

绵马贯众炭中新型碳点的发现及其止血作用研究

熊 威¹, 赵 琰², 成金俊², 张美龄², 孙紫薇², 罗 娟¹, 朱雅凡², 张亚雪², 孔 慧², 屈会化^{3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029

摘要: **目的** 在绵马贯众炭中发现新型的纳米类成分——碳点, 并研究其止血作用。**方法** 通过对绵马贯众炭水煎液提取、分离和透析得到一种新型水溶性的纳米类成分碳点, 命名为绵马贯众炭碳点(DCC-CDs)。利用透射电子显微镜(TEM)、高分辨透射电子显微镜(HR-TEM)、紫外-可见分光光度法(UV-vis)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、X-射线光电子能谱分析(XPS)、高效液相色谱(HPLC)等多种仪器和方法, 对DCC-CDs进行了表征。通过小鼠断尾和肝脏出血实验评价DCC-CDs的止血作用, 通过测定凝血四项及血小板(PLT)数量探讨其止血机制。**结果** 从绵马贯众炭中分离出来的DCC-CDs外形近似球形, 分散度良好, 粒径分布在1~7 nm。动物实验结果显示DCC-CDs具有良好的止血效果, 能显著减少小鼠断尾和肝脏出血时间($P < 0.01$)。此外, DCC-CDs也能使大鼠血液中纤维蛋白原(FIB)浓度和PLT的数量显著升高($P < 0.05$)。**结论** DCC-CDs具有止血效果, 本研究为应用DCC-CDs治疗出血性疾病的研究提供新思路, 也为中药有效成分的探索提供全新的思维模式。

关键词: 绵马贯众炭; 碳点; 表征; 止血作用; 止血机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)06-1388-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.019

Novel carbon dots derived from *Dryopteridis Crassirhizomatis Rhizoma Carbonisatum* and their hemostatic effect

XIONG Wei¹, ZHAO Yan², CHENG Jin-jun², ZHANG Mei-ling², SUN Zi-wei², LUO Juan¹, ZHU Ya-fan², ZHANG Ya-xue², KONG Hui², QU Hui-hua³

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** A new type of nanoparticles—carbon dots was identified from *Dryopteridis Crassirhizomatis Rhizoma Carbonisatum* (DCC) and investigated their hemostatic effect. **Methods** DCC was boiled, filtered, and dialyzed to separate and obtain a novel type of carbon dots named DCC-CDs. These DCC-CDs were characterized using transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution TEM, as well as Fourier transform infrared, ultraviolet-visible, X-ray photoelectron spectroscopy, and HPLC. Then, the anti-hemorrhagic effects were evaluated by severed tails and liver bleeding tests and the related hemostatic mechanisms of the obtained DCC-CDs were assessed by detecting blood coagulation and PLT quantity to discuss the hemostasis mechanism. **Results** The DCC-CDs separated from DCC were spherical, monodisperse, which had a narrow size distribution between 1 and 7 nm. In the animal experiment, DCC-CDs were revealed excellent hemostatic bioactivity, and significant decreased in the tail and liver bleeding time ($P < 0.01$). Additionally, the rats showed a profound increasing in fibrinogen (FIB) and platelets (PLT) after DCC-CDs treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** These results demonstrated an explicit hemostatic effect of DCC-CDs, which offers new avenues for research into DCC to treat hemorrhagic diseases and a new mindset for the exploration of the active ingredients of traditional Chinese medicine.

Key words: *Dryopteridis Crassirhizomatis Rhizoma Carbonisatum*; carbon dots; characterization; hemostasis; hemostasis mechanism

收稿日期: 2018-08-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81573573); 国家自然科学基金资助项目(81503344); 国家自然科学基金资助项目(81473338)

作者简介: 熊 威(1987—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药化学。Tel: 17812095212 E-mail: bucmxiongwei@163.com

*通信作者 屈会化(1966—), 男, 硕士生导师, 研究员, 研究方向为经典方剂的配伍与应用。Tel: 13661101910 E-mail: quhuihuadr@163.com

绵马贯众为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎和叶柄残基, 始载于《神农本草经》, 具有清热解毒、驱虫的作用。绵马贯众炭 *Dryopteridis Crassirhizomatis Rhizoma Carbonisatum* 是绵马贯众高温炭化的炮制品, 被国家药品标准《中国药典》2015年版所收录, 具有收涩止血的功效。临床上作为一种止血类中药, 其常用于治疗衄血、吐血、崩漏、便血、外伤出血等多种出血证^[1-2]。

绵马贯众炭良好的止血作用与其炮制过程息息相关, 炒炭的过程赋予了原药材更好的止血效果。现代医学的研究也证实了通过炒炭的方法能使许多中药具有很好的止血效果^[3]。近年来, 大量的研究致力于揭示中药炒炭止血的物质基础, 人们通过利用现有的中药物质基础的研究理念, 从中药小分子或金属离子的角度阐释其物质基础: (1) 鞣质或黄酮类成分的变化与其止血作用的增强有紧密关系^[4]; (2) 钙、铁、镁等离子发挥了止血作用^[5]。但上述观点都无法解释多种中药经过炒炭之后具有共性的止血作用这一现象。因此, 本课题组把研究重点转到高温炭化这一共同炮制工艺上, 高温炭化产生的碳纳米类成分——碳点 (C-dots) 引起笔者的注意。

碳点作为纳米材料中的重要成员, 一经发现便受到人们广泛关注和深入研究^[6]。碳点具有水溶性、低毒性、良好的生物相容性等优越的性质, 使其广泛应用于生物成像^[7]、药物递送^[8]、纳米探针^[9]等诸多领域。碳点的主要合成方法是高温热解法, 这与炭药的炮制方法有着相似之处, 这就启发笔者从碳点的角度来研究炭药止血的物质基础。在本研究中, 从绵马贯众高温炭化这一过程中, 发现并分离了纳米类成分碳点, 并命名为绵马贯众炭碳点 (DCC-CDs), 在充分表征其结构信息的基础上, 利用小鼠断尾和肝脏出血模型对其止血效果进行评价, 并初步探究其止血作用机制, 为绵马贯众炭临床应用及止血新药开发提供参考。

1 材料

1.1 药品和试剂

绵马贯众药材购于北京仟草中药饮片有限公司, 产地辽宁, 生产批号 160429003, 经北京中医药大学王庆国教授鉴定为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎和叶柄残基; 白眉蛇毒血凝酶 (HC, 批号 20160702) 购于

锦州奥鸿制药有限公司; 透析膜 (截留相对分子质量 1 000) 购于北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 戊巴比妥钠 (批号 P3761) 购于美国 Sigma 公司; 3.2% 枸橼酸钠购于上海源叶生物科技有限公司; 乙醇和其他分析级化学试剂均购于北京化学试剂公司; 所有实验用水均为去离子水。

1.2 动物

SPF 级昆明种小鼠 35 只, 体质量 (25.0 ± 2.0) g, 质量合格证编号 11401500043385; SPF 级 SD 大鼠 35 只, 体质量 (200.0 ± 10.0) g, 质量合格证编号 11401500039535, 实验动物均购于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号均为 SCXK (京) 2016-0002。实验期间动物均饲养于同一环境下, 保持室温 (24.0 ± 1.0) °C, 空气湿度 55%~65%, 环境安静, 动物随意进食进水, 明、暗 12 h 循环饲养。所有动物于实验前 24 h 禁食不禁水。

1.3 仪器

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪 (含四元泵-二极管阵列检测器, 自动进样器, Agilent Technologies, Palo Alto, 美国); TecnaiG220 透射电子显微镜 (FEI Company, 美国); JEN-1230 高分辨透射电子显微镜 (Japan Electron Optics Laboratory, 日本); 紫外分光光度计 (CECIL, 英国) 和 F-4500 荧光分光光度计 (Hitachi, 日本); 红外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国); ESCALAB 250 X 射线光电子能谱分析仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国); CA-550 全自动凝血分析仪、XI-800 血液分析仪 (Sysmex Corporation, 日本)。

2 方法

2.1 DCC-CDs 的制备

按照本实验室已有工艺烧制绵马贯众炭并制备 DCC-CDs^[10-11]。制备过程如下: 称取绵马贯众干燥药材 100 g, 放于坩埚中, 铝箔纸密封并加盖于马弗炉中烧制。马弗炉程序升温: 第 1 阶段 5 min 升温至 70 °C, 保温 30 min; 第 2 阶段 25 min 升温至 300 °C, 保温 1 h。将烧制好的绵马贯众炭置于粉碎机中粉碎。称取炭粉末 50 g, 于 10 倍去离子水中煎煮 2 次, 温度为 100 °C, 时间为 1 h。用 0.22 μm 微孔滤膜滤过残渣, 合并 2 次滤液, 浓缩并透析 72 h 以上, 所用透析膜截留相对分子质量 1 000。将获取的 DCC-CDs 于 4 °C 保存, 留置待用。

2.2 DCC-CDs 的表征

2.2.1 HPLC 法比较所获得的 DCC-CDs 和原药材在成分上的区别^[12-13] 称取绵马贯众药材 5 g, 加入 30 mL 甲醇超声处理 30 min, 获得样品 a; 将“2.1”项制备的 DCC-CDs 用水稀释至 0.5 g/mL (按炭药量计算), 获得样品 b。所有样品在进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。色谱条件: 色谱柱为 Reliasil-C₁₈ (250 mm×4.6 mm; 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 磷酸, B 为甲醇, 梯度洗脱: 0~10 min, 20% B; 10~15 min, 20%~48% B; 15~20 min, 48%~50% B; 20~30 min, 50%~68% B; 30~40 min, 68%~80% B; 40~50 min, 80%~90% B; 50~60 min, 90%~95% B; 60~70 min, 95%~98% B; 进样量 10.0 μL, 体积流量 1 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 286 nm。

2.2.2 TEM 观察 DCC-CDs 的外貌形态、粒径分布和微观结构特征 利用 HR-TEM 观察 DCC-CDs 结构特征。将 DCC-CDs 透析液倍比稀释后取 2 mL 置于离心管中超声分散 5 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 然后用 1 mL 注射器吸取少量的待测样品滤液滴于电镜专用的铜网上, 自然干燥。将铜网放置于透射电子显微镜中, 选择视野范围, 观察样品中碳点的微观结构。

2.2.3 DCC-CDs 的光学特征、结构特征及表面官能团信息 利用紫外分光光度计和荧光分光光度计分析 DCC-CDs 的光学特征和结构特征。DCC-CDs 透析液倍比稀释, 吸取 3 mL 于石英比色皿中, 然后放入紫外可见分光光度计样品槽内, 波长扫描范围为 200~600 nm, 测试 DCC-CDs 紫外光谱。再吸取上述样品 3 mL 于石英比色皿中, 放入荧光分光光度计的样品槽内, 调节扫描速度为 1 200 nm/min, 测试 DCC-CDs 荧光光谱。利用红外分光光度计分析 DCC-CDs 表面的官能团信息。具体操作如下: 先用电子分析天平称取溴化钾粉末 0.160 g; 将 2 mL 的 DCC-CDs 透析液样品与 0.160 g 的溴化钾混合, 烘干后碾磨成细粉, 置于模具中压片。尽量避免样品长时间暴露于空气中, 然后迅速放入红外测试仪器样品架中测定其红外光谱。

2.2.4 DCC-CDs 元素分析 利用 X 射线光电子能谱分析仪分析 DCC-CDs 中所含有的元素及其配位信息。取 20 mL DCC-CDs 透析液滴入蒸发皿中, 放置在水浴锅上烘干。完全干燥后用药匙将 DCC-CDs 粉末轻轻刮下, 均匀铺在铝箔上, 盖上一片铝箔, 液压机压平后迅速放入 X 射线光电子能谱

分析仪中进行分析测试。

2.3 荧光量子产率(Q)的计算

本实验以硫酸奎宁为参照物 (Q 为 0.54), 利用如下公式计算 DCC-CDs 的 Q ^[14]。为了使重吸收效应最小化, A_R 和 A_{CDs} 应该保证在 0.05 以下。

$$Q_{CDs} = Q_R \times (I_{CDs}/I_R) \times (A_R/A_{CDs}) \times (\eta_{CDs}^2/\eta_R^2)$$

I 为发射光谱下的峰下面积, A 为 355 nm 时的吸光度值, η 为溶剂的折射率, CDs 和 R 为 DCC-CDs 和参照物

2.4 DCC-CDs 止血作用的研究

2.4.1 小鼠断尾出血实验^[15] 取雄性昆明种小鼠 35 只, 随机分成 5 组, 每组 7 只, 分别为对照组 (生理盐水)、阳性药组 (HC 浓度为 0.1 kU/mL, 给药剂量 0.67 kU/kg^[11]) 及 DCC-CDs 高、中、低剂量 (10、4、2 g/kg) 组, 给药体积为 20 mL/kg。动物适应后分别给药, 阳性药组 sc 给药, 对照组和 DCC-CDs 各组均 ip 给药。给药 1 h 后, 用 4% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) ip 麻醉小鼠。用干净的手术剪刀在距小鼠尾尖 1 cm 处剪断, 每隔 30 s 将尾尖蘸 1 次滤纸片, 直至滤纸片上没有血迹, 视为停止出血, 记录从剪断开始出血到停止出血所需时间。

2.4.2 小鼠肝脏出血实验^[16] 分组和给药同断尾实验。麻醉后用手术剪将小鼠沿腹中线剪开, 暴露肝脏。用生理盐水浸润的纱布将小鼠的肝脏垫起。用 2 mL 注射器针头在小鼠肝脏刺深度为 2 mm 的创口, 按下秒表开始计时, 每隔 30 s 用生理盐水浸润的小滤纸片蘸 1 次伤口, 直至滤纸片上没有血迹, 视为停止出血。记录实验结果即扎破肝脏开始出血到停止出血时间。

2.5 DCC-CDs 对凝血系统的影响^[17]

雄性 SD 大鼠 35 只, 随机分成 5 组, 每组 7 只, 分别为对照组 (生理盐水)、阳性药组 (HC 浓度和给药剂量同断尾实验) 及 DCC-CDs 高、中、低剂量 (2.5、1、0.5 mg/kg) 组, 给药体积为 5 mL/kg。动物适应后开始给药, 阳性药组 sc 给药, 对照组和 DCC-CDs 各组均 ip 给药。给药后 1 h, 用 4% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) ip 麻醉大鼠, 腹主动脉取血后迅速注入到预先装有 3.2% 枸橼酸钠 (枸橼酸钠-血 1:9) 的离心管中, 上下晃动 10 次, 保证抗凝剂与血液充分混匀, 静置 0.5 h 后将其 3 000 r/min 离心 15 min, 作为凝血四项的测定样本。同时用一次性注射器取血 1~2 滴注入预先装有 EDTA-K₂ 的抗凝管中, 轻弹管壁, 使血液与抗凝剂充分混匀, 作为血小板数目的测定样本。在 Sysmex 全自动血凝仪

和血球分析仪上进行检测,依次测定凝血四项:凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)和血小板(PLT)。

2.6 统计方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析,所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用方差分析。

3 结果

3.1 DCC-CDs 制备和表征结果

3.1.1 HPLC 分析结果 DCC-CDs 通过提取分离、滤过、浓缩、透析等一系列过程制备完成。绵马贯众药材和 DCC-CDs 的 HPLC 图谱对比见图 1,绵马

贯众生药的 HPLC 图谱(图 1-A)中可以看出其成分复杂,小分子种类繁多;而 DCC-CDs 的 HPLC 图谱(图 1-B),在相同的液相条件下,DCC-CDs 中并未检测到小分子类化合物。

3.1.2 TEM 观察结果 DCC-CDs 的微观结构通过 TEM 来观察,如图 2-a 低分辨 TEM 结果表明,绵马贯众炭中的纳米类成分粒径分布较均一,在 1~7 nm,主要集中在 4.2 nm 左右,符合正态分布特征,如图 2-b。由此可知,该温度下烧制的 DCC-CDs 均一性良好。高分辨 TEM 结果如图 2-c 所示,成分呈现出类球形结构,晶格分布明显清晰,晶格间距为 0.278 nm。

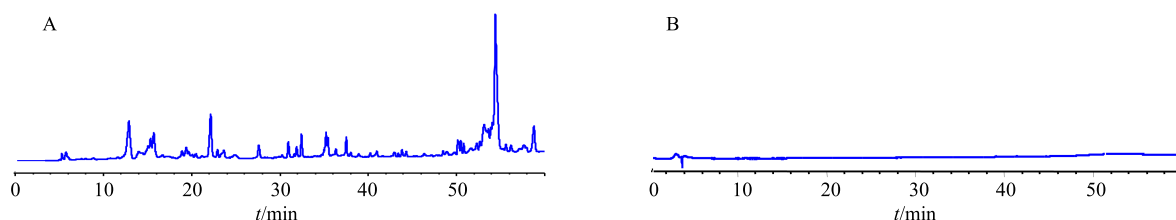
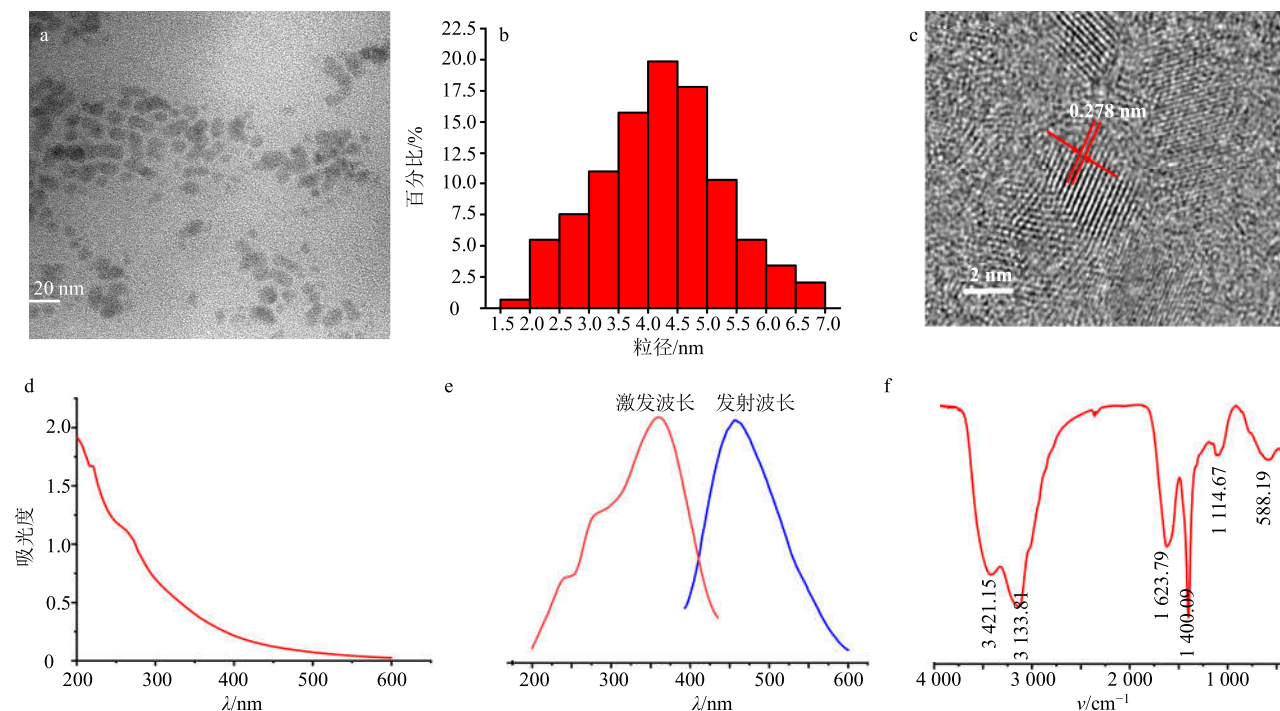


图 1 绵马贯众药材 (A) 和 DCC-CDs (B) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of (a) *Dryopteridis Crassirhizomatis Rhizoma Carbonisatum* (A) and DCC-CDs (B)



a-TEM 图 b-粒径分布图 c-HR-TEM 图 d-紫外光谱图 e-荧光光谱图 f-红外光谱图

a-TEM images of DCC-CDs b-histogram depicting particle size distribution c-HR-TEM image of DCC-CDs

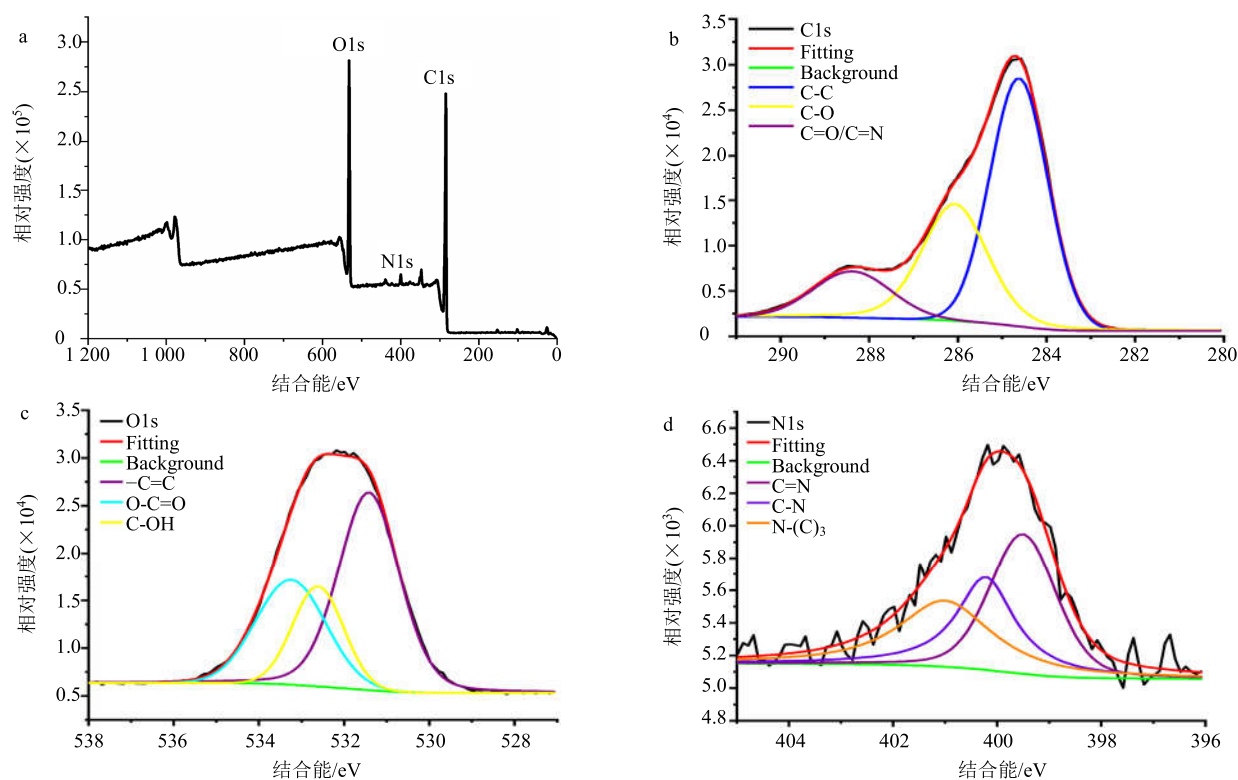
d-ultraviolet-visible (UV-vis) chart e-fluorescence spectra and spectrum chart f-FTIR spectrum chart

图 2 DCC-CDs 的表征结果

Fig. 2 Characterization of DCC-CDs

3.1.3 DCC-CDs 的光学特征、结构特征信息 利用紫外分光光度计测定出的紫外光谱图见图 2-d, 结果显示 DCC-CDs 在 260 nm 左右有微弱的紫外吸收, 这可能是由于 C=O 双键引起的 $n-\pi^*$ 跃迁所导致。荧光光谱图见图 2-e, 如图所示 DCC-CDs 的荧光光谱的最大激发波长出现在 360 nm 左右, 最大发射波长出现在 460 nm 左右。以硫酸奎宁为参照, 计算 DCC-CDs 的 Q 为 7.3%。红外光谱结果如图 2-f, 红外吸收峰分别为 3 421、3 133、1 623、1 400、1 114、588 cm^{-1} , 分析可知 3 421 cm^{-1} 峰为 -N-H 键, 3 313 cm^{-1} 的峰表示 -O-H 键, 1 623 cm^{-1} 的弱吸收表示 -C=O 键, 1 400 cm^{-1} 的强吸收表示 -C-N 键。红外光谱结果显示 DCC-CDs 表面存在羟基、羰基和氨基等功能基团。

3.1.4 DCC-CDs 元素组成和表面官能团分析 通过 X 射线光电子能谱分析技术 (XPS) 对 DCC-CDs 元素组成和表面官能团进行了表征。全扫描如图 3-a 所示, 在 284.8、400.1、532.9 eV 的 3 个峰, 表明 DCC-CDs 样品主要由 C、O 元素和少量 N 元素组成。元素分析结果表明样品中碳含量为 72.07%, 氧含量为 25.55%, 而氮含量仅为 2.08%。在高分辨率 XPS 谱图中, C1s 谱带 (图 3-b) 可以解析为 284.6、286.1、288.4 eV 的 3 个峰, 分别对应于 C-C、C-O 和 C=O/C=N 键。O1s 谱带 (图 3-c) 在 531.4、532.6、533.2 eV 处出现 3 个峰, 分别对应 C=O、C-OH 和 O-C=O 键。N1s 谱带 (图 3-d) 可以解析为 399.5、400.2、401.0 eV 的 3 个峰, 分别对应 N=C、C-N-C 和 N-(C)₃ 键。



a-DCC-CDs 元素峰图 b-碳分峰图 c-氧分峰图 d-氮分峰图

a-XPS spectra of DCC-CDs b-C1s peaks of DCC-CDs c-O1s peaks of DCC-CDs d-N1s peaks of DCC-CDs

图 3 DCC-CDs 的表面基团和元素组成信息分析

Fig. 3 Surface composition and elemental analysis of DCC-CDs

3.2 DCC-CDs 的止血效果

在小鼠断尾出血实验中, HC 和 DCC-CDs 高、中、低剂量均能减少小鼠出血时间。结果见表 1, 与对照组比较, DCC-CDs 高、中、低剂量组和 HC 组小鼠断尾出血时间显著减少 ($P < 0.01$)。在

小鼠肝脏出血实验中, 与对照组相比, HC 和 DCC-CDs 高、中、低剂量均显著减少小鼠肝脏出血时间 ($P < 0.01$)。这表明高、中、低剂量 DCC-CDs 对于小鼠的尾尖和肝脏出血模型均具有较为明显的止血作用。

表 1 小鼠断尾出血模型和肝脏出血模型的出血时间 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Hemostatic time in mice tail amputation and liver scratch models ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	断尾出血 时间/min	肝脏出血 时间/min
对照	—	17.64±6.56	7.79±0.49
HC	0.67 kU·kg ⁻¹	0.58±0.99**	2.11±0.77**
DCC-CDs	10	1.21±1.53**	2.06±0.82**
	4	0.65±1.71**	2.58±1.24**
	2	0.39±0.79**	3.43±0.86**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

表 2 大鼠凝血系统相关指标 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Coagulation parameters analysis of rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/(g·mL ⁻¹)	PLT/($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)
对照	—	15.36±0.38	11.79±4.62	41.20±5.81	2.01±0.06	1 039±60
HC	0.67 kU·kg ⁻¹	15.67±0.38	11.16±2.31	48.40±3.55*	2.24±0.09**	1 137±96*
DCC-CDs	2.5	15.29±0.38	11.49±1.73	45.77±3.22	2.26±0.05**	1 166±60**
	1.0	15.73±0.47	13.04±1.09	47.18±1.13	2.17±0.06**	1 163±46**
	0.5	15.83±0.67	11.17±1.71	41.62±6.21	2.16±0.07**	1 158±78*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

实验结果显示 DCC-CDs 能使大鼠 PLT 显著升高。

4 讨论

在本研究中,用绵马贯众作为前体,高温碳化成功制备出了绵马贯众炭碳点,通过 TEM 和高分辨 TEM 鉴定为 DCC-CDs。紫外光谱和荧光光谱结果显示碳点有荧光现象, Q 为 7.3%,具有荧光也是碳点的材料学特性之一。FT-IR 和 XPS 显示出碳点主要由碳和氧 2 种元素构成,表面具有丰富的官能团,这些官能团可能就是影响其化学性质的关键所在。此外,本实验利用 HPLC 比较了绵马贯众药材和 DCC-CDs 的化学成分差异。绵马贯众的化学成分包括间苯三酚类、鞣质类和黄酮类等多种成分,其中间苯三酚类是绵马贯众的主要有效成分^[18-19],经过高温碳化和过滤透析等过程后得到的 DCC-CDs 中没有小分子类化合物的存在,这在一定程度上排除了小分子类化合物对止血活性的影响,从而确定了 DCC-CDs 自身存在的止血活性。当然,对绵马贯众炭而言,经过炮制之后还含有少量间苯三酚类和鞣质类成分,这些成分是否具有一定的止

3.3 DCC-CDs 大鼠凝血系统相关指标的影响

实验通过对大鼠凝血四项参数 (PT、APTT、TT、FIB) 和 PLT 的测定来研究 DCC-CDs 的止血效果^[17]。结果见表 2,与对照组比较,HC 和 DCC-CDs 高、中、低剂量组的 PT 和 APTT 差异均无显著性 ($P > 0.05$),HC 组能显著增加 TT 值 ($P < 0.05$),但 DCC-CDs 高、中、低剂量组对 TT 值影响不显著 ($P > 0.05$)。FIB 是研究凝血过程的重要指标,HC 组和 DCC-CDs 高、中、低剂量组均能显著提高大鼠的 FIB 值,差异显著 ($P < 0.01$)。PLT 数量密切反映凝血情况,HC 组和 DCC-CDs 高、中、低剂量组均能提高大鼠 PLT 数量 ($P < 0.05, 0.01$)。

血作用,能否在止血过程中与碳点发挥协同作用,有待进一步研究。

在前期的工作中,研究了碳点的生物活性,发现一些炭药中的纳米类成分具有止血作用^[20-22]。这些研究启发笔者从绵马贯众炭中发现了具有止血效果的 DCC-CDs,然后通过小鼠断尾和肝脏出血 2 个经典的动物实验来证明其止血效果,这为 DCC-CDs 成为一种新型纳米源止血药物提供了良好的前期实验基础。为了更进一步研究 DCC-CDs 发挥止血药效的可能作用机制,测定了 DCC-CDs 作用后大鼠的凝血四项参数和血小板 (PLT) 数量变化。凝血机制主要包括血管壁的止血作用、血小板的止血作用和凝血因子的凝血作用 3 个方面^[23]。本实验中 PT 值和 APTT 值测定结果显示 DCC-CDs 对大鼠 PT 和 APTT 无影响,即不影响大鼠的内源性和外源性凝血途径。TT 值测定结果显示 DCC-CDs 不影响 FIB 转为纤维蛋白的时间。FIB 是研究凝血过程的重要指标,可以通过测定 FIB 的含量检测药物对机体凝血、抗凝及纤维蛋白溶解系统

功能的影响^[24]。测定结果显示 DCC-CDs 高、中、低剂量均能显著提高大鼠的 FIB 值,推测 DCC-CDs 的促凝活性可能是通过提高血液中 FIB 的含量或抑制纤溶系统发挥止血、凝血作用的。PLT 测定结果显示 DCC-CDs 能够显著提高大鼠的 PLT 数量,以此来增强止血作用。DCC-CDs 具有很好的止血效果,未来可能成为一种绿色、安全且方便的出血性疾病治疗药物。

综上所述,本研究通过高温热解法以绵马贯众为前体碳源成功制备了 DCC-CDs,通过动物实验证明了 DCC-CDs 在小鼠断尾和肝脏出血模型中有显著的止血作用。凝血参数测定结果显示 DCC-CDs 的止血、凝血作用可能是通过提高 PLT 数量、增加 FIB 的含量或抑制纤溶系统发挥的。本研究首次证明 DCC-CDs 的止血作用,这种新型的纳米类成分为出血症治疗药物的研发提供了一个创新性的思路,也为中药有效成分的探索提供了一个全新的思维模式。

参考文献

- [1] 邢 霓, 曾 倩, 王田平. 浅析《傅青主女科》巧用贯众炭治血崩 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(6): 127-128.
- [2] 马传江, 曹广尚, 杨培民, 等. 绵马贯众的鉴定、化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 27(28): 4103-4105.
- [3] 马传江, 王 信, 辛义周, 等. 中药传统炮制理论的现代研究概述 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 512-520.
- [4] 薛 露, 刘 晨, 丁安伟, 等. 侧柏炭黄酮类成分群对干酵母致血热复合出血模型大鼠的止血作用研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(17): 1486-1491.
- [5] 薛 露, 单鸣秋, 张 丽, 等. 侧柏炭的研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1127-1131.
- [6] Zheng X T, Ananthanarayanan A, Luo K Q, *et al.* Glowing graphene quantum dots and carbon dots: Properties, syntheses, and biological applications [J]. *Small*, 2015, 11(14): 1620-1636.
- [7] Zhao S, Lan M, Zhu X, *et al.* Green synthesis of bifunctional fluorescent carbon dots from garlic for cellular imaging and free radical scavenging [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(31): 17054-17060.
- [8] Feng T, Ai X, An G, *et al.* Charge-convertible carbon dots for imaging-guided drug delivery with enhanced *in vivo* cancer therapeutic efficiency [J]. *ACS Nano*, 2016, 10(4): 4410-4420.
- [9] Zhang J, Zhao X, Xian M, *et al.* Folic acid-conjugated green luminescent carbon dots as a nanoprobe for identifying folate receptor-positive cancer cells [J]. *Talanta*, 2018, 183: 39-47.
- [10] 张美龄. 荆芥炭止血物质基础及其作用机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [11] 王咏枝. 大蓟炭止血物质基础及其作用机制的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [12] 肖国君, 叶利明, 吴纯洁, 等. HPLC 法测定绵马贯众中绵马贯众素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(5): 502-504.
- [13] 司云珊, 徐敬海, 韩 冬, 等. RP-HPLC 法测定绵马贯众药材中绵马贯众素 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1894-1895.
- [14] Ding C, Cao X, Zhang C, *et al.* Rare earth ions enhanced near infrared fluorescence of Ag₂S quantum dots for the detection of fluoride ions in living cells [J]. *Nanoscale*, 2017, doi: 10.1039/C7NR04436D.
- [15] Liu Y, Jennings N L, Dart A M, *et al.* Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice [J]. *World J Exp Med*, 2012, 2(2): 30-36.
- [16] Wu J, Lemarié C A, Barralet J, *et al.* Amphiphilic peptide-loaded nanofibrous calcium phosphate microspheres promote hemostasis *in vivo* [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(11): 9194-9200.
- [17] 颜永刚, 王红艳, 尹立敏, 等. 桃仁-大黄药对对脂多糖所致蓄血证模型大鼠的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(5): 1148-1151.
- [18] 周小菲. 绵马贯众的质量控制方法研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [19] 刘 畅, 闫艳韬, 王 娟, 等. 绵马贯众中间苯三酚类化合物抗流感病毒的活性筛选 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 305-312.
- [20] Zhang M, Zhao Y, Cheng J, *et al.* Novel carbon dots derived from *Schizonepetae Herba Carbonisata* and investigation of their haemostatic efficacy [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017: 46(8): 1562-1571.
- [21] Yan X, Zhao Y, Luo J, *et al.* Hemostatic bioactivity of novel *Pollen typhae carbonisata*-derived carbon quantum dots [J]. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15(1): 60-68.
- [22] Wang Y, Kong H, Liu X, *et al.* Novel carbon dots derived from *Cirsii Japonici Herba Carbonisata* and their haemostatic effect [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(9): 1635-1644.
- [23] 韩邦志, 谢金鲜. 中药止血与凝血机制的研究进展 [J]. 广西中医药, 2009, 182(2): 6-8.
- [24] Xin N, Li Y J, Li Y, *et al.* Dragon's blood extract has antithrombotic properties, affecting platelet aggregation functions and anticoagulation activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(2): 510-514.