

凝血酶时间法的改进及对四物汤类方筛选研究

刘立, 马宏跃, 段金廛*, 唐于平, 宿树兰, 郭建明, 周婧
(南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 改进凝血酶时间(TT)法, 使其更适合体外凝血酶抑制剂筛选。并用此方法测定比较四物汤类方及方中代表性成分的抗凝血酶活性。方法: 建立凝血酶浓度对 lgTT 延长率(%)的标准曲线, 对影响凝血酶活性的相关因素进行考察, 如血浆的储存条件; 药物溶媒的选择; 药物与凝血酶预温时间。并且测定比较四物汤(SW)、少腹逐瘀汤(SF)、香附四物汤(XF)、桃红四物汤(TH)、芩连四物汤(QL)的抗凝血酶活性。对方中代表性成分的抗凝血酶活性进行测定。结果: 获得改进凝血酶时间法的适宜条件; 筛选结果显示四物汤类方均有明显的抗凝血酶活性, 抑制性的强弱顺序为 QL($IC_{50} = 1.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > SF($IC_{50} = 1.39 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > XF($IC_{50} = 3.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > SW($IC_{50} = 8.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > TH($IC_{50} = 10.94 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); 活性成分槲皮素也具有显著抗凝血酶活性。结论 该研究建立了一种凝血酶抑制剂筛选的便捷方法, 证实了四物汤类方及成分具有直接抗凝血酶的活性, 为深入解析活血化瘀方中靶向凝血酶的活性物质奠定了基础。

[关键词] 改进凝血酶时间法; 四物汤类方; 抗凝血酶活性

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)04-0068-04

The Development of a Bioassay Called Thrombin Time and Application of the Bioassay in Study on Siwu Decoction and its Serial Decoctions

LIU Li, MA Hong-yue, DUAN Jin-ao*, TANG Yu-ping, SU Shu-lan, GUO Jian-ming, ZHOU Jing
(Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** A bioassay called thrombin time (TT) was developed for screening potential thrombin inhibitor and determining anti-thrombin activities of Siwu Decoction and its serial decoctions and some representative compositions. **Methods:** The lgTT prolongation rate was found to be linearly related to thrombin concentration. The effects of thrombin activities were studied, for example plasma storage methods and time, the chosen of solvent, drug and thrombin pre-heating time. Inhibitory activities of Siwu Decoction and its serial decoctions were compared including Shaofu Zhuyu Decoction (SF), Xiangfu Siwu Decoction (XF), Taohong Siwu Decoction (TH), Qinlian Siwu Decoction (QL). Inhibitory activities of some compositions were determined. **Results** The suitable condition of optimized bioassay TT is got. Siwu Decoction and its serial decoctions have obvious anti-thrombin activities. Anti-thrombin activities of those decoctions are ranked in the order of QL($IC_{50} = 1.30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > SF($IC_{50} = 1.39 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > XF($IC_{50} = 3.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > SW($IC_{50} = 8.14 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) > TH($IC_{50} = 10.94 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Active composition of quercetin also has anti-thrombin activities. **Conclusion** The optimized method is simple to screen thrombin inhibitor and lays the foundation for compositions of Siwu Decoction and its serial decoctions.

[Key words] The optimized TT; Siwu Decoction and its serial decoctions; Anti-thrombin activities

[收稿日期] 2008-11-18

[基金项目] 江苏省高校自然科学重大基础研究资助项目(06KJA36022); 江苏省方剂研究重点实验室“青年学者培养计划”(LTCMF20071202)

[通讯作者] * 段金廛, Tel: (025) 85811116; E-mail: dja@njutcm.edu.cn

凝血酶是凝血过程的关键酶。当血管组织损伤时,血浆因子、组织因子及血小板的释放导致凝血酶原致活物的生成,凝血酶原转变成有活性的凝血酶,进而促进血浆纤维蛋白原转变成不溶性的纤维蛋白。当在研究血栓、血瘀等血液病症的时候,凝血酶可以作为此类药物的重要靶点。

本实验通过对传统凝血酶时间法的改进,测定比较了活血化瘀方四物汤类方,治疗寒凝血瘀证少腹逐瘀汤(SF)、治疗气滞血瘀证香附四物汤(XF)、治疗血虚血瘀证桃红四物汤(TH)、治疗湿热瘀阻证芩连四物汤(QL)的抗凝血酶活性。同时测定四物汤类方中几个代表性化合物的抗凝血酶活性。

1 材料

1.1 试剂 凝血酶(希森三和集团生物制品有限公司,批号:20080816);三羟甲基氨基甲烷(tris 碱,上海精析化工科技有限公司,批号:080413);枸橼酸钠(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:080413);黄芩苷、盐酸小檗碱、异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷、槲皮素、阿魏酸、原儿茶酸(江苏省生物药品检查所)。

1.2 仪器 LG-PABER-I 型血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司);Anke(TDL-40B)离心机(上海安寿科学仪器厂)

1.3 动物 ♀和 ♂SD 大鼠,体重 180~220 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005。

1.4 组方药材 参照文献^[1]。

2 方法

2.1 改进 TT 法测定凝血时间 大鼠颈总动脉切断取血,全血与抗凝剂(3.8% 枸橼酸钠)9:1 混匀,2 500 r·min⁻¹离心 15 min 制备待测血浆。在测定杯中加入待测血浆 50 μL,37 °C 预温 3 min 后加入共同预温一定时间的 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液稀释的 15 U·mL⁻¹ 凝血酶溶液 100 μL 和生理盐水 10 μL。在加入凝血酶溶液的同时启动凝血因子分析仪记录凝血时间 TT₀。

2.2 标准曲线的绘制 TT 延长率(%) = (TT - TT₀) / TT₀ × 100。用不同浓度的凝血酶,测得凝血时间 TT。计算 TT 延长率(%)。以 lgTT 延长率(%) 对凝血酶浓度作图,得凝血酶浓度对 lgTT 延长率(%) 的影响标准曲线。

2.3 影响抗凝血酶活性的相关因素考察 血浆储藏方式,考察第 1、第 2、第 3、第 4 天血浆,4 °C 和

-20 °C 储存对其影响^[2]。药物溶媒,考察终浓度 6.67%,5%,2.5%,1%,0.75%,0.5%,0.25%,0.1% 浓度的 DMSO 和乙醇对凝血酶活性的影响。预温时间,选择 15,30,45 min 3 个时间点,考察药物和凝血酶预温时间对抗凝活性的影响。

2.4 样品制备 分别称取 10 倍处方量药材,按照组方药材组成进行配比,经粉碎至粒径为 40 目,水煎煮 2 次,第 1 次 10 倍量水煎煮 2 h,第 2 次 8 倍量水煎煮 1.5 h。合并两次水煎液,减压回收溶剂至一定体积,并烘干成水提浸膏,用相应溶媒解制备受试药物备用。

2.5 测定四物汤类方抗凝血酶活性 血浆样品 50 μL 加入测试杯中,37 °C 预温 3 min,加入共同预温 15 min 的待测样品 10 μL 和 15 U·mL⁻¹ 凝血酶 100 μL,记录 TT,计算 lgTT 延长率(%),根据标准曲线,计算凝血酶活力。以生理盐水作对照。

2.6 测定方中代表性成分抗凝血酶活性 分别测定 25 μmol·L⁻¹,50 μmol·L⁻¹,100 μmol·L⁻¹,黄芩苷、盐酸小檗碱、异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷、槲皮素、阿魏酸、原儿茶酸抗凝血酶活性,方法同 2.5。

2.7 数据处理 各组数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,组间相关指标采用方差分析(ANOVA,两两比较用 LSD 检验),所有统计分析全部由 SPSS 11.5 完成。

3 结果

3.1 标准曲线建立 凝血酶浓度对 lgTT 延长率(%) 的标准曲线显示,其线性范围均为 5~13 U,线性方程为 $Y = -0.1504X + 3.0897$, $r = -0.99$,结果见图 1。

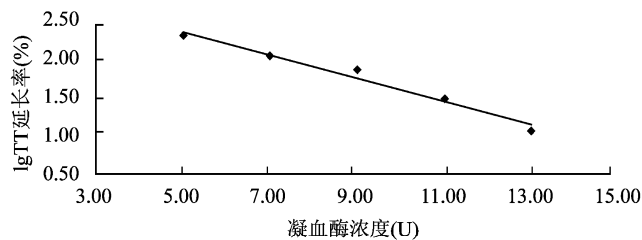


图 1 凝血酶浓度与 lgTT 延长率(%) 的关系

3.2 影响凝血时间的相关因素考察

3.2.1 血浆储藏方式对凝血时间的影响 4 °C, -20 °C 保存血浆时,第 1、第 2、第 3、第 4 天 TT 变化,与第 1 天结果比较。4 °C 保存的血浆第 2、第 3 天的凝血时间没有明显差异($P > 0.05$),而第 4 天出现了显著的差异($P < 0.01$)。-20 °C 保存的血浆第 2 天起就出现了显著的差异($P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 血浆储藏方式对 TT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

温度	血浆储藏天数 TT(S)			
	d 1	d 2	d 3	d 4
4 °C	17.37 ± 0.12	17.43 ± 0.40	17.03 ± 0.50	21.63 ± 0.42 ¹⁾
- 20 °C	—	19.77 ± 0.42 ¹⁾	21.73 ± 1.61 ¹⁾	25.53 ± 1.27 ¹⁾

与 d1 结果比较: ¹⁾ $P < 0.01$

3.2.2 药物溶媒对凝血时间的影响 溶媒 DMSO 终浓度 6.67%, 5% 和 2.5% 对凝血酶时间影响与生理盐水组比较有显著的差异 ($P < 0.01$); 1% DMSO

表 2 溶媒对 TT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

溶媒	溶媒终浓度(%) TT(S)							
	6.67	5	2.5	1	0.75	0.5	0.25	0.1
DMSO	31.60 ± 0.29 ²⁾	25.55 ± 0.76 ²⁾	20.48 ± 0.97 ²⁾	19.13 ± 1.08 ¹⁾	18.25 ± 0.37	17.80 ± 0.18	17.85 ± 0.19	17.18 ± 0.87
乙醇	17.6 ± 0.36	18.83 ± 0.99	18.68 ± 1.08	17.10 ± 0.50	17.20 ± 0.56	17.68 ± 0.99	17.88 ± 0.98	17.48 ± 0.46
NS	17.13 ± 0.97							

与 NS 组结果比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

表 3 预温时间对 SF 抗凝活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

时间(min)	不同 SF 浓度下凝血酶浓度(U)			
	1 mg·mL ⁻¹	2.5 mg·mL ⁻¹	5 mg·mL ⁻¹	10 mg·mL ⁻¹
15	8.23 ± 0.09	7.09 ± 0.31	5.59 ± 0.06	6.13 ± 0.09
30	8.09 ± 0.05	7.02 ± 0.10	5.33 ± 0.16	6.08 ± 0.13
45	7.94 ± 0.21	6.95 ± 0.07	5.40 ± 0.16	6.06 ± 0.08

3.3 四物汤类方对凝血酶活性的影响 SW, SF, XF, TH, QL 对凝血酶活性均有抑制作用。LSD 法多重比较表明: SW 与 SF, TH, QL 抗凝血酶活性有显著差异 ($P < 0.01$); SF 与 SW, XF, TH 抗凝血酶活性有显著差异 ($P < 0.01$); XF 与 SF, TH, QL 抗凝血酶活性有显著差异 ($P < 0.01$); TH 与 SW, SF, XF, QL 抗凝血酶活性有显著差异 ($P < 0.01$); QL 与 SW, XF, TH 有抗凝血酶活性显著差异 ($P < 0.01$)。其中 SW 与 XF 抗凝血酶活性无显著差异 ($P > 0.05$); SF 与 QL 抗凝血酶活性无显著差异 ($P > 0.05$)。计算得 SW, SF, XF, TH, QL 的 IC₅₀。抑制凝血酶活性强弱顺序为 QL > SF > XF > SW > TH, 结果见表 4。

3.4 四物汤类方中代表性成分对凝血酶活性的影响 盐酸小檗碱和槲皮素抗凝血酶活性与剂量负相关, 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷、阿魏酸和原儿茶酸抗凝血酶活性与剂量正相关, 25 μmol·L⁻¹ 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷、25 μmol·L⁻¹ 阿魏酸和 25 μmol·L⁻¹ 原儿茶酸无抗凝活性, 50 μmol·L⁻¹ 和 100 μmol·L⁻¹ 盐酸小檗碱无抗凝活性, 结果见表 5。

对凝血酶时间影响与生理盐水组比较有差异 ($P < 0.05$); 0.75%, 0.5%, 0.25% 和 0.1% DMSO 对凝血酶时间影响与生理盐水组比较无明显差异 ($P > 0.05$); 溶媒乙醇终浓度 6.67%, 5%, 2.5%, 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25% 和 0.1% 对凝血酶时间影响与生理盐水组比较无明显差异 ($P > 0.05$), 结果见表 2。

3.2.3 预温时间对抗凝血酶活性的影响 以 SF 为例, SF 与凝血酶共同预温 15, 30, 45 min, 不同浓度的 SF 抗凝血酶活性无显著变化 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

4 讨论

4.1 标准曲线的建立 在建立标准曲线时, 比较 4 种对凝血酶浓度作图方法。TT, lgTT, TT 延长率(%), lgTT 延长率(%) 分别对凝血酶浓度作图。TT 对凝血酶浓度作图的相关系数仅为 -0.93, lgTT 对凝血酶浓度作图相关系数为 -0.98。但因每次实验血浆取自不同的老鼠, 存在着个体差异, 所以每次都必须做空白对照组, 取 TT 延长率(%)、lgTT 延长率(%) 对凝血酶浓度作图数据更具有可比性且保持数据的稳定。其中 TT 延长率(%) 对凝血酶浓度作图相关系数为 -0.96, 而 lgTT 延长率(%) 对凝血酶浓度作图相关系数最佳为 -0.99。所以选择 lgTT 延长率(%) 对凝血酶浓度作图, 数据进行对数转换, 计算药物抗凝血酶的抑制活性。

4.2 TT 法的改进 本论文对传统 TT 法进行了改进, 使其适于体外凝血酶活性测定。传统 TT 法应用于临床诊断血栓性疾病与出血性疾病的检查, 血浆必须当日采集。改进 TT 法用于凝血酶抑制剂的筛选, 为了避免每日动物采血的麻烦, 提高实验效率, 可将采集好的血浆于 4 °C 冷藏, 3 天之内对筛选结果不会有显著的影响。- 20 °C 保存血浆, 在血浆融化过程中, 有黏液式的成块状物质出现, 可能使纤维蛋白原损失, 导致凝血时间延长。实验中, 传统 TT 法通常都是体内给药数天后采集血浆, 测得 TT 值^[3-4]。但改进 TT 法是直接体外加药。加药的方式有两种: 一种将药物与血浆共同预温; 另一种是

表 4 SW, SF, XF, TH, QL 的抗凝血酶活性($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

方剂	剂量 (mg·mL ⁻¹)	TT 延长率 (%)	lgTT 延长率 (%)	凝血酶浓度 (U)	平均 抑制率 (%)	IC ₅₀ (mg·mL ⁻¹)
SW	0.5	52.94 ± 2.86	1.72 ± 0.02	9.08 ± 0.16	39.43	8.14
	1	56.21 ± 2.42	1.75 ± 0.02	8.91 ± 0.12	40.59	
	2.5	71.55 ± 5.07	1.85 ± 0.03	8.22 ± 0.20	45.23	
	5	81.11 ± 3.64	1.91 ± 0.02	7.85 ± 0.13	47.66	
	10	98.45 ± 2.07	1.99 ± 0.01	7.29 ± 0.06	51.39	
SF	0.5	110.46 ± 5.54	2.04 ± 0.02	6.96 ± 0.15	53.59	1.39
	1	79.98 ± 14.89	1.90 ± 0.08	7.92 ± 0.53	47.18	
	2.5	118.57 ± 20.88	2.07 ± 0.07	6.78 ± 0.49	54.79	
	5	187.66 ± 12.27	2.27 ± 0.03	5.43 ± 0.19	63.79	
	10	149.75 ± 4.41	2.18 ± 0.01	6.08 ± 0.09	59.47	
XF	0.5	53.35 ± 3.81	1.73 ± 0.03	9.07 ± 0.21	39.56	3.55
	1	64.96 ± 10.41	1.81 ± 0.07	8.51 ± 0.45	43.24	
	2.5	81.67 ± 2.01	1.91 ± 0.01	7.83 ± 0.07	47.80	
	5	101.08 ± 10.24	2.00 ± 0.04	7.22 ± 0.29	51.84	
	10	54.49 ± 13.94	1.74 ± 0.11	9.06 ± 0.76	39.57	
TH	0.5	38.46 ± 0.53	1.58 ± 0.01	10.00 ± 0.04	33.30	10.94
	1	25.02 ± 9.84	1.38 ± 0.15	11.37 ± 1.02	24.18	
	2.5	33.22 ± 1.00	1.52 ± 0.01	10.43 ± 0.09	30.48	
	5	50.19 ± 1.56	1.70 ± 0.01	9.24 ± 0.09	38.42	
	10	58.83 ± 8.20	1.77 ± 0.06	8.78 ± 0.39	41.36	
QL	0.5	58.93 ± 9.45	1.77 ± 0.07	8.80 ± 0.49	41.32	1.30
	1	158.69 ± 5.44	2.20 ± 0.01	5.91 ± 0.10	60.58	
	2.5	146.15 ± 6.35	2.16 ± 0.02	6.15 ± 0.13	58.99	
	5	155.27 ± 8.55	2.19 ± 0.02	5.98 ± 0.16	60.15	
	10	175.40 ± 3.24	2.24 ± 0.01	5.62 ± 0.05	62.51	

表 5 异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷、阿魏酸、原儿茶酸、槲皮素、盐酸小檗碱、抗凝血酶活性($\bar{x} \pm s, n = 6 \sim 8$)

化学成分	剂量 (μmol·L ⁻¹)	TT 延长率 (%)	lgTT 延长率 (%)	凝血酶浓度 (U)	平均抑 制率(%)
异鼠李素	25	7.80 ± 6.34	0.81 ± 0.40	15.19 ± 2.67	—
-3-O-新橙皮糖苷	50	15.37 ± 2.79	1.18 ± 0.08	12.69 ± 0.55	15.43
阿魏酸	25	7.80 ± 7.08	0.78 ± 0.47	15.38 ± 3.11	—
	50	15.91 ± 5.45	1.18 ± 0.17	12.69 ± 1.11	15.42
	100	21.77 ± 12.67	1.30 ± 0.27	11.92 ± 1.79	20.56
原儿茶酸	25	13.86 ± 8.95	1.09 ± 0.30	13.29 ± 2.01	—
	50	14.73 ± 6.19	1.13 ± 0.21	13.00 ± 1.41	13.28
	100	22.83 ± 9.69	1.34 ± 0.19	11.65 ± 1.27	22.35
盐酸小檗碱	25	21.19 ± 7.62	1.30 ± 0.17	11.91 ± 1.14	21.00
槲皮素	25	55.38 ± 10.52	1.74 ± 0.09	9.00 ± 0.57	40.00
	50	57.73 ± 23.37	1.72 ± 0.20	9.09 ± 1.32	39.00
	100	19.69 ± 8.20	1.26 ± 0.19	12.15 ± 1.26	19.00

将药物与凝血酶共同预温。因改进 TT 法应用于凝血酶抑制剂的筛选, 所以药物与凝血酶共同预温更能反应药物对凝血酶的直接作用。本实验证明药物与凝血酶预温时间在 15~ 45 min 内其抗凝活性差异不显著, 可以缩短预温时间提高实验效率。

4.3 药物溶媒的考察 样品溶解度是影响药物体外筛选结果的关键因素, 本实验证明溶媒 DMSO 的终浓度控制在 0.75% 以内及乙醇的终浓度控制在 6.67% 以内对凝血时间没有显著影响, 故对于溶解度小的待筛成分, 本方法可以使用无水乙醇助溶。

4.4 本研究建立一种凝血酶抑制剂筛选的便捷方法 其适宜条件是: 药物溶媒为 75% 乙醇, 药物用量 10 μL, 15 U·mL⁻¹ 凝血酶(以凝血时间计: 17~ 19 s) 用量 100 μL, 药物与凝血酶预温 15 min, 4 °C 储藏 3 d 内制备的血浆 50 μL。上述条件适于中药提取物及大部分化学成分抗凝血酶活性筛选。

4.5 比较四物汤类方及成分抗凝血酶活性 四物汤类方水煎液有显著的抗凝血酶活性。除 TH 外, 四物汤加减化裁各方的抑制作用总体上呈现出强于四物汤的趋势, 其中 QL 和 SF 对凝血酶的抑制作用较强。进一步对 QL 和 SF 方中代表化合物(黄芩苷、盐酸小檗碱、异鼠李素-3-O-新橙皮糖苷、槲皮素、阿魏酸、原儿茶酸) 进行筛选, 发现槲皮素具有较强的抗凝血酶活性, 其它化合物抗凝血酶活性弱。本研究证实了四物汤类方具有抗凝血酶活性, 并初步筛选其活性成分, 为深入解析活血化瘀方中靶向凝血酶的活性物质奠定了基础。

[参考文献]

[1] 华永庆, 段金廛, 宿树兰, 等. 用于不同证型痛经的四物汤类方生物效应评价(I) [J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(1): 72-76.

[2] 陈林兴, 黄 华. 时间和温度对凝血酶原时间、活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、纤维蛋白原检测结果的影响分析 [J]. 汕头大学医学院学报, 2004, 17(1): 42-43.

[3] 任洪灿, 芮 明, 韩国柱, 等. 凝血酶时间法测定家兔血浆中重组水蛭素 [J]. 分析化学研究简报, 2006, 34(4): 547-550.

[4] 阎宇辉, 王一楠, 韩国柱, 等. 凝血酶时间法测定家兔尿液及胆汁中 r-水蛭素 [J]. 分析化学研究简报, 2007, 35(5): 691-694.