

林丽萍,李 英,吕 晔. 毛冬青根提取液不同部位的血小板聚集抑制活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):289-290.

毛冬青根提取液不同部位的血小板聚集抑制活性

林丽萍,李 英,吕 晔

(江苏省中国科学院植物研究所,江苏南京 210014)

摘要:采用萃取和柱层析法制备毛冬青各提取部位;用 Born 比浊法,以 ADP 为诱导剂检测毛冬青根提取液各部位对血小板聚集的抑制率,从而确定毛冬青根抗血小板聚集的有效部位。结果表明,各部位均具有不同程度的抑制效果。其中水部位和 D101-95% 乙醇部位活性最强,且在 0.08~0.5 mg/mL 范围内,随着剂量的增加,其活性也随之加强,抗血小板聚集活性与剂量呈正相关。

关键词:毛冬青;提取部位;抗血小板聚集

中图分类号:R285 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0289-02

毛冬青为冬青科(Aquifoliaceae)冬青属植物毛冬青(*Ilex pubescens* Hook. et Am.)的干燥根,具有活血通脉、消肿止痛、清热解毒之功效。已有研究结果表明毛冬青制剂有扩张血管及抗菌消炎的作用,临床用于冠状动脉硬化性心脏病,血栓闭塞性脉管炎,并用于中心性视网膜炎,小儿肺炎等疾病的治疗,有显著疗效^[1]。查阅大量文献可知,当前报道的毛冬青中具有抗血小板聚集活性的单体化合物有毛冬青甲素^[2]、毛冬青酸^[3-4]、Ilexosides D^[5]、Ilexosides J^[6]、Ilexgenin A、缩醛基毛冬青化合物 R₄^[7]、Pubescenosides A 和 Pubescenosides B^[8] 8 种。此外,笔者以 Ilexgenin A 为先导化合物进行结构修饰,也得到了一系列具有抗血小板聚集活性的衍生物^[9]。然而,究竟毛冬青根提取液中哪个部位抗血小板聚集活性高,前人没有做过详细的研究。本研究利用萃取和柱层析的方法,获得毛冬青根提取液的不同极性部位,以 ADP 为诱导剂,测定它们对血小板聚集的抑制效果,为后续有效成分的分离纯化奠

定基础。

1 材料与方法

1.1 动物

新西兰大耳白兔♀♂兼用,体质量 1.7~2.0 kg,由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。

1.2 药物与试剂

毛冬青于 2012 年采自广西,经广西药用植物园韦发南研究员鉴定为毛冬青科冬青属植物毛冬青(*Ilex pubescens* Hook. et Am.)的干燥根,留样样品保存在本所标本馆;柱层析硅胶和薄层层析硅胶(青岛海洋化工有限公司产品);阿司匹林(Sigma,货号:A2093);甲醇、正丁醇、二氯甲烷、乙醇、DMSO 均为国产分析纯(上海实意化学试剂有限公司产品)。

1.3 仪器

普通层析柱,超声仪,型号 KQ2200B,昆明市超声仪器有限公司产品;低温离心机,型号 1-15K, Sigma Corporation 公司产品;血小板聚集仪,型号 LBY-NJ,北京普利生仪器有限公司产品。

1.4 毛冬青提取液各部位的制备

将毛冬青根原材料粉碎后,70% 乙醇回流提取 3 次,每次

收稿日期:2013-10-31

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2012378)。

作者简介:林丽萍(1979—),女,福建永定人,博士,助理研究员,主要从事天然活性成分研究与开发。E-mail:llp790720@yeah.net。

通信作者:吕 晔,研究员。E-mail:1020915216@qq.com。

[7] Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, et al. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model[J]. *Planta Medica*, 2001, 67(9): 807-810.

[8] 艾志录, 张晓宇, 乔明武, 等. 天然食用色素栀子黄的应用特性研究[J]. *食品工业科技*, 2003, 24(12): 69-73.

[9] Wang X S, Wu Y F, Dai S L, et al. Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2012, 19(6): 1155-1159.

[10] 罗光明, 陈 岩, 张晓云, 等. 不同品种及产地栀子水溶性成分指纹图谱研究[J]. *中成药*, 2008, 30(4): 475-479.

[11] 张 村, 肖永庆, 李 丽, 等. 栀子果实不同部位中环烯醚萜苷类成分的比较研究[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(15): 1949-1951.

[12] He M L, Cheng X W, Chen J K, et al. Simultaneous determination of five major biologically active ingredients in different parts of *Gardenia jasminoides* fruits by HPLC with diode-array detection[J]. *Chro-*

matographia, 2006, 64(11/12): 713-717.

[13] 柴 丽, 吴继东. 不同产地栀子药材的质量研究[J]. *中国临床医药研究杂志*, 2006, 147(2): 46-47.

[14] 庄义修, 陈华师. HPLC 法测定不同产地栀子中栀子苷的含量[J]. *亚太传统医药*, 2009, 5(6): 20-21.

[15] 王 谦, 唐 灿, 姚 健, 等. 各栀子主产区栀子中栀子苷含量的比较研究[J]. *泸州医学院学报*, 2009, 32(2): 133-135.

[16] 陆 伟, 钱 铨, 张卫明, 等. 栀子黄色素的提取及精制研究[J]. *中国调味品*, 2009, 34(11): 84-86.

[17] 毛得奖, 朱亚玲, 庞海强, 等. 垂序商陆浆果红色素提取及总皂苷含量测定研究[J]. *中国调味品*, 2012, 37(12): 99-102.

[18] 郝 宁, 李海燕, 李宏博, 等. 白头翁及其同属植物总皂苷含量测定[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(10): 2474-2475.

[19] Wang J, Lu J C, Lv C N, et al. Three new triterpenoid saponins from root of *Gardenia jasminoides* Ellis. [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1396-1401.

3 h,提取液浓缩得浸膏。浸膏水溶(1 kg:2 L)超声悬浮得水悬浮液,依次用石油醚和水饱和的正丁醇萃取,得正丁醇部位和水部位。正丁醇部位减压旋蒸、水浴蒸干,甲醇溶解上 D101 大孔树脂柱,依次用水、30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇和 95% 乙醇冲柱,得 D101-水部位、D101-30% 乙醇部位、D101-50% 乙醇部位、D101-70% 乙醇部位和 D101-95% 乙醇部位。取各部位分别浓缩蒸干后各取粉末 5 mg,以 0.5% DMSO 作为溶媒,各部位分别配置 0.08、0.20、0.50 mg/mL 3 个浓度备用。

1.5 血小板聚集率测定

1.5.1 血浆样品的制备 取健康新西兰大耳白兔,静脉注射 20% 乌拉坦 1 g/kg 麻醉,颈总动脉取血,以 3.8% 枸橼酸钠抗凝(血与抗凝剂体积比为 9:1)。室温下 1 000 r/min 离心 15 min,吸取上层富血小板血浆(platelet rich plasma,PRP),剩余血液 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液贫血小板血浆(platelet poor plasma,PPP)。制备好的 PRP 应在 3 h 内用完。

1.5.2 体外抗血小板聚集试验 取新西兰大耳白兔,按“1.5.1”节方法制备 PRP 和 PPP。用 PPP 调整 PRP 中血小板数为(3~4)×10¹¹个/L。以 0.5% DMSO 作为溶媒对照,测定时以 PPP 调零。精密吸取 15 μL 溶媒或药物溶液加入到 270 μL PRP 中,在 37 ℃ 比浊杯内孵育 5 min,用 PPP 调零,再加入诱导剂 ADP 溶液 15 μL(终浓度为 10 μmol/L),按 Born 比浊法测定血小板聚集率,记录 5 min 内最大聚集率。血小板聚集抑制率=(对照组最大聚集率-药物组最大聚集率)/对照组最大聚集率×100%。

1.5.3 统计学方法 所有试验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 18.0 进行 *t* 检验。

2 结果

与对照组相比,D101-70% 乙醇部位 0.2 mg/mL 和 0.5 mg/mL 均显著抑制 ADP 诱导的新西兰大耳白兔血小板聚集($P<0.05$),毛冬青浸膏、水部位、正丁醇部位、D101-水部位、D101-50% 乙醇部位和 D101-95% 乙醇部位均极显著抑制 ADP 诱导的新西兰大耳白兔血小板聚集($P<0.01$)(表 1)。

3 讨论

毛冬青是我国常用中药之一,临床应用广泛,在治疗血栓方面表现出较好的疗效。本试验结果表明,毛冬青具有显著抗血小板聚集的活性,毛冬青浸膏、水部位、正丁醇部位、D101-水部位、D101-50% 乙醇部位和 D101-95% 乙醇部位,均可极显著地抑制血小板聚集,且呈剂量依赖关系;在 0.5 mg/mL 时,其抑制作用强度也均高于阳性对照药阿司匹林。在本次试验剂量范围内,水部位、D101-50% 乙醇部位和 D101-95% 乙醇部位在抗血小板聚集方面较为显著,因此可判定其抗血小板聚集的有效部位是水部位、D101-50% 乙醇部位和 D101-95% 乙醇部位。下一步试验需对具有抗血小板聚集作用的有效部位进一步分析,以期分离纯化有效成分和探索其药理作用。

参考文献:

[1]南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社,

表 1 毛冬青根提取液不同部位对 ADP 诱导的血小板聚集抑制活性

提取液部位	浓度 (mg/mL)	聚集率 (%)	抑制率 (%)
对照组		48.7±2.3	
毛冬青浸膏	0.08	27.2±3.3**	44.1
	0.20	24.7±2.2**	49.3
	0.50	19.5±4.5**	59.9
水部位	0.08	31.7±2.8**	34.9
	0.20	20.3±1.9**	58.2
	0.50	14.3±2.2**	70.6
正丁醇部位	0.08	34.1±7.3**	30.1
	0.20	26.4±5.2**	45.9
	0.50	16.8±2.3**	65.4
D101-水部位	0.08	32.7±3.4**	32.9
	0.20	14.9±1.5**	69.5
	0.50	16.5±1.8**	66.1
D101-30%乙醇部位	0.08	53.1±3.6	-9.0
	0.20	37.8±3.4**	22.4
	0.50	31.9±5.7**	34.5
D101-50%乙醇部位	0.08	35.8±8.3**	26.5
	0.20	23.3±3.3**	52.1
	0.50	22.5±4.2**	53.7
D101-70%乙醇部位	0.08	35.7±1.3**	26.7
	0.20	42.3±5.7*	13.2
	0.50	42.9±7.2*	12.0
D101-95%乙醇部位	0.08	35.5±5.3**	27.1
	0.20	33.9±3.3**	30.5
	0.50	13.3±1.9**	72.8
阿司匹林	0.50	31.2±2.0**	35.9

注: *、** 分别表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)。

2006:617-618.

[2]汪 钟,杜金香,朱国强,等. 毛冬青甲素对血小板功能和形态的影响[J]. 中西医结合杂志,1985,5(4):232-234.

[3]张芳林. 毛冬青酸抗血栓实验研究及机制探讨[J]. 江西医学院学报,2003,43(2):33-37.

[4]Li M,Wu W K,Liu L,et al. Specific inhibiting effects of liexonin A on von Willebrand factor-dependent platelet aggregation under high shear rate[J]. Chin Med J,2004,117(2):241-246.

[5]Lee C K, Lee H S, Huh M D, et al. Anticoagulant activity of ilexoside D, a triterpenoid saponin from *Ilex pubescens* [J]. Arch of Pharm Res, 1993,16(3):209-212.

[6]Han Y N, Baik S K, Kim T H, et al. Antithrombotic activities of saponins from *Ilex pubescens* [J]. Arch Pharm Res, 1987,10(2):115-120.

[7]付晓春,徐 哲,陈建军. 缩醛基毛冬青化合物 R4 的抗血栓作用研究[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(34):4335-4336,4456.

[8]Jiang Z H, Wang J R, Li M. Hemiterpene glucosides with anti-platelet aggregation activities from *Ilex pubescens* [J]. J Nat Prod, 2005,68(3):397.

[9]Lin L P, Wu F H, Liang J Y. The first examples of ilexgenin A hybrids as a new class of multi-potent, anti-platelet agents[J]. Chin Chem Lett, 2013,24(8):723-726.