

## 2 种地龙饮片不同提取法体外抗凝活性对比研究

于小钧<sup>1</sup>, 张兵<sup>2</sup>, 薛晴<sup>1</sup>, 贺梦媛<sup>1</sup>, 徐桐<sup>1</sup>, 董萍<sup>1</sup>, 代龙<sup>3</sup>, 高鹏<sup>1\*</sup>(1.山东中医药大学, 济南 250355; 2.山东省食品药品审评认证中心 济南 250014; 3.滨州医学院, 山东 烟台 264033)

**摘要:** 目的 研究酒制对地龙体外抗凝活性的影响, 为地龙临床应用提供科学依据。方法 分别采用传统水提法和仿生酶解提取法对生品地龙、酒制地龙进行提取, 以活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)和抗凝血酶活力为指标进行抗凝活性测定, 并采用 BCA 蛋白测定法测定可溶性蛋白、多肽含量。结果 采用水提取法时, PT 和抗凝血酶滴定法均显示酒地龙与生地龙抗凝活性相当, TT 测定结果显示酒地龙抗凝血活性强于生地龙, APTT 测定结果则显示地龙具有促凝血活性, 且在一定范围内, 浓度越高, 促凝效果越强, 蛋白、多肽含量为酒地龙大于生地龙; 采用仿生酶解提取法时, APTT 和 PT 测定结果显示酒地龙的抗凝血活性强于生地龙, 并且蛋白、多肽含量测定结果显示酒地龙要多于生地龙, 但 TT 和抗凝血酶滴定法并未比较出生品与酒制品之间的差异。结论 与传统水提法相比, 仿生酶解提取法能更多地提取出蛋白多肽类成分, 仿生酶解提取液具有更强的抗凝血活性, 2 种提取法均显示地龙酒制有利于可溶性蛋白、多肽的溶出, 能增强体外抗凝血活性。

**关键词:** 地龙; 酒制; 酶解; 抗凝血; 生物活性

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)23-2955-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.007

引用本文: 于小钧, 张兵, 薛晴, 等. 2 种地龙饮片不同提取法体外抗凝活性对比研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 2955-2960.

### Comparative Study on Anticoagulant Activity *in Vitro* of Two Kinds of Pheretima by Different Extraction Methods

YU Xiaojun<sup>1</sup>, ZHANG Bing<sup>2</sup>, XUE Qing<sup>1</sup>, HE Mengyuan<sup>1</sup>, XU Tong<sup>1</sup>, DONG Ping<sup>1</sup>, DAI Long<sup>3</sup>, GAO Peng<sup>1\*</sup>  
(1.Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2.Shandong Food and Drug Evaluation and Certification Center, Jinan 250014, China; 3.Binzhou Medical College, Yantai 264033, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the effect of wine processing on the anticoagulant activity of Pheretima *in vitro*, and to provide scientific basis for clinical application of Pheretima. **METHODS** The traditional water extraction method and bionic enzymatic extraction method were used to extract the raw and wine made Pheretima. Activated partial thromboplastin time(APTT), prothrombin time(PT), thrombin time(TT) and antithrombin activity were selected as activity indexes to evaluate the anticoagulant activity of raw and wine made Pheretima. Then BCA method was applied to measure the content of soluble protein and polypeptide. **RESULTS** When water extraction was used, the results of PT and antithrombin titration showed that the anticoagulant activity of raw products and wine-processed products was the same. The results of TT showed that wine-processed products had stronger anticoagulant activity than raw products. The results of APTT showed that Pheretima had procoagulant activity, and in a certain range, the higher the concentration, the stronger the procoagulant effect. The content of protein and polypeptide in wine-processed products was higher than that in raw products. When biomimetic enzymolysis extraction method was used, the results of APTT and PT showed that the anticoagulant activity of wine-processed products was stronger than raw products. The results of protein and polypeptide content showed that the content of wine-processed products was higher than that of raw products. TT method and antithrombin titration method were not compared the difference between wine-processed products and raw products. **CONCLUSION** Compared with the traditional water extraction method, the bionic enzymatic extraction method can extract more protein and peptide components, and the bionic enzymatic hydrolysate has stronger anticoagulant activity. The results of the two extraction methods show that the wine making of Pheretima is beneficial to the dissolution of soluble protein and polypeptide, and could enhance the anticoagulant activity *in vitro*.

**KEYWORDS:** Pheretima; wine making; enzymolysis; anticoagulant; biological activity

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目(2019JZZY020906)

作者简介: 于小钧, 男, 硕士生 Tel: 18340078152 E-mail: 885014807@qq.com \*通信作者: 高鹏, 男, 博士, 教授 Tel: 15553115610  
E-mail: gaopeng@sducm.edu.cn

地龙, 别名蚯蚓、土龙、曲蟾等<sup>[1]</sup>, 性寒, 味咸, 归肝、脾、膀胱经, 具有清热定惊、通络、平喘、利尿等功效, 在《神农本草经》中首见记载, 药用历史悠久。中国药典 2020 年版<sup>[2]</sup>收载的地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E.Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体。前 1 种习称“广地龙”, 后 3 种习称“沪地龙”。文献报道地龙体内含有蛋白质和多肽、氨基酸、酶类、脂类、核苷酸等成分, 其中蛋白质含量最高<sup>[3]</sup>。现代研究表明, 地龙体内含有的蚓纤维蛋白溶解酶、蚓激酶、蚓胶原酶等蛋白多肽类成分具有抗凝血、纤溶等活性。

酒制地龙最早见于元代的《丹溪心法》<sup>[4]</sup>: “地龙酒炒”。研究表明, 地龙经过酒制后可以达到矫正不良气味和增强活血通络效果的作用<sup>[5-6]</sup>。由于目前对地龙酒制的研究主要是其炮制前后各种成分的变化, 至于其酒制后抗凝活性的研究几乎没有, 再者地龙在临床上常采用煮汤和粉末冲服<sup>[7]</sup>等方式入药, 因此本实验采用传统水煎和仿生酶解 2 种提取方式, 以活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 和抗凝血酶活性为评价指标对广地龙的生品和酒制品进行体外抗凝活性测定<sup>[8-9]</sup>, 并采用 BCA 蛋白测定法<sup>[10-11]</sup>测定提取液中可溶性蛋白及多肽的含量, 以初步解释抗凝活性变化的原因, 为中药地龙酒制的科学性及其合理应用提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

XL1000i 型全自动凝血测试仪 (北京众驰伟业科技发展有限公司); XS105 型十万分之一电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); PHS-25 型 PH 计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); AMR-100 型全自动酶标分析仪 (杭州奥盛仪器有限公司); PK-S24 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); Centrifuge 5810R 型高速冷冻式离心机 (德国 Eppendorf 股份有限公司)。

### 1.2 材料

参环毛蚓 [生地龙, 河北康派中药材有限公司, 由山东中医药大学张芳教授鉴定为参环毛蚓

*Pheretima aspergillum* (E.Perrier)]; 胃蛋白酶 (酶活力  $\geq 1\ 200\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ , 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20200925); 胰蛋白酶 (批号: L01A11Y110630)、凝血酶 (批号: P26A10Y86836); BCA 蛋白定量试剂盒 (批号: L11D11G134141) 均购自上海源叶生物科技有限公司; APTT、PT、TT 试剂盒 (北京众驰伟业科技发展有限公司, 批号分别为 L-3122030、F-3114040、2020-313403); 纤维蛋白原 (中国食品药品检定研究院, 批号: 140626-201611)。

### 1.3 动物

6 只 SD 大鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(京)2016-0006; 体质量 (300±10)g; 动物使用许可证号: SYXK(鲁)2017-0022。

## 2 方法

### 2.1 地龙的炮制

**2.1.1 生品地龙<sup>[2]</sup>** 取 30 g 地龙药材, 除杂, 净制, 切段, 干燥, 粉碎, 过 5 号筛, 备用。

**2.1.2 酒制地龙<sup>[12-13]</sup>** 取 30 g 地龙药材, 加入 3.75 g 黄酒拌匀, 稍闷润, 待酒被吸尽后 (30 min), 置炒制容器内, 用文火加热, 炒至表面呈棕色时, 取出晾凉, 粉碎, 过五号筛, 备用。

### 2.2 地龙各炮制品活性成分提取

**2.2.1 水提取法<sup>[4]</sup>** 分别取“2.1”项下生地龙和酒地龙粉末各 2.0 g, 加 10 倍量去离子水浸泡 30 min, 煮沸 30 min, 冷却至室温, 离心 (4 500 r·min<sup>-1</sup>) 10 min, 得上清液, 沉淀加 3 mL 去离子水洗涤 2 次后离心 (4 500 r·min<sup>-1</sup>) 10 min, 合并上清液, 去离子水定容至 25 mL, 得供试品。

**2.2.2 仿生酶解提取法<sup>[15]</sup>** 分别取“2.1”项下生地龙和酒地龙粉末各 2.0 g, 加 10 倍量去离子水, 85 °C 保持 15 min, 补足失重, 冷却至 40 °C, 稀盐酸调 pH 至 2.0, 加入胃蛋白酶 (酶底比 1%), 40 °C 酶解 1 h, 3 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0, 加入胰蛋白酶 (酶底比 1%), 40 °C 酶解 3 h, 85 °C 保持 15 min, 调 pH 至 7.0, 离心 (4 500 r·min<sup>-1</sup>) 10 min 得上清液, 沉淀加 3 mL 去离子水洗涤 2 次后离心 (4 500 r·min<sup>-1</sup>) 10 min, 合并上清液, 去离子水定容至 25 mL, 得供试品。

### 2.3 体外抗凝血活性测定<sup>[15]</sup>

**2.3.1 贫血小板血浆 (platelet poor plasma, PPP) 的制备** 取健康 SD 大鼠, 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血并与 3.2% 的枸橼酸钠抗凝剂以

9:1 混匀, 4 °C 离心(3 500 r·min<sup>-1</sup>)15 min, 得 PPP。

**2.3.2 APTT 测定** 取 270 μL PPP 和 150 μL 供试品溶液混匀, 作为待测样品, 取 50 μL 待测样品和 50 μL APTT 试剂于测试杯中, 混匀, 37 °C 孵育 3 min, 加 CaCl<sub>2</sub> 溶液 50 μL, 记录凝固时间, 同时以空白溶液为参比溶液。水提取样品以去离子水为空白溶液, 仿生酶解提取样品以空白酶解液为空白溶液。空白酶解液按“2.2.2”项下仿生提取所述, 除不加地龙粉末外, 其余步骤均相同。

**2.3.3 TT 的测定** 取 270 μL PPP 和 150 μL 供试品溶液混匀, 作为待测样品, 取 100 μL 待测样品于测试杯中, 37 °C 孵育 3 min, 加 100 μL TT 试剂, 记录凝固时间, 同时以空白溶液为参比溶液。水提取样品以去离子水为空白溶液, 仿生酶解提取样品以空白酶解液为空白溶液。空白酶解液按“2.2.2”项下仿生提取所述, 除不加地龙粉末外, 其余步骤均相同。

**2.3.4 PT 的测定** 取 150 μL PPP 和 150 μL 供试品溶液混匀, 作为待测样品, 吸取 50 μL 待测样品于测试杯中, 37 °C 孵育 3 min, 加 PT 试剂 100 μL, 记录凝固时间, 同时以空白溶液为参比溶液。水提取样品以去离子水为空白溶液, 仿生酶解提取样品以空白酶解液为空白溶液。空白酶解液按“2.2.2”项下方法仿生提取, 除不加地龙粉末外, 其余步骤均相同。

**2.3.5 不同浓度水提取液 APTT 的测定** 分别取“2.1”项下生地龙和酒地龙粉末各 5.0 g, 加 25 mL 去离子水浸泡 30 min, 然后按“2.2.1”项下自“煮沸 30 min”起往后操作, 得供试品。将供试品稀释得含原药粉浓度为 0.050, 0.075, 0.100, 0.150, 0.200 g·mL<sup>-1</sup> 共 5 个浓度的生地龙及酒地龙水提取液, 将以上 5 个浓度梯度的水提液按“2.3.2”项下方法测定 APTT。

**2.3.6 抗凝血酶活性测定** 取供试品溶液 100 μL 置试管中, 加入含 0.5%(牛)纤维蛋白原的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液(pH=7.4) 200 μL 摇匀, 置水浴中(37±0.5)°C 温浸 5 min, 滴加每 1 mL 中含 10 单位的凝血酶溶液(每 4 min 滴加 1 次, 每次 2 μL, 边滴加边轻轻摇匀)至凝固, 记录消耗凝血酶溶液的体积, 计算抗凝血酶活性。

## 2.4 地龙提取液中可溶性蛋白及多肽含量的测定

**2.4.1 蛋白标准[牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)]溶液的配制** 将 20 mg BSA 溶于

1 mL 蛋白标准配制液得 20 mg·mL<sup>-1</sup> BSA 溶液, 取 50 μL BSA 溶液(20 mg·mL<sup>-1</sup>)加 950 μL 生理盐水混匀得 1 000 μg·mL<sup>-1</sup> BSA 溶液。

**2.4.2 BCA 工作液配制** 取 20 mL BCA 试剂 A 与 0.4 mL BCA 试剂 B 混匀得 BCA 工作液。

**2.4.3 标准曲线的制备及供试品蛋白含量测定** 将 1 000 μg·mL<sup>-1</sup> BSA 溶液按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 加入 96 孔板中。取“2.2.1”项下各供试品溶液及空白水提液 2 μL 加入 96 孔板中。取“2.2.2”项下各供试品溶液及空白酶解液的 10 倍稀释液各 4 μL 加入 96 孔板中。将以上各孔用生理盐水补至 20 μL 后, 再加 200 μL BCA 工作液, 37 °C 孵育 30 min, 酶标仪测定 562 nm 处吸光度, 计算出标准曲线及回归方程, 根据标准曲线计算出待测样品的蛋白和多肽的含量。

## 2.5 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组样本间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Dunnett-t 法。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 APTT 测定结果

生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液的 APTT 测定结果见表 1 及图 1。

表 1 生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液 APTT 测定结果( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Tab. 1 Determination of APTT in water extract and bionic enzymatic hydrolysate of raw and wine made Pheretima ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

样品	APTT/s	
	水提取液	仿生酶解提取液
空白组	24.50±0.30	25.10±0.19
生地龙	21.04±0.30 <sup>1)</sup>	55.13±0.34 <sup>1)3)</sup>
酒地龙	21.42±0.16 <sup>1)2)</sup>	59.75±0.26 <sup>1)2)3)</sup>

注: 与空白组相比, <sup>1)</sup>P<0.05; 与生地龙组相比, <sup>2)</sup>P<0.05; 与水提液相比, <sup>3)</sup>P<0.05。

Note: Compared with the blank group, <sup>1)</sup>P<0.05; compared with raw made Pheretima, <sup>2)</sup>P<0.05; compared with water extraction solution, <sup>3)</sup>P<0.05.

APTT 测定结果显示, 地龙水提液具有一定的促凝效果, 与生地龙组相比, 酒地龙促凝血活性升高(P<0.05); 而仿生酶解提取液具有显著的抗凝血活性, 且与生地龙组相比, 酒地龙抗凝血活性显著升高(P<0.05)。

APTT 反映的是内源性凝血途径, 参与的凝血因子主要有 VIII、IX、XI、XII 等, 因此水提液具有促凝血活性说明水提液中具有能激活以上凝血

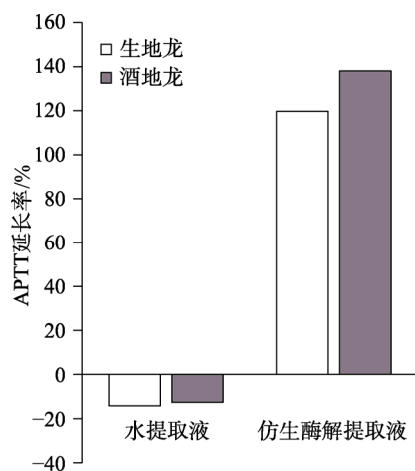


图 1 生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液对 APTT 延长率的影响

Fig. 1 Effect of water extract and bionic enzyme hydrolysate of raw and wine made Pheretima on APTT prolongation

因子中一种或几种的成分, 酒制后促凝活性减弱, 从侧面也反映了抗凝血活性的增强。

### 3.2 PT 测定结果

生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液的 PT 测定结果见表 2 及图 2。

表 2 生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液 PT 测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Tab. 2 Determination of PT in water extract and bionic enzymatic hydrolysate of raw and wine made Pheretima ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

样品	PT/s	
	水提取液	仿生酶解提取液
空白组	13.05±0.13	13.54±0.09
生地龙	14.08±0.29 <sup>1)</sup>	15.50±0.25 <sup>1)3)</sup>
酒地龙	14.21±0.30 <sup>1)</sup>	17.27±0.30 <sup>1)2)3)</sup>

注: 与空白组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与生地龙组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与水提液相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with raw made Pheretima, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with water extraction solution, <sup>3)</sup> $P<0.05$ .

PT 结果显示, 地龙水提液具有一定抗凝血活性, 但酒制前后并无显著差异, 仿生酶解提取液具有很强的抗凝血活性, 且与生地龙组相比, 酒地龙抗凝血活性明显增强( $P<0.05$ )。

PT 反应的是外源性凝血途径, 参与的凝血因子主要有 III、VII 等, 本实验表明, 地龙体内含有能抑制内源性凝血因子的成分, 仿生酶解提取液还表明, 酒制可能有利于这些成分的溶出。

### 3.3 TT 测定结果

生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液的 TT 测定结果见表 3 及图 3。

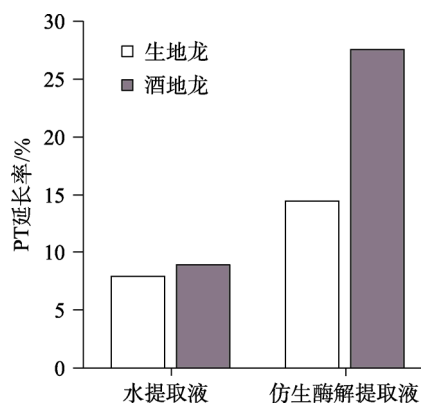


图 2 生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液对 PT 延长率的影响

Fig. 2 Effect of water extract and bionic enzyme hydrolysate of raw and wine made Pheretima on PT prolongation

表 3 生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液 TT 测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Tab. 3 Determination of TT in water extract and bionic enzymatic hydrolysate of raw and wine made Pheretima ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

样品	TT/s	
	水提取法	仿生酶解提取法
空白参比	20.81±0.22	22.51±0.15
生地龙	21.99±0.32 <sup>1)</sup>	58.84±0.21 <sup>1)3)</sup>
酒地龙	22.33±0.25 <sup>1)2)</sup>	58.97±0.25 <sup>1)3)</sup>

注: 与空白组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ , 与生地龙组相比, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与水提液相比, <sup>3)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ ; compared with raw made Pheretima, <sup>2)</sup> $P<0.05$ ; compared with water extraction solution, <sup>3)</sup> $P<0.05$ .

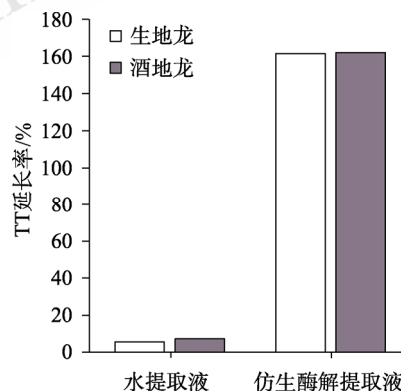


图 3 生地龙和酒地龙水提取液及仿生酶解提取液对 TT 延长率的影响

Fig. 3 Effect of water extract and bionic enzyme hydrolysate of raw and wine made Pheretima on TT prolongation

TT 法的测定原理是往含样品的血浆中加入凝血酶, 记录凝固时间, 反映凝血的共同途径, TT 延长说明样品中含有能抑制凝血酶或纤维蛋白原的成分。

本实验水提取液中,与生地龙相比,酒地龙抗凝活性显著增强( $P<0.05$ ),仿生酶解提取液中,生地龙与酒地龙的抗凝血活性均无明显差异,2种提取方法比较,无论是否炮制,仿生酶解液的抗凝活性均强于水提液。

### 3.4 不同浓度水提取液 APTT 测定结果

不同浓度水提取液 APTT 测定结果见表 4 及图 4。

表 4 生地龙和酒地龙不同浓度水提取液 APTT 测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 4 Determination of APTT in different concentration water extracts of raw and wine made Pheretima ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

浓度/ $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	APTT/s	
	生地龙	酒地龙
0.000	22.00±0.12	22.00±0.12
0.050	18.88±0.16 <sup>1)</sup>	19.04±0.08 <sup>1)</sup>
0.075	18.00±0.16 <sup>1)</sup>	18.20±0.04 <sup>1)</sup>
0.100	17.16±0.20 <sup>1)</sup>	17.36±0.08 <sup>1)</sup>
0.150	16.16±0.18 <sup>1)</sup>	15.84±0.16 <sup>1)</sup>
0.200	15.28±0.24 <sup>1)</sup>	14.72±0.08 <sup>1)</sup>

注: 0.000  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  即空白参比液。与空白组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

Note: 0.000  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  was the blank reference solution. Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ .

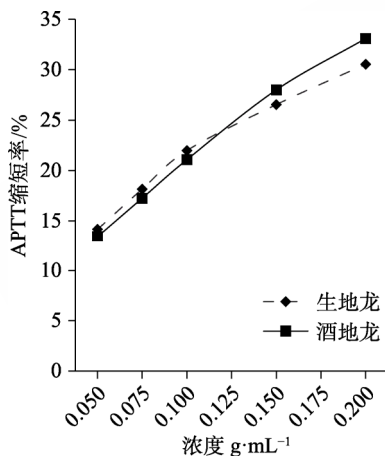


图 4 生地龙与酒地龙不同浓度水提取液的 APTT 缩短效果  
Fig. 4 APTT shortening effect of different concentrations of water extracts of raw and wine made Pheretima

生地龙和酒地龙不同浓度水提液 APTT 测定结果表明,在一定浓度范围内,水提液中的促凝血作用随着浓度的升高而不断增强。

### 3.5 抗凝血酶活性测定结果

记录各组样品消耗凝血酶的体积,计算出各组样品的抗凝血酶活性,结果见表 5。

凝血酶滴定法和 TT 法原理相同,都反映凝血的共同途径,从凝血酶滴定结果来看,水提取液未显示出抗凝血活性,但 TT 结果表明水提液有一

表 5 地龙不同炮制品抗凝血酶滴定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab. 5 Antithrombin titration results of different processed products of Pheretima ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	水提取液		仿生酶解提取液	
	消耗凝血酶体积/ $\mu\text{L}$	抗凝血酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	消耗凝血酶体积/ $\mu\text{L}$	抗凝血酶活性/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白参比	2±0	—	2±0	—
生地龙	2±0	≤0.2	8±0 <sup>1)</sup>	0.8
酒地龙	2±0	≤0.2	8±0 <sup>1)</sup>	0.8

注:与空白组相比, <sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank group, <sup>1)</sup> $P<0.05$ .

定的抗凝血活性,原因可能是水提液的抗凝血活性较弱,抗凝血酶滴定法灵敏度低而检测不到;仿生酶解提取液的测定结果与 TT 结果一致,即酒制前后抗凝活性都很强。

### 3.6 蛋白、多肽含量测定结果

以 BSA 为对照品,采用 BCA 法测定提取液中蛋白和多肽含量,标准曲线线性回归方程为  $Y=2.00 \times 10^{-4}X+0.0161$  ( $R^2=0.9990, n=6$ )。水提取液及仿生酶解提取液的蛋白、多肽含量测定结果见表 6。

表 6 地龙水提取液和仿生酶解提取液蛋白及多肽含量测定

Tab. 6 Determination of protein and polypeptide in water extract and bionic enzymatic hydrolysate of Pheretima

组别	水提取液/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	仿生酶解提取液/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
生地龙	5 411.67	24 558.25
酒地龙	6 378.33	25 141.58

蛋白含量测定结果显示,无论是水提液还是仿生酶解提取液,酒地龙的多肽含量均要比生地龙高。仿生酶解提取液的多肽含量高于水提液,抗凝血活性也强于水提液,这说明地龙多肽应是地龙发挥抗凝血活性的重要成分。

## 4 讨论

地龙体内含有丰富的蛋白质,且其蛋白、多肽类成分是其发挥抗凝作用的基础,仿生酶解会使蛋白质分解为多肽,这导致水提取液和仿生酶解提取液的抗凝血活性差异很大。本研究表明,2种提取方式的测定结果大同小异。在水提取法中,除抗凝血酶滴定法未比较出酒制前后差异外,APTT 和 TT 结果均显示,酒制后地龙的抗凝血活性明显提高。仿生酶解提取法中,TT 和抗凝血酶滴定法均未比较出酒制前后差异,但 PT 和 APTT 较酒制前均有大幅增加。蛋白及多肽含量测定结果也表明,酒制后提取液中蛋白及多肽含量会增加。因此,2种提取方法均明确表明,酒制有助于

蛋白及多肽类成分的溶出, 并有增强地龙抗凝血活性的作用。

地龙酒制的过程中, 先后经过了黄酒闷润和高温炒制。张砾岩等<sup>[16]</sup>研究发现, 地龙乙醇渗漉液的抗凝血活性要高于水提液, 且由乙醇提取过的药渣再提取得到的提取液几乎不具备抗凝血活性, 因此乙醇具有促进地龙体内抗凝血活性成分溶出的作用, 高温会将蛋白质的高级结构破坏, 使结构变得疏松、伸展, 更容易被水解<sup>[9]</sup>, 因此用黄酒闷润过的地龙再经过炒制后能有利于抗凝血活性成分溶出。

本实验中, 地龙水提液在内源性凝血途径上显示出促凝血活性, 为探究其促凝活性与浓度的关系, 本实验增加投料量得到高浓度的水提液, 并稀释成系列浓度, 分别测定 APTT, 结果显示, 在一定范围内, 地龙水提液的促凝血活性随其浓度升高而增强。本课题组推测, 产生促凝血活性的是大分子的蛋白类成分, 这些成分经过仿生酶解后被分解为小分子的多肽类成分, 导致促凝血活性消失, 而小分子成分多肽具有抗凝血活性, 因此仿生酶解液与水提液表现出相反的生物活性。除此之外, Zhao 等<sup>[17]</sup>研究发现赤子爱胜蚓蛋白酶-III-1 (E/P-III-1) 不仅在纤维蛋白溶解的过程中起作用, 而且在纤维蛋白形成的过程中起作用, 其机理为其可以激活凝血酶原(类似 Xa 因子的功能), 产生凝血酶, 进而发挥促凝效果。这也佐证了地龙体内含有促凝物质。

本实验采用了多个指标对地龙体外抗凝活性进行评价, 结果表明各指标均能体现地龙的相应活性, 但笔者认为, 要综合评价地龙及其抗凝血活性, 还需进行体内活性验证, 将体内外活性关联起来, 寻找最能反映体内活性的几个指标, 并用合适的统计学方法计算这几个指标相对于地龙抗凝血作用综合药效指标的药效系数, 得出地龙抗凝作用的综合药效指标, 形成一个综合的评价方法, 以便更好地对地龙的抗凝活性进行评价。

综上所述, 与传统水提取法相比, 仿生酶解提取法能更多地提取出抗凝血活性成分; 酒制有利于地龙蛋白及多肽类成分的溶出, 并可以增强体外抗凝活性。此外, 本实验发现地龙体内含有促凝血的成分。以抗凝血活性为主, 含有少量促进凝血的成分, 这可能是地龙临床应用中既能发挥抗凝血作用, 又很少出现难以止血现象的原因

之一, 可进一步研究其作用机制, 为地龙的临床应用提供更可靠的数据支持。

## REFERENCES

- [1] GUAN S Q, ZHOU G L, ZHOU W L, et al. Herbal textual research and modern analysis of *Pheretima*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(10): 205-212.
- [2] 中国药典. 一部[S]. 2020: 127.
- [3] HUANG Q, LI Z W, MA Z G, et al. Research progress of *Pheretima*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(13): 220-226.
- [4] (元)朱震亨撰. 丹溪心法[M]. 北京: 中国书店, 1986: 264.
- [5] 谭玲龙, 钟凌云. 地龙的炮制研究进展[J]. *江西中医药*, 2017, 48(10): 75-77, 80.
- [6] WAN M, YANG X, ZHANG T, et al. Study on separation of anticoagulant active fractions from *Pheretima guillelmi*[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2018, 29(1): 49-53.
- [7] WU Y L, MA Y N, ZHANG Q, et al. Research on the determination of *in vitro* anticoagulant activity of earthworms[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2019, 36(20): 2527-2530.
- [8] SHAN Y, ZHANG J M, DING Y Z, et al. *In vitro* anticoagulant activity of different processed products of *Whitmania pigra* by water extraction and bionic extraction[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2016, 41(10): 1843-1848.
- [9] WANG C L, CONG Z F, LIU G F, et al. Effects of different processed products of *Whitmania pigra* on hemorheology and coagulation indexes in acute blood stasis model rats[J]. *China Pharm*(中国药房), 2020, 31(16): 1984-1988.
- [10] HAN F L, YUAN C L, GUO A Q, et al. The principle, influence factors and advantages of bicinchoninic acid method (BCA) for protein and peptide assay[J]. *Food Ferment Ind*(食品与发酵工业), 2014, 40(11): 202-207.
- [11] 顾念念. 中药水蛭的质量标准及抗血栓物质基础的初步研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [12] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范(2015年版)[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 92-93.
- [13] XIONG S Q, TAN L L, ZHONG L Y, et al. Processing with wine technology optimization for *Lumbricus* and comparison of the constituents before and after processing[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2019, 41(12): 2953-2957.
- [14] LI T, YANG J, ZHANG T. Optimization of water extraction and purification process of *Lumbricus* by multiple indicators grading method[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2016, 25(19): 2255-2261.
- [15] WANG C L, LIU G F, XIANG Z D, et al. A study on *in vitro* anticoagulant activity from different parts of *Whitmania pigra* Whitman by bionic extraction[J]. *Shandong Sci*(山东科学), 2020, 33(4): 13-17.
- [16] ZHANG L Y, LI L. Extraction of anti-thrombotic constituent from Earthworm (*Pheretima*)[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2010, 32(5): 758-761.
- [17] ZHAO J, PAN R, HE J, et al. *Eisenia fetida* protease-III-1 functions in both fibrinolysis and fibrogenesis[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2007(2007): 1-10.

收稿日期: 2021-04-09  
(本文责编: 陈怡心)