

蒲黄的抗血栓有效部位筛选

何国林¹, 周卫军², 王羚郦^{1*}, 李远彬³, 强皎¹, 陈燕燕¹

(1. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006; 2. 广东省食品药品监督管理局, 广州 510080;
3. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

[摘要] 目的: 确定蒲黄抗血栓作用的主要活性部位。方法: 对蒲黄不同提取部位(石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、水)对体外血小板聚集作用进行筛选, 进一步研究蒲黄活性部位对胶原蛋白-肾上腺素和角叉菜胶诱发小鼠体内血栓形成的影响, 蒲黄有效部位对大鼠体内血栓模型及血管壁的作用。结果: 蒲黄乙酸乙酯部位对花生四烯酸、二磷酸腺苷、胶原、凝血酶诱发家兔体外血小板聚集的抑制率分别为 40.08%、33.09%、37.91%、34.71%, 水部位则为 29.29%、28.65%、28.33%、32.29%; 而蒲黄乙酸乙酯部位对胶原蛋白-肾上腺素诱发小鼠死亡和偏瘫的保护率为 50%, 对角叉菜胶诱发小鼠黑尾发生率为 50%; 同时乙酸乙酯部位可明显抑制大鼠体内血栓的形成, 并对血管内皮有明显的保护作用。结论: 初步认为乙酸乙酯部位为蒲黄抗血栓作用的主要活性部位。

[关键词] 蒲黄; 抗血栓作用; 活性部位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0138-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100138

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000082.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:51

Screening Test for Effective Fraction of Antithrombotic Action from Typhae Pollen

HE Guo-lin¹, ZHOU Wei-jun², WANG Ling-li^{1*}, LI Yuan-bin³, QIANG Jiao¹, CHEN Yan-yan¹

(1. School of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;
2. Guangdong Provincial Food and Drug Administration, Guangzhou 510080, China;
3. Dongguan Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine and Guangzhou University of
Traditional Chinese Medicine, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To ascertain the main active site of Typhae Pollen in effect of antithrombosis.

Method: Screening for effect of platelet aggregation *in vitro* from the different extracts of Typhae Pollen (petroleum ether, ethyl acetate, butanol, water) was carried out, further study the effects of the active sites of Typhae Pollen on the collagen-adrenaline and carrageenan induced thrombosis of mice. Effect of effective parts of Typhae Pollen for the rats of thrombosis and vascular wall *in vivo*. **Result:** The ethyl acetate parts of Typhae Pollen on arachidonic acid (AA), adenosine diphosphate (ADP), collagen, thrombin induced rabbit platelet aggregation inhibition rates were 40.08%, 33.09%, 37.91%, 34.71%, 29.29%, compared with the water parts were 28.65%, 28.33%, 32.29%; while the protection rate of collagen-adrenaline induced death and paralysis in mice by the ethyl acetate parts of Typhae Pollen was 50%, carrageenan-induced mice black tail incidence was 50%; the site of ethyl acetate have significantly inhibitive effect on the thrombosis models *in vivo*,

[收稿日期] 20131022(016)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81274191)

[第一作者] 何国林, 实验师, 中药新药研究, Tel:020-39358051, E-mail: glinhe@163.com

[通讯作者] * 王羚郦, 博士, 副研究员, 中药新药开发, Tel:020-39358316, E-mail: wlingli_1999@126.com

and significantly protective effect on vascular endothelial. **Conclusion:** The site of ethyl acetate is the main active site of the Typhae Pollen.

[**Key words**] Typhae Pollen; effect of antithrombosis; active site

蒲黄 Typhae Pollen 为香蒲科植物水烛香蒲 *Typha angustifolia* L.、东方香蒲 *T. orientalis* Presl 或同属植物的干燥花粉。蒲黄药用记载始于《神农本草经》,列为上品;《日华子本草》首载用其炮制品。蒲黄性味甘、平,具有止血、化瘀、通淋等功效,中医常用作化瘀止血药。近年来,国内外研究表明蒲黄中有机酸类、异鼠李苷等对花生四烯酸(AA)诱导的血小板聚集有明显抑制作用,总提取物对血管内皮细胞有保护作用^[1-3],然而蒲黄各提取部位的抗血栓活性还缺乏系统的比较筛选研究。本文就蒲黄对多种诱导剂诱导的血小板聚集性以及体内血栓形成的影响进行了研究,探讨其抗血栓作用及其可能的机制。

1 材料

1.1 有效部位的制备 生蒲黄饮片购自于广州致信药业有限公司,由广州中医药大学中药学院中药鉴定教研室黄海波教授鉴定为香蒲科植物水烛香蒲 *T. angustifolia* L. 的干燥花粉中主要成分,提供药理试验,进行生物活性筛选,确定与中医用药功能主治基本吻合的有效部位。对生蒲黄饮片进行系统溶剂提取,分为4个部分,即石油醚部分($1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、乙酸乙酯部分($1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、正丁醇部分($1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、水部分($1.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.2 动物 新西兰家兔,清洁级,雌雄各半,2.0~2.5 kg;昆明种小鼠,雄性,18~20 g;SD大鼠,雄性,180~220 g,SPF级,购自广州中医药大学实验动物中心,许可证号为SCXK(粤)2008-0020,合格证号分别为0089475,0086842,008752。

1.3 药品与试剂 蒲黄石油醚部位、蒲黄乙酸乙酯部位、蒲黄正丁醇部位、蒲黄水部位、生理盐水。I型胶原蛋白(collagen type I, Sigma),盐酸肾上腺素注射液(广州白云山明兴制药有限公司,批号100904),生理盐水(四川科伦药业股份有限公司,批号T10120406),二磷酸腺苷(ADP, 3413 03/2012),花生四烯酸(AA, 3416 04/2012),胶原(3423 04/2012),凝血酶(3411 03/2012),硫酸氢氯吡格雷(赛诺菲制药有限公司,批号1A634),三氯化铁(天津市大茂化学试剂厂,分析纯 20100114),阿司匹林(aspirin, ASA, 上海润捷化学试剂有限公司,批号20070423),枸橼酸钠(国药集团化学试剂有限

公司,批号20120329)。

2 方法

2.1 蒲黄不同提取部位对体外血小板聚集的抑制作用 新西兰家兔,3%戊巴比妥局部麻醉,颈动脉插管放血,3.8%的枸橼酸钠1:9抗凝,混匀,以 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清,即为富血小板血浆(PRP),剩余部分以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,取贫血小板血浆(PPP)。取上述所得血浆,用PPP调零,以PRP为血小板供体,实验分为6组,分别为阳性(ASA)、空白对照、蒲黄石油醚部位、蒲黄乙酸乙酯部位、蒲黄正丁醇部位、蒲黄水部位组,每组8个平行样。每管250 μL PRP中加入不同浓度的药物10 μL ,空白对照组PRP中加入生理盐水10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育5 min,然后加入5 μL 诱导剂AA、ADP、胶原、凝血酶,按比浊法用血小板聚集仪测定血小板聚集率,并按下述公式计算抑制率^[4-6]。

$$\text{血小板聚集抑制率} = (\text{对照组血小板聚集率} - \text{给药组血小板聚集率}) / \text{对照组血小板聚集率} \times 100\%$$

2.2 蒲黄活性部位对小鼠体内血栓的作用

2.2.1 蒲黄活性部位对胶原蛋白-肾上腺素诱发小鼠体内血栓形成的作用 取50只小鼠,按体重随机分成5组,正常对照组和模型对照组灌胃给予相应容积($0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)的蒸馏水,其他3组灌胃给予相应容积($0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$)的药物,每天灌胃给药或蒸馏水1次,连续5 d。于第5 d末次给药或蒸馏水45 min后,除正常对照组外,其余4组每鼠尾静脉注射胶原蛋白(225 μg)和肾上腺素(9 μg)的混悬液0.5 mL,正常对照组给予相同体积的生理盐水。观察并记录注射后5 min内小鼠死亡数和15 min内小鼠偏瘫的未恢复数,偏瘫以小鼠翻正反射消失为标准^[7-8]。

2.2.2 蒲黄活性部位对角叉菜胶诱导小鼠体内血栓实验的作用 60只小鼠分成5组,每组12只小鼠,分别为正常组、血栓对照组、阳性组、蒲黄乙酸乙酯部位、蒲黄水部位组,连续灌胃8 d,正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水,在第5天灌胃给药1 h后,各组小鼠腰背部皮下注射1%角叉菜胶 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 诱发血栓,正常对照组于同样部位皮下注射生理盐水。观察注射角叉菜胶24~72 h后动物黑尾发生率及黑尾长度。

2.3 蒲黄乙酸乙酯部位对大鼠体内血栓模型的作用 SD 大鼠 60 只,随机分为假手术对照组、模型对照组、氯吡格雷对照组 ($8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、蒲黄乙酸乙酯部位高、中、低剂量组 ($60, 30, 15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。空白对照组和模型对照组灌胃给予蒸馏水,其余组给予相应药液,灌胃剂量 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 次/d,连续给药 7 d。末次给药 1 h 后,大鼠麻醉后分离左侧颈总动脉段,用完全浸透 50% FeCl_3 的滤纸条 (长/宽: $2 \text{ cm}/1 \text{ cm}$) 环抱于颈总动脉段上,开始计时,假手术组敷等量生理盐水滤纸片。15 min 后,取下滤纸条。30 min 后,分离腹主动脉,并从腹主动脉取血至大鼠死亡,然后精确剪下滤纸条包裹的血管段,用洁净滤纸吸干血管内余血,精确称量含血栓的血管湿

重。假手术组用生理盐水代替 FeCl_3 浸泡的滤纸条。然后用 10% 甲醛固定,作 HE 染色病理切片检查^[9-10]。

3 结果

3.1 蒲黄不同提取部位对体外血小板聚集的影响 蒲黄不同提取部位对体外血小板聚集作用的初步筛选结果显示乙酸乙酯部位和水部位对 AA、ADP、胶原、凝血酶等几种诱导剂所致的家兔血小板聚集有明显的抑制作用,见表 1。

3.2 蒲黄活性部位对小鼠体内血栓的影响 进一步对蒲黄活性部位的研究发现,乙酸乙酯部位可明显抑制胶原蛋白-肾上腺素和角叉菜胶诱发小鼠体内血栓的形成,见表 2~3。

表 1 蒲黄不同提取部位对花生四烯酸、二磷酸腺苷、胶原、凝血酶诱发家兔体外血小板聚集的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	AA		ADP		胶原		凝血酶	
		血小板聚集率	血小板聚集抑制率	血小板聚集率	血小板聚集抑制率	血小板聚集率	血小板聚集抑制率	血小板聚集率	血小板聚集抑制率
		生理盐水	-	40.29 ± 8.9	-	41.67 ± 6.41	-	39.75 ± 6.01	-
阿司匹林	500	$22.43 \pm 8.34^{1)}$	$44.33^{1)}$	$24.49 \pm 5.5^{1)}$	$41.23^{1)}$	$23.63 \pm 5.14^{1)}$	$40.55^{1)}$	$24.61 \pm 3.42^{1)}$	$42.28^{1)}$
蒲黄石油醚部位	100	34.86 ± 10.19	13.48	36.00 ± 5.04	13.61	36.32 ± 6.04	8.63	36.54 ± 4.78	14.31
蒲黄乙酸乙酯部位	100	24.14 ± 8.36	$40.08^{1)}$	27.88 ± 4.45	$33.09^{1)}$	24.68 ± 4.39	$37.91^{1)}$	27.84 ± 3.28	$34.71^{1)}$
蒲黄正丁醇部位	100	32.86 ± 9.08	18.44	34.50 ± 6.16	17.41	33.54 ± 6.21	15.62	34.96 ± 4.36	18.01
蒲黄水部位	100	28.49 ± 7.36	$29.29^{1)}$	29.73 ± 3.24	$28.65^{1)}$	28.49 ± 4.38	$28.33^{1)}$	28.87 ± 6.24	$32.29^{1)}$

注:与生理盐水组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 蒲黄不同提取部位对胶原蛋白-肾上腺素诱导的体内血栓模型小鼠的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	药前体重 $/\text{g}$	药后体重 $/\text{g}$	肺重 $/\text{g}$	肺指数 $/\%$	死亡数 $/\text{例}$	偏瘫数 $/\text{例}$	保护率 $/\%$
正常	-	21.24 ± 1.61	21.71 ± 2.49	$0.17 \pm 0.02^{1)}$	$0.78 \pm 0.09^{1)}$	0	0	$100.0^{1)}$
模型	-	19.62 ± 0.96	19.69 ± 1.93	0.36 ± 0.04	1.83 ± 0.26	10	0	$0.0^{2)}$
阿司匹林	20	20.64 ± 1.69	19.64 ± 1.65	0.30 ± 0.05	1.53 ± 0.20	2	2	$60.0^{1,2)}$
蒲黄乙酸乙酯部位	1 000	20.60 ± 1.64	19.79 ± 1.53	0.33 ± 0.08	1.67 ± 0.40	3	2	$50.0^{1,2)}$
蒲黄水部位	1 000	20.86 ± 2.11	20.29 ± 1.54	0.35 ± 0.08	1.72 ± 0.41	5	2	$30.0^{2)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与正常组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 3 蒲黄不同提取物对角叉菜胶诱导的体内血栓模型小鼠黑尾发生率及黑尾长度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	黑尾发生率 $/\%$	绝对黑尾长度 $/\text{mm}$	相对黑尾长度 $/\%$
正常	-	-	-	-
模型	-	83.3	18.73 ± 3.74	17.96 ± 3.83
阿司匹林	20	40	$9.44 \pm 1.33^{1,2)}$	$9.21 \pm 1.30^{1,2)}$
蒲黄乙酸乙酯部位	100	50	$10.00 \pm 1.43^{1,2)}$	$10.87 \pm 1.32^{1,2)}$
蒲黄水部位	100	60	$13.13 \pm 2.10^{2)}$	$13.09 \pm 2.36^{2)}$

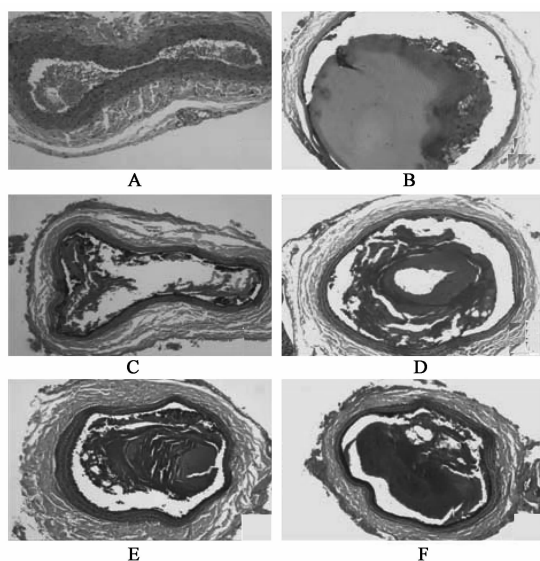
3.3 蒲黄乙酸乙酯部位对大鼠体内血栓模型的影响 蒲黄乙酸乙酯部位不同剂量均对大鼠体内血栓形成有抑制作用,血管湿重数据显示蒲黄乙酸乙酯部位与模型组对比其质量明显变轻 (表 4);对血管病理切片检查发现假手术组血管壁完整,腔内可见红细胞,外膜外有脂肪组织,管壁弹性纤维明显可见,呈波浪状;模型组血管壁完全损伤,管壁变薄,官腔变大,形成的血栓为混合血栓,可见血小板成梁状结构,血小板小梁之间是凝固的血液 (血浆以及褪变溶解的红细胞形成);与模型组比较,其余药物组

的血管壁损伤较小,个别组管壁弹性纤维可见,形成血栓的面积较小且分散(图1)。说明乙酸乙酯部位各剂量组对血管壁有明显的保护作用。

表4 蒲黄乙酸乙酯部位对FeCl₃诱导的体内血栓模型大鼠颈动脉的影响($\bar{x} \pm s, n=10$) /mg

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	总重	血管段重	血栓湿重
假手术对照	-	-	-	-
模型对照	-	9.78 ± 0.46	2.31 ± 0.71	7.47 ± 0.57
氯吡格雷	8	5.67 ± 0.80 ¹⁾	2.49 ± 0.73	3.18 ± 0.40 ¹⁾
乙酸乙酯部位	60	5.76 ± 0.76 ¹⁾	2.44 ± 0.58	3.32 ± 0.62 ¹⁾
	30	5.83 ± 0.62 ¹⁾	2.38 ± 0.55	3.45 ± 0.43 ¹⁾
	15	6.16 ± 0.74 ¹⁾	2.49 ± 0.67	3.67 ± 0.71 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 氯吡格雷组 8 mg·kg⁻¹;

D~F. 乙酸乙酯部位 60, 30, 15 mg·kg⁻¹组

图1 蒲黄乙酸乙酯部位对血管形态的影响(HE, ×100)

4 讨论

血小板聚集指血小板被活化后互相之间黏附并形成聚集物的现象,是形成血栓的重要原因。

ADP、AA、胶原、凝血酶等诱导剂均能诱导血小板的活化,实验观察发现,生蒲黄的乙酸乙酯部位和水部位可明显抑制ADP、AA、胶原、凝血酶诱导的离体家兔血小板聚集。

胶原增加血液黏滞度、肾上腺素能收缩血管,均为血栓形成的诱导剂,胶原蛋白和肾上腺素合用时有显著的协同作用,给小鼠尾静脉注射可引起血栓

性偏瘫和死亡。角叉菜胶是从海藻中提取的硫酸多糖,是一种常用的血栓形成诱导剂,可通过诱发血小板活化和血管内皮损伤,导致血栓形成。实验发现生蒲黄的乙酸乙酯部位可明显抑制小鼠体内血栓的形成。

FeCl₃可损伤颈动脉内膜,激活血小板和凝血系统,诱导血小板聚集和释放ADP等,同时损伤的内皮细胞释放的TXA₂增加、PGI₂减少,导致动脉血栓形成,以此原理制备颈总动脉血栓模型。实验再一次证明生蒲黄的乙酸乙酯部位可明显抑制大鼠体内血栓的形成,而且对血管内皮有模型的保护作用。

通过对生蒲黄的不同提取物进行以上实验的筛选,结果表明其乙酸乙酯部位为蒲黄抗血栓作用的主要活性部位。

[参考文献]

- [1] 高权荣,田景民. 蒲黄的研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2001, 20(增刊): 81.
- [2] 孔祥鹏,陈佩东,张丽,等. 蒲黄与蒲黄炭对血瘀大鼠血液流变性及凝血时间的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 129.
- [3] 杨慧玲,李军. 蒲黄总黄酮对家兔血液流变学参数和血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 129.
- [4] 梁翌,杨为民,李绪兰,等. 银杏叶提取物对兔血小板聚集的影响[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(1): 25.
- [5] 周剑,刘荣华,李祥. 红花对ADP给药家兔血小板聚集率的影响[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(3): 50.
- [6] 张晓林,张相年,杨安平. 阿藿烯对兔血小板聚集抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(7): 872.
- [7] 李家川,孟宪丽,黄蕾蕾,等. 头风愈滴丸抗血小板聚集及抗血栓形成的作用[J]. 中国药理与临床, 2008, 24(2): 77.
- [8] 朱虹,吴强,徐明,等. 黄芪总提物体内抗血栓作用的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(8): 917.
- [9] Kurz K D, Main B W, Sandusky G E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride [J]. Thromb Res, 1990, 60(4): 269.
- [10] 唐映红,梁燕,杨静,等. FeCl₃诱导的大鼠颈总动脉血栓模型血浆TXA₂、PGI₂、抗凝和纤溶活性的变化[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1353.

[责任编辑 聂淑琴]