

蓝萼甲素抗凝血作用研究^{*}

马占强¹, 王 敏¹, 张 健², 傅 强^{1△}, 马世平^{1△}

(1. 中国药科大学中药学院, 江苏南京 211198; 2. 苏州大学药学院, 江苏苏州 215123)

〔摘 要〕目的: 研究蓝萼甲素抗凝血作用。方法: 测定蓝萼甲素对小鼠毛细管凝血时间和尾尖出血时间的作用; 测定蓝萼甲素对小鼠凝血酶时间 (TT)、凝血酶原时间 (PT)、活化部分凝血激酶时间 (APTT)、血浆复钙时间 (PRT) 的影响。测定蓝萼甲素对家兔体外 TT、PT、APTT 和 PRT 的影响。结果: 蓝萼甲素能显著延长小鼠毛细管凝血时间和尾尖出血时间; 显著延长小鼠 TT、PT、APTT 和 PRT。蓝萼甲素在体外显著延长家兔 TT、APTT 和 PRT。结论: 蓝萼甲素具有抗凝血活性。

〔关键词〕蓝萼甲素; 抗凝血; 凝血酶时间; 凝血酶原时间; 活化部分凝血激酶时间; 血浆复钙时间

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2011)03—0026—04

蓝萼甲素 (glaucocalyxin A) 是从唇科香茶菜属植物香茶菜 [*Isodon japonica* (Burrm F) Hara var *glaucocalyx* (Maxim) Hara] 中提取分离出的一个二萜化合物^[1]。蓝萼香茶菜为民间药, 性味苦、寒, 具有健胃、清热解毒、活血、抗菌消炎等活性。现代药理研究表明, 蓝萼香茶菜的乙醇提取液能减轻心肌缺血—再灌注损伤, 保护心肌; 蓝萼甲素可以通过抗血小板作用起到活血、心肌保护作用, 如可抑制卡西霉素刺激的兔血小板生成血小板活化因子, 能抑制花生四烯酸诱导的兔血小板血栓素 A₂ 生成, 并同时升高前列腺素 E₂, 能显著抑制 ADP、AA 和 PAF 等诱导的兔血小板聚集, 显著升高血小板内 cAMP 水平, 能增加机体对⁸⁶Rb 的吸收, 而且有改善微循环作用^[2-7]。但蓝萼甲素能否通过其他途径产生活血作用, 罕见报道, 本文采用体内和体外相结合的实验方法, 对蓝萼甲素抗凝血作用进行了研究。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

蓝萼甲素 (纯度 ≥ 98%, HPLC) 苏州利元医药科技有限公司提供, 动物给药用 0.5% CMC - Na 配制, 体外实验用 DMSO 助溶, 反应体系中 DMSO 终浓度为 0.1%。阿司匹林肠溶片 (批号:

H32026500), 南京白敬宇制药有限责任公司, 动物给药用 0.5% CMC - Na 配制。肝素 (150U/mg, 批号: 091123), 南京图赛生物科技有限公司, 用蒸馏水配制。凝血酶原时间 (PT) 试剂盒 (编号: YZB/沪 0556 - 40 - 2009)、活化部分凝血激酶时间 (APTT) 试剂盒 (编号: YZB/沪 0555 - 40 - 2009) 和凝血酶时间 (TT) 试剂盒 (编号: YZB/沪 0558 - 40 - 2009), 上海太阳生物制品有限公司。

1.2 动物

家兔, 体重 2.5kg, 南京市江宁区青龙山动物繁殖中心提供, 实验动物生产许可证: SCXK (苏) 2007 - 0008; ICR 小鼠, 体重 18 ~ 22g, 扬州大学动物繁殖中心提供, 实验动物生产许可证: SCXK (苏) 2007 - 0001。

1.3 仪器

HH - 4 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司), 纯水机 (Hi - tech Instruments Co., Ltd), 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司), 台式高速冷冻离心机 (Sigma, 美国)。

2 方法

2.1 小鼠凝血时间 (CT) 的测定

取雄性 ICR 小鼠, 选基础生理凝血时间在 40

* 收稿日期: 2010—12—20 修回日期: 2011—03—14

作者简介: 马占强 (1984 ~), 男, 山东潍坊人, 2008 级硕士研究生, 研究方向为中药药理学。△通信作者: 傅强, E - mail: fuqiang@cpu.edu.cn; 马世平, E - mail: spma@cpu.edu.cn

~160s者用于实验,根据基础凝血时间随机分为5组,每组10只,空白组按0.1mL/10g灌胃生理盐水,其余各组均按等体积灌胃相应的药液,分别给蓝萼甲素低剂量4mg/kg、中剂量8mg/kg、高剂量16mg/kg和阿司匹林50mg/kg,每天给药1次,连续给药7d。小鼠于末次给药前禁食不禁水12h,末次给药后1h按毛细管法测小鼠凝血时间(用长10cm、内径1mm的玻璃毛细管插入小鼠眼内眦后静脉丛中,深约4~5mm,轻轻转动,自血液注满开始计时,取出毛细管平放于桌上,每隔约15s折断一端约0.5cm,并缓慢向左右拉开,观察折断处出现凝血丝所需时间)。

2.2 小鼠尾尖出血时间的测定

雄性ICR小鼠50只,随机分为5组,每组10只,给药方法和剂量同2.1。各组动物禁食12h,然后分别给药1次。于灌胃后57~59min,将小鼠置于固定器中,使其尾部垂直,至灌胃后第60min,在距尾尖3mm处剪断鼠尾,每隔30s用滤纸轻吸尾尖血液,直至吸不出血液,记录断尾至出血停止时间间隔,即为出血时间。

2.3 小鼠凝血功能的测定

2.3.1 小鼠凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血激酶时间(APTT)的测定

雄性ICR小鼠50只,随机分为5组,每组10只,给药方法和剂量同2.1。动物每天给药1次,连续给药7d。小鼠末次给药前禁食不禁水12h,于末次给药1h后摘眼球取血,取血约0.9mL,加入装有0.1mL 3.8%枸橼酸钠抗凝剂的试管中,混匀,3 000 r/min离心15min,得贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP),置冰浴中备用。用凝固比浊法测定TT、PT和APTT。

2.3.2 血浆复钙时间(PRT)的测定

雄性ICR小鼠50只,随机分为5组,每组10只,给药方法、剂量、周期及取血方法同2.3.1,血液与抗凝剂混匀后1 000r/min离心10min,得富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP),置冰浴中备用。酶标板置37℃水面上,每孔加入混合血浆100μL,温育1min,迅速加入37℃预温0.025mol/L氯化钙溶液100μL立即混匀,加氯化钙时开动秒表,每隔10s以钢丝轻轻向上挑动,至生成固体细丝即纤维蛋白终止计时,重复以上操作2次,自加钙至纤维蛋白形成的时间即为PRT^[8]。

2.4 家兔体外凝血的测定

2.4.1 家兔体外凝血酶时间(TT)测定

雄性家兔耳正中动脉取血3.6mL,迅速加入装有0.4mL 3.8%枸橼酸钠的离心管中,混匀,3 000 r/min离心10min,得贫血小板血浆,置冰浴中备用。依试剂盒方法,酶标板置37℃水面上,每孔先加入待测血浆50μL,再分别加入蓝萼甲素低、中、高浓度溶液(终浓度分别为0.2、0.4和0.8mmol/L,用DMSO助溶)及肝素溶液(终浓度为50U/mL)各50μL,混匀,温育1min,迅速加入37℃预温的凝血酶溶液100μL,立即混匀,加酶时开动秒表,4s后,每隔2s向上挑动,至生成固体细丝终止计时。重复以上操作3次,取平均值,即为凝血酶时间,另以等量终浓度为0.1% DMSO代替待测样品为对照。

2.4.2 凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血激酶时间(APTT)的测定

血浆制备及加药处理同2.4.1,依试剂盒说明书的方法,测定凝血酶原时间和活化部分凝血激酶时间。

2.4.3 血浆复钙时间(PRT)的测定

取血及加抗凝剂方法同2.4.1,血液与抗凝剂混匀后1 000r/min离心10min,得富血小板血浆,置冰浴中备用。酶标板置37℃水面上,每孔加入混合血浆50μL,分组及加药方法同2.4.1,加药后混匀,温育1min,迅速加入37℃预温0.025mol/L氯化钙溶液100μL立即混匀,加氯化钙时开动秒表,1min后每隔10s以钢丝轻轻向上挑动,至生成固体细丝即纤维蛋白终止计时,重复以上操作2次,自加钙至纤维蛋白形成的时间即为血浆复钙时间。

2.5 统计学处理

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单向方差分析法(ANOVA)对实验数据进行统计分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠凝血时间(CT)的影响

结果见表1,与正常对照组比较,蓝萼甲素剂量依赖性延长小鼠凝血时间,在剂量为4、8和16mg/kg时均有统计学意义。与正常对照组比较,阿司匹林50mg/kg显著延长小鼠凝血时间。

表 1 蓝萼甲素对小鼠凝血时间（CT）的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg/kg)	CT/s
正常对照	—	78.88 ± 19.72
阿司匹林	50	179.63 ± 31.78 *
蓝萼甲素	4	116.00 ± 35.04 *
蓝萼甲素	8	137.00 ± 29.05 *
蓝萼甲素	16	149.88 ± 20.95 *

* $P < 0.05$ ，与正常对照组比较

3.2 对小鼠尾尖出血时间的影响

结果见表 2，与正常对照组比较，蓝萼甲素剂量依赖性延长小鼠尾尖出血时间，在剂量为 8、16mg/kg 时具有统计学意义。与正常对照组相比较，阿司匹林 50mg/kg 显著延长小鼠尾尖出血时间。

表 2 蓝萼甲素对小鼠尾尖出血时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg/kg)	出血时间/s
正常对照	—	215.38 ± 98.43
阿司匹林	50	697.88 ± 196.01 *
蓝萼甲素	4	315.22 ± 141.19
蓝萼甲素	8	416.25 ± 189.69 *
蓝萼甲素	16	591.89 ± 148.52 *

* $P < 0.05$ ，与正常对照组比较

3.3 对小鼠凝血功能的影响

结果见表 3，与正常对照组比较，蓝萼甲素剂量依赖性延长小鼠 TT、APTT 和 PRT，在剂量为 4、8、16mg/kg 时，对 TT、APTT 和 PRT 的延长作用均有统计学意义。与正常对照组比较，蓝萼甲素剂量依赖性延长小鼠 PT，在剂量为 8、16mg/kg 时有统计学意义。与正常对照组相比较，阿司匹林 50mg/kg 显著延长小鼠 TT、PT、APTT 和 PRT。

表 3 蓝萼甲素对小鼠凝血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg/kg)	TT/s	PT/s	APTT/s	PRT/s
正常对照	—	18.15 ± 0.89	14.15 ± 0.56	31.41 ± 2.70	67.29 ± 8.40
阿司匹林	50	21.50 ± 1.26 *	18.08 ± 1.05 *	38.69 ± 2.39 *	85.81 ± 11.43 *
蓝萼甲素	4	19.64 ± 1.24 *	14.77 ± 0.74	34.84 ± 2.39 *	76.04 ± 6.03 *
蓝萼甲素	8	20.72 ± 1.07 *	15.12 ± 0.88 *	36.42 ± 1.42 *	81.65 ± 4.37 *
蓝萼甲素	16	21.04 ± 1.21 *	16.77 ± 0.94 *	38.98 ± 2.89 *	83.97 ± 8.89 *

* $P < 0.05$ ，与正常对照组比较

3.4 蓝萼甲素对家兔体外凝血的影响

结果见表 4，与正常对照组比较，蓝萼甲素浓度依赖性延长家兔 TT、APTT 和 PRT，在浓度为 0.2、0.4、0.8mmol/L 时，对 TT 的延长作用具有

统计学意义，在浓度为 0.4、0.8mmol/L 时，对 APTT 和 PRT 的延长作用具有统计学意义。与正常对照组相比较，肝素 50U/mL 显著延长家兔 TT、PT、APTT 和 PRT。

表 4 蓝萼甲素对家兔体外凝血功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	浓度/(mmol/L)	TT/s	PT/s	APTT/s	PRT/s
正常对照	—	18.02 ± 1.28	15.27 ± 0.76	31.58 ± 3.17	69.38 ± 8.03
肝素	50U/mL	22.22 ± 1.86 *	18.21 ± 0.97 *	41.14 ± 4.17 *	85.89 ± 10.82 *
蓝萼甲素	0.2	19.44 ± 1.48 *	15.28 ± 1.07	34.33 ± 3.56	75.15 ± 8.62
蓝萼甲素	0.4	20.55 ± 1.53 *	15.63 ± 0.87	35.31 ± 3.43 *	82.07 ± 8.36 *
蓝萼甲素	0.8	21.16 ± 1.68 *	15.91 ± 0.87	38.71 ± 3.42 *	85.41 ± 8.29 *

* $P < 0.05$ ，与正常对照组比较

4 讨论

人体内凝血系统和抗凝系统处于一个动态平衡的状态,过度凝血会导致心肌梗死、脑血栓等严重疾病^[9]。在血栓形成过程中,血小板活化与凝血系统激活具有重要作用,两者在体内紧密联系,凝血系统激活后产生的凝血酶,是一个强有力的血小板活化因子,血小板活化后又将促进凝血过程。抗血栓治疗主要针对凝血系统和血小板两个环节,分别称为抗凝治疗和抗血小板治疗。目前临床上常用的抗凝血药主要包括肝素类和香豆素类等,抗血小板药物最常用的是阿司匹林。肝素类药物通过促进凝血酶Ⅲ对含有丝氨酸残基的已经活化的凝血因子Ⅱa、Ⅸa、Ⅹa、Ⅺa、Ⅻa的灭活,产生强大的抗凝血作用,但肝素类药物不能口服给药,不便于患者用药。香豆素类药物与维生素K结构相似,通过拮抗维生素K的利用,抑制凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ在体内的合成,产生抗凝血作用,香豆素类药物可以口服给药,但起效慢,且在体外没有抗凝血活血。阿司匹林可抑制环氧酶活性,抑制血小板花生四烯酸代谢产生血栓素A₂,产生抗血小板活性。此外,阿司匹林还抑制凝血酶原在肝内的合成,具有抗凝血作用^[10-11]。

血液凝固有内源性和外源性两条凝血途径,APTT和PT是临床凝血功能检测中最常用的两个参数,其中APTT主要用于检测机体的内源性凝血系统,其延长或缩短分别反映凝血因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅷ、Ⅹ、Ⅺ和Ⅻ的血浆活性降低或增加,PT则主要用于检测机体的外源性凝血系统,其延长或缩短分别反映凝血因子Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ和Ⅹ的血浆活性降低或增加^[12]。为探讨蓝萼甲素的抗凝血作用机制,本文研究了其对小鼠毛细管凝血时间和尾尖出血时间的影响,并检测了其在体内和体外对TT,PT,APTT和PRT的影响,以确定其在体内和体外抗凝血作用的差异。研究结果显示,蓝萼甲素能显著延长小鼠毛细管凝血时间和尾尖出血时间,具有抗凝血活性。体内给药抗凝血实验结果表明,蓝萼甲素能显著延长小鼠APTT和PRT,提示其能通过干扰内源性凝血因子活性,使纤维蛋白的生成受到抑制,TT的显著延长,显示纤维蛋白原向纤维蛋白的转变受到了抑制。体内给药抗凝血实验结果还显示,蓝萼甲素也能显著延长PT时间,说明其对外源性凝血途径也有一定的抑制作用。蓝萼甲素的家兔体

外抗凝血作用结果显示,蓝萼甲素能延长APTT、TT和PRT,但对PT无显著作用,表明蓝萼甲素在体外主要是通过抑制内源性凝血途径产生抗凝血作用的。

此前的文献报道,蓝萼甲素具有较强的抗血小板活性^[2],本文的研究发现,蓝萼甲素还可以通过抗凝血机制参与香茶菜的活血效应,这与阿司匹林的作用特点相似。此外,蓝萼甲素在体内和体外均具有抗凝血活性,并且可以口服给药,这与临床上常用的肝素类和香豆素类抗凝药相比具有一定的优势,值得对其抗凝血的作用机制和临床应用做进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 许云龙,孙西昌,孙汉董,等. 蓝萼甲素和蓝萼乙素的化学结构[J]. 云南植物研究,1981,3(5):283-285.
- [2] Zhang B, Long K, Jiang Y Y. Effects of glaucocalyxin A on PAF biosynthesis and arachidonic acid metabolism in washed rabbit platelets[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 1992, 6(1): 52-55.
- [3] Zhang B, Long K. Effects of glaucocalyxin A on aggregation and cAMP levels of rabbit platelets in vitro[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1993, 14(4): 347-350.
- [4] 刘兰娣,叶丽卡,潘东军. 蓝萼香茶菜对大鼠全心缺血-再灌注时心肌c-fos基因表达的影响[J]. 中国中药杂志,2003,28(4):358-361.
- [5] 曹露晔,陈子君. 蓝萼香茶菜研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2004,25(3):42-43.
- [6] 金忠民,沙伟,胡修茵. 蓝萼香茶菜提取液抑菌作用研究[J]. 广西科学,2007,14(2):160-162.
- [7] 王慧芬,愈慧然,马国芝. 高效液相色谱法测定蓝萼甲素含量[J]. 解放军医学杂志,1990,15(2):82-84.
- [8] 臧宝霞,吴伟,李蔚然,等. 硅胶吸附法制备红花总黄色素抗凝血作用的实验研究[J]. 中国药理学杂志,2002,37(2):106-109.
- [9] Gardell, S J. Sanderson, P E. Novel anticoagulants based on direct inhibition of thrombin and factor Xa[J]. Coronary artery disease, 1998, 9(2): 75-81.
- [10] 高捷. 阿司匹林的临床进展[J]. 宁波工程学院学报,2005,17(2):54-56.
- [11] 陈俊,何雄平,郑美琴. 阿司匹林对凝血检测项目的影响[J]. 江西医学检验,2003,21(4):297.
- [12] 汤鲁宏,邓超,林丹,等. 霞水母提取物抗凝血作用的初步研究[J]. 天然产物研究与开发,2010,22(3):490-492.

(编辑:迟越)

(英文摘要见第39页)