

茜草和茜草炭对正常大鼠凝血-纤溶系统的影响

耿启彬², 黄海龙², 翁壮锋², 陈鹏², 张万忠^{1*}, 蔡玉春^{1*}

(1. 南方医科大学药学院, 广州 510515; 2. 南方医科大学生物技术学院, 广州 510515)

[摘要] **目的:**研究茜草和茜草炭对正常 Wistar 大鼠凝血-纤溶系统的影响,通过其药理作用探讨它们的止血化瘀机制。**方法:**将 Wistar 大鼠随机分为 6 组,每组 7 只,分别为茜草和茜草炭水煎制低剂量、高剂量组(含生药 5.0, 10.0 g·kg⁻¹),阳性对照组(氨甲苯酸 0.6 g·kg⁻¹),空白对照组(生理盐水 10 mL·kg⁻¹)。灌胃 7 d,用 ELISA 法检测大鼠血浆中组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)和纤溶酶原(PLG)活性。**结果:**和空白对照组比较,茜草在实验剂量下均能提高 t-PA 的活性,且高剂量时提高 t-PA 的活性更显著($P < 0.01$)。高剂量茜草炭能使大鼠 t-PA 活性提高($P < 0.05$),但其作用低于高剂量茜草组。低剂量时对大鼠 t-PA 活性影响不显著。茜草和茜草炭对 PAI 和 PLG 的活性影响均不显著。**结论:**茜草高、低剂量均能提高 t-PA 的活性,且在高剂量时提高更显著,进而影响凝血-纤溶系统,从而发挥其止血化瘀作用。茜草炭对纤溶系统也有一定作用,但可能是多种酶的综合作用。茜草和茜草炭对凝血-纤溶系统药理作用效果不同,进而影响它们的临床使用。

[关键词] 茜草; 茜草炭; 纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活物抑制物; 纤溶酶原; 凝血-纤溶系统

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0279-04

[doi] 10.11653/syfyj2013130279

Effects of *Rubia cordifolia* and Charred *R. cordifolia* on Coagulation-fibrinolytic System of Normal Rats

GENG Qi-bin², HUANG Hai-long², WENG Zhuang-feng², CHEN Peng²,
ZHANG Wan-zhong^{1*}, CAI Yu-chun^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of *Rubia cordifolia* L. and Charred *R. cordifolia* on coagulation-fibrinolytic system in normal Wistar rats and their mechanism of stasis-resolving hemostatic based on

[收稿日期] 20120701(006)

[基金项目] 广东省大学生创新实验计划项目(1212110035)

[第一作者] 耿启彬,本科,从事分子药理学的研究工作, Tel:13631391990, E-mail: qibingeng@126.com

[通讯作者] *张万忠,博士,教授,从事纳米药理学等研究工作, Tel:13246408506, E-mail: zhangwz998@126.com;

*蔡玉春,硕士,讲师,从事分子药理学的研究工作, Tel:020-61648592, E-mail: caroline9988@139.com

[6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2006:78.

[7] 俞葛峰. 妇产科内分泌学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1983:62.

[8] 傅蔓华,徐敏,吉庆明. 癖速消与他莫昔芬联合应用对大鼠乳腺增生的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12):244.

[9] Bundred N J. Aetiological factors in benign breast disease[J]. Br J Surg, 1994, 81(6):788.

[10] 韩铁军,高霞,王俊丽. 乳腺增生病中医学历史渊源、发病机理和证型的研究分析与探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(8):623.

[11] 吴承东,杨焕杰. 消癖合剂对大鼠乳腺增生的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):224.

[12] 李淑敏,石鹤峰. 中医药治疗乳腺增生病实验研究近况[J]. 中医研究, 2004, 17(4):59.

[责任编辑 李玉洁]

their pharmacological action. **Method:** Wistar rats were randomly divided into blank control group (normal saline, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), *R. cordifolia* low-dose ($5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high-dose ($10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups, Charred *R. cordifolia* low-dose ($5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and high-dose ($10.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) groups and positive control group p-aminomethylbenzoic acid, ($0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ig, one time a day for 7 days. The blood in abdominal aorta was taken and then the plasma was separated in the eighth day. The activities of plasma tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor (PAI) and plasminogen (PLG) in plasma were measured by ELISA method. **Result:** Compared with the blank control group, both the low-dose and high-dose group of *R. cordifolia* can increase t-PA activity, the high-dose group of *R. cordifolia* can increase t-PA activity more obviously ($P < 0.01$). The high-dose group of Charred *Rubia cordifolia* L. can also increase t-PA activity ($P < 0.05$) but the low-dose group of Charred *Rubia cordifolia* L. cannot. In addition, the high-dose group of Charred *R. cordifolia*'s effect on t-PA activity is smaller than the high-dose group of *R. cordifolia*. The effects of *R. cordifolia* and Charred *R. cordifolia* on the PAI and PLG activity are all not significant regardless of their dosage. **Conclusion:** Both the low-dose and the high-dose group of *R. cordifolia* can remarkably affect fibrinolytic system to play its role on stasis-resolving hemostatic through increasing t-PA activity. Charred *R. cordifolia* can also affect fibrinolytic system while it may be the comprehensive effects of many enzymes. *R. cordifolia* and Charred *R. cordifolia* have different pharmacological effects on fibrinolytic system. Thereby, they have different uses in clinical practice.

[Key words] *R. cordifolia*; Charred *R. cordifolia*; t-PA; PAI; PLG; coagulation-fibrinolytic system

茜草又名茅搜、茹芦、地血、血见悉、风车草等,始载于《神农本草经》。《中国药典》2010 年版一部规定茜草为茜草科植物茜草的干燥根和根茎。据《本草纲目》记载,茜草具有凉血、祛瘀、止血、通经等功效。近年来对茜草的有效成分及其在血浆中的代谢开展了研究^[1-3],对茜草类药物的药效研究主要集中在它们的抗炎、免疫^[4-5]和抗癌作用^[6-7]等方面,其中,有关茜草和茜草炭的止血化瘀作用则主要研究动物凝血系统的基本指标和影响凝血系统的相关因素^[8-9]。如余旭东等^[9]通过血瘀模型比较茜草和茜草炭的活血化瘀作用,认为茜草炮制后活血化瘀等药理作用减弱、止血作用增强,但以上的研究均是在凝血系统下进行的。然而,血液中存在与凝血系统相互拮抗的抗凝血系统即纤维蛋白溶解系统。在生理状态下,二个系统的动态平衡既保证了血液有潜在的可凝固性又始终保证了血液的流体状态,因此探究茜草和茜草炭对纤溶系统的影响同样重要。目前有关茜草和茜草炭的化瘀作用基于纤溶系统的研究尚未见相关的文献报道。本实验通过观察 Wistar 大鼠在服用茜草和茜草炭水煎液后体内组织型纤溶酶原激活剂(t-PA),纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)和纤溶酶原(PLG)活性的变化来研究茜草炒炭前、后的止血机制,以期在分子水平上为茜草和茜草炭的化瘀机制提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 茜草和茜草炭,陕西产,购于毫

州市老益堂药业有限公司,批号 110620,110620,经南方医科大学药学院植物学博士谢扬教授鉴定为茜草科植物茜草(*Rubia cordifolia* L.),茜草炭为同一批茜草炮制而得。t-PA ELISA Kit(t-PA 检测试剂盒,北京伊普瑞斯科技有限公司,批号 E11070804),PAI ELISA Kit(PAI 检测试剂盒,北京伊普瑞斯科技有限公司,批号 E11070805);PLG ELISA Kit(PLG 活性检测试剂盒,北京伊普瑞斯科技有限公司,批号 E11070806);生理盐水;氨甲酸苯注射液,山东圣鲁制药有限公司,批号 1103262);乙醚,广州化学试剂厂,分析纯。

1.2 动物 SPF 级 Wistar 大鼠,雄性,体重 150 ~ 180 g,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(粤)2006-0015。

1.3 仪器 Bio-Rad 680 型全自动酶标仪(美国 Bio-Rad),Fisher Scientific 生化培养箱(美国),Bio-Rad 1575 型全自动洗板机(美国 Bio-Rad), K_2 EDTA 抗凝一次性采血器,离心机,RE201D 型旋转蒸发器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 茜草水煎液的制备 每次取茜草 100 g,切细磨碎,加 600 mL 蒸馏水,浸泡 30 min 后,共煎煮 3 次(30,25,15 min),每次用 8 层纱布过滤;合并 3 次滤液,旋转蒸发器蒸发浓缩至 100 mL(含生药 $1.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)茜草水煎液。茜草炭高、低剂量的制备同茜草高、低剂量水煎液的制备;每 2 天换 1 次水煎液。

2.2 分组与给药 动物房温度(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度55%。大鼠在动物房环境适应2 d后开始实验,实验前禁食12 h,不禁水。42只大鼠分为6组,每组7只,分别为空白对照组(生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阳性对照组(氨甲苯酸 $0.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,为等效剂量)。茜草和茜草炭低、高剂量($5.0, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。按上述剂量每天上午灌胃给药,连续7 d。

2.3 指标检测 在第8天灌胃1 h后用1次性真空采血管(K_2EDTA 体积比1:9抗凝)腹主动脉取血 1.8 mL , $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min分离血浆,吸取 $400\ \mu\text{L}$ 放入灭菌后的EP管中, $4\ ^{\circ}\text{C}$ 低温保存,待所有血浆分离完成后采用ELISA法、用全自动酶标仪在 450 nm 波长下检测血浆中t-PA,PAI和PLG的活性。

2.4 数据处理 采用SPSS 13.0软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用两组独立样本Student's *t*检验,各组间的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠t-PA活性的影响 和空白对照组比较,茜草高、低剂量时均能显著提高t-PA的活性(分别为 $P < 0.01$, $P < 0.05$)。茜草炭高剂量也能提高大鼠t-PA活性($P < 0.05$),茜草炭低剂量则对大鼠t-PA活性影响不显著。见表1。

表1 茜草和茜草炭对大鼠t-PA活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	t-PA/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$
空白对照	-	0.0512 ± 0.0164
茜草	5.0	$0.1360 \pm 0.1026^{1)}$
	10.0	$0.1622 \pm 0.0762^{2)}$
茜草炭	5.0	0.1105 ± 0.1029
	10.0	$0.1015 \pm 0.0561^{1)}$
氨甲苯酸	0.6	0.1097 ± 0.1025

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对大鼠PAI和PLG活性的影响 与空白对照组比较,茜草和茜草炭分别对PAI,PLG的活性影响均不显著。见表2。

表2 茜草和茜草炭对大鼠血浆PAI和PLG活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$) $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PAI	PLG
空白对照	-	0.3129 ± 0.0251	0.8186 ± 0.3436
茜草	5.0	0.2905 ± 0.0399	0.9582 ± 0.5013
	10.0	0.2897 ± 0.0372	0.8294 ± 0.4978
茜草炭	5.0	0.3210 ± 0.0064	0.7477 ± 0.5342
	10.0	0.2879 ± 0.0336	0.7994 ± 0.5222
氨甲苯酸	0.6	0.2999 ± 0.0225	0.7509 ± 0.5468

3.3 溶血效应 结果表明空白对照、茜草炭低剂量和阳性对照组血浆为淡黄色,提示茜草炭低剂量和氨甲苯酸有止血作用。茜草低、高剂量组及茜草炭高剂量组均发生了轻微的溶血现象。排除其他造成溶血的因素外,可以确定是药物(茜草和茜草炭)的原因引发了实验组大鼠的溶血现象,提示茜草和高剂量的茜草炭可能影响大鼠的凝血-纤溶系统。结合以上数据分析来看,茜草炭高剂量能使大鼠发生轻微溶血可能是其对本实验中所涉及3种酶的综合作用所致;对于茜草而言,高剂量的茜草能够显著影响大鼠的凝血-纤溶系统,并且低剂量时也已经能对凝血-纤溶系统有所作用。经高剂量茜草处理后大鼠溶血比低剂量茜草明显,说明增高茜草的剂量对凝血-纤溶系统的活性影响明显增强,存在一定的量效关系。

4 讨论

t-PA,PAI-I及PLG是反映纤溶系统常用的指标。t-PA是组织型纤溶酶原的特异性激活剂,当纤溶蛋白形成时,t-PA结合到其表面,催化其快速溶解。PAI-I是t-PA的主要抑制剂,可与细胞和血液中的t-PA结合,并抑制t-PA使血浆纤溶酶原转化为纤溶酶(Plasmin)。纤溶酶原是纤溶酶的前体物,纤溶酶是指能专一降解纤维蛋白凝胶的蛋白水解酶,是纤溶系统中的一个重要组份。体内凝血和纤溶两个系统是相互依存紧密相联的^[10]。机体一旦产生凝血反应,也几乎同时激活了纤溶系统,使体内多余的血栓移去,并通过负反馈效应使体内纤维蛋白原的水平降低,从而避免纤维蛋白的过多凝聚^[11]。目前临床常用的止血药物很多,止血机制也很复杂,传统中药和药用植物由于毒性较低,来源广泛,有文献记载等特点,在止血药物资源方面有着巨大的潜力。何希瑞等^[12]总结了常用止血中药及其止血机制,茜草被列为化瘀止血药。

本实验结果显示,与空白对照组比较,茜草高、低剂量时均能显著提高t-PA的活性且高剂量时提高t-PA的活性更显著。茜草对PAI和PLG的活性影响不显著;提示茜草在生用时除了作用于凝血系统外还作用于纤溶系统,能提高纤溶系统的活性,其主要作用于t-PA而对PAI和PLG的影响不显著。茜草炭高剂量也能使大鼠t-PA活性也有所提高,但比高剂量茜草组的作用弱,茜草炭低剂量则对大鼠t-PA活性影响不显著。茜草炭高、低剂量对PAI和PLG的活性影响均不显著。从茜草和茜草炭的对比可以看出,茜草在高、低剂量均能显著提高t-

PA 的活性从而发挥其止血化瘀作用,而茜草炭虽然对纤溶系统作用较弱,可能是多种酶的综合作用。茜草和茜草炭对凝血-纤溶系统药理作用效果不同,这和 2010 年版《中国药典》中调整茜草的功能排序、突出其凉血化瘀止血的药性特点相一致。茜草炭无论高、低剂量均不能显著影响 PAI 及 PLG 的活性,说明其除了作用于 t-PA 之外可能作用于其他靶点。

本实验是在纤溶系统正常的条件下进行的,研究发现茜草无论高、低剂量均能显著提高 t-PA 的活性,从而影响纤溶系统发挥其止血化瘀的作用。提示茜草的化瘀止血可能和提高纤溶系统的活性有关,且在生用时更偏向于化瘀止血,这和茜草的常用的临床应用特点相符合,即茜草生用时偏向于化瘀止血,炮制成茜草炭后味苦涩,常用于止血目的。说明茜草炮制成茜草炭的目的是增强止血作用,但其止血效果可能不是作用于纤溶系统。其作用途径与茜草不同,炮制后茜草的化学成分发生了改变,从而可能也使茜草炭的药理作用与生药茜草相比发生了相应变化。根据本实验结果,提示茜草在生用时含有止血化瘀的成分,在炮制后其发挥止血的成分可能发生了减少或者改变。若能将其止血化瘀的成分提取出来用于治疗各种瘀血症状可能会发挥更好的药效,具有较好的研究价值。

[参考文献]

[1] 司南,杨健,王宏洁,等.液相色谱方法分析茜草中遗传毒性成分 Lucidin 及其苷[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):88.
[2] 浦益琼,王冰,张彤,等.茜草提取物中大叶茜草素测定的方法研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(6):94.
[3] 司南,王宏洁,杨健,等.茜草中 Lucidin, Lucidin-3-

O-primeveroside 及大叶茜草素在小鼠血浆中代谢趋势的初步研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(2):113.
[4] Jeong G S, Lee D S, Kim D C, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effects of mollugin via up-regulation of heme oxygenase-1 in mouse hippocampal and microglial cells[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 654(3):226.
[5] Lodi S, Sharma V, Kansal L. The protective effect of *Rubia cordifolia* against lead nitrate-induced immune response impairment and kidney oxidative damage[J]. Indian J Pharmacol, 2011, 43(4):441.
[6] Hasuda T, Hitotsuyanagi Y, Takeya K. Production of monoclonal antibodies against antitumor cyclohexapeptide RA-VII from *Rubia cordifolia* and their characterization[J]. J Nat Med, 2011, 65(3-4):588.
[7] Son J K, Jung S J, Jung J H, et al. Anticancer constituents from the roots of *Rubia cordifolia* L. [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2008, 56(2):213.
[8] 张卫华,张振凌,黄显峰,等.茜草饮片炒炭前后止血机制的比较[J].中华中医药杂志,2006,21(3):160.
[9] 余旭东,杨季菱.茜草与茜草炭药理作用比较研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(9):53.
[10] 金永喜,郭磊,李勇,等.逐瘀通络汤对脑出血大鼠纤溶系统的影响[J].中华中医药学刊,2010,28(8):1741.
[11] 杜美蓉,戴长林.益气活血方对血瘀证大鼠凝血-纤溶系统的影响[J].现代医药卫生,2002,18(2):90.
[12] 何希瑞,樊鹏程,李茂星,等.常用止血中药及其止血机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(15):217.

[责任编辑 李玉洁]