

· 论著 ·

黎药裸花紫珠在小鼠体内止血活性部位的研究

易博¹, 张旻^{2,3}, 林海¹, 陈涛², 徐文彤¹, 冯世秀² (1.解放军187医院药剂科, 海南海口571159; 2.深圳市中科院仙湖植物园, 深圳市南亚热带植物多样性重点实验室, 广东深圳518004; 3.西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌712100)

[摘要] 目的 确定黎药裸花紫珠的止血活性部位, 为其止血活性成分的研究提供依据。方法 裸花紫珠经醇提获得醇提物(EtOH-extract)、醇提物经大孔吸附树脂处理分别获得水洗脱物(HP-H₂O-elution)和乙醇洗脱物(HP-EtOH-elution), 将EtOH-extract、HP-EtOH-elution和HP-H₂O-elution分别配制成高、中、低剂量的供试药物, 云南白药为阳性对照。每日给小鼠灌胃1次, 在连续给药7d后, 记录小鼠体质量的变化, 采用断尾法和玻片法测定小鼠的出血时间和凝血时间, 并以此为筛选指标对各部位止血效果进行评价。结果 与模型对照组相比, HP-EtOH-elution对缩短小鼠出血时间的作用效果显著, 并且其低剂量组和中剂量组的效果均优于阳性对照组。EtOH-extract、HP-EtOH-elution和HP-H₂O-elution在缩短小鼠的凝血时间和增加小鼠的体质量方面, 效果均不显著。结论 裸花紫珠的止血活性成分主要集中在醇提物经大孔树脂处理后的乙醇洗脱部位, 并且可能是通过影响内源性凝血途径发挥止血作用。

[关键词] 裸花紫珠; 活性部位; 出血时间; 凝血时间; 小鼠

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2015)03-0235-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.011

Screening for the hemostatic active extracts of *Callicarpa nudiflora*, in mice *in vivo*

YI Bo¹, ZHANG Min^{2,3}, LIN Hai¹, CHEN Tao², XU Wentong¹, FENG Shixiu² (1. Department of Pharmacy, No.187 Hospital of PLA, Haikou 571159, China; 2. Key Laboratory of Southern Subtropical Plant Diversity, Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518004, China; 3. College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

[Abstract] **Objective** To screen the hemostatic active extracts from *Callicarpa nudiflora*. **Methods** The powdered *Callicarpa nudiflora* was extracted with 70% EtOH and concentrated to give EtOH-extract. The EtOH-extract was further chromatographed over HP-20 macroporous resin column, eluting with aqua and 95% EtOH to get HP-H₂O-elution and HP-EtOH-elution, respectively. The obtained three extracts of EtOH-extract, HP-EtOH-elution and HP-H₂O-elution were set as large, middle and small dosage groups for drug preparation, respectively. Yunnan Baiyao was used as a positive control group. The weight increment, bleeding time and clotting time of fed mice were detected by cutting tail and grass slide methods after intragastric administration for 7 days. **Results** As compared with blank model and positive control, each dosage groups of HP-EtOH-elution could significantly shortened the bleeding time, of which the small dosage group and middle dosage group even exhibited better results than the positive control group. Whereas the EtOH-extract, HP-EtOH-elution and HP-H₂O-elution didn't demonstrated significant effect on clotting time as well as the weight increment. **Conclusion** The HP-EtOH-elution was suggested to be the major active extract possessing hemostatic activity to mice under tested dosages. The hemostatic mechanism may through intrinsic coagulation pathway. This study would be helpful for further phytochemical investigation of *C. nudiflora*.

[Key words] *Callicarpa nudiflora*; active extracts; bleeding time; clotting time; mice

裸花紫珠 (*Callicarpa nudiflora* Hook et Arn) 是马鞭草科紫珠属植物, 别名紫珠草、止血草、

贼仔叶白花茶等, 为我国海南黎族同胞的习用药材^[1]。分布于海南、广东、广西等省, 目前海南多地有大面积栽培种植, 尤以海南五指山产的为上品。裸花紫珠主要取地上干燥部分入药, 具有止血消炎、散瘀消肿、解毒、祛风湿之功效, 民间主要用于治疗创伤出血、呼吸道及消化道出血、化脓性炎症等, 外用治烧、烫伤及外伤出血^[2,3]。我院前身之一解放

[基金项目] 2013年海南省中药现代化专项基金资助(ZY201328)

[作者简介] 易博, 博士, 副主任药师。研究方向: 中药现代制剂与医院药学。Tel: (0898)65920079; E-mail: boyien@126.com

[通讯作者] 徐文彤, 副主任药师。Tel: (0898)65920988; E-mail: yjk_187@163.com

军 162 医院在上世纪六七十年代已经将裸花紫珠运用于临床,在烧、烫伤救治等方面取得良好效果^[4,5]。现代研究表明,裸花紫珠主要含有黄酮、鞣质、萜类和酚类等成分^[6-13],其中总黄酮提取物具有抗血栓形成、降低全血黏度、抑制血小板凝集和抗炎等作用。目前市场上的裸花紫珠成药主要为其水提取物浸膏制成的片剂、胶囊等,在临床应用中,裸花紫珠片口服对肛肠病、鼻腔鼻窦、流产和上环术后止血作用效果显著^[14,17]。然而,针对裸花紫珠不同溶剂提取部位的止血活性和止血机制却鲜有报道。为了明确裸花紫珠止血活性的部位及效果,本研究以裸花紫珠地上部分的醇提取物、醇提取物经大孔吸附树脂处理后获得的水洗脱物和醇洗脱物制备成供试药物,经小鼠灌胃给药后,测定药物对小鼠的止血作用及给药期间小鼠体重的变化^[18]。本研究最终将明确裸花紫珠止血作用的活性部位,为下一步止血活性成分和止血机制的研究提供依据。

1 材料

1.1 试药 裸花紫珠药材(地上部位全株,于 2013 年 4 月采于海南省五指山,经深圳市中科院仙湖植物园陈涛研究员鉴定,自然风干备用);云南白药(4 g 装,云南白药集团股份有限公司,国药准字 Z53020798);HP-20 大孔吸附树脂(日本三菱化工集团);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 样品制备 裸花紫珠 1.0 kg,粉碎,经 70% 乙醇于 70 °C 水浴锅回流提取 3 次,每次提取 1 h,合并提取液并过滤,滤液于旋转蒸发器减压浓缩获得醇提总浸膏(EtOH-extract 125.0 g)。取总浸膏 80.0 g 水溶解后经大孔吸附树脂柱处理,依次用水和 95% 乙醇洗脱,分别洗脱 3 个柱体积,合并洗脱液,减压浓缩成浸膏状,分别获得 HP-H₂O-elution 26.0 g 和 HP-EtOH-elution 48.0 g。

EtOH-extract、HP-EtOH-elution 和 HP-H₂O-elution 浸膏冷冻干燥,各取 10.0 g,用 DMSO-蓖麻油(1:1)配制成浓度为 0.5 g/ml 的储备液;临用前,以 0.5% CMC-Na 稀释为相应剂量浓度。

1.3 动物 昆明种 SPF 级 KM 小鼠,♀♂各半,体质量(20±2)g,由广州中医药大学(大学城)实验动物中心提供,许可证号:SCXK(粤)2008-0020。饲养环境恒温 20 °C,恒湿 50%。饲料用⁶⁰Co 照射过,达 SPF 级。

2 方法

2.1 对小鼠出血时间的影响 小鼠 110 只,♀♂各

半,称量体质量,用苦味酸标记^[19]。按照给药方案共分为模型对照组(0.5% CMC-Na)、阳性对照组(云南白药,0.667 g/kg)以及 EtOH-extract、HP-EtOH-elution 和 HP-H₂O-elution 3 个给药组,每个给药组分低、中、高 3 个剂量组(0.5、1.0、2.0 g/kg),试验小鼠为每个剂量组 10 只,♀♂各半。采用灌胃法给药 1 次/d,按小鼠体质量计算灌胃量^[20,21]:0.01 ml/(g·d),连续 7 d,测定前再次记录每只小鼠的体质量。试验组在第 7 天给药后 1 h,采用断尾法测定出血时间^[21-23]。具体操作:剪去鼠尾 5.0 mm,自血液流出时开始计时,每隔 10 s 用滤纸轻轻拭血 1 次,直到拭后不再出血为止。从开始出血至停止出血,记录所用时间即为小鼠出血时间。

2.2 对小鼠凝血时间的影响 分组及给药情况同“2.1”项,末次给药后 1 h,选取玻片法测定凝血时间^[23-25]。具体操作:采用眼眶取血法用眼科弯镊迅速摘取一侧眼球,在洁净载玻片的两端各滴 1 滴直径为 5~8 mm 的血滴,立即计时^[20]。每隔 15 s 用清洁大头针自血滴边缘向里轻轻拨动 1 次,并观察有无血丝(纤维蛋白丝)挑起^[25]。从采血开始至挑起血丝,记录所用时间即为小鼠凝血时间,另一滴血平行试验。

2.3 统计学方法 各组数据使用 SPSS 19.0 统计软件,检验方差齐性,并进行 One-Way ANOVA 分析差异的显著性^[26],数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 裸花紫珠提取部位对小鼠体质量的影响 给药 7 d 后,计算给药前后小鼠体质量的变化。将 EtOH-extract、HP-EtOH-elution 和 HP-H₂O-elution 低、中、高 3 个给药浓度下小鼠体质量的增加值与模型对照组体质量增加值比较,各组小鼠体质量的变化没有明显区别,差异无统计学意义($P > 0.05$),呈平稳增长趋势。试验结果见表 1。

3.2 裸花紫珠提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响

3.2.1 对小鼠出血时间的影响 与模型对照组比较,EtOH-extract 中、高 2 个浓度对试验小鼠的出血时间无明显影响($P > 0.05$),低剂量组对其有一定的缩短作用($P < 0.05$),但与阳性对照组比较均无显著性差异($P > 0.05$)。与模型组比较,HP-EtOH-elution 各剂量组可明显缩短小鼠的出血时间,整体差异显著,其中低、中剂量组的效果非常明

显($P<0.001$),高剂量组次之($P=0.01$);并且低、中剂量组的出血时间均小于阳性对照组,其作用效果较阳性对照更为明显($P<0.05$, $P=0.001$)。与模型对照组比较,HP-H₂O-elution 各剂量组也可不同程度地缩短小鼠的出血时间,其中中剂量组的出血时间缩短最为显著($P<0.001$),相比较而言低剂量和高剂量组出血时间缩短程度较小($P<0.05$);与阳性对照组相比,只有中剂量组的出血时间有明显的缩短($P<0.01$)。试验结果见表1。

3.2.2 对小鼠凝血时间的影响 EtOH-extract、HP-EtOH-elution 和 HP-H₂O-elution 低、中、高3个给药浓度的凝血时间与模型组比较,均无显著影响,差异无统计学意义($P>0.05$)。仅阳性对照药组比模型对照组凝血时间缩短较明显($P<0.05$)。表明裸花紫珠各提取物对小鼠的凝血时间没有显著影响。试验结果见表1。

表1 裸花紫珠提取物对小鼠体质量、出血时间和凝血时间的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	体质量增加值(m/g)	出血时间(t/s)	凝血时间(t/s)
模型对照组	—	7.54±3.25	186.40±28.05	78.70±19.10
阳性对照组	0.667	8.49±2.76	161.20±38.83	50.00±6.48 ¹⁾
EtOH-extract 组				
低	0.5	7.88±2.00	141.30±43.36 ¹⁾	46.70±17.41
中	1.0	8.16±2.29	160.20±46.67	55.40±12.50
高	2.0	7.30±1.79	153.50±35.03	49.80±17.00
HP-EtOH-elution 组				
低	0.5	9.16±1.59	126.00±28.21 ³⁾⁴⁾	57.80±23.30
中	1.0	6.98±2.63	113.10±18.21 ³⁾⁵⁾	60.90±25.00
高	2.0	8.21±2.05	137.30±22.28 ²⁾	52.60±18.15
HP-H ₂ O-elution 组				
低	0.5	8.53±2.66	152.80±31.58 ¹⁾	71.80±11.98
中	1.0	8.89±2.49	114.90±22.87 ³⁾⁵⁾	56.30±14.77
高	2.0	9.27±1.42	150.30±38.22 ¹⁾	70.60±32.63

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$, 与模型对照组比较;

⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$, 与阳性对照组比较

4 讨论

在上述止血活性试验中,出血时间(BT)是指穿破毛细血管,自出血到自然止血所需的时间,其止血时间长短与毛细血管功能、组织收缩力、组织因子、血小板的数量和功能等因素相关,影响最大的是血小板和毛细血管功能,凝血因子次之;而凝血时间(CT)是指血液自离体至凝固所需的时间。血液离体后,接触带阴电荷的表面(玻璃器材)时,因子被激活,其后一系列凝血因子相继活化,最后使纤维蛋白

原转化为纤维蛋白而凝血,其时间的长短主要与各种凝血因子的含量和凝血活性有关^[26]。在药物止血化瘀功效的研究中常以上述2个指标作为考察对象,不仅常用于单味药材提取物的止血或者活血活性部位的筛选,为进一步明确相关活性成分及其作用机制提供了一定的实验依据^[9,25,26],而且也多应用于研究复方制剂和单一组分止血药物的止血效果及有效剂量^[24,27]。血液凝固可分为内源性凝血途径和外源性凝血途径,两条途径相互联系,同时进行^[28]。在更为深入的止血机制研究中,还需结合血浆凝血酶原时间PT(用于检测机体外源性凝血系统)和活化部分凝血活酶时间APTT(用于检测机体内源性凝血系统),用于开发安全有效的止血制剂和产品。

本研究的止血试验结果表明,裸花紫珠提取物有一定的止血作用,其中以大孔吸附树脂处理后95%乙醇洗脱部位对出血时间的缩短作用最为明显,其效果更是优于阳性对照药(云南白药);裸花紫珠提取物对凝血时间均无显著影响。裸花紫珠70%乙醇提取物经过大孔吸附树脂柱处理,将提取物分为两个部位,水洗脱物和醇洗脱物,其中水洗脱物主要是大分子的多糖类、蛋白质、氨基酸等水溶性成分,而醇洗脱物则主要集中了裸花紫珠的次生代谢产物,包括糖苷类成分^[7,29]。由以上初步活性试验结果可以推测,裸花紫珠止血的活性成分主要是其次生代谢产物,并且可以通过大孔吸附树脂法进行富集。结合前期文献对裸花紫珠凝血途径的研究,表明其化学成分可明显缩短家兔活化部分凝血活酶时间(APTT),由此推测提取物可能是通过影响内源性凝血途径来发挥止血作用^[1,9]。因此,本研究明确了裸花紫珠止血作用的活性部位,推测可能是通过内源性凝血途径起效,并在低浓度下体内无毒,为下一步分离和鉴定止血的有效成分提供了依据。

【参考文献】

- [1] 戴好富,梅文莉.黎族药志(第一册)[M].北京:中国科技出版社,2008:192-193.
- [2] 广东植物研究所.海南植物志(第4卷)[M].北京:科学出版社,1977:531
- [3] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所,中国医学科学院药物研究所,北京医科大学药学院,等.中药志(第5册)[M].北京:人民卫生出版社,1994:1471.
- [4] 解放军162医院.裸花紫珠的临床应用(一)[J].中草药通讯,1972,2:42-44.
- [5] 解放军162医院.裸花紫珠的临床应用(二)——裸花紫珠治疗烧伤75例疗效初步观察[J].中草药通讯,1972,3:41-44.

3 讨论

药材粗提物的水溶液中还有很多不溶性的杂质,如果直接上大孔树脂会堵塞大孔树脂,影响分离纯化效果,因此在上样前应对样品液进行一定的前处理。洗脱溶剂为乙醇溶液,成本低廉且绿色环保,不污染环境。本实验中严格控制水和乙醇的用量,先用少量的水洗脱,既可以洗掉大量的水溶性成分,又能避免环烯醚萜苷中极性大的成分被洗脱出来,控制20%乙醇的用量,在环烯醚萜苷类成分基本洗脱出来的同时减少大豆异黄酮成分的流失。本实验优选的最佳纯化工艺是上样液吸附浓度为0.1 g/ml(该浓度以每1 ml中所含生药材质量计),上样量与树脂体积比是2:1,吸附时间2 h,依次用1 BV水,6 BV 20%乙醇洗脱,6 BV 60%乙醇洗脱。按照此工艺分离纯化栀子豉汤中的有效成分,总环烯醚萜苷的平均得率和纯度分别为7.9%、72.7%;总大豆异黄酮的平均得率和纯度分别为6.0%、58.3%。本实验中的优化工艺使栀子豉汤中的两类有效成分得到了很好的分离,得率和纯度也很高,且成本低,绿色环保无污染,适合大规模的工业化生产,并为栀

子豉汤进一步开发和研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] 范越,田明,王秀海,等. 栀子豉汤临床和实验研究进展[J]. 中医药学报, 2010, 38(1): 118-119.
- [2] 田义龙,赵静,任艳青,等. 栀子豉汤对胰岛素抵抗的改善作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2010, (6): 5-7.
- [3] 张超云,谢东霞. 栀子豉汤治疗抑郁症有效部位的筛选研究[J]. 中华中医药刊, 2011, 29(11): 2493-2494.
- [4] 袁圣龙. 栀子豉汤在心身疾病治疗中的应用[J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(6): 76-77.
- [5] 杨军宣,赵成城,刘昊. 栀子环烯醚萜苷的大孔吸附树脂纯化工艺研究[J]. 中草药, 2012, 43(9): 1756-1759.
- [6] 彭柳,范开静,熊清平. 大孔树脂分离纯化栀子提取液中栀子苷的工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 20-24.
- [7] 郭文勇,刘彬果,钟蕾,等. 大孔树脂吸附层析法提取淡豆豉总异黄酮的研究[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(9): 1003-1034.
- [8] 王虹玉,喇孝瑾,白素芬,等. 正交试验法优选栀子豉汤的水提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 36-38.

[收稿日期] 2014-12-18 [修回日期] 2015-01-28

[本文编辑] 陈静

(上接第237页)

- [6] 蔡金平,董琳,关薇薇,等. 裸花紫珠的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 60-64.
- [7] 九芝堂股份有限公司. 一种裸花紫珠提取物及其制备方法、制剂和用途[P]. 中国, CN101623394A, 2009-01-12.
- [8] 张洁,柳文媛,冯锋. 裸花紫珠的化学成分研究[J]. 海峡药学, 2010, 22(9): 77-79.
- [9] 张洁,李宝泉,冯锋,等. 裸花紫珠的化学成分及其止血活性研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3297-3301.
- [10] 王祝年,韩壮,崔海滨,等. 裸花紫珠的化学成分[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(4): 359-362.
- [11] 梁纪军,徐凯,李留法,等. 裸花紫珠总黄酮的抗炎、止血作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(26): 3161-3162.
- [12] Mei WL, Zhuang H, Cui HB, et al. A new cytotoxic iridoid from *Callicarpanudiflora* [J]. Nat Prod Res, 2010, 24(10): 899-904.
- [13] Liang JJ, Qi JL, Li L, et al. Flavonoids from *Callicarpanudiflora* leaves [J]. Chem Nat Compd, 2011, 47(1): 110-111.
- [14] 杨远姗. 裸花紫珠片的临床应用进展[J]. 临床合理用药, 2012, 5(9): 151-153.
- [15] 倪海峰,赵淑英. 裸花紫珠片用于上环后止血的临床观察[J]. 基层医学论坛, 2012, 16(26): 3426-3427.
- [16] 席作武,高宗跃,牛明了. 裸花紫珠片治疗肛肠术后出血128例[J]. 陕西中医, 2009, 30(9): 1155.
- [17] 段晓东,汪淑英,李晓静,等. 裸花紫珠片在鼻腔鼻窦术后止血的临床应用[J]. 中国伤残医学, 2009, 17(3): 59-60.
- [18] 薛焱,王同智. 蒙药材阿给(冷蒿)止血活性部位的药理学

筛选研究[J]. 青岛医药卫生, 2012, 44(1): 40-42.

- [19] 张玉萍,余琼. 三七素的止血活性及其神经毒作用实验研究[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(1): 98-99.
- [20] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 179-185.
- [21] 王杉,青桂玲,韦颖,等. 白花九里明提取液对小鼠出血时间、凝血时间和血小板数量的影响[J]. 广东医学, 2012, 33(9): 1228-1230.
- [22] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学[M]. 16版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 569.
- [23] 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: 684.
- [24] 刘萍,刘文波,张婧,等. 仙脉通胶囊对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 中医药信息, 2012, 29(6): 40-41.
- [25] 金松今,张红英,朴惠顺. 桃仁乙醇提取物对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 延边大学医学学报, 2010, 33(2): 98-99.
- [26] 吴久健,孟岳良,邹丽华,等. 白及不同提取部位对小鼠止血活性实验[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(3): 206-207.
- [27] 郭雪婷,杨晓君,王颖. 复合红花黄色素抗凝血作用研究[J]. 新疆农业科学, 2012, 49(9): 1759-1763.
- [28] 白东鲁,陈凯先. 高等药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2011: 1017-1019.
- [29] 董珂. 大孔树脂技术在中药研究中的应用概况[J]. 药学实践杂志, 2006, 4(1): 13-16.

[收稿日期] 2013-10-27 [修回日期] 2014-05-22

[本文编辑] 陈静