

不同提取法炮制对水蛭体外溶栓活性的影响

谭 赫¹ 侯觉文¹ 单 宇² 王雄飞¹ 钟 苗¹ 雷 艳¹ 沈 蒙¹ 于继平¹ 袁瑞娟¹

(1 北京中医药大学中药学院, 北京, 102488; 2 中国医学科学院/北京协和医学院/药用植物研究所, 北京, 100193)

摘要 目的:研究炮制对水蛭体外溶栓活性的影响。方法:采用水提取法和仿生提取法对水蛭净制品、烫制品、酒制品进行提取,选用纤维蛋白平板法和纤维蛋白原平板法,以平板上透明圈面积为指标进行纤溶活性测定;并建立体外血栓模型,通过血凝块的失重比进一步评价水蛭不同炮制品的溶栓活性。结果:水蛭在炮制前后均能在纤维蛋白平板上产生透明圈。采用水提取法时,烫制品和酒制品的溶圈面积减小,炮制后纤溶活性降低,活性顺序为:净制品>酒制品>烫制品。而采用仿生提取法时,显示烫制和酒制后水蛭纤溶活性升高,活性顺序为:烫制品>酒制品>净制品。体外血栓模型中,血凝块失重比结果与纤溶活性测定结果一致,采取水提取法时,炮制使溶栓活性降低,而采用仿生提取法时显示炮制使溶栓活性增加。结论:与水提取法比较,仿生提取法更符合水蛭经口服后在人体内的消化吸收过程,其结果更有说服力。传统炮制可增强水蛭溶栓活性。

关键词 水蛭;炮制;仿生提取;纤溶;溶栓

Effects of Water Extraction Method and Bionic Extraction Method on Antithrombotic Activity of Processed Products of *Whitmania Pigra*

Tan He¹, Hou Juewen¹, Shan Yu², Wang Xiongfei¹, Zhong Miao¹, Lei Yan¹, Shen Meng¹, Yu Jiping¹, Yuan Ruijuan¹

(1 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract Objective: To explore the effects of different processing methods on the antithrombotic activity of *Whitmania Pigra* by different extraction methods. **Methods:** The water extraction method and the bionic extraction method were used respectively to extract the antithrombosis active components in *W. pigra* hanging dried products, talcum powder fried products and wine products. In the case of the transparent circle area of the fibrin plate method and the fibrinogen plate method were used as the activity indexes to evaluate the fibrinolytic activities of different processed *W. pigra*. Then, for the purpose of further determining the antithrombosis activity, the thrombus model in vitro was established in order to calculate further the dissolution rate of blood clot. **Results:** *W. pigra* could produce transparent rings on the fibrin plate before and after processing. In the sample of the water extraction method, it was found there existed not only decreased the area of transparent rings but also weakened activity in fibronolysis after processing both in the talcum powder fried products and the wine products, and the activity order was as follows: hanging dried products > wine products > talcum powder fried products, the results of whom were in agreement with the results of the weight loss ratio of the dissolved blood clot in vitro. In the sample of the bionic extraction method, all the results indicated the fibrinolytic activity and the thrombolysis rate of *W. pigra* after wine product and talcum powder fried product were increased. **Conclusion:** When compared with the water extraction method, the bionic extraction method was more similar to the absorption process of *W. pigra* in human digestive system after oral administration, and the extracted ingredients of the bionic extraction method were more consistent with human digestion and absorption. Therefore, the traditional processing method can enhance the antithrombosis activity of *W. pigra*.

Key Words *Whitmania pigra*; Processing; Bionic extraction; Fibrinolysis; Antithrombosis activity

中图分类号: R284; R283 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.12.012

水蛭是破血逐瘀类药材的代表,始载于《神农本草经》,抗凝、溶栓是其最重要的药理作用。《中华人民共和国药典》2015 年版(一部)收录了 3 种水蛭,分别为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 和柳叶蚂蟥

Whitmania acranulata Whitman^[1], 目前以蚂蟥应用最多。水蛭常用的处理方法为清水吊干,有滑石粉烫制、酒制等诸多炮制方法,其中滑石粉烫制法是《中华人民共和国药典》2015 年版(一部)收录的临床使用最多的炮制方法^[2]。据记载,炮制能使水蛭毒性

基金项目:北京市自然科学基金项目(7172130)

作者简介:谭赫(1998.08—),女,本科生在读,研究方向:中药的物质基础与活性研究,E-mail:183726338@qq.com

通信作者:袁瑞娟(1979.11—),女,博士,副教授,研究方向:中药分析研究,E-mail:rjyuance@126.com

降低、利于粉碎、消减腥味。但目前研究表明,炮制使水蛭抗凝溶栓作用降低,所以临床应用中多选用其清水吊干品^[3-5]。这些研究中主要采用水为溶剂提取样品,而水蛭主要活性成分为蛋白类物质,其发挥真正药效作用的物质可能是经胃肠道消化降解后的成分,仅采用水提取法时不能很好地模拟水蛭在体内被消化降解的过程,因此得出的结论可能有失偏颇^[6-7]。本实验组前期采用仿生提取法研究水蛭的抗凝活性时,发现炮制后水蛭抗凝活性增加^[8]。除抗凝活性外,溶栓活性也是水蛭的主要药理活性,而关于炮制对水蛭溶栓作用的影响还没有相关研究。本实验选用水提取和仿生提取2种方法^[9],用纤维蛋白平板法、纤维蛋白原平板法和体外溶栓实验对水蛭不同炮制品的溶栓活性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 水蛭,市售,清水吊干品,经北京中医药大学中药学院鉴定系杨瑶珺教授鉴定为蚂蟥 *W. pigra*。雄性 SD 大鼠,SPF 级,动物许可证号为 SCXK(京)2016-0002,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供。

1.1.2 药物 黄酒,市售,老恒和浙江黄酒(五年陈酿·清爽型黄酒,湖州老恒河酿造有限公司);滑石粉,市售。

1.1.3 试剂与仪器 磷酸缓冲盐溶液(PBS)缓冲液(片剂, Solarbio, 批号: 809A032);胃蛋白酶(1:10 000, P7000, 北京拜尔迪生物技术有限公司, 批号: 9001756);纤维蛋白原(Sigma F8630, 批号: AP0036);琼脂糖(Agarose G-10, 批号: 1461000);胰蛋白酶(1:250, 0458, 北京拜尔迪生物技术有限公司, 批号: 9002077);凝血酶(T4648-1KU, Sigma, 批号: SLBV3604);注射用尿激酶(25万单位, 广东天普生化医药股份有限公司, 批号: 071704011);0.9%氯化钠注射液(250 mL, 山东华鲁制药有限公司, 批号: G17i21307);乌拉坦、氢氧化钠、盐酸等其他试剂为分析纯试剂;实验用水为去离子水。

RXZ 智能型人工气候箱(宁波市科技园区新江南仪器有限公司);梅特勒-托利多 FE20 实验室 pH 值计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);中科美菱超低温冷冻储存箱(型号: DW-HL 388);水蛭,市售,清水吊干品,经北京中医药大学中药学院鉴定系杨瑶珺教授鉴定为蚂蟥 *W. pigra*;黄酒,市售,老恒和浙江黄酒(五年陈酿·清爽型黄酒,湖州老恒河酿造有限公司);滑石粉,市售。LGJ-12 冷冻干燥机(北京

松源华兴科技发展有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(北京世纪予华仪器有限公司);G16 型医用高速离心机(安新县白洋离心机厂)。

1.2 方法

1.2.1 水蛭炮制 1)净制:取水蛭清水吊干品适量,去离子水洗净,剪切成小段,冷冻干燥 24 h 后,打粉,过 3 号筛,得净制品粗粉,置于 -20 ℃ 冰箱密封保存备用。2)烫制:将滑石粉置于锅内,武火炒至灵活状态时加入净选后的水蛭清水吊干品适量,不断翻动,烫至微鼓起、表面呈黄棕色时取出,筛去滑石粉,放凉至室温,去离子水快速冲洗去除残存的滑石粉,冷冻干燥 24 h 后,打粉,过 3 号筛,得烫制品粗粉,置于 -20 ℃ 冰箱密封保存备用。3)酒制:取水蛭清水吊干品适量,除去杂质,称重,剪切成小段,用黄酒拌匀,水蛭-黄酒(10:1),酒吸尽后加盖闷透,置于烘箱中加热(40 ℃)干燥至表面微变色、质酥脆时取出,放凉至室温,打粉,过 3 号筛,得酒制品粗粉,置于 -20 ℃ 冰箱密封保存备用。

1.2.2 水蛭各炮制品活性成分的提取 1)水提取法:称取水蛭各炮制品粗粉各 0.15 g,分别加入 2.8 mL 去离子水,室温下磁力搅拌 5 h, 15 000 r/min 离心 20 min,取上清液,备用。2)仿生提取法:取 10 mL 人工胃液(人工胃液:9 mL 浓 HCl,加水定容至 1 000 mL),加入胃蛋白酶(酶底比 1.25%),搅拌均匀后分别加入水蛭各炮制品粗粉 1.50 g, 37 ℃ 磁力搅拌 3 h(蛋白质在胃内的消化吸收时间);用 pH 值 13.00 的 NaOH 溶液将反应液 pH 值调至 6.80,加入胰蛋白酶(酶底比 7.5%), 37 ℃ 磁力搅拌 2 h(蛋白质在小肠内的消化吸收时间)将反应样品取出,置于 85 ℃ 水浴中灭活 15 min,自然冷却至室温;以 15 000 r/min 离心 20 min,取上清液,备用^[8]。

1.2.3 纤维蛋白平板和纤维蛋白原平板实验 纤维蛋白平板的制备:用 pH 值 7.4 的 PBS 配置 1% 的琼脂溶液,加热至 90 ℃ 使其完全融化,待冷却至 75 ℃ 左右,取 20 mL 琼脂溶液与用 pH 值 7.4 的 PBS 配置的 8 mL 0.5% 的纤维蛋白原溶液和 1 mL 10 U/mL 的凝血酶溶液混合,搅拌均匀后,立即倒入经高压蒸汽灭菌后的直径为 10 cm 的培养皿中,轻轻摇匀,冷却静置约 50 min 琼脂完全凝固后,打出直径为 8 mm 的孔,打孔后用移液枪小心将孔中液体吸出,备用。

纤维蛋白原平板的制备:用 pH 值 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)配置 3% 的琼脂溶液,加热至 90 ℃ 使其完全融化,待冷却至 75 ℃ 左右,取 20 mL 琼脂溶

表 1 水蛭不同炮制品水提取物及仿生提取物纤维蛋白平板溶圈大小($\bar{x} \pm s$)

组别	水提取法			仿生提取法		
	短径(mm)	长径(mm)	面积(mm ²)	短径(mm)	长径(mm)	面积(mm ²)
净制品组($n=3$)	24.50 $\pm$ 0.07	25.15 $\pm$ 0.07	483.78 $\pm$ 2.88 [*]	19.18 $\pm$ 0.04	19.73 $\pm$ 0.12	297.12 $\pm$ 1.65 [*]
酒制品组($n=3$)	21.00 $\pm$ 0.32	21.78 $\pm$ 0.57	359.16 $\pm$ 1.27 ^{*△}	21.32 $\pm$ 0.06	23.20 $\pm$ 0.06	388.97 $\pm$ 2.89 ^{*△}
烫制品组($n=3$)	12.05 $\pm$ 0.27	13.19 $\pm$ 0.20	125.02 $\pm$ 1.23 ^{*△}	22.34 $\pm$ 0.09	24.21 $\pm$ 0.06	425.25 $\pm$ 2.26 ^{*△}
空白对照组($n=3$)	8.00 $\pm$ 0.12	8.11 $\pm$ 0.02	50.93 $\pm$ 0.69	11.98 $\pm$ 0.13	12.31 $\pm$ 0.08	115.79 $\pm$ 4.08
阳性对照品($n=3$)	31.32 $\pm$ 0.36	33.24 $\pm$ 0.32	817.97 $\pm$ 5.28	34.26 $\pm$ 0.33	35.18 $\pm$ 0.27	946.30 $\pm$ 4.59

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$;与净制品比较,[△] $P<0.05$

液与 10 mL 用 pH 值 7.4 的 PBS 配置的 0.1% 的纤维蛋白原溶液混匀,立即倒入经高压蒸汽灭菌后的直径为 10 cm 的培养皿中,轻轻摇匀,冷却静置约 30 min 琼脂完全凝固后,打出直径为 8 mm 的孔,打孔后用移液枪小心将孔中液体吸出,备用。

纤溶活性测定:分别精密吸取水蛭各样品溶液、阳性对照品(尿激酶)、空白试剂各 120 μ L(其中水提样品以水为空白对照,仿生提取样品以空白酶解液为空白对照,空白酶解液按仿生提取法所述,除不加水蛭样品外,其余操作相同),同板加样,置于恒温(37 $^{\circ}$ C)培养箱中培养 20 h 取出观察。

1.2.4 大鼠体外溶栓实验 血栓的制备:从大鼠腹主动脉取血于无菌离心管中,4 $^{\circ}$ C 放置自然凝血 5 h,待凝固后取出,用手术刀将血凝块均分^[10-12],每块约 0.2 g,分别用生理盐水漂洗至无颜色以除去表面黏附的血细胞和杂质,将血凝块烘干称重(W_1),并随机放入无菌离心管中,分为 4 组,每组 3 支平行管。

溶栓活性测定:向每组离心管中分别加入水蛭各样品溶液、空白试剂各 3 mL(其中水提样品以生理盐水为空白对照,仿生提取样品以空白酶解液为空白对照),置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱内恒温孵育,36 h 后取出血凝块,用生理盐水反复漂洗至无颜色后,将血凝块烘干称重(W_2)^[12-13],计算 36 h 后 3 组血凝块溶解率平均值。血凝块溶解率($\%$)= $[(W_1 - W_2)/W_1] \times 100\%$ 。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件处理所有数据,计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纤维蛋白平板实验结果 将水蛭及炮制品的水提取物和仿生提取物分别加入纤维蛋白平板中,恒温(37 $^{\circ}$ C)培养 20 h 后出现的结果如图 1 所示。纤维蛋白平板的溶圈面积反映了人体内血栓形成后各样品通过与纤维蛋白反应直接溶解血栓的效果。阳

性对照品(尿激酶)出现明显透明圈,证明纤维蛋白平板制作成功。无论水提取法还是仿生提取法,与空白组比较,水蛭各炮制品均能与纤维蛋白平板作用产生透明圈,表明水蛭各炮制品能通过直接降解纤维蛋白以达到纤溶作用,但是炮制前后纤溶活性对比时,不同提取方法下,不同炮制品产生的透明圈大小差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

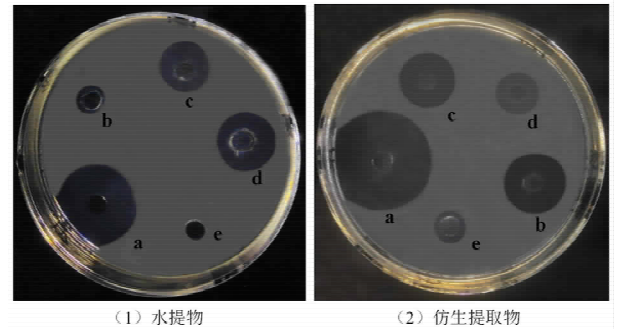


图 1 宽体金钱蛭不同炮制品水提取物及仿生提取物纤维蛋白平板溶圈图

注:a-阳性对照品,b-烫制品,c-酒制品,d-净制品,e-空白对照

水提取法显示水蛭各炮制品在纤维蛋白平板上产生透明圈的大小顺序为:净制品 $>$ 酒制品 $>$ 烫制品,表示炮制降低了净制品的溶栓活性;仿生提取法显示,水蛭各炮制品在纤维蛋白平板上产生透明圈的大小顺序为:烫制品 $>$ 酒制品 $>$ 净制品,表示烫制和酒制均能使净制品的溶栓活性增强。

2.2 纤维蛋白原平板实验结果 将水蛭各炮制品的水提取物和仿生提取物分别加入纤维蛋白原平板中,恒温(37 $^{\circ}$ C)培养 20 h 后发现阳性对照品(尿激酶)出现明显透明圈,证实纤维蛋白原平板具有活性。但是无论水提取法还是仿生提取法均显示水蛭各炮制品均不能在纤维蛋白原平板上产生透明圈,即水蛭各炮制品在发挥抗血栓作用时,不是通过直接降解纤维蛋白原抑制血栓形成,而是对已形成的血栓进行溶解。

2.3 大鼠体外溶栓实验结果 无论采用水提取法还是仿生提取法,与空白对照组比较,水蛭各炮制品均有显著的体外溶栓效果,差异有统计学意义($P<$

0.05)。观察显示,样品组溶栓后,血凝块质地松散,体积减小,溶液明显红染。而空白组溶栓前后血凝块形状、质地及溶液颜色均无明显变化。

溶栓率结果表明,水提取法和仿生提取法均显示水蛭各炮制品对血栓有很好的溶解效果,但是炮制前后溶栓活性比较,不同提取法差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 水蛭不同炮制品水提取物及仿生提取物的溶栓率比较($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	水提取法	仿生提取法
净制品组($n=3$)	70.56 $\pm$ 1.71 [*]	58.85 $\pm$ 1.08 [*]
酒制品组($n=3$)	62.82 $\pm$ 2.07 ^{*△}	69.69 $\pm$ 1.14 ^{*△}
烫制品组($n=3$)	44.53 $\pm$ 1.49 ^{*△}	81.87 $\pm$ 1.36 ^{*△}
空白对照组($n=3$)	24.68 $\pm$ 2.76	46.79 $\pm$ 1.32

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$;与净制品比较,[△] $P<0.05$

水提取法显示水蛭各炮制品溶栓率顺序为:净制品>酒制品>烫制品,表示炮制降低了水蛭的活性;仿生提取法显示水蛭各炮制品溶栓率顺序为:烫制品>酒制品>净制品,表示烫制和酒制均能使水蛭的溶栓活性增强。

3 讨论

由于水蛭在体内发挥抗血栓活性作用的成分为蛋白类物质,所以经水提取法和仿生提取法得到的物质存在很大差异,对抗血栓活性的强弱有着决定性的影响。本实验结果表明,通过出现的透明圈和测得的溶栓率证明水蛭能直接降解纤维蛋白并溶解血栓。在采用2种提取方法研究炮制对水蛭纤溶活性的影响时,在纤维蛋白平板和体外血栓模型上所得到的结果却几乎相反。在水提取法中,根据观察测量透明圈的大小及测得的溶栓率显示,炮制使水蛭抗血栓活性明显降低,这与采用水提取法的研究者所得出的实验结论基本相同^[10];而采用仿生提取法时,通过产生透明圈的大小及测得的溶栓率显示2种炮制方法均能使水蛭的抗血栓活性增强。在纤维蛋白原平板上所得到的结果与纤维蛋白平板不同,根据观察,2种提取方法得到的成分均不能产生透明圈,反映了水蛭不能直接降解纤维蛋白原。

由于水蛭的给药形式通常为口服,所以仿生提取法得到的抗血栓活性成分与在人体内真正发挥药效作用的物质更加相似,所得结果比水提取法更具有说服力,对于在2种不同平板上所得到的不同结果及2种提取方法在纤维蛋白平板上及体外血栓模型中所得到的抗血栓活性结果相悖的情况,可能的原因分析如下。

3.1 水蛭在纤溶过程中可能发挥类纤溶酶的作用

机体内存在凝血系统、纤溶系统。凝血-纤溶平衡系统血液凝固过程中最后可溶的纤维蛋白原在凝血酶的作用下变成不溶的纤维蛋白而凝固。在哺乳动物血液系统中包含2个基本的纤溶过程:一个是纤溶酶溶解纤维蛋白或者纤维蛋白原,从而溶解血栓;另一个是在纤溶酶原激活剂的作用下,纤溶酶原转变成纤溶酶,进而发挥溶栓作用。通过建立体外血栓模型反映溶栓药物向血栓渗透并发挥作用的溶栓效果^[14]。由实验结果推测,水蛭各炮制品可能起着类似纤溶酶的作用^[15],其中含有1种或多种可以溶解纤维蛋白但不能直接溶解纤维蛋白原的成分,这可能是因为纤溶过程中构成纤维蛋白原的肽链不具有水蛭各炮制品的纤溶作用点,而有效的作用部位在形成纤维蛋白时暴露出来。

3.2 烫制对水蛭抗血栓活性的影响 水提取法提取出的活性物质主要为大分子蛋白类物质,而仿生提取法产物多为相对分子质量较小的肽类物质。水蛭经过滑石粉高温烫制后,蛋白质变性甚至失活,水溶性降低。因此,采用水提取法提取出的物质中水溶性蛋白变少,抗血栓活性较未经炮制的水蛭有所降低。而烫制后,水蛭中蛋白类成分的空间结构被破坏,活性中心暴露,结构变得疏松易被酶解而释放出更多的活性肽,因此采用仿生酶解提取法后抗血栓活性的增强可能是活性肽的含量升高所导致。

3.3 酒制对水蛭抗血栓活性的影响 蛋白具有热变性的属性,在高温下易变性而致某些理化性质、生物活性改变。酒制烘干时的温度和黄酒中的乙醇共同导致了部分蛋白质变性,但综合两者所达到的变性程度仍不及烫制所达到的高温。因此,水提取法所得到的抗血栓活性较未炮制的水蛭有所减弱,但其活性明显高于烫制品。而采用仿生提取法的酒制品抗血栓效果大幅提升,一方面与蛋白质变性,提取得到的活性肽增多有关,另一方面,传统炮制理论认为酒制可引药上行、增强药物活血功效,如经酒制后的大黄、丹参等药物活血作用增强^[16]。水蛭经酒制后可矫味矫臭、引药上行^[17],还能加强破血逐瘀之功效,推测对头面部的血栓可能会有更好的溶栓效果。

3.4 基于溶栓特异性的抗血栓作用 水蛭在临床应用上可能会较少的引发出血现象,所以有必要深入探究其对纤维蛋白专一性,同时也有望揭示其发挥溶栓作用的真正药效成分。此外,现存的水蛭以及动物类药材的加工炮制工艺仍缺少确定的参数,还需以抗凝溶栓效果及蛋白多肽的变化为主要指

标,建立更完善的水蛭高温炮制过程的标准化质量控制体系。

综上所述,采用水提取法和仿生提取法研究炮制对水蛭体外抗血栓活性的影响结果几乎完全相反。水提取法显示,水蛭经炮制后在纤维蛋白平板上产生的透明圈及体外血栓溶解率均变小,而采用仿生提取法时,产生的透明圈及血栓溶解率均变大。仿生提取法模拟了胃肠道的吸收过程,其结果比传统的水提法更具有可信度。此外,炮制可使水蛭质地更加酥脆易于打粉,同时还能够矫味矫臭、增效减毒。因此,采用烫制法或者酒制法对水蛭进行炮制在临床应用上具有一定的科学性。

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,2015:83-84.
- [2] 祝之友. 水蛭的炮制方法与临床应用[J]. 中国中医药现代远程教育,2017,15(8):131.
- [3] 王厚伟. 低温炮制工艺对水蛭水溶性蛋白组成及纤溶活性的影响[J]. 中药材,2007,30(3):272-275.
- [4] 尹娜. 宽体金钱蛭提取物初步分离纯化及其抗氧化活性研究[D]. 曲阜:曲阜师范大学,2014.
- [5] 张永太. 水蛭炮制前后质量比较[J]. 中国中药杂志,2008,33(7):766-768.
- [6] 陈新,崔健,关鹏,等. 黄芪仿生化提取法与水提取法的比较研究[J]. 吉林中医药,2009,29(12):1085,1106.

- [7] 陈新,严琼晓,张秀娥. 人参仿生化提取物与水提取物安全性对比研究[J]. 长春中医药大学学报,2013,29(3):393-394.
- [8] 单宇,张伽妹,丁月珠,等. 水提取法和仿生提取法研究水蛭不同炮制品的体外抗凝活性[J]. 中国中药杂志,2016,41(10):1843-1848.
- [9] 孙雪,袁瑞娟,赵智健,等. 蚂蟥酶解工艺研究[J]. 中草药,2014,45(17):2482-2486.
- [10] 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,2001,22(5):229-231.
- [11] 康小宁. 低频超声联合尿激酶体外溶栓效果观察[J]. 医学理论与实践,2013,26(6):711-712.
- [12] 李映新,李肖肖,黄媛恒,等. 光裸方格星虫纤溶酶 SNFE 体外溶栓作用及安全性初评[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(11):1789-1792,1844.
- [13] 刘君,张丽艳. 宽体金钱蛭新鲜药材抗凝血有效成分分析[J]. 中国药物经济学,2017,12(6):22-24.
- [14] 付樱,何娟,卢露. 丹红注射液对实验动物抗凝抑栓作用的研究[J]. 世界中医药,2007,2(6):367-369.
- [15] 沙建慧,杨中万,夏文春. 水蛭注射液对小鼠血栓形成及血浆纤溶酶原激活物及抑制物的影响[J]. 中成药,2002,24(3):198-199.
- [16] 王云霞. 骨伤科大黄炮制的功效影响因素分析[J]. 中医临床研究,2012,4(22):26-27.
- [17] 陈干先. 不同炮制工艺对水蛭药效成分含量的影响[J]. 中国医药导报,2008,5(5):31-32.

(2019-01-20 收稿 责任编辑:杨觉雄)

声 明

1. 作者唐义爽,毛羽丰,赵瑜,等,文章题目“表皮生长因子影响舌苔形成的机制研究进展”,英文题目“Potential Role of EGF and EGF-R in Tongue Coating Formation”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2016 年第 2 卷第 4 期 62-69 页。

2. 作者张宝月,郑一夫,庞晓丛,等,文章题目“中药抗肿瘤作用的物质基础与网络机制研究”,英文题目“Network Pharmacology-based Study of the Active Constituents of Chinese Medicinal Formulae for Antitumor Mechanism”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2018 年第 4 卷第 2 期 43-53 页。

3. 作者彭小燕,马金驹,程晓东,等,文章题目“神经系统自身免疫病中西医结合疗法 Meta 分析”,英文题目“Clinical Study with Randomized Control on the Therapy of Integrated Chinese and Western Medicine in Treating Neurological Autoimmune Diseases: A Meta-Analysis”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2018 年第 4 卷第 3 期 85-95 页。

4. 作者林伟明,王子晨,吴文敬,等,文章题目“细胞学方法评价南美草药阿萨伊的寒热药性”,英文题目“Evaluation on Hot/Cold Drug Property of A? ai (Euterpe oleracea Mart.) by Cytological Study Methods”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2018 年第 4 卷第 3 期 112-120 页。

5. 作者刘欣,赵京霞,王燕,等,文章题目“紫草素对银屑病 T 淋

巴细胞增殖、活化的影响”,英文题目“Effects of Shikonin on the Proliferation and Activation of T Lymphocytes”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2018 年第 4 卷第 3 期 121-126 页。

6. 作者白晶,高永红,高颖,等,文章题目“培元通脑胶囊对 CI 大鼠工作记忆及海马内谷氨酸及其受体表达的影响”,英文题目“Effects of Peiyuan Tongnao Capsule on Working Memory and the Expression of Glutamic Acid and Receptor in Hippocampal Area in Rats with Cerebral Ischemia”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2019 年第 5 卷第 1 期 36-41 页。

7. 作者赵丹丹,白颖,吴瑞,等,文章题目“人参皂苷 Rb1 对肥胖小鼠骨骼肌胰岛素抵抗及 AMPK 信号通路的影响”,英文题目“Effects of Ginsenoside Rb1 on Skeletal Muscle Insulin Resistance and Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase Signaling Pathway in Obese Mice”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2019 年第 5 卷第 1 期 42-49 页。

8. 作者张涛,刘改霞,李耀辉,等,文章题目“清肺化痰法治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期疗效的系统评价和 Meta 分析”,英文题目“Effects of the Clearing the Lung and Dissipating Phlegm Method in the Treatment of Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis”,文章首次见刊于 World Journal of Traditional Chinese Medicine,2019 年第 5 卷第 1 期 61-69 页。