

中华鳖血液凝固特性研究

闫书彩,李玉荣,高明,王韞,曹栋,李双安

(河北农业大学动物科技学院,河北保定 071000)

摘要:通过中华鳖全血、无细胞血浆(CFP)的凝固指标及水的稀释作用对这些指标的影响来阐述其凝血特性,指标包括全血复钙时间(CT)及血浆的复钙时间(RT)、活化凝血时间(ACT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)6个方面。结果显示:试验首次报道鳖无细胞血浆的ACT、APTT和PT分别为332.65、147.75和50.61 s,与哺乳动物存在差异,但CT、RT和TT与哺乳动物没有差异;CFP复钙在10 min内未凝固,而CFP稀释后血浆凝固;CFP稀释后ACT、APTT与未稀释相比缩短($P < 0.01$),PT无变化($P > 0.05$)。结论:稀释后的鳖CFP发生凝固,主要通过影响内源性凝血过程,与外源性凝血途径无关。

关键词:中华鳖;血液;凝固

中图分类号:S917

文献标志码:A

论文编号:2009-2618

A Study on the Characteristics of Blood Coagulation for Chinese Soft-shelled Turtle

Yan Shucui, Li Yurong, Gao Ming, Wang Yun, Cao Dong, Li Shuang'an

(Animal Science and Technology College, Agriculture University of Hebei, Baoding Hebei 071000)

Abstract: In order to discover the characteristics of blood coagulation for Chinese soft-shelled turtle, some general blood clotting tests have been done, for example, the whole blood clotting time(CT) test, the plasma recalcification time (RT) test, the activated plasma clotting time (ACT) test, the activated partial thromboplastin time (APTT) test, the prothrombin time (PT) test and the thrombin time (TT) test, the samples of whole blood or plasma were treated with citrate and differently diluted 1-, 2-, 3-fold with ion-free water. The results prove that: this paper firstly reported the ACT, the APTT and the PT for Chinese soft-shelled turtle were 332.65, 147.75, 50.61 s, which are different from mammals, however, the CT, the CT and the TT are no difference between Chinese soft-shelled turtle and mammals; the cell-free plasma of Chinese soft-shelled turtle uncoagulates within 10 min. , but the diluted cell-free plasma of Chinese soft-shelled turtle coagulate; the ACT and the APTT are extremely significant difference ($P < 0.01$) between the diluted plasma and the control group for Chinese soft-shelled turtle, however, the PT is nonsignificant difference ($P > 0.05$) between the diluted plasma(1:1, 1:2) and that of the control group. Conclusions: the diluted cell-free plasma of Chinese soft-shelled turtle has coagulated, primarily by influencing the intrinsic pathway but has nothing to do with the extrinsic pathway.

Key words: Chinese soft-shelled turtle; blood; coagulation

0 引言

中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)隶属于脊索动物门脊

椎动物亚门爬行纲龟鳖目鳖属,各种鳖一般寿命均较长,抵抗各种恶劣条件和疾病的能力极强,还有较大的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670260)。

第一作者简介:闫书彩,女,1980年出生,河北石家庄栾城人,硕士研究生,研究方向:动物生理学。通信地址:071000 河北农业大学动物科技学院2007级动物学研究生,E-mail:ysctxg2007@126.com。

通讯作者:李双安,男,1958年出生,河北保定蠡县人,副教授,学士,研究方向:动物生理学。通信地址:071000 河北农业大学动物科技学院,Tel:0312-7526376,E-mail:shuanganli@126.com。

收稿日期:2009-12-11,修回日期:2009-12-23。

营养和食疗价值, 鳖的血还可以作药用, 已将其作为药食同源的功能食品来开发^[1-2], 有较高的经济价值和社会效益。近几年, 中国对中华鳖的研究主要集中在氨基酸含量分析^[3-4]、养殖模式和疾病防治等方面的研究^[5-6], 对其血液方面的研究主要集中在血液流变学常值^[7]、血象方面^[8]和血细胞形态数量^[9-14]的研究, 但其血液凝固特性方面研究却未见报道。作者通过测定不同稀释倍数的鳖的全血或血浆的全血复钙时间(whole blood clotting time, CT)、血浆复钙时间(plasma recalcification time, RT)、活化凝血时间(activated clotting time, ACT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(Prothrombin time, PT)和凝血酶时间(Thrombin time, TT)这6方面来加以阐述其凝血特性, 从而丰富中华鳖的基础数据库, 以期为生生物血液凝固的研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

健康中华鳖(♀:♂=1:1)50只, 购自河北保定白洋淀水产养殖场, 体重0.5~1.0 kg/只。试验动物暂养在实验室的水族箱内, 室温常规养殖。

1.2 试剂和仪器

0.109 mol/L 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.025 mol/L 氯化钙($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 以上试剂均为分析纯; 5%白陶土混悬液(0.75%生理盐水配制), 500 IU/mL 生理盐水溶液。凝血酶时间(TT)试剂盒(规格: 500单位, 湖南一格制药有限公司, 批号: 050708-1); 凝血酶原时间(PT)试剂盒(规格: 2.0 mL, 试剂国际敏感指数 ISI 值: 1.22, 上海太阳生物技术有限公司, 批号: 103012); 活化部分凝血活酶时间(APTT)测定试剂盒(规格: 1.5 mL, 上海太阳生物技术有限公司, 批号: 111010), 血凝测定仪(上海精密仪器仪表有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 血浆制备 活体心脏采血^[15-16], 手术暴露心脏, 用塑料注射器刺入心室, 采血5~8 mL/只, 置于含有1/10体积0.109 mol/L 柠檬酸钠抗凝液(1份抗凝液+9份全血)的硅化玻璃管中, 轻轻颠倒混匀, 以1500 r/min, 10 min 离心得无细胞血浆(cell-free plasma, CFP)^[16]。水以不同比例与CFP混合(CFP:去离子水=1:0, 1:1, 1:2, 1:3)分别得CFP_{1.0}、CFP_{1.1}、CFP_{1.2}、CFP_{1.3}, 以CFP_{1.0}为对照组, 观察血浆稀释对血液凝固的影响。

1.3.2 鳖的CT的测定 测定不同稀释倍数的全血的复钙时间。首先制备不同稀释倍数的全血, 即全血与去离子水分别为1:0、1:1、1:2、1:3混合, 各取0.1 mL分别

注入小试管中, 每管加入0.025 mol/L 氯化钙溶液0.1 mL, 记录凝固时间。

1.3.3 鳖的RT测定 测定不同稀释倍数无细胞血浆的复钙时间。取CFP_{1.0}、CFP_{1.1}、CFP_{1.2}、CFP_{1.3}各0.1 mL分别注入小试管中, 每管加入0.025 mol/L 氯化钙溶液0.1 mL, 记录凝固时间^[17]。

1.3.4 鳖的ACT的测定 测定不同稀释倍数血浆的活化凝血时间。取CFP_{1.0}、CFP_{1.1}、CFP_{1.2}、CFP_{1.3}各0.1 mL分别注入已含5%白陶土生理盐水混悬液0.05 mL的小试管中, 然后每管加入0.025 mol/L 氯化钙溶液0.05 mL, 记录凝固时间^[17]。

1.3.5 鳖的APTT、PT和凝血酶时间(TT)的测定 这3个试验均参考试剂盒说明书进行, 分别测定CFP_{1.0}、CFP_{1.1}、CFP_{1.2}、CFP_{1.3}的APTT、PT和TT值。

1.4 统计方法

试验数据采用 $\bar{x} \pm S$ 表示, 使用Excel 2003和SPASS 12.0软件进行单因素方差分析。其中 $P > 0.05$ 表示差异不显著, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 中华鳖全血复钙时间

水的添加在一定程度上使鳖血凝速度加快, 结果见表1。中华鳖的CT为174.23 s, 而其1:1和1:2稀释CT分别为131.56 s、127.65 s, 较对照组极显著缩短($P < 0.01$), 即鳖的全血稀释后能使血凝速度加快, 但其1:3稀释的抗凝全血CT却显著延长(211.35 s, $P < 0.01$)。作者认为水加入抗凝全血具有双重作用, 一方面, 其造成低渗透压使红细胞裂解并释放促凝活性物质, 从而激活了鳖的外源性凝血系统, 促进凝血; 另一方面水造成血中凝血因子的水平降低, 抑制凝血。当前者大于后者时(1:1, 1:2), 血凝时间缩短, 反之凝血时间延长(1:3)。

2.2 中华鳖CFP血浆复钙时间

中华鳖的CFP被水稀释后血凝速度加快, 结果见表1。鳖的CFP在10 min内未凝固, 而1:1, 1:2, 1:3稀释后的凝固时间分别为250.00、173.42、166.12 s, 即稀释后CFP凝固, 且凝血时间随稀释度的增加而缩短, 但1:4稀释组CFP未凝固。可能由于血栓细胞的缺失, 鳖的CFP才不发生凝固, 这一点和哺乳动物相似, 哺乳动物的血液在无血小板提供膜磷脂(platelet factor 3, PF3)的情况下不能发生凝固。

2.3 中华鳖血浆活化凝血时间(ACT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)

血浆活化凝血时间(白陶土)是指在鳖的血浆中加

表1 中华鳖的不同稀释倍数的全血或CFP在不同方法下的凝固时间

测定项目	中华鳖全血或CFP的不同稀释倍数			
	CK(1:0)	1:1	1:2	1:3
CT	174.23±13.52	131.56±7.35**	127.65±8.36**	211.35±6.54**
RT	-	250.00±7.51**	173.42±4.21**	166.12±8.62**
ACT	332.65±15.10	128.21±10.11**	100.25±9.20**	132.65±0.63**
APTT	147.75±5.75	113.39±4.96**	101.78±5.18**	128.35±5.15**
PT	50.61±2.35	46.15±1.31	48.08±0.24	58.52±2.12*
TT	9.20±0.78	7.97±0.52	8.35±0.52	9.54±0.45

注:1.“-”表示血液10 min内不凝固;2.同行中,数据资料右角标“*”表示与对照组相比差异显著($P<0.05$),“**”表示差异极显著($P<0.01$),其他为差异不显著($P>0.05$)。

入一定量的白陶土以激活凝血因子XII,活化的XII再激活因子XI等一系列的凝血反应,从而启动内在性凝血过程,再加 Ca^{2+} 后测得凝固时间^[17]。从结果(表1)可知,鳖的血浆ACT为332.65 s,1:1、1:2、1:3稀释后的ACT分别为128.21、100.25、132.65 s,较对照组极显著降低($P<0.01$),即稀释后ACT缩短;APTT是指在鳖的血浆中加入部分凝血活酶溶液(白陶土-脑磷脂混悬液),再加 Ca^{2+} 后测得的凝固时间,也是启动内在性凝血过程,所不同的是加入了脑磷脂。鳖APTT为147.75 s,被水稀释(1:1, 1:2, 1:3)后APTT分别为113.39、101.78、128.35 s,极显著低于对照组($P<0.01$),从ACT和APTT的结果得出鳖的内在性凝血过程被水稀释后(一定比例)反应速度加快。同时,组内比较显示鳖APTT显著低于ACT($P<0.01$)。

2.4 中华鳖凝血酶原时间和凝血酶时间

PT是指在鳖的血浆中加入过量的含钙组织凝血活酶,重新钙化的血浆在组织凝血活酶存在时激活因子X,形成FXa-FVa-磷脂- Ca^{2+} 复合物,使凝血酶原转变成凝血酶,进而使血液发生凝固,测定凝固所需的时间,属于外在性凝血过程。鳖PT为50.61 s,鳖的1:1和1:2稀释CFP的PT为46.15、48.08 s,与对照组无显著性差异($P>0.05$),说明水不影响鳖的外在性凝血过程;TT是指鳖的血浆中加入适量的凝血酶溶液,直接使纤维蛋白原转变为不溶性的纤维蛋白所需的时间,从结果看鳖的不同稀释倍数的血浆TT分别为9.20, 7.97, 8.35和9.54 s,组间无显著性差异($P>0.05$),即水不影响血浆TT。

3 结论与讨论

3.1 鳖与哺乳动物凝血特性的差异

试验测得中华鳖的全血复钙时间为174.23 s,与哺乳动物(120~240 s)相一致($P>0.05$)^[18];中华鳖无细胞血浆不凝固,也与哺乳动物一致($P>0.05$);用于检

测内在性凝血途径的血浆活化凝血时间(ACT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)的结果表明,中华鳖ACT(332.65 s)比哺乳动物的ACT正常值(74~125 s)明显延长($P<0.01$),说明鳖的血浆活化时间很长;中华鳖APTT(147.75 s)比哺乳动物正常值(25~45 s)明显延长($P<0.01$),这可能是因为鳖的血液中缺乏类似哺乳动物的FXII^[19]和由于中华鳖血浆中抗凝血酶Ⅲ的含量高的缘故^[20]。用于检测外源性凝血途径的PT结果显示鳖PT为50.61 s,他和哺乳动物的凝血酶原时间的正常值(10~14 s)之间差异较大($P<0.01$);可见位于爬行纲的中华鳖与哺乳动物有一定的差异性。而用于检测纤维蛋白原转变为不溶性的纤维蛋白的凝血酶时间的结果表明,中华鳖TT为9.20 s,与哺乳动物TT正常值在8~16 s相一致($P>0.05$),即鳖的凝血酶时间和哺乳动物一致。

3.2 中华鳖内在性凝血过程被水稀释后(一定比例)反应速度加快

从试验结果可以看出被水稀释后CFP的ACT和APTT明显缩短,因ACT与APTT是测定内源性凝血时间的指标,所以可以推出水稀释后促进中华鳖CFP的内源性凝血途径。ACT是指外源白陶土所启动的内源性凝血时间,对于哺乳动物ACT是指外源白陶土首先激活CFP中凝血因子XII,继而激活因子XI而启动的内源性凝血途径^[17],鳖与哺乳动物相比仅不含类似哺乳动物凝血因子XII^[19],但究竟白陶土是怎样启动其内在性凝血过程的还有待于进一步研究。活化部分凝血活酶时间(APTT)是指在鳖的血浆中加入部分凝血活酶溶液(白陶土-脑磷脂混悬液)所启动的内在性凝血过程,所不同于ACT的是加入了脑磷脂,即提供了外源性的磷脂表面。组内比较显示中华鳖APTT低于ACT,即外源磷脂加入,可以补充内源磷脂的不足,使血液凝固速度加快。

3.3 水不影响中华鳖的外在性凝血过程

凝血酶原时间也是凝血系统的一个较为敏感的筛选试验,主要反映外源性凝血,即在鳖的血浆中加入过量的含钙组织凝血活酶,进而使血液发生凝固,测定凝固所需的时间。鳖的1:1和1:2稀释CFP的凝血酶原时间和对照组差异不显著($P>0.05$),说明水不影响鳖的外在性凝血过程。

凝血酶时间是指血浆中加入适量的凝血酶溶液,直接使纤维蛋白原转变为不溶性的纤维蛋白,测定凝固所需的时间,从结果看鳖的不同稀释倍数的血浆凝血酶时间分别为9.20、7.97、8.35和9.54 s,哺乳动物凝血酶时间正常值在8~16 s,即鳖的稀释后的凝血酶时间均在正常值范围内,即他们之间差异不显著($P>0.05$),说明鳖的凝血酶时间和哺乳动物凝血酶时间没有区别。

参考文献

- [1] 刘娅,凌笑梅,王莉馨,等.中华鳖提取物抗肿瘤机制初探[J].实用肿瘤学杂志,1994(3):60-61.
- [2] 刘拴桃,聂向庭,刘桂林,等.中华鳖不同组织器官生化指标的测定及其营养和药用价值的探讨[J].山西农业大学学报,1997,17(1):55-58.
- [3] 王军萍.中华鳖血清游离氨基酸含量的分析[J].河北大学学报:自然科学版,1998,18(2):189-190.
- [4] 王永辉,章广远,金宏.中华鳖不同部位氨基酸的测定与分析[J].氨基酸和生物资源,2005,27(1):74-76.
- [5] 吴惠仙,王淑霞,胡向东.中华鳖疾病研究进展[J].水产科学,1999,18(5):38-41.
- [6] 洪美玲,付丽容,王锐萍,等.龟鳖动物疾病的研究进展[J].动物学杂志,2003,38(6):115-119.
- [7] 何成明,方廖琼,岳兴建.中华鳖血液流变学常值研究[J].北京农业科学,1998,16(6):32-34.
- [8] 王军萍.中华鳖血象的研究[J].水产养殖,1999(3):18-20.
- [9] 刘恩勇,陈万芳,朱普智.中华鳖外周血细胞形态学观察[J].南京农业大学学报,1991,14(3):91-96.
- [10] 王石泉.鳖血细胞的显微形态和细胞化学[J].动物学杂志,1995,30(1):16-18.
- [11] 程备久,蒋立科,宋祥芬,等.鳖血细胞数量的季节变化及形态结构研究[J].应用生态学报,1996,7(4):411-416.
- [12] Szarski H, Czopek G. Erythrocyte diameter in some amphibians and reptiles [J]. Bull Acad Polonaise Ser Biol,1996,14:433-437.
- [13] 王军萍,郭明中,韩希福,等.中华鳖血细胞显微和超微结构的观察[J].中国水产科学,1999,6(4):106-108.
- [14] 傅丽容,洪美玲,史海涛.龟鳖类血细胞研究进展[J].海南师范学院学报:自然科学版,2003,16(3):68-73.
- [15] 王军萍,韩希福.中华鳖去学的一种新方法[J].河北大学学报:自然科学版,1997,17(4):78-79.
- [16] 李双安,张正珊,李铁拴,等.MgSO₄溶液抑制鲤鱼血液凝固的初步研究[C]//中国动物学会.中国动物科学研究[M].北京:中国林业出版社,1999:765-769.
- [17] 王永才编.血液病确诊化验诊断[M].大连:大连出版社,1994:60-81.
- [18] 崔云昊.采供血规范化监督管理与血液制品检测新技术新标准实用手册[M].银川:宁夏大地音像出版社,2004.
- [19] Davidson C J, Hirt R P, Lal K, et al. Molecular evolution of the vertebrate blood coagulation network[J]. Thrombosis and Haemostasis,2003,89:420-428.
- [20] 王韞,韩旭东,李鑫,等.几种变温脊椎动物抗凝血酶和纤溶酶原相对含量比较[J].四川动物,2008,27(5):797-799.