

毛冬青皂苷 B₃ 的抗血栓作用研究

熊天琴¹, 陈元元¹, 李红侠¹, 林朝展^{1,2}, 祝晨蓀^{1,2*}, 赵钟祥^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学 广中尖峰天然产物共建实验室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 从毛冬青根中分离、鉴定毛冬青皂苷 B₃, 研究其抗血栓作用。**方法** 色谱法、重结晶法分离、精制毛冬青皂苷 B₃, 薄层色谱对照及波谱分析法对毛冬青皂苷 B₃ 进行结构鉴定。采用体内血栓形成试验、体外血凝块溶解试验及二磷酸腺苷 (ADP) 诱导血小板聚集试验, 观察毛冬青皂苷 B₃ 的抗血栓作用。**结果** 体内抗血栓试验显示, 毛冬青皂苷 B₃ 对胶原蛋白-肾上腺素诱发的血栓形成所致小鼠的偏瘫和死亡及 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成均有明显的抑制作用; 在体外实验中, 对家兔血凝块无明显的溶解作用, 对 ADP 诱导的离体家兔血小板聚集也无明显的抑制作用。**结论** 毛冬青皂苷 B₃ 可能为毛冬青抗血栓作用的物质基础之一, 其体内抗血栓形成的作用可能与其促进血凝块溶解和抗 ADP 诱导的血小板聚集无关。

关键词: 毛冬青; 毛冬青皂苷 B₃; 抗血栓; 血栓形成; 血小板聚集

中图分类号: R284.1; R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)09-1785-04

Antithrombotic activity of ilexaponin B₃ from roots of *Ilex pubescens*

XIONG Tian-qin¹, CHEN Yuan-yuan¹, LI Hong-xia¹, LIN Chao-zhan^{1,2}, ZHU Chen-chen^{1,2}, ZHAO Zhong-xiang¹

1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Guangzhong Jianfeng Union Research Laboratory for Natural Products, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To separate and prepare ilexaponin B₃ (IB₃) from the roots of *Ilex pubescens*, and to study its antithrombotic activity. **Methods** Chromatography and recrystallization were used in the separation and purification of IB₃, and the structure was identified by PTLC and ¹H-NMR. Antithrombotic activity of IB₃ was observed by *in vivo* thrombosis test, solubility test of blood clot *in vitro*, and platelet aggregation in rabbits induced by adenosine diphosphate (ADP). **Results** IB₃ had significant inhibition on thrombosis-caused hemiplegia and death induced by collagen-epinephrine in mice, and on abdominal arterial thrombotic model induced by FeCl₃ in rats. IB₃ neither had dissolution solubility experiment of blood clot in rabbits nor had inhibition on platelet aggregation in rabbits induced by ADP. **Conclusion** IB₃ may be one of the ilexolic material bases for the antithrombotic activity, but it may have no correlation with increasing thrombolysis and platelet aggregation induced by ADP.

Key words: *Ilex pubescens* Hook. et Arn.; ilexaponin B₃ (IB₃); antithrombosis; thrombosis; platelet aggregation

毛冬青为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. 的干燥根, 主产广东、广西、福建、江西, 是我国南方常用中药。毛冬青主要用于治疗循环系统疾病, 对冠心病、炎症、血栓性疾病疗效确切^[1]。然而毛冬青有效成分和作用机制仍不清楚。本课题组采用色谱

法和重结晶法从毛冬青根中分离得到毛冬青皂苷 B₃ (ilexaponin B₃, IB₃), 采用薄层色谱对照及波谱分析法对该化合物进行结构鉴定, 并对其体内抗血栓形成、体外血栓溶解作用及抗血小板聚集作用进行研究, 为阐明毛冬青抗血栓活性成分提供实验依据。

收稿日期: 2011-11-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901954); 广东省自然科学基金资助项目 (9451040701003203); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20094425110008); 广州中医药大学创新基金 (09CX015); 广州市珠江科技新星专项 (2011J2200047)

作者简介: 熊天琴 (1973—), 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制。

Tel: (020)39358085 E-mail: xiongtq020@126.com

***通讯作者** 祝晨蓀 Tel: (020)39358047 E-mail: zhuchenchen@vip.sina.com

赵钟祥 Tel: (020)39358072 E-mail: zzx307@yahoo.com.cn

1 材料

1.1 药材与试剂

毛冬青购自广州致信中药饮片有限公司, 经广州中医药大学祝晨蓁研究员鉴定为冬青科植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. 的干燥根; 阿司匹林肠溶片, 每片 0.1 g, 拜耳医药保健有限公司, 批号 BJ01119; 盐酸肾上腺素注射液, 1 mg/mL, 广州白云山明兴制药有限公司, 批号 100904; 肝素钠注射液, 2 mL: 12 500 U, 江苏万邦生化医药股份有限公司, 批号 1103129-B。柱色谱和薄层色谱硅胶, 青岛海洋化工厂; 三氯化铁, 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂; 尿激酶、I 型胶原蛋白, Sigma 公司; 二磷酸腺苷 (ADP), 批号 3413 03/2012, 美国 Chrono-Log 公司; 3%戊巴比妥钠, 北京北化学试剂公司; 阿司匹林, 上海润捷化学试剂有限公司, 批号 20070423; 3.8%枸橼酸钠溶液, 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 动物

SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 180~200 g; 昆明种小鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 18~20 g; 新西兰家兔, 清洁级, 雌雄各半, 体质量 2.0~2.5 kg, 均购自广州中医药大学实验动物中心, 许可证号为 SCXK (粤) 2008-0020, 合格证号分别为 0089475、0086842、0095855。

1.3 仪器

Bruker AV 400 型核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; HH-6 数显恒温水浴锅, 金坛市医疗仪器厂; JB/T5374 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 560-CA 血小板聚集测试仪, Chrono-Log 公司。

2 方法

2.1 Ilexsaponin B₃ 的分离和鉴定

毛冬青干燥根 12.0 kg, 粉碎, 用甲醇渗漉提取, 提取液减压回收溶剂得总浸膏 1.5 kg。浸膏用蒸馏水 (4 L) 充分分散, 滤去沉淀。滤液分别用醋酸乙酯 (3×4 L) 和正丁醇 (3×4 L) 萃取, 正丁醇萃取液减压回收溶剂得浸膏。取浸膏 300 g, 用大孔树脂进行色谱分离, 依次用水及 15%、30%、70%、100% 甲醇进行洗脱。取 70% 甲醇洗脱部位进行硅胶柱色谱分离, 以氯仿-甲醇 (100:1→2:1) 梯度洗脱, 洗脱液每 1 000 mL 为 1 份, 以 TLC 进行检测、合并, 得到 15 个部位 (A₁~A₁₅)。A₃ 35 g 反复经硅胶柱色谱、重结晶 (甲醇-水混合溶剂) 等方法分离,

得白色针晶 (2.3 g)。将其 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献报道比对^[2-4], 鉴定化合物为毛冬青皂苷 B₃ (IB₃)。

2.2 IB₃ 药液的配制

在体内实验中, IB₃ 用蒸馏水配制含相应给药剂量的药液; 在体外实验中, IB₃ 用生理盐水配制成相应质量浓度的药液。

2.3 对家兔血凝块的溶解作用^[5]

家兔颈总动脉插管放血入长约 80 cm、直径 3 mm 的塑料管中, 夹闭管两端, 于室温放置 24 h, 取血凝块, 将其切成质量约 50 mg 的小段。精密称取后, 分别放置含有 IB₃ (6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 mg/L)、尿激酶 (100 U/mL) 和生理盐水 (对照组) 各 2 mL 的 7 个试管中 (每组重复 10 次), 37 °C 温浴 24 h 后取出剩余血凝块, 称质量, 计算血凝块溶解率。

血凝块溶解率 = (溶解前血凝块湿质量 - 溶解后血凝块湿质量) / 溶解前血凝块湿质量

2.4 对胶原蛋白-肾上腺素诱导的血栓形成模型小鼠偏瘫和死亡率的影响^[6]

小鼠按体质量随机分成对照组, 模型组, 阿司匹林肠溶片阳性对照组, IB₃ 低、中、高剂量 (15、30、60 mg/kg) 组, 每组 10 只。3 个 IB₃ 组每天分别 ig IB₃ 1 次, 阳性对照组每天 ig 阿司匹林肠溶片 20 mg/kg 1 次, 连续给药 5 d。于末次给药 45 min 后, 除对照组外, 其余 5 组小鼠尾 iv 胶原蛋白 (225 μg) - 肾上腺素 (9 μg) 的混悬液 0.5 mL, 对照组给予相同体积的生理盐水。观察并记录 iv 混悬液后 5 min 内小鼠死亡数和 15 min 内小鼠偏瘫后未恢复数。偏瘫以小鼠翻正反射消失为标准。实验结束后, 颈椎脱臼处死小鼠, 取出肺组织称质量, 计算肺指数。

肺指数 = 肺质量 / 体质量

2.5 对 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成的影响^[7]

SD 大鼠按体质量随机分成假手术组, 模型组, 肝素钠阳性对照组, IB₃ 低、中、高剂量 (15、30、60 mg/kg) 组。IB₃ 组每天 ig 给予相应药物 1 次, 每次 2 mL/100 g, 连续给药 5 d, 假手术组和模型组 ig 等量蒸馏水。末次给药前 12 h, 肝素钠组大鼠 sc 肝素钠 (1 250 U) 2 mL, 共给药 2 次, 间隔 6 h。末次 ig 给药 30 min 后, 所有大鼠 ip 10% 水合氯醛 0.3 mL/100 g 麻醉, 分离腹主动脉段, 除假手术组外, 其他组用 70% FeCl₃ 浸透的 2.0 cm×1.0 cm 的滤纸条环抱动脉, 其下置小片保鲜薄膜 (3.0 cm×2.0 cm), 用于保护血管周围组织, 假手术组动脉用等

量生理盐水滤纸条包裹。50 min 后去除纸片，在滤纸环抱处截取 1.0 cm 长血管，吸干血管中的残留血液，用电子天平称质量，取出血栓后再称血管质量，两者之差即为血管段内血栓质量。

2.6 对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的影响^[8]

家兔以 3%戊巴比妥钠局部麻醉，颈总动脉插管放血，3.8%枸橼酸钠 1:9 抗凝，混匀，1 000 r/min 离心 10 min，取上清液，即为富血小板血浆 (PRP)；剩余部分以 3 000 r/min 离心 20 min，即得贫血小板血浆 (PPP)。取上述 2 种血浆，用 PPP 调零，以 PRP 为血小板供体。实验设阿司匹林阳性对照组、对照组和 IB₃ 低、中、高剂量组，每组 (每管 250 μL) 8 个平行样本。阳性对照组加入阿司匹林 500 mg/L，3 个给药组分别加入 IB₃ 1、10、100 mg/L 各 10 μL，对照组 PRP 中加入等体积生理盐水。各组 PRP 于 37 °C 温育 5 min 后，加入 ADP (终浓度为 10 μmol/L) 5 μL，按比浊法用血小板聚集仪测定血小板最大聚集率，计算血小板聚集抑制率。

血小板聚集抑制率 = (对照组血小板聚集率 - 给药组血小板聚集率) / 对照组血小板聚集率

2.7 数据处理

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 统计软件对各组数据进行单因素方差分析。质反应资料统计采用 Monte Carlo 确切概率法进行组间比较。

3 结果

3.1 对家兔血凝块的溶解作用

与对照组比较，各质量浓度的 IB₃ 对体外形成的家兔血凝块无明显溶解作用。结果见表 1。

3.2 对胶原蛋白-肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成的影响

各组小鼠尾 iv 胶原蛋白-肾上腺素混合诱导剂后，均出现不同数量的死亡或偏瘫现象。模型组小

表 1 IB₃ 对家兔血凝块的溶解作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Dissolution of IB₃ on blood clot in rabbits

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	$\rho /$ (mg·L ⁻¹)	血凝块湿质量 / mg		溶解率 / %
		给药前	给药后	
对照	—	40.2 ± 5.2	32.1 ± 9.0	20.5 ± 17.5
IB ₃	6.25	47.8 ± 1.9	36.5 ± 2.9	23.8 ± 4.0
	12.50	45.9 ± 2.6	34.0 ± 3.3	25.9 ± 5.1
	25.00	45.3 ± 3.3	34.1 ± 3.2	24.6 ± 3.8
	50.00	46.5 ± 2.7	35.0 ± 2.9	24.7 ± 3.1
	100.00	44.4 ± 2.8	34.1 ± 2.7	23.0 ± 6.1
尿激酶	100 U·mL ⁻¹	40.9 ± 4.7	25.4 ± 4.2	37.8 ± 6.8*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

鼠死亡率为 100%。与模型组相比，阿司匹林肠溶片组死亡小鼠 2 只，偏瘫小鼠 4 只，对血栓形成的保护作用明显 ($P < 0.01$)。IB₃ 高、中、低剂量组小鼠死亡数分别为 2、1、1 只，偏瘫数分别为 3、2、2 只，也有明显的抗血栓形成作用 ($P < 0.05$)。IB₃ 各组小鼠的肺指数与模型组相比明显减轻 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果表明 IB₃ 对胶原蛋白-肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成有显著保护作用。结果见表 2。

3.3 对 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成的影响

与模型组相比，IB₃ 15 mg/kg 组和肝素钠组小鼠血栓质量明显减轻 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.4 对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的影响

与对照组比较，IB₃ 质量浓度分别为 100、10、1 mg/L 时，ADP 诱导的家兔血小板聚集率分别为 (27.00 ± 5.04)%、(27.88 ± 4.45)%、(27.50 ± 6.16)%，血小板聚集抑制率分别为 9.24%、6.29%、7.56%，提示 IB₃ 各质量浓度对 ADP 诱导离体家兔血小板聚集无明显抑制作用。结果见表 4。

表 2 IB₃ 对胶原蛋白-肾上腺素诱导的血栓形成模型小鼠偏瘫和死亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of IB₃ on thrombosis-caused hemiplegia and death induced by collagen-epinephrine in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	死亡 / 只	偏瘫 / 只	保护率 / %	肺指数 / %
对照	—	0	0	—	0.75 ± 0.06**
模型	—	10	0	0	2.44 ± 0.10
IB ₃	15	1	2	70*	2.06 ± 0.43*
	30	1	2	70*	2.03 ± 0.41**
	60	2	3	50*	1.80 ± 0.30**
阿司匹林肠溶片	20	2	4	40*	1.19 ± 0.44**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

表 3 IB₃ 对 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of IB₃ on abdominal arterial thrombosis induced by FeCl₃ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	血栓质量 / mg
模型	—	7.97 ± 0.81
IB ₃	15	7.25 ± 1.12*
	30	7.35 ± 0.44
	60	7.36 ± 0.64
肝素钠	—	5.85 ± 0.30*

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

表 4 IB₃ 对 ADP 诱导离体家兔血小板聚集的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of IB₃ on platelet aggregation in rabbits induced by ADP ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	ρ / (mg·L ⁻¹)	血小板聚集率 / %	血小板聚集抑制率 / %
对照	—	29.75 ± 6.41	—
IB ₃	100	27.00 ± 5.04	9.24
	10	27.88 ± 4.45	6.29
	1	27.50 ± 6.16	7.56
阿司匹林	500	19.63 ± 5.58*	34.02

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

4 讨论

胶原蛋白和肾上腺素均为血栓形成诱导剂, 两者合用有显著的协同作用, 给小鼠尾 iv 可引起血栓性偏瘫和死亡^[5]。本实验发现 IB₃ 15、30、60 mg/kg 均能降低胶原蛋白-肾上腺素诱导的小鼠血栓性偏瘫率和死亡率, 减轻肺指数, 提示其对血栓形成有明显的保护作用, 该作用可能与其降低血液黏度和抗血管收缩有关。FeCl₃ 可使血管内膜受损, 从而激活血小板和凝血系统, 在损伤局部形成阻塞性栓塞。本实验发现, IB₃ 对 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成有抑制作用, 该作用可能与其抑制血小板聚集、增强纤溶作用、保护血管有关。此外, IB₃ 对体外形成的家兔血凝块未显示明显的溶解作用, 表明 IB₃ 可能对纤溶系统无促进作用。

血小板聚集主要通过 3 种途径^[9]: (1) ADP 途径, ADP、胶原、凝血酶均可诱导血小板释放内源

性 ADP, 后者引起血小板聚集反应; (2) 血栓烷 A₂ (TXA₂) 途径, 细胞膜上的磷脂可以产生游离的花生四烯酸, 花生四烯酸的环氧化酶代谢产物对血小板的功能活动有很大的影响, 经 TXA₂ 合成酶催化生成的 TXA₂ 具有较强的导致血小板聚集的作用; (3) PAF 途径, PAF 是迄今发现的最强的血小板活化剂, 可能是凝血酶引起的不依赖 ADP 及 TXA₂ 的血小板聚集的媒介, 凝血酶也可引起 PAF 的释放。ADP 属中等强度的血小板聚集诱导剂, 其诱导的血小板活化的信号通路是血小板聚集过程中最为重要的信号通路, 因此本实验选择 ADP 诱导的血小板聚集进行研究。结果 IB₃ 对 ADP 诱导的离体家兔血小板聚集无明显抑制作用。

综上所述, IB₃ 明显抑制胶原蛋白-肾上腺素诱导的小鼠体内血栓形成, 抑制 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成, 表明该化合物可能是毛冬青抗血栓作用的物质基础之一, 其作用可能与其促进血凝块溶解和抗 ADP 诱导的血小板聚集无关, 而可能与降低血液黏度和抗血管收缩有关。因而可对 IB₃ 降低血液黏度、扩张血管的作用以及从 TXA₂、PAF 途径对该化合物的抗血小板聚集作用等进行进一步研究。

参考文献

- [1] 赵钟祥, 曾瑞鑫, 金 晶, 等. 毛冬青根中的新三萜皂苷 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1267-1269.
- [2] Hidaka K, Ito M, Matsuda Y, et al. New triterpene saponins from *Ilex pubescens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(2): 524-529.
- [3] 周中流. 毛冬青化学成分的研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2007.
- [4] 冯 峰, 朱明晓, 谢 宁. 毛冬青化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(10): 732-736.
- [5] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [6] 王四旺, 施新猷, 黄传贵, 等. 中药药效学研究及评价 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2005.
- [7] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [8] 魏 伟, 吴希美, 李元建, 等. 药理实验方法学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [9] 卢 瑾, 郭如华, 张广森, 等. 血小板功能评估、诊断和治疗 [M]. 上海: 上海科学出版社, 2006.