

水蛭冻干粉的急性毒性及对急性血淤证大鼠的治疗作用

蒋倩倩,张伯言,陈晓蒙,魏屹*

(西南交通大学生命科学与工程学院,四川成都610000)

摘要: **目的** 评价水蛭冻干粉的急性毒性,比较水蛭冻干粉及水蛭饮片对急性血淤证大鼠的作用。**方法** 采用最大给药量实验评价水蛭冻干粉的急性毒性;将SD大鼠随机分为空白组、模型组、阿司匹林组($31.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、宽体金线蛭冻干粉和日本医蛭冻干粉高、中、低剂量组(0.3125 、 0.2083 、 $0.1042 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、宽体金线蛭和日本医蛭饮片组($0.3125 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续灌胃14 d,于第13天复制急性血淤大鼠模型,分别考察水蛭冻干粉对大鼠凝血功能、血液流变学、血小板指标、氧化应激水平的影响,观察大鼠心、肺组织病理情况,并对给药组的治疗效果进行聚类分析。**结果** 宽体金线蛭冻干粉和日本医蛭冻干粉给药剂量分别达到临床成人安全剂量的56、68倍时,未出现急性毒性现象。与模型组比较,阿司匹林、水蛭冻干粉能显著改善大鼠的凝血功能、血液流变学、血小板指标、氧化应激水平,能改善心、肺炎性细胞浸润、纤维增生等状况。聚类分析结果显示:相同剂量下,水蛭冻干粉的治疗效果优于水蛭饮片,其中,日本医蛭冻干粉与阿司匹林无显著性差异。**结论** 水蛭冻干粉无严重急性中毒的危险,与水蛭饮片比较,可显著改善急性血淤证大鼠的凝血功能、血液流变学、血小板指标、氧化应激水平及心肺病理损伤程度。

关键词: 水蛭冻干粉;宽体金线蛭;日本医蛭;急性毒性;大鼠急性血淤模型;凝血功能;血液流变学;氧化应激水平

中图分类号:R96

文献标志码:A

文章编号:1006-0103(2022)02-0169-07

DOI:10.13375/j.cnki.wcjps.2022.02.013

Study on the acute toxicity and therapeutic effect on acute blood stasis rats of Hirudo freeze - dried powder

JIANG Qianqian, ZHANG Boyan, CHEN Xiaomeng, WEI Yi*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610000 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To evaluate the acute toxicity of Hirudo freeze - dried powder and to compare the effects of Hirudo freeze - dried powder and Hirudo decoction pieces on acute blood stasis rats. **METHODS** The acute toxicity of Hirudo freeze - dried powder was evaluated by maximum dose test. SD rats were randomly divided into blank group, model group, aspirin group ($31.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), *Whitmania pigra* Whitman freeze - dried powder and *Hirudo nipponica* Whitman freeze - dried powder high, medium and low dose group (0.3125 , 0.2083 , $0.1042 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), *W. pigra* and *H. nipponica* decoction pieces group ($0.3125 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Rats were given continuous intragastric administration for 14 days, and acute blood stasis rat model was replicated on day 13. The effects of Hirudo freeze - dried powder on coagulation function, hemorheology, platelet index and oxidative stress level of rats were investigated, the pathological conditions of heart and lung tissues were observed, and the therapeutic effect of medication group was analyzed by cluster analysis. **RESULTS** There was no acute toxicity observed when the dosage of *W. pigra* freeze - dried powder and *H. nipponica* freeze - dried powder reached 56 and 68 times of the safe dose of clinical adults, respectively. Compared with model group, aspirin group and Hirudo freeze - dried powder group could improve the coagulation function, hemorheology, platelet index and oxidative stress level of rats, and could improve the pathological injury of heart, pneumonia cell infiltration, fibrous hyperplasia. Cluster analysis results showed that at the same dose, the therapeutic effect of Hirudo freeze - dried powder was better than that of Hirudo decoction pieces, and there was no significant difference between *H. nipponica* freeze - dried powder and aspirin. **CONCLUSION** Hirudo freeze - dried powder has no risk of severe acute poisoning, and can significantly improve the coagulation function, hemorheology, platelet index, oxidative stress level and cardiopulmonary pathological injury degree in acute blood stasis rats compared with Hirudo Yinpian.

Key words: Hirudo freeze - dried powder; *Whitmania pigra*; *Hirudo nipponica*; Acute toxicity; Acute blood stasis rat model; Coagulation function; Hemorheology; Oxidative stress level

作者简介:蒋倩倩(1996—),女,正攻读药学专业的硕士学位。Email:jiangqq5297@126.com

*通信作者(Correspondent author),Email:weiyiyx@126.com

CLC number: R96

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2022)02-0169-07

血淤证是由机体气机逆乱所致的血液淤滞、血脉雍阻等多种病症的总称,症状为疼痛、肿块、出血等^[1],其病因是组织或器官的缺血、缺氧、血液循环障碍、血液流变性异常等引起^[2-5]。研究主要通过血流变学、凝血功能、氧化应激水平、心肺病理学基础等方法研究血淤证的病理学变化^[6-9]。水蛭为水蛭科动物宽体金线蛭 *Whitmania pigra* Whitman、日本医蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 的干燥全体,经冷冻干燥后制成的水蛭冻干粉,其抗凝血效价远高于经晒干或晾干而成的水蛭饮片。水蛭冻干粉作为新型炮制品,考虑到用药安全,需考察其急性毒性及对急性血淤证大鼠的治疗作用,可为临床应用提供数据参考。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与动物

SA-9000 型自动血流变检测仪(北京赛科希德科技有限公司);SpectraMAX Plus384 型酶标仪(美谷分子仪器有限公司)。宽体金线蛭冻干粉、日本医蛭冻干粉、宽体金线蛭饮片、日本医蛭饮片(泸州百草堂健康产品有限公司);阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司);盐酸肾上腺素注射液(哈药集团三精制药有限公司);大鼠 CD62P、GP II b/III a、TXB2、vWF ELISA 试剂盒(上海茁彩生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。SPF 级 KM 小鼠(20 ± 2 g)、SPF 级 Wistar 大鼠(200 ± 20 g)(成都达硕生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK 川 2020-030),♀ ♂ 兼用。

1.2 方法与结果

1.2.1 急性毒性实验 参照经典的急性毒性试验方法,进行水蛭冻干粉急性毒性研究^[10]。取禁食 16 h 后的小鼠,随机分为宽体金线蛭冻干粉组和日本医蛭冻干粉组各 4 组,每组 5 只。各组给

药剂量分别为 5、50、500、 5×10^3 mg·kg⁻¹,给药后观察 14 d,记录小鼠动物数。预试验结果表明:8 组小鼠给药后,精神状态良好,呼吸正常,无死亡。为进一步评价水蛭冻干粉的安全性,正式试验采用最大给药量法测定^[11]。将 SPF 级 KM 小鼠随机分为空白组、宽体金线蛭冻干粉组和日本医蛭冻干粉组,每组 10 只。用生理盐水分别将宽体金线蛭冻干粉和日本医蛭冻干粉配制成 0.32、0.39 g·mL⁻¹ 的混悬液,此为灌胃的最大浓度。给药前禁食 12 h,空白组给予生理盐水,给药组单次给药剂量分别为 12.8、15.6 g·kg⁻¹,一日内连续给药 2 次(分别相当于 2020 年版《中国药典》水蛭项下 60 kg 成人日推荐最大剂量的 56、68 倍),观察 14 d,每日记录小鼠的体质量、毒性反应及死亡情况。于第 14 日取血,测定血常规,并解剖观察脏器的变化。给药后 4 h 内,小鼠精神萎靡、运动失调、呼吸急促,第 2 天小鼠恢复正常;给药第 14 天,各组小鼠均无特殊反应,无死亡,解剖后观察心、肝、脾、肺、肾、胸腺等器官均无异常。各组小鼠的体质量、血常规见表 1、表 2。结果表明:最大给药量下水蛭冻干粉会影响小鼠正常生长发育,但给药组的质量、血常规与空白组比较无显著性差异($P > 0.05$)。在给药剂量远超临床推荐剂量的情况下,水蛭冻干粉未出现毒性现象,说明水蛭经冷冻干燥炮制后无严重急性中毒的危险性,临床短期常用剂安全可靠。

1.2.2 实验分组、剂量设计及给药方法 将 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、阿司匹林组、宽体金线蛭冻干粉高、中、低剂量组、宽体金线蛭饮片组及日本医蛭冻干粉高、中、低剂量组和日本医蛭饮片组,每组 10 只。2020 年版《中国药典》中水蛭项下 60 kg 成人的日推荐量为 1~3 g,将日推荐量设为水蛭冻干粉高、中、低剂量,换算成大鼠临床等效剂量为 0.3125、0.2083、0.1042 g·kg⁻¹;水蛭饮片组给药剂量为 0.3125 g·kg⁻¹(同水蛭

表 1 小鼠体质量的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Changes in body weight of mice($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	0 d	4 d	9 d	13 d	体质量增加值
空白	20.68 ± 0.61	21.33 ± 0.42	22.36 ± 0.54	23.12 ± 0.73	2.44 ± 0.62
宽体金线蛭冻干粉	21.24 ± 0.73	22.08 ± 0.57	22.29 ± 0.33	22.86 ± 0.41	1.92 ± 0.48
日本医蛭冻干粉	21.55 ± 0.49	21.94 ± 0.45	22.35 ± 0.59	23.09 ± 0.67	2.07 ± 0.65

表2 各组小鼠血常规的数据($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Date of blood routine of mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

项目	空白组	宽体金线蛭冻干粉组	日本医蛭冻干粉组
白细胞数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	1.43 \pm 0.27	1.17 \pm 0.24	1.22 \pm 0.15
淋巴细胞数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	1.15 \pm 0.19	0.92 \pm 0.32	1.03 \pm 0.33
单核细胞数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	0.05 \pm 0.06	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03
中性粒细胞数/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	0.23 \pm 0.08	0.20 \pm 0.12	0.25 \pm 0.05
淋巴细胞百分比/%	79.25 \pm 5.22	76.97 \pm 9.29	72.57 \pm 9.32
单核细胞百分比/%	4.83 \pm 2.41	5.05 \pm 2.76	4.45 \pm 3.02
中性粒细胞百分比/%	15.92 \pm 0.88	17.38 \pm 2.19	16.98 \pm 3.77
红细胞数/ $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$	7.93 \pm 0.59	8.41 \pm 1.58	8.76 \pm 1.16
血红蛋白/ $g \cdot L^{-1}$	125.2 \pm 9.62	133.2 \pm 12.59	130.2 \pm 12.03
红细胞压积/%	42.05 \pm 6.81	43.98 \pm 4.36	45.27 \pm 3.76
平均红细胞体积/ μL	52.93 \pm 8.59	52.33 \pm 2.04	51.73 \pm 4.98
平均血红蛋白含量/ pg	15.68 \pm 1.64	16.25 \pm 3.75	15.52 \pm 3.54
平均血红蛋白浓度/ $g \cdot L^{-1}$	297.2 \pm 12.03	311.3 \pm 18.44	300.5 \pm 9.13
红细胞分布宽度变异系数/%	15.95 \pm 1.16	15.82 \pm 0.98	16.08 \pm 1.23
血小板数目/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	618.8 \pm 86.83	624.7 \pm 103.25	688.3 \pm 95.33
平均血小板体积/ μL	5.2 \pm 1.01	5.20 \pm 0.42	5.23 \pm 1.13
血小板分布宽度	16.8 \pm 2.32	16.73 \pm 4.78	16.73 \pm 2.37
血小板压积/%	0.3225 \pm 0.14	0.4315 \pm 0.17	0.3583 \pm 0.08

冻干粉高剂量);阿司匹林组剂量为 31.25 mg·kg⁻¹(阿司匹林肠溶片治疗急性心肌梗死的剂量为 100~300 mg,选择最高剂量作为阳性对照量)。除阿司匹林组最后 3 d 给药外,各组大鼠每日 ig 1 次,灌胃体积为 10 mL·kg⁻¹,连续 14 d。空白组和模型组给予等剂量生理盐水。

1.2.3 造模的方法 第 13 日,除空白组外均 sc 盐酸肾上腺素注射液 0.8 mg·kg⁻¹,共 2 次,间隔 4 h,第 1 次注射 2 h 后,将大鼠置 2℃冰水中游泳 5 min,取出后擦干毛发。复制大鼠急性血淤证模型^[12]。正常大鼠毛发浓密顺滑,行动敏捷,瞳孔呈鲜红色,嘴唇及鼻子红润。模型组大鼠造模成功后,行动较缓、毛发膨胀且稀疏、目光呆滞、鼻唇发紫、有些许震颤、心跳加快^[12]。给药组与模型组比较,行动敏捷,心跳较慢。造模后禁食,于第 14 天时,将各组大鼠麻醉后,腹主动脉取血,检测各项指标。

1.2.4 统计学方法 应用 SPSS 25.0 进行统计学处理,单因素方差分析中,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.2.5 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠凝血指标的影响 取“1.2.3”项下血样,加入枸橼酸钠(血液:抗凝剂=9:1),以 3×10^3 r·min⁻¹离心 15 min,取血浆,测定凝血酶原时间(PT)、活化部分

凝血酶原时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)的含量。水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠凝血指标的影响见表 3。与空白组比较,模型组的 PT、APTT、TT 明显缩短,FIB 含量明显增加,差异极显著($P < 0.01$),说明急性血淤证模型复制成功;与模型组比较,阿司匹林组、日本医蛭冻干粉高、中剂量组大鼠的 PT 显著延长($P < 0.01$);阿司匹林组、宽体金线蛭冻干粉高、中剂量组、日本医蛭冻干粉高、中、低剂量组大鼠的 APTT 延长($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$);阿司匹林组、日本医蛭冻干粉高剂量组大鼠的 TT 显著延长($P < 0.01$);各给药组大鼠 FIB 的含量无显著性影响。与阿司匹林组比较,日本医蛭冻干粉高剂量延长 PT、APTT、TT 的效果与之接近($P > 0.05$),其余组均与阿司匹林组有显著差异($P < 0.01$)。

1.2.6 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠血小板指标的影响 取“1.2.5”项下血清,按照 TXB2、GP II b/III a、CD62p、vWF 的试剂盒步骤操作,在 450 nm 处检测吸光度。水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠血小板指标的影响见表 4。与空白组比较,模型组大鼠血清中 CD62P、GP II b/III a、TXB2、vWF 的浓度明显升高,差异极显著($P < 0.01$);与模型组比较,阿司匹林组、宽体金线蛭冻干粉高、中剂量组、日本医蛭冻干粉高、中、低剂量组 CD62P、

表3 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠凝血指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of Hirudo freeze-dried powder on coagulation indexes in acute blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	PT/s	APTT/s	TT/s	FIB/g·L ⁻¹
空白	7.9 ± 0.37	28.66 ± 1.79	32.63 ± 1.93	1.67 ± 0.35
模型	5.76 ± 0.66 *	19.5 ± 1.31 *	25.6 ± 0.42 *	5.36 ± 0.89 *
阿司匹林	7.14 ± 0.47 ^{##}	25.63 ± 2.38 ^{##}	30.83 ± 1.22 ^{##}	4.57 ± 0.36 [#]
宽体金线蛭冻干粉高剂量	6.22 ± 0.43 [△]	23.27 ± 0.99 ^{##△}	27.17 ± 2.65 [△]	4.99 ± 0.49
宽体金线蛭冻干粉中剂量	6.08 ± 0.52 [△]	21.6 ± 1.23 ^{##△}	26.04 ± 1.34 [△]	5.13 ± 0.69
宽体金线蛭冻干粉低剂量	6.01 ± 0.84 [△]	20.73 ± 2.93	25.83 ± 0.92 ^{△△}	5.15 ± 0.46 [△]
宽体金线蛭饮片	5.83 ± 0.32 [△]	20.4 ± 1.25 [△]	25.87 ± 2.53 [△]	5.3 ± 0.54 [△]
日本医蛭冻干粉高剂量	7.07 ± 0.68 ^{##}	24.05 ± 1.78 ^{##}	29.92 ± 1.99 ^{##}	4.76 ± 0.5
日本医蛭冻干粉中剂量	6.44 ± 0.22 ^{##△}	23.36 ± 1.59 ^{##△}	27.16 ± 2.75 [△]	4.92 ± 0.88
日本医蛭冻干粉低剂量	6.26 ± 1.04 [△]	21.1 ± 1.42 ^{##△}	26.5 ± 1.68 [△]	5.11 ± 0.24 [△]
日本医蛭饮片	6.06 ± 0.71 [△]	20.8 ± 2.45 [△]	26.1 ± 0.87 [△]	5.19 ± 0.57 [△]

与空白组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与阿司匹林组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表4 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠血小板指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effects of Hirudo freeze-dried powder on platelet index in acute blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	CD62P/pg·mL ⁻¹	GP II b/III a/U·mL ⁻¹	TXB2/pg·mL ⁻¹	vWF/pg·mL ⁻¹
空白	1.45 ± 0.335	46.864 ± 9.924	8.969 ± 1.611	103.499 ± 30.332
模型	2.188 ± 0.168 *	87.865 ± 9.604 *	15.912 ± 0.832 *	223.937 ± 13.495 *
阿司匹林	1.663 ± 0.398 ^{##}	59.418 ± 7.394 ^{##}	12.178 ± 0.959 ^{##}	160.792 ± 10.942 ^{##}
宽体金线蛭冻干粉高剂量	1.856 ± 0.180 ^{##△△}	68.783 ± 7.469 ^{##△}	14.215 ± 1.820 ^{##△△}	187.506 ± 12.144 ^{##△△}
宽体金线蛭冻干粉中剂量	1.938 ± 0.302 ^{##△△}	74.319 ± 5.201 ^{##△△}	14.771 ± 1.769 ^{△△}	208.391 ± 9.913 ^{##△△}
宽体金线蛭冻干粉低剂量	2.087 ± 0.275 ^{△△}	81.357 ± 8.631 ^{△△}	15.137 ± 2.080 ^{△△}	218.843 ± 14.816 ^{△△}
宽体金线蛭饮片	2.082 ± 0.233 ^{△△}	83.719 ± 6.668 ^{△△}	15.558 ± 2.001 ^{△△}	220.205 ± 16.128 ^{△△}
日本医蛭冻干粉高剂量	1.589 ± 0.261 ^{##}	61.327 ± 8.037 ^{##}	11.917 ± 0.819 ^{##}	174.941 ± 10.613 ^{##△}
日本医蛭冻干粉中剂量	1.798 ± 0.288 ^{##△△}	67.467 ± 7.861 ^{##△}	13.878 ± 1.029 ^{##△△}	186.196 ± 13.740 ^{##△△}
日本医蛭冻干粉低剂量	1.992 ± 0.155 ^{##△△}	76.490 ± 9.798 ^{##△△}	14.501 ± 1.331 ^{△△}	202.488 ± 8.437 ^{##△△}
日本医蛭饮片	2.055 ± 0.184 ^{△△}	80.328 ± 8.616 ^{△△}	15.059 ± 0.850 ^{△△}	214.774 ± 12.012 ^{△△}

与空白组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与阿司匹林组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

GP II b/III a、vWF 的浓度显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$); 阿司匹林组、宽体金线蛭冻干粉高剂量组、日本医蛭冻干粉高、中剂量组 TXB2 的浓度显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$); 其余各组大鼠的各项指标浓度差异不显著, 不具统计学意义。与阿司匹林组比较, 日本医蛭冻干粉高剂量组降低急性血淤证大鼠血清中 CD62P、GP II b/III a、TXB2 浓度的效果与之接近 ($P > 0.05$), 其余各组显著几项指标均与阿司匹林组有显著差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

1.2.7 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠血液流变学指标的影响 取“1.2.3”项下血样, 检测不同切变率下的全血黏度 (WBV)。取“1.2.5”项下血浆, 检测血浆黏度 (PV)。各组血液流变学指标

的检测结果见表 5。与空白组比较, 模型组大鼠在不同切变率下的 WBV 和 PV 均明显升高, 差异极显著 ($P < 0.01$), 急性血淤证模型复制成功。与模型组比较, 阿司匹林组、宽体金线蛭冻干粉高剂量组、日本医蛭高、中剂量组中大鼠高、中、低切变率下的 WBV 和 PV 均显著降低 ($P < 0.01$); 宽体金线蛭冻干粉中剂量组高切变率下的全血黏度降低 ($P < 0.05$); 其余各组大鼠的各项指标差异不显著。与阿司匹林组比较, 日本医蛭冻干粉高剂量降低大鼠 WBV 和 PV 的效果与之接近 ($P > 0.05$), 日本医蛭冻干粉中剂量降低大鼠高切变率下 WBV 和 PV 的效果与之接近 ($P > 0.05$), 其余给药组均与阿司匹林组有显著差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

表 5 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠血液流变学指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of Hirudo freeze - dried powder on hemorheology indexes in acute blood stasis rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	WBV/mPa·s ⁻¹			PV/mPa·s ⁻¹
	1 s ⁻¹	50 s ⁻¹	200 s ⁻¹	
空白	30.76 ± 5.54	8.26 ± 0.53	5.25 ± 0.57	1.12 ± 0.17
模型	48.65 ± 3.17 *	16.51 ± 1.86 *	8.61 ± 0.73 *	1.84 ± 0.31 *
阿司匹林	37.47 ± 3.31 ##	11.21 ± 2.18 ##	6.58 ± 0.67 ##	1.3 ± 0.26 ##
宽体金线蛭冻干粉高剂量	43.01 ± 4.54 ##△△	13.03 ± 1.95 ##△	7.23 ± 0.36 ##△	1.54 ± 0.23 ##△
宽体金线蛭冻干粉中剂量	45.98 ± 2.62 △△	14.79 ± 1.86 △△	7.89 ± 0.53 #△△	1.63 ± 0.15 △△
宽体金线蛭冻干粉低剂量	46.55 ± 5.17 △△	15.33 ± 0.71 △△	8.21 ± 0.61 △△	1.79 ± 0.48 △△
宽体金线蛭饮片	47.79 ± 3.19 △△	16.21 ± 1.47 △△	8.39 ± 1.01 △△	1.87 ± 0.24 △△
日本医蛭冻干粉高剂量	35.89 ± 5.71 ##	10.83 ± 1.23 ##	6.35 ± 0.39 ##	1.29 ± 0.49 ##
日本医蛭冻干粉中剂量	41.42 ± 4.04 ##△	12.97 ± 0.79 ##△	7.01 ± 0.68 ##	1.37 ± 0.25 ##
日本医蛭冻干粉低剂量	44.65 ± 2.67 △△	14.95 ± 1.44 △△	7.88 ± 0.83 △△	1.66 ± 0.26 △△
日本医蛭饮片	46.83 ± 5.09 △△	15.76 ± 0.96 △△	8.26 ± 0.42 △△	1.84 ± 0.67 △△

与空白组比较: * P < 0.01; 与模型组比较: #P < 0.05, ##P < 0.01; 与阿司匹林组比较: △P < 0.05, △△P < 0.01

1.2.8 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠心肌组织病理学的影响 处死大鼠,洗净心、肺组织表面血液,切片,HE 染色后置显微镜下观察。空白组的心外膜结构完整清晰,心肌纤维形态正常,心内膜内皮细胞完好;肺组织外膜完整,胞质染色均匀,胞核清晰,未见明显病理变化。模型组的心肌纤维坏死,局部可见明显炎性细胞浸润;肺呼吸部肺泡上皮细胞伴有结晶沉积,间质可见少量炎性细胞浸润,表明模型组大鼠心肺损伤明显。与模型组病理比较,日本医蛭冻干粉高剂量

组、阿司匹林药组的心脏组织未见明显病理变化,提示用药后改善作用良好。日本医蛭冻干粉中、低剂量组的病理组织损伤程度略有减轻,提示用药后有一定的改善作用。其余各组大鼠的病理组织损伤程度相差不大,提示用药后无明显改善作用(图 1)。与模型组比较,日本医蛭高剂量组、阿司匹林药组的肺脏组织病理损伤有所减轻,提示用药后有一定的改善作用;其余各组大鼠的病理组织损伤程度相差不大,提示用药后无明显改善作用(图 2)。

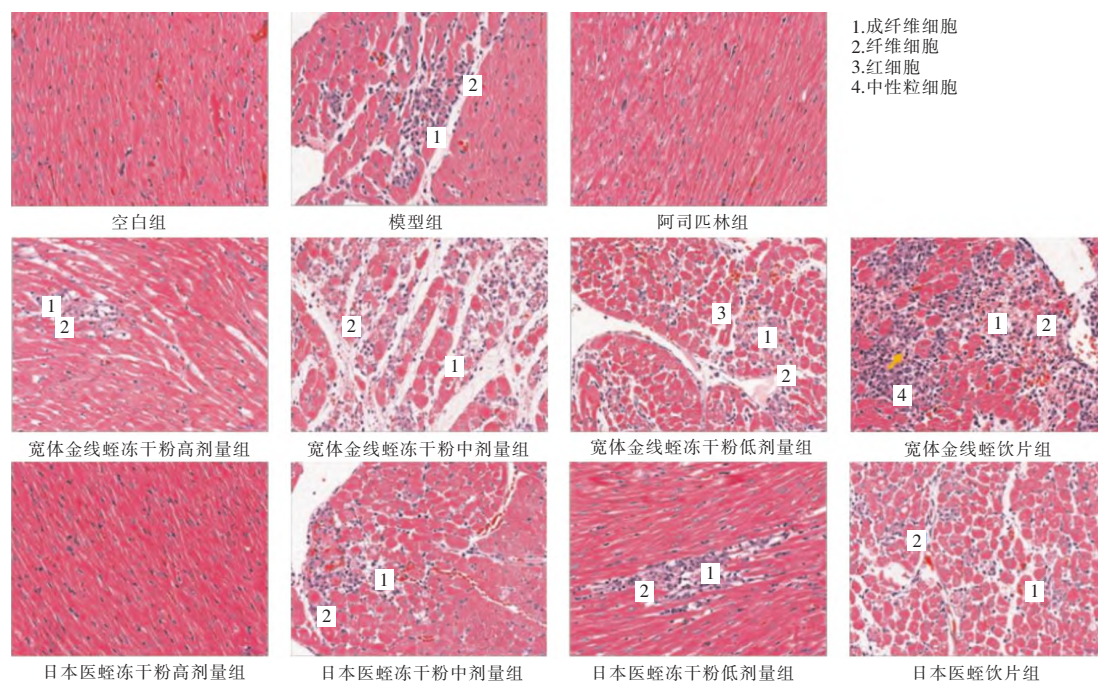


图 1 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠心肌组织病理学的影响(×400)

Figure 1 Effects of Hirudo freeze - dried powder on myocardial histopathology of acute blood stasis rats (×400)

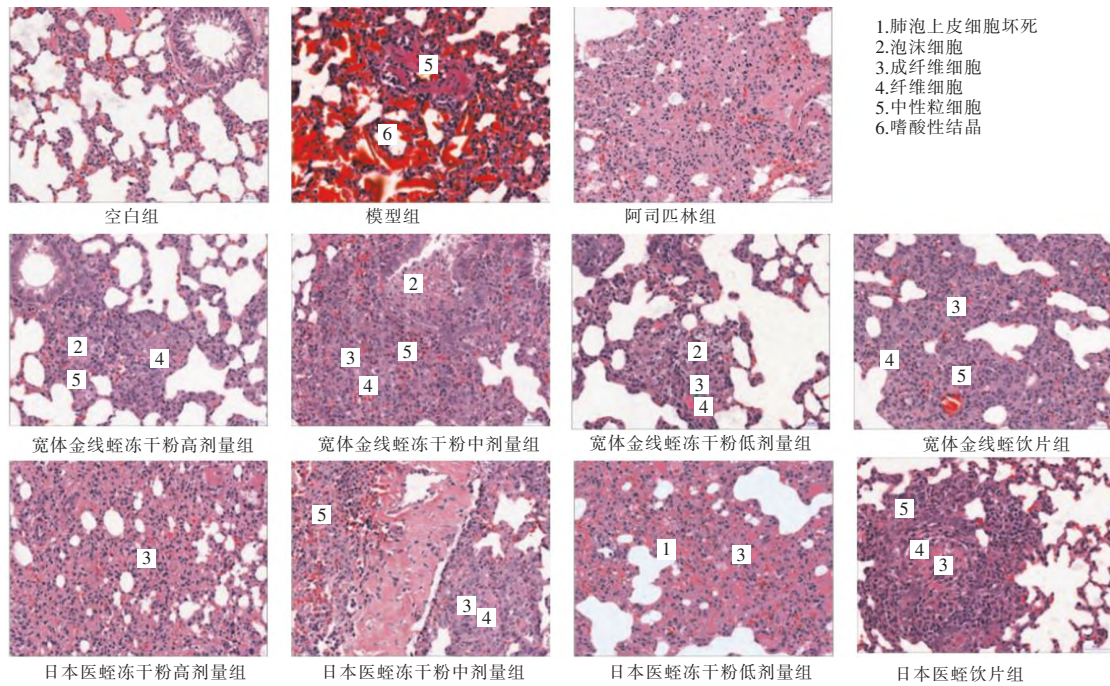


图 2 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠肺脏组织病理学的影响 (×400)

Figure 2 Effects of Hirudo freeze – dried powder on lung histopathology of acute blood stasis rats (×400)

1. 2. 9 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠氧化应激水平的影响 取“1. 2. 5”项下血浆,按照 SOD、MDA、GSH - Px 试剂盒步骤操作,测定相关指标的含量。水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠氧化应激水平的影响见表 6。与空白组比较,模型组大鼠血清中 SOD、GSH - Px 的含量明显降低,MDA 的含量明显升高,差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较,除水蛭饮片组外,其余各组 SOD 的含量均显著升高 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$);除水蛭饮片组、水蛭冻干粉低剂量组外,其余各组 MDA 的含量均显著降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$);阿司匹林组、宽

体金线蛭冻干粉高剂量组、日本医蛭冻干粉组 GSH - Px 含量均显著升高 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$);其余各组大鼠各项指标差异不显著。与阿司匹林组比较,日本医蛭冻干粉高剂量改善血淤证大鼠氧化应激水平各项指标的效果与之接近 ($P > 0.05$);宽体金线蛭冻干粉高剂量升高 SOD、GSH - Px 含量的效果与之接近 ($P > 0.05$);日本医蛭冻干粉中剂量降低 MDA、升高 GSH - Px 含量的效果与之接近 ($P > 0.05$);其余给药组的情况均与阿司匹林组有显著差异 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

表 6 水蛭冻干粉对急性血淤证大鼠血浆中 SOD、MDA、GSH - Px 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effects of Hirudo freeze – dried powder on SOD, MDA and GSH - Px contents in plasma of rats with acute blood stasis syndrome ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹	GSH - Px/nmol·mL ⁻¹
空白	104.761 ± 5.412	3.012 ± 0.869	2196.552 ± 79.01
模型	70.158 ± 7.629*	5.663 ± 0.525*	1782.758 ± 113.95*
阿司匹林	98.654 ± 8.468##	4.199 ± 0.434##	2048.276 ± 80.796##
宽体金线蛭冻干粉高剂量	91.092 ± 5.739##	4.776 ± 0.703##△	1953.448 ± 120.149##
宽体金线蛭冻干粉中剂量	83.968 ± 6.283##△△	4.9 ± 0.687##△△	1896.52 ± 192.239△△
宽体金线蛭冻干粉低剂量	77.219 ± 8.342##△△	5.41 ± 0.351△△	1840.69 ± 100.793△△
宽体金线蛭饮片	73.314 ± 14.224△△	5.522 ± 0.525△△	1822.068 ± 91.947△△
日本医蛭冻干粉高剂量	99.309 ± 7.194##	3.815 ± 0.427##	2084.483 ± 85.950##
日本医蛭冻干粉中剂量	90.912 ± 7.988##△	4.418 ± 0.506##	2009.379 ± 70.136##
日本医蛭冻干粉低剂量	78.563 ± 7.706##△△	5.257 ± 0.855△△	1918.621 ± 128.080##△
日本医蛭饮片	76.329 ± 12.463△△	5.281 ± 0.552△△	1853.104 ± 104.989△△

与空白组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.05$, ### $P < 0.01$; 与阿司匹林组比较: △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

1.2.10 聚类分析 为更直观地评价药物对急性血淤证大鼠的治疗作用,使用 SPSS25.0 对各给药组的结果进行聚类分析。由图 3 可知:当聚类数为 3 时,阿司匹林组、日本医蛭冻干粉高、中剂量组的治疗效果最好;宽体金线蛭冻干粉高、中剂量组、日本医蛭冻干粉低剂量组的治疗效果一般;宽体金线蛭冻干粉低剂量组、宽体金线蛭饮片组、日本医蛭饮片组的治疗效果较差。由此可知:水蛭经冷冻干燥后的药效明显高于传统炮制品,其中,日本医蛭冻干粉的疗效优于宽体金线蛭,且与阿司匹林无显著性差异($P > 0.05$)。

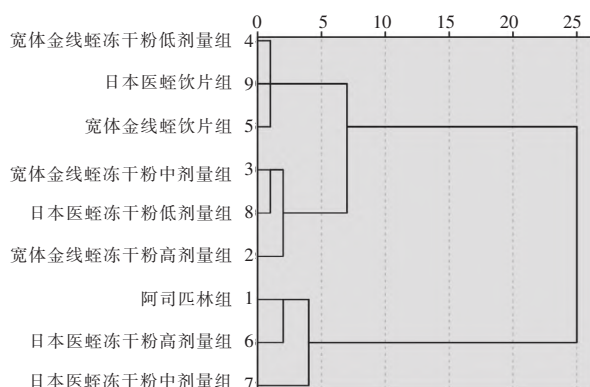


图3 给药组治疗效果的聚类分析结果

Figure 3 Cluster analysis results of therapeutic effect in the administration group

2 讨论

水蛭素是迄今为止最强的凝血酶特效抑制剂,其药理作用和理化性质与空间构象相关^[13]。冷冻干燥常用于临床和实验室保存蛋白质,能够避免药物因高热而分解、氧化、污染^[14]。试验前研究发现:宽体金线蛭、日本医蛭饮片的抗凝血酶活性分别为 $7, 26 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,制成冻干粉后分别为 $30, 219 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,分别增加了 4、8 倍。文中结果表明:水蛭冻干粉不仅无严重的急性毒性,还能显著改善急性血淤证大鼠的凝血功能、血液流变学、氧化应激水平和心肺损伤,且作用明显优于水蛭饮片,说明冷冻干燥能更好地保护水蛭的药用活性成分,与传统吊干或晒干的水蛭比较具有更强的体内、体外活性。近年来,人类心脑血管疾

病的发病率日渐升高,增加药物种类、提高药物的治疗效果是解决问题的关键一步,因此,对水蛭冻干粉的研究具有深远意义。

参考文献:

- [1] 吴青和. 中药药理学[M]. 北京:高等教育出版社,2007:156.
- [2] GUO SZ, CHEN JX, CHUO WJ. A new biomarkers feature pattern consisting of TNF- α , IL-10, and IL-8 for blood stasis syndrome with myocardial ischemia[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:130702.
- [3] 李广新. 血液流变学指标在首发精神分裂症诊断中的临床价值[J]. 中国医药指南, 2018, 16(1):77-78.
- [4] 林明宝, 黄湘, 张建. 水蛭提取物对体外培养大鼠大脑皮层神经细胞缺氧性凋亡的影响[J]. 华西药理学杂志, 2008, 23(5):543-545.
- [5] 吴建峰. 中西医结合治疗缺血性脑中风的疗效及对血液流变学指标的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(34):3833-3834.
- [6] 梁进权, 王宁生, 宓穗卿. 水蛭抗凝抗血栓活性及其与品种、提取方法的关系[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(9):1096-1098.
- [7] 田雪飞, 孙婧, 方圆, 等. 水蛭提取物对肝癌 Hep G2 细胞 DNA 去甲基化作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2011, 31(9):8-11, 22.
- [8] 戚清权, 高一明, 周洵如, 等. 水蛭清除慢性肾炎循环免疫复合物作用的研究[J]. 上海中医药杂志, 1997, 4:15-17.
- [9] 刘吉尧, 徐霜霜, 曾海文, 谢丽萍. 水蛭对糖尿病肾病的疗效及安全性的 Meta 分析[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(5):137-139, 157.
- [10] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1992:201
- [11] 王玉荣, 王再谟, 邓崇刚, 等. 中药新制剂开发与应用[M]. 第二版. 北京:人民卫生出版社.
- [12] 李伟霞, 黄美艳, 唐于平, 等. 大鼠急性血瘀模型造模方法的研究与评价[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12):1761-1765.
- [13] 张子文, 王尉, 刘胜男, 等. 水蛭素生物学特性的研究进展[J]. 生物化工, 2019, 5(1):156-157, 164.
- [14] 陈华友, 耿旭, 齐向辉, 等. 枯草杆菌重组水蛭素的冷冻干燥工艺及热稳定性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(35):17695-17697.

收稿日期:2021-02-08