

宽体金线蛭研究进展

郑利^{1,2}, 覃川杰^{1,2*}

(1. 内江师范学院生命科学学院, 四川内江 641100; 2. 内江师范学院, 长江上游鱼类资源保护与利用四川省重点实验室, 四川内江 641100)

摘要 宽体金线蛭是一味中药材, 具有活血化瘀、抗血栓、抗肿瘤及抗早孕等重要作用, 其唾液腺中存在着能减缓血液凝固、抑制血栓形成的水蛭素。目前, 宽体金线蛭体内的活性成分治疗心血管疾病重要药物之一, 因此宽体金线蛭在药业市场的需求量大。近十几年来, 宽体金线蛭养殖技术和水蛭素药用价值深受研究者关注。主要归纳和总结了宽体金线蛭的生物学特性、养殖技术、水蛭素的提取方法、药理作用等方面的研究进展, 以期对宽体金线蛭的养殖和开发提供参考。

关键词 宽体金线蛭; 生物学特性; 养殖技术; 分离纯化; 活性测定; 药理作用

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)20-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.20.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Research Progress of *Whitmania pigra*

ZHENG Li^{1,2}, QIN Chuan-jie^{1,2} (1. College of Life Science, Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641100; 2. Key Laboratory of Sichuan Province for Fishes Conservation and Utilization in the Upper Reaches of the Yangtze River, Neijiang Normal University, Neijiang, Sichuan 641100)

Abstract *Whitmania pigra* is a kind of traditional Chinese medicine. It has the functions of promoting blood circulation, removing blood stasis, antithrombotic, antitumor and anti early pregnancy. Hirudin, in salivary gland of *W. pigra*, relieve blood coagulation and inhibit thrombosis. At present, hirudin of *W. pigra* is an important drug for the treatment of cardiovascular diseases. So *W. pigra* has a large demand in the pharmaceutical market. In recent ten years, the cultivation technology of *W. pigra* and the medicinal value of hirudin have attracted much attention of researchers. In this paper, the biological characteristics, cultivation technique, the extraction method and pharmacological action of hirudin were summarized, in order to provide reference for the farming and development of *W. pigra*.

Key words *Whitmania pigra*; Biological characteristics; Cultivation technique; Separation and purification; Activity determination; Pharmacological action

宽体金线蛭(*Whitmania pigra*)隶属于环节动物门、蛭纲、无吻蛭目、黄蛭科、金线蛭属^[1], 其分布范围广^[2]、个体大、适应能力强, 可用于治疗血滞经闭、瘀血和跌打损伤等症状^[3]。随着生物技术的蓬勃发展, 宽体金线蛭的药用价值陆续被挖掘利用。从宽体金线蛭头部和口部提取的水蛭素, 不仅有活血化瘀的作用, 还具有抗癌、抗细胞凋亡和抗早孕等作用, 且为目前治疗心脑血管疾病的重要药物之一。随着社会老龄化问题不断加重, 心脑血管疾病患者不断增加, 对水蛭素等抗凝药物的需求量越来越大。然而化肥和农药的大量使用, 使自然环境逐年恶化, 加上人工过度捕捞, 野生宽体金线蛭资源严重不足, 这使宽体金线蛭不能满足市场需求。为此, 对其进行大规模引种养殖是解决这一问题的有效途径。此外, 水蛭素的纯化程度和活性强弱是影响药物效果的重要因素。欲获得高纯度、抗凝血作用强的水蛭素, 则需要采用恰当的分纯化化和活性测定法, 才能有效提高水蛭素的提取率、纯度和抗凝作用。笔者主要从宽体金线蛭的生物学特性、养殖技术、水蛭素的分离纯化、活性检测以及药理作用方面进行综述, 以期对宽体金线蛭的养殖和开发提供参考资料。

1 宽体金线蛭的生物学特性

1.1 形态学特征 宽体金线蛭个体较大, 其体型为纺锤且扁平型, 体长 7~13 cm, 宽 1.3~2.0 cm, 体重 10~30 g; 蛭体有 2 个吸盘分别位于其前后的尖端处; 宽体金线蛭的前吸盘与后

吸盘不断交替吸附物体可使蛭体运动, 其主要的运动方式为游泳式、尺蠖式和蠕动式^[4]。宽体金线蛭的口腔内生长着比较发达的颚, 颚表面有 2 列用来撕破宿主皮肤的齿板^[5]。宽体金线蛭体表的颜色会因环境不同而稍有区别, 大多数蛭体背部由暗绿和黄黑相间的纵线条纹组成, 且位于中间的条纹颜色较深; 蛭体腹面呈淡黄色且混杂着许多不规则的暗绿色斑点; 处于生殖季节的宽体金线蛭体表有较明显的生殖环带, 但非生殖季节的蛭体表面环带不是很明显^[6]。

1.2 生活习性 自然环境里的宽体金线蛭一般喜欢生活在较温暖的沿岸浅水区, 环境安静隐蔽、水流缓慢、有较多的水生植物和水生软体动物, 便于宽体金线蛭吸附物体活动和摄取食物, 沿岸处要有湿润疏松和腐殖质丰富的土壤, 便于宽体金线蛭产卵孵化^[7]。在人工养殖过程中, 用于宽体金线蛭产卵孵化的土壤需要保持一定的湿度, 其土壤基质的湿度一般以 60% 为宜^[8-9], 便于宽体金线蛭的种蛭钻入土壤层中产卵。吴雷明等^[10]研究发现蘑菇菌渣与土壤混合组比单独的蘑菇菌渣组和土壤组幼蛭孵化率高。童水明等^[11-12]研究认为宽体金线蛭偏好于稻草基质上产卵, 膨胀蛭石可作为其蛭卵的孵化保温基质利于孵化。郭坤等^[13]研究认为将稻草和土壤按 1:1 混合后适合作为宽体金线蛭的越冬基质。

宽体金线蛭是一种变温动物。温度的变化对宽体金线蛭影响较大^[4]。自然水温在 10 ℃ 以下时会使宽体金线蛭陆续进入冬眠状态; 13 ℃ 的水温会使宽体金线蛭陆续出土摄食^[14]; 25 ℃ 是宽体金线蛭幼蛭生长速率最快、存活率最佳的养殖水温^[15]。水温在 30 ℃ 以上时宽体金线蛭会出现急躁、

基金项目 国家级大学生创新训练项目(x201622)。

作者简介 郑利(1997—), 女, 四川遂宁人, 从事水产养殖研究。* 通信作者, 副教授, 博士, 从事水生动物营养和免疫及病害防治的研究与应用工作。

收稿日期 2020-04-09

疯狂游动,水温超过 35 ℃ 或低于 4 ℃ 时出现大量死亡^[16]。宽体金线蛭主要生活于淡水中,其对水体中的含盐量要求不高,一般不应超过 0.1%^[4]。宽体金线蛭适合生活在 pH 为 6.5~8.0 的水体中^[16]。宽体金线蛭主要依靠体表进行有氧呼吸,它对水体溶解氧的量要求不高,在适宜温度条件下,宽体金线蛭能在水体溶解氧为 1 mg/L 以上生长良好^[7]。

自然水域中的螺蛳类、蛙类和蚬等软体动物是宽体金线蛭的天然饵料^[8-9]。在人工养殖条件下,动物的内脏、配合饲料和杂鱼类等可作为宽体金线蛭的饵料^[17]。宽体金线蛭幼蛭生长过程中,使用高质量的饵料对其健康生长极为重要。蔡银碧等^[18]研究发现与鸭血和非牛蛭配合饲料相比,螺类更适合作为宽体金线蛭饵料。吴雷明等^[19]研究认为与蚯蚓相比,漂螺适合作为幼蛭的饵料,但应该用蚯蚓搭配使用,以提高幼蛭免疫力。王建国等^[20]研究认为幼蛭对螺蛳饵料的个体大小具有选择性,一般投喂体积小的螺蛳且早期投喂量为幼蛭体质量的 11 倍以上,才能满足幼蛭生长的营养需要。童水明等^[21]研究发现更适合作为宽体金线蛭幼蛭生长的饵料是福寿螺,而非田螺。王亚等^[22]研究认为与田螺相比,以椎实螺作为宽体金线蛭苗饵料能显著促进其生长,提高幼苗存活率。林小清等^[23]研究发现最佳宽体金线蛭仔蛭生长的饵料是由原生动动物与螺蛳混合所制。王宣朋等^[24]研究发现以轮虫和圆田螺作为饵料的仔蛭生长率最快、存活率最佳,这与马春庆等^[15]的研究结果基本一致。由此可见,投喂原生动动物与田螺混合而成的饵料,有利于宽体金线蛭仔蛭生长。

1.3 繁殖习性 宽体金线蛭属于雌雄同体、异体交配环节动物。在水温为 14 ℃ 时,达到性成熟的宽体金线蛭会在安静的清晨,就近岸疏松土层中进行交配^[4]。宽体金线蛭交配受精后,需经历 30 d 的怀孕期,才开始产卵^[25]。刚产下的卵茧经 28 d 自然孵化,可孵出幼蛭,每个卵茧可孵化出 16~35 条幼蛭^[26]。

2 宽体金线蛭养殖技术

2.1 养殖模式

2.1.1 池塘养殖。用于养殖宽体金线蛭的池塘分为土泥池和水泥池 2 种。渗透性好的土池,可用水泥修建成水泥池塘;而对于渗透性差的地方,可根据当地实际情况开挖养殖池塘。养殖宽体金线蛭的池塘面积为 300~400 m²,水深为 0.8~1.0 m;池壁周边应修建高出池塘水位 0.1~0.2 m 的平台,其宽为 0.5~1.0 m;保持平台土壤的湿润疏松和丰富腐殖质是宽体金线蛭打洞产卵的必要条件^[27]。在池底部可放置些小瓦片、碎石块和种植一些水草等;水面放些浮性水生植物,以供宽体金线蛭栖息^[28]。熊良伟等^[29]研究表明用池塘养殖宽体金线蛭,可收入纯利润 28.5 万元/hm²,获得了较高的养殖效果。

2.1.2 网箱养殖。用 40~50 目尼龙网布缝制成网箱;箱体的四边用 4 根毛竹或其他柱子作为框架;用泡沫浮子撑起箱顶的四角使网箱向内高出水面 0.2 m 左右,以防止宽体金线蛭逃逸;沉子放于箱底部以固定箱体;用铁丝将网箱固定于已经打好的木桩上;网箱底部与池底保持 0.6~0.7 m,使水体交

换流通^[30]。在箱底放瓦片、石块并种植一些绿色水草,供蛭栖息^[31]。养殖过程中的网箱应经常清理,并始终保持网箱内外水体流通^[32]。

2.1.3 生态养殖。水生植物与宽体金线蛭间作是一种生态养殖模式,如莲藕-水蛭-螺蛳、水蛭-田螺-水稻或茭白,具有节约用地、投资少和经济效益高等特点。作为生态养殖池的池埂可高出水面 1 m,水深 0.8 m,宽 3.0 m,而生态养殖池的长度可因养殖规模和地势高低而变化;水生植物的种植面积应占池塘面积的 1/3,以便供宽体金线蛭栖息;在池子边需用网遮挡住进排水口,便于水的排灌以及防止宽体金线蛭逃逸^[33]。李顺等^[34]将水蛭与莲藕混养于 667 m² 的池塘里,获得 500 kg 的水蛭,经济效益显著。

2.2 养殖技术路线 虽然宽体金线蛭的养殖模式诸多,但其养殖的基本技术路线还是大致相似的,其基本养殖路线如图 1 所示。

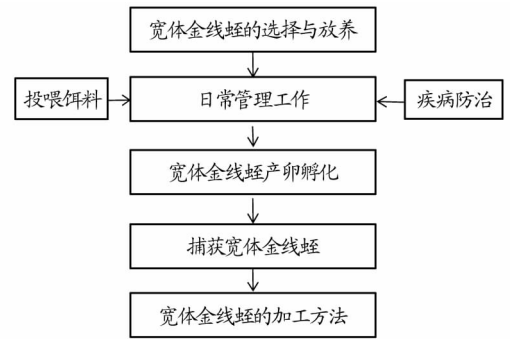


图 1 宽体金线蛭养殖的技术路线

Fig.1 The technical route of *W. pigra* breeding

2.2.1 宽体金线蛭的选择与放养。引种放养的种蛭一般选择 2 龄以上、健康有活力,若用手去触碰它,它会立刻皱缩成一团者为最佳^[35]。体质量为 20~30 g 的宽体金线蛭适合作种蛭^[36]。新购回的种蛭不可直接放到养殖池中,以防止突然的应激而造成种蛭死亡^[37]。种蛭放养前应清除池内杂物并注水 10 mL,再用 15 kg/hm² 的强氯精杀死池中的野生鱼虾及病原微生物;繁殖小球藻作为螺类的食物^[29]。在 4 月中旬,可陆续将亲蛭放入养殖池中,待其入池后应尽量保持水体环境良好,且要有充足的浮游动物和螺蛳类以供宽体金线蛭吸食^[38]。舒斌等^[39]研究发现宽体金线蛭繁殖时最佳放养时段为 30~35 d,可提高产卵率。

2.2.2 日常管理。

2.2.2.1 投喂饵料。人工养殖的宽体金线蛭主要摄食鲜活的螺类,其次是以昆虫幼虫和动物血块作为辅料。在人工养殖过程中,应遵循四定原则,以利于宽体金线蛭正常进食和生长繁殖。宽体金线蛭食用完后应及时将剩余的残渣清理干净,避免污染水质^[38]。

2.2.2.2 防治疾病。若环境突然变化与饲养密度过大,会使生命力顽强的宽体金线蛭增加感染疾病的机率^[37]。因此需保持池水清洁酸碱适中,保持养殖水温在 20~25 ℃;以养殖池水的水质情况作为换水次数的依据,若养殖池水的水质良好,可 15 d 左右换一次水;若养殖池水的水质较差,需根据实

际情况勤换水;换水速度不宜过快,否则过大的水温变化会影响宽体金线蛭的生长^[29]。唐毅等^[40]研究发现养殖宽体金线蛭时可以放心选择的渔药为二氧化氯和聚维酮碘,而应谨慎使用伊维菌素、高锰酸钾和苯扎溴铵等药物。在养殖过程中,每天应做到经常巡塘,观察水蛭活动情况和水体颜色变化状况,避免出现问題后不能及时处理。

2.2.3 宽体金线蛭产卵孵化。亲蛭交配期间需保持安静,避免其受到干扰而不能成功交配。亲蛭在交配受精后,会经历30 d左右的怀孕期,30 d后产下卵茧,卵在茧内自然孵化28 d左右,幼蛭会破茧而出;孵化过程中,保持适当的温度至关重要,当卵茧所处的土壤温度低于15℃时,所能孵出幼蛭的孵化率极低;25℃左右的土壤温度,能孵出幼蛭的孵出率最高;温度若超过35℃,则不能孵出幼蛭^[41]。而孵化时,水位所处的位置是保持孵化温度的关键。在室外孵化时,若天气炎热应向池中注水到产卵时的水位,否则卵会干死;若天气潮湿多雨应使水位降到产卵时的水位,否则卵会烂掉^[4]。邱楚雯等^[8]研究发现若维持孵化箱内土壤的湿度为30%~40%时,能使幼蛭的孵出率最佳。幼蛭生长期,应提供充足的螺类的软体部分、动物的新鲜血块和原生动物等;待每条幼蛭平均体长为0.15 m以上时,转入大池进行养殖^[38]。

2.2.4 捕获宽体金线蛭。每年10月份可捕捉宽体金线蛭,其方法是将动物的血液洒在草把上经晾干后放入水中诱捕宽体金线蛭,一段时间后将扎草把取出抖下宽体金线蛭,捡大放小,多次重复上述动作即可获得成蛭^[42]。

2.2.5 宽体金线蛭加工方法。宽体金线蛭干制品质量的好坏,会影响到售价的高低;干制的水蛭成品一般以自然扁平、易脆易断且富有光泽者为最佳^[37]。宽体金线蛭的加工方法可归纳为以下3种:①将捕捞的宽体金线蛭埋入石灰中约0.5 h,然后将死亡的水蛭晒干,筛出石灰粉即为成品^[25];②用线将捕捞的宽体金线蛭直接悬挂于阳光下暴晒;③用煮好的沸水烫死宽体金线蛭,再将烫死的水蛭捞出洗净晒干^[27]。

3 水蛭素的分离与纯化

水蛭素的传统提取方法是将水蛭品置于水、有机溶剂或水与有机混合的溶剂中进行提取^[43]。李宝红等^[44]采用丙酮、水提醇沉和醇提水沉的方法来提取水蛭素,并将这3种方法的提取效果进行两两比较,结果表明生物活性最强的水蛭提取物是水提醇沉的方法提取的。刘洋等^[45]用丙酮提取水蛭的头部、口部以及蛭体其他位置的水蛭素,以比较3个不同部位的水蛭素活性,结果发现,蛭体口部的水蛭素抗凝血酶活性最佳,头部的水蛭素活性是口部的22%,蛭体其他部位的生物活性几乎为0。通过以上的比较,在生产中用水提醇沉法来提取水蛭干制品口部的水蛭素,可提高提取效率,获得较高的抗凝活性以及提高劳动效率,但为防止浪费,可将蛭体口部以外的其他部位作为中药材入药。Shan等^[46]为了确定水提法和仿生法对宽体金线蛭体内活性成分的影响,分别用仿生法和水提法从悬挂干蛭品、滑石粉油炸蛭品及乙醇浸泡后烘干蛭品中提取抗凝活性物,结果发现,用水

提法从悬挂干蛭品中提取的活性成分抗凝血作用最强,乙醇浸泡后烘干蛭品次之,滑石粉油炸蛭品最弱;用仿生法从乙醇浸泡后烘干蛭品中提取的活性成分抗凝作用强,滑石粉油炸蛭品次之,悬挂干蛭品最弱。由此可见,对于不同的蛭品应考虑合适的提取方法。水蛭材料的不同也会影响提取效果,从活的水蛭中分离提取的水蛭素具有活性较强、纯度较高、还可以反复提取利用的优点,但从活体蛭体中分离水蛭素的操作难度大,因此在操作时,应避免伤害到蛭体,而影响下次提取;从干制品中分离提取水蛭素时,操作较简便,但水蛭素的纯度和活性不是很高^[47]。李濯冰等^[48]用传统提取方法与酶解提取法对水蛭素进行提取,并将所提取的水蛭素进行活性效果比较,结果发现酶解提取法优于传统提取法。酶解提取法虽然比传统提取法效果较佳,但成本相对较高。

使用科学合理的纯化技术是水蛭素活性物质有效利用的前提,离子交换和凝胶过滤层析法是目前主要的纯化方法。段超等^[49]先采用仿生法对鲜活水蛭进行诱导,再用超滤膜透析法对诱导获得的蛭体唾液进行分离,可得到纯度为92%的水蛭素。陈曦等^[50]通过先后使用阴离子交换层析和凝胶过滤层析的方法,能从35 g的水蛭粗品中得到5 g较纯的天然水蛭素,其总活力为2 250 IU。

4 水蛭素活性测定

目前测定水蛭素活性的方法主要有凝血酶滴定改进法、发色底物吸光值变化率法、纤维蛋白平板法及光散射法^[51]。不同的水蛭素活性测定方法有优点也有缺点,在选择水蛭素活性测定方法时可根据已有的条件,选择合适的测定方法。陈华友等^[52]通过配制不同倍数的凝血酶溶液来缩小所测水蛭素的活性范围,此方法简便又省时,且重复性和准确度好。赵荣乐^[53]采用发色底物吸光值变化法测定水蛭素的活性,此方法灵敏度和准确度都较高,但需配备昂贵的仪器。班建东等^[54]采用纤维蛋白原平板的方法来测定水蛭素的活性,此方法成本低、操作简单、准确度好,但比较耗时。周靓等^[55]在已绘制好的标准曲线上寻找最高斜率处的水蛭素光散射强度每分钟变化值的对应值,此方法操作简单、成本低、准确性好,还可以较好地观察到反应的动力学过程。

5 水蛭素的药理作用

5.1 抗凝、抗血栓 目前水蛭素的抗凝作用最佳^[56]。水蛭素可与凝血酶结合形成稳定的复合物,从而起到一定的抗凝血效果^[57]。目前已有许多研究表明具有生物活性的水蛭素有一定的抗凝血、抗血栓形成的效果。Liu等^[58]在宽体金线蛭的体内发现一种名为WP-30的新肽,它能选择性地抑制血栓诱导的抗血小板的体外聚集,并有效减少鼠体内血栓的形成。Yao等^[59]建立大鼠深静脉血栓形成模型并用宽体金线蛭提取物(34.7、104.2、312.5 mg/kg)、肝素(200 U/kg)和氯吡格雷(25 mg/kg)作用于大鼠深静脉血栓形成过程,发现宽体金线蛭的提取物对减少血栓量有重要意义,能显著增加SIRT1的蛋白质表达,还能减少静脉壁和血栓处白细胞的聚集,减少血清中白细胞介素、肿瘤坏死因子- α 及Ace-p65和p-p65蛋白质的表达,此外还确认宽体金线蛭的提取物具有

抗血栓作用。李树凯等^[60]研究发现水蛭治深浅静脉炎的有效率为91.6%,脑血栓形成的有效率为88.7%,表明水蛭用于深浅部静脉炎和脑血栓的治疗效果较好。马进理等^[61]使用水蛭精致颗粒通过治疗微小血管吻合术后所建立的家兔模型的药物,试验后得出水蛭精致颗粒能有效阻碍吻合口血栓的形成,且还能有效减少血管发生病变的概率。有研究发现,水蛭胶囊能够抑制血小板的汇集和微血栓的形成^[62]。胡哲等^[63]用水蛭素、生理盐水、肝素随机作用于微血管损伤后吻合的大鼠模型,一段时间后对血栓形成的情况进行两两比较,结果发现,水蛭素能够有效降低大鼠模型局部血栓的形成率,提高血液流通率。

5.2 抗癌、抗肿瘤 水蛭素可对肿瘤细胞进行有效诱导,促进其程序性死亡,从而阻碍了荷瘤小鼠肿瘤细胞的增殖^[64]。王杰等^[65]将复方水蛭素作用于大白鼠胃癌细胞,研究发现复方水蛭素能显著提高大白鼠抑制肿瘤靶细胞所参与的活动。黄晓丽等^[66]使用具有分子质量小和高度抗凝血的水蛭素与抗癌药物联合作用于癌细胞时,水蛭素能快速渗入肿瘤细胞,并联合抗癌药物直接参与干扰肿瘤基因复制的活动,能有效地阻碍肿瘤细胞的增殖和转移。张博等^[67]研究表明水蛭素能阻碍肿瘤细胞的移植。田雪飞等^[68]研究发现水蛭提取物能够阻碍肝癌 HepG2 细胞 DNTMS 的有效表达。水蛭素对癌细胞和肿瘤细胞有一定的抑制作用。

5.3 抗细胞程序性死亡、保护眼 近几年来,已有不少研究者发现水蛭素可以用于治疗眼科疾病,并对细胞有保护作用。吕莉等^[69]采用剂量不同的水蛭素用于试验右部大脑中动脉阻塞的大鼠模型,结果表明水蛭素剂量越多,对抵抗脑缺血的能力就越强,对抑制神经元细胞程序性死亡的能力越强。任现志等^[70]通过研究水蛭素是否对鼠肾上球系膜细胞自然凋亡有阻碍作用,发现水蛭提取物可以保护肺缺血再灌注所引起的损伤。水蛭素对眼的病变有一定的治疗效果,其具有抑制眼球玻璃体视网膜的增生,且对视网膜组织有一定的保护作用^[71]。黄秀榕等^[72]研究发现具有活性的水蛭素能显著抑制眼球体晶状体上皮细胞的程序性死亡。

5.4 减轻脑出血、保护脑 有研究证实,水蛭提取物能明显减轻脑水肿及脑出血能力,还可以改善血液微循环的状况。娄季宇等^[73]研究发现水蛭素能够较好地阻碍凝血酶的作用,从而减轻脑水肿。刘应柯等^[74]采用水蛭粉末与水煎液来处理高龄自发性高血压大鼠,结果发现,水蛭粉与水煎液均可以明显降血压、降血脂以及改善血液的流动情况,能有效保护缺血脑细胞。周端球^[75]研究发现水蛭粉末可以明显缓解缺血性脑患者的血液流动变化情况,还能有效降低血脂。李克明等^[76]探究水蛭微粉是否对所建立的大脑动脉脑缺血再灌注模型有一定的影响,在此试验探究中,发现水蛭微粉可以通过阻碍炎症因子的生成,从而缓解炎症反应,改善局部血液微循环状况,对缺血性脑细胞具有一定的保护能力。

5.5 抑制皮肤性瘢痕增生 水蛭素提取物能阻碍瘢痕纤维细胞的增殖分化,从而使胶原沉积率减少^[77]。农晓琳等^[78]研究发现水蛭素可以有效增加体外培养的皮肤瘢痕成纤维

细胞的程序性死亡。李开通等^[79]通过水蛭提取物对体外培养所形成的瘢痕纤维细胞进行处理,结果表明水蛭提取物对增生性瘢痕有明显的抑制作用。郭睿等^[80]通过观察水蛭提取物作用于皮肤增生性瘢痕纤维细胞 TGF β 1 和 bFGF,发现水蛭素对 bFGF 的信使 RNA、TGF β 1 mRNA 和蛋白质水平的表达有一定的影响。

5.6 其他作用 陆媚等^[81]通过添加浓度不同的水蛭提取物作用于猪精液,结果表明,在 4 °C 低温保存的条件下,一定浓度的水蛭素可在一段时间内维持猪精子的存活率和动力,还能降低精子的畸形率,并且水蛭素浓度越高,对猪精液的保存效果越好。杨尚雪等^[82]用浓度不同的水蛭素对美系公猪精液进行处理,研究发现适宜浓度的水蛭提取物可以显著提高猪精液冷冻后的质量,其效果最佳的水蛭素浓度为 0.08%。水蛭素能对猪精液产生保护作用的原因可能是水蛭提取物能上调 *Bcl-2* 基因的表达和下调 *Bax* 基因的表达,可阻碍精细胞的程序性死亡^[72]。水蛭素对骨骼愈合相关基因的表达有一定的影响效果^[83],李嘉等^[84]用水蛭提取物辅助治疗 Colles 骨折,其治疗优良率比对照组高 27.64%,水蛭素虽不能够加快骨折的愈合,却能够对骨折所引起的局部肿胀有消肿作用,并对关节活动功能的恢复有促进作用。杨健等^[85]通过对蛭体进行水煎剂和有机溶剂沉淀分离,将分离获得的蛋白成分用于小鼠的抗早孕试验,在小鼠抗早孕试验中发现,水蛭素对小鼠具有抗早孕效果。水蛭提取物可较好地减轻患有糖尿病大鼠的肾脏病变状况^[86]。此外,水蛭提取物对高血脂症^[87]、慢性肾脏病^[88]和高血压^[89]等具有一定的治疗作用。

6 展望

宽体金线蛭作为一种传统的活血化瘀药材被广泛运用于临床,且其药用效果好,是治疗多种疾病的药物,但水蛭素的药理作用机制尚没有了解透彻,临床适宜剂量尚无明确规定及有无拮抗性药物等一系列问题还有待进一步研究。宽体金线蛭的养殖技术是解决其在市场供应量的关键,其规模化、集约化养殖还是目前难以攻克的问题,在养殖过程中亲蛭的繁殖技术是亟待解决的问题,目前已出现无土繁殖技术,但其产茧率、孵化率并不乐观,还有待改进^[90]。其次有待解决的是宽体金线蛭的疾病防治以及优化人工配合饲料问题。宽体金线蛭活性成分的分离纯化法和水蛭素的药用价值还需要更全面深入的研究,以提高抗凝作用和挖掘水蛭素潜在的更多价值。进一步探究水蛭素的具体作用机制及药物动力学,使水蛭素的药理作用更好地用于临床,发挥更好的治疗效果,以便更好地为人类健康服务。

参考文献

- [1] 高明,侯建华,刘玉芝,等.温度对宽体金线蛭生长的影响[J].安徽农业科学,2009,37(22):10547-10548.
- [2] 高明,侯建华,李双安.水蛭人工养殖技术研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2013(5):17-19.
- [3] 杨洪雁,杜智恒,白秀娟.水蛭药理作用的研究进展[J].东北农业大学学报,2012,43(3):128-133.
- [4] 王安纲,王祖效.宽体金线蛭的调查及生物学特性的观察[J].水利渔业,2005(5):40-41,82.
- [5] 乔宁,白义,王贵虎,等.三种金线蛭的形态比较研究[J].四川动物,2013,32(4):526-529.

- [6] 高明,刘玉芝,李双安.宽体金线蛭的生物学特性及养殖技术[J].宁夏农林科技,2012,53(7):54-55.
- [7] 杨成胜.宽体金线蛭的生物学特性及其人工繁殖技术[J].渔业致富指南,2005(24):47-48.
- [8] 邱楚雯,王韩信,刘晓东.等.宽体金线蛭人工繁殖技术初步研究[J].水产科技情报,2015,42(5):225-228.
- [9] 郭坤,罗鸣钟,苏应兵,等.土壤湿度及稻草基质对宽体金线蛭繁殖性能的影响[J].南方农业学报,2017,48(10):1918-1922.
- [10] 吴雷明,王守红,张家宏,等.不同孵化基质和开口饵料对宽体金线蛭生长发育的影响[J].水产科学,2019,38(2):260-265.
- [11] 童水明,徐毛喜,颜冬,等.宽体金线蛭对稻草基质产卵适应性的研究[J].水产科技情报,2015,42(5):258-261.
- [12] 童水明,徐毛喜,颜冬,等.膨脹蛭石对宽体金线蛭卵孵化的影响[J].水产科技情报,2016,43(3):143-146.
- [13] 郭坤,罗鸣钟,杨代勤,等.不同基质对两种规格宽体金线蛭越冬的影响[J].淡水渔业,2019,49(4):98-101.
- [14] 安瑞永,刘书广,李会军.宽体金线蛭的生活习性与养殖注意事项[J].河北渔业,1999(6):29,27.
- [15] 马春庆,杨代勤.温度和饵料对宽体金线蛭仔蛭生长和存活的影响[J].长江大学学报(自科版),2018,15(10):21-23,27.
- [16] 郭坤,罗鸣钟,阮国良,等.宽体金线蛭幼苗对水温、盐度和pH的耐受性试验[J].科学养鱼,2019(7):71-72.
- [17] 李东方,李艳春,郑远洋.水蛭的生物学特性及养殖技术[J].黑龙江水产,2008(4):6-7.
- [18] 蔡碧碧,张孟,梁月,等.人工养殖宽体金线蛭食性偏好初探[J].水产科技情报,2018,45(6):308-310.
- [19] 吴雷明,韩光明,寇祥明,等.3种生物饵料对宽体金线蛭幼蛭生长性能、消化酶活性及免疫力的影响[J].动物营养学报,2019,31(7):3383-3390.
- [20] 王建国,熊良伟,陶桂庆,等.不同体质量宽体金线蛭对饵料螺的摄食规律及生长特性[J].江苏农业科学,2018,46(18):168-171.
- [21] 童水明,徐毛喜,颜冬,等.宽体金线蛭幼苗培养技术试验[J].湖北农业科学,2017,56(2):299-300,305.
- [22] 王亚,牟长军,刘士旗,等.饵料、温度对宽体金线蛭生长的影响[J].水产养殖,2019,40(7):31-34.
- [23] 林小清,徐海圣,沈乃峰,等.不同饵料对宽体金线蛭生长的影响[J].浙江农业科学,2014(9):1447-1449.
- [24] 王宣朋,王宣忠,王信海,等.不同温度、饵料对宽体金线蛭仔蛭生长和存活的影响[J].福建水产,2014,36(3):241-246.
- [25] 孙连周,扈志辉,陈会师.水蛭的生物学特性和养殖技术[J].河南水利,2005(4):26.
- [26] 马燕,游华建,李晋,等.宽体金线蛭生殖系统形态结构与胚胎发育[J].西南大学学报(自然科学版),2017,39(7):64-71.
- [27] 叶保华.宽体金线蛭养殖技术[J].水产养殖,2001(5):16-18.
- [28] 王致祥,王艳芳,王猛,等.宽体金线蛭生物学与养殖技术[J].齐鲁渔业,1999,16(3):17-19.
- [29] 熊良伟,王建国,陶桂庆,等.宽体金线蛭池塘养殖试验[J].水产科技情报,2015,42(5):232-233,238.
- [30] 王兴礼.池塘设置网箱养殖宽体金线蛭技术[J].中国水产,2015(1):59-60.
- [31] 沈勤.池塘大网箱养殖宽体金线蛭技术[J].河北渔业,2016(1):40-41.
- [32] 陆健,王绍绵,肖飞,等.宽体金线蛭池塘网箱养殖技术[J].水产养殖,2018,39(2):31-33.
- [33] 王树林.水蛭养殖与水生植物间作[J].科学养鱼,2000(8):15.
- [34] 李顺,魏星,张艳春.水蛭-藕混养技术[J].渔业致富指南,2005(17):35-36.
- [35] 曾颖婷.宽体金线蛭的人工繁殖技术[J].水产养殖,2008(6):39-40.
- [36] 丁辰龙,王宣朋,王信海,等.宽体金线蛭4个繁殖性状指标的相关性分析[J].福建水产,2012,34(6):488-492.
- [37] 廖燕平.水蛭的人工养殖[J].内陆水产,2002(1):26-27.
- [38] 王声瑜.宽体金线蛭的人工养殖[J].特种经济动植物,1999(6):18.
- [39] 舒斌,董扬帆,郝晨光,等.放养时间段对宽体金线蛭产茧率的影响[J].河北渔业,2019(8):32-33,55.
- [40] 唐毅,吴荣华,袁渊,等.六种常用渔药对宽体金线蛭的急性毒性试验[J].淡水渔业,2019,49(3):78-82.
- [41] 史红专,刘飞,郭巧生.温度和体重对蚂蝗人工繁殖影响的研究[J].中国中药杂志,2006,31(24):2030-2032.
- [42] 黄权,张东鸣,赵静,等.宽体金线蛭(*W.pigra*)养殖技术[J].经济动物学报,2000,4(4):36-38.
- [43] 杨秀娟,邓斌,曹志勇,等.水蛭活性成分提取分离纯化方法的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2017(13):66-68,77.
- [44] 李宝红,邓妙丽,程怡,等.宽体金线蛭不同工艺提取物抗凝血活性的比较[J].中国医药导报,2012,9(12):140-141.
- [45] 刘洋,崔红.水蛭素的分离与纯化[J].牡丹江医学院学报,2004,25(2):35-36.
- [46] SHAN Y,ZHANG J M,DING Y Z, et al. *In vitro* anticoagulant activity of different processed products of *Whitmania pigra* by water extraction and bionic extraction[J].China journal of Chinese materia medica,2016,41(10):1843-1848.
- [47] 杨立新,秦海娜,李晓晖,等.水蛭素的分离纯化与检测方法研究进展[J].水产科学,2005,24(2):37-39.
- [48] 李濯冰,赵韶华,王玉蓉,等.水蛭不同工艺提取物抗凝与纤溶活性比较及酶解物组成分析[J].中成药,2011,33(1):42-45.
- [49] 段超,刘娟.仿生诱导高效提取水蛭素及分离纯化的研究[J].黑龙江医药科学,2008(3):40-41.
- [50] 陈曦,刘光明,胡强,等.天然水蛭素的提取和纯化[J].华东师范大学学报(自然科学版),2004(2):104-106.
- [51] 刘纯古,童张法.水蛭素活性分析方法的研究[J].当代化工,2004,33(4):243-245.
- [52] 陈华友,邢自力,李媛媛,等.凝血酶滴定法测定水蛭素活性的改进[J].生物技术,2002,12(6):24-25.
- [53] 赵荣乐.一种测定凝血酶抑制活性质的新方法[J].喀什师范学院学报,2003,24(6):52-55.
- [54] 班建东,廖共山,黄爱民,等.纤维蛋白原平板法测定水蛭素活性[J].广西医科大学学报,2007,24(6):827-828.
- [55] 周靓,姜葵,郝荣乔,等.光散射法测凝血酶、水蛭素及蚓激酶活性[J].生物物理学报,1997,13(4):531-535.
- [56] MARKWARDT F.The development of hirudin as an antithrombotic drug[J].Thrombosis research,1994,74(1):1-23.
- [57] STRINGER K A,LINDENFELD J.Hirudins: Antithrombin anticoagulants[J].Ann Pharm,1992,26(12):1535-1540.
- [58] LIU X,WANG C H,DING X, et al. A novel selective inhibitor to thrombin-induced platelet aggregation purified from the leech *Whitmania pigra* [J].Biochemical and biophysical research communications,2016,473(1):349-354.
- [59] YAO X L,LIU H,LI P, et al. Aqueous extract of *Whitmania pigra* whitman alleviates thrombus burden via sirtuin1/NF- κ B pathway[J]. Journal of surgical research,2020,245:441-452.
- [60] 李树凯,李奇霞.水蛭治疗深浅部静脉曲张及脑血栓形成[J].中医杂志,1993,34(4):199.
- [61] 马进理,潘浩.水蛭防治微血管吻合术后血栓形成的实验研究[J].浙江中西医结合杂志,1999,9(1):25-26.
- [62] 陈秋月,黄米武,柯绍发,等.水蛭胶囊对颈动脉斑块稳定性及血小板膜糖蛋白分子表达的影响[J].中华中医药杂志,2009,24(12):1643-1645.
- [63] 胡哲,张静,郭鹏年.局部应用水蛭素对大鼠血管吻合模型术后血栓形成的观测[J].卫生职业教育,2014,32(24):84-86.
- [64] 刘京生,苗智慧,董力,等.水蛭抗肿瘤作用的实验研究[J].时珍国医国药,2001,12(10):884-885.
- [65] 王杰,韩俊庆,李伯辉,等.复方水蛭素的药效学研究[J].山东大学学报,2007,45(8):852-854.
- [66] 黄晓丽,蔡捷,苏承武,等.水蛭素联合阿霉素对人卵巢癌细胞株耐药性的实验观察[J].蛇志,2013,25(4):365-366.
- [67] 张博,王敏敏,任青华,等.复方水蛭素对小鼠移植瘤组织中 p53、ki-67 及 VEGF 表达的影响[J].山东医药,2008,48(43):29-30.
- [68] 田雪飞,孙婧,方圆,等.水蛭提取物对肝癌 HepG2 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.
- [69] 吕莉,姜琪.水蛭素对 MCAO 模型大鼠大脑皮质细胞凋亡影响的实验研究[J].中国中医药科技,2009,16(4):291.
- [70] 任现志,蒋淑敏,翟文生,黄芪,水蛭.水蛭素及水蛭黄芪配方含药血清对大鼠肾小球系膜细胞生长周期及凋亡的影响[J].中华中医药杂志,2009,24(5):625-627.
- [71] 郑燕林,王毅,袁晓辉,等.水蛭素对增生性玻璃体视网膜病变影响的组织病理学观察[J].中国中医眼科杂志,2000,10(1):1-3.
- [72] 黄秀榕,祁明信,汪朝阳,等.复方水蛭滴眼液抑制大鼠晶状体上皮细胞凋亡及其对 Bcl-2 和 Bax 基因的调控[J].中西医结合学报,2007,5(6):681-685.
- [73] 姜季宇,杨霄鹏,李建章,等.水蛭素对抗脑出血后脑水肿作用机制的研究[J].河南实用神经疾病杂志,2004,7(1):1-2.
- [74] 刘应柯,程鹏,王文华,等.水蛭粉与煎剂对老龄自发性高血压大鼠血压血脂及血流动力学的影响[J].解放军药科学学报,2003,19(6):441-443.
- [75] 周端球.水蛭粉治疗急性缺血性脑卒中临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7(3):150-151.

3 研究展望

黄花菜在我国有悠久的种植历史,全国栽培范围很广,除了几个大黄花菜的产区有规模化的加工工厂及品牌外,大多数种植区都是农户自己加工出售,产品品质及食品安全不能保证。黄花菜传统加工方式会产生二氧化硫残留,影响黄花菜的品质,损害产业形象。因此,对黄花菜采后加工方式的研究和普及对产业发展具有重要的推动作用。此外,黄花菜食疗功效显著,是不可多得的天然镇定剂、抗衰老佳品,还有一定的抗癌功效。加强对黄花菜药食特性的理论研究对于现代医学研究有重要意义,可为黄花菜的深度开发利用提供重要的理论支持。

参考文献

- [1] 乔德华,白灵军.甘肃黄花菜发展中存在的问题及提质增效对策[J].中国水土保持,2018(4):35-38.
- [2] 李育军,植石灿,黄妙林,等.华南黄花菜的生产研究与发展[J].长江蔬菜,2018(24):29-35.
- [3] 南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2006:1947-1948.
- [4] 傅茂润,茅林春.黄花菜的保健功效及化学成分研究进展[J].食品与发酵工业,2006,32(10):108-112.
- [5] 龚吉军,谭兴和,夏延斌,等.鲜黄花菜小袋包装气调保藏技术[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2003,29(1):57-60.
- [6] 张欣,李坤,马朋,等.黄花菜不同温度贮藏保鲜研究[J].食品与发酵工业,2006,32(4):150-152.
- [7] 范学钧,任考亮,李士豪,等.黄花菜保鲜与干制试验初报[J].西北园艺,2000(6):13-14.
- [8] 杨大伟,张海容.中草药提取液保鲜黄花菜的效果[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2010,28(4):380-382.
- [9] 周凌霄,杨荣华,汪洲国.脱水苦瓜护绿和着色方法的研究和比较[J].科技通报,2001,17(4):68-72.
- [10] 杨大伟,夏延斌.脱水黄花菜加工过程中的非酶促褐变抑制条件[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2003,29(4):345-348.
- [11] 黄中培,申双贵.有机黄花菜速冻工艺研究[J].农产品加工,2008(1):33-35.
- [12] 焦凌梅,袁唯.绿色蔬菜加工中护绿技术的研究及进展[J].保鲜与加工,2004(1):11-14.
- [13] 张清云,李明,安钰,等.不同杀青温度及制干方式对黄花菜营养成分的影响研究[J].宁夏农林科技,2018,59(6):3-4,18.
- [14] 潘年龙,吴凯,王孝荣,等.黄花菜的热泵干燥工艺研究[J].食品工业科技,2013,34(11):259-262,266.
- [15] 张海红,李海峰.脱水蔬菜热泵干燥工艺研究[J].安徽农业科学,2009,37(32):15997-16000.
- [16] 姜启宗,宗文雷,于沛沛,等.大蒜热泵干燥生产工艺的研究[J].安徽农业科学,2010,38(19):10259-10261.
- [17] GOH L J, OTHMAN M Y, MAT S, et al. Review of heat pump systems for drying application[J]. Renewable and sustainable energy reviews, 2011, 15(9):4788-4796.
- [18] 杨富民,张丽,严晓娟.干制黄花菜工业化生产工艺技术[J].农业工程

学报,2008,24(11):264-267.

- [19] 许国宁.黄花菜真空冷冻干燥工艺研究[D].南京:南京农业大学,2011.
- [20] 周纪东,李余动.黄花菜多糖的不同提取方法及其含量测定的研究[J].温州职业技术学院学报,2015,15(1):69-72,88.
- [21] 欧丽兰,余昕,张椿,等.黄花菜多糖的提取工艺及抗肿瘤活性研究[J].四川农业大学学报,2016,34(2):201-205.
- [22] 李毅花.超声协同高压静电场提取黄花菜多糖的机理研究及其结构表征[D].南宁:广西大学,2018.
- [23] 郎娜,罗红霞.黄花菜中黄酮类物质抗氧化性的研究[J].食品研究与开发,2007,28(3):74-77.
- [24] 杨日福,耿琳琳,范晓丹,等.超声协同静电场提取黄花菜中总黄酮的研究[J].声学技术,2017,36(1):32-37.
- [25] BRAVO L. Polyphenols: Chemistry, dietary source, metabolism, and nutritional significance[J]. Nutr Rev, 1998, 56(11):317-333.
- [26] CICHEWICZ R H, NAIR M G. Isolation and characterization of stelladrol, a new antioxidant naphthalene glycoside, and other antioxidant glycosides from edible daylily (*hemerocallis*) flowers[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, 50(1):87-91.
- [27] 周志娥,杜华英,林雨萍,等.超声波辅助提取黄花菜中多酚类物质工艺的优化[J].食品工业科技,2014,35(18):284-287.
- [28] 周向军,高义霞,张继.黄花菜多酚提取工艺及抗氧化作用的研究[J].作物杂志,2012(1):68-72.
- [29] 何纯莲.百合中秋水仙碱的分离应用研究[D].长沙:湖南大学,2003.
- [30] 申利旺,李雅.秋水仙碱的研究与应用进展[J].中国农学通报,2009,25(21):185-187.
- [31] 李谷才.超临界流体萃取百合中的秋水仙碱[D].长沙:中南大学,2004.
- [32] 杨旭辉,朱敏恒,吴越.植物源性天然抗氧化成分研究进展[J].农垦医学,2004,26(4):298-300.
- [33] 潘烁.黄花菜保鲜与保健功能的研究[D].杭州:浙江大学,2006.
- [34] 周启升,刘训理,段祖安.植物多糖的研究与应用进展[J].蚕业科学,2010,36(3):465-469.
- [35] 武永福.黄花菜多糖的提取工艺及含量测定[J].中国食物与营养,2015,21(5):54-57.
- [36] 陈智理,杨昌鹏,韦璐,等.落葵多糖的提取方法及其工艺优化研究[J].农产品加工,2011(8):72-75.
- [37] 何成雄.萱草花提取液及表皮生长因子对人真皮成纤维细胞增殖的作用[J].中华皮肤科杂志,1994,27(4):218-220.
- [38] CICHEWICZ R H, ZHANG Y J, SEERAM N P, et al. Inhibition of human tumor cell proliferation by novel anthraquinones from daylilies[J]. Life science, 2004, 74(14):1791-1799.
- [39] DU B J, TANG X S, LIU F, et al. Antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extracts of *Hemerocallis citrina* and its potential active components[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2014, 14(1):326-329.
- [40] GU L, LIU Y J, WANG Y B, et al. Role for monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of ethanol extracts from *Hemerocallis citrina*[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(3):780-787.
- [41] 翟俊乐,田欢,李孟秋,等.黄花菜抗抑郁作用有效成分的筛选[J].中国食品添加剂,2015(10):93-97.
- [42] 卢兰芳.萱草花镇静作用的实验研究[J].海峡药学,2010,22(5):59-60.
- [43] 王翹楚,庞传宇,施明,等.萱草花治疗失眠症的临床与实验报告[J].上海中医药杂志,1993(8):42-44.

(上接第5页)

- [76] 李克明,张国,武彪.水蛭的药理研究概况[J].中医研究,2007,20(2):62-64.
- [77] 胡哲,张静.水蛭素的应用研究进展[J].包头医学院学报,2014,30(3):152-154.
- [78] 农晓琳,陈洪,李佳荃,等.水蛭素抗皮肤瘢痕的体内外实验研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(12):1638-1643.
- [79] 李开通,刘达恩,陈小婷,等.水蛭素对增生性瘢痕基质金属蛋白酶-2、9表达作用的影响[J].山东医药,2012,52(20):28-29,88.
- [80] 郭睿,农晓琳,邓凌,等.水蛭素对皮肤增生性瘢痕成纤维细胞 bFGF 及 TGF β 表达的影响[J].中国美容医学,2011,20(4):614-617.
- [81] 陆媚,许春荣,刘德玉,等.水蛭素对猪精液低温保存的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2014(17):68-72.
- [82] 杨尚雪,汪彦玲,黄明光,等.水蛭素对猪精液冻后质量的影响[J].中国兽医学报,2015,35(3):489-492.

- [83] 郑军,董福慧,程伟.水蛭对骨愈合相关基因表达影响[J].中国骨伤,2003,16(9):513-515.
- [84] 李嘉,付婷婷,李腾辉,等.水蛭素辅助治疗 Colles 骨折的疗效分析[J].中药材,2011,34(12):1967-1969.
- [85] 杨健,王线,贺云娇.水蛭的抗早孕有效成分研究(D)[J].广东药学院学报,2002,18(1):34-36.
- [86] 仝小林,周水平,李爱国,等.水蛭对糖尿病大鼠肾脏病变的防治作用及机理探讨[J].中国中医药信息杂志,2002,9(6):21-23.
- [87] 李宁,赵霞,张文高.水蛭微粉治疗高脂血症疗效观察[J].中国误诊学杂志,2008,8(4):802-803.
- [88] 刘俊鹤,李洁,杨洪涛.水蛭素治疗肾脏病的研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2016,17(2):165-166.
- [89] 李菊花,马玲丽.水蛭蛭降降压丸对高血压及左心功能影响的临床疗效观察[J].陕西中医,2009,30(10):1302-1303.
- [90] 姜爱兰,王信海,丁辰龙,等.宽体金钱蛭的人工有、无土繁殖技术比较研究[J].水产养殖,2018,39(2):14-16.