酸性黑木耳多糖协同抗凝血作用分析

顾嘉林，康宁，李德海，周聪，杜令娟，符群
（东北林业大学林学院，黑龙江哈尔滨 150040）

摘要：为了研究酸性黑木耳多糖（Ac-AAP）与其他多糖的抗凝血活性协同作用，选用茶多糖（TP）、红枣多糖（JP）、海藻多糖（SP）三种多糖与 Ac-AAP 分别组合，以纤维蛋白原（FIB）转化为纤维蛋白抑制率、活化部分凝血活酶时间（APTT）、凝血酶原时间（PT）和凝血酶时间（TT）为考察指标，结合 Chou-Talalay 联合指数（CI），确定 Ac-AAP 与三种多糖协同抗凝血效果。试验结果表明，组合 Ac-AAP:SP（1+2）的协同抗凝血效果最强（p<0.05），联合指数 CI 达到 0.63175。抗凝血综合评价显示，统一多糖浓度至 2.0 mg/mL，Ac-AAP:SP（1+2）各项抗凝血指标均优于其它多糖（p<0.05），其中 FIB 转化为纤维蛋白抑制率为 91.06±0.79%，血浆的 APTT 值为 95.47±0.61 s，TT 值为 62.24±0.53 s，但其对血浆 PT 值与阴性对照无显著性差异（p>0.05）。

关键词：酸性黑木耳多糖；协同作用；抗凝血活性

文章篇号：1673-9078(2017)6-45-52 DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.008

Synergistic Effect of Acidic *Auricularia auricular* Polysaccharide on Anticoagulant Activity

GU Jia-lin, KANG Ning, LI De-hai, ZHOU Cong, DU Ling-juan, FU Qun
(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: To study the synergistic effect of an acidic *Auricularia auricular* polysaccharide (Ac-AAP) with other polysaccharides on anticoagulant activity, tea polysaccharide (TP), jujube polysaccharide (JP), and seaweed polysaccharide (SP) were combined with Ac-AAP, respectively. The Chou-Talalay combination index (CI), percentage inhibition of conversion of fibrinogen (FIB) to fibrin, activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and thrombin time (TT) were used as indicators to evaluate the synergistic effect of Ac-AAP with other three polysaccharides on anticoagulant activity. The experimental results revealed that the Ac-AAP:SP (1+2) combination had the strongest anticoagulant activity (p<0.05), and the CI value was 0.63175. Comprehensive evaluation of the anticoagulant activity showed that with a polysaccharide concentration of 2.0 mg/mL, values of all anticoagulation indices of Ac-AAP:SP (1+2) were better than those of the other combinations (p<0.05); the percentage inhibition of conversion of FIB to fibrin was 91.06±0.79 %, the APTT of plasma was 95.47±0.61 s, and the TT value was 62.24±0.53 s, but the PT of plasma was not significantly different from that of saline (negative control).

Key words: acidic *Auricularia auricular* polysaccharide; synergistic action; anticoagulant activity

血栓形成是心脑血管疾病的发病基础，据统计全世界每年死于心脑血管疾病的人数高达 1500 万人，居各种死因首位[1]。现今临床上常用于治疗血栓的抗凝剂肝素是一种从动物肝脏中提取的由两种多糖交替连接而成的多聚体，属于天然抗凝血物质[2]。但因其可能会诱发机体产生血小板减少症、出血症和高血钾症等副作用而存在一定隐患，因此，从天然产物中继续探索安全、高效的抗凝血活性成分显得尤为重要[3]。

黑木耳（*Auricularia auricula*），又名黑菜、桑耳，是一种中温型的药食同源胶质菌，有“素中之荤”的美称[4]。黑木耳资源丰富，主要分布于北半球的温带和亚热带高山地区，在我国的主要产区是黑龙江、吉林、湖北、四川、贵州、陕西和云南等地，这为黑木耳的开发和利用提供了便利条件[5]。黑木耳多糖是黑木耳的主要活性成分，研究表明，黑木耳多糖具有抗辐射、抗氧化、抗肿瘤、抗凝血、降血脂和降血糖等多种生物学功能[6]。目前发现的具有抗凝血作用的天然产物有黄酮类、糖类、生物碱类以及从动物体内发现的水蛭素等[7]。其中，以糖类化合物的来源最为丰富，鼠李科、木耳科、海带科、茶科、豆科以及百合科均存

收稿日期：2016-10-18

基金项目：中央高校基本科研业务费专项资金资助（2572014CA19）；黑龙江省自然科学基金面上项目（C2015062）；黑龙江省教育厅科学技术研究项目（12543015）

作者简介：顾嘉林（1991-），女，硕士研究生，研究方向：食品化学及植物有效成分研究

通讯作者：李德海（1976-），男，副教授，硕士生导师，研究方向：食品化学及植物有效成分研究

在具备抗凝血功能特性的植物多糖[8,9]。Jin 等[10]通过对比不同分子量褐藻硫酸酯的抗凝血活性差异，推测样品的抗凝血活性与样品的分子量和半乳糖与岩藻糖的摩尔比有一定关系。王娜[11]对不同品种大枣多糖的抗凝血效果对比分析，表明大枣多糖的抗凝血效果与大枣品系存在一定相关性。李德海等[12]以酸、中、碱三种性质的溶剂分别提取黑木耳多糖，发现碱提黑木耳多糖的抗凝血活性最佳，但对其成分未做近一步的分析。

协同作用是指两种或两种以上的药物共同作用时所产生的正向效应[13]。应用协同效应可克服多糖对某一生理效应的单一效果，因此协同多糖的研究或可成为新的探究方向[14]。红藻、毛头伞、坛紫菜三种多糖以 6:6:3 比例复配对 HeLa 细胞增殖抑制率可达 76.30%，显著高于三种多糖同剂量单独使用[15]。白海娜等[16]将白藜芦醇与黑木耳多糖以 1:1 比例复配，发现复配物在对清除 ABTS 自由基的 IC_{50} 为 2.50 mg/L，而两种成分单独作用的 IC_{50} 分别为其 1.4 和 24.6 倍。何庆峰等[17]将苦瓜多糖与皂苷协同灌胃高血糖小鼠模型，发现协同组的胰岛素与超氧化物歧化酶（SOD）显著高于苦瓜多糖组与皂苷组。然而对于多糖在协同抗凝血方面的报道还未曾见到。

本实验选取了茶多糖、红枣多糖和海藻多糖三种有一定代表性的具有抗凝血活性的多糖与酸性黑木耳多糖分别组合，根据等效线图法和联合指数 CI 值分析其联合应用后的协同抗凝血效果，为天然复合抗凝血药物的研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

黑木耳（秋木耳）产自黑龙江省伊春市；茶多糖（纯度 99%）红枣多糖（纯度 50%）、海藻多糖（30%）购自郑州天海生物科技公司；健康成年雄性家兔，体重 2.5~3 kg；氢氧化钠、硫酸、苯酚、硫酸、葡萄糖和氯化钠均为国产分析纯，Tris，solarbio 公司；肝素钠（效价≥140 U/mg），solarbio 公司；活化部分凝血活酶时间（APTT）测定试剂盒（白陶土，凝固法）、凝血酶原时间（PT）测定试剂盒（冻干型，凝固法）、凝血酶时间（TT）测定试剂盒（凝固法）由上海太阳生物技术有限公司提供；凝血酶（牛血清，规格 1000 U），sigma 公司；纤维蛋白原（牛血清），sigma 公司。

1.2 仪器与设备

TGL-16G 台式离心机，上海安亭科学仪器厂；722s 分光光度计，上海第三分析仪器厂；RE-52 旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器公司；HH-4 数显恒温水浴锅，江苏省金坛荣华仪器制造有限公司；WD800 LG 烧烤型微波炉，乐金电子电器有限公司；RT-6000 酶标分析仪，深圳市雷杜生命科学股份有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 原料的预处理

将市购的黑木耳除杂烘干，粉碎，过 60 目筛。脱脂，蒸发溶剂后，得到脱脂黑木耳粉，保藏备用。

1.3.2 多糖的制备

准确称取脱脂后的黑木耳干粉，按料液比 1:100 加入 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液后，采用微波辅助技术（功率 640 W）处理 15 min，随后将其分别放入 90 ℃水浴锅继续碱液浸提 120 min，离心，过滤，得上清液。调节 pH 至中性，真空浓缩，自来水透析 24 h，蒸馏水透析 12 h，醇沉过夜，60 ℃烘干，得到 Ac-AAP，粉碎备用。采用苯酚-硫酸法，测得 Ac-AAP 纯度为 83.26±0.78%。

1.3.3 兔血浆的制备

选择健康雄性成年家兔，心脏取血，用 0.109 mol/L 的柠檬酸钠做抗凝剂（其与兔血的混合比例为 1:9），收集混合全血于塑料管中，轻轻颠倒摇匀，用 4 ℃的冷冻离心机以 3000 r/min 离心 15 min，收集上清液即血浆（黄色）。

1.3.4 Ac-AAP 与三种多糖协同抗凝血作用

由于 FIB 转化为纤维蛋白是抗凝血过程的最后阶段，故以 FIB 转化为纤维蛋白抑制率为依据，通过 Ac-AAP 与三种多糖的 IC_{50} 比值确定复配多糖的复配比例。应用药物分析软件 CalculSyn 分析 Ac-AAP 与 TP、JP 和 SP 三种多糖复配后的抗凝血效果，并以 APTT、PT、TT 和 FIB 转化为纤维蛋白的抑制率四个指标综合评价多糖协同作用后的抗凝血效果。

1.3.4.1 FIB 转化为纤维蛋白抑制率测定

根据 Yan 等[18]的方法稍作修改。准确称取纤维蛋白原（fibrinogen）、凝血酶（thrombin）和多糖样品，溶于 pH 7.4 的缓冲液（0.05 mol/L Tris-HCl 溶液，0.12 mmol/L NaCl 溶液）中，使纤维蛋白原质量浓度为 0.001 g/mL，配制多糖样品的质量浓度为 0.2 mg/mL、0.4 mg/mL、0.6 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL、1.4 mg/mL、1.6 mg/mL、1.8 mg/mL 和 2.0 mg/mL，凝血酶的活力为 20 U/mL。在 96 孔微平板的小孔中分别加入 150 μL 纤维蛋白原、50 μL 多糖、5 μL 凝血酶，混合震荡 15 s，37 ℃预热 5 min，在 405 nm 下测吸光度，每孔设置一个空白对照孔，用缓冲液代

替凝血酶作为空白对照。以多糖样品的浓度为横坐标，纤维蛋白原转化为纤维蛋白的抑制率为纵坐标作图。体系吸光度稳定后（10 min）取值，样品对纤维蛋白原转化抑制率 Y 按下式计算：

$$Y\% = \frac{A_e - A_i}{A_e - A_o} \times 100\%$$

其中 A_e 为体系稳定后，加入多糖反应体系的吸光值；A_i 为加入多糖后，反应体系的吸光值；A_o 为缓冲液代替凝血酶的空白对照。每一样品平行测 3 次，取平均值。

1.3.4.2 活化部分凝血活酶时间（APTT）测定

每瓶 APTT 试剂加入瓶标标示体积的蒸馏水，轻摇溶解成悬液。以 0.9%的生理盐水为复溶剂，将 1.3.4 中四种多糖分别配制成 4.0 mg/mL 的多糖溶液。分别取每种多糖溶液 0.1 mL，与待测血浆以 1:4 的比例混合。设立阴阳对照（阴性对照为生理盐水，阳性对照为肝素）。取混合血浆 0.1 mL，加入 37 ℃预温 APTT 试剂 0.1 mL，37 ℃孵育 5 min。加入 37 ℃预温 0.025 mol/L 溶液 0.1 mL，记录凝固时间。每组平行测 10 次。

1.3.4.3 凝血酶原时间（PT）测定

每瓶 PT 试剂加入瓶标标示体积的缓冲液，轻摇溶解。以 0.9%的生理盐水为复溶剂，将 1.3.4 中四种多糖分别配制成 4.0 mg/mL 的多糖溶液。分别取每种多糖溶液 0.1 mL，与待测血浆以 1:4 的比例混合。设立阴阳对照（阴性对照为生理盐水，阳性对照为肝素）。取混合血浆 0.1 mL，37 ℃孵育 3 min，加入 37 ℃预温 PT 试剂 0.2 mL，记录凝固时间，即为 PT 值。每组平行测 10 次。

1.3.4.4 凝血酶时间（TT）测定

每瓶 TT 试剂加入瓶标标示体积的缓冲液，静置 5~10 min，轻摇溶解。以 0.9%的生理盐水为复溶剂，将 1.3.4 中四种多糖分别配制成 4.0 mg/mL 的多糖溶液。分别取每种多糖溶液 0.1 mL，与待测血浆以 1:4 的比例混合。设立阴阳对照（阴性对照为生理盐水，阳性对照为肝素）。取 37 ℃预温混合血浆 0.2 mL（预温时间不得超过 5 min），加入 TT 试剂 0.2 mL，记录凝固时间。

1.4 统计分析

实验中的数据均平行测定 3 次，以（平均值±标准差）表示。以下数据均用 excel 2010、origin 8.0、SPSS 17.0 和 CalculSyn 等软件处理完成。

2 结果与分析

2.1 Ac-AAP 与三种多糖组合比例的确定

调控四种多糖在适当浓度范围，测定其在抗凝血系统中对 FIB 转化为纤维蛋白的抑制作用，结果如图 1 所示。

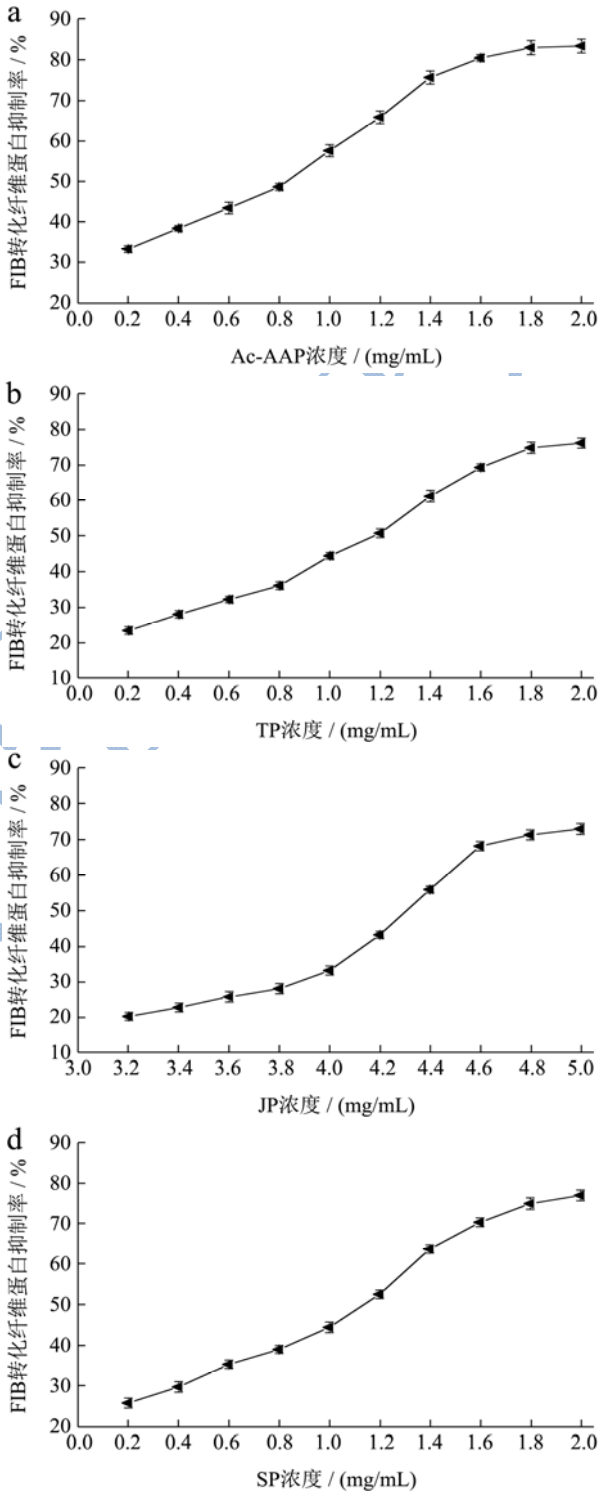


图 1 多糖浓度对 FIB 转化抑制率的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of polysaccharides on the percentage inhibition of FIB conversion

由图 1 可知，在适当的浓度范围下，四种多糖对 FIB 转化为纤维蛋白的抑制率随着多糖浓度的增加而升高，且其剂量效应关系符合“S”曲线[19]。FIB 转化为

纤维蛋白是血浆凝血过程的最终阶段[20]。当多糖浓度范围在 0.2~2.0 mg/mL 内，Ac-AAP、TP 和 SP 均表现出良好的抑制效果，而 JP 对 FIB 转化为纤维蛋白明显的抑制效果则体现在 3.2~5.0 mg/mL 这一浓度范围内，是因为较低浓度的 JP 不足以抑制凝血酶的活性，使其减缓对纤维蛋白肽的水解和对可溶性纤维蛋白的激活[21]。通过 SPSS 17.0 软件分析得到 Ac-AAP、TP、JP 和 SP 四种多糖的半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 0.742 mg/mL、1.111 mg/mL、4.821 mg/mL 和 1.059 mg/mL，由此可见四种多糖单独应用时均具有抗凝血效果，其中 Ac-AAP 最佳，SP 次之，JP 最差。

统计 TP、JP 与 SP 三种多糖在凝血系统中对 FIB 转化为纤维蛋白抑制作用的 IC_{50} 同 Ac-AAP 的比值，结果见图 2，初步确定三种多糖与 Ac-AAP 的组合比例。

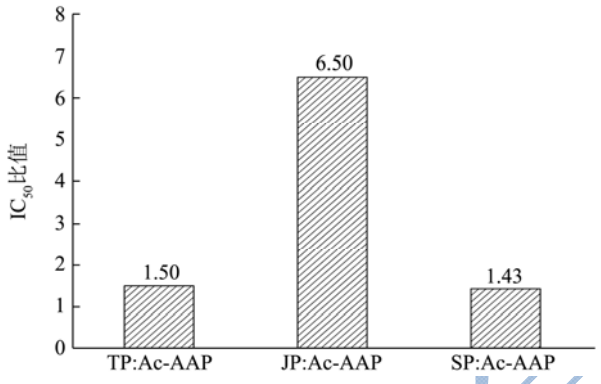


图 2 组合前三种多糖与 Ac-AAP 对 FIB 转化抑制作用的 IC_{50} 比值

Fig.2 Ratio of IC_{50} values for the inhibition of FIB conversion by three kinds of polysaccharides combined with Ac-AAP

由图 2 可知，Ac-AAP:TP≈1:1.50，Ac-AAP:JP≈1:6.50，Ac-AAP:SP≈1:1.43。为了较准确地反应药物合并用药后的相互作用，必须使两种药物效能近似[22]。因此设定：Ac-AAP+TP 的组合比为 1:1、1:2 和 1:4；Ac-AAP+JP 的组合比为 1:1、1:5 和 1:10；Ac-AAP+SP 的组合比为 1:1、1:2 和 1:4。

2.2 Ac-AAP 与 TP 对 FIB 转化抑制作用的协同效果分析

统一浓度梯度，分别测定 Ac-AAP:TP（1+1）、Ac-AAP:TP（1+2）和 Ac-AAP:TP（1+4）三种多糖样品对 FIB 转化为纤维蛋白抑制率的影响，运用等效线图解分析法初步分析 Ac-AAP 与 TP 之间的协同效果，结果见图 3。

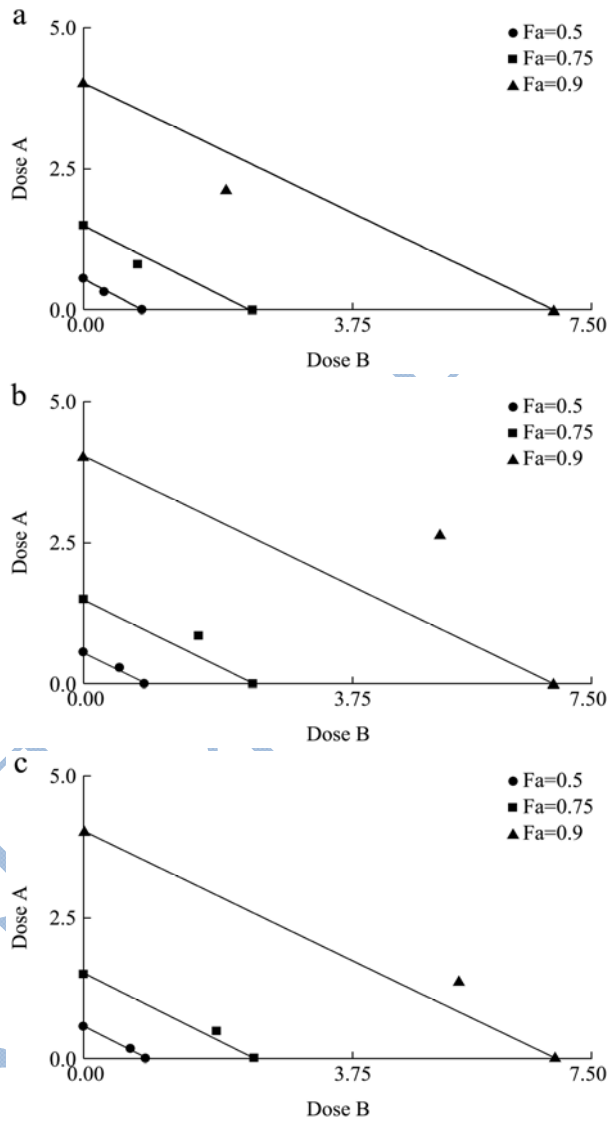


图 3 Ac-AAP 与不同浓度 TP 的抗凝血效果分析

Fig.3 Analysis of anticoagulant effects of the combinations of Ac-AAP and different concentrations of TP

注：a，1:1；b，1:2；c，1:4。

由图 3a 所示，TP 与 Ac-AAP 的组合比例为 1:1 时，合用后的效应点均落在等效线左侧，则说明多糖样品 Ac-AAP:TP（1+1）可协同抑制血浆的凝血过程。在图 3b 和 c 中，Ac-AAP 与 TP 以 1:2 和 1:4 比例组合时，三条等效线显示合用后的效应点均落在直线右侧，说明多糖样品 Ac-AAP:TP（1+2）和 Ac-AAP:TP（1+4）对 FIB 转化为纤维蛋白的抑制作用低于两种多糖的单独应用，即对血浆的凝血过程表现为拮抗作用[23]。推测组合后 Ac-AAP:TP（1+1）的阴离子较多，与带负电荷的血液产生静电排斥作用会间接阻滞了纤维蛋白原的转化，从而延迟凝血过程。而当 TP 的比例增加，系统产生较多的阳离子反而与血液相互吸引，加快纤维蛋白原向纤维蛋白的转化，促进凝血过程的产生。

2.3 Ac-AAP 与 JP 对 FIB 转化抑制作用的协同效果分析

统一浓度梯度，分别测定三种多糖样品 Ac-AAP:JP（1+1）、Ac-AAP:JP（1+5）、Ac-AAP:JP（1+10）对 FIB 转化为纤维蛋白抑制率的影响，运用等效线图解分析法初步分析 Ac-AAP 与 JP 之间的协同效果，结果见图 4。

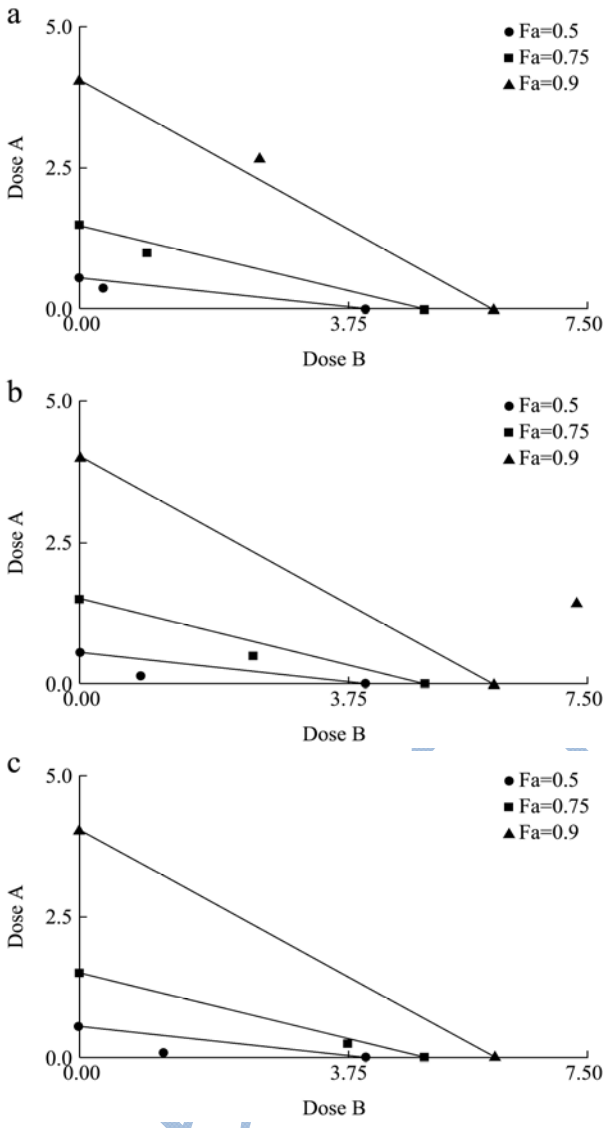


图 4 Ac-AAP 与不同浓度 JP 的抗凝血效果分析

Fig.4 Analysis of anticoagulant effects of the combinations of Ac-AAP and different concentrations of JP

注：a，1:1；b，1:5；c，1:10。

由图 4 可得，虽然在抑制率为 50%和 75%的等效线上，Ac-AAP:JP（1+1）、Ac-AAP:JP（1+5）和 Ac-AAP:JP（1+10）三种样品的效应点均落在等效线的左侧，即对抗凝血效果表现出一定的协同作用，但在抑制率为 90%的等效线上，三种多糖的效应点却落在等效线右侧，即联用多糖 Ac-AAP:JP（1+1）、Ac-AAP:JP（1+5）和 Ac-AAP:JP（1+10）对血浆的抗凝过程表现为拮抗作用[24]。表明 Ac-AAP 与 JP 组合后的电荷空间不稳定，对血浆不能产生单一方向的作用。因此，综合考虑，不选 Ac-AAP 与 JP 组合参与后续实验。

2.4 Ac-AAP 与 SP 对 FIB 转化抑制作用的协同效果分析

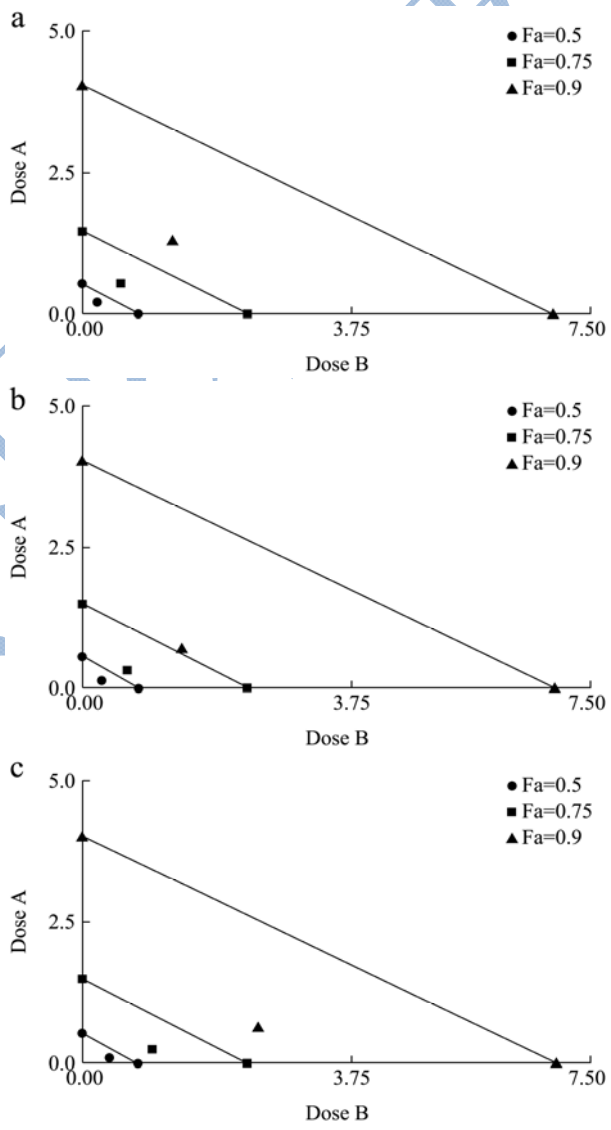


图 5 Ac-AAP 与不同浓度 SP 的抗凝血效果分析

Fig.5 Analysis of anticoagulant effects of the combinations of Ac-AAP and different concentrations of SP

注：a，1:1；b，1:2；c，1:4。

统一浓度梯度，分别测定三种多糖样品 Ac-AAP:SP（1+1）、Ac-AAP:SP（1+2）和 Ac-AAP:SP（1+4）对 FIB 转化为纤维蛋白抑制率的影响，采用等效线图解分析法初步分析 Ac-AAP 与 SP 之间的协

同效果，结果见图 5。

由图 5 可知，Ac-AAP:SP(1+1)、Ac-AAP:SP(1+2)和 Ac-AAP:SP（1+4）三种多糖样品对 FIB 转化为纤维蛋白抑制率的效应点均位于抑制率为 50%、75%和 90%三种等效线的左侧，即联用多糖 Ac-AAP:SP（1+1）、Ac-AAP:SP（1+2）和 Ac-AAP:SP（1+4）均可协同抑制血浆的凝血过程[25]。表明三种比例的协同组合均可为血液提供足够的携带阴离子的基团以维持其与血液组分的静电排斥作用，在这种情况下，一方面纤维蛋白原和血小板的吸附量会减少，另一方面，凝血因子被激活的频率会降低，从而延迟了凝血过程的发生。

2.5 Ac-AAP 协同抗凝血效果比较分析

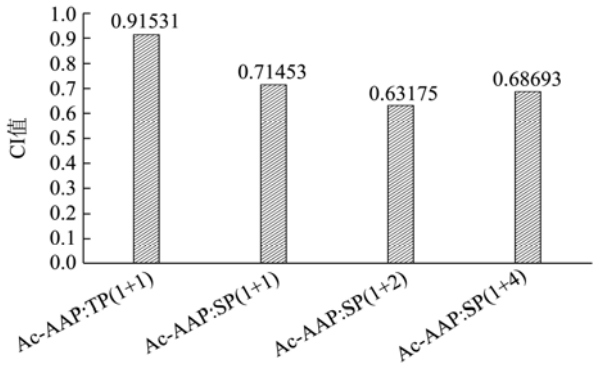


图 6 四种协同复配物间联合指数 CI 的比较分析

Fig.6 Comparative analysis of CIs of the four combinations with synergistic action

综上所述，在以上几种组合中对抑制血浆凝血过程可起到协同作用的组合有四种，分别为：Ac-AAP:TP（1+1）、Ac-AAP:SP（1+1）、Ac-AAP:SP（1+2）、Ac-AAP:SP（1+4），其联合指数 CI 见图 6。

CI 值是衡量药物之间相互作用强度和性质的指标（CI>1 为拮抗作用，CI=1 为相加作用，CI<1 为协同作用）[26]。图 6 所示四种协同组合中 Ac-AAP:SP（1+2）和 Ac-AAP:SP（1+4）在抗凝血活性方面的协同作用相对较强，但以 Ac-AAP:SP（1+2）最佳（p<0.05），Ac-AAP:TP（1+1）最差。

2.6 Ac-AAP 协同抗凝血效果验证分析

将四种协同组合的浓度统一至 2.0 mg/mL，分别测定其 APTT、PT、TT 值以及 FIB 转化为纤维蛋白原抑制率，并与 Ac-AAP、TP、SP 三种多糖单独作用时血浆的 APTT、PT、TT 值和 FIB 转化为纤维蛋白抑制率做比较，结果见表 1。

血液的凝固过程可分为三个阶段即凝血酶原复合物的生成，凝血酶原的激活以及纤维蛋白的生成。其中，第一阶段属于内源性途径，第二阶段是外源性途径，而最终阶段构成血液凝固过程的共同途径[27]。血液凝固的实质就是血浆中的可溶性纤维蛋白原变成不可溶的纤维蛋白的过程[28]。由表 1 可得，无论是协同多糖还是单一多糖均可显著性延长血浆的 APPT 和 TT 值（p<0.05），但不同的多糖样品加入血浆后其 PT 值与阴性对照无显著性差异（p>0.05），因此，可推断表 1 中的单一多糖和协同多糖均是通过内源性途径和共同途径来影响血浆抗凝血过程的[29]。FIB 向纤维蛋白的转化是血浆凝血过程的最终阶段，协同多糖相较于单一多糖其对血浆的 APTT 值、TT 值和 FIB 转化纤维蛋白抑制率均有显著性提高（p<0.05）。

表 1 多糖的抗凝血效果

Table 1 Anticoagulant effects of four polysaccharides

组别	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB 转化抑制率/%
Ac-AAP	59.88±0.66^{f}	18.33±0.45^{a}	45.31±079^{e}	83.32±0.51^{e}
TP	43.94±0.43^{h}	19.24±0.73^{a}	33.42±0.15^{g}	74.13±0.67^{g}
SP	48.31±0.31^{g}	18.33±0.58^{a}	39.81±0.23^{f}	76.89±0.35^{f}
Ac-AAP:TP(1+1)	78.59±0.81^{e}	18.33±0.39^{a}	47.54±0.84^{d}	84.70±0.52^{d}
Ac-AAP:SP(1+1)	85.15±1.03^{d}	18.29±0.52^{a}	53.60±0.82^{c}	86.62±0.63^{c}
Ac-AAP:SP(1+2)	95.47±0.61^{b}	18.74±0.78^{a}	62.24±0.53^{a}	91.06±0.79^{a}
Ac-AAP:SP(1+4)	91.23±0.59^{c}	18.58±0.62^{a}	56.71±0.76^{b}	88.63±0.71^{b}
阴性对照（0.9%生理盐水）	35.27±0.31^{i}	18.46±0.53^{a}	18.79±0.57^{h}	-
阳性对照（0.5 mg/mL 肝素）	135.56±0.97^{a}	19.11±0.19^{a}	不凝固	-

注：数值表示为均值±标准差，不同小写字母表示同一列比较具有显著性差异（p<0.05）。

在 Ac-AAP:TP（1+1）、Ac-AAP:SP（1+1）、Ac-AAP:SP（1+2）和 Ac-AAP:SP（1+4）四种协同多糖中，以 Ac-AAP:SP（1+2）对血浆的 APTT、TT 值延长效果最明显（p<0.05），对 FIB 转化纤维蛋白的抑制率也最大（p<0.05），这进一步验证了协同多糖 Ac-AAP:SP（1+2）的抗凝血效果最佳（p<0.05），当

多糖浓度为 2.0 mg/mL 时，其对 APTT 值的延长效果 0.67 倍 0.5 mg/mL 的肝素，可达 95.47±0.61 s，TT 值 62.24±0.57 s，此时对 FIB 转化为纤维蛋白的抑制率达到 91.06±0.79%。

3 结论

Ac-AAP、TP、JP 和 SP 还有抗凝血的常用药物肝素均是通过影响血浆的内源性途径和共同途径来完成抗凝血过程的。Ac-AAP 与 JP 组合后对血浆的凝血过程产生拮抗作用，而 Ac-AAP 与 TP 和 SP 组合后对血浆的凝血过程产生协同增效作用，其中 Ac-AAP:SP（1+2）的协同效果最佳，联合指数 CI 值为 0.63175，可使血浆的 APTT 值达到 95.47±0.61 s，相当于 0.67 倍 0.5 mg/mL 的肝素。TT 值 62.24±0.57 s，对 FIB 转化为纤维蛋白的抑制率达到 91.06±0.79%。

参考文献

[1] 毛威.血栓事件中西医结合防治现状及展望[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(5):449-453
MAO Wei. Research status and prospects of traditional Chinese and western medicine in thrombosis treatment. [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, 2016, 14(5): 449-453

[2] Lord M S, Cheng B, Tang F, et al. Bioengineered human heparin with anticoagulant activity [J]. Metabolic Engineering, 2016, 38: 105-114

[3] 康彩练,华尉利.新型抗凝血药物的临床研发和评价要点[J].中国新药杂志,2012,15:1711-1717
KANG Cai-lian, HUA Wei-li. Clinical development and evaluation of new anticoagulants [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2012, 15: 1711-1717

[4] 许海林,吴小勇,聂少平,等.黑木耳多糖提取工艺优化及其对小鼠巨噬细胞功能的影响[J].食品科学,2016,37(10): 100-104
XU Hai-lin, WU Xiao-yong, NIE Shao-ping, et al. Optimization of extraction conditions of crude polysaccharide from *Auricularia auricular* and its effects on the functions of mouse peritoneal macrophages [J]. Food Science, 2016, 37(10): 100-104

[5] 王波,马琪,麻鑫,等.黑木耳多糖提取物对肝纤维化大鼠肝功能及 MPO,MDA,TGF-β 的影响[J].现代生物医学进展,2016, 16(19):3638-3641
WANG Bo, MA Qi, MA Xin, et al. Effects of *Auricularia* auricula-judae extract on liver function and MPO MDA and TGF-β of rats with hepatic fibrosis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(19): 3638-3641

[6] 刁毅,刘涛,韩洪波.不同地区地木耳多糖红外光谱与抗氧化活性研究[J].湖北农业科学,2016,55(4):984-987,996
DIAO Yi, LIU Tao, HAN Hong-bo. Study on FT-IR and anti-oxidative activity of polysaccharides in *Nostoc commune* of different districts [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2016, 55(4): 984-987, 996

[7] 杨澍,史海雯,高秀清,等.天然产物抗凝血作用研究进展[J].天津中医药,2014,5(31):318-320
YANG Shu, SHI Hai-wen, GAO Xiu-qing, et al. Advances in anticoagulant effects of natural products [J]. Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014, 5(31): 318-320

[8] 程皓,王天亮.黑木耳抗凝、抗栓功能综述[J].黑龙江科学,2015,15:16-17
CHENG Hao, WANG Tian-liang. Advances of anti-coagulation and antithrombotic from *Auricularia auricular* [J]. Heilongjiang Science, 2015, 15: 16-17

[9] 鄢文霞,陈超.植物多糖抗凝血、抗血栓的药理学研究进展[J].医学信息,2013,26(4):569-570
YAN Wen-xia, CHEN Chao. Recent studies on the anticoagulation and antithrombosis pharmacology of polysaccharides in China [J]. Journal of Biology, 2013, 26(4): 569-570

[10] Jin W, Zhang Q, Wang J, et al. A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 91(1): 1-6

[11] 王娜,冯艳风,范会平,等.大枣粗多糖体外抗凝血活性的差异化研究[J].中国食品学报,2013,13(12):34-39
WANG Na, FENG Yan-feng, FAN Hui-ping, et al. Study on the difference of anticoagulant activity *in vitro* of crude polysaccharide of jujube [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(12): 34-39

[12] 李德海,史锦硕,周聪,等.黑木耳多糖的制备及其抗凝血功能的研究[J].安徽农业科学,2015,2:283-285
LI De-hai, SHI Jin-shuo, ZHOU Cong, et al. Preparation of polysaccharides from *Auricularia auricular* and analysis of their anticoagulant function [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 2: 283-285

[13] 张海燕,李晓晴,张晶.我国药物研发协同创新机制初探[J].中国新药杂志,2016,17:1928-1932
ZHANG Hai-yan, LI Xiao-qing, ZHANG Jing. Comments on collaborative innovation mechanism in drug research and development [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2016, 17: 1928-1932

[14] 叶伶艳,任明,吕琳,等.多糖合剂的制备及体外间接抗肿瘤

活性[J].吉林大学学报(医学版),2014,40(5):1033-1037
YE Ling-yan, REN Ming, LV Lin, et al. Preparation of polysaccharide complex and indirect antitumor activity *in vitro* [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2014, 40(5): 1033-1037

[15] 谢好贵,韦明钎,陈美珍,等.3 种多糖复合体外抗肿瘤协同增效作用[J].食品科学,2013,34(15):289-294
XIE Hao-gui, WEI Ming-qian, CHEN Mei-zhen, et al. Synergistic antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from three different matrices [J]. Food Science, 2013, 34(15): 289-294

[16] 白海娜,王振宇,刘瑞海,等.白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J].现代食品科技,2014,3:64-68
BAI Hai-na, WANG Zhen-yu, LIU Rui-hai, et al. Synergistic ABTS radical scavenging activity of resveratrol with *Auricularia auricular* polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 3: 64-68

[17] 何庆峰,刘金福,尤玲玲,等.苦瓜多糖与皂苷对高血糖协同预防作用机制研究[J].食品与机械,2010,26(5):91-93
HE Qing-feng, LIU Jin-fu, YOU Ling-ling, et al. Study on synergy preventive effect of polysaccharide and saponin extracted from *Momordica* on hyperglycemia induced by *Streptozotocin* [J]. Food & Machinery, 2010, 26(5): 91-93

[18] Yang W G, Wang Z, Xu S Y. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader [J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18(4): 449-451

[19] Sathler P C, Lourenço A L, Miceli L A, et al. Structural model of haptoglobin and its complex with the anticoagulant ecotin variants: structure-activity relationship study and analysis of interactions [J]. Journal of Enzyme Inhibition & Medicinal Chemistry, 2014, 29(2): 256-262

[20] Dobrovolskaia M A. Nanoparticles and the blood coagulation system [J]. Nanomedicine, 2015, 8(6): 969-81

[21] Zavyalova E, Kopylov A. How does association process affect fibrinogen hydrolysis by thrombin? [J]. Biochimie, 2014, 107 Pt B: 216-222

[22] 安静,赵博琛,吴清,等.当归提取物配伍应用对小鼠结直肠癌的预防作用[J].北京中医药大学学报,2014,37(5):309-313
AN Jing, ZHAO Bo-chen, WU Qing, et al. Preventive effect of combined administration of extracts from Danggui (*Radix Angelicae Sinensis*) on colorectum cancer in mice [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 37(5): 309-313

[23] 皮卓,李琳娜,杨德宣,等.Loewe 等效线法计算盐霉素和索拉非尼合用抑制人肺腺癌细胞 A549 生长的协同相加和拮抗浓度范围[J].解放军药学学报,2016,4:293-298
PI Zhuo, LI Lin-na, YANG De-xuan, et al. Concentration range of synergism addition and antagonism of combination of salinomycin and sorafenib for inhibition of human lung cancer cell A549 calculated with loewe isobologram method pharmaceutical journal of Chinese people's liberation army [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2016, 4: 293-298

[24] 刘玉庆,胡明,刘焕奇,等.表征抗菌药物抑菌动力学的等效线药敏试验方法[J].中国科学:生命科学,2015,6:614-622
LIU Yu-qing, HU Ming, LIU Huan-qi, et al. Antibiotic susceptibility test to characterize the antimicrobial dynamics of antibiotic concentration by isobiologram [J]. Scientia Sinica (Vitae), 2015, 6: 614-622

[25] Dirkmann D, Britten M W, Pauling H, et al. Anticoagulant effect of sugammadex: Just an *in vitro* artifact. [J]. Anesthesiology, 2016, 124(6): 1277-1285

[26] Ashton J C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method-letter. [J]. Cancer Research, 2015, 75(11): 2400

[27] Pavlova J, Fasano A, Sequeira A. Numerical simulations of a reduced model for blood coagulation [J]. Zeitschrift Für Angewandte Mathematik Und Physik Zamp, 2016, 67(2): 1-20

[28] Qi X, Mao W, Gao Y, et al. Chemical characteristic of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide from *Enteromorpha clathrata* [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(4): 1804-1810

[29] Maksimova V. Electrochemical evaluation of the synergistic effect of the antioxidant activity of capsaicin and other bioactive compounds in *Capsicum* sp. extracts [J]. Electrochemical Science, 2016: 6673-6687