

毛冬青中三萜皂苷 ilexoside O 的制备及抗血栓活性研究

金晶¹, 秦聪怡², 周园², 曾瑞鑫², 赵钟祥^{2*}

1. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 从毛冬青 *Ilex pubescens* 中分离制备三萜皂苷 ilexoside O, 并探讨其抗血栓活性。方法 综合运用大孔树脂、硅胶和重结晶等分离方法制备化合物, 采用核磁、质谱等技术鉴定结构; 小鼠和大鼠分别 ig 给予不同剂量的 ilexoside O, 通过考察其对小鼠的凝血时间、出血时间和大鼠在三氯化铁诱导下腹主动脉血栓形成量的影响评价其药理活性。结果 ilexoside O 各剂量组与对照组相比, 对小鼠出血时间均有明显影响 ($P < 0.01$), ilexoside O 低剂量组 (25 mg/kg) 对小鼠凝血时间无明显影响 ($P > 0.05$), 但中 (50 mg/kg)、高 (100 mg/kg) 剂量组可以明显延长小鼠的凝血时间 ($P < 0.05$); ilexoside O 各剂量组均可明显减少 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓形成量 ($P < 0.01$)。结论 制备得到的 ilexoside O 显示出明显抗凝血效果, 同时能减少血栓形成, 有明显的活血作用。

关键词: 毛冬青; 三萜皂苷; ilexoside O; 抗血栓活性; 凝血时间

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1834-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.005

Preparation of triterpenoid ilexoside O from *Ilex pubescens* and study on its antithrombotic activity

JIN Jing¹, QIN Cong-yi², ZHOU Yuan², ZENG Rui-xin², ZHAO Zhong-xiang²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

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

Abstract: Objective To prepare triterpenoid ilexoside O from the roots of *Ilex pubescens* and to investigate its antithrombotic activity. **Methods** Ilexoside O was separated and purified by column chromatography and recrystallization, and was identified by ¹H-NMR and ¹³C-NMR analyses. After ig administration, the pharmacological effects of ilexoside O were evaluated by clotting time (CT), bleeding time (BT), and the amount of the abdominal aortic blood clots induced by FeCl₃ in rats, respectively. **Results** In comparison with placebo group, ilexoside O showed the obvious effects on BT ($P < 0.01$). The low-dose group (25 mg/kg) of ilexoside O showed no obvious effect on CT ($P > 0.05$), but the mid- (50 mg/kg) and high- (100 mg/kg) dose groups obviously increased CT of mice ($P < 0.05$); Ilexoside O obviously decreased the amount of the abdominal aortic blood clots in the induction of FeCl₃ in rats ($P < 0.01$). **Conclusion** Ilexoside O shows obvious anticoagulant effect and could decrease the amount of the abdominal aortic blood clots, and its related mechanism is one of the problems which need to be further studied.

Key words: roots of *Ilex pubescens* Hook. et Arm.; triterpenoid; ilexoside O; antithrombotic activity; clotting time

毛冬青为冬青科 (Aquifoliaceae) 冬青属 *Ilex* L. 植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arm. 的干燥根, 是我国南方常用中药, 具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒功效。已有研究表明毛冬青的主要药理作用包括抗动脉、静脉血栓, 扩张外周血管, 抑制血小板聚集, 调节机体免疫功能等, 在血栓闭塞性脉管炎、缺血性脑血管病、冠心病、心绞痛、心肌梗死、

周围血管病等疾病的治疗中应用广泛^[1-2]。研究表明毛冬青主要含有的三萜及其苷类成分具抗血栓作用^[3-6]。为了阐明毛冬青发挥临床治疗作用的有效成分及其作用机制, 本课题组对其化学成分和心血管方面活性进行了系统研究, 发现毛冬青中三萜类成分 ilexsaponin A₁ 和 ilexsaponin B₃ 具有抗血栓活性^[7-8]。

本课题组前期研究表明 ilexoside O 在毛冬青药

收稿日期: 2013-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270054, 30901954); 广州市珠江科技新星专项 (2011J2200047); 广东省优秀青年教师培养计划 (Yq2013045); 广东省自然科学基金资助项目 (9451040701003203)

*通信作者 赵钟祥 (1979—), 男, 教授。Tel: (020)39358072 E-mail: zzx37@163.com

材中的量可达 0.33%，是毛冬青药材的主要成分之一，其结构和前期发现的抗血栓活性化合物非常类似，但其是否具有抗血栓活性尚无文献报道。由于 ilexoside O 为三萜皂苷类成分，极性较大，加之毛冬青药材中含有系列与其结构非常类似的皂苷类成分，因此分离制备足量化合物用于动物实验难度较大。本研究综合运用多种分离纯化技术从毛冬青根中分离制备三萜皂苷 ilexoside O，采用波谱法对其结构进行了鉴定，并对其药理活性进行了研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

核磁用 Bruker AV 400 型核磁共振仪 (Bruker, Switzerland); 质谱用 Finnigan LCQ Deca XP MAX 液-质联用仪 (Thermo Finnigan, CA, USA); 电子天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 药品

毛冬青药材于 2009 年购自广州致信中药饮片有限公司，经广州中医药大学赵钟祥教授鉴定为冬青科冬青属植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Arn. 的干燥根，样品 (2009-3150) 保存于本实验室；阿司匹林 (亚宝药业太原制药有限公司，20100314)；肝素钠注射液 (江苏万邦生化医药股份有限公司，批号 20110302)；柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶 (青岛海洋化工厂)；所有有机溶剂均为国产分析纯 (广州化学试剂厂)。

1.3 动物

昆明种小鼠，体质量 (20±2) g，雌雄各半；SD 大鼠，体质量 (250±10) g，均为雄性。实验动物均由广州中医药大学实验动物中心提供。动物许可证号：SCXK (粤) 2008-0020，粤监证字 2008A003。

2 方法与结果

2.1 制备与鉴定

毛冬青干燥根 (12.0 kg) 粉碎至粗粉，采用甲醇渗漉法提取，减压回收溶剂得总浸膏 1.5 kg。浸膏加蒸馏水至 4 L，充分分散后滤去沉淀，滤液分别用醋酸乙酯 (4 L×3) 和正丁醇 (4 L×3) 萃取。正丁醇萃取液减压回收溶剂至干，得浸膏 350 g。取正丁醇部位 300 g 进行大孔树脂柱色谱，依次用水及 15%、30%、70%、100% 甲醇梯度洗脱。取 70% 甲醇洗脱组分进行硅胶柱色谱，氯仿-甲醇 (100 : 1→2 : 1) 梯度洗脱，以 TLC 进行检测、合并，得到 15 个部分 (Fr. A₁₋₁₅)。Fr. A₄ 54 g 通过反复硅胶柱色谱、重结晶 (甲醇-水混合溶剂) 等方法进行分离，

得到三萜皂苷 ilexoside O (3.5 g)，质量分数 ≥98%。

化合物 ilexoside O：羽状结晶 (甲醇)，TLC 10% 硫酸-乙醇 105 °C 加热显粉红色，Liebermann-Burchard 和 Molish 反应呈阳性。ESI-MS m/z : 1097 [M+Na]⁺。¹H-NMR (400 MHz, C₅D₅N) δ : 6.40 (1H, s, Rha-H-1), 6.34 (1H, d, J = 8.0 Hz, 28-O-Glc-H-1), 5.80 (1H, d, J = 7.6 Hz, Glc-H-1), 5.53 (1H, brt, J = 3.6 Hz, H-12), 4.90 (1H, d, J = 6.8 Hz, Xyl-H-1), 3.30 (1H, dd, J = 11.6, 4.4 Hz, H-3), 3.20 (1H, s, H-18), 1.79 (1H, d, J = 6.4 Hz, Rha-H-6), 1.73 (3H, s, H-27), 1.41 (3H, s, H-29), 1.35 (3H, s, H-23), 1.20 (3H, s, H-26), 1.12 (3H, s, H-24), 1.01 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-30), 0.92 (3H, s, H-25); ¹³C-NMR (100 MHz, C₅D₅N) δ : 39.6 (C-1), 27.4 (C-2), 90.2 (C-3), 40.3 (C-4), 56.6 (C-5), 19.3 (C-6), 32.4 (C-7), 41.0 (C-8), 48.3 (C-9), 37.6 (C-10), 25.2 (C-11), 128.2 (C-12), 139.4 (C-13), 42.7 (C-14), 29.8 (C-15), 27.2 (C-16), 48.9 (C-17), 47.8 (C-18), 74.0 (C-19), 43.3 (C-20), 24.6 (C-21), 34.1 (C-22), 29.0 (C-23), 16.1 (C-24), 16.6 (C-25), 18.0 (C-26), 24.8 (C-27), 177.6 (C-28), 30.3 (C-29), 17.3 (C-30); 106.3 (C-1'), 80.0 (C-2'), 78.3 (C-3'), 71.77 (C-4'), 67.1 (C-5'), 102.9 (C-1''), 79.8 (C-2''), 79.7 (C-3''), 73.24 (C-4''), 79.6 (C-5''), 63.9 (C-6''), 102.5 (C-1'''), 72.90 (C-2'''), 73.17 (C-3'''), 74.9 (C-4'''), 70.0 (C-5'''), 19.5 (C-6'''), 96.3 (C-1'''), 74.6 (C-2'''), 79.5 (C-3'''), 71.69 (C-4'''), 79.3 (C-5'''), 62.8 (C-6''')。以上数据经与文献报道对照^[9-10]，鉴定化合物为 ilexoside O。

2.2 Ilexoside O 对小鼠凝血时间 (CT) 的影响

取昆明种健康小鼠 50 只，体质量 (20±2) g，随机分为 5 组：对照组 (生理盐水)，阿司匹林 (50 mg/kg) 组，ilexoside O 高 (100 mg/kg)、中 (50 mg/kg)、低 (25 mg/kg) 剂量组。分别按剂量 ig 给药，每日 1 次，连续给药 5 d。末次给药后 1 h 后，采用玻片法测定 CT。小鼠眼球采血，于载玻片两端各滴 1 滴血，血滴直径约 5 mm，立即用秒表计时，每隔 10 s 用清洁大头针自血液边缘向里轻轻挑动 1 次，并观察有无血丝挑起。从采血开始至挑起血丝时间即为 CT，CT 最长观察 150 min，超过 15 min 不凝固的按 30 min 计算，另一滴血供最后复试^[11]。数据采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析处理，结果见表 1。毛冬青三萜 ilexoside O 高 (100 mg/kg)、中 (50 mg/kg) 剂量组分别与对照组相比，

表 1 Ilexoside O 对小鼠 CT 和 BT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	CT / s	BT / s
对照	—	56 ± 19	84 ± 23
阿司匹林	50	79 ± 8**	123 ± 30**
ilexoside O	100	94 ± 31**	124 ± 30**
	50	76 ± 20*	149 ± 36**
	25	65 ± 14	119 ± 24**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

小鼠 BT 明显延长, 均有显著性差异 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而低剂量 (25 mg/kg) 组与对照组相比, 对小鼠 BT 无明显影响 ($P > 0.05$)。

2.3 Ilexoside O 对小鼠出血时间 (BT) 的影响

取昆明种健康小鼠 50 只, 体质量 (20 ± 2) g, 分组、给药方法与剂量同“2.2”项, 连续给药 5 d。末次给药后 1 h, 采用断尾法测定小鼠 BT。将小鼠固定, 以毫米尺测量鼠尾长度并标记, 然后用手术剪将小鼠尾尖 4 mm 处横断, 待血液自行溢出开始计时, 每隔 10 s 用滤纸吸去血滴一次, 直至血流自然停止 (滤纸吸时无血) 为止, 即为 BT^[12]。BT 最长观察 30 min, 超过 30 min 仍出血的按 30 min 计算。数据采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析处理, 将各组的 BT 与对照组进行比较, 结果见表 1。毛冬青三萜 ilexoside O 各剂量组对小鼠 BT 均有显著延长作用 ($P < 0.01$)。

2.4 Ilexoside O 对 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓生成量的影响

取 SD 大鼠 50 只, 体质量 (250 ± 10) g, 随机分为 5 组: 对照组 (生理盐水), 肝素钠 (1 250 U/kg) 组, ilexoside O 高 (80 mg/kg)、中 (40 mg/kg)、低 (20 mg/kg) 剂量组。除肝素钠组以外, 均按剂量 ig 给药, 每日 1 次, 连续给药 5 d; 肝素钠组以背部 sc 给药, 每间隔 12 h 给药 1 次, 共给药 2 次。末次给药 30 min 后, 大鼠麻醉后剖腹, 分离腹主动脉段。然后用完全浸透 50% FeCl₃ 溶液的滤纸条 (1.0 cm × 2.0 cm) 环抱于分离出的腹主动脉段上, 50 min 后沿滤纸环边缘精确截取 1.0 cm 长血管段, 吸干血管中的残留血液, 精密称定质量, 将除去血栓后的血管再次精密称定质量, 前后两者相减即为该 1.0 cm 长血管段内血栓的质量^[13-14]。将各组的血栓质量与对照组进行比较。数据采用 SPSS 13.0 软件进行

单因素方差分析处理, 结果见表 2。毛冬青三萜 ilexoside O 高 (80 mg/kg)、中 (40 mg/kg)、低 (20 mg/kg) 剂量组均可明显减少 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓生成量 ($P < 0.01$)。与低剂量组比较, 高、中剂量组平均血栓质量分别下降了 48.0% 和 24.0%, 表明 ilexoside O 对血栓生成的抑制作用随给药剂量增加也相应增强, 存在明显的剂量相关性, 说明其具有良好的抗血栓活性。

表 2 Ilexoside O 对 FeCl₃ 诱导的大鼠腹主动脉血栓生成量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of ilexoside O on abdominal arterial thrombosis induced by FeCl₃ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	血栓质量 / mg
对照	—	8.8 ± 1.8
肝素钠	1 250 U·kg ⁻¹	1.8 ± 0.6**
ilexoside O	80 mg·kg ⁻¹	2.6 ± 0.6**
	40 mg·kg ⁻¹	3.8 ± 0.6**
	20 mg·kg ⁻¹	5.0 ± 1.3**

3 讨论

化学成分研究表明毛冬青中主要含有三萜及其苷类、木脂素类、环烯醚萜类化合物等, 其中三萜及其苷类是毛冬青的主要成分和特征性成分。现代药理学研究表明, 毛冬青提取物及单体具有显著的心血管方面的活性。由于毛冬青化学成分复杂, 毛冬青发挥临床治疗作用的有效成分及作用机制至今尚未阐明。中药中的化学成分众多, 获取足量用于药理活性研究的纯化合物难度较大, 极大地困扰了中药药效物质基础研究。本研究通过对分离纯化条件的优化, 充分结合色谱法和重结晶法的优点, 制备了足量的三萜皂苷 ilexoside O 用于药理活性研究。

本研究通过在体实验发现, 三萜皂苷 ilexoside O 各剂量组均能明显延长小鼠 CT 和 BT, 抑制 FeCl₃ 诱导大鼠血栓形成, 具有明显的抗凝血和抗血栓形成的作用。课题组的前期研究表明 ilexoside O 是毛冬青药材中的主要成分之一, 据此推测三萜皂苷 ilexoside O 可能为毛冬青发挥心血管方面药理作用的有效成分, 在防治血栓性疾病方面具有一定的应用前景。FeCl₃ 诱导动脉血栓模型既存在血小板活化和凝血系统激活, 也存在抗凝和纤溶活性降低的血液病理变化, 符合人类动脉血栓特征, 被广泛应用于抗血栓药理研究^[14]。本研究中, 三萜皂苷 ilexoside O 可以显著抑制 FeCl₃ 诱导血栓形成, 减轻血栓质量,

推测其可能具有增强抗凝系统和纤溶系统活性的作用,其作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 昌艳艳, 郭 阳. 中药毛冬青对心血管疾病的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(21): 2198-2199.
- [2] 郝巨祥, 杨崇真. 毛冬青的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2010, 23(4): 592-594.
- [3] 张芳林, 郭 晟, 朱令元, 等. 毛冬青酸抗血栓实验研究及机制探讨 [J]. 江西医学院学报, 2003, 43(2): 33-37.
- [4] Han Y N, Han B H, Baik S K, *et al.* Antithrombotic activity of triterpenoids from *Ilex pubescens*: US, 4987125A [P]. 1991-01-22.
- [5] Han Y N, Song Jae I, Rhee I K. Anticoagulant activity of ilexoside D, a triterpenoid saponin from *Ilex pubescens* [J]. *Arch Pharm Res*, 1993, 16(3): 209-212.
- [6] 蔡 雄, 刘中秋, 祝晨蒨, 等. 毛冬青化学成分、药理作用及临床应用研究进展 [J]. 广东药学, 2001, 11(1): 4-6.
- [7] 周 园, 熊天琴, 林朝展, 等. 毛冬青皂苷 ilexosaponin A₁ 的制备及其药理活性研究 [J]. 中药材, 2011, 34(5): 765-767.
- [8] 熊天琴, 陈元元, 李红侠, 等. 毛冬青皂苷 B₃ 的抗血栓作用研究 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1785-1788.
- [9] 周中流. 毛冬青化学成分的研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2007.
- [10] Son Y K, Han Y N. Isolation of triterpenoid saponins from the stems of *Acer ginnala* Maxim [J]. *Saengyak Hakhoechi*, 2002, 33(4): 301-304.
- [11] 胡爱萍. 机能药理学实验教程 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004.
- [12] 徐淑云. 药理学实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [13] 夏红梅, 高云华, 刘 政. 建立动脉血栓模型的方法学及其应用的研究进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2007, 9(6): 353-354.
- [14] Kurz K D, Main B W, Sandusky G E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride [J]. *Thromb Res*, 1990, 60(4): 269-280.