

## · 基础研究 ·

日本医蛭抗凝活性研究<sup>△</sup>

鲁增辉, 贺宗毅, 石萍, 李卿, 游华建, 陈仕江\*

(重庆市中药研究院/中国中医科学院 中药资源中心 重庆分中心/中药资源学重庆市重点实验室, 重庆 400065)

**[摘要]** **目的:** 研究分析人工养殖条件下日本医蛭活体、干品的抗凝活性, 为日本医蛭合理入药提供参考。**方法:** 根据中国药典规定, 采用凝血酶滴定法对不同处理的日本医蛭样品进行测试。**结果:** 发现日本医蛭抗凝活性依次为超低温冻干品、鲜品、晒干品。**结论:** 保证日本医蛭最佳抗凝活性的方法为超低温冻干。

**[关键词]** 日本医蛭; 人工养殖; 抗凝活性

**Anticoagulant Activity Analysis of *Hirudo nipponica***

LU Zenghui, HE Zongyi, SHI Ping, LI Qing, YOU Huajian, CHEN Shijiang\*

(Chongqing Academy of Chinese Materia Medica/Chongqing Sub-center of National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science;  
/Chongqing Key Laboratory of Chinese Medicine Resources, Chongqing 400065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine and analyses anticoagulant activity of dry and living body of artificial culturing *Hirudo nipponica*, and provide references for reasonable use of *H. nipponica* in traditional medicine. **Methods:** The anticoagulant activity was measured by the method of titration with thrombin. **Results:** The results indicated that anticoagulant activity of *H. nipponica* decreased successively under freeze-dried with ultralow temperature, fresh and dried treatment. **Conclusion:** The best treatment was freeze-dried with ultralow temperature to ensure the optimal anticoagulant activity of *H. nipponica*.

**[Keywords]** *Hirudo nipponica*; artificial culturing; anticoagulant activity

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.1.007

日本医蛭 *Hirudo nipponica* 是《中华人民共和国药典》收录的水蛭药材基原中唯一吸食动物血液的品种<sup>[1]</sup>。日本医蛭体内含有迄今为止所发现的最强凝血酶天然特异抑制剂—水蛭素, 同时还含有其它抗凝血因子<sup>[2-4]</sup>, 因此具有抑制血小板聚集, 抗血栓、改善血液流变性、降血脂和抗动脉粥样硬化等药理作用, 在治疗心脑血管疾病方面具有显著功效。现有关于日本医蛭的研究主要集中于基原论证<sup>[4]</sup>、药材鉴定及分子系统发育<sup>[5-9]</sup>、人工养殖繁育<sup>[10]</sup>、化学成分及抗凝活性<sup>[11-12]</sup>、日本医蛭医学实践<sup>[13-14]</sup>等方面, 但上述研究均不够深入, 不利于日本医蛭可持续利用及深度开发。

目前, 关于日本医蛭特别是养殖状态下日本医

蛭抗凝活性, 研究资料几乎为空白。为此, 本研究对全人工养殖的日本医蛭抗凝活性进行了检测, 以期日本医蛭人工养殖、水蛭药材深度开发以及水蛭药材抗凝成分等研究提供借鉴与参考。

**1 材料与方法****1.1 材料**

试验用日本医蛭来源于本课题组日本医蛭养殖基地全人工繁殖获得。试验个体均为 0.3 g 以上健康、活跃的日本医蛭。

**1.2 方法**

**1.2.1 样品处理** 日本医蛭超低温冻干品以及日本医蛭晒干品, 研碎, 直接过三号筛; 日本医蛭鲜品

<sup>△</sup> [基金项目] 重庆市卫生和计生委中医药科技项目(zy201402130); 重庆市卫生和计生委中医药科技项目(zy201602097); 重庆市南岸区科委科技攻关项目(2015-18-23); 重庆市科委应用开发计划项目(cstc2013yykFA00002)

\* [通信作者] 陈仕江, 研究员, 研究方向: 中药资源及开发利用; Tel: (023)89029082, E-mail: shijiangchen@163.com

直接采用低温匀浆机进行匀浆, 然后进入下一步检测。

1.2.2 样品抗凝活性测定 日本医蛭抗凝活性测定, 依据《中华人民共和国药典》2015版规定<sup>[1]</sup>, 具体如下: 取1g上述样品, 加入0.9%氯化钠溶液5mL, 充分搅拌, 浸提30min, 不断震荡, 离心, 精密量取上清液100μL, 加入新鲜配制的含0.5%牛纤维蛋白原的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液200μL, 37℃±0.5℃中水浴5min, 滴加每1mL中含40单位的凝血酶溶液(每1min滴加1次, 每次5μL, 边滴加边轻轻摇匀)至凝固, 记录消耗凝血酶溶液的体积, 按下面公式计算:

$$U = \frac{C_1 V_1}{C_2 V_2}$$

U—每1g含凝血酶活性单位, U·g<sup>-1</sup>;

C<sub>1</sub>—凝血酶溶液的浓度, μg·mL<sup>-1</sup>;

C<sub>2</sub>—供试品溶液的浓度, g·mL<sup>-1</sup>;

V<sub>1</sub>—消耗凝血酶溶液的体积, μL;

V<sub>2</sub>—供试品溶液的加入量, μL。

中和一个单位的凝血酶的量, 为一个抗凝血酶活性单位。

## 2 结果

### 2.1 日本医蛭抗凝活性测定

分别对养殖状态下的日本医蛭超低温冻干品、晒干品以及鲜品进行抗凝活性的测定, 结果如表1所示。在三种不同处理方式中, 抗凝活性的大小依次为超低温冻干品>鲜品>晒干品, 其中超低温冻干品的抗凝活性能高达2974±159.52U, 鲜品以及晒干品的抗凝活性分别为380.00±17.44U、110.67±10.01U。

表1 日本医蛭不同处理方式抗凝活性

日本医蛭处理组	消耗凝血酶的量(μL)	抗凝活性(U/g)	平均值	标准差(SD)
超低温冻干	780	3120	2974.67	159.52
	701	2804		
	750	3000		
晒干	25	100	110.67	10.01
	28	112		
	30	120		
鲜品	98	392	380.00	17.44
	97	388		
	90	360		

### 2.2 日本医蛭抗凝活性与处理方式的相关性

对不同处理状态下的日本医蛭抗凝活性进行相关性分析, 发现抗凝活性与不同处理方法呈现正相关性(结果如图1所示), 鲜品及晒干品抗凝活性急剧下降。因此不同处理方式, 能直接影响日本医蛭的抗凝活性甚至决定了其入药的疗效。

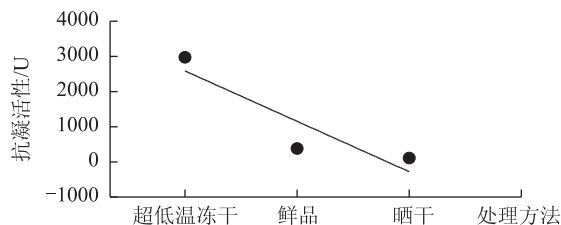


图1 日本医蛭不同处理与抗凝活性的相关性

## 3 讨论与结论

不同处理的人工养殖日本医蛭抗凝血试验结果表明, 经过3种方法处理的日本医蛭均有不同程度的抗凝活性, 其中以超低温冷冻干燥的日本医蛭抗凝活性最强, 证明超低温冷冻干燥最大限度的保留了日本医蛭体内的抗凝成分。然而日本医蛭鲜品在低温匀浆时候, 理论上应该也能保证体内的活性物质, 但数据显示其在抗凝活性上与超低温冷冻干燥相比, 有较大差距, 产生该问题的主要原因可能是由于鲜品日本医蛭含有的水分、摄取的食物量等影响了试验结果。晒干品日本医蛭在抗凝活性上相比超低温冷冻干燥的, 更低出很多, 原因可能是在晒干过程中某些抗凝活性成分如水蛭素有所丧失。

李友宾等<sup>[15]</sup>研究了日本医蛭水提取物、以及加热处理过的日本医蛭抗凝活性, 发现日本医蛭鲜品水提取物抗凝活性是干品的2倍, 未加热的日本医蛭抗凝活性要高于加热的日本医蛭, 与本研究结果一致。除此之外, 有学者采用盐浸提法<sup>[16]</sup>、水提法<sup>[15]</sup>提取日本医蛭粗提物, 研究日本医蛭粗提物的抗凝活性, 结果显示粗提物在抗凝活性上均低于本研究, 可能是试验方法上存在一定差异, 也有可能是现有提取方法, 不能将日本医蛭体内抗凝成分完全分离出来, 造成日本医蛭粗提物抗凝活性低于全体入药。另有研究<sup>[17]</sup>发现日本医蛭干品抗凝活性能达到360U, 是本研究的3倍多, 可能是由于本研究中的干品日本医蛭经过高温晒干, 损失了部分活性成分。

本研究表明: 日本医蛭超低温冻干品具有较强的体外抗凝血酶活性, 高于新鲜匀浆以及目前市场

主流的水蛭药材加工方法——吊干,证明日本医蛭的不同处理方法,对抗凝活性有极大的影响,然其机制尚不十分清楚。因此深度解析日本医蛭以及其它水蛭药材的核心抗凝成分,揭示抗凝活性成分在不同处理方式下的动态变化规律能够为水蛭药材的合理利用与入药提供科学依据,也为诠释目前水蛭药材炮制的科学内涵,判定诸如日本医蛭类含有水蛭素的品种,是否需要晒干或者炮制提供借鉴和参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 李文,廖福龙,殷晓杰,等. 七种水蛭抗血小板聚集与抗凝血研究[J]. 中药药理与临床,1997,13(5):32-34.
- [3] 姚楠,余顺慧,相宇,等. 日本医蛭不同萃取部位体外抗凝活性的实验研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(5):1092-1093.
- [4] 张卫,张瑞贤,李健,等. 中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨[J]. 中国中药杂志,2013,38(6):914-918.
- [5] 刘晓帆,杨瑶珺,吴丽洁,等. 中药水蛭生药学与化学成分的研究进展与展望[J]. 环球中医药,2012,5(8):637-640.
- [6] Liu F, Guo Q S, Shi H Z, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within populations of *Whitmania pigra* and *Hirudo nipponica* based on ISSR and SRAP markers [J]. *Biochemical Systematic and Ecology*, 2013,51(4):215-223.
- [7] 徐云玲. 无吻蛭目五种水蛭线粒体基因组注释分析[D]. 武汉:湖北中医药大学,2013.
- [8] Xu Y L, Nie J, Hou J J, et al. Complete mitochondrial genome of *Hirudo nipponica* (Annelida, Hirudinea) [J]. *Mitochondrial DNA*,2016,27(1):257-258.
- [9] 刘晓帆,刘春生,杨瑶珺,等. 基于COI基因的水蛭及其混伪品的DNA条形码研究[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(1):63-66.
- [10] 石萍,鲁增辉,贺元川,等. 水蛭(日本医蛭)繁殖性能的研究[J]. 中药材,2015,38(6):1144-1147.
- [11] Li Y B, Huang W H, Xiang Y. Three new pteridines, hirudinoidines A-C, from *Hirudo nipponica* Whitman [J]. *Helvetica Chimica Acta*,2008,91(2):303-307.
- [12] 苏斌,王志斌,郭玉东,等. 纤维蛋白原-凝血酶时间法用于水蛭质量控制方法的研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(10):1802-1806.
- [13] 刘坤. 医用蛭在治疗耳廓撕脱伤中的应用[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志,2004(4):180-180.
- [14] 张德宗,彭建强,杨潼,等. 医蛭在断指再植术后淤血中的应用[J]. 中西医结合杂志,1990(2):84-84.
- [15] 李友宾,张健,段金庚,等. 土鳖虫与日本医蛭提取物抗凝血酶活性的比较研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(3):350-351.
- [16] 李军,于翔,张健,等. 4种水蛭粗提物抗凝活性及冻存时间对菲牛蛭抗凝活性影响[J]. 水产科学,2014,33(9):591-593.
- [17] 张彬,汪波,龚元,等. 几种水蛭抗凝物质提取及活性分析[J]. 中山大学学报,2012,51(4):92-96.

(收稿日期 2016-09-02)