

中草药提取物体外止血效果评价模型*

Establishment and Application of the Model of External Hemostatic of Herb

宋 瑾¹, 周利琴¹, 林钻煌², 覃青云², 伍善广^{1,3}, 许 静², 孙建华¹, 廖丹葵^{1**}

SONG Jin¹, ZHOU Liqin¹, LIN Zuanhuang², QIN Qingyun², WU Shanguang^{1,3}, XU Jing², SUN Jianhua¹, LIAO Dankui¹

(1. 广西大学化学化工学院, 广西高校资源化工应用新技术重点实验室, 广西南宁 530004; 2. 柳州两面针股份有限公司, 广西柳州 545001; 3. 广西科技大学, 广西柳州 545006)

(1. Key Laboratory of New Technology Applied in Chemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. LMZ Limited by Share Ltd, Liuzhou, Guangxi, 545001, China; 3. Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi, 545006, China)

摘要:【目的】建立体外综合止血评价模型, 筛选止血效果良好的中草药。【方法】选择凝血酶时间(Thrombin time, TT)、血小板聚集率(Platelet aggregation rate, PAgr)和黏附率(Platelet adhesion rate, PADr)、抗凝血酶Ⅲ(Anti-thrombin Ⅲ activity, AT-Ⅲ)活性、血浆复钙时间(Recovery calcium time, RT)、最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC) 7 项指标, 应用层次分析法建立分析评价模型, 对侧柏叶、三七、两面针、止血环酸进行体外止血活性评价, 并通过小鼠出血与凝血实验验证模型的可行性。【结果】模型分析表明止血效果好的为侧柏叶、三七、止血环酸; 效果较好的为两面针; 效果差的为生理盐水。模型分析结果与动物实验结果相吻合。【结论】该模型对中草药止血效果评价方法的建立有一定的参考价值。

关键词: 中草药提取物 止血 抗菌 评价模型

中图分类号: R285. 5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2017)04-0407-06

Abstract:【Objective】To establish a comprehensive evaluation model for the selection of the hemostatic activity of herb. 【Methods】Thrombin time, platelet aggregation rate and the adhesion rate, anti-thrombin Ⅲ activity and plasma recovery calcium time, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentrations were tested for evaluation of in vitro hemostatic activity. Analytic hierarchy process was used to establish the evaluation system of hemostasis in vitro, and the feasibility of the model is verified by the experiment of hemorrhage and coagulation of mice. 【Results】The model analysis showed that the hemostatic effect was good for

Platyclus orientalis leaf, *Panax notoginseng*, tranexamic acid; better for *Radix zanthoxyli*; poor for physiological saline. The results were consistent with the experimental results of the animals. 【Conclusion】The model has a certain reference value for the establishment of the evaluation method of herbal hemostasis.

Key words: herbal extracts, hemostatic, antibacterial, evaluation model

收稿日期: 2017-02-10

修回日期: 2017-03-15

作者简介: 宋 瑾(1992—), 女, 硕士, 主要从事天然产物提取研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(1355012-4)和柳州市科技攻关项目(2013C040403)资助。

** 通信作者: 廖丹葵(1967—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事精细化工、生物制品分离纯化和生物功能材料研究, E-mail: li-aodk@gxu. edu. cn.

0 引言

【研究意义】近年来,中草药提取物的药用研究尤其是消炎止血方面的研究受到了广泛关注。该领域研究方法多样,筛选方法不一,即使是同一种草药提取物,其止血等活性的评价结果也不一致。**【前人研究进展】**彭凯等^[1]选用血浆活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间和纤维蛋白原指标,比较荷叶3种不同炮制品提取物对大鼠凝血功能的影响;李高申等^[2]选用血浆复钙时间从冬凌草中寻找具止血活性成分;杨瑞芳等^[3]使用小鼠出血时间和凝血时间研究卷柏炒炭前后的止血效果。但如果仅选择几种指标进行测试,往往不能全面反映中草药止血效果。**【本研究切入点】**综合多种指标,探寻合适且有效的方法筛选具有止血活性的中草药提取物。**【拟解决的关键问题】**借鉴前人研究,选择凝血酶时间、血小板聚集率和粘附率、抗凝血酶活性测试、血浆复钙时间、最低抑菌浓度、最低杀菌浓度,建立综合评价模型,为筛选具有止血活性的中草药提供方法。

1 材料与方法

1.1 材料

中草药:侧柏叶(批号20140301)、三七(批号20141211)、两面针(批号20150122)。样品粉碎,过40目筛,干燥,备用。

实验动物:健康家兔,体重3.0~3.5 kg,雌雄兼备;昆明小白鼠220只,体重18~22 g,雌雄各半,购自广西医科大学动物实验中心。

供试菌株:变异链球菌(ATCC25175)、牙龈卟啉单胞菌(ATCC33277)购自广东省微生物菌种保藏中心。

试剂:牛脑心浸液肉汤培养基(BHI培养基)、CDC厌氧菌琼脂、定标血浆(美国IL公司)、止血酸由柳州两面针有限公司提供,其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 体外止血效果综合评价模型的建立

(1)止血评价指标体系的确定

选择从事生物学研究、动物临床实验和药理研究的多名专业人员,对初步确定的止血评价指标进行征询。结合专家意见,再根据评价指标体系科学性、代表性、层次性、可操作性及可比性原则^[4]确定评价一级指标与二级指标。将止血效果评价目标层的一级指标概括为抗菌作用、体外凝血效果,见表1。以口

腔牙龈出血为例,致龋菌(变异链球菌, *Streptococcus mutans*)与致牙周病菌(牙龈卟啉单胞菌, *Porphyromonas gingivalis*)均可引起牙龈出血,因此选中草药对两株菌的最低抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)作为抗菌作用的二级指标。凝血最直观地表现是血液凝固,凝血酶是血液凝固的核心;血小板聚集率(Platelet aggregation rate, PAgR)和黏附率(Platelet adhesion rate, PAdR)发生在血管受损处,因黏着和聚集而产生血栓;血浆复钙时间 Recovery calcium time, RT)代表内源性凝血系统最终可生成凝血酶达到止血效果;抗凝血酶Ⅲ(Anti-thrombin Ⅲ, AT-Ⅲ)能抑制凝血酶活性起到抗凝作用。因此选中草药凝血酶时间(Thrombin time, TT)、PAgR、PAdR、RT、AT-Ⅲ活性作为止血作用的二级指标。

表1 评价指标体系表

Table 1 Evaluation index system

目标层 Target layer	U		U _{ij}
	一级指标 U _i Level 1 indicators	二级指标 Level 2 indicators	
止血效果 Hemostatic effect	抗菌作用 Antibacterial effect	对变异链球菌 MIC	U ₁₁
		MIC of <i>S. mutans</i>	
		对变异链球菌 MBC	U ₁₂
		MBC of <i>S. mutans</i>	
		对牙龈卟啉单胞菌 MIC	U ₁₃
		MIC of <i>P. gingivalis</i>	
		对牙龈卟啉单胞菌 MBC	U ₁₄
		MBC of <i>P. gingivalis</i>	
	体外凝血效果 Clotting effect	TT	U ₂₁
		PAgR	U ₂₂
		PAdR	U ₂₃
		RT	U ₂₄
		AT-Ⅲ活性 Anti-thrombin Ⅲ activity	U ₂₅

(2)各评价指标权重的确定及一致性检验

确定权重:利用“1~9”标度法建立判断矩阵,赋值并求出判断矩阵的最大特征值和所对应的特征向量,用归一化法求得权重值^[4]。

一致性检验:计算判断矩阵一致性指标(C. I.)及一致性比例(C. R.)。当 C. R. < 0.1 时,认为判断矩

阵的一致性是可以接受的;否则要对判断矩阵做适当修正。根据式 $C. I. = (\lambda_{\max} - m) / (m - 1)$ (式中, m 为判断矩阵的阶数) 与 $C. R. = C. I. / R. I.$ 检验总排序的一致性。

(3) 评价因子的分级

用模糊综合评判进行定量化处理给出评价因子的分级标准;咨询专家后给出各因子的分级标准。按照 5 级评分法,将评价等级分为优、良、一般、较差、很差 5 个等级,分别赋值 5 分、4 分、3 分、2 分、1 分。具体分级标准见表 2。

表 2 各评价因子的分级标准

Table 2 Grading criteria of each evaluation factor

编号 Number	评价因子 Evaluation factor	等级评分 Grade score
U11 U12 U13	药物浓度 Concentration ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0~50 为 5 分;50~100 为 4 分;100~150 为 3 分;150~250 为 2 分;250 以上为 1 分。
U14 U21	TT(s)	0~5 为 5 分;5~10 为 4 分;10~15 为 3 分;15~20 为 2 分;20 以上为 1 分。
U22	PAgR(%)	0~40 为 1 分;40~60 为 2 分;60~80 为 3 分;80~90 为 4 分;90~100 为 5 分。
U23	PAdR(%)	0~40 为 1 分;40~60 为 2 分;60~80 为 3 分;80~90 为 4 分;90~100 为 5 分。
U24	RT(s)	0~40 为 5 分;40~80 为 4 分;80~100 为 3 分;100~120 为 2 分;120 以上为 1 分。
U25	AT-III 活性 Anti-thrombin III activity (%)	0~25 为 5 分;25~50 为 4 分;50~75 为 3 分;75~100 为 2 分;100 以上为 1 分。

(4) 综合止血评价计算

在明确评价因子的权重后,根据分级标准确定各评价因子水平值,依式 1) 计算其综合止血效果。

$$Y = \sum U_{ij} W_{ij} (i, j = 1, 2, 3, n), \quad 1)$$

式中: Y 表示综合止血效果, U_{ij} 表示某评价因子的权重值, W_{ij} 表示中草药评价因子的得分值。

(5) 止血效果综合评价指数计算

$$Y_0 = \sum 5 \times U_{ij} (i, j = 1, 2, 3, n), \quad 2)$$

式中: Y_0 表示止血效果理想值。各参评因子理想水平值均为 5 分。根据式 3) 计算出综合止血评价指数。

$$CEI = Y / Y_0, \quad 3)$$

式中: CEI 为综合止血评价指数, Y 为综合止血效果, Y_0 为综合止血效果理想值。

(6) 评价结果分类

以 CEI 为分级依据,按照差值百分比分级法划分 I、II、III、IV 级。I 级表示止血效果好,等级在 60%~100%;II 级表示止血效果较好,等级在 40%~

60%;III 级表示止血效果一般,等级在 30%~40%;IV 级表示止血效果差,等级在 0~30%。

1.2.2 提取物凝血测试

(1) 中草药提取

取侧柏叶、三七、两面针适量,与超纯水按 1:10 的比例室温浸泡 2 h,回流提取 2 次,每次 2 h,滤渣超声提取 40 min,合并滤液,旋蒸浓缩,冷冻干燥。

样品液配制:配制 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的侧柏叶、三七、两面针提取物及止血环酸溶液,经一次性进口滤器过滤成清亮的提取液。

抗凝血液的制备:兔耳缘静脉取血,立即与 $109 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的枸橼酸钠 9:1 混匀,将含抗凝剂全血 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,得富血小板血 (PRP); $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,得贫血小板血浆 (PPP)。

(2) 凝血酶时间 (TT) 测定

参考文献 [5] 方法测定 TT。

(3) 血小板聚集率 (PAgR) 测试

参照文献 [5] 方法进行测定。

(4) 血小板粘附率 (PAdR) 测试

0.1 mL 的 PRP 分别装于塑料离心管中 0.1 mL 与不同样品液混合,在每个离心管中加入 3 个大小相等的直径为 3.0 mm 的玻璃珠,振荡 10 min,显微镜下用血球计数器计数。血小板粘附率 (%) = (黏附前血小板数 - 黏附后血小板数) / 黏附前血小板数 $\times 100\%$,生理盐水做空白对照。

(5) 血浆复钙时间 (RT) 测定

0.1 mL 生理盐水或样品液和 0.1 mL PRP 于离心管中混合,37°C 水浴下加入 0.1 mL 质量分数为 25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液混匀并开始计时,有颗粒状或丝状物产生时停止计时 [6]。

(6) 抗凝血酶 III (AT-III) 活性测定

参照汪宏良等 [7] 凝固时间法制作凝固时间与 AT-III 活性的标准曲线,得 $Y = 0.040X - 0.184$, $R^2 = 0.9994$,可知 AT-III 活性在 25%~125% 时,与凝固时间呈良好线性关系。测定样品血浆 AT-III 活性。

(7) 提取物抗菌测试

菌悬液制备:将变异链球菌与牙龈卟啉单胞菌复苏 48 h 后,接种于 BHI 液体培养基中,37°C 在 85% N_2 、10% H_2 、5% CO_2 的条件下于厌氧培养箱中培养 24 h 后,待细菌生长达到对数期,涂片镜检为纯培养后,收集菌液,调菌浓度 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,备用。

二倍稀释法 [8]:将粗提物以倍比稀释法溶于 BHI 液体培养基中,配制成 $1\ 000 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 至

0.488 mg · mL⁻¹ 的 12 组样品液(其中侧柏叶初始浓度为 1 200 mg · mL⁻¹), 取样品液 100 μL 加入每孔各有 100 μL 菌悬液的无菌 96 孔板中(相当于培养体系中提取物浓度为 500 mg · mL⁻¹至 0.244 mg · mL⁻¹)作为实验组; 另取样品液 100 μL 加入 BHI 液体培养基 100 μL 作为对照组。将 96 孔板 37℃ 厌氧培养 24 h, 肉眼观察无浑浊出现的最低药物浓度为最低抑菌浓度(MIC)值, 挑取肉眼观察可能无细菌生长的溶液, 划线于 CDC 血平板, 37℃ 厌氧培养, 观察培养 24 h 平板上有无菌落生长, 无菌生长的浓度即为最低杀菌浓度(MBC)。

1.2.3 模型验证

灌胃样品液配制: 适量样品粉末加 0.5% 的羧甲基纤维素钠混悬 0.2 mL。配制浓度分别为 5 g 生药 · kg⁻¹、10 g 生药 · kg⁻¹、15 g 生药 · kg⁻¹, 止血环酸作为阳性对照, 灌胃量为 130 mg · kg⁻¹。草药提取物对小鼠出血时间与凝血时间的测试参考曲香芝等^[9]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 评价模型指标权重及一致性检验

采用“1~9”标度法构造止血模型和各指标的判断矩阵, 结果如下:

$$A_u = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1/4 & 1/2 & 1/2 & 1/4 & 1/4 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1/4 & 1/2 & 1/2 & 1/4 & 1/4 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1/4 & 1/2 & 1/2 & 1/4 & 1/4 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1/4 & 1/2 & 1/2 & 1/4 & 1/4 \\ 4 & 4 & 4 & 4 & 1 & 2 & 2 & 1 & 1 \\ 2 & 2 & 2 & 2 & 1/2 & 1 & 1 & 1/2 & 1/2 \\ 2 & 2 & 2 & 2 & 1/2 & 1 & 1 & 1/2 & 1/2 \\ 4 & 4 & 4 & 4 & 1 & 2 & 2 & 1 & 1 \\ 4 & 4 & 4 & 4 & 1 & 2 & 2 & 1 & 1 \end{pmatrix}。$$

表 3 样品指标测试结果

Table 3 Results of sample index test

药物 Drug	指标 Index					
	MIC(mg · mL ⁻¹)		MBC(mg · mL ⁻¹)		TT(s)	PAgR(%)
	变异链球菌 <i>S. mutans</i>	牙龈卟啉单胞菌 <i>P. gingivalis</i>	变异链球菌 <i>S. mutans</i>	牙龈卟啉单胞菌 <i>P. gingivalis</i>		
生理盐水 Physiological saline	/	/	/	/	20.3 ± 1.8	42.9 ± 3.8
侧柏叶 <i>Platyclusus orientalis</i> leaf	150	600	150	600	4.9 ± 0.4*	70.0 ± 1.4*
三七 <i>Panax notoginseng</i>	/	/	/	/	3.2 ± 0.3*	44.5 ± 2.7
两面针 <i>Zanthorplum nitidum</i>	250	/	/	/	13.7 ± 1.5*	63.0 ± 2.2*
止血环酸 Tranexamic acid	/	/	/	/	8.8 ± 1.3*	73.4 ± 2.5*

注: n = 3; 与生理盐水组比较, * P < 0.05; “/”表示无效果

Note: n = 3; Compared with the physiological saline group, * P < 0.05; “/” indicates no effect

各指标的权重系数可以将矩阵 A_u 的内容按式 4) 进行处理后, 根据式 5) 由归一法求得。

$$b_i = \left(\prod_{j=1}^9 a_{ij} \right)^{1/9}, \quad (4)$$

$$u_i = b_i / \sum_{i=1}^9 b_i. \quad (5)$$

一致性检验结果: 经计算总排序的 C. I. = 0,

R. I. = 1.345 0^[4], C. R. = 0 < 0.1, 说明总排序满足一致性。

2.2 体外止血效果评价

样品凝血与抗菌指标测试结果见表 3。止血测试表明: 与生理盐水相比, 4 种样品的 TT、RT 均缩短, PAgR 和 PAdR 均增加, AT-III 活性均减小, 说明 4 种样品均能促进凝血酶活性, 促进血小板聚集与粘附, 影响内源性凝血系统, 抑制 AT-III 活性达到体外促凝效果。抗菌实验表明: 侧柏叶变异链球菌与牙龈卟啉单胞菌的抗菌效果均较好, 均出现抑菌与杀菌效果, MIC 均为 150 mg · mL⁻¹, MBC 均为 600 mg · mL⁻¹; 其次为两面针, 仅出现对变异链球菌的抑菌作用, MIC 为 250 mg · mL⁻¹。此外, 5 项凝血测试发现, 不同样品可通过不同的止血途径, 联合或单独起到体外止血的作用。与生理盐水相比, 侧柏叶、止血环酸、两面针均能够明显的缩短 TT (P < 0.05) 与 RT (P < 0.05), 促进 PAgR (P < 0.05) 与 PAdR (P < 0.05), 抑制 AT-III 活性 (P < 0.05), 达到体外凝血效果。将所测实验数据代入模型, 所得各样品液综合止血评价结果见表 4。可以看出, 在 10 mg · mL⁻¹ 浓度下, 止血效果好的为侧柏叶、三七、止血环酸; 止血效果较好的为两面针; 止血效果差的为生理盐水。

表 4 样品综合止血评价结果

Table 4 Comprehensive hemostasis evaluation results of sample

药物 Drug	Y	Y ₀	CEI(%)	等级 Grade
生理盐水 Physiological saline	1.40	5.00	28.0	IV
侧柏叶 <i>Platycladus orientalis</i> leaf	3.50	5.00	70.0	I
三七 <i>Panax notoginseng</i>	3.30	5.00	66.0	I
两面针 <i>Zanthorplum nitidum</i>	2.90	5.00	58.0	II
止血环酸 Tranexamic acid	3.00	5.00	60.0	I

表 5 小鼠出血时间与凝血时间($\bar{x} \pm s$)Table 5 The bleeding and coagulation time of mice($\bar{x} \pm s$)

样品 Sample	数量(只) Number (unit)	给药量 Dose (g 生药 · kg ⁻¹)	出血时间 Bleeding time (min)	凝血时间 Coagulation time (min)
生理盐水 Physiological saline	10	等体积 Equal volume	17.23 ± 4.02	3.00 ± 1.23
止血环酸 Tranexamic acid	10	0.13	10.59 ± 6.34**	1.93 ± 1.31*
低 Low 侧柏叶 <i>Platycladus orientalis</i> leaf	10		13.91 ± 6.60	1.72 ± 1.47*
三七 <i>Panax notoginseng</i>	10	5	6.00 ± 4.82***	1.28 ± 1.04***
两面针 <i>Zanthorplum nitidum</i>	10		19.68 ± 6.21	1.99 ± 1.41
中 Meium 侧柏叶 <i>Platycladus orientalis</i> leaf	10		1.50 ± 1.23**	1.50 ± 1.23**
三七 <i>Panax notoginseng</i>	10	10	10.01 ± 6.82**	2.89 ± 1.87
两面针 <i>Zanthorplum nitidum</i>	10		19.23 ± 6.78	1.96 ± 1.29*
高 High 侧柏叶 <i>Platycladus orientalis</i> leaf	10		5.87 ± 3.01***	0.87 ± 0.48***
三七 <i>Panax notoginseng</i>	10	15	19.97 ± 4.86	3.25 ± 2.48
两面针 <i>Zanthorplum nitidum</i>	10		13.88 ± 4.96*	1.53 ± 1.49**

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 结论

本研究考察了侧柏叶、三七、两面针、止血环酸 4 种样品对血浆复钙时间、血小板聚集与粘附、凝血酶及抗凝血酶 III 活性的影响,发现 4 种样品均在不同程度上缩短血浆复钙时间(影响内源性凝血系统);促进血小板的聚集与粘附(加快血液凝固);影响凝血酶活性并抑制抗凝血酶 III 的活性等。此外,侧柏叶提取物对口腔致病菌变异链球菌及牙龈卟啉单胞菌有明显的杀菌作用,两面针仅可以抑制变异链球菌的生长,而三七无抗菌效果。已有研究表明,中草药提取物中的黄酮、生物碱、皂苷等活性成分具有止血、抗菌等作用^[10-11],因此,本实验中几种中草药抗菌止血活性的不同,可能是这几类成分的含量不同所致。三七的主要活性成分为三七总皂苷,而高剂量的三七总皂苷可

2.3 止血模型验证

由表 5 知,3 种剂量的侧柏叶组均显著地缩短小鼠出血时间与凝血时间,且剂量越高,效果越好;三七组低中剂量对小鼠出血与凝血的缩短效果比高剂量显著;两面针中高剂量时,才显著地缩短出血与凝血时间。样品所用剂量越低,对小鼠出血时间与凝血时间越短,说明该样品的止血效果越好。各样品低剂量的出血与凝血时间表明,三七与侧柏叶的止血效果比两面针好,这也与模型结论一致。

显著抑制血小板聚集与粘附,具有抗血栓的作用^[12],本实验也发现 15 g 生药 · kg⁻¹的三七与生理盐水相比有延长小鼠出血和凝血时间的趋势,即存在抗血栓的作用。

本研究还对 3 种中草药进行体外凝血及抗菌实验,建立体外止血模型,将所得检测数据运用到模型中,得到各样品的体外止血效果评价结果,止血效果好的为侧柏叶、三七、止血环酸;止血效果较好的为两面针;止血效果差的为生理盐水。小鼠出血及凝血实验发现,几种中草药与空白组相比均可缩短小鼠出血和凝血时间从而达到止血效果。样品止血的效果好坏与体外评价模型的结果基本一致。表明建立与动物实验相吻合的体外止血评价模型,解决了止血中草药筛选时工作量大,耗时耗力等缺点,为今后筛选具有高止血活性的中草药提供方法。此外,根据不同出

血情况可选择不同细菌如皮肤等外伤出血可选择其它致感染细菌带入模型,即改变抗菌评价指标,这也体现了所建模型灵活的适应性。

参考文献:

[1] 彭凯,张学兰,王莉,等. 荷叶不同炮制品提取物对正常大鼠凝血功能影响的比较研究[J]. 中成药,2013,35(1):140-143.
PENG K,ZHANG X L,WANG L,et al. Comparison among processed *Nelumbinis folium* extracts on normal rats coagulation function[J]. Chinese Traditional Patent Medicine,2013,35(1):140-143.

[2] 李高中,郭梅珍,张伟,等. 冬凌草对血浆复钙作用的凝血活性成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(13):59-61.
LI G S,GUO M Z,ZHANG W,et al. Effect of coagulant active constituents of *rabdosiae rubescentis herba* on plasma recalcification time[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2015,21(13):59-61.

[3] 杨瑞芳,吴宿慧,魏术会,等. 卷柏炒炭前后对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. 中医研究,2015,28(12):70-73.
YANG R F,WU S H,WEI S H,et al. Effects of *Cynanchum auriculatum* on blood bleeding time and coagulation time in mice [J]. TCM Research, 2015, 28(12):70-73.

[4] 郭亚军. 综合评价理论、方法及应用[M]. 北京:科学出版社,2007:38.
GUO Y J. Comprehensive evaluation theory method and application[M]. Beijing:Science Press,2007:38.

[5] 王欢,唐于平,郭建明,等. 当归-川芎药对不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(2):73-77.
WANG H,TANG Y P,GUO J M,et al. Effect of *radix angelica* and *Rhizoma ligusticum* with different proportions and preparation methods on platelet aggregation and prothrombin[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae,2010,16(2):73-77.

[6] 尹玉华,钟山,杨得坡. 蚂蟥药材总脂肪酸的 GC-MS 分析及其抗凝活性研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(3):520-521.

YIN Y H,ZHONG S,YANG D P. Analyzing composition of *whitmania pigra*' fatty acids and its anticoagulant activity[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2013,24(3):520-521.

[7] 汪宏良,蒋玉叶,马全新,等. 凝固时间法测定血浆 AT-III 活性[J]. 微循环学杂志,2005,15(4):68-69.
WANG H L,JIANG Y Y,MA Q X,et al. Establishment of the clotting-time method for determination of antithrombin III activity in human plasma [J]. Chinese Journal of Microcirculation,2005,15(4):68-69.

[8] BARBIERI D S V,TONIAL F,LOPEZ P V A,et al. Anti adherent activity of *Schinus terebinthifolius* and *Croton urucurana* extracts on in vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* [J]. Archives of Oral Biology,2014,59(9):887-896.

[9] 曲香芝,崔弘,陈正爱. 不同炮制法的淫羊藿提取物对小鼠出血和凝血时间的影响[J]. 时珍国医国药,2007,18(1):118-119.
QU X Z,CUI H,CHEN Z A. Effects of extraction of epimedy by different processed methods on bleeding and coagulation time in mice [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2007,18(1):118-119.

[10] 胡玉霞,余世春,王圣男,等. 凉血止血中药的研究进展[J]. 现代中药研究与实践,2014,28(2):66-69.
HU Y X,YU S C,WANG S N,et al. Research progress of Chinese medicine for cooling blood [J]. Research and Practice of Chinese Medicines,2014,28(2):66-69.

[11] 刘华钢,申庆荣,刘丽敏. 中药抗菌研究进展[J]. 时珍国医国药,2010,21(2):463-465.
LIU H G,SHEN Q R,LIU L M. The development of traditional Chinese medicine in antibacteria [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research,2010,21(2):463-465.

[12] 张玉军. 三七总皂苷的药理研究进展[J]. 广西医学,2009,31(4):598-591.
ZHANG Y J. Advances in pharmacology of *panax notoginseng* saponins [J]. Guangxi Medical Science,2009,31(4):598-591.

(责任编辑:尹 闯)