

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2024.01.002

侧柏叶提取物对血液凝固的影响及其机制

沈哲慧 刘梦晴 朱雪晴 李丽

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 **目的** 探究侧柏叶提取物对血液凝固的影响及其机制。**方法** 制备侧柏叶水提取物及其石油醚、乙酸乙酯和正丁醇提取物,取家兔颈总动脉血液,用凝血板法,观察侧柏叶水提取物和石油醚、正丁醇及乙酸乙酯提取物对血液凝固的影响;以 RT、APTT、PT 以及 TT 为指标,观察体外实验侧柏叶提取物对血液凝固的影响。将健康昆明种小鼠随机分为侧柏叶水提取物低、高浓度组,乙酸乙酯提取物低、高浓度组,正丁醇提取物低、高浓度组以及空白对照组,每组 8 只;以凝血时间、APTT、PT、TT 及凝血因子 XII 为指标,观察侧柏叶提取物对血液凝固的影响。通过灌胃 5ml/kg 的无水乙醇制备胃溃疡出血模型,以胃出血面积、胃组织切片后胃黏膜细胞形态为指标,观察侧柏叶提取物对胃溃疡出血模型的作用。**结果** 在体外实验与空白对照组相比,石油醚、乙酸乙酯、正丁醇提取物和水提取物组显著延长凝血时间和 RT ($P < 0.05$);正丁醇提取物、水提取物组明显延长 APTT 和 PT ($P < 0.05$),乙酸乙酯提取物明显延长 PT ($P < 0.05$)。在体内实验与空白对照组相比,乙酸乙酯、正丁醇提取物、水提取物低浓度组凝血时间明显缩短 ($P < 0.05$);乙酸乙酯提取物高浓度组和正丁醇提取物低浓度组分别显著缩短 APTT 和 PT ($P < 0.05$),而正丁醇、水提取物高浓度组则显著延长 TT ($P < 0.05$);与空白对照组相比,乙酸乙酯低浓度组、正丁醇提取物高、低浓度组血浆 X II 因子含量明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,乙酸乙酯提取物高、低浓度组、正丁醇提取物高、低浓度组和水提取物高、低浓度组胃出血面积明显缩小 ($P < 0.05$),乙酸乙酯提取物低浓度组胃出血面积最小。**结论** 侧柏叶体内实验可促进凝血,乙酸乙酯提取物是主要的止血提取物,且低浓度的乙酸乙酯提取物止血效果更好。

关键词 侧柏叶;血液凝固;胃出血

中图分类号:R285 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2024)02-005-05

The effect of platycladus orientalis leaf extract on blood coagulation and its mechanisms

SHEN Zhehui, LIU Mengqing, ZHU Xueqing, LI Li

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Platycladus orientalis leaves on blood coagulation and its related mechanisms. **Methods** In vitro coagulation experiment: prepared the extract of Platycladus orientalis leaves by petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water. Took the blood from the common carotid artery of rabbits, and observed the effect of the extract of Platycladus orientalis leaves by water, petroleum ether, n-butanol and ethyl acetate on blood coagulation with the clotting plate method. Using RT, APTT, PT, and TT as indicators, observed the effects of Platycladus orientalis leaves and its extracts on blood coagulation in vitro experiments. In vivo coagulation experiment: Healthy Kunming mice were randomly divided into low and high concentration groups of water extract from Platycladus orientalis leaves. Low and high concentration groups of ethyl acetate extract. Low and high concentration groups of n-butanol extract, as well as blank group. Using coagulation time, APTT, PT, TT, and coagulation factor XIII as indicators, the effects and related mechanisms of Platycladus orientalis leaves and its extracts on blood coagulation were studied through in vivo experiments. The effect of extract of Platycladus orientalis leaves on gastric ulcer bleeding model: A gastric ulcer bleeding model was prepared by gavage with 5ml/kg anhydrous ethanol. The effect of Platycladus orientalis leaves and its extract on gastric bleeding model was observed using gastric bleeding area and gastric mucosal cell morphology after gastric tissue sectioning as indicators. **Results** In vitro experiment: Compared with the blank control group, petroleum ether,

[基金项目] 济宁医学院大学生创新创业项目(cx2021022)

[通信作者] 李丽, Email: tyvm80@163.com

ethyl acetate, n-butanol extract, and water extract significantly prolonged coagulation time and RT ($P < 0.05$); The n-butanol extract, water extract significantly prolonged APTT and PT ($P < 0.05$), and ethyl acetate extract significantly prolonged PT ($P < 0.05$). In vivo experiment: Compared with the blank control group, the low concentration group of ethyl acetate, n-butanol and water extract significantly shortened the coagulation time ($P < 0.05$); The high concentration group of ethyl acetate extract and the low concentration group of n-butanol extract significantly shortened APTT and PT separately ($P < 0.05$), while the high concentration group of n-butanol and water extract significantly prolonged TT ($P < 0.05$); Compared with the blank control group, the low concentration group of ethyl acetate, the high and low concentration group of n-butanol extract showed a significant increase in plasma factor XIII content ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the areas of gastric bleeding in the high and low concentration groups of ethyl acetate extract, high and low concentration groups of n-butanol extract, and high and low concentration groups of water extract were significantly reduced ($P < 0.05$). The low concentration group of ethyl acetate extract had the smallest area of gastric bleeding.

Conclusion In vivo experiments, *Platycladus orientalis* leaves mainly promote coagulation, with ethyl acetate as the main hemostatic site, and low concentrations of ethyl acetate extract have better hemostatic effects.

Keywords: *Platycladus orientalis* leaves; Blood coagulation; Gastric bleeding

侧柏叶为柏科植物侧柏的嫩枝叶,其味苦辛,性涩,微寒,归入肺经、肝经以及大肠经^[1]。唐代孙思邈《备急千金要方》记载,侧柏叶可用于血证,如吐血、小儿赤白滞下、便血等,尤其对血热出血病拥有较好疗效^[2]。我们的预实验表明,在体外凝血实验中,侧柏叶水提取物及其它提取物均能明显延长家兔颈总动脉血液凝血时间,由此可见,侧柏叶对血液凝固的影响作用与古籍记载的有所不同。基于此,在本研究中,我们以出血时间、凝血时间、APTT、PT、TT、凝血因子XⅡ为指标,系统而全面地观察了侧柏叶不同提取物在体内及体外实验对血液凝固的影响及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

石油醚(批号:20210309)、乙酸乙酯(批号:20210205),正丁醇(批号:20172206),二甲苯(批号:20191111)均购于烟台远东精细化工有限公司。PT(批号:105460),APTT(批号:1122436),TT(批号:121292)均购于上海太阳生物技术有限公司。凝血因子XⅡ Elisa 检测试剂盒(货号:H433)购于南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 侧柏叶水提取物及其他提取物的制备 1) 侧柏叶水提取物的制备。采摘济宁医学院本草园新鲜侧柏叶,经清洗、晾干、打粉、水煮、抽滤、旋转蒸发仪浓缩后,用冷冻干燥机冻干成粉,得侧柏叶水提取物。

2) 侧柏叶石油醚提取物的制备。取1)中适量侧柏叶水煎液,放入分液漏斗,加入等体积的石油

醚,萃取3次,并将上层石油醚提取液混合,经旋转蒸发仪浓缩后,入真空干燥箱干燥至恒重,得侧柏叶石油醚提取物。

3) 侧柏叶乙酸乙酯提取物的制备。取2)中的水层溶液,放于分液漏斗中,加入等体积乙酸乙酯,萃取3次,取水层备用,将上层乙酸乙酯提取液混合在一起,经旋转蒸发仪浓缩后,入真空干燥箱干燥至恒重,得侧柏叶乙酸乙酯提取物。

4) 侧柏叶正丁醇提取物的制备。取3)中的水层溶液,置于分液漏斗中,加入等体积的正丁醇,萃取3次,将上层正丁醇提取液混合在一起,经旋转蒸发仪浓缩后,入真空干燥箱干燥至恒重,得侧柏叶正丁醇提取物。

1.2.2 体外实验观察侧柏叶提取物对血液凝固的影响 1) 凝血时间测定。以枸橼酸钠:全血=1:9的比例将家兔颈总动脉血液取至采血管中,制作适量的抗凝血液。生理盐水、乙醇和丙二醇以3:1:1的比例溶解侧柏叶提取物并配制5mg/ml的侧柏叶提取物溶液。侧柏叶各提取物为样品组,溶剂为空白组。分别取各侧柏叶提取物溶液或溶剂各0.1ml加入凝血板的孔洞中,再加入0.27%的氯化钙溶液0.1ml,充分混匀,最后迅速加入0.5ml的抗凝血液与之混合,并立刻计时,每隔30s用针挑起血液一次,出现血丝即血液凝固,用针移动凝血块,若能够看见凝血板的底部,则为凝血完全。各溶液及溶剂重复测定6次,并记录数据。

2) 血浆复钙时间(RT)的测定。将上述抗凝血液离心(2500g/min, 15min)取上清。试管内依次加入0.5%的侧柏叶提取物或溶剂0.1ml后,放入37℃恒温水浴箱,再向各个试管中加入0.27%的氯

化钙溶液和上清各 0.1ml 并记录时间,每 30 秒查看一次,试管中出现白色纤维蛋白丝时,停止计时,记录的时间即为 RT。重复测定 6 次并记录数据。

3) APTT、PT、TT 的测定。将上述抗凝血液离心(2500g/min, 15min)取上清。以侧柏叶各提取物为样品组,溶剂为空白组,在 EP 管中分别加入相应的侧柏叶提取物溶液 0.1ml 或溶剂 0.1ml,再加入 0.1ml 的血浆,放入 37℃ 恒温箱。将 APTT、PT、TT 试剂放入 37℃ 恒温箱中孵育 5min,分别取 0.1ml、0.2ml、0.2ml 加入待测管中,APTT 测量管加入 37℃ 预温的 0.025mol/L 氯化钙溶液 0.1ml 后开始计时,待血液凝固记录凝血时间。

1.2.3 体内实验观察侧柏叶提取物对血液凝固和胃出血模型的影响 1) 实验分组。将健康昆明种小鼠随机分为侧柏叶水提取物低、高浓度组,乙酸乙酯提取物低、高浓度组,正丁醇提取物低、高浓度组以及空白对照组,每组 8 只。空白对照组用 0.1ml/10g 的 NS 灌胃,侧柏叶提取物高浓度、低浓度组分别用同体积的 4g/kg、1g/kg 的浓度给小鼠灌胃 4 周。4 周后小鼠分别进行凝血时间、APTT、PT、TT,同时 Elisa 法测定血浆 XⅡ 因子含量,以此观察侧柏叶提取物对血液凝固的影响。本实验所有动物实验符合动物伦理学要求(批准编号:2019-DW-081)。

以上实验结束后,所有小鼠灌胃 5ml/kg 的无水乙醇 1 次,制备胃溃疡出血模型,则此时空白对照组为模型组。其余侧柏叶提取物组用同样的方法灌胃无水乙醇,以计分法量化各组小鼠胃出血面积和胃黏膜石蜡切片 HE 染色观察侧柏叶提取物对胃出血模型的影响。

2) 毛细玻璃管法凝血时间测定。取内部直径为一毫米的毛细玻璃管,使用内眦取血的方法将毛细管插进小鼠眼部,从血液到达毛细玻璃管末端开始计时,10s 后在毛细玻璃管 0.5cm 处折断,将其缓缓拉开,观察断口处是否有凝血丝,若有则血液凝固,每 10 秒折断观察,记录凝血时间。

3) 计分法量化胃出血面积。把靠近胃的十二指肠结扎并取胃和食管,用 4% 的多聚甲醛沿食管注射进胃中,并立即结扎食管,20min 后将胃剪开,用 NS 充分冲洗胃内容物,吸干表面水分,用游标卡尺测量出血面积的长度以及宽度,1mm 及以下长或宽的出血面计为 1 分;1~2mm 为 2 分;2~3mm 为 3 分;3~4mm 为 4 分;大于 4mm 为 5 分,若

出血宽度大于 2mm,分数变为 2 倍,若出血面为片状,则按面积计分,各评分的总和为小鼠胃损伤。以计分法观察侧柏叶提取物对胃出血面积的影响。

4) 胃组织 HE 染色。取胃,以 4% 的多聚甲醛固定,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋后,以 5um 厚度连续切片,按 HE 染色流程进行染色,镜下观察各组小鼠胃黏膜细胞的形态学变化。

1.3 统计学方法

将所有实验数据输入到 SPSS26.0 进行分析,正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Bonferroni 检验, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 体外实验侧柏叶提取物对血液凝固的影响

与空白对照组相比,侧柏叶各提取物均能显著延长凝血时间、RT($P < 0.05$),且正丁醇提取物效果最明显,如表 1 所示。侧柏叶正丁醇提取物、水提取物均能显著延长 APTT、PT($P < 0.05$),侧柏叶乙酸乙酯提取物能明显延长 PT($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 体外实验侧柏叶提取物对凝血时间、RT、APTT、PT 和 TT 的影响($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	凝血时间/s	RT/s	APTT/s	PT/s	TT/s
空白对照组	156.23±3.23	38.72±5.65	19.53±3.57	10.36±1.98	21.35±4.95
石油醚提取物组	194.42±6.26*	89.39±20.18*	19.62±4.72	12.85±1.98	17.53±5.19
乙酸乙酯提取物组	200.10±3.32*	110.26±13.55*	20.80±3.63	15.08±3.95*	21.86±4.03
正丁醇提取物组	235.66±3.29*	118.48±13.03*	24.63±1.08*	16.49±5.13*	20.37±6.18
水提取物组	209.77±2.18*	84.50±16.21*	25.58±3.92*	14.75±2.28*	21.02±2.25
F	325.80	27.48	3.82	3.07	0.79
P	<0.001	<0.001	0.015	0.035	0.54

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$ 。

2.2 体内实验侧柏叶提取物对血液凝固的影响

与空白组对照相比,除侧柏叶乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物和水提取物低浓度组能显著缩短凝血时间($P < 0.05$)外,其余各组均无统计学差异。见表 2。

与空白对照组相比,侧柏叶乙酸乙酯提取物高浓度组能显著缩短 APTT($P < 0.05$),侧柏叶正丁醇提取物低浓度组能显著缩短 PT($P < 0.05$),侧柏叶正丁醇提取物和侧柏叶水提取物高浓度组能显著延长 TT 外($P < 0.05$),其余各组与空白对照组相比均无统计学差异。见表 2。

与空白对照组相比,侧柏叶乙酸乙酯低浓度组、正丁醇提取物低浓度及高浓度组均能显著增加

血浆 X II 因子的含量 ($P < 0.05$), 低浓度侧柏叶乙酸乙酯的效果最好。其余各组血浆 X II 因子的含量均无统计学差异。见表 3。

表 2 体内实验侧柏叶提取物对凝血时间、APTT、PT、TT 的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	凝血时间/s	APTT/s	PT/s	TT/s
空白对照组	43.02±10.93	30.94±2.22	13.10±0.54	21.20±0.68
乙酸乙酯提取物低浓度组	27.11±7.69*	30.59±0.36	13.18±0.38	20.89±1.60
正丁醇提取物低浓度组	28.01±6.34*	34.72±2.04	11.78±0.29*	21.85±2.21
水提取物低浓度组	30.98±4.47*	27.46±1.22	12.11±0.79	21.35±0.24
乙酸乙酯提取物高浓度组	38.03±6.67	23.75±0.75*	12.67±0.26	22.41±0.42
正丁醇提取物高浓度组	45.28±11.21	30.93±0.82	13.78±0.38	23.81±0.39*
水提取物高浓度组	36.53±8.72	37.02±5.37	12.57±0.25	24.40±1.21*
F	5.90	26.32	18.14	10.52
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$ 。

表 3 侧柏叶提取物对血浆凝血因子 X II 含量的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	凝血因子 X II/(ng · ml ⁻¹)
空白对照组	52.53±14.17
乙酸乙酯提取物低浓度组	100.87±13.77*
正丁醇提取物低浓度组	87.74±17.93*
水提取物低浓度组	67.36±30.58
乙酸乙酯提取物高浓度组	53.30±8.18
正丁醇提取物高浓度组	78.79±15.26*
水提取物高浓度组	66.29±14.09
F	8.31
P	<0.001

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$ 。

2.3 侧柏叶提取物对小鼠胃出血的影响

与模型组对比,侧柏叶各浓度提取物均可显著减轻胃部出血 ($P < 0.05$),且低浓度乙酸乙酯提取物的效果好,见表 4。胃组织石蜡切片结果显示,模型对照组胃黏膜出现了缺损、断裂,而侧柏叶提取物组均出现不同程度的减轻,乙酸乙酯提取物低浓度组胃黏膜损伤的程度最轻,见图 1。

表 4 侧柏叶提取物对胃出血模型小鼠胃出血面积的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	胃出血面积得分/分
模型组	34.67±3.05
乙酸乙酯提取物低浓度组	9.33±2.08*
正丁醇提取物低浓度组	14.00±2.65*
水提取物低浓度组	21.00±2.00*
乙酸乙酯提取物高浓度组	27.67±2.52*
正丁醇提取物高浓度组	20.67±1.53*
水提取物高浓度组	25.00±2.65*
F	99.10
P	<0.001

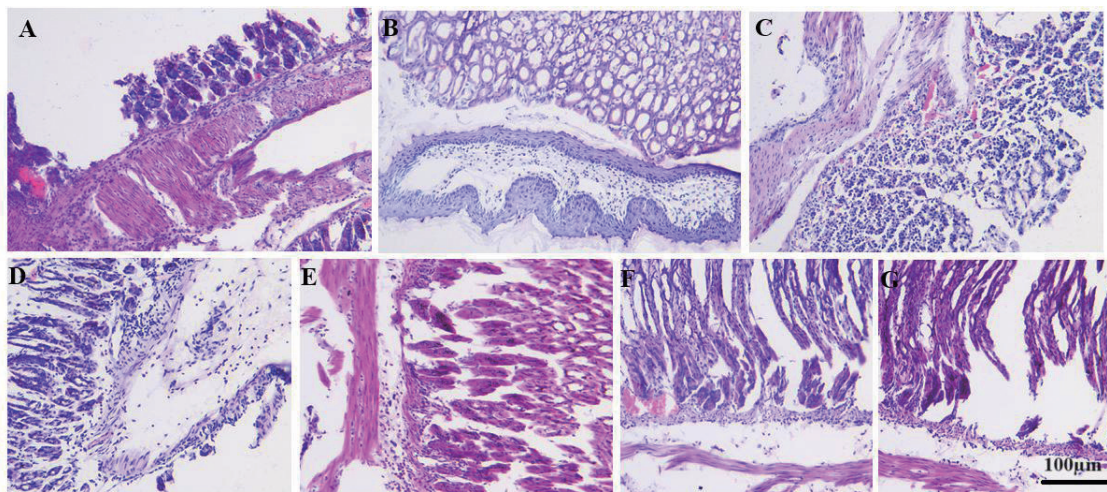
注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

血液凝固由 3 个过程组成,首先是凝血酶原酶复合物的形成,内源性和外源性凝血途径均可导致其生成;其次是凝血酶原的激活,最后是纤维蛋白的生成。凝血时间反映了内源性及外源性途径凝血情况。APTT 和 RT 主要反映了内源性凝血过程以及凝血因子 VIII、IX、XI、XII 等的活性;PT 则主要体现了外源性凝血过程以及凝血因子 II、V、VII、X 等的活性;TT 主要反映了纤维蛋白原转为纤维蛋白的时间。

在体外实验中,侧柏叶各提取物可以显著延长凝血时间、RT,乙酸乙酯、正丁醇提取物和水提取物可明显延长 APTT 或 PT,提示侧柏叶能够通过内源性和外源性途径抑制凝血。据文献记载,侧柏叶主要的化学成分有黄酮、鞣质和挥发油^[3],在体外实验中,鞣质能够与血液中的钙离子结合形成沉淀,干扰凝血过程;这可能是导致体内和体外实验不一致的原因之一。血液凝固是凝血系统与抗凝系统双重作用的结果,侧柏叶也有可能增强抗凝系统的作用产生抗凝的效果。与体外凝血实验不同,侧柏叶乙酸乙酯、正丁醇和水提取物均能明显缩短凝血时间;侧柏叶乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物分别能显著缩短 APTT、PT;在无水乙醇诱导的胃出血模型中,侧柏叶乙酸乙酯、正丁醇和水提取物均能显著减小胃出血面积,提示侧柏叶体内凝血实验则促进凝血。体内凝血过程受血小板、凝血因子的影响,也受神经和体液多种因素的调节。在本实验中,侧柏叶乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物均能增加血液中 X II 因子含量,且侧柏叶乙酸乙酯低浓度组 X II 因子含量增加最为明显,这与侧柏叶乙酸乙酯提取物低浓度组减少无水乙醇诱导的胃出血面积和减轻胃黏膜损伤的作用最强这一结果一致,提示侧柏叶促进凝血的作用与 X II 因子相关。

侧柏叶乙酸乙酯提取物止血的作用较正丁醇提取物、水提取物强,提示乙酸乙酯提取物是促进凝血最有效的侧柏叶提取物。侧柏叶中黄酮类物质含量丰富,其中乙酸乙酯提取物槲皮苷、槲皮素、山奈酚、芹菜素、穗花杉双黄酮和扁柏双黄酮含量最为丰富,正丁醇提取物次之^[4-6],提示侧柏叶乙酸乙酯提取物的促进凝血的作用可能与上述成分有关。据文献记载^[7],侧柏叶炒炭后凝血作用明显增强,且其中的槲皮素、山奈酚、芹菜素含量明显升高,是



注:A 模型组,B 乙酸乙酯低浓度组,C 正丁醇低浓度组,D 水提物低浓度组,E 正丁醇高浓度组,F 水提物高浓度组,G 乙酸乙酯高浓度组。

图 1 侧柏叶提取物对小鼠胃出血的影响(HE 染色, ×100)

否槲皮素、山奈酚、芹菜素等成分主要发挥了凝血作用,尚需要更为广泛和深入的研究。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] 于浩,包永睿,王帅,等. 槐花散中侧柏叶的遵古炮制及现代炮制方法比较研究[J]. 中南药学,2021,19(10):2063-2066.
- [2] 张娟,刘美,李先宽,等. 侧柏叶的本草考证[J]. 中国现代中药,2017,19(9):1318-1321. DOI: 10. 13313/j. issn. 1673-4890. 2017. 9. 022.
- [3] 张瑞峰,曾阳,刘力宽,等. 侧柏叶的化学成分与药理学作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2021,40(4):53-56.
- [4] 肖凡. 侧柏叶黄酮的大孔树脂纯化工艺研究[J]. 化学工程师,2022,36(4):91-95. DOI: 10. 16247/j. cnki. 23-1171/tq. 20220491.
- [5] 黄小梅,胡孝勇,左华江. 响应面法优化侧柏叶总黄酮提取工艺[J]. 化学试剂,2020,42(9):1093-1097. DOI: 10. 13822/j. cnki. hxsj. 2020007487.
- [6] 王树宁,宋照军,黄滢洁,等. 响应面法优化超声波辅助提取侧柏叶总黄酮工艺[J]. 食品研究与开发,2020,41(9):88-93.
- [7] 柳佳. 侧柏炭凉血止血作用研究及机制初探[D]. 南京:南京中医药大学,2013.

(收稿日期 2023-05-23)

(本文编辑:石俊强)