

见血青总生物碱凝血活性的研究

张 杨, 樊晓旭, 柴淑丽, 王 丽

(四川大学生命科学学院, 成都 610065)

摘要: 用超声波辅助提取见血青总生物碱(TALN), 配置成 10mg/mL 见血青总生物碱药液(TASLN), 测试药液凝血活性. 实验以生理盐水(NS)为空白对照、云南白药做阳性对照, 体内凝血实验以小白鼠为研究对象测定其出血时间和出血量; 局部创面止血实验以兔子为实验对象, 记录背部创伤止血时间; 体外凝血实验选用抗凝兔血, 分别测定凝血时间、凝血酶原时间以及复钙时间. 结果显示: TALN 的体内和体外凝血实验与空白对照组相比, 明显缩短了老鼠出血时间(212.95s)和出血量(42.5格)、家兔的凝血时间(凝血板法时间为 192.23s、试管法时间为 245.48s)、凝血酶原时间(PT)(12.22s)及血浆复钙时间(RT)(180.78s); 局部创面止血实验结果中, TASLN 组平均止血时间为 81.50s, 相对于 NS 组 125.20s 明显缩短且与云南白药组 75.20s 的结果差异不显著. 说明: TALN 具有良好的凝血活性.

关键词: 见血青; 总生物碱; 凝血活性

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)04-0870-04

Study on coagulation activity of total alkaloids in *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl.

ZHANG Yang, FAN Xiao-Xu, CHAI Shu-Li, WANG Li

(college of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: A solution (TASLN) of 10mg/ml total alkaloids of *Liparis nervosa* (TALN) was configured, which was extracted by Ultrasonic-assisted method. Normal saline (NS) was used as blank control and Yunan Baiyao as control in experience. For coagulation *in vivo*, the object was mice and we measured the bleeding time and the amount of bleeding. For coagulation *in vitro*, the object was rabbits. The hemostasis time of wound was recorded. the rabbits' anticoagulant blood was used to measure the coagulation time, prothrombin time (PT), recalcification time (RT), respectively. The results showed that the time and the amount of mice bleeding was 212.95s and 42.5 square. The coagulation time was 192.23s by blood congeals method and 245.48s by tube method, PT and RT of rabbits' blood of TALN was 12.22s and 180.78s, all the times were shorter that of blank control. The average hemostasis time of total alkaloids solution of *Liparis nervosa* (81.50s) was obviously shorter than that of NS (125.20s), but showed no significant difference with that of Yunnan Baiyao (75.20s). The TALN shows obvious coagulation activity.

Keywords: *Liparis nervosa*; alkaloids; coagulation activity

1 引言

我国目前常见的止血中草药有300多种,在对其研究过程中发现了氨基酸、脂类、生物碱类、酚类、黄酮、萜类、甾体类、鞣质、有机酸等许多的凝血活性成分.如田七中的田七氨酸止血快且所需剂量小^[1].冬凌草中的冬凌草甲素能明显缩短血浆的复钙时间^[2].来源于瑞香科欧亚瑞香的果实和种子中的欧瑞香素能促进家兔血小板凝集等^[3].

生物碱在植物中分布较广,是中草药的重要组成部分之一,有显著的生物活性和明显的药理作用.目前已经发现生物碱有多种活性,如杀虫、扩张血管、抗肿瘤、降脂降血糖、抗炎、抗菌、抗病毒、抗氧化等.除此之外生物碱还有止血的活性,如麦角新碱、白毛茛碱、小檗红碱、水苏碱等^[4].

见血青(*Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl.) 属兰科(Orchidaceae)羊耳蒜属(*Liparis*),又名毛慈姑、脉羊耳蒜,分布于浙江、江西、湖南、福建、四川、广东、台湾、广西、贵州、云南等地,为多年生草本植物.见血青在《民间常用草药汇编》等书中记载有止血凉血的功效.民间常用见血青煎水送服用以治疗胃热吐血,温水煎服治疗肺热咳血,浓缩水煎药液涂抹伤口用外伤出血等.周继铭等人将见血青和马兰(*Kalimeris indica*)、挖耳草(*Utricularia bifida*)一起配制成复方外用止血药用于临床研究,发现其对手术切口皮肤、肌肉中毛细血管和小血管等均有较好的止血效果;初试于个别脏器血管,止血效果也较好^[5].

见血青草主要含脉羊耳兰碱,此外有报道还发现脉羊耳兰碱B、原黎芦因等生物碱^[6-7].但到目前为止,只有少许文献报道过见血青二氯甲烷、乙酸乙酯、水等提取物有凝血效果^[8-10],未见其总生物碱进行凝血实验的研究.

因此,本文通过体内、体外凝血法,对见血青总生物碱(total alkaloids of *Liparis nervosa*, TALN)的体内、体外凝血效果进行了研究.其次,通过局部创面止血试验,研究了TALN对破损皮肤伤口止血的功效,并对见血青体外及体内凝血机制进行了初步探讨.为见血青的进一步开发利用提供科学依据.

2 材料和方法

2.1 实验材料和试剂

2.1.1 原料 见血青药材购于成都市中药材市

场,经四川大学生命科学学院王丽教授鉴定为兰科羊耳蒜属植物见血青 *Liparis nervosa* (Thunb.) Lindl. 将见血青洗净、除杂,在烘箱中65℃下烘干,粉碎后,过0.5mm筛,备用.

2.1.2 动物 昆明种小白鼠,购自四川大学华西动物中心,体重18~22g,雌雄各半.颗粒饲料(购于四川大学华西动物中心)喂养,自由饮水,适应性喂养一周时间并观察确认其健康.

健康家兔,体重2.5~3.0kg,雌雄兼有,购自四川大学华西动物中心.

2.1.3 试剂 生理盐水(normal saline, NS)、无水氯化钙、去离子水、无水硫化钠、枸橼酸钠等,以上试剂均为分析纯.凝血酶原时间测定试剂盒(上海太阳生物技术有限公司生产)、75%酒精、云南白药(云南白药集团股份有限公司)、灭菌棉球、灭菌纱布等.

兔子脱毛剂:准确称取硫化钠8g,溶解于100mL的水中,另外加入1g洗衣粉于上述溶液中,搅拌均匀后再加入适量的淀粉,拌成稀糊状即得.

M/40 氯化钙溶液:准确称取无水氯化钙1.11g,以去离子水400mL溶解即得.

2.2 实验方法

2.2.1 TALN 提取 提取方法为本实验优化后的方法^[11].准确称取50g见血青干粉于1000ml碘量瓶中,按照料液比1:9加入80%乙醇,60℃超声提取60min.过滤得提取液,旋转蒸发器上减压浓缩成浸膏,蒸馏水溶解浸膏,2%盐酸调节pH值为3左右,搅拌均匀后过滤,滤液用10%氨水调节pH值为9左右,最后用氯仿萃取三次,合并氯仿层,减压浓缩回收氯仿,蒸干溶剂得到TALN.

2.2.2 药液的配制 取上述提取得到的TALN 1g,溶解于100mL NS中,待充分溶解后,用一次性过滤器过滤,得见血青总生物碱药液(total alkaloids solution of *Liparis nervosa*, TASLN).同理配得云南白药药液.

2.2.3 体内凝血试验 选取健康小白鼠,雌雄各半,平均分为两组.一组采用腹腔注射的方法注射0.3mL/10g TASLN.另一组注射等量的NS作为空白对照组.给药30min后,采用断尾法,剪掉鼠尾端0.5cm,待血液自行溢出,然后用滤纸片吸去创面流出的血液,每隔30s吸取血液1次.从创面形成到停止出血记为出血时间,同时测量滤纸片上的出血面积,记为出血量.

2.2.4 体外凝血试验 凝血板法:在经灭菌的洁

净凝血板凹槽内,加入 M/40 的氯化钙溶液 0.1mL 和 TASN. 用洁净针头将药液和氯化钙溶液轻轻混合均匀,最后分别加入已制备好的抗凝血液 0.5mL,即刻计时. 迅速用洁净针头混合均匀且保证混合次数一致. 以后每隔 30s 用洁净针头轻挑血液一次,当推动血块时,露出凝血板底则算血液完全凝固. 以加入抗凝血液到血液完全凝固为止,记为凝血时间. 以云南白药作为阳性对照,NS 作为空白对照. 各次试验均重复三次,并求平均值.

试管法:取 8mm 内径的灭菌洁净玻璃试管,加入 M/40 的氯化钙溶液 0.1mL 和 TASN. 最后在各管中同时加入 0.5mL 的兔血,迅速将试管放入 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的恒温水浴中,轻轻混合均匀,即刻计时. 每隔 30s 轻轻倾斜试管,观测血液有无凝固. 从加入血液开始计算,直至将试管倒置血液不动为止,记为凝血时间. 以云南白药作为阳性对照,NS 作为空白对照. 各次试验均重复 3 次,求其平均值.

2.2.5 凝血酶原时间(prothrombin time, PT)的测定 采用凝血酶原时间测定试剂盒(凝固法)测定 TALN 的凝血酶原时间. PT 试剂中加入缓冲液 0.1mL, M/40 氯化钙溶液 0.1mL,再加入 TASN 0.1mL,轻摇溶解. 取待测血浆(上述制备好待用的血浆)0.1mL, 37°C 下孵育 3min 后,加入 37°C 预温的 PT 试剂 0.2mL,记录凝固的时间,即为 PT 值. 以云南白药作为阳性对照,NS 作为空白对照. 各次试验均重复 3 次,求其平均值.

2.2.6 复钙时间(recalcification time, RT)的测定 取内径 8mm 的灭菌洁净玻璃试管,加入 TASN 0.1mL,再加入 0.1mL M/40 氯化钙溶液,混合均匀,放置在 37°C 的恒温水浴中,在各个试管中同时加入 0.1mL 已制备待用的血浆,即可开始计时,每隔 30s 倾斜一次试管,观察,当试管中出现白色颗粒纤维蛋白丝时,记为 RT 值. 以云南白药作为阳性对照,NS 作为空白对照. 各次试验均重复 3 次,求其平均值.

2.2.7 局部创面止血研究 用手术剪平整均匀地

剪去脊柱一侧的毛,脱毛区域不超过体表的 10%, 剪毛前不能用水湿润被毛,以免脱毛剂流入毛根造成损伤. 再用镊子夹灭菌棉球蘸取脱毛剂涂抹一层在已剪去被毛的部位,待 5 分钟后,用温水洗脱下的毛及脱毛剂. 再用灭菌干纱布擦干水,饲养 24 小时后供实验使用. 取已脱毛的健康家兔 6 只,雌雄各半,用 1% 戊巴比妥钠 30mg/kg 进行耳缘静脉麻醉. 在无菌的小手术台上进行操作,在家兔背部左右侧切出 3 个 $2\text{cm} \times 2\text{cm}$ 大小的全皮肤层,在暴露的肌肉层上用灭菌手术刀划“×”的出血创面,然后分别在各个出血创面平铺浸有 TASN 纱布、云南白药纱布、NS 纱布. 每隔 30s,揭开纱布,观察记录伤口出血情况. 直到不出血为止,记录下止血时间,止血效果.

2.2.8 统计学处理 结果采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示.

3 结果与分析

3.1 体内凝血试验

经腹腔注射后,采用断尾法测得小白鼠的出血时间和出血量,结果见表 1.

表 1 TALN 对小鼠出血时间和出血量的影响

Tab. 1 Effects of TALN on bleeding time and amount of quantity in mice

样品	出血时间(s)	出血量(格)
TALN	$213.95 \pm 1.23^*$	$42.5 \pm 5.6^*$
NS	675.12 ± 1.05	273.7 ± 3.4

*:与 NS 组比较 $P < 0.05$

由表 1 结果可以看出, TALN 组小鼠的出血时间,仅为空白对照组的三分之一,出血量也仅为空白对照组的七分之一,差异显著. 该初步研究证实了 TALN 有较好的凝血活性.

3.2 体外凝血试验

采用凝血板法、试管法、凝血酶原时间测定法及复钙时间测定法来探讨 TALN 体外凝血活性效果,结果见表 2.

表 2 TALN 对家兔体外凝血时间的影响

Tab. 2 Effects of TALN on coagulation time in rabbits

样品	凝血板法(s)	试管法(s)	凝血酶原(s)	复钙时间(s)
TALN	$192.23 \pm 1.51^*$	$245.48 \pm 0.82^*$	$12.22 \pm 0.55^*$	$180.79 \pm 0.78^*$
NS	270.05 ± 2.03	315.67 ± 1.25	19.01 ± 1.32	240.02 ± 1.15
云南白药	111.45 ± 0.95	183.12 ± 0.66	8.86 ± 0.73	89.77 ± 0.87

*:与 NS 组比较, $P < 0.05$

从表 2 可以发现血青总生物碱的凝血时间、凝血酶原时间以及复钙时间都比空白对照组明显缩

短,差异显著,有良好的凝血活性;但与云南白药复方剂的凝血时间相比,其凝血活性不如云南白药.

3.3 局部创面止血试验

家兔为试验对象,以给药后立即计时,直至伤口不再渗血为止.其局部创面止血试验结果见表3.

表3 TALN对家兔局部创面止血作用

Tab.3 Effects of TALN on hemostasis of wound in rabbit

创面位置	动物数量(只)	止血时间(s)		
		TALN(s)	云南白药(s)	NS(s)
皮肤创面	6	81.50±0.77 *#	75.20±0.95	125.20±1.04

*:与NS比, $P<0.05$;#:与云南白药组比较, $P>0.05$.

由表3可知,对家兔皮肤创面止血效果TALN的止血时间远短于空白对照组,且差异显著;虽然还是比阳性对照云南白药止血时间长,但是它们之间差异不显著,且经过后期对家兔的继续观察,未发现其使用TALN后有不适现象,亦未见皮肤出现明显的改变,说明了TALN对皮肤创面具有止血功效.

4 讨论

在《民间常用草药汇编》等书中均有记载见血青味苦,性凉,用于肺热咳血,吐血,创伤出血.民间也用水煎剂可治疗吐血、咳血和治疗外伤出血等.但有关其有效成分及作用机制均未见报道.体外凝血和体内凝血试验结果表明,TALN与NS的空白对照组比较,其凝血时间有显著缩短且出血量减少,但比云南白药的活性稍差.而体表皮肤创面止血试验结果表明,TALN与空白对照组相比较,其凝血时间明显缩短,止血效果较好.经后期继续观察,TALN对家兔创面皮肤愈合良好,并未见红肿,感染等症状.总的来说见血青总生物碱具有良好的凝血活性.

现代药理学认为止血过程包括了血管的收缩、血小板的凝聚和血液的凝固三个重要的因素.正常的止血及凝血机制是依赖血管壁、血小板、抗凝因子、凝血因子、纤溶系统和它们互相的调节与平衡来实现.止血过程中主要起作用的是血小板,而凝血过程常分为内源性凝血途径、外源性凝血途径和共同凝血途径.目前许多止血中草药的药理作用已研究得较为清楚,如复方三七是通过加快子宫螺旋动脉修复及收缩来止血^[12],风轮菜和荫风轮醇、槐花是通过调节血管的收缩以达到止血的目的^[13-14].两面针提取物可显著降低动物血管通透性,提高血浆渗透压,产生具有类似输液治疗的血液稀释疗法的止血作用^[15].独一味可能通过提高纤维蛋白原的含量,影响抗凝及纤溶系统来进行止血^[16].本实验对TALN的止凝血作用及机制进行了初步研究,结果表明TALN的体内体外凝血时间较空白对照组明

显缩短.凝血时间和复钙时间是检测内源性凝血途径中各种凝血因子是否缺乏的重要指标,而凝血酶原时间PT,PT常用以反映外源性凝血途径的状况.说明见血青的总生物碱可能是同时通过内源性和外源性凝血途径来达到其促凝效果的.

参考文献:

- [1] 赵国强,王秀训.三七止血成分 dencichine[J]. 中草药, 1986, 17(6): 34.
- [2] 柯铭清. 中草药有效成分理化与药理特性[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1982: 238
- [3] 张月华,任婉薇,万树文,等. 柘木的化学成分研究[J]. 医药工业, 1980, 3(8): 15.
- [4] Ronlan A, Wickberg, B. Wickberg. The structure of mezerein, a major toxic principle of *Daphne mezereum* [J]. Tetrahedron Lett, 1970, 49: 4262.
- [5] 周继铭,周碧珍. 复方见血青外用止血药的初步研究[J]. 中国医院学杂志, 1983, 3(3): 6.
- [6] 赵颖,胡少南,王昌华,等. 见血青化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(21): 2957.
- [7] 刘小波,张杨,王丽. 见血青总生物碱的气相色谱-质谱分析[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2015, 52(4): 881.
- [8] 赵颖,胡少南,郑一敏,等. 见血青提取物止血作用的实验研究[J]. 中国药房, 2013, 24(31): 2884-2886.
- [9] 宋芹,刘芳,苟小军,等. 见血清有效部位的止血作用及机制研究[J]. 中药材, 2014, 37(10): 1851
- [10] 张仁强,刘正有,梁大刚. 草药见血清中化学物质的提取及医用功效探讨[J]. 教育教学论坛, 2015, 26: 51.
- [11] 文旭,葛彦双,崔龙,等. 超声波辅助提取见血青总生物碱工艺研究[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2013, 50(1): 184.
- [12] 尤昭玲,马红霞,王若光,等. 三七复合有效成分对恒河猴感染性子宫出血一氧化氮及一氧化氮合酶的影响[J]. 中医药信息, 2005, 22: 44.
- [13] 李惠,原桂东,金亚宏,等. 槐花饮片及其提取物止血作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24: 1007.
- [14] 刘霞,徐玉春. 断血流的研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(5): 附5-附6.
- [15] Liu S H, Qin Q Y, Fang K. The Effects of the Extract (S-O) from *Zanthoxylum nitidum* on Analgesia, Anti-inflammation and Hemostasia in Mice [J]. Nat Prod Res Dev, 2005, 17(6): 759.
- [16] 廖爱军,张丽杰,刘卓刚. 中药补络补管汤止血机制的实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2006, 29: 34.