

不同工艺疏血通脉胶囊对小鼠凝血功能及血栓形成的影响*

刘 泰¹, 周 军², 林秋红¹, 胡玉英¹, 曹 斌^{2**}, 高 微², 吴玉强²,
王 丽², 刘 瑛², 张青萍¹, 何乾超¹

(1. 广西中医药大学第一附属医院 南宁 530023; 2. 广西中医药研究院 南宁 530023)

摘 要:目的 观察不同工艺疏血通脉胶囊对小鼠凝血功能及血栓形成的影响。方法 观察不同工艺疏血通脉胶囊对小鼠的凝血时间、出血时间的影响和对胶原蛋白-肾上腺素小鼠血栓模型的保护作用。结果 与Ⅱ号、Ⅲ号工艺的疏血通脉各剂量组比较,Ⅰ号工艺疏血通脉等剂量组能显著延长小鼠凝血时间($P<0.05$),显著提高胶原蛋白-肾上腺素血栓模型小鼠的存活恢复率($P<0.05$);Ⅰ号工艺疏血通脉等剂量组对小鼠出血时间影响无显著差异。结论 疏血通脉胶囊具有抑制凝血及抗血栓形成的作用,其中以Ⅰ号工艺疏血通脉胶囊的效果较好。

关键词:疏血通脉胶囊 凝血时间 出血时间 胶原蛋白-肾上腺素小鼠血栓模型

doi: 10.11842/wst.2013.08.022 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

现代中医认为,中风的病因病机是在气血内虚的基础上,由劳倦内伤、忧思恼怒、嗜食厚味及烟酒等诱因引起阴阳失调、气血逆乱、直冲犯脑,导致脑脉痹阻或血溢脉外^[1]。“痰(痰凝)”“淤(血瘀)”二因在中风病急性期中至关重要。

根据老年人脑梗塞急性期的临床特点,广西名中医刘泰教授立足中医中风痰瘀致病理论,结合现代中药药理研究成果,拟经验方醒脑通脉胶囊用于缺血性脑血管病,因疗效确切得到广泛认可^[2]。实验研究^[3~5]发现此方可减少缺血再灌注损伤后模型大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、IL-8 以及 TNF- α 的含量,减轻缺血区的炎症反应、减少神经细胞凋亡,减小梗死范围,促进神经功能恢复。临床观察表明^[2,6]其对老年脑梗塞的神经功能缺损评分、中医证候疗效等方面均有改善,对缺血性中风急性期有较好

的疗效。后历经 10 余年临床不断探索和优化完善,减轻其毒副作用,在醒脑通脉胶囊基础上化裁了疏血通脉胶囊,临床疗效和安全性较前述方剂为优。

本实验旨在观察探讨不同工艺疏血通脉胶囊对凝血功能及血栓形成的影响,通过药效学实验,比较探讨疏血通脉胶囊药效表现最佳的制作工艺,为疏血通脉胶囊后期进行大样本动物实验、临床试验治疗急性脑梗死提供客观的现代医药学理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

清洁级昆明种雄性小鼠 440 只,体质量 20~22 g,由广西医科大学实验中心提供,合格证号:SCXK 桂 2009-0002。

收稿日期:2013-03-02

修回日期:2013-03-24

* 广西省科技厅自然科学基金项目(2011GXNSFA018180)疏血通脉胶囊预处理对脑缺血大鼠 MAPKs 通路的影响研究,负责人:刘泰;广西省科技厅科技攻关课题(桂科攻 11107009-1-11)缺血性中风新药—疏血通脉胶囊的临床前研究,负责人:刘泰。

** 通讯作者:曹斌,副研究员,主要研究方向:新药研发,药学研究。

1.2 实验药物

曲克芦丁片,又名维脑路通片,山西亚宝药业集团股份有限公司,国药准字 H14023273,产品批号:20110112,规格:60 mg×100 片/瓶。

疏血通脉胶囊(三七 15 g、薤白 10 g、地龙 10 g、瓜蒌皮 10 g、冰片 0.1 g 等)。制作工艺:3 种不同制作工艺疏血通脉胶囊,由广西中医药研究院制备(药材鉴定人员为广西中医药研究院农云开主管药师)。

1.2.1 疏血通脉胶囊 I 号(三七全粉法)

处方量的三七打粉备用。其余药材(薤白、地龙、瓜蒌皮)加水 10~15 倍,煎煮 3 次,每次 2~3 h,合并滤液,浓缩成稠膏后与三七粉混匀、烘干。最后加入冰片打粉、装胶囊。胶囊中有效成分(人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1)含量共计 8.3%。

1.2.2 疏血通脉胶囊 II 号(部分醇提水沉法)

处方量三分之二的三七粉用 70%乙醇提取 3 次,合并滤液,浓缩成稠膏备用,醇提后三七药渣与余下药材(薤白、地龙、瓜蒌皮)水提,滤液合并浓缩成稠膏与田七醇提液及余下三七粉合并,烘干。最后加入冰片打粉,装胶囊。胶囊中有效成分(人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1)含量共计 7.4%。

1.2.3 疏血通脉胶囊 III 号样品(部分水提醇沉法)

处方量的三分之一的三七打粉备用。三分之二的三七和其他药材(薤白、地龙、瓜蒌皮)水煮,50%乙醇沉淀,滤取上清液回收乙醇,稠膏与三七粉混匀,烘干。最后加入冰片打粉,装胶囊。胶囊中有效成分(人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} 和三七皂苷 R_1)含量共计 4.9%。

2 实验方法

2.1 凝血实验

取雄性小鼠 110 只,随机分 11 组,每组 10 只,分别为生理盐水组、曲克芦丁组、疏血通脉胶囊 I 号、II 号、III 号组(各组再分为低、中、高剂量 3 个亚组)。灌胃给药 7 日,每日 1 次。①玻片法:末次给药 1 h 后用毛细玻管于眼眶取血,滴于载玻片,立即用秒表计时。以针头能挑起纤维蛋白丝为止,记录为凝血时间。②玻管法:同时将上述毛细玻管取血至玻管内血柱达 5 cm。每隔 30 s 折断毛细玻管一小段,检查有无出现纤维蛋白丝。计算从毛细玻管采血到出现血凝丝的时间,记录为凝血时间。

2.2 出血实验

取雄性小鼠 110 只,随机分 11 组(具体分组及给药方法、时间同凝血实验)。末次给药 1 h 后将小鼠置于固定器中,在距尾尖 3 mm 处剪断,待血液自行溢出时开始计时,直至血液自然停止为止,记录为出血时间。

2.3 胶原蛋白-肾上腺素小鼠血栓模型实验

取雄性小鼠 220 只,随机分 11 组(具体分组及给药方法、时间同凝血实验)。末次给药 1 h 后于小鼠尾静脉注射胶原蛋白-肾上腺素混合剂溶液,20 s 推完。小鼠死亡或 15 min 内后肢麻痹未恢复者为阳性,15 min 内恢复者为阴性。

2.4 给药

以临床用量的 5、10、20 倍设疏血通脉胶囊低、中、高剂量组。按人和小鼠体表面积折算为疏血通脉胶囊 I 号、II 号、III 号组小鼠的等效剂量(低、中、高剂量组小鼠给药剂量分别为 5、10、20 g·kg⁻¹)。曲克芦丁的等效剂量为 (0.1 g·kg⁻¹)。灌胃给药每天 1 次,共给药 7 天。

2.5 数据分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,根据资料特点采用相应的统计方法。计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析,计数资料用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 凝血实验

与生理盐水组比较,3 种不同工艺的疏血通脉胶囊 I 号、II 号、III 号各剂量组及曲克芦丁组均能延长小鼠凝血时间 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3 种工艺疏血通脉胶囊各剂量组延长凝血时间的作用未显示出量效关系;与 II 号、III 号工艺疏血通脉胶囊等剂量组及曲克芦丁组比较, I 号工艺疏血通脉胶囊各剂量组延长小鼠凝血时间明显增长 ($P < 0.05$)。具体见表 1。

3.2 出血实验

与生理盐水组比较,3 种工艺的疏血通脉胶囊 I 号、II 号各剂量组有延长出血时间趋势,但 I 号、II 号、III 号各剂量组及曲克芦丁组对小鼠出血时间的影响无显著差异。具体见表 2。

3.3 胶原蛋白-肾上腺素小鼠血栓模型实验

与生理盐水组比较,3 种工艺的疏血通脉胶囊

I 号、II 号、III 号各剂量组及曲克芦丁组均可显著提高胶原蛋白-肾上腺素血栓模型小鼠的存活恢复率 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), I 号工艺疏血通脉胶囊组

表 1 不同工艺疏血通脉胶囊对小鼠凝血时间影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	玻片法/s	玻管法/s
生理盐水组	123±38	127±51
曲克芦丁组	215±42	197±54
疏血通脉 I 号高剂量组	260±53 ^{△△}	257±48 [△]
疏血通脉 I 号中剂量组	268±50 ^{△△}	251±50 [△]
疏血通脉 I 号低剂量组	267±63 ^{△△}	256±49 ^{△△}
疏血通脉 II 号高剂量组	214±45 [△]	188±40
疏血通脉 II 号中剂量组	219±50 [△]	184±44
疏血通脉 II 号低剂量组	216±43 [△]	187±40
疏血通脉 III 号高剂量组	213±46 [△]	186±54
疏血通脉 III 号中剂量组	223±45 [△]	188±41
疏血通脉 III 号低剂量组	217±41	189±43

注:与生理盐水组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$;与 II 号、III 号各剂量组及曲克芦丁组比较, [△] $P<0.05$ 。

表 2 不同工艺疏血通脉胶囊对小鼠出血时间的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	出血时间/s
生理盐水组	176±90
曲克芦丁组	170±90
疏血通脉 I 号高剂量组	180±100
疏血通脉 I 号中剂量组	183±89
疏血通脉 I 号低剂量组	184±90
疏血通脉 II 号高剂量组	178±91
疏血通脉 II 号中剂量组	189±84
疏血通脉 II 号低剂量组	186±90
疏血通脉 III 号高剂量组	170±82
疏血通脉 III 号中剂量组	169±80
疏血通脉 III 号低剂量组	181±90

表 3 不同工艺疏血通脉胶囊对胶原蛋白-肾上腺素小鼠血栓模型的影响 ($n=20$)

组别	死亡或麻痹未恢复数/只	恢复数/只	恢复率/%
生理盐水组	19	1	5
曲克芦丁组	13	7 [△]	35
疏血通脉 I 号高剂量组	11	9 ^{△△}	45
疏血通脉 I 号中剂量组	10	10 ^{△△}	50
疏血通脉 I 号低剂量组	11	9 ^{△△}	45
疏血通脉 II 号高剂量组	14	6 [△]	30
疏血通脉 II 号中剂量组	14	6 [△]	30
疏血通脉 II 号低剂量组	14	6 [△]	30
疏血通脉 III 号高剂量组	14	6 [△]	30
疏血通脉 III 号中剂量组	13	7 [△]	35
疏血通脉 III 号低剂量组	13	7 [△]	35

注:与生理盐水组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ 。

效果最好。具体见表 3。

4 讨论

曲克芦丁能抑制血小板聚集,有防止血栓形成作用。药理实验资料丰富,临床使用较多,故选择其作为实验阳性对照组。

疏血通脉方中三七为君药,所含人参三醇皂苷对大鼠急性不完全性脑缺血神经细胞及微血管膜的稳定性有保护作用^[7]。主要活性成分三七总皂苷具有扩张脑血管、增加脑血流量、降低脑血管阻力、减轻水肿、改善血脑屏障、抗自由基、抗血小板聚集及抗炎功效,对脑损伤有保护作用^[8]。故将三七有效成分的提取工艺作为疏血通脉不同制作工艺选择的基础,其中 I、II、III 号 3 种工艺中三七有效成分的提取工艺分别为使用全粉、部分醇提水沉法、部分水提醇沉法。三七总皂甙 (Panax Notoginsenoside, PNS) 为三七根部提取的有效成分,含有人参皂甙、三七皂甙等 20 多种皂甙成分,其中以人参皂甙 Rb₁、Rg₁、三七皂甙 R₁ 含量最高^[9]。三七有效成份提取工艺的比较研究结果显示^[10],水提、醇提三七总皂甙提取率分别为 83.29%、80.07%。三七作为名贵中草药,使用全粉较水提或醇提法更能充分利用其有效成分。且生三七具有活血化瘀、消肿定痛的功效,熟三七具有补血、滋补的功效, I 号工艺中使用生全粉更能发挥其活血化瘀的功效。实验证

明,疏血通脉胶囊具有抑制凝血及抗血栓形成的作用,其中以 I 号工艺疏血通脉胶囊的效果较好,且无出血不良反应。对疏血通脉胶囊抗血栓机制的进一步研究及临床应用研究具有指导意义。

参考文献

- 1 姚巧林. 中风病的病因病机及历史形成过程. 中国临床康复, 2006, 10(27): 131~133.
- 2 刘泰, 吕玉宝, 梁健芬, 等. 醒脑通脉胶囊治疗老年脑梗塞的临床疗效研究. 辽宁中医杂志, 2007, 34(12): 1745~1746.
- 3 刘泰, 韦必清, 韦玉进. 醒脑通脉胶囊对脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的影响. 辽宁中医杂志, 2005, 32(2): 89~90.
- 4 刘泰, 秦若飞, 张青萍, 等. 醒脑通脉胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织 IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 含量的影响. 广西医科大学学报, 2008, 25(1): 1~4.
- 5 刘泰, 谭璐璐, 秦若飞, 等. 醒脑通脉胶囊对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 TNF- α 的影响. 广西中医学院报, 2008, 10(4): 13~16.
- 6 刘泰. 自拟醒脑通脉胶囊治疗急性脑血栓的研究. 临床荟萃, 2000, 15(19): 867~868.
- 7 刘宗超, 周官恩, 赵克建, 等. 三七三醇皂苷对大鼠脑缺血/再灌注脑损伤保护作用的实验研究. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(1): 38~40.
- 8 唐婧姝, 裴清华. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 211~213.
- 9 苏静, 朱卫泉. RP-HPLC 梯度洗脱法测定血塞通片中三七皂甙 R₁、人参皂甙 Rb₁ 及人参皂甙 Rg₁ 的含量. 药物分析杂志, 2005, 25(2): 212~214.
- 10 赵惠莹, 刘福强, 王艳萍, 等. 三七有效成分提取工艺的比较研究. 药学实践杂志, 2009, 27(3): 205~208.

Effects of Different Production Techniques of Shuxue Tongmai Capsules on Mouse Blood Coagulation Function and Thrombosis Formation

Liu Tai¹, Zhou Jun², Lin Qihong¹, Hu Yuying¹, Cao Bin², Gao Wei², Wu Yuqiang², Wang Li²,
Liu Ying², Zhang Qingping¹, He Qianchao¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;
2. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530023, China)

Abstract: This study was aimed to evaluate effects of different production techniques of Shuxue Tongmai (SXTM) capsules for blood coagulation function and thrombosis formation among mice. The observation was made on the clotting time, bleeding time and instauration rate of collagen-adrenaline model of mice. The results showed that compared with SXTM II and III production technique, the SXTM I production technique of the same dosage group can prolong the clotting time of mice significantly ($P < 0.05$), and increase the instauration rate of collagen-adrenaline model of mice significantly ($P < 0.05$). There was no significant difference on the bleeding time of mice between the SXTM I production technique of same dosage group and the saline group. It was concluded that the SXTM had anticoagulative and antithrombotic effects. And the SXTM I production technique receives better effects.

Keywords: Shuxue Tongmai capsules, clotting time, bleeding time, collagen-adrenaline model of mice

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 王 晶)