

茜草炭不同提取物对急性血瘀模型大鼠的影响比较研究

王海丽, 肖林焱, 陈 毅, 单鸣秋, 张 丽, 丁安伟*

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 观察茜草炭不同提取物对急性血瘀模型大鼠的影响, 筛选茜草炭化瘀止血作用最佳的提取方式。**方法** 连续给药 8 d, 于第 7 天给药后, 除对照组大鼠外, 其余各组大鼠均 sc 盐酸肾上腺素加冰浴复制急性血瘀模型, 以云南白药为阳性药, 观察茜草炭醇提物、醇提加水提物、醇提后水提物、水提物对急性血瘀模型大鼠血液流变学、体外血栓形成、血小板系统及纤溶系统的影响。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠各切变率下的全血黏度升高 ($P < 0.01$), 体外血栓湿、干质量增加 ($P < 0.05$), 凝血时间延长 ($P < 0.05, 0.01$), 血浆纤维蛋白原 (FIB) 的量与 ADP 诱导的血小板聚集率升高 ($P < 0.01$), 纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1) 和血栓素 B_2 (TXB₂) 的量增加, 6-酮-前列腺素 1α (6-keto-PGF_{1 α}) 的量下降 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型组比较, 茜草炭醇提物与醇提加水提物显著改善模型大鼠全血黏度、减轻血栓湿质量与干质量、缩短凝血时间、升高 PAI-1 与 6-keto-PGF_{1 α} 的量、降低 TXB₂ 的量 ($P < 0.05, 0.01$), 两者均能升高模型大鼠血小板聚集率, 醇提物显著降低纤溶酶原激活物 (t-PA) 的量 ($P < 0.05$), 但对 FIB 量影响不大; 而醇提加水提物显著升高 t-PA 的量 ($P < 0.01$), 其中醇提加水提物对全血黏度、血栓湿质量与干质量影响优于醇提物, 而醇提物对凝血时间的作用效果强于醇提加水提物; 醇提后水提物与水提物对急性血瘀模型大鼠的影响弱于醇提物与醇提加水提物, 两者均具有改善模型大鼠全血黏度、减轻血栓干质量、缩短凝血酶时间 (TT) 与凝血酶原时间 (PT)、升高 PAI-1 与 TXB₂ 的量、降低 t-PA 量的趋势, 显著缩短活化部分凝血活酶时间 (APTT)、升高 FIB 与 6-keto-PGF_{1 α} 的量、减轻血栓湿质量 ($P < 0.05, 0.01$) 的作用。**结论** 茜草炭醇提加水提物化瘀止血作用强于茜草炭其他提取物, 即醇提加水提法为茜草炭化瘀止血作用的最佳提取方式。

关键词: 茜草炭; 化瘀止血; 急性血瘀模型; 体外血栓; 凝血

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)08-1351-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.017

Comparative study on effect of different extracts from carbonized *Rubiae Radix* et *Rhizoma* in acute blood stasis model of rats

WANG Hai-li, XIAO Lin-yan, CHEN Yi, SHAN Ming-qiu, ZHANG Li, DING An-wei

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, National and local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To observe the effect of different extracts from carbonized *Rubiae Radix* et *Rhizoma* (RRR) on acute blood stasis model of rats, in order to screen the optimal extraction method for its hemostatic effect by removing blood stasis. **Methods** The acute blood stasis models of rats were established with sc injection of high-dose adrenaline hydrochloride after continuous administration for 8 d and being soaked in ice-water, using Yunnan Baiyao as positive drug. The effect of the alcohol extract, compound (alcohol + aqueous) extract, aqueous extract, and aqueous extract after alcohol extracting on hemorheology, *in vitro* thrombus, blood platelets system, and fibrinolytic system in acute blood stasis model of rats were observed. **Results** Compared with the control group, the whole blood viscosity in each shear rate ($P < 0.01$) and the wet and dry weight of *in vitro* thrombus could be increased ($P < 0.05$), the coagulation time was prolonged ($P < 0.05, 0.01$), the FIB content and platelet aggregation rate induced by ADP increased ($P < 0.01$), the PAI-1 and TXB₂ contents increased, and the 6-keto-PGF_{1 α} content decreased in the rats of model group ($P < 0.05, 0.01$). Compared

收稿日期: 2015-12-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473348); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2014); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (PPZY2015A070)

作者简介: 王海丽 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量标准与创新药物研究。Tel: 15861815259

***通信作者** 丁安伟, 博士生导师, 教授。Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

with the model group, both the alcohol extract and compound extract could significantly improve the whole blood viscosity, decrease the wet and dry weight of external thrombus, shorten the coagulation time, increase the contents of PAI-1 and 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, and decrease the TXB $_2$ content ($P < 0.05$, 0.01). Both of them could make platelet aggregation rate increased, but have no significant influence on the content of FIB. The alcohol extract significantly decreased the content of t-PA ($P < 0.05$), while the compound extract significantly increased t-PA content ($P < 0.01$). The compound extract has influenced the hemorheology and the wet and dry weight of *in vitro* thrombus greater than the alcohol extract. While on the coagulation time, the effect of alcohol extract is greater.

Conclusion The hemostatic effects by removing blood stasis of alcohol extract and compound extract are stronger than those of others, especially the compound extract. In other words, the optimal extraction method of its hemostatic effect by removing blood stasis is the compound extract.

Key words: carbonized *Rubiae Radix et Rhizoma*; hemostasia by removing blood stasis; acute blood stasis model; *in vitro* thrombus; coagulation

茜草炭 carbonized *Rubiae Radix et Rhizoma* (RRR) 由茜草科 (Rubiaceae) 茜草属 *Rubus* L. 植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 干燥根和根茎经炒炭炮制而成^[1], 炒炭后寒性下降, 涩性增加, 止血作用增强, 临床上主要用于治疗由瘀血阻滞引起的吐血、崩漏、外伤出血等出血症^[2]。茜草炭现代研究较少, 研究方向集中在炮制前后化学成分以及药理作用变化^[3-5], 药理研究多在正常动物身上进行, 割裂了中医“病症”与中药及其炮制品之间的关联性, 孤立地去评价药物。且现代研究成果无法完全揭示茜草炭化瘀止血的物质基础及作用机制。为了进一步探究茜草炭化瘀止血物质基础及作用机制, 本实验观察茜草炭醇提物、醇提后水提物、醇提加水提物、水提物 4 种不同提取物对急性血瘀模型大鼠的影响, 初步确定茜草炭化瘀止血作用的物质基础。

1 材料

1.1 仪器

MR-16 型多环血栓检测仪 (上海高新技术研究所); HANGPING FA1104N 型十万分之一电子分析天平; SA-5000 半自动血流变测试仪 (北京中勤世帝科学仪器有限公司); LG-PABER 半自动凝血分析仪 (北京世帝科学仪器有限公司); TDZ4-WS 台式低速离心机 (上海安亭科学仪器厂); 352 型酶标仪 (芬兰 Labsystems Multiskan MS); Waters I Class 超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); KH-500B 超声机 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、枸橼酸钠、水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司); 凝血四项试剂盒: 凝血酶时间 (TT, 批号 STY20301-52)、凝血酶原时间 (PT, 批号 STY20101-89B)、活化部分凝血活酶时间 (APTT, 批号 STY20201-59)、血浆纤维蛋白原 (FIB, 批号 STY20401-63), 均为北京

中勤世帝科学仪器公司生产。ADP (北京中勤世帝科学仪器有限公司, ADP 粉剂 1 瓶, ADP 缓冲液 10 mL/瓶)。ELISA 试剂盒: 血栓素 B $_2$ (TXB $_2$, 批号 SBJ-R0548)、6-酮-前列腺素 1 α (6-keto-PGF $_{1\alpha}$, 批号 SBJ-R0532)、纤溶酶原激活物 (t-PA, 批号 SBJ-R0002) 和纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1, 批号 SBJ-R0574) 均购自南京森贝伽生物科技有限公司; 甲醇 (色谱纯, 江苏汉邦科技发展有限公司); 甲酸 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 药品

茜草购自安徽丰原铜陵中药饮片有限公司, 经南京中医药大学吴启南教授鉴定为茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥根和根茎。茜草炭按《中国药典》2010 年版一部有关要求炒制而成。云南白药 (批号 Z530207, 云南白药集团股份有限公司); 盐酸肾上腺素注射液 (批号 10150101, 上海禾丰制药有限公司); 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌为自制, 经 HPLC 检测质量分数 $\geq 98\%$, 大叶茜草素 (批号 110884-200604, 中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 98\%$), 羟基茜草素 (森贝伽生物科技有限公司, HPLC 检测质量分数 $\geq 98\%$)。

1.4 实验动物

SPF 级 SD 大鼠雌、雄各半, 体质量 180~220 g, 由浙江省实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (浙) 2014-0001。

2 方法

2.1 茜草炭不同提取物溶液的制备

(1) 茜草炭醇提物: 取茜草炭 500 g, 加 10 倍量 95% 乙醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并 2 次滤液, 减压回收溶剂, 干燥, 得浸膏 (得率 7.91%)。参照文献方法^[6], UPLC 检测得到浸膏中羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素的质量分数分别为 3.71、1.09、0.52 mg/g (以生药量计, 下同)。

(2) 茜草炭醇提后水提物: 将 500 g 茜草炭醇提后的残渣继续加 10 倍量水, 加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并 2 次滤液, 减压回收溶剂, 干燥, 得浸膏 (得率 11.27%)。UPLC 检测发现浸膏中检测不到大叶茜草素, 而羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌的质量分数分别为 0.63、0.04 mg/g。

(3) 茜草炭醇提加水提物: 取茜草炭 500 g, 加 10 倍量 95%乙醇加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 残渣加 10 倍量水加热回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并 4 次滤液, 减压回收溶剂, 干燥, 得浸膏 (得率 19.18%)。UPLC 检测发现浸膏中羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素的质量分数分别为 4.54、1.30、0.56 mg/g。

(4) 茜草炭水提物: 取茜草炭 500 g, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 2 h, 合并 2 次滤液, 减压回收溶剂, 干燥, 得浸膏 (得率 14.1%)。UPLC 检测发现浸膏中检测不到大叶茜草素, 而羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌的质量分数分别为 0.75、0.09 mg/g。

用 0.5% CMC-Na 溶液将云南白药粉末、茜草炭 4 种提取物浸膏研匀并稀释至实验所需质量浓度。

2.2 动物分组及给药

SD 大鼠, 雌、雄各半, 按体质量随机分为 7 组, 每组 10 只, 分别为对照组、模型组、云南白药组 (0.25 g/kg)、茜草炭醇提物组、茜草炭醇提后水提物组、茜草炭醇提加水提物组、茜草炭水提物组 (按临床给药剂量 2 倍折算, 茜草炭不同提取物给药剂量均按茜草炭生药量计设为 2.5 g/kg)。各给药组分别 ig 给予相应药物, 对照组与模型组 ig 给予等体积的 0.5% CMC-Na 溶液, 每天给药 2 次, 连续给药 8 d。

2.3 急性血瘀大鼠模型的制备

参照文献方法复制急性血瘀模型大鼠^[7], 第 7 天给药后, 除对照组 sc 生理盐水外, 其余各组均于大鼠背部两侧 sc 盐酸肾上腺素 2 次, 间隔 4 h, 注射剂量为 0.8 mL/kg, 在第 1 次 sc 2 h 后, 除对照组外, 其余各组大鼠均浸入 0~2 °C 冰水中, 冰浴 5 min。

2.4 指标测定

第 8 天, 各组正常给药 40 min 后, 各组大鼠 10%水合氯醛麻醉, 颈动脉取血, 分装 1.5 mL 未加抗凝剂的全血, 采用 MR-16 型多环血栓检测仪进行体外血栓形成实验, 测定体外血栓湿质量和干质

量; 其余全血 3.8%枸橼酸钠 1:9 抗凝, 取 1 mL 全血分装, 以 SA-5000 半自动血流变测试仪测定全血高、中、低切黏度; 剩余全血以 800 r/min 离心 10 min, 得富血小板血浆 (PRP), 测定 ADP 诱导的血小板聚集率; 余血再以 3 000 r/min 离心 10 min, 得贫血小板血浆 (PPP), 测定内/外源性凝血功能指标 (TT、PT、APTT、FIB), ELISA 法测定 TXB₂、6-keto-PGF_{1α}、t-PA 和 PAI-1 水平。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行双样本 *t* 检验及方差分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对体外血栓质量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠体外血栓湿质量与干质量显著增加 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 云南白药、茜草炭醇提后水提物与茜草炭水提物均显著降低模型大鼠血栓湿质量 ($P < 0.05$ 、0.01), 具有降低血栓干质量趋势; 茜草炭醇提物、醇提加水提物显著降低血栓湿质量与干质量 ($P < 0.05$ 、0.01)。其中茜草炭醇提后水提物对血栓湿质量影响最显著, 茜草炭醇提加水提物作用次之, 两者作用效果无统计学差异; 茜草炭醇提加水提物对血栓干质量影响最显著。综合茜草炭提取物对体外血栓湿质量与干质量的影响, 可见茜草炭醇提加水提物对模型大鼠体外血栓质量影响最显著。结果见表 1。

3.2 对血液流变学指标的影响

与对照组比较, 模型组大鼠全血各切变率下黏

表 1 茜草炭不同提取物对体外血栓质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Effect of different extracts from carbonized RRR on weight of *in vitro* thrombos ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	血栓湿质量/g	血栓干质量/g
对照	—	0.520 1±0.081 5	0.095 3±0.016 8
模型	—	0.607 5±0.043 2 [#]	0.116 7±0.018 5 [#]
云南白药	0.5	0.542 4±0.081 5 [*]	0.108 7±0.009 3
茜草炭醇提物	5.0	0.516 2±0.054 8 ^{**}	0.098 2±0.010 2 [*]
茜草炭醇提加水提物	5.0	0.514 1±0.063 1 ^{**}	0.094 9±0.011 4 ^{**}
茜草炭醇提后水提物	5.0	0.488 6±0.053 6 ^{**}	0.106 9±0.009 2
茜草炭水提物	5.0	0.541 4±0.059 8 [*]	0.112 1±0.015 5

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

^{**} $P < 0.01$, 下同

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

度均显著增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 云南白药和茜草炭醇提物均可降低模型大鼠低切黏度 ($P<0.05$); 茜草炭醇提加水提物显著降低模型大鼠各切变率下黏度 ($P<0.01$); 除了茜草炭水提物能够有效改善模型大鼠 5 s^{-1} 切变率下黏度, 茜草炭醇提后水提物和茜草炭水提物均有降低模型大鼠全血黏度趋势, 但均无统计学差异; 其中茜草炭醇提加水提物降低模型大鼠全血黏度最为显著 ($P<0.01$)。结果见表 2。

3.3 对凝血四项以及血小板聚集率的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 TT、PT、APTT 显著延长, FIB 水平增加, ADP 诱导的血小板聚集率显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组比较, 云南白

药显著缩短 TT、增加 FIB 的量 ($P<0.05$); 茜草炭醇提物和醇提加水提物显著缩短 TT、PT、APTT ($P<0.05$ 、 0.01), 对 FIB 量影响不大, 两组间作用效果无统计学差异; 茜草炭醇提后水提物与水提物显著缩短 APTT、增加 FIB 的量 ($P<0.05$), 有缩短 TT、PT 趋势; 茜草炭醇提物与水提物有增加 ADP 诱导的血小板聚集率趋势, 而醇提加水提物与醇提后水提物显著升高 ADP 诱导的血小板聚集率 ($P<0.01$)。茜草炭醇提物与醇提加水提物对 TT、PT、APTT 作用效果优于醇提后水提物与水提物; 醇提后水提物对 FIB 量、血小板聚集率的影响最显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 而醇提物与水提物作用效果弱。结果见表 3。

表 2 茜草炭不同提取物对血瘀模型大鼠全血黏度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of different extracts from carbonized RRR on hemorheology of blood stasis rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)			
		200 s ⁻¹	30 s ⁻¹	5 s ⁻¹	1 s ⁻¹
对照	—	4.54±0.44	5.75±0.53	9.16±0.89	19.29±2.09
模型	—	5.47±0.36 ^{##}	7.16±0.54 ^{##}	12.10±0.94 ^{##}	26.33±2.41 ^{##}
云南白药	0.5	5.36±0.28	6.87±0.61	10.81±1.02 [*]	22.68±2.64 [*]
茜草炭醇提物	5.0	5.37±0.25	6.95±0.48	11.01±0.88 [*]	23.01±2.43 [*]
茜草炭醇提加水提物	5.0	3.60±0.66 ^{**}	4.97±0.83 ^{**}	9.23±1.49 ^{**}	20.78±1.92 ^{**}
茜草炭醇提后水提物	5.0	5.24±0.53	6.91±0.57	11.28±0.99	24.91±1.57
茜草炭水提物	5.0	4.95±0.47	6.48±0.55	10.70±1.00 [*]	23.67±2.93

表 3 茜草炭不同提取物对血瘀模型大鼠凝血四项、血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of different extracts from carbonized RRR on TT, PT, APTT, FIB, and platelet aggregation rate induced by ADP of blood stasis rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	TT/s	PT/s	APTT/s	FIB/(g·L ⁻¹)	血小板最大聚集率/%
对照	—	26.30±3.15	18.50±1.19	19.21±1.90	2.24±0.38	13.42±2.49
模型	—	34.04±2.77 ^{##}	21.64±3.68 [#]	22.86±4.52 [#]	7.02±0.55 ^{##}	20.77±3.90 ^{##}
云南白药	0.5	28.68±4.73 [*]	20.37±3.42	20.35±3.34	8.02±0.95 [*]	23.60±4.33
茜草炭醇提物	5.0	29.46±5.18 [*]	16.23±2.53 ^{**}	16.43±1.43 ^{**}	6.73±0.83	25.36±6.49
茜草炭醇提加水提物	5.0	29.81±4.33 [*]	16.64±2.22 ^{**}	16.91±2.57 ^{**}	7.34±0.86	33.38±4.45 ^{**}
茜草炭醇提后水提物	5.0	34.06±2.14	20.30±1.39	19.09±1.71 [*]	8.27±0.95 [*]	35.61±3.81 ^{**}
茜草炭水提物	5.0	33.28±4.04	20.99±2.09	18.72±2.57 [*]	7.83±0.83 [*]	24.33±5.39

3.4 对血小板功能及纤溶系统的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 PAI-1、TXB₂ 水平升高, 6-keto-PGF_{1α} 水平降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 有降低 t-PA 的量趋势。与模型组比较, 云南白药显著降低 PAI-1、TXB₂ 的量, 升高 6-keto-PGF_{1α} 的量 ($P<0.01$), 具有升高 t-PA 量的趋势; 茜草炭醇提物与醇提加水

提物显著降低 TXB₂ 的量, 升高 PAI-1、6-keto-PGF_{1α} 的量 ($P<0.05$ 、 0.01), 醇提物亦可降低 t-PA 的量 ($P<0.05$), 而醇提加水提物升高 t-PA 量 ($P<0.01$); 茜草炭醇提后水提物与水提物显著升高 6-keto-PGF_{1α} 的量 ($P<0.01$), 有升高 PAI-1、TXB₂ 的量, 降低 t-PA 量的趋势。与对照组比较, 模型组

t-PA/PAI-1 值下降、TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 值升高；与模型组比较，云南白药与茜草炭醇提加水提物可升高 t-PA/PAI-1，降低 TXB₂/6-keto-PGF_{1α}，而其他各给药组降低 t-PA/PAI-1、TXB₂/6-keto-PGF_{1α}。综合

茜草炭不同提取物对 t-PA/PAI-1 与 TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 作用趋势，可见茜草炭醇提加水提物对 t-PA/PAI-1、TXB₂/6-keto-PGF_{1α} 作用效果最显著。结果见表 4。

表 4 茜草炭不同提取物对急性血瘀模型大鼠 PAI-1、t-PA、TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α} 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of different extracts from carbonized RRR on PAI-1, t-PA, TXB₂, and 6-keto-PGF_{1α} of blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	PAI-1/ (ng·L ⁻¹)	t-PA/ (μg·L ⁻¹)	t-PA/ PAI-1	TXB ₂ / (ng·L ⁻¹)	6-keto-PGF _{1α} / (ng·L ⁻¹)	TXB ₂ /6-keto- PGF _{1α}
对照	—	486.14±30.18	12.49±1.26	25.40±3.57	182.50±20.12	223.94±13.00	0.82±0.11
模型	—	528.67±35.10 [#]	12.22±0.78	22.90±1.19	206.53±12.70 ^{###}	184.23±14.76 ^{###}	1.13±0.11 ^{###}
云南白药	0.5	462.25±51.73 ^{**}	12.39±1.48	27.03±3.95 ^{**}	185.84±18.12 ^{**}	231.68±18.19 ^{**}	0.81±0.10 ^{**}
茜草炭醇提物	5.0	642.39±49.10 ^{**}	10.97±1.15 [*]	17.13±1.92 ^{**}	191.61±15.77 [*]	241.25±25.80 ^{**}	0.81±0.13 ^{**}
茜草炭醇提加水提物	5.0	579.37±41.36 [*]	14.19±1.04 ^{**}	24.60±2.30	165.05±13.05 ^{**}	219.25±20.55 ^{**}	0.76±0.07 ^{**}
茜草炭醇提后水提物	5.0	554.08±58.71	11.93±0.97	21.73±2.75	208.33±15.54	250.69±19.74 ^{**}	0.84±0.10 ^{**}
茜草炭水提物	5.0	572.07±68.82	10.29±0.92	18.30±3.37 ^{**}	219.34±19.90	297.22±26.10 ^{**}	0.74±0.11 ^{**}

4 讨论

全血黏度是反映血液流变学基本特征的参数，也是反映血液黏滞程度的重要指标。肾上腺素联合冰水刺激可造成大鼠急性血液高黏滞模型^[8]，血液黏稠度增加，机体形成血栓的趋势增大。通过考察茜草炭不同提取物对急性血瘀模型大鼠的全血黏度与体外血栓湿质量、干质量的影响，比较各提取物化瘀作用强弱。茜草炭 4 种提取物均可不同程度改善血瘀模型大鼠全血高黏状态、降低体外血栓湿质量与干质量，其中茜草炭醇提物与醇提加水提物作用效果优于醇提后水提物与水提物，醇提加水提物效果最佳。

中医理论认为，瘀阻经脉，血行不畅，溢于脉外，形成离经之血，故瘀血常伴随着出血。造模过程中观察到大鼠足肿胀、耳后出现瘀斑，耳后、眼睛、鼻子等处可见出血点。本实验选择 TT、PT、APTT、FIB 4 个指标研究茜草炭不同提取物对凝血系统的作用。TT 反映内、外源性凝血途径的共同凝血途径；PT 是外源性凝血途径常测指标；APTT 是内源性凝血途径常测指标；FIB 表示纤维蛋白原的量，反映是否有足量的纤维蛋白原生成纤维蛋白。除了茜草炭醇提后水提物对 TT 无作用效果，以及茜草炭醇提物降低模型大鼠 FIB 的量外，其余茜草炭提取物均可以缩短 TT、PT、APTT，升高 FIB 的量，其中茜草炭醇提物与醇提加水提物对 TT、PT、APTT 作用效果强于茜草炭醇提后水提物与水提物，醇提

后水提物对 FIB 的量影响最显著，醇提加水提物与水提物作用效果次之。可见茜草炭提取物可通过影响内、外源性凝血途径发挥止血作用。

本实验亦考察了茜草炭不同提取物对血小板系统与纤溶系统的影响。通过测定 ADP 诱导的血小板聚集率、TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 3 个指标，探讨茜草炭不同提取物如何影响血小板系统达化瘀止血之效。茜草炭提取物均能提高 ADP 诱导的血小板聚集率，其中茜草炭醇提后水提物与醇提加水提物作用效果强于醇提物与水提物。TXB₂ 由血小板释放，具有收缩血管、促进血小板聚集作用，6-keto-PGF_{1α} 是 TXB₂ 抑制物，具有舒张血管、抑制血小板聚集作用。模型组大鼠 TXB₂ 的量增加，6-keto-PGF_{1α} 的量下降，符合瘀血模型特征。较其他提取物而言，茜草炭醇提加水提物对 TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 作用效果最显著，亦可显著降低模型大鼠 TXB₂/6-keto-PGF_{1α}，降低瘀血模型大鼠血小板聚集，扩张血管，降低血栓形成趋势。t-PA 是纤溶系统激活物，可促进纤维蛋白溶解，PAI-1 是 t-PA 抑制物，可降低纤溶功能、促进末梢微循环瘀滞、增加血栓形成趋势^[9-10]，模型组大鼠 PAI-1 的量增加，t-PA 的量有降低趋势，符合瘀血模型特征，茜草炭提取物均可升高 PAI-1 的量，除了醇提加水提物可升高 t-PA 的量，升高 t-PA/PAI-1，其他提取物均降低 t-PA 的量与 t-PA/PAI-1。综上茜草炭醇提加水提物对血瘀模型大鼠血小板系统和纤溶系统作用强。

UPLC 分析茜草炭不同提取物发现,醇提加水提物含有醇提后水提物与水提物中不含有的大叶茜草素,研究表明,大叶茜草素对血小板聚集有一定的抑制作用^[11];醇提加水提物中亦含有羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌,其量明显高于其他提取物,羟基茜草素可抑制了 PHBP 对凝血因子 VIII 的激活^[12],本课题组发现炒炭后 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌的量升高,该物质对人脐静脉损伤细胞有一定保护作用,推测大叶茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌可能为茜草炭醇提加水提物发挥化瘀止血作用的有效成分。结合药理数据初步推测化学成分种类及量的差异是导致茜草炭不同提取物化瘀止血作用差异的主要原因。综上所述,醇提加水提是茜草炭化瘀止血作用的最佳提取方式,但茜草炭发挥化瘀止血作用的活性成分(群)以及化学成分与药效关联性还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
- [3] 单鸣秋, 陈 星, 王 侃, 等. 炒炭前后茜草中 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌含量的 UPLC 测定 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(12): 9-11.
- [4] 耿启彬, 黄海龙, 翁壮锋, 等. 茜草和茜草炭对正常大鼠凝血-纤溶系统的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 279-282.
- [5] 余旭东, 杨季菱. 茜草与茜草炭药理作用比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9): 53-56.
- [6] 陈 星, 王 侃, 单鸣秋, 等. UPLC 测定茜草炭中 4 种醌类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2922-2925.
- [7] 郑传柱, 贾 梅, 张 丽, 等. 胶艾汤与四物汤对血瘀模型大鼠活血功效的比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2652-2657.
- [8] 秦任甲. 血液流变学研究进展与问题 [J]. 中国医学物理学杂志, 2003, 20(2): 65-69.
- [9] Heberlein K R, Straub A C, Best A K, *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 regulates myoendothelial junction formation [J]. *Circ Res*, 2010, 106(6): 1092-1102.
- [10] Izuhara Y, Yamaoka N, Kodama H, *et al.* A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(5): 904-912.
- [11] 田代华. 实用中药辞典 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [12] Nishimura N, Takai M, Yamamoto E, *et al.* Purpurin as a specific inhibitor of spermidine-induced autoactivation of the protease plasma hyaluronan-binding protein [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(8): 1430-1433.