

丹皮炭止血作用有效部位及作用机制研究

李 娟,张 丽,丁安伟*

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室,江苏 南京 210046)

摘 要:目的 首先确定丹皮炭止血作用的主要活性部位,进而探讨丹皮炭止血作用的机制。方法 首先对丹皮炭按不同溶剂极性不同化学成分类型提取,以小鼠的出血时间(BT)和凝血时间(CT)为筛选指标对各部位进行筛选;在此基础上以 Wistar 大鼠为研究对象,观察丹皮炭及其止血活性部位对大鼠血浆复钙时间(PRT)、凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)的影响。结果 丹皮炭鞣质部位、醋酸乙酯部位均可缩短小鼠的BT和CT;丹皮炭及其鞣质、醋酸乙酯部位均有缩短大鼠PRT、TT、PT、APTT的作用。结论 确定丹皮炭鞣质部位、醋酸乙酯部位为丹皮炭饮片止血作用的主要活性部位;丹皮炭及其止血活性部位通过激活内源性和外源性凝血系统中的多种凝血因子,发挥其止血、凝血作用,且丹皮炭饮片作用强于其活性部位。

关键词:丹皮炭;活性部位;止血

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)08-1278-03

牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,是中医临床常用中药之一,始载于《神农本草经》,列为中品,已有两千余年的药用历史。元代始即将牡丹皮制炭后用于临床,以治疗各种出血性疾病。长期的临床实践证明丹皮炭具有明显的止血作用,可用于吐血、崩漏及其他多种出血病症,疗效确切^[1]。然而目前国内外对丹皮炭止血机制的研究尚不深入。本实验首先对丹皮炭止血作用主要活性部位进行筛选研究,在此基础上进一步探讨丹皮炭止血作用的机制。

1 材料

1.1 动物:小鼠(ICR种),雌雄各半,体质量(18±2)g,购自扬州大学比较医学中心,许可证号:SCXK(苏)2007-0001。Wistar大鼠,雄性,体质量(180±20)g,购自扬州大学比较医学中心,许可证号:SCXK(浙)2003-0001。

1.2 药品与试剂:云南白药:云南白药集团股份有限公司(批号:20080112);CMC-Na:中国医药(集团)上海化学试剂公司;氯化钙:南京化学试剂厂;枸橼酸钠:天津市科密欧化学试剂开发中心。试剂盒:凝血酶时间(TT,批号STG10301-25)、凝血酶原时间(PT,批号STG20102-36)、活化部分凝血活酶时间(APTT,批号ST20201-29),均为北京世帝科学仪器公司生产。

1.3 仪器:LG-PABER凝血仪(北京世帝科学仪器公司)、离心机(上海安亭科学仪器厂)、电热恒温

水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

1.4 供试品制备:云南白药临床用量为2g,实验动物按临床用量20倍给药,即0.667g/kg。取云南白药粉末8.004g加入240mL 0.5% CMC-Na研磨均匀即得。牡丹皮药材购自安徽亳州,经南京中医药大学中药鉴定教研室吴启南教授鉴定为毛茛科植物牡丹 *P. suffruticosa* Andr. 的干燥根皮。

丹皮炭(十灰散)临床用量为9g,实验动物按临床用量20倍给药,即3g/kg。取适量生品牡丹皮,280℃炒制20min,制成牡丹皮炭品。适当粉碎后200目筛。取丹皮炭粉末36g,加入240mL 0.5% CMC-Na研磨均匀即得。

取36g丹皮炭粉末,按《中国药典》2005年版中鞣质的提取方法进行提取,将提取液浓缩到1g/mL后加入240mL 0.5% CMC-Na混匀即得。

取适量丹皮炭粉末,石油醚索氏提取2h后;药渣再以70%乙醇回流提取2h,回收乙醇后;制备成丹皮炭的70%乙醇提取部位浸膏。取2.34g浸膏(相当于36g丹皮炭粉末)加入240mL 0.5% CMC-Na混匀即得。

取适量丹皮炭粉末,以95%乙醇回流提取2h回收乙醇;用1% HCl酸化,抽滤;滤液用氨水碱化,使pH值约等于10;氯仿少量多次萃取后,回收氯仿;制备成丹皮炭的氯仿部位浸膏。取2.52g浸膏(相当于36g丹皮炭粉末)加入240mL 0.5% CMC-Na混匀即得。

* 收稿日期:2008-10-14

基金项目:国家“十一五”科技攻关项目(2006BAI09B006-02);江苏省研究生培养创新工程(CX08B-2002)

作者简介:李 娟(1980—),女,博士研究生,主要从事中药炮制与复方研究。Tel: 13611517960 E-mail: lixian0813@126.com

*通讯作者 丁安伟 Tel: (025) 85811523

取适量丹皮炭粉末,以70%乙醇回流提取2次,每次2h;回收乙醇,用醋酸乙酯少量多次萃取后,回收醋酸乙酯;制备成丹皮炭的醋酸乙酯部位浸膏。取1.896g浸膏(相当于36g丹皮炭粉末)加入240mL 0.5%CMC-Na混匀即得。

取适量生品牡丹皮,适当粉碎后过200目筛,取生丹皮粉末45g(相当于36g丹皮炭粉末)加入240mL 0.5%CMC-Na研磨均匀即得。

2 方法与结果

2.1 对小鼠出血时间(BT)的影响^[2]:取小鼠80只,雌雄各半,随机分为8组,每组10只,分别为对照组(0.5%CMC-Na)、云南白药组、丹皮生品组、丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组、丹皮炭70%乙醇提取部位组、丹皮炭氯仿部位组、丹皮炭醋酸乙酯部位组。将各供试品分别按0.4mL/20g每天ig给药1次,连续5d。于第5天给药后1h,剪去鼠尾3mm,在有血液流出时开始计时,每隔10s用滤纸轻轻拭血1次,直到拭后不再出血为止,从开始出血至停止出血,所历时间即为小鼠BT,结果见表1(结果统计用t检验,下同)。实验结果表明,丹皮炭及其鞣质部位、70%乙醇提取部位、醋酸乙酯部位均可缩短小鼠出血时间,其中丹皮炭醋酸乙酯部位止血作用尤佳。

2.2 对小鼠凝血时间(CT)的影响^[2]:取小鼠80只,雌雄各半,随机分为8组,每组10只,分别为对照组(0.5%CMC-Na)、云南白药组、丹皮生品组、丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组、丹皮炭70%乙醇提取部位组、丹皮炭氯仿部位组、丹皮炭醋酸乙酯部位组。将各供试品分别按0.4mL/20g每天ig给药1次,连续5d。于第5天给药后1h,颈动脉插管取血4.5mL,加入放有枸橼酸钠(3.8%)溶液0.5mL的离心管内抗凝,以3000r/min离心10min,分离血浆备用。取试管5支,每管加入混合血浆0.1mL,放入37℃水浴中温育1min,然后各加入氯化钙0.1mL。混匀后再放入37℃水浴中,同时开始计时。1min后每隔15s缓慢倾斜试管1次。记录自加Ca²⁺至纤维蛋白形成,液面不动所需时间,计算5支试管平均值,即为该供试品组大鼠PRT。结果见表2。实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位以及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠PRT的作用,表明它们均有一定的凝血作用。其中丹皮炭品较其鞣质提取部位以及醋酸乙酯部位凝血作用强。

Table 1 Effects of extracts from carbonized Cortex Moutan on BT and CT of mice ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BT/s	CT/s
对照	-	192.70 ± 34.28	165.70 ± 26.60
云南白药	0.667	140.81 ± 21.30 *	117.00 ± 31.47 **
丹皮生品	3.00	269.20 ± 30.41	152.00 ± 10.43
丹皮炭品	3.00	112.10 ± 26.92 *	42.60 ± 9.20 **
丹皮炭鞣质	3.00	133.50 ± 29.37 *	80.22 ± 30.62 **
丹皮炭70%乙醇提取部位	3.00	120.00 ± 31.69 *	106.33 ± 33.35 *
丹皮炭氯仿部位	3.00	188.00 ± 27.20	113.00 ± 27.12
丹皮炭醋酸乙酯部位	3.00	109.60 ± 37.33 **	93.50 ± 27.51 **

与对照组比较: * P<0.05 ** P<0.01

* P<0.05 ** P<0.01 vs control group

表2 各丹皮炭提取物对大鼠PRT、TT、PT、APTT的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 2 Effects of extracts from carbonized Cortex Moutan on PRT, TT, PT, and APTT of rats ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PRT/s	TT/s	PT/s	APTT/s
对照	-	112.00 ± 8.01	37.30 ± 3.60	17.30 ± 1.31	14.39 ± 1.91
云南白药	0.667	80.01 ± 13.07 **	35.72 ± 1.55	14.82 ± 1.00 **	13.61 ± 1.14
丹皮生品	3.00	168.39 ± 31.15	36.85 ± 1.94	16.54 ± 1.79	15.27 ± 3.46
丹皮炭品	3.00	70.64 ± 16.97 **	32.88 ± 2.95 **	15.71 ± 0.98 **	12.03 ± 1.62 **
丹皮炭鞣质	3.00	80.32 ± 17.52 **	33.19 ± 3.86 *	15.99 ± 1.40 *	12.25 ± 2.47 *
丹皮炭醋酸乙酯	3.00	83.30 ± 21.29 **	34.30 ± 2.68 *	16.43 ± 0.75	12.09 ± 0.03 *

与对照组比较: * P<0.05 ** P<0.01

* P<0.05 ** P<0.01 vs control group

只,雌雄各半,分组及给药方法同2.1项。于第5天给药后1h,用眼科弯镊迅速摘取一侧眼球,即有血液流出,在洁净载玻片的两端各滴1滴直径约5mm的血滴,立即计时,每隔10s用清洁大头针自血滴边缘向里轻轻拨动1次,并观察有无血丝挑起。从采血开始至挑起血丝,所历时间即为小鼠CT。另一滴血供最后复验。结果见表1。结果表明,丹皮炭及其鞣质部位、醋酸乙酯部位、70%乙醇提取部位均可缩短小鼠凝血时间,其中丹皮炭、丹皮炭鞣质部位、丹皮炭醋酸乙酯部位凝血作用尤佳。

2.3 对大鼠血浆复钙时间(PRT)的影响^[2]:取大鼠60只,雄性,随机分为6组,每组10只,分别为对照组(0.5%CMC-Na)、云南白药组、丹皮生品组、丹皮炭品组、丹皮炭鞣质组、丹皮炭醋酸乙酯组。将各供试品分别按2mL/100g每天ig给药1次,连续5d。于第5天给药后1h,颈动脉插管取血4.5mL,加入放有枸橼酸钠(3.8%)溶液0.5mL的离心管内抗凝,以3000r/min离心10min,分离血浆备用。取试管5支,每管加入混合血浆0.1mL,放入37℃水浴中温育1min,然后各加入氯化钙0.1mL。混匀后再放入37℃水浴中,同时开始计时。1min后每隔15s缓慢倾斜试管1次。记录自加Ca²⁺至纤维蛋白形成,液面不动所需时间,计算5支试管平均值,即为该供试品组大鼠PRT。结果见表2。实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位以及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠PRT的作用,表明它们均有一定的凝血作用。其中丹皮炭品较其鞣质提取部位以及醋酸乙酯部位凝血作用强。

2.4 对大鼠TT、PT、APTT的影响^[2]:取大鼠60只,雄性,随机分为6组,每组10只,分组及给药方法同2.3项。于第5天给药后1h,颈动脉插管取血4.5mL,加入放有枸橼酸钠(3.8%)溶液0.5mL的离心管内抗凝,以3000r/min离心10min,分离血浆备用。按各指标试剂盒的要求进行TT、PT、APTT的测定,结果见表2。

实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠 TT 的作用。说明三者均能较好地提高凝血过程中纤维蛋白原的利用度,但丹皮炭的鞣质部位以及醋酸乙酯部位对凝血过程中纤维蛋白原利用度的提高作用没有丹皮炭整体效果好。

实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位均有缩短大鼠 PT 的作用。说明丹皮炭品以及丹皮炭的鞣质部位均能通过影响外源性凝血系统以及血浆中凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性产生凝血作用,但是丹皮炭品作为一个整体比丹皮炭的鞣质部位作用强。

实验结果表明丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠 APTT 的作用。说明丹皮炭品以及丹皮炭的鞣质部位、醋酸乙酯部位均能通过影响内源性凝血系统以及血浆中凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性产生凝血作用,但是丹皮炭品作为一个整体比丹皮炭的鞣质部位以及醋酸乙酯部位作用强。

3 讨论

目前国内外对牡丹皮药理作用的研究多集中于生品,牡丹皮的炮制作用及丹皮炭止血机制还没有深入研究。为探讨丹皮炭止血的机制,本实验首先对丹皮炭止血作用主要活性部位进行筛选研究。结果表明丹皮炭具有一定的止血、凝血作用,并初步确定了其止血作用主要活性部位为丹皮炭鞣质部位以及醋酸乙酯部位。通常炭药是通过以下途径发挥止血作用:首先饮片炒炭后炭素增加,加强吸附作用,使局部止血作用增强^[3];其次炒炭后炭药中的鞣质相对增多,而鞣质具有止血和收敛作用,能达到止血、凝血的目的^[4];再次饮片炒炭后钙离子增多,而钙离子是凝血系统中的重要离子,它对内源性、外源

性凝血系统和血小板有激活作用,使纤维蛋白原转化为纤维蛋白,使血小板聚集,从而起到促进止血、凝血的作用^[5]。

PRT 能反映内源性凝血系统的活性,TT 可以反映内源性凝血过程第三期中纤维蛋白原的利用度;而 APTT 反映了内源性凝血系统诸因子如凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性。本实验结果表明,丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位及醋酸乙酯部位均有缩短大鼠 PRT、TT、APTT 的作用,说明三者均能影响内源性凝血系统,加速纤维蛋白原的利用度以及对内源性凝血系统中的凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 表现出明显的激活作用,达到止血、促进凝血的作用。PT 能反映外源性凝血系统的活性,其长短与外源性凝血系统中凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性有关。丹皮炭品、丹皮炭鞣质部位均有缩短大鼠 PT 的作用,说明两者可通过影响外源性凝血系统以及激活凝血因子、 Ca^{2+} 、 FII 的活性发挥止血、促进凝血的作用。

实验中同时发现丹皮炭作为一个整体比其鞣质部位、醋酸乙酯部位具有更强的止血能力,说明丹皮炭炒后也许是多成分通过多途径产生了止血作用,即不仅对内源性和外源性凝血系统产生影响,是否还对凝血途径中的纤溶系统、血小板的功能产生一定影响,还有待于对丹皮炭止血机制进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药志 [M]. 第 3 卷. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [3] 孔祥安, 刘洪章, 刘喜梅. 中药炭药析疑 [J]. 时珍国药研究, 1995 (4): 42.
- [4] 连以国. 中药炭药作用原理的探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 1989, 9(6): 265.
- [5] 单鸣秋, 张丽, 丁安伟. 中药炭药的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 631-634.

越橘中原花青素抑制新生大鼠心肌成纤维细胞增殖及其作用机制

王艳春¹, 任 旷^{1*}, 顾饶胜¹, 杨世杰²

(1. 吉林医药学院 药理教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林大学基础医学院 药理教研室, 吉林 长春 130021)

摘 要:目的 研究越橘中原花青素对血管紧张素 (angiotensin, Ang) 诱导新生大鼠心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblast, CFb) 增殖的影响及其作用机制。方法 用 Ang 诱导新生大鼠 CFb 增殖, 采用 MTT 法检测细胞增殖, ELISA 法测定 Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原及转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 的量, 硝酸还原酶法、分光光度法检测

* 收稿日期: 2009-03-12

基金项目: 吉林省科技厅发展计划项目资助课题 (200705405)

作者简介: 王艳春 (1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为心血管分子药理学。

Tel: (0432) 4560023 E-mail: wangyanchun1972@163.com

*通讯作者 任 旷 Tel: (0432) 4560301 E-mail: renkuang@sina.com