

益母草注射液主要提取成分对凝血系统影响的筛选

赵小梅, 谢晓芳*, 熊亮
(成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] **目的:**探索益母草注射液中主要提取成分对凝血系统的影响。**方法:**通过体外实验测定凝血四项值、血小板聚集率和纤溶活性探索益母草注射液主要成分对凝血系统的影响。**结果:**体外实验表明, 葫芦巴碱具有明显延长活化部分凝血酶时间(APTT)的作用, 氯化胆碱和葫芦巴碱均具有抗血小板聚集的作用, 均无明显的纤溶活性。**结论:**氯化胆碱和葫芦巴碱为益母草注射液抗凝的有效成分。有效成分的提取分离为扩大益母草注射液的临床应用以及控制益母草注射液的质量提供了很好的科学依据。

[关键词] 益母草注射液; 氯化胆碱; 葫芦巴碱

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0128-03

[doi] 10.11653/syfy2014040128

Main Ingredients from Motherwort Injection for Coagulation System

ZHAO Xiao-mei, XIE Xiao-fang*, XIONG Liang
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the main ingredients from Motherwort injection for coagulation system. **Method:** By measuring the coagulation values, platelet aggregation and fibrinolysis to explore the effects of the main ingredients from Motherwort injection on blood coagulation system. **Result:** *In vitro*, trigonelline obviously prolonged activated partial thromboplastin time (APTT), both choline chloride and trigonelline inhibited platelet aggregation, but no significant fibrinolytic activity. **Conclusion:** Both choline chloride and trigonelline are the active ingredients of Motherwort injection for coagulation system. The extraction and separation of active ingredients expand the clinical application of Motherwort injection and provide a good scientific basis for the quality control of Motherwort injection.

[Key words] Motherwort injection; choline chloride; trigonelline

益母草素有“血家圣药”的称号, 而益母草注射液作为其代表制剂, 其对凝血系统的影响及其有效物质基础尚不清楚。本研究对益母草注射液主要提取成分对凝血系统的影响进行了初步的筛选研究。其中氯化胆碱和葫芦巴碱均为首次从益母草注射液中提取分离获得, 其在注射液中的含量仅次于水苏

碱, 为益母草注射液的主要成分。

1 材料

1.1 动物 10只健康雌性SD大鼠, 体重(220±20)g, 由成都中医药大学动物实验中心提供, 质量合格证号SCXK(川)2008-11。6只健康雄性SD大鼠, 体重(220±20)g, 由成都中医药大学动物实验中心提供, 质量合格证号SCXK(川)2008-11。

1.2 药物 氯化胆碱和葫芦巴碱均自益母草注射液浸膏中提取获得, 由成都中医药大学药学院中药材标准化教育部重点实验室、中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地提供。阿司匹林肠溶片(批号120529210, 辰欣药业股份有限公司)。注射用尿激酶(批号201304095, 南京南天药业有限责任公司)。

[收稿日期] 20130704(004)

[基金项目] 国家“十二五”支撑计划重点项目(2011BAI13B05)

[第一作者] 赵小梅, 在读博士, 从事中药药理研究, E-mail: xiaomei08gz@163.com

[通讯作者] *谢晓芳, 博士, 从事中药药理与毒理研究, Tel: 02-861351386, E-mail: XXF14544@163.com

1.3 试剂 凝血酶原时间(PT,批号 545487)、活化部分凝血活酶时间(APTT,批号 547163A)、纤维蛋白原(FIB,批号 538043)及凝血酶时间(TT,批号 42282)测定试剂均购自德国 Siemens 公司。腺苷二磷酸(ADP,批号 SLBB1854),纤维蛋白原(fibrinogen,批号 F8630),凝血酶(thrombin,批号 T4648),均由美国 Sigma 公司生产。琼脂粉[Agar,日本进口分装,分装号 89054120,购自溶海生物技术(成都)有限公司]。PBS 磷酸盐缓冲液粉末(批号 20130311,北京中杉金桥生物科技有限公司)。

1.4 仪器 日本 SYSMEX 株式会社 CA-500 型血凝仪,SC-2000 血小板聚集测试仪,德国 Heraeus 台式离心机 Biofuge Stratos, Sanyo CO₂ 培养箱 MLO-15A。

2 方法

2.1 体外凝血四项值的测定 取雌性 SD 大鼠 10 只,采用 20% 乌拉坦麻醉,经股静脉取血,每只 1.8 mL,以 3.8% 枸橼酸三钠 1:9 抗凝,经 3 500 r·min⁻¹,可获得 1 mL 左右血浆,取 200 μL × 3 份,可平行进行 3 组实验:阴性对照组、氯化胆碱组和葫芦巴碱组,于实验前分别加入 20 μL 相应药物,其中阴性对照组加入等量生理盐水。经充分混匀,37 °C 温浴 5 min。以全自动血凝仪测定各组凝血四项指标,每组重复 10 次。

2.2 体外血小板聚集的测定 取雄性 SD 大鼠 6 只,采用 20% 乌拉坦麻醉,经股静脉采血,每只取血 1.8 mL,3.8% 枸橼酸三钠 1:9 抗凝,25 °C 离心 200 × g,10 min,取上液作为富血小板血浆(PRP),剩余部分继续离心 2 200 × g,10 min 作为贫血小板血浆(PPP),采用同只鼠的 PPP 稀释 PRP 至 2.5 ~ 3.5 × 10⁸ 个/mL,每只鼠的 PRP 可平均分成 300 μL × 4 份,可平行进行 4 组实验:阴性对照组、阳性对照组、

氯化胆碱组和葫芦巴碱组。应用 SC-2000 四通道血小板聚集仪,按 Born 比浊法^[1-2]测定血小板聚集性。PPP 调零,取 300 μL PRP,分别加入 20 μL 相应药物,其中阴性对照组加入生理盐水,阳性对照组加入阿司匹林,实验组分别加入氯化胆碱和葫芦巴碱。37 °C 温浴 5 min,然后加入 5 μmol ADP,每次测试时间为 5 min,记录最大聚集率,计算血小板聚集抑制率=(对照管血小板最大聚集率-给药管血小板最大聚集率)/对照管血小板最大聚集率 × 100%,每组重复 6 次。

2.3 体外纤维平板实验 参照文献^[3-4]方法,用 PBS 缓冲液配制 10 g·L⁻¹ 的纤维蛋白原溶液、1 U·mL⁻¹ 的凝血酶和 100 U·mL⁻¹ 的尿激酶。取 0.2 g 琼脂粉加 20 mL PBS 缓冲液加热溶解,待温度降至 55 ~ 60 °C 时,取 18 mL 放入玻璃杯中,加入 30 °C 的纤维蛋白原溶液 1 mL,摇匀后再加入 30 °C 的凝血酶溶液 1 mL,摇匀,立即放入水平放置的 90 mm 玻璃培养皿中,待冷凝后采用 7 mm 中空打孔器打孔。在孔中加入相应药物 50 μL,其中阴性对照组加入生理盐水,阳性对照组加入尿激酶,实验组分别加入葫芦巴碱和氯化胆碱。然后将平板放入 37 °C 的培养箱,16 h 后测定结果。每组重复 6 次。

2.4 统计学处理 统计数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,与对照组比较采用配对 *t* 检验,用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析 *P* < 0.05 为差异有显著性。

3 结果

3.1 益母草注射液主要提取成分体外给药对凝血四项的影响(表 1) 氯化胆碱对 PT 和 APTT 均无明显影响,葫芦巴碱对 PT 无明显影响,但对 APTT 有明显延长的作用。葫芦巴碱和氯化胆碱对血纤维蛋白原均无明显影响,亦不延长凝血酶时间。

表 1 益母草注射液主要提取成分体外给药对凝血四项的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	PT/s	APTT/s	FBG/g·mL ⁻¹	TT/s
阴性对照	-	10.87 ± 0.29	23.38 ± 2.13	1.828 ± 0.02	25.30 ± 1.30
氯化胆碱	7 × 10 ⁻⁵	10.78 ± 0.33	24.17 ± 5.07	1.834 ± 0.02	24.90 ± 1.50
葫芦巴碱	7 × 10 ⁻⁵	10.81 ± 0.37	26.63 ± 1.82 ¹⁾	1.825 ± 0.02	25.96 ± 0.77

注:与阴性对照组相比¹⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

3.2 益母草注射液主要提取成分体外给药对 ADP 诱导的血小板聚集率的影响(表 2) 氯化胆碱和葫芦巴碱均能明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集。

3.3 益母草注射液主要提取成分体外给药对纤维蛋白的溶解作用(表 3) 葫芦巴碱和氯化胆碱对体

外已形成的纤维蛋白均无明显的溶解作用。

4 讨论

氯化胆碱多用作禽畜饲料添加剂,能刺激多产蛋和产仔,对禽畜和鱼类有增重作用;作为重要的甲基供体,对幼小动物的生长发育尤为重要;在临床医

表2 益母草注射液主要提取成分体外给药
对ADP诱导的血小板聚集率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度 /mol·L ⁻¹	加样量 /μL	聚集率 /%	抑制率 /%
阴性对照	-	30	56.92 ± 5.96	-
阿司匹林	10 ⁻⁵	30	40.72 ± 4.47 ¹⁾	28.46
氯化胆碱	7 × 10 ⁻⁵	30	44.93 ± 3.34 ¹⁾	21.06
葫芦巴碱	7 × 10 ⁻⁵	30	41.13 ± 3.02 ¹⁾	27.74

表3 益母草注射液主要提取成分体外给药
对纤维蛋白的溶解作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度	加样量 /μL	溶解圈直径 /mm
阴性对照	-	50	-
尿激酶	100 U·mL ⁻¹	50	14.58 ± 1.02
葫芦巴碱	7 × 10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹	50	-
氯化胆碱	7 × 10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹	50	-

学上主要用于脂肪肝和肝硬化的辅助治疗;现代药理研究也表明氯化胆碱具有促进肝脏脂肪代谢的作用^[5-7]。近年来,人们还发现了氯化胆碱具有缓解哮喘的作用^[8]。葫芦巴具有温肾助阳、散寒止痛之功效,主要用于肾脏虚冷、小腹冷痛、小肠疝气和寒湿脚气的治疗。现代药理研究表明,葫芦巴碱能显著改善糖尿病大鼠的糖代谢和肝功能^[9-10],对中枢神经系统具有保护作用^[11],具有抗肿瘤细胞入侵的作用^[12]。此外,葫芦巴碱还是一种新型的植物雌激素,具有激活雌激素受体的作用,但不拮抗雌激素^[13]。

由于上述生物碱是益母草注射液中除水苏碱之外含量最高的两大成分,均大于1 g·L⁻¹益母草注射液。因此,笔者推测两者可能具有益母草的活血化瘀作用,本研究通过3项实验:体外凝血四项值测定、血小板聚集实验和纤维平板实验探索上述2个成分对凝血系统的影响。实验结果表明,氯化胆碱和葫芦巴碱对凝血系统均有不同程度的影响,葫芦巴碱具有延长内源性凝血时间的作用,氯化胆碱和葫芦巴碱均能明显的抑制血小板聚集,但对体外纤维蛋白无溶解作用。

本研究筛选了氯化胆碱和葫芦巴碱对凝血系统的影响,其抗凝的作用机制有待进一步研究。而氯化胆碱和葫芦巴碱的现代药理研究也拓宽了益母草注射液可能的适用范围:改善糖代谢和脂肪代谢,保护肝脏,保护中枢神经系统,缓解哮喘,防止肿瘤

细胞入侵,植物雌激素样作用。

[参考文献]

[1] Born G V R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal [J]. Nature, 1962, 194:927.

[2] 王欢,唐于平,郭建明,等.当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):73.

[3] Walton P L. An improved fibrin plate method for assay of plasminogen activators [J]. Clinica Chimica Acta, 1966 (13):680.

[4] 张晓丽,杨洪武,吴品昌.蚯蚓用于抗血栓的加工方法[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(22):24.

[5] Petzold H, Schmidt C. Effect of choline chloride and (-)-carnitine of the experimental fatty liver in the rat [J]. Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr, 1965, 25(5):321.

[6] Al-Saeedi F J, Cheng B. Choline treatment affects the liver reticuloendothelial system and plasma fatty acid composition in diabetic rats [J]. Clin Physiol Funct Imaging, 2013, 33(4):293.

[7] Mehedint M G, Zeisel S H. Choline's role in maintaining liver function; new evidence for epigenetic mechanisms [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013, 16(3):339.

[8] Mehta A K, Gaur S N, Arora N, et al. Effect of choline chloride in allergen-induced mouse model of airway inflammation [J]. Eur Respir J, 2007, 30(4):662.

[9] Khaled H, Kais M, Zahra A, et al. Inhibition of key digestive enzymes related to diabetes and hyperlipidemia and protection of liver-kidney functions by trigonelline in diabetic rats [J]. Sci Pharm, 2013, 81(1):233.

[10] Akashi I, Kagami K, Hirano T, et al. Protective effects of coffee-derived compounds on lipopolysaccharide/D-galactosamine induced acute liver injury in rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(4):473.

[11] Gaur V, Bodhankar S L, Mohan V, et al. Neurobehavioral assessment of hydroalcoholic extract of trigonella foenum-graecum seeds in rodent models of Parkinson's disease [J]. Pharm Biol, 2013, 51(5):550.

[12] Nobuhiro H, Rieko O, Yutaka M, et al. Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(3):653.

[13] Kimberly F, Katarina M, Jairam V, et al. Trigonelline is a novel phytoestrogen in coffee beans [J]. J Nutrition, 2009, 139:1833.

[责任编辑 邹晓翠]