

地龙提取物的抗凝血作用

何红^{1,2}, 丰庆明^{1*}, 孙启时²

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 研究地龙提取物的抗凝血作用。方法 观察地龙提取物对小鼠凝血、出血时间和家兔离体血浆复钙时间的影响, 测定提取物中游离氨基酸的量。结果 地龙提取物能延长小鼠凝血、出血时间和家兔离体血浆复钙时间。游离氨基酸测定结果表明, 提取物中含有丰富的氨基酸。结论 地龙提取物所含的游离氨基酸可能是其抗凝血作用的有效成分。

关键词:地龙; 抗凝血作用; 氨基酸

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)05-0733-03

Anticoagulant effects of *Pheretima* extractsHE Hong^{1,2}, CHE Qing-ming¹, SUN Qi-shi²

(1. College of Pharmaceutical Science, Beijing University, Beijing 100083, China; 2. College of Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To study the anticoagulant effects of *Pheretima* extracts and analyze the effective constituents. **Methods** Antithrombotic effects of *Pheretima* extracts were observed by determining the coagulation time, bleeding time of mice and the recalcification time of rabbit plasma *in vitro*, meanwhile the content of free amino acid in the extracts were determined. **Results** *Pheretima* extracts could prolong the coagulation time, bleeding time of mice, and the recalcification time of rabbit plasma *in vitro*. The content of free amino acid was rich in *Pheretima* extracts. **Conclusion** Free amino acid in *Pheretima* extracts may be the main anticoagulant effective constituents.

Key words: *Pheretima*; anticoagulant effects; amino acid

地龙是一味常用传统中药, 为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 的干燥体, 具有清热定惊、平喘通络的功效, 用于高热神昏、关节痹痛、半身不遂等症。现代研究发现地龙具有中枢抑制、松弛平滑肌、抑制血栓形成、解热、降压等作用^[1]。

1983年 Mihara 等发现人口服地龙提取物后有直接溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原作用后, 地龙在凝血、抗血栓方面的作用备受关注, 但多数研究的重点集中在地龙对纤溶酶的作用方面。由于口服的酶制剂难于吸收及在消化系统易被水解为氨基酸, 且中药汤剂需长时间煎煮, 酶易变性失活等原因, 笔者认为地龙提取物的有效成分可能不是其活性酶, 而是降解产物或小分子化合物, 所以本实验对地

龙提取物的抗凝血活性和游离氨基酸的量进行了研究。

1 材料与方法

1.1 仪器: 日立-835型氨基酸自动分析仪(日本), 离心机(白洋离心机厂)。

1.2 药品与试剂: 广地龙购于北京首创大地药业有限公司, 经鉴定为参环毛蚓 *P. aspergillum* E. Perrier 的干燥体; 氯化钙为上海通亚精细化工厂; 枸橼酸钠为北京化工厂生产; 阿司匹林为北京双桥制药公司生产。

1.3 实验动物: ICR 雄性小鼠 50 只, 体重 18~22 g; 家兔 1 只, 体重 2.5 kg, 均由北京大学医学部实验中心提供。

1.4 地龙提取物的制备: 广地龙加 20 倍量水浸泡 12 h, 煎煮 2 次 (2、1.5 h), 减压浓缩, 浓缩液加石油醚萃取 3 次, 水相经离心 (4 000 r/min) 20 min 后

收稿日期: 2006-08-22

基金项目: 国家自然科学基金杰出青年项目 (30225049)

作者简介: 何红 (1979—), 女, 江苏昆山人, 沈阳药科大学药理学博士研究生, 研究方向为中药复方的现代研究。

E-mail: ks7912@sina.com

* 通讯作者 丰庆明 Tel: (010) 82802468 E-mail: cheqingming 2003@sina.com

浓缩至浸膏,浸膏加 95% 乙醇加热回流提取,滤过,回收乙醇得醇溶部分。

1.5 地龙提取物对小鼠凝血、出血时间及家兔血浆复钙时间的影响

1.5.1 地龙提取物对小鼠凝血时间的影响:ICR 小鼠 40 只,随机分为给药组和对照组,以人 20 g/d 生药量折算^[2],分别 ig 给予地龙提取物 (0.30、0.55、1.10 g/kg) 和等体积蒸馏水,连续给药 3 d。于末次给药 75 min 后用毛细玻璃管测定凝血时间^[3]。

1.5.2 地龙提取物对小鼠出血时间的影响:ICR 小鼠 30 只,随机分为 3 组,即给药组、阿司匹林组和对照组,分别 ig 给予地龙提取物 (0.55 g/kg)、阿司匹林羧甲基纤维素混悬液 (10 mg/kg) 和等体积蒸馏水,连续给药 3 d。参照文献方法^[4],将小鼠置于固定器中,使其尾部垂直,末次给药后 75 min,在距尾尖 5 mm 处剪断,从血自行流出后计时,每隔 30 s 用滤纸吸去血,直至滤纸吸时无血 (血液自然停止) 即为出血时间。

1.5.3 地龙提取物对家兔血浆复钙时间的影响:家兔静脉取血 4.5 mL,迅速加入装有 38 mg/mL 枸橼酸钠抗凝剂 0.5 mL 的离心管中,混匀后离心 (1 000 r/min) 10 min,分离血浆置冰浴备用。取试管 5 支,每管加入血浆和生理盐水各 0.1 mL,随即放入 37 ℃ 水浴温育 1 min,然后各加入 2.8 mg/mL CaCl_2 溶液 0.1 mL。混匀,加入时开动秒表,每隔 10 s 缓慢倾斜试管一次。记录自加入 CaCl_2 至纤维蛋白形成,即液面不动所需时间,计算 5 管均值,即为对照组血浆复钙时间。将生理盐水换成不同质量浓度的地龙提取物 0.1 mL,按相同方法求出提取组血浆复钙时间^[3]。

1.6 地龙提取物中游离氨基酸测定

1.6.1 样品液的制备:取地龙提取物干燥,精密称量,定容至 1 mL。再将样品溶液和磺基水杨酸以 1:1 混合,充分混匀,离心 (10 000 r/min) 15 min,取上清液直接上机测试。

1.6.2 样品测定:采用日本日立 835 型氨基酸自动分析仪,分析柱 2.6 mm×150 mm 不锈钢柱,离子交换树脂为日立 Hilachi gcl2619[®],柱温 53 ℃,体积流量 0.225 mL/min,压力 80~130 kg/cm²,循环时间 70 min,茚三酮体积流量 0.3 mL/min,压力 15~35 kg/cm²。分析变换 5,标准浓度 3 nmol/L,氮气压力 0.28 kg/cm²。

2 结果

2.1 地龙提取物对小鼠凝血、出血时间及家兔血浆

复钙时间的影响

2.1.1 地龙提取物对小鼠凝血时间的影响:结果见表 1。从表中可以看出,地龙提取物可显著延长小鼠凝血时间,与对照组比较差异极显著 ($P<0.001$)。

表 1 地龙提取物对小鼠凝血时间的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of *Pheretima* extracts on coagulation

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	凝血时间/s
地龙提取物	0.30	125±14**
	0.55	146±17***
	1.10	161±18***
对照	—	103±13

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

2.1.2 地龙提取物对小鼠出血时间的影响:结果见表 2。地龙提取物可延长小鼠尾尖出血时间,与对照组比较差异极显著 ($P<0.001$)。

表 2 地龙提取物对小鼠出血时间的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of *Pheretima* extracts on bleeding

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	出血时间/min
地龙提取物	0.55	11.6±4.1***
阿司匹林	0.01	8.2±2.3**
对照	—	5.9±2.1

与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

2.1.3 地龙提取物对家兔离体血浆复钙时间的影响:结果见表 3。地龙提取物能明显延长家兔离体血浆复钙时间,并随着其质量浓度的升高而呈现明显的量效关系,且与对照组比较均有显著性差异 ($P<0.001$)。

表 3 地龙提取物对家兔离体血浆复钙时间的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 Effect of *Pheretima* extracts at various concentrations on recalcification time of rabbit plasma *in vitro* ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	ρ /(mg·mL ⁻¹)	血浆复钙时间/s
地龙提取物	20	121±8
	40	286±25***
	80	412±39***
对照	—	118±13

与对照组比较: *** $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs control group

2.2 地龙提取物中游离氨基酸成分分析:结果见表 4。地龙提取物含有 19 种游离氨基酸,其中有人体所必需的 8 种氨基酸 (苏氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸),游离氨基酸总量占提取物的 26%。

表 4 地龙提取物中游离氨基酸成分分析
Table 4 Analysis of free amino acid content
in *Pheretima* extracts

氨基酸	质量分数/%	氨基酸	质量分数/%
牛磺酸	0.48	异亮氨酸	2.31
天冬氨酸	0.173	亮氨酸	5.92
苏氨酸	1.10	酪氨酸	0.354
丝氨酸	0.832	苯丙氨酸	2.95
谷氨酸	0.572	赖氨酸	1.31
甘氨酸	0.635	组氨酸	0.332
丙氨酸	3.2	色氨酸	0.295
γ -氨基丁酸	0.194	精氨酸	0.922
缬氨酸	2.50	脯氨酸	1.17
蛋氨酸	0.746	总氨基酸	26

3 讨论

实验结果表明,地龙提取物可明显延长小鼠凝血、出血时间及家兔离体血浆复钙时间,提示地龙提取物能抑制内源性凝血系统,具有抗凝血作用。

地龙提取物含有 19 种游离氨基酸,总量达 26% 以上。游离的谷氨酸、甘氨酸、酪氨酸、色氨酸、和组氨酸或是神经递质或是递质的前体物质,且质量分数最高的几种氨基酸缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸为脑内的能源物质,上述物质易通过血脑屏障,具有促进神经细胞更新、调节神经递质代谢、维护神经功能及抗脑组织缺氧等作用。另外量较高的苯丙氨酸、赖氨酸和精氨酸在心血管方面也有重要的作用^[5],赖氨酸是优良的血栓预防剂,与蛋氨酸合用能抑制重高血压病^[6];苯丙氨酸能预防某些有高血压病家族史“易感者”发病,降低心血管疾病的发病率;还可对抗自由基,防治缺血-再灌注损伤^[7];精氨酸是人体半必需氨基酸,可通过 L-Agr-NO 途径扩张血管、抑制血小板聚集、减少氧自由基损伤,用于治疗缺血性心脏病、高血压、肺动脉高压症、动脉粥样硬化等疾病^[8]。综上所述,推测地龙提取物中所含有

的游离氨基酸可能是地龙抗凝血作用的主要有效成分。

以往的多数研究认为地龙纤溶酶是抗血栓活性的有效成分,但临床上用的多为口服制剂,而口服的酶制剂在消化系统易被水解为氨基酸进入血液,因而推测地龙纤溶酶口服时实际发挥疗效的物质可能是其水解产物。本实验所用的不含活性纤溶酶的提取物具有抗凝血活性,且主要含有丰富的游离氨基酸,所以推断其氨基酸可能是临床上实际发挥抗凝血疗效的物质。

References:

- [1] Zhu D C, Zhang L H, Wang Y J. Separating and screening of the anti-inflammatory part of *Lumbricus* animal [J]. *J Dalian Inst Light Ind* (大连轻工业学院学报), 2004, 23(1): 34-38.
- [2] Chen X D, Tian D F, Liu H P, et al. An Investigation to the effect to *Pheretima* Decoction on bleeding time and blood clotting time in healthy young people [J]. *J Tradit Chin Med Univ Hunnan* (湖南中医学院学报), 2003, 23(2): 10-11.
- [3] Chen Q. *Experimental Methodology in Pharmacological of Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1994.
- [4] Tang S S, Teng D, Wang X H. Pharmacodynamics of Agacutin: a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon acutus* [J]. *Acta Acad Med Xuzhou* (徐州医学院学报), 2005, 25(4): 308-312.
- [5] Lin Y Z, Lin X Y, Wan F D, et al. The preparation and biological activity of hydrolysate of swine brain [J]. *Amino Acids Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 1999, 21(3): 5-8.
- [6] Tian J B, Jia X B, Yang Z H, et al. Application, production and market expectation of L-Lysine [J]. *Amino Acids Biotic Resour* (氨基酸和生物资源), 2004, 26(1): 44-46.
- [7] Peng K Y, Jin X R. Effects of cysteine and phenylalanine on pulmonary circulation and cerebral blood flow in chronic hypoxic rats [J]. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 1996, 12(2): 153-156.
- [8] Zhang J F, Gao L R, Lin Q H. Effects of treatment of cardiovascular diseases [J]. *J Cardiovasc Pulmon Dis* (心肺血管病杂志), 1994, 13(2): 125-127.

虎杖提取物对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

郑晓媛, 杜俊蓉*, 杨芳, 彭海燕, 陈维, 喻冬柯

(四川大学华西药学院 药理教研室, 四川 成都 610041)

摘要:目的 研究虎杖水溶性提取物对 α -葡萄糖苷酶的作用。方法 采用大孔吸附树脂柱色谱法进行虎杖水溶性总提取物初步分离, 研究其总提取物和不同组分对 α -葡萄糖苷酶活性的影响及其抑制反应的类型。结果 虎杖总提取物 (RRPC) 与 30% 醇洗脱物 (RRPC I) 对 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 分别为 74.15 μ g/mL, 而蒸馏水 (RRPC

收稿日期: 2006-10-13

基金项目: 四川大学辐射物理及技术教育部重点实验室开放基金资助 (LF04004)

* 通讯作者 杜俊蓉 Tel: (028) 85503938 E-mail: dujro7@gmail.com