

葶苈子炭新型纳米类成分的发现及其止血机制研究

赵玉升^{1#}, 田雨^{1#}, 李伟洋¹, 陈玉民¹, 曹天佑², 赵亚芳¹,
李郁茹², 屈会化^{3*}, 赵琰^{1*}

(1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029;
3. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029)

摘要: 在葶苈子炭中提取分离出一种新型纳米类成分, 并通过药理实验研究其止血机制。利用马弗炉制备 250 °C、300 °C 和 350 °C 的葶苈子炭, 通过提取分离方法获得各温度下的葶苈子炭透析液, 利用低分辨透射电镜 (TEM) 和高分辨透射电镜 (HR-TEM) 对该纳米类成分进行表征, 利用紫外光谱 (UV-Vis)、荧光光谱 (FL) 和红外光谱 (FTIR) 测定其光学特征及官能团信息, 利用小鼠肝脏出血实验评价其止血效果, 进一步检测凝血 4 项参数和血小板 (PLT) 的数量来研究其机制。所有动物实验均符合北京中医药大学伦理委员会的规定。TEM 结果显示, 葶苈子炭袋内透析液中存在一种新型纳米类成分, 并命名为葶苈子炭纳米类成分 (DSC-NCs)。小鼠肝脏出血实验结果表明, 250 °C、300 °C 和 350 °C 制备的 DSC-NCs 都能够降低小鼠肝脏出血时间, 其中, 以 350 °C 制备的 DSC-NCs 效果最好。此外, 各温度制备的 DSC-NCs 也能够不同程度地降低凝血酶原时间 (PT) 值、升高纤维蛋白原 (FIB) 值和 PLT 值。综上, DSC-NCs 有一定的止血效果, 这可能与激活外源凝血系统、提高 FIB 值及 PLT 含量有关, 这为探索出血性疾病治疗药物提供了新的研究方向, 也为 DSC-NCs 在医学领域的潜在应用提供了新的视角。

关键词: 葶苈子炭; 纳米类成分; 表征; 止血作用; 机制

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)02-0492-08

Nano-components derived from *Descurainiae Semen Carbonisatum* and its hemostatic mechanism

ZHAO Yu-sheng^{1#}, TIAN Yu^{1#}, LI Wei-yang¹, CHEN Yu-min¹, CAO Tian-you², ZHAO Ya-fang¹,
LI Yu-ru², QU Hui-hua^{3*}, ZHAO Yan^{1*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: A novel sort of nano-component was extricated and isolated from *Descurainiae Semen Carbonisatum* (DSC), and its hemostatic component was considered through pharmacological experiments. A muffle furnace was used to prepare DSC at 250 °C, 300 °C and 350 °C, and the DSC dialysate at each temperature was obtained by the extraction and separation method. Low-resolution transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution transmission electron microscopy (HR-TEM) were utilized to characterize the nano-components. Ultraviolet spectroscopy (UV-Vis), fluorescence spectroscopy (FL) and infrared spectroscopy (FTIR) were utilized to measure its optical characteristics and functional group information. The anti-hemorrhagic effects were evaluated by liver

收稿日期: 2021-06-03; 修回日期: 2021-07-09.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2019-JYB-TD-001).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 86-10-64286705, E-mail: quhuihuadr@163.com; zhaoyandr@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0824

bleeding tests and the related hemostatic mechanisms of the obtained nano-components were further assessed by detecting blood coagulation and PLT quantity to discuss the hemostasis mechanism. The experiments complied with the Animal Ethics Committee of Beijing University of Chinese Medicine. TEM results showed that there was a novel type of nano-component in the DSC dialysate bag, which was named DSC nano-components (DSC-NCs). The experimental results of liver bleeding in mice showed that DSC-NCs prepared at 250 °C, 300 °C, and 350 °C could reduce the bleeding time of mice liver. Among them, DSC-NCs prepared at 350 °C had the best effect. In addition, DSC-NCs prepared at various temperatures can also reduce the prothrombin time (PT) value, increase the fibrinogen (FIB) value and the platelet (PLT) value to varying degrees. DSC-NCs have a certain hemostatic effect, which may be related to the activation of the exogenous coagulation system, the increase of FIB value and the increase of platelet content. This provides a new research direction for exploring the treatment of bleeding diseases, and provides a new perspective for the potential application of DSC-NCs in the medical field.

Key words: *Descurainiae Semen Carbonisatum*; nano-component; characterization; hemostasis; mechanism

葶苈子系十字花科植物播娘蒿 *Descurainia Sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 或独行菜 *Lepidium apetalum* Willd. 的干燥成熟种子, 性辛、苦, 大寒, 归肺、膀胱经, 具有泻肺平喘, 行水消肿之功效, 常用于痰涎壅肺、咳嗽痰多、胸腹水肿和小便不利等病症^[1]。炭药作为一类具有特殊功效的中药炮制品, 在历代中医用药中占有十分重要的地位, 更是为临床医家所重视, 并逐渐形成了以治疗出血性疾病为主的独特的中药炭药理论, 并为临床实践所证实^[2]。葶苈子本身不具备止血的药效, 作为其炮制品, 葶苈子炭在经过高温炭化过程中的止血功效变化引发了研究者的思考。许多学者试图从小分子或金属离子的角度来阐述炭药的止血物质基础, 如黄酮类化合物含量的改变进而发挥凉血止血作用、钙离子的变化起到了止血作用^[3-5], 但这些研究结果并不足以解释中药炒炭后具有止血这一共性现象。因此, 本课题组将注意力转向纳米材料学, 基于纳米技术来研究葶苈子炭炮制加工后的物质基础变化。

高温炭化是葶苈子炭的关键制备工艺之一, 这与目前材料学中碳量子点的制备过程相似, 碳量子点是一种尺寸小于 10 nm 的准球形碳颗粒, 具有低毒性、生物相容性好、可调节的化学特性、光稳定性和优良的水分散性等优点^[6,7], 其在医学上的生物活性如抑菌、抗病毒^[8]、抗痛风^[9]、抗胃溃疡^[10]和抗肿瘤^[11]等已经得到证实, 引起了众多学者的关注与研究。

本实验从纳米材料学的角度出发, 从葶苈子炭的水提液中发现了类似材料学中碳量子点的纳米类成分, 并进一步通过高效液相色谱技术、低分辨透射电镜和高分辨透射电镜确认了该纳米类成分的存在, 最终命名为葶苈子炭纳米类成分 (DSC-NCs)。利用现代光谱仪器对其光学特征和结构特征进行表征, 采用小鼠肝脏出血模型对其止血效果进行了评价, 并通过检测 DSC-NCs 对凝血 4 项和血小板的影响来探究其止血机

制。本研究所采用的纳米技术具有一定的临床医学价值, 为进一步研究具有止血活性的潜在药物和有效的中药物质基础提供了依据。

材料与方法

仪器与试剂 PXR-9 马弗炉 (北京中科澳博科技股份有限公司); Agilent 1260 系列高效液相色谱仪 (美国 Agilent Technologies 公司); TecnaiG220 透射电子显微镜 (美国 FEI 公司); JEN-1230 高分辨透射电子显微镜 (日本电子株式会社); CECIL 紫外分光光度计 (英国 Cambridge 公司); F-4500 荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司); 傅立叶红外变换光谱仪 (JEN-1230, 美国 Thermo 公司)。本实验所使用药材为南葶苈子, 采购于北京仟草中药饮片有限公司; 白眉蛇毒血凝酶 (HC, 锦州奥鸿制药有限公司); 3.2% 枸橼酸钠 (上海源叶生物科技有限公司); 甲醇和其他分析级化学试剂 (北京化学试剂公司)。所有实验用水均为去离子水。

动物 本实验动物购买于北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2019-0010, SPF 级雌性昆明种小鼠 40 只, 体重为 27.0 ± 2.0 g; SPF 级 SD 大鼠 35 只, 体重为 150.0 ± 10.0 g, 实验环境为北京中医药大学西校区动物房屏障系统, 保持室温 (24.0 ± 1.0) °C, 相对湿度 55%~65%, 12 h 明暗交替, 通风良好, 饲养期间内自由进水、进食, 实验前 12 h 小鼠禁食不禁水。所有动物实验均符合北京中医药大学伦理委员会的规定。

DSC-NCs 的制备 称取葶苈子干燥药材 480 g, 放于坩埚中, 铝箔纸密封并加盖于马弗炉中烧制。马弗炉程序升温: 第 1 阶段 5 min 升温至 70 °C, 保温 25 min; 第 2 阶段 25 min 升温至最高温度 (250 °C、300 °C 和 350 °C), 保温 1 h。将烧制好的葶苈子炭置于中药粉碎机中粉碎。称取炭粉末 100 g, 加入 1 800 mL

去离子水中煎煮3次,温度为100 °C,时间为1 h。然后使用0.22 μm的微孔滤膜将煎煮液进行过滤,合并3次滤液,浓缩并选用透析膜(M_w 1 000)透析7天,获得2 g·mL⁻¹(按炭药质量算)的葶苈子炭袋内透析液,于4 °C保存,留置待用。

高效液相色谱法(HPLC)分析 利用HPLC比较所获得的GSC-NCs和葶苈子生药在成分上的区别。称取葶苈子生药2 g,加入40 mL甲醇超声处理30 min,获得甲醇提取液。将制备的GSC-NCs溶液烘干后获得粉末,使用甲醇稀释至一定浓度,获得不同温度下的GSC-NCs甲醇稀释液。所有样品使用0.22 μm微孔滤膜滤过后再进样。本实验中高效液相色谱仪采用四元泵-二极管阵列检测器,自动进样器;色谱柱为Reliasil-C18柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为1%磷酸-乙腈,等度洗脱程序:0~12 min, 10%乙腈;12~18 min, 14%乙腈;18~30 min, 19%乙腈;30~35 min, 19%乙腈;35~40 min, 25%乙腈;40~50 min, 25%乙腈;进样量为10.0 μL;体积流量为1 mL·min⁻¹;检测波长设定为330 nm;柱温30 °C^[12]。

电镜分析 使用低分辨透射电镜(TEM)观察样品粒径分布和形态特征,将300 °C、1 h条件下制备的DSC-NCs溶液稀释到适宜浓度,超声分散0.5 h后,用0.22 μm的微孔滤膜过滤,获得待测样品,最后使用1 mL注射器吸取,重复几次滴到铜网上,尽量使液体落在铜网中间,保证在检测之前溶液干透。使用高分辨透射电镜(HR-TEM)观察其晶格间距等,将上述制备好样品的铜网于HR-TEM下观察,从而获取DSC-NCs的晶格间距等内部结构详细特征。

紫外分光光度计(UV-Vis)分析 利用UV-Vis测定DSC-NCs溶液的紫外吸收光谱,开机预热15 min以上,首先使用去离子水来测定基线,然后将250 °C、300 °C和350 °C条件下制备的DSC-NCs溶液稀释至适宜的浓度后放入比色皿中进行测试,测试波长的扫描范围为200~600 nm,速度为5 nm·s⁻¹。

荧光分光光度计(FL)分析 利用FL测定250 °C、300 °C和350 °C条件下制备的DSC-NCs溶液的荧光性质,先开机预热30 min以上,然后将DSC-NCs溶液稀释到一定的浓度并放入石英比色皿中,测定DSC-NCs溶液的最大激发波长和最大吸收波长。测试条件:荧光光谱扫描时激发波长与发射波长的狭缝宽度皆为10 nm。光谱扫描范围:200~600 nm。

傅里叶红外变换分光光度计(FTIR)分析 采用FTIR测定250 °C、300 °C和350 °C条件下制备的DSC-NCs的官能团信息,分析样品的表面基团分布情况。DSC-NCs溶液蒸干得到粉末,称取适量粉末,再称量溴

化钾粉末160 mg,两者混合,放在玛瑙研钵中并置于红外灯箱里,不断研磨,烘干。然后用压力机(压力为20 kPa)压制成片,样片质地透明。为了避免在空气中暴露时间过长,快速将样片放入仪器检测,得到测试结果。

小鼠肝脏出血实验 采用小鼠肝脏出血模型^[13]来评价DSC-NCs的止血效果。取SPF级雄性昆明小鼠40只,分成5组,每组8只,分别为对照组(生理盐水)、阳性药组(0.1 kU·mL⁻¹白眉蛇毒血凝酶0.67 kU·kg⁻¹)、DSC-NCs组(250 °C、300 °C、350 °C)2 g·mL⁻¹,给药体积为18.51 mL·kg⁻¹。小鼠适应一段时间后分别给药,阳性药皮下给药,对照组和DSC-NCs组均腹腔给药。给药1 h后,腹腔注射4%水合氯醛麻醉。沿腹中线解剖小鼠暴露出肝脏位置,使用2 mL注射器针头在肝脏刺深度为2 mm的伤口,之后每隔30 s用生理盐水浸润的滤纸片蘸一次伤口,直至滤纸片上没有血迹,视为停止出血。记录扎破肝脏开始出血到停止出血的时间。

大鼠凝血4项及血小板检测 通过检测凝血4项[活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)]及血小板(PLT)的数值来研究DSC-NCs可能的止血机制。将SD雄性大鼠35只分成5组,每组7只,分别为对照组(生理盐水)、阳性药组(0.1 kU·mL⁻¹白眉蛇毒血凝酶0.67 kU·kg⁻¹)、DSC-NCs组(250 °C、300 °C、350 °C)2 g·mL⁻¹,给药体积为10 mL·kg⁻¹。动物适应一段时间后分别给药,阳性药皮下给药,对照组和DSC-NCs组均腹腔给药。给药1 h后,小鼠腹腔注射4%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血后迅速注入到预先装好3.2%枸橼酸钠(枸橼酸钠:血=1:9)的离心管中,上下晃动数次,保证抗凝剂与血液充分混匀,静置30 min后将其于3 000 r·min⁻¹离心10 min,作为凝血4项的测定样本。同时,用一次性注射器取血1、2滴注入预先装好EDTA-K2的抗凝管中,轻弹管壁,使血液与抗凝剂充分混匀,便于血小板的检测。在全自动血凝仪和血球分析仪上进行检测,依次测定APTT、PT、TT、FIB和PLT^[14]。

统计学分析 采用SPSS 25.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用方差分析。单因素ANOVA分析方法用于实验数据服从正态分布,同时方差齐。组间差异则运用LSD方法统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 HPLC分析

经过高温炭化、煎煮、过滤、浓缩和透析后获得葶苈子炭袋内透析液,之后进行烘干、甲醇复溶后获得DSC-NCs甲醇提取液,利用HPLC比较250 °C、300 °C

和 350 °C 下制备的 DSC-NCs 甲醇提取液和葶苈子甲醇提取液的成分差异。如图 1 所示, 葶苈子甲醇提取液中可以观察到一系列峰, 说明含有苷类化合物等小

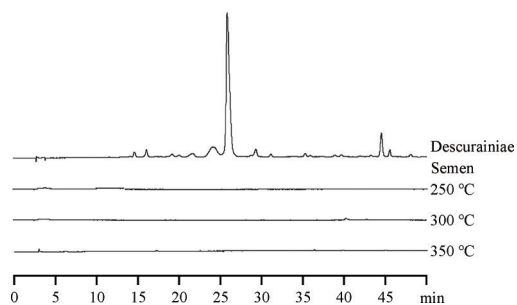


Figure 1 High-performance liquid chromatography (HPLC) profile of *Descurainiae Semen* and *Descurainiae Semen Carbonisatum* nano-components (DSC-NCs) prepared at different temperature conditions

分子化合物。而与之形成鲜明对比的是, 经过透析后的各温度下制备的 DSC-NCs 甲醇提取液中观察不到小分子的存在, 说明 DSC-NCs 溶液经透析后小分子成分已经不存在了。经过 HPLC 的观察对比, 在一定程度上排除了小分子化合物的干扰。

2 TEM 分析

利用 TEM 观察不同温度条件下制备的 DSC-NCs 的形态大小及粒径分布, 利用 HR-TEM 观察不同温度条件下制备的 DSC-NCs 的晶格间距, 结果如图 2 所示。在 DSC-NCs 的低分辨电镜图中, 可以观察到 DSC-NCs 的形状为近球形颗粒, 250 °C (图 2a) 下制备的 DSC-NCs 颗粒较小, 粒径分布 (图 2b) 在 0.8~2.4 nm 之间, 图 2c 显示其晶格间距为 0.211 nm, 但整体分布量较少; 从图 2d 上可以明显观察到 300 °C 制备的 DSC-NCs, 粒径颗粒较大, 粒径分布 (图 2e) 在 2.0~

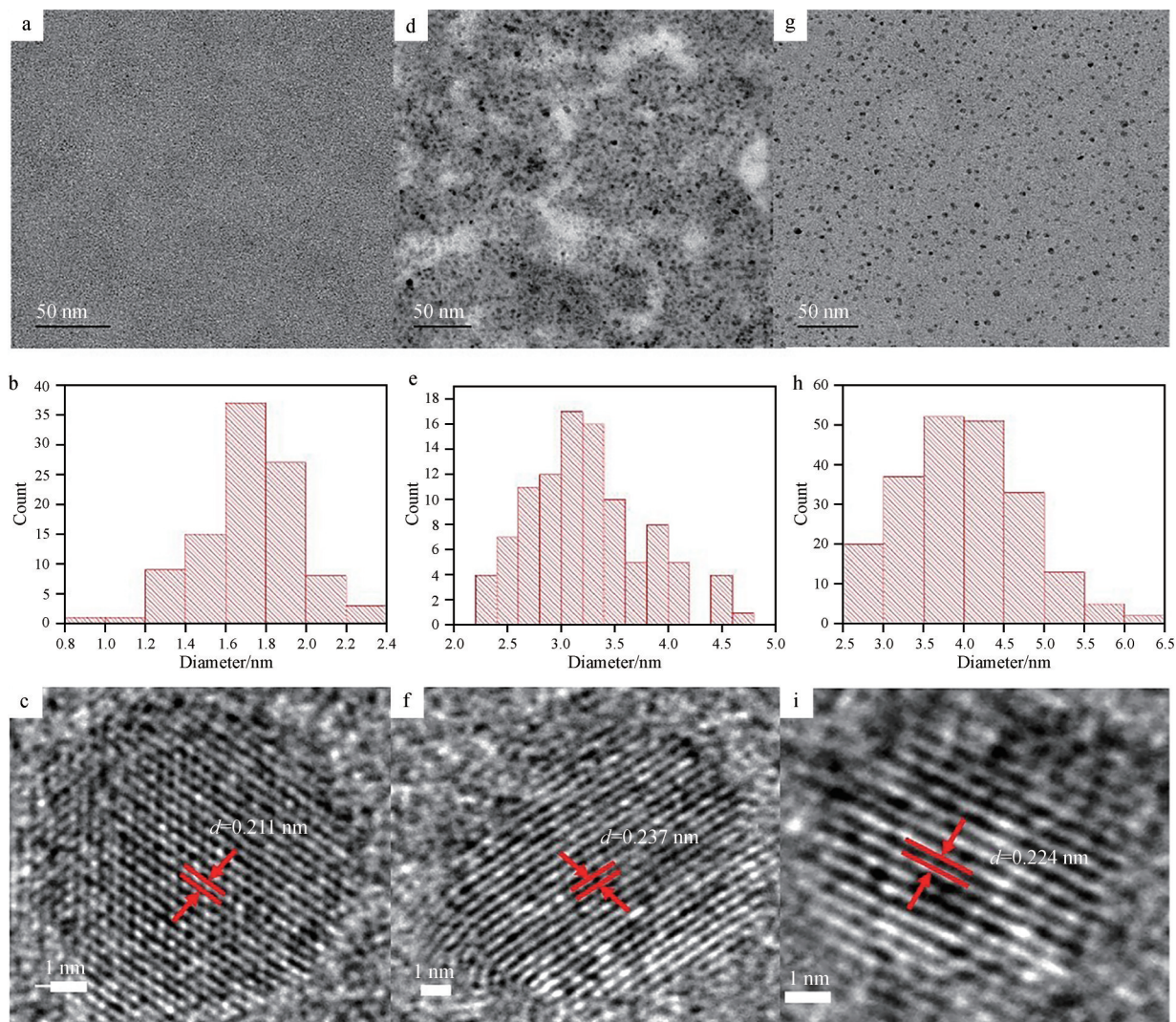


Figure 2 Transmission electron microscope (TEM) images of DSC-NCs prepared with different temperature conditions. Low resolution transmission electron micrograph: (a) 250 °C; (d) 300 °C; (g) 350 °C. Particle size distribution chart: (b) 250 °C; (e) 300 °C; (h) 350 °C. High resolution transmission electron micrograph: (c) 250 °C; (f) 300 °C; (i) 350 °C

5.0 nm 之间, 晶格间距为 0.237 nm (图 2f), 粒径分布较为广泛, 但出现小部分重叠聚集现象, 分布图清晰度较差; 图 2g 中可以观察到 350 °C 制备的 DSC-NCs 颗粒分散性良好, 粒径分布 (图 2h) 在 2.5~6.5 nm, 晶格间距为 0.224 nm (图 2i), 粒径清晰可见。

3 UV-Vis 分析

利用 UV-Vis 测定了不同温度下制备的 DSC-NCs 的紫外光谱图, 如图 3 所示。250 °C (图 3a)、300 °C (图 3b) 和 350 °C (图 3c) 下制备的 DSC-NCs 在 260~280 nm 处可以观察到有一处微弱的吸收峰, 这可能是由于含有杂原子的不饱和基团引起的 $n-\pi^*$ 跃迁所导致。对比各温度下 DSC-NCs 的紫外光谱图, 不同温度下 DSC-NCs 并没有强吸收峰, 各组之间的峰形差异不大。

4 FL 分析

利用 FL 分析不同温度下制备的 DSC-NCs 的荧光特性, 如图 3d 所示, 250 °C、300 °C 和 350 °C 下制备的 DSC-NCs 的最大发射波长依次为 438、440 和 453 nm, 由此可见, 随着制备温度的升高, DSC-NCs 的最大发射波长发生红移, 这可能是由于不同温度下制备的 DSC-NCs 的粒径大小和表面基团分布不同造成的。

5 FTIR 分析

用 FTIR 测定了不同温度下所制备的 DSC-NCs 的表面官能团信息, 结果如图 3e 所示。不同温度制备下 DSC-NCs 的红外光谱在波长 3 430、2 920、2 850、1 630、1 384 和 1 034 cm^{-1} 左右处均具有吸收峰, 其中 3 423~

3 431 cm^{-1} 的吸收峰提示可能存在 -O-H 键, 2 920、2 850 cm^{-1} 处的两个峰提示为 $-\text{CH}_2-$ 的伸缩振动峰, 这是亚甲基的特征峰, 1 628~1 635 cm^{-1} 的强吸收峰为 $-\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动峰, 1 384 cm^{-1} 强吸收峰提示可能为 -OH 的面内弯曲振动峰, 1 034 cm^{-1} 处的吸收峰提示可能含有 -C-O-C- 键。综上所述, 可以得出不同温度下所制备的 DSC-NCs 表面都携带着羟基、羧基等官能团。但是, 不同温度之间 DSC-NCs 的表面化学性质也存在着微小的差异, 如官能团的位置和强度不同。

6 DSC-NCs 的止血效果观察

在小鼠肝脏出血实验中, 阳性药组和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 均能减少小鼠出血时间。如图 4 所示, 生理盐水组的肝脏出血时间最长 (7.54 ± 0.45 min), 与生理盐水组相比, 阳性药组 (2.08 ± 0.23 min) 和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 组 (3.46 ± 0.30 、 4.20 ± 0.33 、 2.54 ± 0.35 min) 均降低小鼠肝脏出血时间, 并且数据统计具有显著差异 ($P < 0.01$)。其中, 350 °C 下制备的 DSC-NCs 治疗效果更明显, 这表明 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 对于小鼠肝脏出血模型均具有较为明显的止血作用。

7 DSC-NCs 对大鼠凝血相关参数的影响

实验通过对大鼠凝血 4 项参数 (PT、APTT、TT、FIB) 和血小板 (PLT) 含量的测定来研究 DSC-NCs 的可能凝血机制。DSC-NCs 对大鼠 PT 的影响如图 5a 所示, 与生理盐水组 (15.42 ± 0.19 s) 相比, 阳性药组

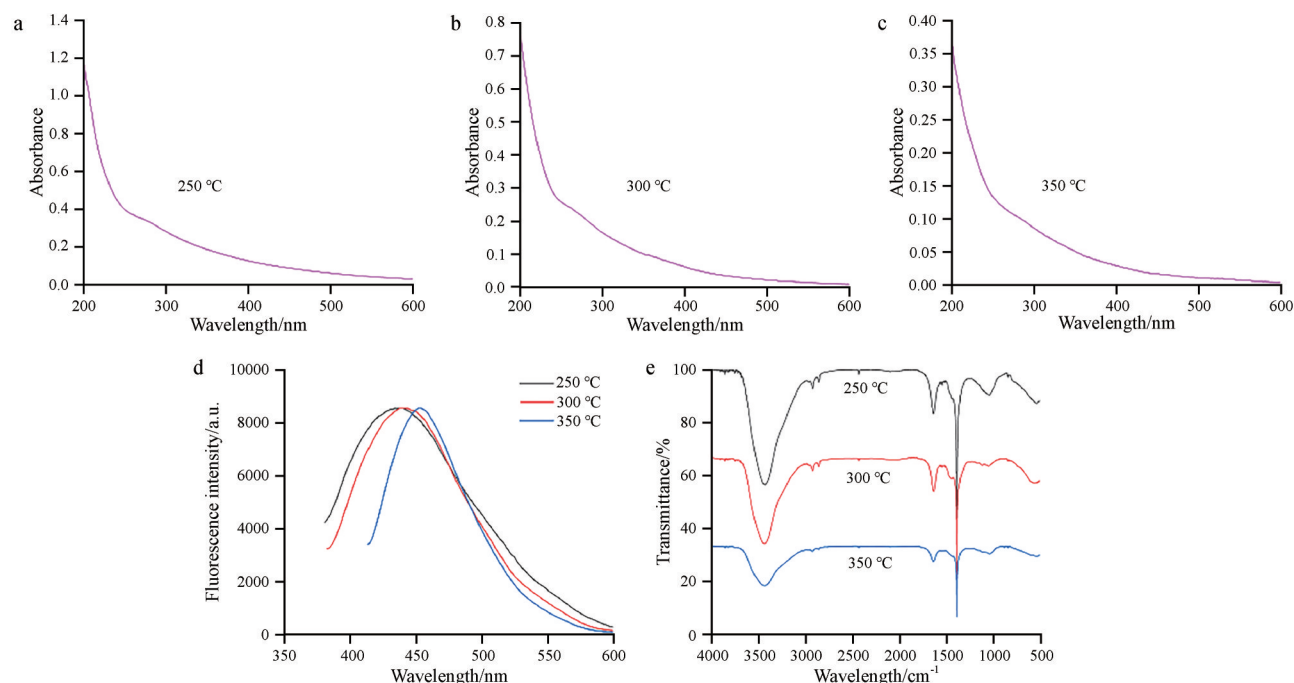


Figure 3 Spectra of DSC-NCs prepared with different temperature conditions. Ultraviolet-visible spectrum: (a) 250 °C; (b) 300 °C; (c) 350 °C. Fluorescence spectrum (d). Fourier transform infra-red spectrum (e)

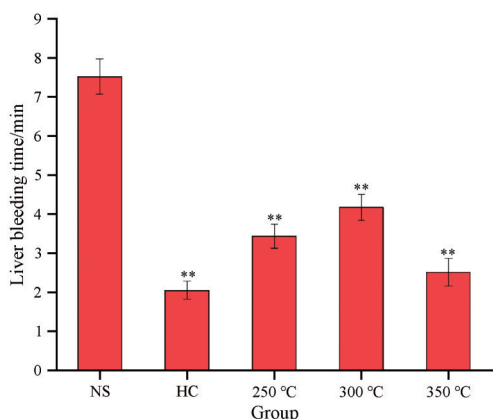


Figure 4 Graphs of hemostatic time in mice liver scratch models, treated with normal saline (NS), hemocoagulase (HC), and DSC-NCs group (250 °C, 300 °C, 350 °C). $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs NS

(14.76 ± 0.13 s) 和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 组 (15.03 ± 0.36 、 15.08 ± 0.42 、 14.94 ± 0.42 s) 能够明显降低 PT 值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。对 APTT 的影响如图 5b 所示, 与生理盐水组 (20.97 ± 1.35 s) 相比, 阳性药组 (20.60 ± 1.54 s) 和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 组 (20.75 ± 1.73 、 22.41 ± 1.57 、 20.43 ± 1.39 s) 对 APTT 值无显著性影响。对 TT 的影响如图 5c 所示, 与生理盐水组 (46.72 ± 4.14 s) 相比, 阳性药组 (45.73 ± 2.61 s) 和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 组 (45.17 ± 2.76 、 47.93 ± 4.22 、 48.27 ± 3.67 s)

对 TT 值无显著性影响。纤维蛋白原 FIB 是研究凝血过程的重要指标, DSC-NCs 对大鼠 FIB 的影响如图 5d 所示, 与生理盐水组 (1.57 ± 0.11 g·L⁻¹) 比较, 阳性药组 (1.89 ± 0.06 g·L⁻¹) 和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 组 (1.67 ± 0.05 、 1.78 ± 0.08 、 1.83 ± 0.04 g·L⁻¹) 均能显著地提高大鼠的 FIB 值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

PLT 的数量反映凝血情况, DSC-NCs 对大鼠 PLT 的影响如图 5e 所示, 与生理盐水组 [$(1\ 076 \pm 54) \times 10^9$ L⁻¹] 比较, 阳性药组 [$(1\ 358 \pm 123) \times 10^9$ L⁻¹] 和 250 °C、300 °C、350 °C 下制备的 DSC-NCs 组 [$(1\ 277 \pm 22$ 、 $1\ 271 \pm 103$ 、 $1\ 287 \pm 58) \times 10^9$ L⁻¹] 均能提高大鼠 PLT 数量 ($P < 0.01$)。实验结果显示, DSC-NCs 给药组能使大鼠 PLT 显著升高。

讨论

结构生物学、超分子化学和生物物理学等新兴学科和现代技术的发展极大地拓展了人们对中药的认识维度和实践手段, 在总结前人理论和实践的基础上提出了结构中药学的概念, 是具有鲜明时代特征的产物。结构中药学^[15]是研究中药功效成分物理基础的学科领域, 包括中药成分的相态变化规律及其效应关系。“相态”包含成分和结构两个层面, 一般中药物质基础研究主要关注成分研究, 但任何成分在不同环境条件下都会有不同的结构形式。本实验发现的 DSC-NCs 便是在一定的炮制环境下, 不同或相同成分间相互作用形

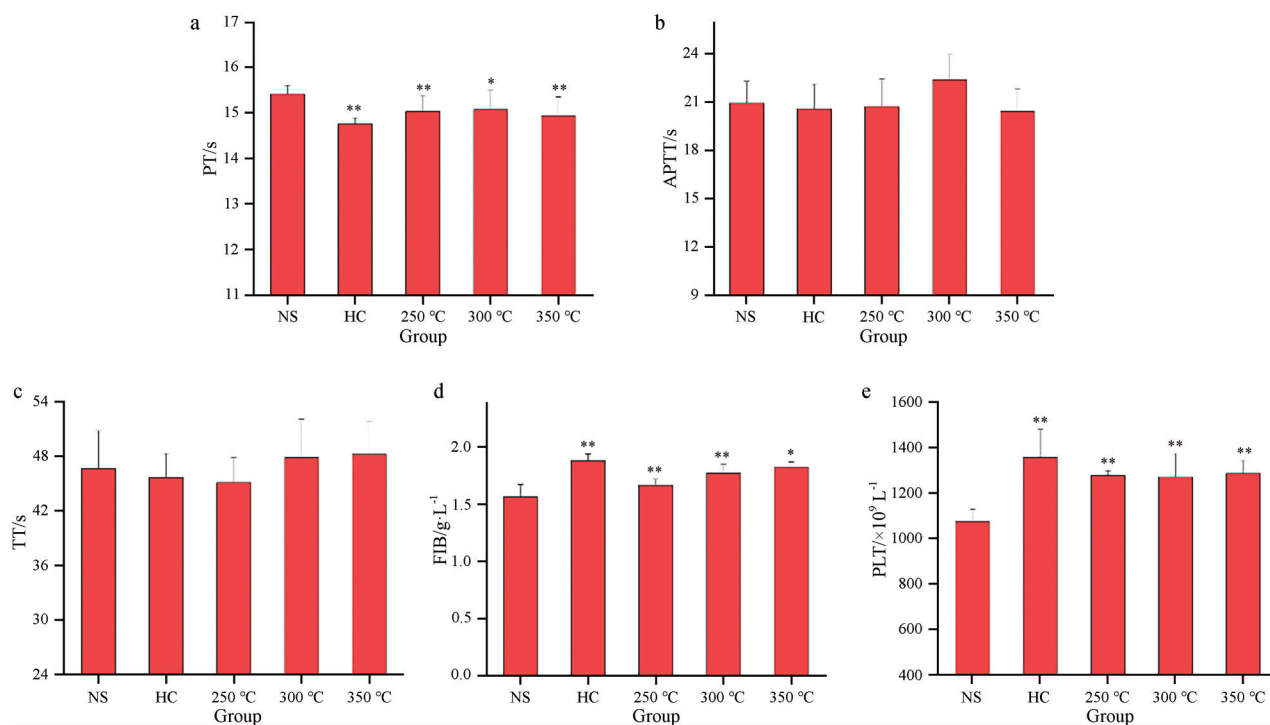


Figure 5 Graphs of measurements of coagulation parameters: (a) prothrombin time (PT); (b) activated partial thromboplastin time (APTT); (c) thrombin time (TT); (d) fibrinogen (FIB) and (e) platelet count (PLT) analysis of rats treated with normal saline (NS), hemocoagulase (HC), and DSC-NCs group (250 °C, 300 °C, 350 °C). $n = 7$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NS

成的相对稳定的构造形式。纳米类成分作为一种新型的纳米材料,具有许多独特的特性,如水溶性高、光稳定性好和生物相容性好等^[16-18]。长期以来,对于炭药药理作用的研究方向偏重于止血,这与中医基础理论的指导密切相关。本团队在前期工作中已经证明了从炭药中提取分离的纳米类成分是发挥止血作用的物质基础,包括卷柏炭^[19]、蒲黄炭^[20]和黄柏炭^[21]等。对于已知的炭药纳米类成分发挥止血作用的机制有一个共同的趋势,即激活纤维蛋白原系统和促进血小板聚集来发挥止血作用。但总体作用上又并不完全一致,如卷柏炭纳米类成分^[19]能够降低PT值,说明能刺激外源性凝血途径而发挥止血作用;蒲黄炭纳米类成分^[20]能够降低APTT值,说明能刺激内源性凝血途径而发挥止血作用;黄柏炭纳米类成分^[21]对于APTT、TT值都没有明显的影响。同时,炭药中纳米类成分的药理活性不仅局限于此,如灯芯草炭纳米类成分^[14]具有止血和保肝的功效、艾叶炭纳米类成分^[22,23]具有抗冻伤和抗菌的作用等,这可能与不同基源中药在不同炮制环境下形成的结构形式有关。

本实验利用TEM观察到了250 °C、300 °C和350 °C制备的DSC-NCs的粒径分布、形态特征及晶格间距等微观特征信息,利用UV-Vis、FL和FTIR等光谱仪器对各温度制备的DSC-NCs的光学特征及表面基团分布做出表征,结果发现,各温度制备的DSC-NCs在粒径大小分布、表面官能团含量存在着差异,其中350 °C制备的DSC-NCs粒径分布图像清晰可见,分散性更好。此外,本研究还利用HPLC比较了葶苈子甲醇提取液和各温度下制备的DSC-NCs甲醇提取液的化学成分差异,发现葶苈子甲醇提取液的主要活性成分包括苷类化合物等小分子物质,与之形成鲜明对比的是,DSC-NCs甲醇提取液中不含小分子化合物,这在一定程度上排除了小分子化合物对止血活性的干扰。

通过小鼠肝脏出血实验发现250 °C、300 °C和350 °C制备的DSC-NCs均具有一定的止血效果,其中以350 °C制备的DSC-NCs治疗效果最佳,这种治疗效果上的差异可能与不同温度制备的DSC-NCs的粒径大小及表面携带电荷多少相关^[24]。正常的生理止血抗凝机制是一个复杂的生理生化过程,主要由血管收缩与血小板反应、抗凝系统和纤溶系统三个相互关联的部分组成^[25,26]。在本研究中,DSC-NCs对TT和APTT值的影响无统计学意义,因此不影响大鼠内源性凝血途径。然而,PT值的降低提示DSC-NCs可能影响外源性凝血途径,FIB的含量也在一定程度上增加,推测DSC-NCs的促凝活性可能通过增加血液中FIB含量或抑制纤溶系统发挥止血凝血作用。另外,DSC-NCs能

显著提高大鼠PLT水平,从而增强其止血作用。本实验首次证明了DSC-NCs具有显著的止血作用,为DSC-NCs作为新型纳米粒止血药物的应用提供了初步的实验基础,但仍需要进一步的研究来阐明这些影响的潜在机制。DSC-NCs的发现及其止血作用的证实,使其有可能成为一种安全的、治疗出血性疾病的药物。以上研究不仅为探索炭药的物质基础和特性提供了新的研究方向,也为DSC-NCs在医学领域的潜在应用提供了新的视角。

作者贡献: 赵琰、屈会化和赵玉升构思并设计了实验;赵玉升、田雨和李伟洋进行了论文的整体实验和数据分析;陈玉民、赵亚芳和曹天佑参与本论文相关动物实验;赵玉升和李郁茹参与数据分析工作;赵玉升、李伟洋和赵琰对本论文进行撰写并修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Gao XM. Chinese Materia Medica [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011.
- [2] He RJ, Diao TM, Du D. History and development of carbonization of Chinese materia medica and exploration on its mechanism of hemostatic action [J]. Chin J Med Hist (中华医史杂志), 2017, 47: 70-72.
- [3] Li SJ, Jia SJ, Yang L, et al. The study of changes in microstructure and hemostatic components of *Crataegus pinnatifida* bge. before and after carbonization [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2019, 30: 1352-1354.
- [4] Ma CJ, Wang X, Xin YZ, et al. Advances of modern research on processing theory of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 512-520.
- [5] Xue L, Liu C, Ding AW, et al. Study on the hemostasis of the flavonoids of *Platycladi Cacumen Carbonisatum* (PCC) on the blood heat and hemorrhage syndrome rat model induced by dry yeast [J]. Chin J Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2016, 36: 1486-1491.
- [6] Shen LM, Liu J. New development in carbon quantum dots technical applications [J]. Talanta, 2016, 156: 245-256.
- [7] Xin TZ, Ananthanarayanan A, Luo KQ, et al. Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications [J]. Small, 2015, 11: 1620-1636.
- [8] Tong T, Hu H, Zhou J, et al. Glycyrrhizic-acid-based carbon dots with high antiviral activity by multisite inhibition mechanisms [J]. Small, 2020, 16: e1906206.
- [9] Wang S, Zhang Y, Kong H, et al. Antihyperuricemic and anti-gouty arthritis activities of *Aurantii Fructus Immaturus Carbonisata*-derived carbon dots [J]. Nanomedicine (Lond), 2019, 14: 2925-2939.
- [10] Hu J, Luo J, Zhang M, et al. Protective effects of *Radix Sopho-*

- rae Flavescentis Carbonisata-based carbon dots against ethanol-induced acute gastric ulcer in rats: anti-inflammatory and antioxidant activities [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 2461-2475.
- [11] Bajpai VK, Khan I, Shukla S, et al. Multifunctional N-P-doped carbon dots for regulation of apoptosis and autophagy in B16F10 melanoma cancer cells and *in vitro* imaging applications [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 7841-7856.
- [12] Wang XW, Ma ZJ, Jin RN, et al. Establishment of quality evaluation methods for pieces and standard decoction of honey-fried *Descurainiae Semen* [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2020, 45: 884-889.
- [13] Wu J, Lemarié CA, Barralet J, et al. Amphiphilic peptide-loaded nanofibrous calcium phosphate microspheres promote hemostasis *in vivo* [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9: 9194-9200.
- [14] Cheng J, Zhang M, Sun Z, et al. Hemostatic and hepatoprotective bioactivity of *Junci Medulla Carbonisata*-derived carbon dots [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2019, 14: 431-446.
- [15] Qiao HZ, Di LQ, Ping QN, et al. Structural Chinese medicine: new research field on pharmacodynamic substance basis of traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 46: 2443-2448.
- [16] Wang K, Gao Z, Gao G, et al. Systematic safety evaluation on photoluminescent carbon dots [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2013, 8: 122.
- [17] Wang Z, Liu J, Wang W, et al. Photoluminescent carbon quantum dot grafted silica nanoparticles directly synthesized from rice husk biomass [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 4679-4689.
- [18] Zhang J, Zhao X, Xian M, et al. Folic acid-conjugated green luminescent carbon dots as a nanoprobe for identifying folate receptor-positive cancer cells [J]. *Talanta*, 2018, 183: 39-47.
- [19] Zhao Y, Zhang Y, Kong H, et al. Haemostatic nanoparticles-derived bioactivity of from *Selaginella Tamariscina Carbonisata* [J]. *Molecules*, 2020, 25: 446.
- [20] Yan X, Zhao Y, Luo J, et al. Hemostatic bioactivity of novel *Pollen Typhae Carbonisata*-derived carbon quantum dots [J]. *J Nanobiotechnol*, 2017, 15: 60.
- [21] Liu X, Wang Y, Yan X, et al. Novel *Phellodendri Cortex (huang bo)*-derived carbon dots and their hemostatic effect [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13: 391-405.
- [22] Kong H, Zhao Y, Zhu Y, et al. Carbon dots from *Artemisiae Argyi Folium Carbonisata*: strengthening the anti-frostbite ability [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2021, 49: 11-19.
- [23] Wang H, Zhang M, Ma Y, et al. Selective inactivation of gram-negative bacteria by carbon dots derived from natural biomass: *Artemisia Argyi* leaves [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 2666-2672.
- [24] Miao P, Han K, Tang Y, et al. Recent advances in carbon nanodots: synthesis, properties and biomedical applications [J]. *Nanoscale*, 2015, 7: 1586-1595.
- [25] Xin N, Li YJ, Yan L, et al. Dragon's blood extract has antithrombotic properties, affecting platelet aggregation functions and anticoagulation activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135: 510-514.
- [26] Zhang Q, Ju WZ, Guo JM, et al. Influence of ceftriaxone on pharmacokinetics, anticoagulation and antithrombotic effects of phenolic acids from *Danhong* injection in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 701-709.