

铅污染对水蛭的体外抗凝血活性的影响

杨超杰 孟杰亲 陈秀芬 杨瑶琨
(北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

【摘要】目的 探讨重金属铅污染对水蛭抗凝血活性的影响。**方法** 选取市场上主流的水蛭品种—蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman, 将蚂蟥种苗随机分为正常对照组、铅低残留组、铅中残留组、铅高残留组各 70 条, 分别养殖在含有原始土壤、低剂量硝酸铅土壤、中剂量硝酸铅土壤、高剂量硝酸铅土壤的水族箱中。50 d 后获得不同程度铅污染的水蛭样品, 分别采用凝血酶滴定法和凝血酶时间 (TT) 法评价其抗凝血活性。**结果** 凝血酶滴定法测定结果显示, 与生理盐水相比, 各组水蛭样品均显示出抗凝血活性, 且效价均高于药典对水蛭药材的规定 (3 U/g); 与正常对照组相比, 铅高残留组水蛭的 U 值较低 ($P < 0.01$)。TT 法结果显示, 与生理盐水相比, 各组水蛭样品均能延长 TT; 其中铅高残留组水蛭的 TT 较正常对照组水蛭的短 ($P < 0.01$)。**结论** 铅污染可降低水蛭的抗凝血活性。

【关键词】 水蛭; 抗凝血; 凝血酶滴定法; 凝血酶时间法; 铅污染

DOI: 10.16025/j.1674-1307.2022.03.008

水蛭为水蛭科动物蚂蟥 (*Whitmania pigra* Whitman)、水蛭 (*Hirudo nipponica* Whitman) 或柳叶蚂蟥 (*Whitmania acranulata* Whitman) 的干燥全体^[1], 为传统的活血化瘀药之一, 广泛应用于血液疾病及糖尿病性神经病变的治疗中^[2-3]。现代研究^[4-5]表明, 水蛭具有抗凝血、抗血栓形成、抗动脉粥样硬化和抗血小板聚集等多种药理作用, 其有效成分主要是以水蛭素为代表的多肽和蛋白质等大分子以及糖脂、蝶啶类等小分子, 而内源性物质的含量可能受水蛭栖息环境的影响。目前水蛭药材的来源以养殖为主, 其中 90% 以上的水蛭养殖品种为蚂蟥^[6]。郭巧生等^[7]发现, 蚂蟥体内的重金属残留量高于其栖息环境, 对铅的明显富集可能是导致部分水蛭药材重金属铅含量超标的重要原因。本课题组前期通过模拟蚂蟥的养殖环境, 获得不同程度铅污染的水蛭药材, 测定其活化部分凝血酶时间 (APTT) 和凝血酶原时间 (T), 研究结果表明铅污染能够降低水蛭的抗凝血活性^[8], 但未采用其他凝血酶活性测定方法加以佐证。本实验采用凝血酶滴定法测定不同铅残留量水蛭样品的抗凝血酶活性效价 (U), 并借助全自动凝血仪测定其凝血酶时间 (TT), 结合前期实验

结果, 全面评价铅污染对水蛭抗凝血活性的影响, 为保障水蛭药材的品质与临床用药安全提供理论依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

药用动物水蛭 (初始质量约 10 g) 购自黑龙江友搏药业有限责任公司山东微山湖蚂蟥养殖基地, 经北京中医药大学鉴定系主任杨瑶琨教授鉴定, 均为水蛭科动物蚂蟥 (*Whitmania pigra* Whitman)。

1.2 实验试剂

盐酸 (北京化工厂, 批号 20170826); TT 试剂盒 [希森美康医用电子 (上海) 有限公司, 批号 48066]; 兔血浆 (批号 J13D9577418)、三羟甲基氨基甲烷 (批号 Y02M9K54873)、生理盐水 (批号 L07S9G69791) 等均购自源叶生物科技有限公司; 牛血纤维蛋白原 (批号 NOP-XAWF)、凝血酶 (批号 3Y3D-6JC4) 等购自中国食品药品检定研究所。

1.3 实验仪器

电脑智能温控器 (乐清朗本电器有限公司, LB-SM6); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司, DHG-9070A); 手提式高速中药粉碎机

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773840)

作者简介: 杨超杰, 女, 23 岁, 硕士研究生。研究方向: 中药品种研究及质量评价, 动物类中药的安全性研究。

通信作者: 杨瑶琨, E-mail: yangyaoj002@sina.com

引用格式: 杨超杰, 孟杰亲, 陈秀芬, 等. 铅污染对水蛭的体外抗凝血活性的影响[J]. 北京中医药, 2022, 41(3): 260-263.

(温岭市大德中药机械有限公司, DFT-100); 电热恒温水浴锅 (上海博讯医疗生物仪器股份有限公司, HH. S21-6); pH 计 (FiveEasy Plus, METTLER); 高速冷冻离心机 (SIGMA, 3K15); 全自动凝血测定仪 (日本希森美康公司, Sysmex CA-500 series)。

2 实验方法

2.1 蚂蟥分组、养殖及样品制备

以原始土壤为对照, 分别将低 (50 mg/kg)、中 (250 mg/kg)、高 (500 mg/kg) 剂量的硝酸铅水溶液拌入原始土壤中, 在玻璃水族箱 (30 cm×35 cm×60 cm) 内铺成厚约 2 cm 的底泥, 加曝气 24 h 的自来水, 用于蚂蟥养殖。将蚂蟥种苗随机分为正常对照组、铅低残留组、铅中残留组、铅高残留组各 70 条, 分别养殖在含有原始土壤, 低、中、高剂量硝酸铅土壤的水族箱中。每日监测水温、定时换水、投喂田螺、充氧 2 h。养殖 50 d 后, 捞出蚂蟥, 用沸水烫死, 于 55 °C 电热鼓风干燥箱中烘干, 即得水蛭样品^[9]。经电感耦合等离子体质谱仪 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 测定^[8], 正常对照组铅含量 (2.05±0.84) mg/kg, 铅低、中、高残留组铅含量分别为 (3.185±1.63)、(6.46±3.25)、(10.66±2.79) mg/kg。将所有水蛭样品剪成小段、打粉, 过 3 号筛, 备用。

2.2 凝血酶滴定法

参照 2015 年版《中国药典》水蛭药材的抗凝血活性测定方法。取水蛭粉末约 1 g, 精密称定, 加入生理盐水 5 mL, 充分搅拌, 浸提 30 min, 并时时振摇。混合液以 700 g 离心 10 min, 取上清液, 即得供试品溶液, 质量浓度为 0.2 g/mL。精密移取供试品溶液 100 μL 于 2 mL 离心管中, 加入含 0.5% (牛) 纤维蛋白原的三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲溶液 200 μL, 摇匀, 置水浴锅中 (37±0.5) °C 温浸 5 min, 滴加 10 U/mL 的凝血酶溶液, 每 4 min 滴加 1 次, 每次 2 μL, 边滴加边轻轻摇匀至凝固, 记录消耗凝血酶溶液的体积。重复测定 3 次, 取均值后按下式计算抗凝血酶活性效价。以等量生理盐水为空白对照。U=C₁V₁/C₂V₂, U 为每 1 g 水蛭药材含凝血酶活性单位 (U/g); C₁ 为凝血酶溶液浓度 (U/mL); C₂ 为供试品溶液浓度 (g/mL); V₁ 为消耗凝血酶溶液体积 (μL); V₂ 为供试品溶液加入量 (μL)。

2.3 凝血酶时间法 (TT 法)

取水蛭粉末约 1 g, 精密称定, 加入生理盐水 5 mL, 浸提 30 min, 并时时振摇。混合液以 900 g 离心 20 min, 取上清液, 即得供试品溶液, 质量浓度为 0.2 g/mL。取血凝仪样品杯, 每孔加入兔血浆和供试品溶液各 50 μL, 混匀, 37 °C 孵育 60 s, 加入 TT 试剂 100 μL, 检测并记录凝固时间, 重复测定 3 次。以等量生理盐水为空白对照。

2.4 统计学方法

采用 Microsoft Excel 2016 和 GraphPad Prism 7.00 进行数据分析, 数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 Turkey 检验; 相关性分析采用 Pearson 相关性分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 抗凝血酶活性效价测定结果

正常对照组、铅低残留组、铅中残留组、铅高残留组水蛭的抗凝血酶活性效价均高于药典对水蛭药材的规定 (3 U/g), 且随着样品中铅残留量的增加, 抗凝血酶活性效价呈降低趋势。与正常对照组相比, 铅高残留组的 U 值低 (P<0.01)。见表 1。

表 1 各组抗凝血酶活性效价测定结果比较 (U/g, n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	效价测定值			效价均值
空白对照组	2	2	2	2.00±0
正常对照组	5	5	6	5.33±0.47 ^{△△}
铅低残留组	6	6	5	5.66±0.47 ^{△△}
铅中残留组	5	5	5	5.00±0.00 ^{△△}
铅高残留组	4	4	4	4.00±0.00 ^{△△*}

与空白对照组比较, △△P<0.01; 与正常对照组比较, *P<0.05

3.2 TT 测定结果

与空白对照组相比, 其他各组水蛭的 TT 延长, 且随着样品中铅残留量的增加, TT 呈缩短趋势。与正常对照组比较, 铅高残留组 TT 缩短 (P<0.01)。见表 2。

表 2 各组凝血酶时间测定结果比较 (s, n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	TT 测定值			TT 均值
空白对照组	11.4	11.9	12.1	11.80±0.36
正常对照组	25.8	25.7	25.5	25.67±0.15 ^{△△}
铅低残留组	25.6	25.1	24.1	24.97±0.71 ^{△△}
铅中残留组	25.1	24.1	25.4	24.87±0.68 ^{△△}
铅高残留组	23.7	23.4	24.0	23.70±0.30 ^{△△*}

与空白对照组比较, △△P<0.01; 与正常对照组比较, *P<0.05

3.3 TT与铅残留量的相关性

TT与水蛭样品的铅残留量呈负相关(相关系数 $=-0.9051$, $P<0.05$)。线性回归的决定系数(R^2) $=0.9051$,表明水蛭样品的铅残留量可以解释TT变异性的90.51%。

4 讨论

目前,用于测定水蛭体外抗凝血活性的反应体系除《中国药典》规定的滴定法外,还有借助全自动凝血仪测定的TT法、纤维蛋白原-凝血酶时间(Fib-TT)法、APTT法、PT法等^[10-12]。不同中药的抗凝机制有别,适用于不同反应原理的测定方法,因此越来越多的相关研究采取联合检测方法^[13-14],能够提高试验结果的准确性和可靠性。本课题组前期研究分别采用APTT法和PT法测定水蛭的抗凝血活性^[8]。前者是测定内源性凝血系统较为敏感和常用的筛选试验,反应体系中涉及内源性凝血因子Ⅷ、Ⅸ、Ⅺ、Ⅻ等;后者则常用于外源性凝血系统,见于凝血因子Ⅶ、Ⅲ等参与凝血过程^[15-16]。本研究中的TT法针对凝血共同途径,可用于评估干扰因素对抗凝结果的影响^[9]。Fib-TT法和滴定法原理相同,反映纤维蛋白原在凝血酶的作用下转化为纤维蛋白这一过程,测定结果中1个抗凝血酶活力单位(ATU)相当于中和1个单位(NIH)凝血酶的水蛭素量^[17],该方法更加稳定、确切,具有简便、直接的特点^[11]。

前期PT法试验中,与生理盐水相比,水蛭未显示出抗凝血活性,因此无法评价铅污染对水蛭抗凝血活性的影响;APTT试验与本研究TT法、滴定法试验结果一致:与生理盐水相比,各组水蛭均显示出抗凝血活性;与正常对照组水蛭相比,仅铅高残留组水蛭的抗凝血活性显著降低。根据铅残留量与TT的相关性分析结果可知,水蛭的抗凝血活性随铅残留量的增加而降低,提示铅残留量与水蛭抗凝血活性的降低程度存在一定量效关系,但只有当铅含量达到一定水平时才会造成明显影响。

水蛭药材的铅残留现象与其栖息环境遭受污染相关^[18]。无论是在天然生态系统,还是在模拟养殖环境中,铅均可以持久性存在于水体中。且蚂蟥的天然饵料螺蛳对重金属有较高的富集作用,因此铅可能通过食物链螺蛳从土壤、水体转移到水蛭体内,并随时间的推移而富集^[19-20]。本研究土壤造模的铅添加量参照我国无公害水产品产地环

境要求(GB18407.4-2001,以下简称国标),即用于水产养殖的底质中铅的最高限量为 $Pb\leq 50\text{ mg/kg}$ 。铅低残留组土壤的铅添加量为该上限,铅中残留组为5倍上限,铅高残留组为10倍上限。经ICP-MS法测定,铅高残留组的铅残留量(10.66 mg/kg)与2020年版《中国药典》规定的水蛭药材的重金属铅限量(10 mg/kg)接近,因此推测铅超标可能是水蛭临床疗效不佳的原因之一,反之,重金属铅含量达标的水蛭其养殖环境中铅含量也可能远远超出了国标上限,提示水蛭养殖环境的管理需引起重视。

铅是危害水生动物的常见重金属元素之一^[18]。持续暴露于含铅环境的水生动物,会产生不同程度的细胞形态改变、脏器损伤等病理变化,其合成代谢活动、免疫功能等也会受到干扰^[21-22]。一些针对铅暴露鱼、虾等水生动物的组学研究^[23-25]表明,铅能够影响其糖代谢、蛋白质代谢等能量代谢过程,氧化应激反应等。而水蛭的活性物质基础以多肽、小分子蛋白为主,铅污染水蛭抗凝血活性下降的机制是否与能量代谢等生物过程受到干扰有关,有待借助组织病理学、多组学技术等作进一步探究。

综上所述,水蛭药材的铅含量控制不仅是临床用药安全的保障,也是保证药材疗效的措施之一。因此,国家有关部门应对水蛭养殖环境的重金属限量予以重视,确保养殖环境免遭工业重金属的污染,并制定相关标准,指导企业规范养殖,这对于保障水蛭药材的安全有效具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:85.
- [2] 高亚斌,郭敬,苗润培,等.王耀献清热消癥法治疗糖尿病肾病经验[J].北京中医药,2020,39(2):152-154.
- [3] 郭春艳,陈宝鑫,金香兰,等.补肾治疗血管性认知障碍有效性和安全性的系统评价[J].北京中医药,2020,39(11):1129-1134.
- [4] 郭晓庆,孙佳明,张辉.水蛭的化学成分与药理作用[J].吉林中医药,2015,35(1):47-50.
- [5] 刘玉梅,章军,匙峰,等.水蛭化学成分研究进展[J].中国中医药信息杂志,2011,18(12):108-110.
- [6] 刘飞,杨大坚.中国水蛭人工养殖的现行模式调研[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(10):2170-2173.

- [7] 郭巧生,刘飞,史红专.水蛭及其养殖基地农药与重金属残留分析[J].中国中药杂志,2006,31(21):1763-1765.
- [8] 罗雪梅,孟杰亲,陈秀芬,等.基于体外抗凝血实验研究铅污染对水蛭抗凝血作用的影响[J].中国中药杂志,2019,44(23):5114-5117.
- [9] 王文祎.水蛭药材重金属残留与抗凝活性的研究[D].北京:北京中医药大学,2016.
- [10] 喻珊.宽体金线蛭抗凝活性测定的影响因素及酶解提取工艺研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014.
- [11] 金家金,王志斌,苏斌,等.水蛭体外抗凝血实验研究及其生物活性测定方法反应体系的筛选[J].中国药理学杂志,2014,49(22):1997-2001.
- [12] 朱正光,吴曙光,孙燕荣.水蛭水煎液抗栓作用机制的体外实验研究[J].中国生化药物杂志,2001,21(5):229-231.
- [13] 杜振兴,周斯仪,钟赛意,等.不同海洋生物源肝素的理化性质及抗凝血活性[J].食品科学,2019,40(17):134-140.
- [14] 华芳,赵玉玲,李莞,等.川芎及其中成药抗凝血作用测定方法的研究[J].中草药,2019,50(7):1698-1702.
- [15] JAMES LZ. Clinical use of coagulation tests[EB/OL]. (2020-11-16)[2021-05-01]. <https://www.uptodate.com/contents/1368#!>.
- [16] 肖凌,徐小玲,何开勇,等.生物检定技术应用于水蛭抗凝血活性测定的研究[J].中国药理学杂志,2015,50(3):258-262.
- [17] MARKWARDT F. Hirudin as an inhibitor of thrombin [C]// Methods in Enzymology. Elsevier,1970,19:924-932.
- [18] STRUNGARU SA, NICOARA M, TEODOSIU C, et al. Patterns of toxic metals bioaccumulation in a cross-border freshwater reservoir[J]. Chemosphere, 2018, 207: 192-202.
- [19] 王文祎,杨瑶琨,吕晓娜,等.关于水蛭药材重金属元素富集原因的研究[J].西部中医药,2016,29(8):29-32.
- [20] KESER G, TOPAK Y, SEVGILER Y. Concentrations of some heavy metal and macroelements in sediment, water, macrophyte species, and leech (*Hirudo sulukii* n.sp.) from the Kara Lake, Adiyaman, Turkey[J]. Environ Monit Assess, 2020, 192(2):1-12.
- [21] ALM-ELDEEN AA, DONIA T, ALZAHABY S. Comparative study on the toxic effects of some heavy metals on the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Middle Delta, Egypt[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(15):14636-14646.
- [22] 戴伟.水生动物铅毒性作用的研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(11):5819-5820.
- [23] WU YS, HUANG SL, CHUNG HC, et al. Bioaccumulation of lead and non-specific immune responses in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to Pb exposure[J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 62:116-123.
- [24] HAMED M, SOLIMAN HAM, SAYED AEH. Ameliorative effect of *Spirulina platensis* against lead nitrate-induced cytotoxicity and genotoxicity in catfish *Clarias gariepinus* [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(20):20610-20618.
- [25] JIAO LF, DAI TM, JIN M, et al. Transcriptome analysis of the hepatopancreas in the *Litopenaeus vannamei* responding to the lead stress[J]. Biol Trace Elem Res, 2021, 199(3):1100-1109.

Evaluation of anticoagulant activity of lead-contaminated leeches in vitro

YANG Chao-jie, MENG Jie-qin, CHEN Xiu-fen, YANG Yao-jun

(收稿日期: 2021-07-05)

《北京中医药》杂志对论文中使用法定计量单位的要求

计量单位名称与符号一律实行国务院颁布的《中华人民共和国法定计量单位》,并用单位符号表示。使用时可参阅2001年中华医学会杂志社主编的《法定计量单位在医学上的应用》(第3版,人民军医出版社出版)。根据有关规定,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mm Hg),但在文中首次出现时应注明mmHg与千帕斯卡(kPa)的换算系数(1 mmHg=0.133 kPa)。

(本刊编辑部)