芨、血竭粉、三七粉、蒲黄粉、大、小蓟、血余、仙鹤草、侧柏叶、艾叶、地榆、白茅根购于沙坪大药房;槐花、紫珠草、茜草购于重庆市中药材市场;HB(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(北京医用离心机厂)、电热恒温水浴槽由本所提供;凝血活酶购于重庆亚中公司;氯仿、正丁醇、乙酸乙酯、已醚等有机溶剂由本院试剂中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 初提物的制备

各取中草药生药500 g用自来水反复冲洗若干遍后,再用

作者简介:王秀琴(1970-),女,河北省承德市人,硕士研究生,主管护师,主要从事止血生物敷料方面的研究。电话:(023)65398407
通信作者:罗向东;E-mail:luoxd@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-09-10;修回日期:2004-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10倍量蒸馏水反复漂洗5~6遍,阴干,粉碎过筛即得粗粉。称取粗粉10 g,进行以下3种提法的提取:①水提法[1]:取粗粉10 g,加100 ml蒸馏水,在50~60 ℃的水浴上加热1 h,过滤,离心后取上清,置入60 ℃烤箱内烘干,取结晶物,称重,得率。②醇提法[1]:取粗粉10 g,加100 ml 95%乙醇,在水浴上回流1 h,过滤,离心后取上清,置入30~40 ℃烤箱内烘干,取结晶物,称重,得率。③石油醚提法[1]:取粗粉10 g,加100 ml石油醚(沸程:60~90 ℃),放置2~3 h。过滤,滤液放在表面皿上,让石油醚挥发掉,取固形物,称重,得率。

1.2.2 凝血作用的实验观察

1.2.2.1 M/40氯化钙溶液 无水氯化钙1.11 g,去离子水加至400 ml。

1.2.2.2 抗凝血液的制备 用一次性真空枸橼酸钠(9∶1)抗凝管(血与抗凝剂按9∶1)自兔子耳缘静脉抽血,轻轻混匀即成。

1.2.2.3 抗凝血浆的制备 抗凝血液经离心制备,离心力3 000 r/min,15 ℃,离心30 min。

1.2.2.4 药液的制备 各取提取物0.25 g,溶于50 ml去离子水,配制成0.5%浓度,经一次性进口滤器抽滤成不同色泽,清亮的提取液,用此溶液进行凝血实验。

1.2.2.5 各中草药对家兔体外凝血时间(CT)的影响

凝血板法[2]:在一次性凝血板的凹坑内,加入各药液0.1 ml,再分别加入M/40的氯化钙溶液0.1 ml,用大头针把药液与氯化钙溶液混匀,最后分别同时加入抗凝血液0.5 ml,立即计时,迅速用大头针搅拌混匀且搅拌次数一致。以三七为阳性对照,并设空白对照,不加药液。以后每30 s用大头针穿过血液轻挑1次,当出现血丝时为开始凝血,当推动血块时,露出凝血板底即算血液完全凝固。从加入抗凝血液到血液完全凝固时间为凝血时间。每药重复实验6次,取其平均值。

试管法[2]:取内径为8 mm的玻璃洁净试管,每管分别加入上述各药液0.1 ml,再加入M/40的氯化钙溶液0.1 ml;摇匀后于各管内同时加入兔血0.5 ml,以三七为阳性对照;并设空白对照,盖紧,倒转3次,立即计时,在37 ℃的水浴箱中观察,每隔30 s轻轻倾斜试管1次,观察有无凝血。从加入兔血开始计时,到倾斜试管血块凝固于管底而不流动时为止,即为凝血时间,每药重复实验6次,取其平均值。

凝血酶原时间(PT)时间的测定[2]:各取抗凝血浆0.1 ml,加入内径为8 mm的玻璃洁净试管中,再加入凝血活酶试剂0.1 ml,于各管中加入药液0.1 ml,混匀后置37 ℃水浴中。再加入M/40的氯化钙溶液0.1 ml(也可先将凝血活酶试剂与$CaCl_2$溶液等量混合后加入0.2 ml)。立即混匀并开动秒表,试管仍浸于水浴中,至约10 s时取出,不断倾斜试管或用特制塑料小钩挑动此混合液,观察有无纤维蛋白形成。一旦见到纤维蛋白,立即停表记录时间,以三七为阳性对照,并设空白对照。每种药物重复6次,求其平均值。

复钙时间(RT)的测定[3]:方法:取药液0.1 ml分别放入内径为8 mm的玻璃洁净试管内,于各试管内分别加入0.1 ml M/40氯化钙溶液,摇匀,于各管内同时加入0.1 ml的去钙血浆(在37 ℃水浴中进行),同时开动秒表计时,每隔30 s倾斜试管1次,在混和液中开始出现弥漫的白色颗粒纤维蛋白丝时,即为复钙时间。以三七为阳性对照,并设空白对照,每种药物重复6次,取其平均值。

1.2.3 水提萃取物的制备及其凝血实验的观察 通过以上实验,水提法凝血效果较好,为此对凝血效果较好的HB、紫珠、三七等各中药生药水提物进行氯仿、正丁醇、乙酸乙酯、已醚等有机溶剂萃取。

1.2.3.1 水提物的制备[1,4] 称取HB、紫珠草、三七粗粉10 g,放入烧瓶内,用150 ml去离子水室温下浸泡4~6 h,置入80 ℃的水浴箱内热浴1 h,过滤,取上清;渣子再用100 ml去离子水热浴1 h,过滤,取上清;渣子再用60 ml去离子水热浴1 h,过滤,取上清;合并3次滤液,离心(6 000 r/min,30 min,25 ℃),取上清;旋转蒸发浓缩至糊状约80 ml,测其pH值为5.78;加4倍量体积95%乙醇搅拌均匀,滴加1% NaOH溶液调至pH值为8,密闭静置过夜。离心,上清液在室温下蒸发掉乙醇至无醇味,水溶液置0~4 ℃冷藏24 h,离心,上清液旋转蒸发浓缩成糊状约100 ml,80 ℃干燥得棕褐色结晶物,用研钵研碎即得。

1.2.3.2 萃取提取物的制备[1,4] 取HB、紫珠草、三七上述初提物适量,加同体积的去离子水和有机溶剂,置入小口默口瓶内,振摇数次,充分混匀、溶解、饱和2 h后,静置过夜。离心(3 000 r/min,30 min)去掉乳化现象,置于萃取瓶内,静置2 h,分别分出有机溶剂层及水层分别放入培养皿内,有机溶剂层自然挥干,水层放入60 ℃烤箱内烘干即得萃取水相提取物。

1.2.3.3 凝血时间的测定 取HB、紫珠、三七有机相层及水相层提取物0.25 g,溶于50 ml去离子水,配制成0.5%浓度,经一次性进口滤器抽滤成不同色泽,清亮的提取液,用此溶液进行上述4种凝血时间(凝血板法,试管法、凝血酶原时间、血浆复钙时间)的测定。

1.3 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS10.0统计软件,两组间比较用t检验,多组间比较采用多因素方差分析。

2 结果

2.1 各中草药初提物对家兔体外凝血时间的影响结果

见表1~3,20多种中草药3种提法初提物经过4种凝血时间的测定,结果表明:HB、三七、紫珠有体外凝血作用,且水提法较其它两种提法体外凝血效果较好;其它中草药凝血时间均大于对照组,或没有促凝作用,甚至有溶血现象。其中HB初提物的凝血时间(凝血板法、试管法)PT、RT及凝血时间缩短率与空白对照组相比有显著性差异($P<0.01$),并且凝血时间比其它中草药初提物明显缩短,且水提物促凝效果最好。

表1 水提物对家兔凝血时间的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of water extract from HB on coagulation time in rabbits ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Coagulation method (s)	Tube method (s)	Prothrombin time (s)	Recalfication time (s)	Shortened rate (%)
Blank	280.01±7.51**	300.11±9.10**	18.06±0.84**	240.06±1.18**	
Sanchi	308.12±8.34**	295.16±7.33**	20.24±0.93**	270.42±8.05**	1.6
HB	90.02±8.82	100.08±13.01	10.15±0.80	97.07±5.20	67
Callicarpa Pedunculata	248.37±8.94**	270.23±7.83**	18.35±0.67**	-	10

**: $P<0.01$, *vs* HB

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　醇提物对家兔凝血时间的影响(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of ethanol extract from HB on coagulation time in rabbits (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Coagulation method (s)	Tube method (s)	Prothrombin time (s)	Recalfication time (s)	Shortened rate (%)
Blank	280.00±7.51 **	300.11±9.10 **	18.06±0.84 **	240.06±1.18 **	
Sanchi	300.17±0.78 **	283.25±0.75 **	20.01±0.71 **	236.10±0.79 **	5.6
HB	119.75±0.55	126.89±0.74	10.67±0.71	81.74±0.56	57.3
Calliarpa Pedunculata	263.79±0.54 **	279.84±0.51 **	20.86±0.45 **	289.89±0.56 **	6.7

**: $P<0.01$, *vs* HB

表 3　石油醚提取物对家兔凝血时间的影响(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effects of petroleum ether extract from HB on coagulation time in rabbits (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Coagulation method (s)	Tube method (s)	Prothrombin time (s)	Recalfication time (s)	Shortened rate (%)
Blank	280.00±7.51 **	300.11±9.10 **	18.06±0.84 **	240.06±1.18 **	
Sanchi	285.88±0.46 **	287.88±0.59 **	22.87±0.68 **	239.89±0.55 **	7.1
HB	136.04±0.75	131.73±0.63	12.98±0.61	86.92±0.63	57.4
Calliarpa Pedunculata	276.04±0.79 **	286.91±0.59 **	19.86±0.56 **	259.86±0.63 **	7.4

**: $P<0.01$, *vs* HB

2.2　各中草药有机溶剂萃取提取物对家兔体外凝血时间的影响

HB、三七、紫珠草 3 种水提物通过 4 种有机溶剂的再次萃取, 通过家兔体外凝血实验, 对获得的萃取提取物进行进一步筛选。结果表明: 三者的氯仿萃取纯化后的水相提取物均有促凝血作用, 但 HB 氯仿萃取纯化后的水相提取物的凝血时间明显短于空白对照组及三七、紫珠的水相提取物($P<0.01$), 且凝血时间缩短率也明显高于空白对照组的 30% 以上, HB 氯仿萃取纯化后的水相提取物有明显的体外促凝作用(表 4)。

表 4　氯仿萃取水相提取物对家兔凝血时间的影响(n=6, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of water-chloroform extract from HB on coagulation time in rabbits (n=6, $\bar{x}\pm s$)

Group	Coagulation method (s)	Tube method (s)	Prothrombin time (s)	Recalfication time (s)	Shortened rate (%)
Blank	270.01±9.83 **	302.12±8.68 **	20.00±0.73 **	230.24±4.08 **	
Sanchi	278.14±12.13 **	290.32±8.68 **	19.5 ±0.89 **	231.21±0.88 **	3.97
HB	80.09±8.59	88.23±8.62	5.01±0.55	50.06±4.08	70.86
Calliarpa Pedunculata	260.11±2.58 **	285.23±1.83 **	22.03±0.59 **	210.04±1.61 **	5.6

**: $P<0.01$, *vs* HB

3　讨论

凝血时间(CT): 是指血液自离体至凝固所需时间, 大部分是内源性凝血活酶生成所需时间, 其长短与第Ⅷ、Ⅳ、Ⅺ等因子关系很大。测定凝血时间是观察受试药物对凝血机制有无影响的必须实验。本研究 HB 及其氯仿萃取纯化后的水相提取物 CT 均较对照组明显降低, 说明 HB 是通过影响内源性凝血系统起到促凝作用。

凝血酶原时间(PT): 能够准确、有效地反映外源性凝血系统。结果表明: HB 及其氯仿萃取水相提取物 PT 均较对照组明显缩短, 说明 HB 是通过影响外源性凝血系统起到促凝作用。

复钙时间(RT): 由于抗凝剂与血浆中的钙结合, 使凝血过程中断, 在血浆中加入适量的钙以后, 血液的凝固过程即继续进行 。HB 及其氯仿萃取水相提取物使复钙时间明显缩短, 说明其有体外促凝作用。

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%。一般以药物凝血时间比空白对照组缩短 30%以上者认为有效, 结果表明: HB 3 种提法初提物及其萃取物凝血时间缩短率都高于 30%, 凝血时间明显短于对照组, 但以水提法缩短程度最高; 凝血时间最短, 当加入抗凝血液时 HB 立即形成微小凝块, 于 1 h 40 min 左右完全凝固; 三七、紫珠草及其萃取水相提取物凝血时间缩短率低于 30%; 其它中草药有不凝, 甚至溶血现象。

中草药水提物制备中, 加高浓度乙醇可沉淀水提取带入的树脂、蛋白质等共存物质, 调节 pH 值至 8 是为了增加酚类物质的溶解度; 0~4 ℃冷藏可沉淀除去脂溶性物质[5]。为了验证实验结果, 又对其水提物采用(氯仿—水)两相溶剂萃取进行凝血实验研究。萃取的目的: 去掉杂质, 进一步分离纯化(提纯), 得到更纯的有效部位。

本研究对 HB、三七、紫珠草等 20 多种中草药 3 种提法初提物, 通过家兔体外凝血实验研究, 初步筛选出 HB、三七、紫珠草的水提法比其它两种提法的凝血效果好; 又对 HB、三七、紫珠草水提物及其 4 种有机溶剂萃取提取物进行体外凝血实验比较研究, 又筛选出 HB、三七、紫珠草水提法氯仿萃取水相提取物比其它有机溶剂萃取提取物体外凝血效果好, 且 HB 水提法氯仿萃取水相提取物体外凝血效果最好, 凝血时间明显短于对照组及凝血时间缩短率明显高于对照组($P<0.01$), 说明 HB 氯仿萃取纯化后的水相提取物有明显的体外促凝作用, 而且萃取后水相提取物的凝血时间比萃取前缩短更明显, 因此可说明氯仿萃取纯化后的水相提取物是 HB 止血有效部位。

参考文献:

[1] 中国科学院上海药物研究所编著. 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.

[2] 徐叔云, 卞如濂, 陈　修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 1016—1018.

[3] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 493—505.

[4] 肖崇厚. 中药提取鉴定原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981. 60—66.

[5] 王秀琴, 伍素华, 苏踊跃, 等. 一种促凝血草药有效部位的初步研究及其凝血实验的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(20): 1841—1844.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net