

止血散对凝血系统的影响

刘俭, 田泽, 刘振秀, 赵翠兰

(中国医学科学院协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 止血散灌胃给药在大剂量时可延长小鼠的凝血时间, 但小剂量可明显缩短小鼠的出血、凝血时间。体外研究表明, 止血散具有增强兔血小板聚集作用, 最大增强率达 38.58%。此外, 止血散还可延长兔凝血酶原时间, 血浆复钙时间, 同时能延长兔的优球蛋白溶解时间及兔全血聚凝块溶解时间。

关键词: 止血散; 促凝血; 血小板聚集

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** D **文章编号:** 1005-9903(2001)04-0031-03

止血散主要由紫草、三七、黄芪、阿胶等相互配伍提取加工制成。具有凉血解毒, 益气养血止血功效, 用于血热气虚, 瘀血发癍, 见有面色萎黄, 神疲乏力, 食少纳呆, 肌衄发斑或痹衄、跟衄或妇女月经量多及血小板减少性紫癜等证。为了研究其止血功能, 我们进行了以下药理学实验研究, 以便为临床用药提供理论依据。

1 实验材料

1.1 药品 止血散北京市宣武区椿树医院制剂, 京安疑难病研究所提供, 批号 990918。体外实验所用药液的制备方法为: 止血散用生理盐水溶解, 然后放在 90℃水浴中保温 3h, 此药液需经滤纸过滤, 再经 $\phi 0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤两次后, 放 4℃冰箱中储存备用, 实验时用生理盐水配到所需浓度。

1.2 动物 昆明种小鼠, 雌、雄兼用, 体重 20~25g, 大耳白兔, 雌、雄兼用, 体重 450±30g, 均由北京市海淀区通利试验动物养殖厂提供, 动物合格证号: 2000 第 013 号, 总 058 号。

1.3 试剂 二磷酸腺苷(ADP), 凝血酶(Thrombin)均为 Sigma 公司产品; 戊巴比妥钠, 化学纯, 佛山市化工实验厂, 批号: 860901; 枸橼酸钠, 草酸铵, 醋酸, 硼砂, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, NaH₂PO₄ 均为市售分析纯; 云南白药购于同仁堂药店, 制备过程同止血散, 过滤后药液放 4℃冰箱备用。

1.4 实验仪器 BS634 型血小板聚集仪, 北京生化仪器厂; 普通离心机, 分析天平, 恒温水浴。

2 方法与结果

2.1 止血散对 ADP 诱导的兔体外血小板聚集的影响

兔, 戊巴比妥钠腹腔麻醉, 45mg/kg, 3.8% 枸橼酸钠 1:9 抗凝, 腹主动脉取血。1000rpm 离心 6min, 吸取上层富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP)。余下部分再以 3000rpm 离心 15min, 即得寡血小板血浆 (platelet-poor plasma, PPP)。以 PPP 调 PRP 使透光度在 30 左右(血小板数在 $4 \times 10^8/\text{ml}$)。取 200 μl PRP 与 25 μl 不同浓度的止血散, 云南白药或生理盐水于 37℃温孵, 在电磁搅拌下加入 ADP 致聚剂, 终浓度为 0.01mg/ml, 诱导血小板聚集, 计算最大聚集率和促进百分率。结果见表 1。

表 1 止血散对 ADP 诱导的兔体外血小板聚集的影响 (n=8)

组别	剂量 (g/ml)	最大聚集百分率 (%)	促进百分率 (%)
空白对照	-	50.75 ± 7.96	-
止血散	9.4×10^{-2}	70.33 ± 15.63**	38.58
止血散	4.7×10^{-2}	63.75 ± 16.08*	25.61
云南白药	9.4×10^{-2}	38.81 ± 13.76*	-22.05
云南白药	4.7×10^{-2}	45.24 ± 10.48	-10.86

注: 与空白对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (下同)

表 1 显示止血散能够促进 ADP 诱导的血小板聚集, 且在 0.094g/ml 浓度时对血小板的二项聚集呈现出促进作用; 而云南白药在剂量 0.094g/ml 浓度时对血小板的聚集呈现出抑制作用。

2.2 止血散对小鼠出血、凝血时间的影响^[2] 小鼠随机分为空白对照组 (ig 等体积蒸馏水); 止血散五个剂量组和云南白药组, 连续灌胃 2 周, 于末次给药 30min 后玻管法测定小鼠凝血时间。次日用剪尾法测定出血时间(表 2)。

表2 止血散对小鼠凝血时间的影响

组别	动物数	剂量(g/kg)	凝血时间(s)	出血时间(s)
空白对照	33	-	247.13±47.23	450.47±185.39
云南白药	11	0.667	412.78±75.72***	585.32±177.06
止血散	11	0.667	204.64±42.08*	182.91±88.62***
止血散	11	0.333	216.55±66.30	215.64±89.96***
止血散	11	6.66	294.45±71.37	575.60±254.45
止血散	11	3.33	311.15±76.59*	571.80±244.95
止血散	11	1.67	251.10±56.64	524.00±235.77

从表2可知止血散在剂量0.667g/kg时,能够明显缩短小鼠凝血时间,同时止血散在剂量0.667,0.333g/kg时亦能缩短小鼠出血时间,且0.667g/kg剂量组作用较强。然而灌胃止血散剂量在3.33g/kg时小鼠的凝血时间却明显长于空白对照组小鼠。此外云南白药组小鼠的出血时间也都长于空白对照组小鼠,但其中只有凝血时间的延长与对照组比差异显著。

2.3 止血散对兔凝血功能和纤溶活性的影响

2.3.1 对兔血浆复钙时间的影响^[3] 兔,45mg/kg戊巴比妥钠腹腔麻醉,3.8%枸橼酸钠1:9抗凝,腹主动脉取血。抗凝血以1000rpm离心12min,得血浆,每管加入血浆0.1ml,加入止血散或生理盐水25μl,加入1/40M CaCl₂各0.1ml,混均后放入37℃水浴中,同时开始计时,1min后每隔5-10S缓慢倾斜试管一次,记录自放入水浴至液面不动所需时间。结果见表3。

表3 止血散对兔血浆复钙时间的影响(n=8)

组别	剂量(g/ml)	血浆复钙时间(S)
空白对照	-	205.38±30.59
止血散	9.4×10 ⁻²	210.13±29.40
止血散	4.7×10 ⁻²	215.63±23.71
止血散	9.4×10 ⁻³	259.13±27.53**

2.3.2 止血散对兔血浆凝血酶原时间的影响^[3]

兔,45mg/kg戊巴比妥钠腹腔麻醉,3.8%枸橼酸钠1:9抗凝,腹主动脉取血。抗凝血以3000rpm离心12min,分离血浆。取内径均匀的试管,每管加入凝血活酶和1/40M CaCl₂各0.1ml,加入止血散或生理盐水各30μl,加入血浆0.1ml,立即开始计时,将试管置37±1℃水浴中温育,不断倾斜试管进行观察,当试管内出现凝胶状纤维蛋白,液面不动,停止计时。结果见表4。

表4 止血散对兔血浆凝血酶原时间的影响(n=8)

组别	剂量(g/ml)	凝血酶原时间(S)
空白对照	-	9.38±1.06
止血散	9.4×10 ⁻²	11.00±2.00
止血散	1.9×10 ⁻²	15.88±4.64**
止血散	9.4×10 ⁻³	37.88±9.51***
止血散	6.3×10 ⁻³	20.13±9.69**
止血散	4.7×10 ⁻³	9.87±1.25

2.3.3 止血散对兔全血浆凝块溶解时间的影响^[4]

兔,45mg/kg戊巴比妥钠腹腔麻醉,3.8%枸橼酸钠1:5抗凝,腹主动脉取血。抗凝血以3000转/min离心10min,分离血浆。取血浆0.25ml置小试管内,在37℃水浴中,加入止血散或N.S15μl,凝血酶0.05ml(5u),使其凝固,观察血浆块溶解情况,记录血浆块溶解所需的时间(表5)。

表5 止血散对兔全血浆凝块溶解时间的影响(n=8)

组别	剂量(g/ml)	血浆凝块溶解时间(min)
空白对照	-	318.50±47.46
止血散	9.4×10 ⁻²	485.00±97.10***
止血散	1.9×10 ⁻²	674.87±114.64***
止血散	9.4×10 ⁻³	427.50±51.20***
止血散	4.7×10 ⁻³	386.38±82.72

2.3.4 止血散对兔优球蛋白溶解时间(ELT)的影响

兔,45mg/kg戊巴比妥钠腹腔麻醉,3.8%枸橼酸钠1:9抗凝,腹主动脉取血。抗凝血以3000rpm离心12min,得无血小板血浆。取血浆0.5ml,加入9ml蒸馏水,再加1%醋酸溶液0.1ml,使pH值为4.5,充分混合后,将混合液置于4℃冰箱中10min。优球蛋白遇弱酸沉淀,再以3000rpm的转速离心5min,弃去上清,将沉淀管倒置于滤纸上,吸取多余的液体。加硼砂缓冲液(pH=9)0.5ml于沉淀管中,搅溶约1min。加生理盐水或止血散50μl,将试管放入37℃水浴中2min后,在加1/40M CaCl₂各0.5ml,待其凝固。每隔10min观察一次,直至凝块完全溶解为止,记录其溶解所需的时间。结果见表6。

表6 止血散对兔优球蛋白溶解时间(ELT)的影响(n=8)

组别	剂量(g/ml)	优球蛋白溶解时间(min)
空白对照组	-	374.00±97.96
止血散	9.4×10 ⁻²	677.13±159.52***
止血散	1.9×10 ⁻²	357.25±86.01
止血散	9.4×10 ⁻³	351.25±96.69

3 讨论

凝血时间大部分是内源性凝血活酶生成所需的

时间,其长短与第 VIII、IX、XI等因子密切相关,我们的研究表明:止血散当用至成人剂量 4 倍时(0.666g/kg)能缩短小鼠出凝血时间,然而在用至成人剂量 20 倍时(3.33g/kg)止血散则有延长小鼠出凝血时间的作用,提示止血散对体内凝血因子有双向调节作用。血浆复钙时间长短直接反映了内源性凝血系统的功能;而凝血酶原时间可反映外源性凝血系统的功能,实验证明止血散可延长兔血浆复钙时间、凝血酶原时间,提示其对内源性和外源性凝血系统均有一定抑制作用,这说明止血散即有促凝血作用又有活血化瘀之功效。这也正是止血散的优势所在。优球蛋白是溶于盐而不溶于水的一类球蛋白,它含有纤维蛋白原、纤维蛋白酶原及其激活物,不含纤溶抑制物;全血浆凝块既包含纤溶抑制物也包含纤溶激活物。研究证明止血散既能够延长优球蛋白溶解时间,又对全血浆凝块溶解时间有明显延长作用,这说明其抑制纤溶活性的作用可能与抑制纤溶激活物和激活纤溶抑制物有关。血小板也是凝血系统中重要的组成部分,实验证明止血散能够促

进 ATP 透导的血小板聚集反应,并在剂量 9.4×10^{-2} g/kg 时对血小板的二项聚集呈现出促进作用。总之,止血散是通过影响内外源凝血系统、血小板功能及对纤溶激活物的抑止等方面的作用而发挥其止血活性的。

参考文献:

- [1] 佟丽,岳天立. 蝙蝠葛碱对血小板聚集及花生四烯酸代谢的影响[J]. 药学报, 1989, 24(2): 85-88.
- [2] 李仪奎,王钦茂. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989. 496.
- [3] 杜力军,何卫世,国月英,等. 三七止血活血机理的研究 I. 不同剂量三七对小鼠凝血系统的作用[J]. 中药药理与临床, 1995. (3): 25-27.
- [4] 陈奇,邓文龙,张世玮,等. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 481.
- [5] 王北婴. 中药新药研制与申报[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 248.
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1975. 2342, 54, 2057, 1184.