

地龙蛋白多肽类成分的研究进展

刘巧, 毕启瑞*, 谭宁华*

中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198

摘要: 动物药地龙药用历史悠久, 资源丰富, 为临床常用中药之一。现代研究表明蛋白多肽类为地龙主要成分, 具有抗凝血、抗脑卒中、抗菌、抗纤维化等多方面的药理作用, 已被应用于心脑血管等多种疾病的治疗。对 1983 年至今发现的 48 种地龙蛋白多肽类成分的名称、相对分子质量、氨基酸序列、等电点及其活性等进行总结, 同时对地龙蛋白多肽类成分的药理作用研究进展进行较全面地综述, 以期地为地龙蛋白多肽类成分的深入研究与开发利用提供参考。

关键词: 地龙; 中药; 蛋白; 多肽; 抗凝血; 抗脑卒中; 抗菌; 抗纤维化

中图分类号: R284; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)01-0252-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.036

Research progress on proteins and peptides from earthworm

LIU Qiao, BI Qi-ru, TAN Ning-hua

School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract: Earthworm is one of animal drugs in Chinese materia medica. It was commonly used in clinic with rich resources in China. Modern studies showed that proteins and peptides were the main components in earthworm. It has been used for treating cardiovascular and cerebrovascular diseases because of its various activities, such as anticoagulant, anti-stroke, antibacterial, and antifibrotic activities, etc. In this review, 48 proteins and peptides from different species of earthworm reported since 1983 were summarized, including their names, molecular weights, amino acid sequences, isoelectric points, and activities. In addition, its pharmacological effects of earthworm proteins and peptides were summarized. In all, it will provide a scientific basis for the further study and comprehensive utilization of proteins and peptides of earthworm.

Key words: earthworm; Chinese materia medica; proteins; peptides; anticoagulant activity; anti-stroke activity; antibacterial activity; antifibrotic 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* (Michaelson) 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelson 的干燥体^[1]。始记于《神农本草经》, 在我国已有悠久的历史, 其性寒, 味咸, 归肝、脾、膀胱经, 具有清热止痉、平肝熄风、通经活络、平喘利尿的功效; 用于治疗高热神昏、惊痫抽搐、关节痹痛、肺热喘咳、尿少水肿、高血压等症^[2]。

现代研究表明, 地龙化学成分主要有氨基酸、蛋白质、多肽、核苷、有机酸、脂质等^[3]。其中蛋

白多肽类成分质量分数高达 55%~68%^[3], 具有抗凝血、降压、抗菌、抗脑卒中、神经保护等多方面的药理作用, 因此受到人们的广泛关注。检索国内外文献发现, 自 1983 年以来, 针对地龙的综述性文章已有 46 篇, 这些文章主要集中在地龙的小分子化学成分、药理作用及临床研究方面^[5]。虽然 Verma 等^[6]、袁渊等^[7]、杨新等^[8]对地龙部分蛋白类成分进行了药理作用方面的综述, 但是缺乏对地龙蛋白多肽类成分的系统总结, 故本文对地龙中的蛋白多肽类成分及其药理作用进行全面综述, 旨在为地龙中该类成分的进一步研究与开发利用提供参考。

收稿日期: 2018-07-16

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20170738); 江苏省博士后科研资助项目 (1701055A); 天然药物活性组分与药效国家重点实验室自主研究课题 (3144060028)

作者简介: 刘巧 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。Tel: 15951712211 E-mail: 1556423408@qq.com

*通信作者 谭宁华 (1963—), 女, 博士生导师, 教授, 从事含环肽中药和止咳中药系统研究。E-mail: nhtan@cpu.edu.cn

毕启瑞 (1986—), 男, 博士, 博士后, 研究方向为中药分析。E-mail: biqirui@cpu.edu.cn

1 地龙及其近缘品蛋白多肽类成分

1983 年, Mihara 等^[9]首次从地龙提取物中发现了具有纤溶酶活性的蛋白质, 从而拉开了地龙蛋白多肽类成分研究的序幕, 并于 1991 年从粉正蚓 *Lumbricus rubellus* Hoffmeister 中分离得到 6 个单多肽链蛋白, 统称为蚓激酶 lumbrokinase^[10], 分别为 F-III-1 (1)、F-III-2 (2)、F-II (3)、F-I-2 (4)、F-I-1 (5) 和 F-I-0 (6), 这些蛋白的氨基酸组成中, 含有丰富的天冬酰胺和天冬氨酸, 研究表明这些酶属于碱性胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶^[11]。其后, 该团队又从粉正蚓中分离得到一个蛋白 (7)^[12], 并测定了其 N 端序列。Yang 等^[13]从赤子爱胜蚓 *Eisenia foetida* Savigny 中分离得到一种纤维蛋白溶解酶 ($M_r=4.5 \times 10^4$), 该酶由 2 个亚基 ($M_r=2.6 \times 10^4$ 和 $M_r=1.8 \times 10^4$) 通过疏水相互作用结合在一起, 并对大亚基 (8) 的 N 末端序列进行了分析。Lassegues 等^[14]通过多克隆抗菌肽血清筛选 cDNA 文库, 克隆了编码 fetidin (9) 的 cDNA, 并使用 Intelligenetics 软件包和在线 MIPS 软件包将核苷酸和氨基酸序列与 EMBL 和 wiss-Prot 数据库中的条目进行比较, 最终确定 fetidin 的氨基酸序列。Cho 等^[15]从地龙裂解物中分离得到了 6 种具有纤溶活性的丝氨酸蛋白酶 F1~F6 (10~15)。Verma 等^[16]从 *P. posthumous* Vaillant 中分离得到了一个相对分子质量为 2.95×10^4 的纤溶蛋白酶 (16), 该酶具有广泛的底物亲和力和稳定性。

国内学者程牛亮及其团队率先开展了地龙蛋白多肽类成分的研究, 该课题组从正蚓科双胸蚓属 *Bimastos* 中分离得到多个相对分子质量为 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 的纤溶酶^[17-18], 同时也从赤子爱胜蚓中分离得到含有多个二硫键的 EWD1 (17)、EWD2 (18) 和 EWD3 核酸酶样蛋白^[19-20]。茹炳根课题组从赤子爱胜蚓中分离得到 1 种相对分子质量为 3.3×10^4 的纤溶酶 (19)^[21], 之后又从赤子爱胜蚓中分离得到同时兼具抗肿瘤和纤溶酶活性的蛋白酶 ARSP1 (20)^[22]。有文献报道, 从赤子爱胜蚓中分离得到了 7 种纤溶酶, 分别为 EFE-a (21)、EFE-b (22)、EFE-c (23)、EFE-g (24)、EFE-d (25)、EFE-e (26) 和 EFE-f (27), 测定了 EFE-a 和 EFE-b 的晶体结构, 并对 EFE-a 的结构进行深入分析, 从结构的角度解释了该类酶的双重纤溶活性的机制^[23-26]。赵锐等^[27]从赤子爱胜蚓中分离到一组等电点 (pI) 在 3.0~4.0 的酸性蛋白 (28~31)。值得一提的是, 张汶婕等^[28]

首次从赤子爱胜蚓中发现了相对分子质量小于 2×10^4 的纤溶酶 F1 (32) 和 F2 (33), 同时, 二者还具有较广的抗菌谱。

Lumbricin (34) 是一种新的富含脯氨酸的抗菌肽, 由 Cho 等^[29]首次从粉正蚓中分离得到。张希春等^[30]从赤子爱胜蚓中分离得到 2 个抗菌肽, 分别为 F-1 (35) 和 F-2 (36)。Liu 等^[31]也从赤子爱胜蚓中分离得到了 1 个新的抗菌小肽 OEP3121 (37)。Li 等^[32]首次对威廉环毛蚓皮肤分泌物进行了分离, 并得到新的抗菌肽 lumbricin-PG (38)。

除了从地龙中发现一些具有纤溶酶活性和抗菌活性的蛋白之外, 国内外学者也发现了一些具有其他活性的蛋白多肽类成分。Oumi 及其团队分别在 1994 年和 1995 年从赤子爱胜蚓和 *P. vittata* Megascolecidae 中分离得到了具有促进肠道收缩活性的 annetocin (39)、GGNG-1 (40)、GGNG-2 (41) 和 GGNG-3 (42)、*Pheretima* tetradecapeptide (43) 和 *Eisenia* tetradecapeptide (44) 等多肽类成分^[33-35]。VQ-5 (45) 和 AQ-5 (46) 是 2 个具有镇痛和抗炎活性的多肽, 由 Li 等^[36]首次从赤子爱胜蚓体腔液中分离得到。Park 等^[37]从 *Eisenia Andrei* Bouché 中分离得到 1 种纤维素酶 Ean-EG (47), 该酶在 *Eisenia andrei* 体内分布广泛, 推测 Ean-EG 不仅在酶解中发挥作用, 而且在固有免疫方面也有一定作用。目前从地龙及其近缘品中已发现的蛋白多肽类成分见表 1。

从表 1 中可以看出, 地龙蛋白多肽类成分已有较多的研究。从氨基酸序列来看, 目前仅确定了多肽类成分的氨基酸序列, 而蛋白类成分的氨基酸序列并未完全确定, 仅鉴定了其 N 端序列。通过氨基酸序列比对, 不同课题组得到了功能相近的同源蛋白, 如 F-III-1 (1)、F-III-2 (2)、EFE-g (24)、F5 (14)、F6 (15)、EFE-b (22)、EFE-c (23) 等具有相似的 N 端序列; 从活性的角度来看, 高相对分子质量的蛋白类成分具有抗凝、溶栓的作用, 而低相对分子质量的多肽类成分则具有抗菌、促进肠道收缩等作用; 从来源来看, 目前地龙蛋白多肽类成分的研究主要集中在非药典来源的赤子爱胜蚓和粉正蚓。

2 地龙及其近缘品蛋白多肽类成分药理作用

2.1 对心血管系统的作用

2.1.1 抗凝血、抗血栓 研究发现, 地龙中含有的蚓纤维蛋白溶解酶、蚓激酶、蚓胶原酶等具有很好

表 1 地龙及其近缘品中蛋白多肽类成分

Table 1 Proteins and peptides from *Pheretima* and its relatives

序号	名称	氨基酸序列/N 端序列	相对分子质量	pI	来源	药理作用	文献
1 ^a	F-III-1	IVGGIARPYEFPWQVSVRRKSSD	29 667	3.40	粉正蚓 <i>Lumbricus</i>	纤溶酶活性	10
					<i>rubellus</i>		
2 ^a	F-III-2	IVGGIARPYEFPWQVSVRRKSSD	29 662	3.60	粉正蚓	纤溶酶活性	10
3 ^a	F-II	VIGGTNASPGFEPWQLSQRXSGS	24 664	4.20	粉正蚓	纤溶酶活性	10
4 ^a	F-I-2	IIGGSNASPGFEPWQLSQTRGGSH	24 220	4.00	粉正蚓	纤溶酶活性	10
5 ^a	F-I-1	IIGGSNASPGFEPWQLSQTRGGSH	24 196	4.30	粉正蚓	纤溶酶活性	10
6 ^a	F-I-0	VVGGSDTTIGQYPHQLSLRVGTSH	23 013	4.85	粉正蚓	纤溶酶活性	10
7 ^a	未命名	IVGGIARPYEFPWQV	35 500		粉正蚓	纤溶酶活性	12
8 ^a	未命名	VIGGTNASPEIPWQLSQQRQSGSW	26 000		赤子爱胜蚓 <i>Eisenia</i>	纤溶酶活性	13
					<i>fetida</i>		
9 ^b	fetidin	MSSRAGIAEGYEQIEVDVAVWKEGYVYENRGSTSVQKIKITKGM RNLNSETKTLTASHSIGSTISTGDLFEIATVDVSYSHSHEESQVSMETET EVYESKEIEHTITIPPTSKFTRWQLNADVGGADIEYMYLIDEVTPIGGT LSIPQVIKSRKILVGREIYLGETEIRIKHADRKEYMTVSRKSWPAAT LGHSKLYKFVLYEDMYGFRIKLNTMYSGYEYAYSSDQGGIYFDQGS DNPQRWAINKSLPLRHGDVVTMKNYFTRSGLCYYDGPATDVYCL DKREDKWILEVVKP	40 000		赤子爱胜蚓	抗菌、过氧化物酶 活性	14
10 ^a	F1	VVGGSDTTIGQYPHQLSLRVGT	24 600		粉正蚓	纤溶酶活性	15
11 ^a	F2	IIGGSNASPGFEPWQLSQTRG	26 800		粉正蚓	纤溶酶活性	15
12 ^a	F3	VIGGTNASPGFEPWQLSQQRQ	28 200		粉正蚓	纤溶酶活性	15
13 ^a	F4	VIGGTDAAPGEPWQLSQTR	25 400		粉正蚓	纤溶酶活性	15
14 ^a	F5	IVGGIARPYEFPWQVSVRRKS	33 100		粉正蚓	纤溶酶活性	15
15 ^a	F6	IVGGIARPYEFPWQVSVRRKS	33 000		粉正蚓	纤溶酶活性	15
16 ^a	未命名	RKKGASYFYPWSVKA	29 500	4.50	<i>P. posthumous</i>	纤溶酶活性	16
17 ^a	EWD1	DEWVYP			赤子爱胜蚓	核酸酶活性	20
18 ^a	EWD2	LLGPYKPKC			赤子爱胜蚓	核酸酶活性	20
19 ^a	未命名	IVGGIARPYEFP	33 000	3.50	赤子爱胜蚓	纤溶酶及蛋白酶 活性	21
20 ^a	ARSP1	I(V) IGGT(S) N(D) ASPGEPWQLSQTRGGSHS	28 000	<3.80	赤子爱胜蚓	细胞杀伤、纤溶酶 和纤溶酶原激 活酶活性	22
21 ^a	EFE-a	VIGGTNASPGFEPWQLQ	24 663	3.46	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
22 ^a	EFE-b	IVGGIARPYEFPQVSVR	29 515	3.50	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
23 ^a	EFE-c	IVGGIARPYEFPQVSVR	29 690	3.50	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
24 ^a	EFE-g	IVGGIARPYEFPQVSVR	29 595	3.46	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
25 ^a	EFE-d	IIGGSNASPGFEPWQL	24 201	3.68	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
26 ^a	EFE-e	IIGGSNASPGFEPWQL	24 170	3.62	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
27 ^a	EFE-f	VVGGSDTTKQQYP	23 028	3.94	赤子爱胜蚓	纤溶酶活性	23
28 ^a	band 13	GVHLTDAEKA	15 983	3.00~4.00	赤子爱胜蚓	抗肿瘤、激酶活性	27

续表 1

序号	名称	氨基酸序列/N 端序列	相对分子质量	pI	来源	药理作用	文献
29 ^a	band 7	GVVISIANQKGGVG	33 317	3.00~4.00	赤子爱胜蚓	抗肿瘤、激酶活性	27
30 ^a	D2(8)	IVGGYTCCA	23 335	3.00~4.00	赤子爱胜蚓	抗肿瘤、激酶活性	27
31 ^a	band 9	IVGGYTCCA	23 335	3.00~4.00	赤子爱胜蚓	抗肿瘤、激酶活性	27
32 ^c	F1	VIGGTDAAPGEFPWQLSQRGGSHSCGASLLSSN SGLS ^a SHCVDGALPGS	20 000		赤子爱胜蚓	抗菌	28
33 ^c	F2	MGFE ^b PEPYVWDESFKVFYENLDEEHKG	9 000		赤子爱胜蚓	抗菌	28
34 ^b	lumbricin I	FSKYERQKDKRYPYSERKNQYTGPFQFLYPPERIPP QKVIKWNEEGLPIYEIPGEGGHAEPAAA	7 231		粉正蚓	抗菌	29
35 ^b	F-1	Ac-AMVSS	535		赤子爱胜蚓	抗菌	30
36 ^b	F-2	Ac-AMVGT	519		赤子爱胜蚓	抗菌	30
37 ^b	OEP3121	ACSAG	511		赤子爱胜蚓	抗菌	31
38 ^b	lumbricin-PG	FSRYARMRDRSPWSDRKNNSGPFQTYPEKAP PEKLIKWNNEGSPIFEMPAEGGHIEP	6 909		威廉环毛蚓 <i>P. guillelmi</i>	抗菌	32
39 ^b	annetocin	CFVRNCPGT	992		赤子爱胜蚓	调节渗透压	33
40 ^b	GGNG-1	APKCSGRWAIHSCGGGNG	1 756		赤子爱胜蚓	促进肠道收缩	34
41 ^b	GGNG-2	GKCAQWAIHACAGGNG	1 598		赤子爱胜蚓	促进肠道收缩	34
42 ^b	GGNG-3	RPKACGRWAIHSCGGGNG	1 824		<i>P. vittata</i>	促进肠道收缩	34
43 ^b	<i>Pheretima</i> tetradecapeptide (PTP)	GFRDGSADRISHGF	1 520		<i>P. vittata</i>	促进肠道收缩	35
44 ^b	<i>Eisenia</i> tetradecapeptide (ETP)	GFKDGAADRISHGF	1 476		赤子爱胜蚓	促进肠道收缩	35
45 ^b	VQ-5	VSSVQ	518		赤子爱胜蚓	镇痛、抗炎	36
46 ^b	AQ-5	AMADQ	534		赤子爱胜蚓	镇痛、抗炎	36
47 ^b	Ean-EG	MATRLMMLLGMIALCMMSGVAGQVNYDEVLEKS ILFYEAERSGDLPSNNRIPYRGDSALGDQGNQGG DLTGGWYDAGDHVKFGFPMFAFATTLAWGILEF RDGYEAAGQYNLALDSIRWTLNYFLKAHVSDNE FYGQVGDANTDHAWWGRPEDMTMERPAWSISP SAPGSDLAETAALAAGYLVFRDLDAAFANL LAHSRTLYDFALNNGIYSQISNAAGFYASSAYE DELAWGAAWLYRATEEQEYLDRAYEFGTTNTA WAYDWNEKIVGYQLLLTTSAGQTDFLPRVENFL RNWFPGGSVQYTPLGLAWLAQWGPNRYAANAA FIALVSAKVNILASESEQFARSQIHYMLGDAGRS YVVGFGNPPQPPIHRSSCPDQPAECDWDEFN QPGPNYQILYGALVGGPDQNDQFEDLRSYIRNE VANDYNAGFQGAVALRAIQLRDGK	48 500		<i>Eisenia andrei</i>	促进消化	37
48 ^a	antiviral protease	VIAGGXAAIIG	27 000		赤子爱胜蚓	抗植物病毒	38

^aN 端序列 ^b全序列 ^c部分序列

^aN terminal sequence ^bcomplete sequence ^cpartial sequence

的抗凝血、促进纤溶蛋白溶解、改善血液循环等作用^[39]。它们可以直接作用于纤维蛋白原和纤维蛋白，

也可以通过激活纤溶酶原而发挥作用。另外，地龙中的这些酶还能够抑制血小板聚集，促进组织型纤

溶酶原激活物的分泌,以及水解凝血酶^[8]。段平等^[40]通过实验发现地龙中的纤溶酶抗凝血效果具有剂量相关性,低剂量时能够降低纤维蛋白原水平和延长凝血酶时间,高剂量时能在此基础上延长凝血酶原时间和白陶土部分凝血活酶时间,并且还能够降解凝血因子 II、VIII,从而产生强效抗凝的效果。

2.1.2 降压 李承德课题组对地龙耐热蛋白 LHP 在降压方面的作用进行了深入研究,发现 LHP 对正常大鼠和自发性高血压大鼠 (SHR) 均有显著降压作用,LHP 能够升高血浆、肾脏局部 6-酮-前列腺素-F1a 的含量,抑制 SIIR 肾脏血管紧张素 1 型受体 (AT1) 受体的表达,降低血浆、肾脏血管紧张素 II、内皮素及醛固酮的含量^[41-42]。肖梅芬^[43]制备得到 1 种具有降糖、降压、消除糖尿病并发症的地龙蛋白,研究发现该蛋白能够通过溶解血栓及改善血管状态而发挥降压作用。临床实验发现,该蛋白能够使原发性高血压病患者血压控制在正常水平,使重度高血压或心脑血管并发高血压患者服用其他降压药的效果增强,从而减少其服药剂量及毒副作用。

2.2 对神经系统的作用

2.2.1 抗缺血性脑卒中 根据缺血性脑卒中的特点,临床上主要有 2 种治疗方案:一是通过溶栓、扩张血管、调节血液状态等改善脑缺血区域供血^[44];二是通过阻断神经细胞死亡,减轻神经细胞损伤,保护神经细胞结构和功能,促进受损神经细胞恢复等方式达到神经保护的目的^[45]。

地龙中的蚓激酶 (LK) 具有类似纤溶酶原激活物的作用,能够使缺血性脑卒中患者纤维蛋白含量下降,从而抑制血栓形成,减小脑梗死面积,改善脑缺血区供血^[46]。Ji 等^[47]对 LK 抗脑缺血作用机制进行研究,发现 LK 能够升高环磷酸腺苷 (cAMP) 水平,减少钙离子从钙库释放,还能够抑制细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 表达从而起到抗血小板聚集以及抗血栓形成的作用,另外 LK 还能够激活 JAK1/STAT1 通路产生抗细胞凋亡、保护脑缺血损伤的作用。临床上通过多中心、双盲、安慰剂对照的试验也证实了 LK 在缺血性脑卒中治疗及康复过程中具有良好的疗效^[48]。除 LK 外, Kim 团队对地龙中的 1 种抗菌肽 lumbricusin 在神经系统方面的作用也进行了深入研究,发现 lumbricusin 能够促进神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞的增殖,抑制 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 诱导的小鼠神经干细胞 (MNSCs) 细胞凋亡,并且在小鼠帕金森病 (PD) 模型中显示

出神经保护作用,其作用机制可能是促进 p27^[Kip1] 降解^[49-50]。Seo 等^[51]基于 lumbricusin 的氨基酸序列新合成得到 1 种多肽 LumA5,研究发现该多肽能够抑制脂多糖 (LPS) 引起的小胶质细胞活化,从而改善神经炎症,此外, LumA5 还能够抑制由 LPS 活化产生的对神经元细胞 SH-SY5Y 的细胞毒性并改善其细胞活力。这些研究均显示地龙中蛋白多肽类成分在神经系统中可能有多方面的效果,值得进一步研究开发。

2.2.2 抗癫痫 癫痫是一种神经系统综合征,具有突然发生、反复发作的特点。中枢神经系统内的抑制性氨基酸和兴奋性氨基酸之间平衡失调是导致癫痫发作的重要原因,而 γ -氨基丁酸 (GABA) 和谷氨酸 (Glu) 分属于这 2 种氨基酸^[52]。研究发现地龙中 LK 能够提高 GABA 水平,并同时降低 Glu 含量,从而改善抑制性氨基酸和兴奋性氨基酸神经递质的平衡失调,产生与丙戊酸钠相仿的抗癫痫效果,并且随着 LK 剂量的增加,其作用呈现出优于后者的趋势^[53]。

2.3 止咳平喘作用

临床资料显示^[54-55],鲜地龙提取液能够快速治疗哮喘急性发作,改善呼吸困难症状和肺功能。房泽海等^[56-57]从赤子爱胜蚓中提取分离得到一种粗蛋白 EP,豚鼠哮喘模型整体实验表明 EP 具有良好的平喘活性,能够预防抗原攻击后引起的动态肺顺应性下降和肺阻力增高。对 EP 进一步分离纯化得到的活性蛋白成分 EP2,研究发现 EP2 在整体和离体动物实验中均表现出良好的平喘效果,作用强度与孟鲁司特接近。可以看出,地龙蛋白是地龙平喘作用的物质基础之一,但是其平喘蛋白的具体结构以及作用机制还有待进一步研究。

2.4 免疫增强作用

QY-I 是从太平 II 号蚯蚓 *Eisenia foelide* 中分离得到 1 种糖蛋白,研究发现该蛋白能够显著提高荷瘤小鼠的胸腺指数和脾指数,增强小鼠巨噬细胞的吞噬功能^[58]。唐小云等^[59]分离得到 1 种小分子活性多肽 LP,研究发现 LP 能够明显提高淋巴细胞增殖率和巨噬细胞及脾细胞分泌 NO 的水平,还能够增强巨噬细胞毒效应。郭建等^[60]研究了地龙活性蛋白对免疫造血功能的影响,发现地龙活性蛋白对 B 淋巴细胞 (BC) 反应和淋巴细胞的转化具有促进作用,还能够增强巨噬细胞的吞噬功能,从而提高机体的免疫力。

2.5 抗肿瘤作用

体内外实验均证明地龙提取物对多种肿瘤有明显的抑制作用,其抗肿瘤成分主要为蛋白类成分^[61]。赵锐等^[27]从地龙中分离得到一组活性蛋白 D2(8),通过体外肿瘤细胞抑制实验证明 D2(8) 具有抗肿瘤活性,并推测其对肿瘤细胞的作用可能与丝氨酸蛋白酶水解肿瘤细胞中某些结构蛋白,破坏肿瘤细胞结构完整性有一定的联系。陈学东等^[62]从背暗异唇蚓 *Allolophora caliginosa* Duges 中分离得到一组相对分子质量在 3 000~5 000 的蛋白成分,动物实验发现该组蛋白能够抑制基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 表达,从而明显降低瘤体的体积与质量。林少琴等^[63]从地龙中分离得到一组具有清除自由基、抗脂质过氧化的糖蛋白,研究发现该组蛋白能够通过增强小鼠免疫功能,从而抑制肿瘤细胞的生长。Hrzenjak 等^[64]从地龙中提取得到一种糖脂蛋白混合物,发现其具有抗氧化作用、类似纤溶酶和抗氧化酶活性,并推测其具有较强的抑制肿瘤细胞生长和促进肿瘤细胞凋亡的作用^[64]。郭建等^[60]通过实验推测地龙活性蛋白对免疫系统的作用可能是其抗癌作用的相关环节。刘松江等^[65]观察地龙蛋白提取液对小鼠结肠癌移植瘤生长及血管新生的抑制作用,并探索相关分子机制,发现地龙提取液对小鼠结肠癌移植瘤的生长及血管新生有显著抑制作用,该作用可能与其抑制 JAK-STAT3 通路有关。谢江碧等^[66]研究发现地龙提取物对多种人癌细胞株有抑制杀伤作用,其中凋亡相关丝氨酸蛋白酶 I 是地龙抑制癌细胞生长的物质基础。常春霞^[67]对地龙纤溶酶抗肝癌转移作用进行研究,发现地龙蛋白具有类似纤溶酶原激活物的作用,能够使肿瘤患者血液高凝的状态得到改善,从而有效减少肿瘤发生转移的风险。

2.6 抗纤维化作用

研究发现地龙 2 号(主要成分为蚯蚓纤溶酶及蚯蚓胶原酶)具有抗肝纤维化作用,能够抑制 CCl₄ 诱导的大鼠肝内纤维组织的形成、减轻肝细胞的损害、降低血中透明质酸及黏连蛋白的含量,进一步研究发现地龙 2 号能下调肝脏细胞 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子- β 1、尿激酶型纤溶酶原激活物、I 型纤溶酶原激活抑制物、基质金属蛋白酶组织抑制物-1 水平;上调基质金属蛋白-13 mRNA 和蛋白表达水平,并促进细胞外基质降解,从而抑制肝星状细胞的活化,对抗纤维化形成^[68-69]。

Yang 等^[70]研究发现地龙提取物(主要为蚓激酶)能够显著减少肺部炎症和纤维化,并且改善 SiO₂ 灌注小鼠的肺结构和功能。其作用机制为抑制人支气管上皮样细胞 HBE 和人肺癌 A549 细胞中的 SiO₂ 诱导的氧化应激、线粒体凋亡途径和上皮间质转化。此外,还发现核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 激活部分介导了地龙提取物对 SiO₂ 诱导的肺纤维化的干预作用。其研究说明地龙提取物是一种潜在的具有抗氧化、抗炎和抗纤维化的用于矽肺治疗的药物。Lai 等^[71]发现蚓激酶能抑制暴露于二手烟所引起的心脏纤维化,具有心脏保护作用,可有效防止暴露于二手烟的非吸烟者心脏疾病的流行病学发病率。地龙中具有抗纤维化的蛋白成分,多为具有抗凝、溶栓作用的酶类成分,其抗纤维化的作用机制与其抗凝、溶栓作用有可能存在一定的联系。

2.7 抗炎、镇痛、解热作用

临床上发现鲜地龙提取物能够加速伤口的恢复,减少炎症物质的渗出,缩短炎症期,推测其良好的抗炎能力可能与其增强巨噬细胞的免疫活性有关^[72]。Balamurugan 等^[73]从蚯蚓中分离得到 1 种类似于糖蛋白复合物的物质 EE,该物质具有与吲哚美辛及扑热息痛相似的抗炎和解热功效,能够使炎症和发热大鼠的组胺呈剂量依赖性降低,并恢复正常状态。Seo 等^[51]基于地龙抗菌肽 lumbricisin 的氨基酸序列新合成得到 1 种多肽 LumA5,该多肽能够显著降低酶如环氧合酶-2 (COX-2)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS),细胞因子如白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和信号转导因子如蛋白激酶 B (AKT)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)、核转录因子- κ B (NF- κ B) 参与 LPS 引发的体内外炎症反应。Li 等^[36]分离得到镇痛肽 VQ-5 (45) 和抗炎肽 AQ-5 (46),它们能够在持续性神经性疼痛和炎症小鼠模型中表现出镇痛活性,并能够抑制参与镇痛和抗炎功能的 MAPKs 信号通路。地龙蛋白多肽类成分的抗炎活性是其具备其他药理作用的基础,如止咳平喘作用、抗肿瘤作用以及对神经系统的作用等。

2.8 抗菌作用

地龙生活在土壤中,经过长期的进化已经形成了抵抗外来微生物侵袭的机制,自身能够产生一些抗菌类成分。Cho 等^[29]分离得到的抗菌肽 lumbricin I (34),具有广谱的抗菌活性,且没有溶血副作用,说明该肽可能为地龙的防御系统的组成成分。张希

春等^[30]分离得到的抗菌肽 F-1 (32) 和 F-2 (33), 对革兰阳性菌、阴性菌和真菌都有一定抑制作用。崔东波等^[74]从地龙中分离得到了 1 种抗菌肽, 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等 10 多种菌均有不同程度的抑制作用。Li 等^[32]分离得到的抗菌肽 lumbricin-PG (38) 对细菌和真菌具有潜在的抗微生物活性, 但表现出对人和兔红细胞的弱溶血活性。在当前抗生素使用泛滥、抗药性细菌不断增多的背景下, 基于仿生学, 对来源于地龙抗菌活性多肽类成分的深入研究, 将有助于新的抗生素的发现。

2.9 加速创面愈合作用

Deng 等^[75]通过宏观、组织病理学、血液学和免疫组织化学证明鲜地龙匀浆提取物具有促进伤口愈合的作用, 并推测其潜在的机制可能是加速羟脯氨酸和转化生长因子- β (TGF- β) 分泌, 从而增加胶原蛋白的合成, 促进毛细血管和成纤维细胞的增殖。Grdisa 等^[76]通过测量健康皮肤、生理愈合伤口和用地龙糖蛋白 G-90 处理的伤口中表皮细胞生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF) 的活化程度, 发现 G-90 能够明显促进 EGF、FGF 的产生。Matausijć-Pisl 等^[77]进一步研究 G-90 对动物伤口模型的影响, 发现 G-90 比阳性药 panthenol D 能够更好地促进伤口愈合, 并具有抗菌、抗炎效果。Goodarzi 等^[78]同样发现 G-90 能够促进糖尿病大鼠的伤口愈合, 故一致认为 G-90 能够成为一种新型伤口愈合剂。Yang 等^[79]对 G-90 进一步分离得到 3 个组分, 其中 ES2 能够促进成纤维细胞和角质形成细胞的增殖以及刺激创伤区域中成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子的表达, 从而表现出显著的创伤愈合能力。Song 等^[80]研究发现地龙活性蛋白 EAP 可有效促进 NIH3T3 细胞的增殖和迁移活性, 其促进增殖活性是通过 PI3K \rightarrow Rac \rightarrow PAK \rightarrow MEK 信号通路实现的。

2.10 其他作用

Pan 等^[81]研究发现地龙消化道中的 1 种蛋白酶 *Eisenia fetida* protease-III-1 (EfP-III-1) 具有 DNA 酶和蛋白酶双重活性, 且其活性具有 pH 依赖性, 在碱性条件下表现出蛋白酶的作用; 在酸性条件下表现出 DNA 酶活性; 在 pH 7.0 时 2 种活性均具备。鉴于蚯蚓复杂的生活环境, EfP-III-1 的这种双重活性可能在蚯蚓的消化道中发挥重要作用。Ueda 等^[38]从赤子爱胜蚓的体腔液中纯化出 1 种新蛋白酶 (48), 研究发现该蛋白酶对黄瓜花叶病毒 (CMV) 和番茄花叶

病毒 (TMV) 具有强抗病毒活性, 可作为抗 CMV、TMV 和其他植物病毒的潜在抗病毒因子。

3 结语

中药地龙资源丰富, 其蛋白多肽类成分含量高、毒性低, 具有多方面的药理作用, 国内外学者对地龙蛋白多肽类成分的研究也日益深入和广泛, 并开发出多种地龙蛋白多肽类产品, 如地龙活性蛋白胶囊、地龙蛋白溶血栓胶囊、蚓激酶肠溶胶囊、多肽地龙蛋白等, 这些产品都已应用于临床, 并越来越多地在心脑血管、呼吸系统等疾病的预防和治疗中发挥作用。

但是地龙蛋白多肽类成分复杂, 针对其研究也存在一些问题。首先, 目前分离纯化并确定氨基酸序列的蛋白多肽类成分较少, 测定了空间结构的更是微乎其微, 因此在传统分离的基础上, 结合化学合成及基因重组的方法将有助于地龙蛋白多肽类成分氨基酸序列的解析, 也为地龙蛋白多肽类成分空间结构的解析打下基础; 其次, 地龙蛋白多肽类成分的活性研究目前多集中于提取物及提取部位的活性测定, 因此, 蛋白多肽单体成分的活性及其机制研究显得尤为迫切。

本文通过对中药地龙蛋白多肽类成分及其药理作用研究进展进行了综述, 为地龙蛋白多肽类成分的进一步研究与开发提供参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第 25 卷) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [3] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.
- [4] 王光忠, 胡迪. 地龙类药材化学成分分析 [J]. 中药材, 1998, 21(3): 133-135.
- [5] 杜航, 孙佳明, 郭晓庆, 等. 地龙的化学成分及药理作用 [J]. 吉林中医药, 2014, 34(7): 707-709.
- [6] Verma M K, Pulicherla K K. Enzyme promiscuity in earthworm serine protease: Substrate versatility and therapeutic potential [J]. *Amino Acids*, 2016, 48(4): 941-948.
- [7] 袁渊, 沈宏萍. 地龙活性蛋白药理学作用研究进展 [J]. 中国现代医药杂志, 2014, 16(3): 107-109.
- [8] 杨新, 刘欣, 万明, 等. 地龙抗凝血活性物质研究进展 [J]. 江汉大学学报: 自然科学版, 2017, 45(1): 83-88.

- [9] Mihara H, Sumi H, Akazawa T, *et al.* Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm [J]. *Thromb Haemostas*, 1983, 50(1): 258-263.
- [10] 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.
- [11] Nakajima N, Mihara H, Sumi H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(10): 1726-1730.
- [12] Sumi H, Nakajima N, Mihara H. A very stable and potent fibrinolytic enzyme found in earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. *Comparat Biochem Physiol Part B Comparat Biochem*, 1993, 106(3): 763-766.
- [13] Yang J S, Ru B G. Purification and characterization of an SDS-activated fibrinolytic enzyme from *Eisenia fetida* [J]. *Biochem Mol Biol*, 1997, 118(3): 623-631.
- [14] Lassegues M, Milochau A, Doignon F, *et al.* Sequence and expression of an *Eisenia-fetida*-derived cDNA clone that encodes the 40-kDa fetidin antibacterial protein [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 246(3): 756-762.
- [15] Cho I H, Choi E S, Lim H G, *et al.* Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2004, 37(2): 199-205.
- [16] 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.
- [17] 程牛亮, 牛 勃, 张祖珣, 等. 双胸蚓纤溶酶的纯化及性质 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1990, 6(2): 186-190.
- [18] 郑国平, 程牛亮. 双胸蚓纤溶酶 III 的分离纯化及其性质研究 [J]. 山西医科大学学报, 1996, 27(2): 81-83.
- [19] 于保锋, 刘志贞, 张悦红, 等. 赤子爱胜蚓核酸酶样蛋白的纯化及其活性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(5): 705-709.
- [20] 于保锋, 刘志贞, 张悦红, 等. 赤子爱胜蚓核酸酶样蛋白的一级结构特征 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(15): 2390-2396.
- [21] 杨四成, 刘晓英, 李令媛, 等. 蚯蚓纤溶酶的分离纯化及部分序列的测定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1997, 13(3): 292-296.
- [22] 谢江碧, 郭振泉, 翁 宁, 等. 一种凋亡相关蚯蚓丝氨酸蛋白酶的纯化、活性鉴定及部分性质研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(3): 453-460.
- [23] Feng W, Chao W, Mei L, *et al.* Purification, characterization and crystallization of a group of earthworm fibrinolytic enzymes from *Eisenia fetida* [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(13): 1105-1109.
- [24] Tang Y, Zhang J, Gui L, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of earthworm fibrinolytic enzyme component A from *Eisenia fetida* [J]. *Acta Crystallogr Sect C-Struct Chem*, 2000, 56(12): 1659-1661.
- [25] Wang F, Wang C, Li M, *et al.* Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component B: A novel, glycosylated two-chained trypsin [J]. *J Mol Biol*, 2005, 348(3): 671-685.
- [26] Tang Y, Liang D, Jiang T, *et al.* Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component A: Revealing the structural determinants of its dual fibrinolytic activity [J]. *J Mol Biol*, 2002, 321(1): 57-68.
- [27] 赵 锐, 纪建国, 童元鹏, 等. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 中抗肿瘤与纤溶酶原激活酶活性蛋白质的分离与鉴定 [J]. 生物化学与生物物理学报: 英文版, 2002, 34(5): 576-582.
- [28] 张汶婕, 何晓冬, 蒋企洲, 等. 低分子量蚯蚓纤溶酶的获得及其活性研究 [J]. 药物生物技术, 2009, 16(6): 550-553.
- [29] Cho J H, Park C B, Yoon Y G, *et al.* Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: Purification, cDNA cloning and molecular characterization [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1408(1): 67-76.
- [30] 张希春, 糕如朋. 蚯蚓两种抗菌肽的分离纯化及部分性质 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(6): 955-960.
- [31] Liu Y Q, Sun Z J, Wang C, *et al.* Purification of a novel antibacterial short peptide in earthworm *Eisenia foetida* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2004, 36(4): 297-302.
- [32] Li W, Li S, Zhong J, *et al.* A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelson) [J]. *Peptides*, 2011, 32(6): 1146-1150.
- [33] Oumi T, Ukena K, Matsushima O, *et al.* Annetocin: An oxytocin-related peptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198(1): 393-399.
- [34] Oumi T, Ukena K, Matsushima O, *et al.* The GGNG peptides: Novel myoactive peptides isolated from the gut and the whole body of the earthworms [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216(3): 1072-1078.
- [35] Ukena K, Oumi T, Matsushima O, *et al.* A novel gut tetradecapeptide isolated from the earthworm, *Eisenia foetida* [J]. *Peptides*, 1995, 16(6): 995-999.

- [36] Li C, Chen M, Li X, *et al.* Purification and function of two analgesic and anti-inflammatory peptides from coelomic fluid of the earthworm, *Eisenia foetida* [J]. *Peptides*, 2017, 89: 71-81.
- [37] Park I Y, Ju R C, Ok S M, *et al.* A new earthworm cellulase and its possible role in the innate immunity [J]. *Dev Comparat Immunol*, 2017, 67: 476-480.
- [38] Ueda M, Noda K, Nakazawa M, *et al.* A novel anti-plant viral protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*: Purification, characterization and its identification as a serine protease [J]. *Comparat Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol*, 2008, 151(4): 381-385.
- [39] 毕燕芳, 马书林. 中药地龙中溶栓成分研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(8): 60-62.
- [40] 段平, 胡淑丽. 蚯蚓溶栓酶对大鼠凝血及纤溶指标的影响 [J]. 时珍国医国药, 1997, 8(1): 14-16.
- [41] 张兰娥, 康白, 李承德, 等. 地龙耐热蛋白降压作用的研究 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(11): 1886-1887.
- [42] 李承德, 康白, 毛淑梅, 等. 地龙降压蛋白对自发性高血压大鼠降压作用及其机制的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 450-452.
- [43] 肖梅芬. 降糖、降压、消除糖尿病并发症的地龙蛋白及其应用: 中国, CN103263660 A [P]. 2013-05-13.
- [44] Borlongan C V, Jr A A R, Oliveira M C. Breaking the barrier in stroke: What should we know? A mini-review [J]. *Curr Pharm Design*, 2012, 18(25): 3615-3623.
- [45] Ayuso M I, Montaner J. Advanced neuroprotection for brain ischemia: An alternative approach to minimize stroke damage [J]. *Expert Opinion Investig Drugs*, 2015, 24(9): 1137-1142.
- [46] 孟胜喜, 霍清萍. 地龙及其有效成分对神经系统疾病的作用 [J]. 山东中医杂志, 2016, 35(10): 933-936.
- [47] Ji H, Wang L, Bi H, *et al.* Mechanisms of lumbricinase in protection of cerebral ischemia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 590(1): 144-151.
- [48] 盛爱珍, 徐忠宝. 蚓激酶多中心、双盲、安慰剂对照治疗缺血性脑血管病患者的实验室效果 [J]. 中国新药杂志, 2002, 11(1): 82-84.
- [49] Kim D H, Lee I H, Nam S T, *et al.* Neurotropic and neuroprotective activities of the earthworm peptide Lumbricin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(3): 292-297.
- [50] Kim D H, Lee I H, Nam S T, *et al.* Antimicrobial peptide, lumbricin, ameliorates motor dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2015, 25(10): 1640-1647.
- [51] Seo M, Lee J H, Baek M, *et al.* A novel role for earthworm peptide lumbricin as a regulator of neuroinflammation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(3): 1004-1010.
- [52] Filatova Y B, Voronina T A, Klodt P M, *et al.* Changes in the levels of inhibitory and excitatory amino acids in the brain structures of female rats with cobalt epileptogenic focus during different phases of the estrous cycle [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2011, 152(1): 47-49.
- [53] 马艳春, 韩宇博, 贾晓聪, 等. 地龙有效成分对戊四氮慢性点燃大鼠海马区 Glu、GABA 含量的影响 [J]. 中医药学报, 2013, 41(6): 54-56.
- [54] 王左. 地龙液治疗支气管哮喘急性发作临床观察 [J]. 中国中医急症, 1996, 5(1): 3-4.
- [55] 陈梅瑜. 地龙提取液对哮喘患者肺功能的影响 [J]. 右江民族医学院学报, 1997, 19(4): 606-607.
- [56] 房泽海, 冯怡, 徐德生. 鲜地龙平喘活性蛋白提取工艺研究 [J]. 中成药, 2007, 29(8): 1143-1146.
- [57] 王茵, 徐德生, 冯怡, 等. 蚯蚓中平喘蛋白组分的提取分离及其作用机制的初探 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(3): 189-193.
- [58] 林少琴, 邹开焯. 蚯蚓 QY-I 对荷瘤小鼠免疫功能及抗氧化酶的影响 [J]. 海峡药学, 2002, 14(1): 10-12.
- [59] 唐小云, 许静, 梁再赋, 等. 地龙肽免疫药理作用的实验研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(2): 249-250.
- [60] 郭建, 高福云, 靳耀英, 等. 地龙活性蛋白对免疫造血功能的影响及其抗肿瘤作用 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 670-672.
- [61] 余艳秋, 陈洪. 蚯蚓提取物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(3): 232-234.
- [62] 陈学东, 田道法, 孙虹. 地龙蛋白组分 III 对鼻咽癌细胞裸鼠移植瘤血管密度和 MMP-9 表达的影响 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2007, 15(5): 326-328.
- [63] 林少琴, 余萍. 蚯蚓抗肿瘤成分的研究 [J]. 海峡药学, 2000, 12(3): 59-61.
- [64] Hrzenjak T, Hrzenjak M, Kasuba V, *et al.* A new source of biologically active compounds-earthworm tissue (*Eisenia foetida*, *Lumbricus rubellus*) [J]. *Comparat Biochem Physiol A-Mol Integr Physiol*, 1992, 102(3): 441-447.
- [65] 刘松江, 孙姮, 闫珺. 地龙提取液对小鼠结肠癌移植瘤血管新生的抑制作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2018, 32(1): 70-73.
- [66] 谢江碧, 贺卫国, 翁宁, 等. 蚯蚓中抗肿瘤蛋白组分的提取分离及其抗肿瘤活性 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(3): 359-366.
- [67] 常春霞. 蚯蚓纤溶酶抗肝癌转移作用的实验研究 [D]. 南京: 东南大学, 2010.
- [68] 陈洪, 陆亚琴, 刘顺英, 等. 地龙 2 号对大鼠肝纤维

- 化 TGF- β 1, MMP-13 及 TIMP-1 mRNA 和蛋白表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(10): 2333-2337.
- [69] 陆亚琴, 陈洪, 吴平平, 等. 地龙 2 号对肝纤维化大鼠 uPA 和 PAI-1 蛋白表达的影响 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2007, 16(4): 354-356.
- [70] Yang J, Wang T, Li Y, *et al.* Earthworm extract attenuates silica-induced pulmonary fibrosis through Nrf2-dependent mechanisms [J]. *Lab Invest*, 2016, 96(12): 1279-1300.
- [71] Lai C H, Han C K, Shibu M A, *et al.* Lumbricinase from earthworm extract ameliorates second-hand smoke-induced cardiac fibrosis [J]. *Envir Toxicol*, 2014, 30(10): 1216-1225.
- [72] 张凤春, 陈云峰, 苏颜珍, 等. 地龙对巨噬细胞免疫活性的增强作用 [J]. 中国药理学杂志, 1998, 33(9): 532-535.
- [73] Balamurugan M, Parthasarathi K, Cooper E L, *et al.* Anti-inflammatory and anti-pyretic activities of earthworm extract-*Lampito mauritii* (Kinberg) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121(2): 330-332.
- [74] 崔东波, 郑彦杰, 王运吉, 等. 蚯蚓抗菌肽的分离 [J]. 大连工业大学学报, 2004, 23(4): 265-269.
- [75] Deng Z, Yin J, Luo W, *et al.* The effect of earthworm extract on promoting skin wound healing [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(2): BSR20171366.
- [76] Grdisa M, Popović M, Hrzenjak T. Stimulation of growth factor synthesis in skin wounds using tissue extract (G-90) from the earthworm *Eisenia foetida* [J]. *Cell Biochem Funct*, 2004, 22(6): 373-378.
- [77] Matausijć-Pisl M, Cupić H, Kasuba V, *et al.* Tissue extract from *Eisenia foetida* as a wound-healing agent [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2010, 14(3): 177-184.
- [78] Goodarzi G, Qujeq D, Elmi M M, *et al.* The effect of the glycolipoprotein extract (G-90) from earthworm *Eisenia foetida* on the wound healing process in alloxan-induced diabetic rats [J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(4): 242-249.
- [79] Yang Y, Hu H, Wang W, *et al.* The identification of functional proteins from amputated lumbricus *Eisenia fetida* on the wound healing process [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 1469-1478.
- [80] Song S, Wang Y, Ji K, *et al.* Effect of earthworm active protein on fibroblast proliferation and its mechanism [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(4): 732-739.
- [81] Pan R, Zhou Y, He H J, *et al.* An enzyme from the earthworm *Eisenia fetida* is not only a protease but also a deoxyribonuclease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407(1): 113-117.