

## 通俗环毛蚓抗血栓活性蛋白成分的快速富集及活性考察

张经纬, 杨万青, 马韞楠, 汪文杰, 钟宛凌, 毕嘉谣, 杜守颖\*  
(北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:以地龙品种中的通俗环毛蚓为研究对象,对其蛋白总提取物进行纯化富集以获得抗血栓活性蛋白成分(PvQ),对PvQ进行抗血栓活性研究,以期地为地龙的抗血栓物质基础研究提供参考。方法:采用AKTA-Pure型蛋白纯化系统,以体外活性为导向,富集通俗环毛蚓PvQ;采用纤维蛋白平板法、纤维蛋白原-凝血酶时间法(Fibg-TT法)对PvQ的纤溶及抗凝活性进行测定;利用体外血栓溶解试验评价PvQ对体外血栓的溶解能力,同时,考察了不同温度及pH对PvQ活性的影响。结果:成功富集得到通俗环毛蚓PvQ,活性测定表明其具有显著的纤溶及抗凝活性。体外血栓试验结果显示,37℃孵育5h后PvQ可水解超过80%的血栓块。此外,温度和pH对于PvQ活性影响显著,在≥60℃或酸性条件(pH<7)下PvQ活性显著降低或失活,而在≤50℃和碱性条件下PvQ活性则不受影响或受较少影响。结论:建立了可行的通俗环毛蚓PvQ制备方法,PvQ可同时作用于纤维蛋白和纤维蛋白原,从而发挥双重纤溶作用,表现出良好的纤溶及抗凝活性,为其用于治疗血栓性疾病提供了科学阐释,并可为地龙抗血栓蛋白类产品的开发提供参考。

**[关键词]** 地龙;通俗环毛蚓;抗凝活性;纤溶活性;蛋白纯化;温度;抗血栓活性

**[中图分类号]** R22;R94;R28;Q51 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0166-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211562

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210430.1243.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-04-30 16:18

### Rapid Enrichment and Activity Research of Antithrombotic Proteins from *Pheretima vulgaris*

ZHANG Jing-wei, YANG Wan-qing, MA Yun-nan, WANG Wen-jie,  
ZHONG Wan-ling, BI Jia-yao, DU Shou-ying\*

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** A strong antithrombotic protein component, named PvQ, was purified and enriched from total protein of *Pheretima vulgaris*, a traditional Chinese medicine. Moreover, we evaluated its fibrinolytic and anticoagulant activity, and expected to provide reference for the research on antithrombotic substances of *Pheretima*. **Method:** A rapid *in vitro* activity-oriented separation combined with the AKTA-Pure protein purification system conducted on *P. vulgaris*. Meanwhile, the fibrinolytic and anticoagulant activities of PvQ were measured by fibrin plate method and fibrinogen-thrombin time (Fibg-TT) method. And the *in vitro* thrombolysis assay was used for evaluating the lysis ability of PvQ to thrombus. Then the stability of PvQ was also analyzed for its anticoagulant activity at different pH and temperature. **Result:** The PvQ was successfully enriched and its activity was determined to have significant fibrinolytic and anticoagulant activities. And the result of *in vitro* thrombolysis assay revealed that PvQ could hydrolyze more than 80% of thrombus after 5 h of incubation at 37 °C. In addition, the changes of temperature and pH had significant effects on antithrombotic activity, and this study showed that PvQ was rapidly inactivated at ≥60 °C or in acidic conditions (pH<7). While, the activity of PvQ was unaffected or less affected at ≤50 °C and under alkaline conditions. **Conclusion:**

**[收稿日期]** 20210228(007)

**[基金项目]** 北京市技术开发类横向课题(2017110031009877)

**[第一作者]** 张经纬,在读硕士,从事中药新制剂与新技术研究,E-mail:zjw970830@163.com

**[通信作者]** \*杜守颖,博士,教授,从事中药新制剂与新技术研究,Tel:010-53912123,E-mail:dushouying@263.net

A feasible preparation method of PvQ is established, and it can affect fibrin and fibrinogen at the same time, thus exerting a dual fibrinolytic effect and possessing significant fibrinolytic and anticoagulant activities. It provides a scientific interpretation for the treatment of thrombotic diseases by PvQ and a reference for the development of antithrombotic protein products of *Pheretima*.

[Keywords] *Pheretima*; *Pheretima vulgaris*; anticoagulant activity; fibrinolytic activity; protein purification; temperature; antithrombotic activity

地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*, 通俗环毛蚓 *P. vulgaris*, 威廉环毛蚓 *P. guillelmi* 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* 的干燥体<sup>[1]</sup>。地龙使用历史悠久,应用广泛,多用于高凝状态及血栓性疾病的防治,并且取得了良好的效果。其始载于《神农本草经》,可以“主治蛇瘕,去三虫、伏尸、鬼疰、蛊毒,杀长虫,仍自化作水”<sup>[2]</sup>。近现代以来,MIHARA 等<sup>[3]</sup>报道了蚯蚓提取物中具有纤溶酶活性的蛋白质,随后,众多学者陆续发现地龙蛋白在抗凝血、抗血栓方面疗效显著<sup>[4-5]</sup>。鉴于血栓性疾病对人类健康造成的极大威胁,地龙的抗凝及纤溶活性当前备受关注。有研究表明,地龙抗凝蛋白中富含纤维蛋白溶解酶,可以直接水解血栓纤维蛋白。同时,其激酶成分还可启动血栓中的纤维蛋白溶酶原,使之转化为纤维蛋白溶解酶,进而溶解血栓中的纤维蛋白,发挥双重溶栓作用<sup>[6]</sup>。

通俗环毛蚓作为2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的地龙品种之一<sup>[1]</sup>,其广泛分布于中国中部、南部地区,其中上海、江苏、山东等地为其道地产区,是我国较为常见且大量使用的地龙品种<sup>[7]</sup>。然而,目前有关地龙的活性物质基础研究多集中于2020年版《中国药典》未收录品种赤子爱胜蚓、粉正蚓等<sup>[8-10]</sup>,通俗环毛蚓的活性物质基础研究有待加强。基于此,本实验拟通过AKTA-Pure蛋白纯化系统,结合离子交换色谱技术,建立通俗环毛蚓抗血栓活性蛋白成分(PvQ)的快速纯化富集方法,并对其进行活性表征分析,为通俗环毛蚓用于血栓性疾病的治疗提供依据,并为其抗血栓蛋白单体的分离纯化提供参考。

## 1 材料

AKTA-Pure型蛋白纯化系统和HiTrap Q HP型离子交换色谱柱(美国GE公司),LGJ-10C型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂),Innova 40R型恒温空气浴摇床(美国New Brunswick公司),FE20型pH计(瑞士Mettler-Toledo公司),MNT-150型数显游标卡尺(上海美耐特实业有限公司),BSA224S型精密电子天平(德国Sartorius公司),CA500型全自动血

凝分析仪(日本Sysmex公司),Milli-Q型超纯水系统(德国Merck密理博公司),Epoch-2型多功能酶标仪(美国BioTek公司),Velocity14型台式离心机(澳大利亚Dynamica公司)。

三羟甲基氨基甲烷(Tris,美国Bioruler公司,批号r000901008),磷酸盐缓冲液(PBS,江苏凯基生物技术股份有限公司,批号20200429),生理盐水(石家庄四药有限公司,批号2011112002),二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒,牛血清白蛋白(BSA)对照品和甘氨酸(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200722,20200722,709T063),琼脂糖(西班牙Biowest公司,批号122000),水合氯醛[福晨(天津)化学试剂有限公司,批号20200602];纤维蛋白原(牛血),纤维蛋白溶酶原,凝血酶(牛血)和蚓激酶(中国食品药品检定研究院,批号分别为140607-202042,140606-201826,140605-201927,140650-201804);通俗环毛蚓购自上海中草药种植专业合作社,批号20190501,经北京中医药大学中药学院杜守颖教授鉴定为钜蚓科动物通俗环毛蚓 *P. vulgaris* 鲜品。

SPF级雄性SD大鼠2只,体质量200~250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。本文涉及的动物实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号BUCM-4-2020110903-4109。

## 2 方法

**2.1 通俗环毛蚓粗酶的制备** 在前期基础基础上,取通俗环毛蚓适量,加入6倍量Tris-HCl缓冲液(pH 7.8),匀浆处理,离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>,5 min,离心半径13.5 cm),收集上清液,缓慢滴加乙醇使含醇量达30%,沉淀2 h,弃去沉淀,上清液缓慢滴加乙醇至无沉淀继续析出,收集沉淀,冷冻干燥(冷阱温度设定-80 ℃,真空度8 Pa,干燥时间24 h),得通俗环毛蚓粗酶冻干粉。

### 2.2 通俗环毛蚓 PvQ 的富集

**2.2.1 色谱条件** 选择HiTrap Q HP型阴离子交换色谱为填料,Tris-HCl(50 mmol·L<sup>-1</sup>)为流动相A,

Tris-HCl(50 mmol·L<sup>-1</sup>)-NaCl(1 mol·L<sup>-1</sup>)为流动相B,检测波长280 nm,洗脱流速5 mL·min<sup>-1</sup>,Step模式梯度洗脱(第1~8个柱体积,100%A;第9~18个柱体积,80%A;第19~25个柱体积,100%B)。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 称取2.1项下通俗环毛蚓粗酶冻干粉200 mg,溶解于20 mL的Tris-HCl缓冲液(pH 7.8,50 mmol·L<sup>-1</sup>)中,涡旋混匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

**2.2.3 富集** 取2.2.2项下供试品溶液1.5 mL注入蛋白纯化系统,按2.2.1项下条件洗脱,AKTA-Pure自动收集装置设定每个收集管收集1个柱体积(1个柱体积=5 mL)的收集液。各收集管中的收集液以超滤管(截留相对分子质量3 kDa)离心除盐后,采用纤维蛋白原-凝血酶时间法(Fibg-TT法)测定活性,根据活性测定结果合并活性样品溶液。

### 2.3 通俗环毛蚓提取物的活性评价

**2.3.1 酶活性评价方式** 采用纤维蛋白平板法及Fibg-TT法测定样品纤溶及抗凝活性。取直径9 cm的培养皿,加入凝血酶(40 BP·mL<sup>-1</sup>)0.5 mL,将纤维蛋白原(2 g·L<sup>-1</sup>)8 mL与琼脂糖(5 g·L<sup>-1</sup>)10 mL迅速混合后加入培养皿中,轻轻摇匀,室温水平放置1 h后打孔。精密量取不同浓度的蚓激酶对照品溶液(24 000,16 000,12 000,8 000,6 000,4 000 U·mL<sup>-1</sup>)及供试品溶液各10 μL,点在同一培养皿中,加盖,置37 °C恒温箱中孵育18 h后取出,用游标卡尺精确测量溶圈垂直两直径长度,以蚓激酶对照品活性的对数为横坐标,垂直两直径乘积的对数为纵坐标,绘制回归方程,计算样品活性<sup>[11-13]</sup>。

以生理盐水(溶解样品时的溶剂)为空白对照,采用全自动血凝分析仪测定系列浓度蚓激酶对照品溶液(250,500,1 000,1 500,2 000 U·mL<sup>-1</sup>)及待测样品的Fibg-TT,建立测定时间对数与对照品活性的标准曲线,同等条件下待测样品的Fibg-TT结果取对数后带入标准曲线,得各样品相对于蚓激酶对照品的活性<sup>[14]</sup>。同时,采用BCA法测定样品蛋白浓度,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书中酶标仪检测法,在562 nm处测定样品蛋白浓度,以系列浓度BSA对照品溶液绘制标准曲线,计算样品蛋白浓度<sup>[15-16]</sup>。比活力的计算参照蚓激酶的国家药品标准,根据公式比活力=样品活性/样品蛋白浓度计算样品比活力<sup>[11]</sup>。

**2.3.2 温度对通俗环毛蚓 PvQ 抗凝活性的影响** 以生理盐水为溶剂配制 PvQ 溶液为待测样品(质量浓度 1.0 g·L<sup>-1</sup>),恒温空气浴摇床孵育(回旋频率

150 r·min<sup>-1</sup>),设置各试验组孵育温度分别为30,40,50,60,80 °C,各试验组在0,15,30,60,90,120 min时分别取样,以各温度下孵育的生理盐水为空白对照,测定各样品Fibg-TT,并按照2.3.1项下方法进行酶活性评价。

**2.3.3 pH对通俗环毛蚓 PvQ 抗凝活性的影响** 以生理盐水为溶剂配制 PvQ 溶液为待测样品(质量浓度 1.0 g·L<sup>-1</sup>)。向待测样品中分别加入 pH 2.0 和 pH 3.0 的甘氨酸-HCl 缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>),pH 4.0 和 pH 5.0 的乙酸-乙酸钠缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>),pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>),pH 9.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>),恒温空气浴摇床孵育(回旋频率 150 r·min<sup>-1</sup>,温度 37 °C),各组在 0,15,30,60,90,120 min 时分别取样,以对应 pH 的缓冲液为空白对照,测定各样品 Fibg-TT,并按照 2.3.1 项下方法进行酶活性评价。

**2.3.4 PvQ 体外血栓溶解研究** 为进一步评价 PvQ 对体外血栓的溶解能力,参考 TRISINA 等<sup>[17]</sup>的方法研究 PvQ 体外溶栓活性。取大鼠 2 只,腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(0.3 g·kg<sup>-1</sup>),麻醉起效后腹主动脉取血,置于真空采血管中,37 °C 生化培养箱中静置 5 h,制成血栓条。将血栓条轻轻取出放入培养皿中,快速分割为约 5 mm 大小的血栓块,并且记录各段质量。将分割后的血栓块放入预称重的离心管中,每管加入蚓激酶,PBS 及不同浓度 PvQ 溶液各 100 μL,其中 PBS 为溶剂对照,蚓激酶对照品(浓度为 24 000 U·mL<sup>-1</sup>)为阳性对照。通过 BCA 法测定 24 000 U·mL<sup>-1</sup> 蚓激酶对照品蛋白浓度,以此为参照确定 PvQ 给药浓度,并设置低、中、高 3 个给药浓度(342,684,1 368 mg·L<sup>-1</sup>),以考察体外溶栓活性与给药浓度的相关性;同时,于给药后 0.5,1.0,2.0,3.0,5.0 h 共 5 个时间点进行取样、称重,根据公式溶栓百分比=[(初始栓块质量-孵育后各取样点栓块质量)/初始栓块质量]×100% 计算各时间点溶栓百分比,以考察药物活性与孵育时间的相关性。

## 3 结果

**3.1 PvQ 的富集** 按 2.2 项下方法对通俗环毛蚓粗酶提取物进行富集,色谱图见图 1,共得到 3 个吸收峰(25 个收集管)。将各收集管样品进行 Fibg-TT 测定,结果表明第 10~16 个收集管中收集液活性明显,第 1 个和第 25 个收集管中收集液几乎无活性,其余各管样品未检测到蛋白且无抗凝活性,抗凝活性曲线见图 2。因此,将第 10~16 个收集管收集的通俗环毛蚓抗血栓活性蛋白成分命名为 PvQ。综上分析,

说明利用2.2项下富集纯化方法可将通俗环毛蚓粗酶快速富集为PvQ,该方法操作简便易行,且能够保证样品的均一性和稳定性。

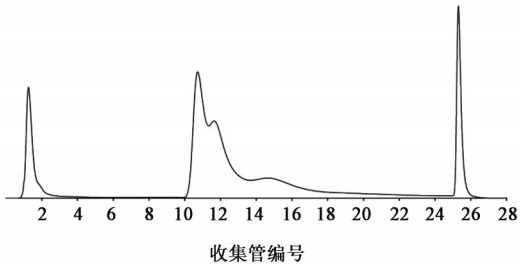


图1 通俗环毛蚓粗酶蛋白纯化色谱

Fig. 1 Protein purification chromatography of crude enzyme of *P. vulgaris*

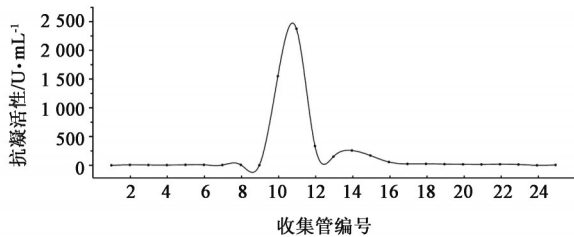


图2 通俗环毛蚓粗酶蛋白纯化收集液的抗凝活性曲线

Fig. 2 Anticoagulant activity curve of purified collection of crude enzyme protein of *P. vulgaris*

### 3.2 PvQ活性研究

**3.2.1 纤维蛋白平板法** 平行测定3批通俗环毛蚓粗酶及其对应的3批PvQ的比活力,结果粗酶和PvQ的比活力分别为 $(188.42 \pm 5.10)$ ,  $(247.33 \pm 10.74)$   $\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ,3批PvQ的比活力较为稳定,且较粗酶约提高31.27%。

**3.2.2 Fibg-TT法** 3批通俗环毛蚓粗酶及其对应的3批PvQ的比活力见表1。结果发现PvQ的比活力稳定,约为粗酶的1.6倍。同时,与纤维蛋白平板法测得的PvQ比活力相比,Fibg-TT法测得的PvQ比活力提升更加显著,这在一定程度上表明PvQ不仅能够直接作用于纤维蛋白,还可作用于纤维蛋白原,故而表现出比活力的进一步提升。

**3.2.3 温度对PvQ抗凝活性的影响** 各样品在不同温度下孵育的抗凝活性经时变化情况见图3。结果发现PvQ在 $\geq 60^\circ\text{C}$ 时活性迅速丧失;在 $50^\circ\text{C}$ 条件下,60 min内活性基本不变,随着时间延长活性略有降低;当 $< 50^\circ\text{C}$ 时,120 min内样品活性影响较小。此外,在30~40 $^\circ\text{C}$ 孵育短时间内(0~30,0~60 min)样品抗凝活性有升高趋势,推测可能是由于在此温度范围更接近酶的最适反应温度,因此,抗凝活性表现出相比室温条件下升高的现象。

表1 通俗环毛蚓粗酶和PvQ比活力的Fibg-TT法测定( $n=3$ )

Table 1 Specific activity of crude enzyme and PvQ determined by Fibg-TT method ( $n=3$ )

样品	编号	活性/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	比活力( $\bar{x} \pm s$ )/ $\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$
粗酶	1	673.97	7.93	$88.21 \pm 3.34$
	2	649.91	7.09	
	3	657.97	7.48	
PvQ	1	743.87	5.20	$142.38 \pm 0.68$
	2	743.87	5.25	
	3	758.96	5.33	

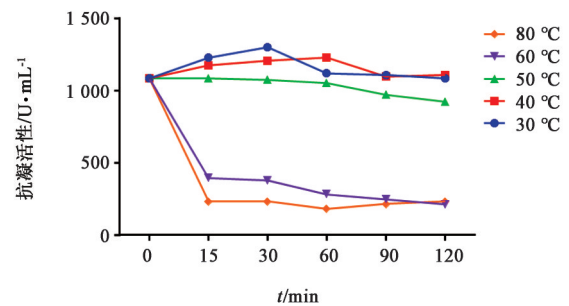


图3 温度对通俗环毛蚓PvQ抗凝活性经时变化的影响

Fig. 3 Effect of temperature on time-dependent behavior of anticoagulant activity of PvQ

**3.2.4 pH对PvQ抗凝活性的影响** 由图4可知,当pH 2时,PvQ孵育15 min内抗凝活性急剧丧失;当pH 3~5时,PvQ孵育30 min内抗凝活性急剧下降,30 min后活性维持在较弱的抗凝水平;当 $\text{pH} \geq 7$ 时,PvQ孵育120 min后抗凝活性无明显变化。此外,pH 9时PvQ的抗凝活性略强于pH 7时,推测PvQ抗凝活性的升高可能与其最适反应pH有关。提示该类蛋白酶在碱性条件下活性更强,酸性条件下严重失活,验证了含蚓激酶类产品在临床治疗中采用肠溶制剂形式给药的合理性。

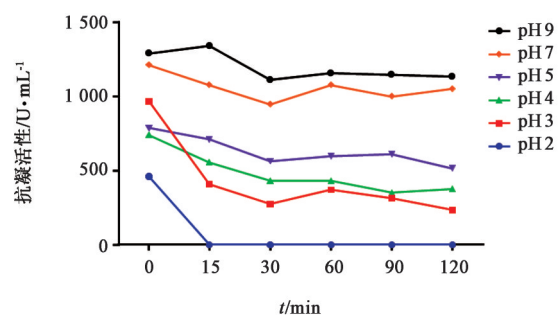


图4 pH对通俗环毛蚓PvQ抗凝活性经时变化的影响

Fig. 4 Effect of pH on time-dependent behavior of anticoagulant activity of PvQ

**3.2.5 PvQ体外血栓溶解试验** 3个给药浓度PvQ的体外溶栓活性见表2;按照2.3.4项下方法制备的

血栓条见图5。结果发现溶剂PBS在5 h内对血栓几乎无水解作用,而蚓激酶及不同浓度PvQ则表现出显著的体外溶栓活性,并且呈现出时间和剂量的相关性。同时,孵育5 h后低浓度PvQ即可溶解约

80%的血栓,其溶栓作用高于24 000 U·mL<sup>-1</sup>蚓激酶(41.97%)。表明PvQ具有极显著的体外溶栓活性,提示2.2项下纯化方法可以对通俗环毛蚓PvQ达到高效富集的作用。

表2 不同样品的溶栓百分比( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

样品	水平	0.5 h	1 h	2 h	3 h	5 h
PBS		1.08±0.27	1.12±0.22	2.48±0.14	2.82±0.17	2.83±0.40
蚓激酶	24 000 U·mL <sup>-1</sup>	2.60±0.50	7.58±0.19	18.32±0.67	30.56±2.66	41.97±2.05
PvQ	342 mg·L <sup>-1</sup>	4.13±0.17	18.34±0.83	51.61±1.80	67.23±2.11	80.97±2.32
	684 mg·L <sup>-1</sup>	5.39±0.39	20.46±0.48	52.07±2.12	74.87±1.59	89.09±2.20
	1 368 mg·L <sup>-1</sup>	5.74±0.35	21.64±0.54	55.73±2.30	82.83±4.00	92.55±1.22



图5 大鼠体外血栓条的制备

Fig. 5 Preparation of *in vitro* thrombus strips of rats

#### 4 讨论

地龙具有清热定惊、平喘通络等功效,用于治疗高热神昏、关节痹痛、半身不遂等<sup>[1,18]</sup>。现代研究发现,地龙具有抑制中枢、松弛平滑肌、抑制血栓形成、解热、降压等药理作用<sup>[19-20]</sup>。含地龙成分的中成药已广泛应用于临床治疗,如复方地龙胶囊治疗缺血性中风<sup>[21]</sup>,心脑血管胶囊治疗冠心病心绞痛<sup>[22]</sup>,黄龙止咳颗粒治疗哮喘病<sup>[23]</sup>。然而,地龙入药时多选用粗提物,其制备工艺粗放、成分复杂且批次间稳定性差,不利于开发为安全、有效、可控的中药抗血栓制剂。

本研究通过AKTA-Pure型蛋白纯化系统对通俗环毛蚓PvQ进行分离纯化研究,实现了PvQ的快速富集,并可以保证通俗环毛蚓PvQ的批次间稳定性。此外,笔者采用纤维蛋白平板法和Fibg-TT法对PvQ的纤溶及抗凝活性进行测定,利用体外血栓试验测定了PvQ的溶栓能力,并考察了温度及pH对PvQ活性的影响,完善了地龙治疗血栓性疾病的相关基础研究。在本研究中,与纤维蛋白平板法测

得的PvQ比活力相比,Fibg-TT法测得的PvQ比活力提升更加显著,这可能是因为Fibg-TT法测定的活性可以同时反映样品对纤维蛋白及纤维蛋白原的共同作用<sup>[14]</sup>。纤维蛋白原是主要由肝细胞合成的、具有凝血功能的蛋白质,是血浆中含量最高的凝血因子,能够影响血液黏度<sup>[24]</sup>。说明PvQ可通过作用于纤维蛋白原,从而发挥预防血栓形成的作用。本研究还发现通俗环毛蚓PvQ对体外血栓具有较强的溶解能力,同时,由于其在碱性条件下稳定,因此支持了通俗环毛蚓PvQ作为肠溶制剂的合理性。

据文献报道,蚯蚓的间接纤溶作用主要体现在激活纤溶酶原<sup>[25]</sup>、刺激血管内皮细胞释放组织纤溶酶原激活物(t-PA)<sup>[26]</sup>等方面。因此,本课题组后续将考察通俗环毛蚓PvQ的间接纤溶作用,建立相关动物模型,进一步验证其药效作用,并对其物质基础进行深入研究,以期通俗环毛蚓的临床精准应用提供科学支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:127.
- [2] 佚名. 神农本草经[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:123.
- [3] 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.
- [4] LIU C H, LIN Y W, TANG N Y, et al. Effect of oral administration of *Pheretima aspergillum* (earthworm) in rats with cerebral infarction induced by middle-

- cerebral artery occlusion[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(1):66-82.
- [ 5 ] 梁超,刘冬洁,高瑞辰,等. 注射用地龙冻干粉针对大鼠颈动脉血栓形成的影响[J]. 神经药理学报, 2011, 1(5):14-18.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] 关水清,周改莲,周文良,等. 地龙的本草考证及现代研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(10): 205-212.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] 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.
- [10] LI C L, CHEN M R, LI X J, 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.
- [11] 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准修订件 [J]. 中国药品标准, 2011, 12(5):390-400.
- [12] MILLAR W T, SMITH J F. The comparison of solid phase and fibrin plate methods for the measurement of plasminogen activators[J]. Thromb Res, 1983, 30(5): 431-439.
- [13] 廖共山,班建东. 一种检测凝血酶、类凝血酶的新方法——纤维蛋白原平板法[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(6):967-968.
- [14] 吴娅丽,马韞楠,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.
- [15] REDINBAUGH M G, TURLEY R B. Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions [J]. Anal Biochem, 1986, 153(2):267-271.
- [16] BAINOR A, CHANG L, MCQUADE T J, et al. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume [J]. Anal Biochem, 2011, 410(2):310-312.
- [17] TRISINA J, SUNARDI F, SUHARTONO M T, et al. A protein extract from *Lumbricus rubellus*, possesses antithrombotic and thrombolytic activities [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:519652.
- [18] 黄庆,李志武,马志国,等. 地龙的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13):220-226.
- [19] 刘文雅,王曙东. 地龙药理作用研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2):282-285.
- [20] 王承利,张贺,王洋,等. 蚓激酶研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(11):86-90.
- [21] 龚国清,钱之玉,周曙. 新药复方地龙胶囊的药效学研究[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(11):821-823.
- [22] 钱正瑶,刘蕾,王海博,等. 心脑康胶囊治疗不稳定型心绞痛临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(6): 2433-2436.
- [23] 高繁花,王英娟. 黄龙止咳颗粒治疗患儿反复呼吸道感染的效果分析[J]. 陕西中医, 2015, 36(10):1312-1313.
- [24] 赖光强,韩正雪,张维,等. 地龙胶囊对急性脑梗死患者血浆纤维蛋白原的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2008, 18(4):240-241.
- [25] 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.
- [26] 杨嘉树,李令媛,茹炳根. 蚯蚓体内一种纤溶酶原激活剂(e-PA)的分离纯化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, 14(2):156-163.

[责任编辑 刘德文]