

白底辐肛参多糖的抗凝血特性研究

耿安静, 陈健, 朱良

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 对昆明小鼠和新西兰兔进行不同剂量的白底辐肛参多糖 AMP 的注射喂养及空白试验, 然后用断尾法测定小鼠的出血时间和凝血时间, 并测定新西兰兔耳静脉血静脉凝血时间, 数据经统计处理、方差分析和 t 检验后, 得出 AMP 具有抗凝血作用, 能够显著延长凝血时间。

关键词: 白底辐肛参多糖 (AMP); 抗凝血; 动物实验

中图分类号: R973; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0524-03

Blood Anticoagulation Activity of Polysaccharides from *Actinopyga mauritiana*

GENG An-jing, CHEN Jian, ZHU Liang

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Kunming mice and New Zealand rabbits were feeding with different dosage of *Actinopyga mauritiana* (AMP) by injection. Then the bleeding time and clotting time (CT) of mice were determined by cutting off their tails. The CT of the venous blood of New Zealand rabbit ear was also detected. Results showed that AMP had high blood anticoagulation activity, which could significantly prolong the CT.

Key words: *Actinopyga mauritiana* polysaccharides (AMP); anticoagulated blood; animal experiment

白底辐肛参 (*Actinopyga mauritiana*) 属棘皮动物门海参纲, 楯手目海参科, 辐肛参属, 又称白底靴参、赤瓜参、靴海参、黄玉参等, 广泛分布于印度洋及西太平洋地区^[1]。目前已证明了刺参多糖和玉足海参多糖的抗凝血作用^[2-8], 但对白底辐肛参多糖 (AMP) 的抗凝血作用, 目前仍未有报道。

本实验通过木瓜蛋白酶酶解法提取白底辐肛参多糖, 并以 H₂O₂ 脱色、乙酸钾沉淀法除蛋白、SepHadex G-200 柱层析纯化多糖, 冷冻干燥后通过动物实验测定其抗凝血时间, 在对白底辐肛参多糖的抗凝血作用作了初步评价, 为充分地发挥白底辐肛参多糖治疗和保健作用提供实验参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

白底辐肛参多糖, 实验室自制; 0.9%生理盐水, 实验室自制。

收稿日期: 2008-01-16

作者简介: 耿安静, 女, 在读硕士生, 主要从事食品化学方面的研究工作

通讯作者: 陈健, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学和生物分离技术方面的研究工作

1.1.2 实验动物

昆明小鼠: 40 只, 全雄性, 体重 25.12±1.43 g, 由广东省医学实验动物中心提供。

新西兰兔: 1 只, 雄性, 体重 2.5 kg, 由广东省医学实验动物中心提供。

1.2 动物模型的建立及分组

昆明小鼠 40 只, 每组 10 只, 分作 4 组, 即空白对照组 (每日腹部注射 0.1 mL 0.9%生理盐水), AMP 小剂量对照组 (每日腹部注射 0.1 mL 1 mg/mL 白底辐肛参多糖), AMP 中剂量对照组 (每日腹部注射 0.1 mL 3 mg/mL 白底辐肛参多糖), AMP 大剂量对照组 (每日腹部注射 0.1 mL 9 mg/mL 白底辐肛参多糖), 进行观察。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠出血时间测定

小鼠断尾法。各组连续腹部注射 12 d 后, 将小鼠固定, 以手术剪剪去小鼠尾部尖端 3 mm, 待血液自行溢出开始计时, 每隔 30 s 用滤纸吸去血液 1 次, 直至血液自然停止、以滤纸吸收时无血为结束时间, 记作出血时间 (s)。

1.3.2 小鼠凝血时间测定

(1) 毛细玻璃管法。各组小鼠连续腹部注射 12 d

后,以眼科镊子掀开眼皮,毛细管迅速刺入内眦取血,自血液进入毛细管开始计时,毛细管充满时离开,每隔 15 s 从一端断开毛细管一次,每次约 5 mm,当毛细管内血液出现丝状物时计时结束,记作凝血时间(s)。

(2) 玻片法。各组小鼠连续腹部注射 12 d 后,以针头刺入小鼠内眦使血液流出,用干棉球擦去第 1 滴血,再分别滴血于清洁载玻片两端,血液直径约 5~10 mm,计时,每隔 15 s 以干燥针头挑动血液 1 次,至针头能挑起纤维蛋白丝时计时结束,记作凝血时间(s);另 1 滴血供重复试用。

1.3.3 兔凝血时间测定

取 40 支试管,每组 10 支,分作 4 组,即空白对照组、AMP 小剂量对照组、AMP 中剂量对照组、AMP 大剂量对照组。

分别取 0.1 mL 0.9%生理盐水加入空白对照组各试管中,0.1 mL 1 mg/mL AMP 加入低剂量组各试管中,0.1 mL 3 mg/mL AMP 加入中剂量组各试管中,0.1 mL 9 mg/mL AMP 加入高剂量组各试管中。

将新西兰兔耳静脉取得的血液滴入试管中,每个试管加入约 0.5 mL,轻轻混匀并计时,每隔 30 s 倾斜试管 1 次,观察表层血液是否沿试管移动,至凝固时停止计时,记作体外凝血时间(s)。

1.3.4 数据统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件包统计,数据用均数±标准差($\bar{X} \pm s$)表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较用方差分析,以 $p < 0.05$ 为统计学差异标准。

2 结果与分析

2.1 不同剂量 AMP 注射对出血时间的影响

小鼠断尾法测定不同剂量 AMP 注射对出血时间的影响如表 1 所示。

表 1 注射不同剂量的 AMP 对小鼠出血时间的影响

($\bar{X} \pm s$, n=10)

Table 1 Effects of injection doses of AMP on the bleeding time of mice (n=10)

组别	小鼠出血时间/s
空白对照组	651.00±27.00 ^b
低剂量组	669.00±27.00 ^b
中剂量组	888.00±36.00 ^a
高剂量组	1128.00±50.56 ^a

注:与空白对照组比较 ^a $p < 0.01$, ^b $p > 0.05$ 。

由表 1 可知,低剂量组动脉出血时间相对于空白对照组,动脉出血时间为空白对照组的 1.03 倍,出血

时间延长不明显;中剂量组相对于空白对照组,动脉出血时间为空白对照组的 1.36 倍;高剂量组相对于空白对照组,动脉出血时间为空白对照组的 1.73 倍。结果表明,和空白对照组相比,低剂量组小鼠出血时间有所增加,但差异无显著性 ($p > 0.05$);中剂量组、高剂量组的 AMP 出血时间显著增加,与低剂量组和空白对照组相比,差异均具有显著性 ($p < 0.01$)。可见中剂量、高剂量的 AMP 均能够显著延长小鼠动脉出血时间。

2.2 不同剂量的 AMP 对小鼠凝血时间的影响

小鼠凝血时间测定结果如表 2 所示。

表 2 注射不同剂量的 AMP 对小鼠凝血时间的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=10)

Table 2 Effects of injection doses of AMP on the CT of mice (n=10)

组别	小鼠凝血时间(s)	
	毛细玻璃管法	玻片法
空白对照组	88.50±10.50 ^b	89.50±8.79 ^b
低剂量组	94.50±15.07 ^b	96.00±12.00 ^b
中剂量组	111.00±12.00 ^a	121.50±10.50 ^a
高剂量组	165.00±36.74 ^a	169.50±13.50 ^a

注:与空白对照组比较 ^a $p < 0.01$, ^b $p > 0.05$ 。

由表 2 可知,两种方法所得的低剂量组相对于空白对照组,凝血时间分别为空白对照组的 1.07 倍、1.07 倍,凝血时间延长不显著;中剂量组相对于空白对照组,凝血时间分别为空白对照组的 1.25 倍、1.35 倍;高剂量组相对于空白对照组,凝血时间分别为空白对照组的 1.86 倍、1.88 倍。结果表明,和空白对照组相比,低剂量组小鼠凝血时间有所增加,但差异无显著性 ($p > 0.05$);中剂量组、高剂量组的 AMP 凝血时间显著增加,与低剂量组和空白对照组相比,差异均具有显著性 ($p < 0.01$)。可见中剂量、高剂量的 AMP 均能够显著延长小鼠凝血时间。

2.3 不同剂量的 AMP 对兔凝血时间的影响

新西兰兔耳静脉血静脉凝血时间测定结果如表 3 所示。

由表 3 可知,低剂量组凝血时间相对于空白对照组,凝血时间为空白对照组的 1.09 倍,凝血时间延长不显著;中剂量组相对于空白对照组,凝血时间为空白对照组的 1.31 倍;高剂量组相对于空白对照组,凝血时间为空白对照组的 1.82 倍。结果表明,和空白对照组相比,低剂量组新西兰兔凝血时间有所增加,但差异无显著性 ($p > 0.05$);中剂量组、高剂量组的 AMP 凝血时间显著增加,与低剂量组和空白对照组相比,差异均具有显著性 ($p < 0.01$)。可见中剂量、高剂量的

AMP 均能够显著延长兔凝血时间。

表3 不同剂量的AMP对兔凝血时间的影响 ($\bar{X} \pm s$, n=10)

Table 3 Effect of AMP dosage on the coagulant time of rabbits (n=10)

组别	兔凝血时间(s)
空白对照组	135.00±15.00 ^b
低剂量组	147.00±21.00 ^b
中剂量组	177.00±24.92 ^a
高剂量组	246.00±29.39 ^a

注: 与空白对照组比较 ^a $p < 0.01$, ^b $p > 0.05$ 。

3 讨论

出血时间和凝血时间是评价抗凝血的关键指标。本研究中 MAPM 各剂量均能延长小鼠和兔的凝血时间, 其中以高、中剂量组最为明显 ($p < 0.01$), 说明 MAPM 能延长血液的凝固时间, 表现出良好的抗凝血特性。

综合以上 2.1、2.2、2.3 结论表明, MAPM 在高 ($9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中剂量 ($3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 用量下, 能显著延长血液的凝固时间, 抗凝血方面具有明显的效果, 而且, 其抗凝血的效果具有剂量的依赖性关系, 高、中剂量 MAPM 抗凝血作用最强, 低剂量次之。

AMP 具有抗凝血作用, 这可能是由于白底辐肛参多糖使血小板聚集性增高, 导致血小板聚集增多, 致使血小板自发性聚集, 在血循环中的血小板凝集体不能通过脏器和组织中的毛细血管而被扣下, 出现血小板减少^[9]。

目前对白底辐肛参的研究较少, 通过对其多糖抗凝血作用的研究, 相信对这种可药可食的海产品的使用会有所裨益, 它可作为药食两用品, 对预防和治疗

血栓类疾病有着十分重要的意义。随着人们对白底辐肛参的不断深入研究和认识, 以白底辐肛参为主或以白底辐肛参有效成分为主的药品及功能性食品的开发, 将成为综合利用白底辐肛参资源及提高产品科技含量的重要发展趋势之一。

参考文献

- [1] 温尚开,等.广西常见海参种类的鉴定[J],中药材,1994, 17(10):16
- [2] 樊绘曾,等.玉足海参酸性多糖的研究[J].药学学报.1983, 18(3): 203- 208
- [3] 马西. 刺参酸性粘多糖抑制凝血酶生成的作用方式[J].中华血液学杂志. 1990, 11(5): 237-240
- [4] 高存记,等.刺参酸性粘多糖对纤维蛋白凝胶结构及其溶解性的影响[J].中华血液学杂志,1996,17(9):458-461
- [5] Pacheco RG, Viente CP, Zancan P, et al. Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm[J]. Blood Coagul Fibrinolysis. 2000, 11(6): 563-570
- [6] Mourao PA, Giumaraes B, Mulloy B. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action[J]. Br J Haematol.1998,101(4): 647-654
- [7] Li Z, Wang H, Li J. Basic and clinical study on the antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan extracted from the sea cucumber[J]. Chin Med J. 2000, 113(8): 706-718
- [8] 张佩文,骆苏芳,等.玉足海参酸性粘多糖的抗凝血作用[J].中国药理学与毒理学杂志. 1988, 5(2): 98-101
- [9] 闫冰,等.海参多糖的生物活性研究概况.药物实践杂志[J]. 2004, 22(2): 101-103