地龙抗凝血活性体外评价方法的建立

吴娅丽，马韫楠，张琦，喻祥龙，杜守颖*(北京中医药大学，北京 100029)

摘要：目的 建立一种基于全自动血凝分析仪测定纤维蛋白原-凝血酶时间的地龙及其相关制剂的抗凝血活性的体外评价方法。**方法** 以威廉环毛蚓提取物为研究对象，采用 BCA 蛋白测定法测定可溶性蛋白含量，以抗凝血活性为指标，建立纤维蛋白原-凝血酶时间法测定活性，以活性浓度与可溶性蛋白浓度的比值(比活)作为活性评价指标。**结果** 10 批地龙提取物可溶性蛋白含量为(26.56±3.57)%，比活为(34.64±3.98)U·μg^{-1}。其比活大小与蚓激酶标准品(43.60 U·μg^{-1})相当，且是市售蚯蚓酶(22.17 U·μg^{-1})比活的 1.5 倍。**结论** 采用 BCA 蛋白测定法测定地龙提取物可溶性蛋白，方法简便、可靠；所建立的纤维蛋白原-凝血酶时间法，操作简便，人为影响因素小，结果客观准确，可用于实时测定，重复性和仪器精密度良好，线性范围较广，具有可行性，可用于地龙及其制剂活性的评价。

关键词：威廉环毛蚓；可溶性蛋白；纤维蛋白原–凝血酶时间；比活

中图分类号：R282.74　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2019)20-2527-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.007

引用本文：吴娅丽，马韫楠，张琦，等. 地龙抗凝血活性体外评价方法的建立[J]. 中国现代应用药学，2019，36(20)：2527-2530.

Research on the Determination of *in Vitro* Anticoagulant Activity of Earthworms

WU Yali, MA Yunnan, ZHANG Qi, YU Xianglong, DU Shouying*(*Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method to evaluate the anticoagulant activity of earthworms and corresponding preparations based on the measurement of fibrinogen-thrombin time with automatic hemagglutination analyzer. **METHODS** *Pheretima guillelmi* extracts was used as test sample, and BCA method was applied to measure the content of soluble protein, and fibrinogen-thrombin time method was established to evaluate the antithrombin activity of earthworm, using the ratio of active concentration to soluble protein concentration as the index. **RESULTS** The protein content of ten bathes earthworms was (26.56±3.57)%. The specific activity of these earthworms was (34.64±3.98)U·μg^{-1}, which was similar to the activity of lumbrokinase (43.60 U·μg^{-1}), and 1.5-fold of purchased earthworm enzyme (22.17 U·μg^{-1}). **CONCLUSION** BCA method is applied to measure the soluble protein content of earthworms, and it is verified to be reliable and convenient. The established fibrinogen-thrombin time method express to be convenient operation, objective result and real-time measurement properties, with satisfactory methodological evaluation results, and can be used to evaluate the bioactivity of earthworms and related preparations.

KEYWORDS: *Pheretima guillelmi*; soluble protein; fibrinogen-thrombin time; specific activity

地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum (*E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen)或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Mkhaeken 的干燥体[1]。含有酶类、蛋白质及多肽、氨基酸等活性物质[2]，现代研究表明，其有平喘、抗凝血、抗血栓、抗肿瘤、降压等药理作用[3]。

Mihara 等[4]在 1991 年从正蚓科地龙中发现了一类直接溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原的酶类成分，此类纤维蛋白水解酶多来自于粉正蚓、赤子爱胜蚓及环毛蚓属，且其组成由地龙的种属和生活环境决定[5]。

中药地龙来源复杂、规格较多，中国药典 2015 年版[1]并未规定地龙药材的成分及含量测定方法，且未对地龙药材的活性测定提供参考方法。本实验以不同批次威廉环毛蚓提取物为研究对象，采用分光光度法，以蛋白标准溶液[牛血清蛋白(bovine serum albumin，BSA)]为对照，BCA 显色，测定可溶性蛋白质含量；并参考苏斌等[6]对水蛭质量控制的研究方法，建立了纤维蛋白原-凝血酶时间(fibrinogen-thrombin time，Fib-TT)法反应体系，以蚓激酶标准品为对照测定不同批次威廉环毛蚓提取物的活性，并以活性浓度与可溶性蛋白浓度的比值(比活)为指标评价不同批次威廉环毛蚓提

作者简介：吴娅丽，女，博士生　Tel: 17812163932　E-mail: wuyali1993@163.com　***通信作者：**杜守颖，女，博士，教授，博导　Tel: 13911053905　E-mail: dushouying@263.net

取物的抗凝血活性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

CA500 全自动血凝分析仪(Sysmex)；Multiscan Go 全波长酶标仪(Thermo Scientific)；实验室 pH 计(Mettler Toledo)；KQ 5200 DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)等。

1.2 材料

纤维蛋白原(牛血)(批号：140626-201611)、凝血酶(牛血)(批号：140605-201526)、蚓激酶(批号：140650-201703)，均购自中国食品药品检定研究院；蚯蚓酶(PS1，精制级，上海源叶)；生理盐水(山东华鲁制药有限公司，批号：H18022817)；威廉环毛蚓提取物(以下称为地龙提取物)由云南永安制药有限公司提供，批次分别为 T1818005，T1818006，T1818007，T1818010，T1818011，T1818012，051812，051813，051704，051609B；BCA 蛋白含量检测试剂盒(凯基生物，批号：KGP902)；其他试剂均为分析纯，购自北京高华伟业有限公司。

2 方法

2.1 地龙提取物浸提液(地龙提取液)的制备

取 10 批地龙提取物制备浸提液，取地龙提取物约 20 mg，精密称定，加生理盐水定容至 5.0 mL，涡旋 30 s，超声 10 min，离心(8 000 r·min^{-1}，15 min)，取上清液即得地龙提取液，备用。

2.2 地龙提取液可溶性蛋白含量的测定

取“2.1”项下地龙提取液，采用 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定供试品的可溶性蛋白含量，按试剂盒说明书操作，加样后室温振荡 30 s，37 ℃放置反应 30 min，562 nm 下测定吸光度，以蛋白标准溶液(BSA)做随行标准曲线，计算地龙提取液的可溶性蛋白含量。

2.3 地龙提取物的抗凝血活性测定及方法学考察

2.3.1 地龙提取液及蚓激酶标准品溶液的配制 称取地龙提取物，用生理盐水配制为 1 000 mg·L^{-1} 样品，离心取上清液，用生理盐水稀释为 40，80，160，320，640，800 mg·L^{-1} 的系列浓度样品。取蚓激酶标准品(每支 27 000 U)，加去离子水配制成 27 000 U·mL^{-1} 的储备液，用去离子水逐级稀释至 250，500，1 000，2 000，3 000 U·mL^{-1} 系列活性浓度的溶液。

2.3.2 纤维蛋白原和凝血酶溶液的制备 纤维蛋白原溶液：称取 0.04 g 纤维蛋白原，加入生理盐水 10 mL 溶解即得 0.4 %纤维蛋白原溶液。

2 BP·mL^{-1} 凝血酶溶液：凝血酶(每支 160 BP)中加入 4 mL 生理盐水溶解，分装；再用生理盐水稀释至 2 BP·mL^{-1}。

2.3.3 测定方法 以 Fib-TT 为抗凝血活性指标，测定不同批次地龙提取液的抗凝血活性。取地龙提取液，稀释至全自动血凝分析仪可测浓度范围，按程序设定参数(纤维蛋白原 90 μL，试样液 10 μL，凝血酶 50 μL)测定 Fib-TT，以系列浓度蚓激酶标准品做随行标准曲线，计算地龙提取液的活性浓度。

2.3.4 Fib-TT 法的方法学考察

2.3.4.1 线性范围 以溶剂为空白对照，分别取“2.3.1”项下蚓激酶标准品和地龙提取液，全自动血凝分析仪测定 Fib-TT，以系列浓度蚓激酶标准品溶液确定可测得的活性浓度范围，以系列浓度地龙提取物浸提液确定可测得的浓度范围。

2.3.4.2 仪器精密度试验 取 320 mg·mL^{-1} 地龙提取液，连续测定 6 次，计算对数 Fib-TT，并计算 RSD 值。

2.3.4.3 重复性试验 取地龙提取物(批次：T1818006)，依据“2.1”项下方法平行制备 6 份供试品，用去离子水稀释至全自动血凝分析仪可测得范围内，依据“2.3.3”项下方法测定 Fib-TT，计算 RSD 值。

2.3.5 不同批次地龙提取液的比活测定 依据“2.2”项下可溶性蛋白的测定方法，测定“2.3.3”项下稀释后的地龙提取液的可溶性蛋白浓度，以活性浓度(U)与可溶性蛋白浓度(C)的比值为不同批次地龙提取物的比活。

2.4 结果统计

以 BSA 为对照计算地龙提取物的可溶性蛋白含量；以蚓激酶标准品为对照计算地龙提取物的抗凝血活性；并以活性浓度(U)与可溶性蛋白浓度(C)的比值计算地龙提取物的比活。多次测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 Fib-TT 法方法学考察结果

3.1.1 线性范围考察 以溶剂为空白对照，全自动血凝分析仪测定系列活性浓度(250，500，1 000，2 000，3 000 U·mL^{-1})蚓激酶标准品液以及系列质量浓度(0，40，80，160，320，640，800 mg·L^{-1})地龙提取液的 Fib-TT。以蚓激酶标准品活性浓度

(或地龙提取液质量浓度)为横坐标，相对 Fib-TT 的对数为纵坐标进行线性回归。蚓激酶标准品液和地龙提取液的回归方程分别为 y=0.000 6x–0.077 6 (r=0.993 5)和 y=0.000 7x+1.192 9(r=0.995 0)。

可知蚓激酶标准品在 250~3 000 U·mL^{-1} 活性浓度范围内，地龙提取液在 0~800 mg·L^{-1} 内与相对 Fib-TT 的对数呈现良好的线性关系。

3.1.2 仪器精密度试验 按照“2.3.3”项下测定方法，对 320 mg·L^{-1} 地龙提取液连续测定 6 次，其对数 Fib-TT 的结果为 1.38±0.00，RSD=0.22%。提示仪器精密度良好。

3.1.3 重复性试验 按照“2.3.3”项下测定方法，T1818006 批次地龙提取物的活性浓度为(1 858.27±16.50)U·mL^{-1}(RSD=0.89%)。提示测定方法重复性良好。

3.2 不同批次地龙提取液中可溶性蛋白含量及比活测定结果

按照“2.2”“2.3”项下可溶性蛋白含量及 Fib-TT 的测定方法测定不同批次地龙提取物的可溶性蛋白含量以及抗凝血活性。并计算其比活大小。结果显示，10 批威廉环毛蚓提取物的可溶性蛋白含量为(26.56±3.57)%，比活为(34.64±3.98)%。其比活大小与蚓激酶标准品(43.60 U·μg^{-1})相当，且是市售蚯蚓酶(22.17 U·μg^{-1})比活的 1.5 倍，见表 1。

表 1 10 批威廉环毛蚓提取物的可溶性蛋白含量测定，及其与蚓激酶标准品、市售蚯蚓酶的比活($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Soluble protein determination of ten batches of earthworm extract and specific activity of lumbrokinase and purchased earthworm enzyme($\bar{x}\pm s$)

批号	可溶性蛋白含量/%	活性/U·mL^{-1}	比活/U·μg^{-1}
051609B	24.29±0.48	1 666.66±25.25	35.87±1.02
051704	29.04±0.78	1 915.42±11.44	35.16±1.84
051812	25.46±0.54	1 451.71±9.05	28.14±0.62
051813	24.72±0.66	1 728.46 ±11.80	35.24±0.81
T1818005	27.31±0.65	1 854.07±21.40	34.38±0.98
T1818006	23.38±0.40	1 868.12±14.77	41.49±1.10
T1818007	20.07±0.18	1 284.08±30.74	30.71±0.83
T1818010	30.78±0.54	1 892.80±21.92	31.15±1.02
T1818011	29.77±0.14	2 024.28±0.91	34.73±0.46
T1818012	28.51±0.33	2 273.54±7.34	39.85±0.91
10 批地龙提取物平均值	26.56±3.57	1 795.91±267.84	34.64±3.98
蚓激酶标准品	–	2 000.00	43.60
市售蚯蚓酶	–	2 453.20	22.17

4 讨论

中国药典 2015 年版尚未设定地龙的对照药材，且并无任何活性测定方法与评价指标，目前文献[7-9]多采用纤维蛋白平板法评价地龙抗凝血活性，不同批号的纤维蛋白原试剂可能使得制成的平板中纤维蛋白浓度不一致而导致活性测定的重复性差[10]，本实验前期考察了纤维蛋白平板法，该法需要孵育 18 h 后检测，且每个平板中点样数量有限，无法进行大量样本实时测定。因此本实验在水蛭抗凝活性测定实验的基础上，初步建立了地龙的抗凝活性评价指标——Fib-TT。

Fib-TT 法用于测定对凝血酶的抑制活性，反应体系固定，用全自动血凝分析仪测定，有固定的凝固终点的判定标准，不需人为的判定反应终点[6]。且通过方法学考察得知该方法仪器精密度、重复性均良好。

由于临床人血浆纤维蛋白原的含量为 2~4 g·L^{-1}，故在全自动血凝分析仪 Fib-TT 固定的参数设置条件下，确定纤维蛋白原浓度为 0.4%。根据苏斌等[6]的方法，调整凝血酶浓度为 2 BP·mL^{-1}。

有研究表明地龙中抗凝活性成分主要是蛋白质[2]。地龙溶栓蛋白，蚓激酶，只有在纤维蛋白存在下具有抗凝血的作用[11]。有文献报导从粉正蚓[4]、赤子爱胜蚓[12-13]、印度蚯蚓[14]中分离提取出直接溶解纤维蛋白(原)的蛋白组分，故推测地龙具有直接溶解纤维蛋白原的作用，从而抑制纤维蛋白的形成，因此可用 Fib-TT 作为抗凝血活性的评价指标。本实验中选用 Fib-TT 为指标，并研究发现在一定线性范围内，蚓激酶标准品的活性浓度、威廉环毛蚓提取液的质量浓度与对数 Fib-TT 呈良好线性关系，线性范围分别在 250~3 000 U·mL^{-1}，0~800 mg·L^{-1}，相关系数均>0.99，说明该方法具有较宽的线性范围。其仪器精密度、重复性考察均合格，且所得数据客观，并可及时测定供试品，故可用于地龙药材的抗凝血活性测定。

文献多采用考马斯亮蓝法检测动物药中可溶性蛋白含量[8,15-16]，经本实验前期考察，考马斯亮蓝法所测得可溶性蛋白含量显著低于 BCA 法测定的含量，故采用 BCA 法测定，有商业化试剂盒，操作方便，数据重复性良好(RSD=2.11%)。经测定，10 批地龙提取物中可溶性蛋白含量为(26.56±3.57)%，活性为(1 795.91±267.84)U·mL^{-1}，

比活为(34.64±3.98)U·μg^{-1}。其比活与蚓激酶标准品相当，且是市售蚯蚓酶比活的 1.5 倍。

综上所述，本实验以威廉环毛蚓提取物为研究对象，建立了地龙中可溶性蛋白的含量测定方法，及可用于评价地龙及其相关制剂抗凝血活性的体外测定指标，可以为中国药典地龙的质量控制标准提供参考，同时为建立含地龙制剂的质量控制方法提供参考。通过与蚓激酶标准品、市售蚯蚓酶的比活比较，发现威廉环毛蚓提取物具有良好的抗凝血活性，可进一步分离纯化，进行相关机制研究，进而制备不具出血不良反应的口服抗凝剂。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2015.

[2] DU H, SUN J M, GUO X Q, et al. The chemical composition and pharmacological action of earthworms [J]. Jilin J Tradit Chin Med(吉林中医药), 2014, 34(7): 707-709.

[3] 刘调调, 李晓红, 巩丽丽. 地龙药理作用研究进展[J]. 山东中医杂志, 2012, 31(7): 529-531.

[4] MIHARA H, SUMI H, YONETA T, et al. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, lumbricus rubellus [J]. Jpn J Physiol, 1991, 41(3): 461-472.

[5] PAN R, ZHANG Z J, HE R Q. Earthworm protease [J]. Appl Environ Soil Sci, 2010(2010): 1-13.

[6] SU B, WANG Z B, GUO Y D, et al. Research on the method of fibrinogen-thrombin time by coagulometer for quality control of hirudo [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(10): 1802-1806.

[7] LI J, XU Y T, WANG Y X, et al. Study on best preparation procedure of Lumbricus for anticoagulated blood region in vitro [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36(7): 850-853.

[8] 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.

[9] XU Y L, WU Y, LI P C, et al. Re-evaluation for quality standard of Compound Lumbrical Capsule based on enzyme activity [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48(7): 1340-1343.

[10] 黄飞, 周慧. 提高龙心素活性测定的重复性[J]. 华西药学杂志, 2001, 16(6): 465.

[11] WANG Y H, LI S N, HUANG C H, et al. Sirt1 activation by post-ischemic treatment with lumbrokinase protects against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 636.

[12] ZHAO J, LI L, WU C, et al. Hydrolysis of fibrinogen and plasminogen by immobilized earthworm fibrinolytic enzyme II from Eisenia fetida [J]. Int J Biol Macromol, 2003, 32(3-5): 165-171.

[13] 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(5): 97654.

[14] VERMA M K, PULICHERLA K K. Broad substrate affinity and catalytic diversity of fibrinolytic enzyme from Pheretima posthumous-Purification and molecular characterization study [J]. Int J Biol Macromol, 2017(95): 1011-1021.

[15] 丁冠华, 李峰, 康廷国. 水蛭地龙药材商品中可溶性蛋白质的含量测定[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(6): 1100-1101.

[16] CHEN L Y, ZHANG Y, QI F, et al. Compared with the dissolubility proteins and activity of fibrinolytic enzyme between fresh earthworm and dry earthworm [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学), 2012, 18(8): 89-92.

收稿日期：2019-02-20

(本文责编：李艳芳)

http://www.chinjmap.com