

• 药理与临床 •

僵蚕提取液激活凝血因子 XII 介导缺血再灌注大鼠血管新生研究

王珊珊^{1,2}, 徐昊^{1,2}, 梁祺^{1,2}, 杨彤^{1,2}, 李泽康^{2,3}, 侯培媚^{2,4}, 葛金文^{1,2*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学, 中西医结合防治心脑血管疾病湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

4. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 基于接触系统探讨僵蚕提取液激活凝血因子 XII (coagulation factor XII, FXII) 对缺血性卒中大鼠血管新生的干预作用。方法 检测僵蚕提取液干预血浆凝血四项, 体外检测僵蚕提取液对 FXII 及其下游底物激肽释放酶(kallikrein-kinin, KK) 的激活作用。通过大鼠脑缺血再灌注损伤模型, 检测大鼠的脑形态学及 FXII、KK、血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factors, VEGF)、CD31、BrdU⁺/vWF⁺蛋白表达; 通过氧糖剥夺模型, 检测大鼠脑微血管内皮细胞的形态学改变、细胞增殖情况及 VEGF 的表达。采用 LC-MS 鉴定僵蚕提取液药效物质。结果 在体外实验中, 僵蚕提取液延长了人血浆部分凝血酶原时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT) ($P < 0.05$), 激活 FXII 并导致下游底物 KK 的生成, 呈剂量相关性 ($P < 0.05$); 在大鼠脑缺血再灌注模型中, 僵蚕提取液改善了大鼠神经元损伤, 激活了 FXII, 导致 KK 生成和 VEGF、CD31、BrdU⁺/vWF⁺的表达增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 在细胞氧糖剥夺实验中, 僵蚕提取液干预提高了大鼠脑微血管内皮细胞的增殖和 VEGF 的表达 ($P < 0.05$)。LC-MS 鉴定僵蚕提取液含代谢物共计 809 个。结论 僵蚕提取液可改善缺血再灌注大鼠神经功能损伤, 其机制可能与抗凝和促脑微血管内皮细胞增殖有关。

关键词: 缺血性卒中; 僵蚕; 凝血因子 XII; 缓激肽; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)23-7421-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.012

Bombyx Batryticatus extracts activates coagulation factor XII to promote angiogenesis in rats with ischemia/reperfusion

WANG Shan-shan^{1,2}, XU Hao^{1,2}, LIANG Qi^{1,2}, YANG Tong^{1,2}, LI Ze-kang^{2,3}, HOU Pei-mei^{2,4}, GE Jin-wen^{1,2}

1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

4. College of Acupuncture, Massage and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the interventional effect of Jiangcan (*Bombyx Batryticatus*) extracts as an activator of coagulation factor XII (FXII) on angiogenesis of rats with ischemic stroke by contact system. **Methods** The effects of *Bombyx Batryticatus* extract on plasma coagulation were detected, and the activation of FXII and its downstream substrate kallikrein kinase (KK) by *Bombyx Batryticatus* extract was detected *in vitro*. The brain morphology and expressions of FXII, KK, vascular endothelial growth factors (VEGF), CD31, BrdU⁺/vWF⁺ were detected by rats model of cerebral ischemia reperfusion injury; The morphological changes, cell

收稿日期: 2022-08-19

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(2020JJ5424); 湖南省教育厅青年基金资助项目(21B30386); 湖南中医药大学中西医结合“双一流”学科开放基金资助项目(2020ZXYJH08)

作者简介: 王珊珊(1990—), 女, 在读博士, 讲师, 研究方向为中西医结合防治脑血管病、中药药理。E-mail: 68761083@qq.com

*通信作者: 葛金文(1965—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中西医结合防治脑血管病、中药药理。E-mail: 001267@hnuucm.edu.cn

proliferation and VEGF expression of brain microvascular endothelial cells were detected by oxygen glucose deprivation model. The pharmacodynamic substances of *Bombyx Batryticatus* extract were identified by LC-MS. **Results** *In vitro*, *Bombyx Batryticatus* extract prolonged the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT) ($P < 0.05$), activated FXII and promoted the production of downstream substrate KK, with dose-dependent ($P < 0.05$). In the model of cerebral ischemia reperfusion in rats, *Bombyx Batryticatus* extract improved the neuronal damage of rats, activated FXII and increased the production of KK and the expressions of VEGF, CD31, Brdu⁺/vWF⁺ ($P < 0.05, 0.01$); In the cell oxygen and glucose deprivation experiment, *Bombyx Batryticatus* extract increased the proliferation of brain microvascular endothelial cells and expression of VEGF in rats ($P < 0.05$). A total of 809 metabolites in *Bombyx Batryticatus* extract were identified by LC-MS. **Conclusion** *Bombyx Batryticatus* extract can ameliorate the injury of nerve function in rats with ischemia-reperfusion, and its mechanism may be related to anticoagulation and promoting the proliferation of brain microvascular endothelial cells.

Key words: ischemic stroke; *Bombyx Batryticatus*; coagulation factor XII; bradykinin; vascular endothelial growth factor

缺血性脑卒中 (ischemia stroke, IS) 是临床高发、高致残性疾病, 是现今人类死亡率最高的 3 大疾病之一。1990—2017 年所有死因排名中, 卒中排名已上升至第 1 位^[1], 其中, IS 占比 87%^[2], 是血栓性疾病临床防治的难点、热点。目前研究认为 IS 是血栓形成和炎症联合递进反应的结果^[3]。血栓的形成涉及血小板和凝血级联, 其中凝血系统的激活促进了稳定血凝块的生成, 是 IS 发病的关键发病机制, 因此, 目前针对 IS 的防治以抑制凝血因子 (如凝血因子 Xa、凝血酶) 活性的抗凝或促纤溶为主。在凝血级联反应中, 凝血因子 XII (coagulation factor XII, FXII) 的作用非常特殊, 尽管许多研究认为 FXII 的激活与 IS 预后不良有关^[4], 但 IS 死亡率和二次脑梗发生率与血浆 FXII 水平不呈正相关。而 FXII 激活还可引起接触、纤溶、补体等系统的激活, 这些通路与促凝的内源性凝血途径并不同步发生, 提示其多靶点作用可能从多途径调控了 IS 的病理转归。

接触系统是 FXII 通过与负电荷表面接触而发生构象改变, 激活生成 FXIIa, 促进内源性凝血系统激活同时加速血浆激肽释放酶原 (plasma kallikreinogen, PK) 活化生成激肽释放酶 (kallikrein-kinin, KK), 导致高分子激肽原 (high molecular weight kininogen, HK) 裂解, 促进血管活性物质缓激肽 (bradykinin, BK) 的产生^[5-7]。在其他疾病病机研究中, BK 有 2 个对应受体 (BKR1、BKR2), BK 与 BKR2 结合可促进肿瘤组织中血管内皮细胞生长因子的表达, 从而有利于血管新生^[8-9]。但是在 IS 发病中存在类似的生理机制目前并不清楚。

僵蚕是蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染 (或人工接种) 白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体, 具有抗凝血、抗血栓、促纤溶等功效, 能够有效延长动物血

浆部分凝血酶原时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT), 主要抑制了 FII 及 FXa 的活性, 提示了其对于 IS 的干预效应^[10-12]。IS 的防治中溶栓、抗凝均有狭窄的时间窗伴出血并发症风险, 导致临床使用受限。僵蚕经提取后虽具有抗凝效应, 但其在体内实验中并未引起实验动物明显的出血并发症, 其可能的机制目前尚未阐明, 本实验拟针对僵蚕提取液干预 FXII 开展相关研究。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (220±10) g, 4 周龄, 购自斯莱克景达有限公司, 合格证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物于温度 (26±2) °C 环境下饲养, 自由进食饮水。动物实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 LL2019092009)。

1.2 细胞

大鼠脑微血管内皮细胞、HEK-293 细胞 (批号 CM-R108、CL-0001) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药材

实验用僵蚕于 2020 年 3 月购自湖南中医药大学第一附属医院药房, 由湖南中医药大学第一附属医院药剂科邓桂明教授鉴定为蚕蛾科昆虫家蚕 4~5 周龄幼虫感染白僵菌素致死的干燥体。

1.4 药品与试剂

APTT、PT、TT、FIB 试剂盒 (批号 251730、114145、2551325、251560) 购自法国 Stago 公司; FXII 激活剂 Bismuth subgallate (批号 HY-B1560) 购自美国 MedChemExpress 公司; BKR2 抑制剂 Icatibant acetate (批号 S5695) 购自美国 Selleck 生物科技有限公司; FXII 抗体 (批号 DF6558)、KK

抗体(批号 DF7271)购自 Affinity 公司; VEGF 抗体(批号 Ab214424)购自英国 Abcam 公司; CD31 抗体(批号 GB11063-2)、 β -actin(批号 GB15003)、兔二抗(批号 HG-SAR00002b)、鼠二抗(批号 HG-SAM00001b)购自赛维尔生物科技有限公司; 核转试剂盒(批号 V4XC-2024)购自美国 Lonza 公司; CCK8 试剂盒(批号 BS350B)购自 Biosharp 公司。

1.5 仪器

Cytation 3 多功能酶标仪(美国 Biotake 公司); STA Compact Max 全自动血凝仪(法国 Stago 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽、GelDocXR+凝胶成像系统、Mini Trans-Blot 型转印槽、PowerPac™基础电泳仪电源(美国 Bio-Rad 公司); 4D-Nucleofector™ Core Unit 核转仪(美国 Lonza 公司)。

2 方法

2.1 僵蚕提取液制备

称定白僵蚕 100.0 g, 煎煮沸腾 30 min, 煎煮 2 次, 75%乙醇醇沉, 4 °C 过夜; 相对分子质量 5000 透析袋中透析, 得到僵蚕提取液, 高压灭菌后配制成 105 mg/L, 分装, 封口, 于 4 °C 保存。水煎僵蚕浸出物得率为 44.2%, 醇沉后得率 20.9%, 最终僵蚕提取液得率为 15.1%, 符合《中国药典》僵蚕浸出物标准。

2.2 血浆制备

2.2.1 人血浆制备 健康人全血(纳入标准: 20~65 岁, 无感冒、高血压、冠心病等急慢性疾病, 无阿司匹林、华法林等抗凝药物服用史)来源于湖南中医药大学第一附属医院健康管理科。于湖南中医药大学中西医结合心脑血管防治实验室离心制备成血浆, 分装后于-80 °C 保存(6 个月内)。

2.2.2 动物空白血清、血浆制备 4 周龄雄性 SD 适应性喂养 12 h 后, ip 1 mL 生理盐水, 1 次/d, 连续 7 d, 于末次处理后 6 h, ip 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉, 腹主动脉采血, 部分全血装入 5 mL 空白管中, 部分全血装入 2 mL 枸橼酸钠采血管中, 编号, 3500 r/min(血清 4 °C 静置过夜)离心 10 min 得到大鼠空白血清、血浆, 分装后于-80 °C 保存。

2.2.3 动物含药血浆制备 4 周龄雄性 SD 大鼠适应性喂养 12 h 后, ip 1 mL 僵蚕提取液(105 mg/L), 1 次/d, 连续 7 d, 于末次给药后 6 h, ip 25%乌拉坦(4 mL/kg)麻醉, 腹主动脉采血, 全血装入 2 mL 枸橼酸钠采血管中, 编号, 3500 r/min 离心 10 min 得到大鼠含药血浆, 分装后于-80 °C 保存。

2.3 过表达 FXII 蛋白的 HEK-293 细胞制备

HEK-293 细胞按核转试剂盒说明书操作转入 FXII 质粒, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 转染率可达 95%, 用 G418 筛选, 获稳定表达 FXII 蛋白的 HEK-293 细胞。收集细胞上清液, 10 μ L/s 上样蛋白纯化柱, 0.25 nmol/L 咪唑洗脱可得 FXII 纯化蛋白。

2.4 凝集实验

取健康人全血浆 150 μ L, 分别加入 150 μ L 3、6、9 g/L 僵蚕提取液或生理盐水, 分别设为僵蚕提取液低、中、高剂量组和空白组, 37 °C 孵育 5 min, 全自动血凝仪检测并记录 PT、APTT、TT、FIB。

2.5 FXII 激活实验

含 FXII 蛋白的细胞悬液, 加入 40 μ L 不同质量浓度(0.15、0.30、0.60、1.20 g/L)的僵蚕提取液, 空白组加入生理盐水, 激动剂组加入 3.94×10^{-6} g/L Bismuth subgallate, 37 °C 孵育 5 min, 加入 2 \times SDS 上样缓冲液和 2.5% β -ME, 热水浴 5 min 后, 上样 10%丙烯酰胺胶, 12 μ L/孔, 100 V 跑胶, 120 V 湿转 2 h 后, 于脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入 FXII 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后, 加入二抗, 37 °C 孵育 1 h, 以 ECL 发光法于 Bio-Rad ChemiDoc™ 成像系统显影。

2.6 KK 生成实验

取人血浆 20 μ L, 按“2.5”项下方法处理样本后(僵蚕提取液质量浓度为 0.6、1.2 g/L), 上样于 8%丙烯酰胺胶, 30 μ L/孔, 100 V 跑胶, 120 V 湿转 2 h 后, 于脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入 KK 抗体, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后, 加入二抗, 37 °C 孵育 1 h, 以 ECL 发光法于 Bio-Rad ChemiDoc™ 成像系统显影。

96 孔板每孔加入 20 μ L 人全血浆或缺 FXII 血浆, 再分别加入 40 μ L 僵蚕提取液(1 g/L), 用 40 μ L 生理盐水作为空白对照组、40 μ L 高岭土溶液作为阳性对照组。37 °C 孵育 5 min, 加入 20 μ L 5 mg/L S-2302, 在酶标仪上 37 °C 孵育 30 min, 每 5 分钟测定 405 nm 处的吸光度(A)值。

2.7 动物模型制备

30 只 SD 大鼠适应性喂养 12 h 后, 随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、肝素组(150 IU)和僵蚕低、中、高剂量(0.45、0.9、1.8 mg/g, 26.25、52.50、105.00 mg/L 的僵蚕提取液)组。除空白组外, 其余大鼠分离双侧颈总动脉, 在小动物散斑成像仪下, 用动脉夹夹闭 1.5 min 后放开 1 min, 连续操作 5 次后, 成像仪中可见明显微血管血流减少(30 \pm 5)%, 缝合皮肤。空白组仅分离双侧颈总动脉后缝合皮肤,

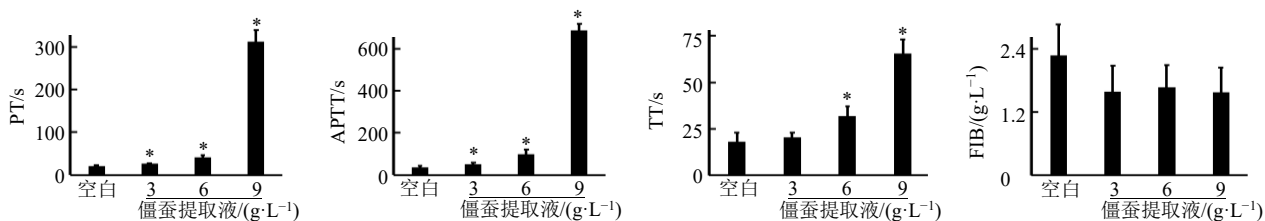
手术后各组连续 ip 1.2 mL 相应药物 3 d, 处死取材。

2.8 大鼠脑组织指标检测

将各组大鼠脑组织采用 4%多聚甲醛固定, 经乙醇脱水、二甲苯透明等步骤包埋制成石蜡块, 切片, 进行苏木素-伊红(HE)染色观察脑组织病理变化; 孵育 KK、CD31、BrdU/vWF 抗体, 于显微镜下观察并拍照。取大鼠脑组织, 于冰上匀浆, 提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 孵育 FXII、KK、VEGF 抗体及二抗, 显影。

2.9 氧糖剥夺模型制备

将大鼠脑微血管内皮细胞分为空白组 (10 μL 生理盐水)、空白血浆组 (10%空白血浆)、僵蚕提取液联合血浆组 (10% 26.25 mg/L 僵蚕提取液+10%空白血浆)、僵蚕提取液含药血浆组 (10%僵蚕提取液含药血浆)、肝素组 (10 IU 肝素+10%空白血浆)、激活剂组 (10 nmol/L Bismuth subgallate+10%空白血浆)、空白血清组 (10%空白血清)、BKR2 抑制剂组 (15 nmol/L Icatibant acetate+10%僵蚕提取液含药血浆), 采用无糖培养基, 5% CO₂、1% O₂ 条件下培养 12 h, 复氧 30 min 后, 于显微镜下观察并拍照, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖, 采用 Western blotting 法测定细胞内 VEGF 蛋白表达。



*P < 0.05 vs blank group, same as below Figs. 2, 3

图 1 僵蚕提取液对健康人血浆凝血时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 1 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on coagulation time in healthy human plasma ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

3.2 僵蚕提取液对 FXII 的激活水平的影响

如图 2 所示, 僵蚕提取液处理后, FXII 原型蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 随着僵蚕提取液质量浓度的增加, FXII 原型蛋白表达逐渐降低, 0.30 g/L 僵蚕提取液与 FXII 纯化蛋白溶液 1:1 混合孵育, 即可使 FXII 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 1.20 g/L 僵蚕提取液干预下, FXII 蛋白表达减少趋近于 FXII 激活剂的作用效果。

3.3 僵蚕提取液对血浆中 KK 表达的影响

如图 3-A 所示, 僵蚕提取液干预后, 血浆 KK 表达量明显增加, 呈剂量相关性 ($P < 0.05$); 如图

2.10 液相-色谱联用 (LC-MS) 鉴定僵蚕提取液代谢物

僵蚕提取液非靶代谢组学鉴定和分析由北京诺禾致源科技股份有限公司完成, 公司通过代谢物提取、LC-MS/MS 检测以及数据分析等, 得出实验数据, 具体实验条件如下: Hyperil Gold C₁₈ 色谱柱, 正离子模式下, 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~1.5 min, 98%A; 1.5~3 min, 98%~15%A; 3~10 min, 15%~0A; 10~10.1 min, 0~98%A; 10.1~12 min, 98%A。负离子模式下, 流动相为 pH 9 的 5 mmol/L 醋酸铵水溶液 (A)-甲醇 (B); 梯度洗脱: 0~1.5 min, 2%B; 1.5~3 min, 2%~85%B; 3~10 min, 85%~100%B; 10~10.1 min, 100%~2%B; 10.1~12 min, 2%B。柱温 40 °C; 体积流量 0.2 mL/min。

2.11 统计学分析

数据使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据两组间比较, 满足正态性者采用 *T* 检验; 多组间比较, 满足正态性、方差齐性者采用单因素方差分析, 方差不齐者采用秩和检验。

3 结果

3.1 僵蚕提取液对健康成人凝血时间的影响

如图 1 所示, 僵蚕提取液显著延长人 PT、APTT、TT ($P < 0.05$), 呈剂量相关性; 而 FIB 无统计学差异。

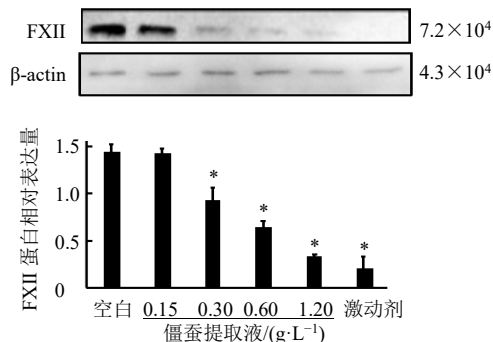


图 2 僵蚕提取液对 FXII 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on FXII protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

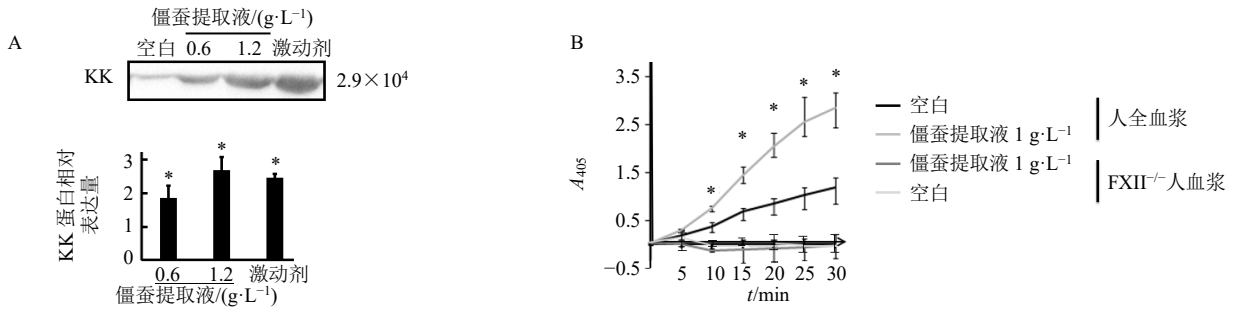


图3 Western blotting (A) 和酶标仪 (B) 检测僵蚕提取液对血浆中 KK 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Western blotting (A) and enzyme reader (B) detect the effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on KK expression in plasma ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3-B 所示, 在动力学实验中, 僵蚕提取液导致血浆中 KK 表达量增加较空白组更为明显, 在 5 min 时缓慢起效, 随着时间的增加, 其表达快速增加, 至 25 min 时, 增加趋势开始减缓, 在 FXII 缺乏的血浆中, 这种增加的趋势消失 ($P < 0.05$)。

3.4 缺血再灌注损伤大鼠模型的验证

如图 4 所示, 双侧颈总动脉反复结扎损伤后, 大鼠脑血流量明显减少, 以右侧脑减少更为明显, 部分小血管血流消失, 血管分支变细或消失, 平均血流减少 30%。

3.5 僵蚕提取液对缺血再灌注损伤大鼠脑形态学改变的影响

如图 5 所示, 与空白组比较, 模型组脑组织镜

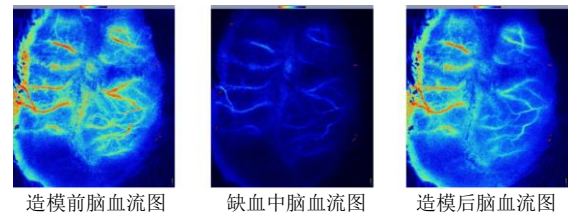


图4 缺血再灌注大鼠脑血流图

Fig. 4 Rheoencephalogram of rats with ischemia reperfusion

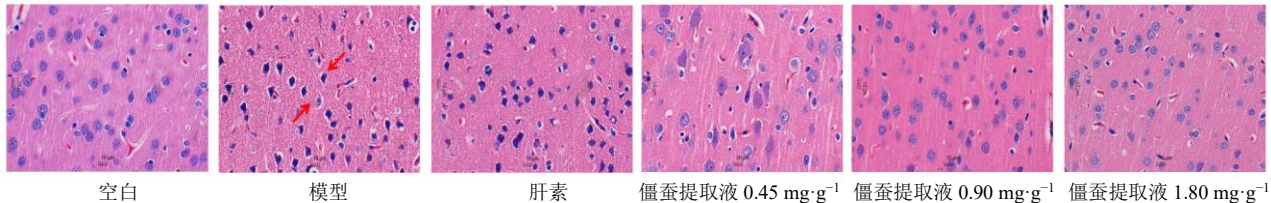


图5 僵蚕提取液对缺血再灌注损伤大鼠脑形态学影响 (HE, $\times 200$)

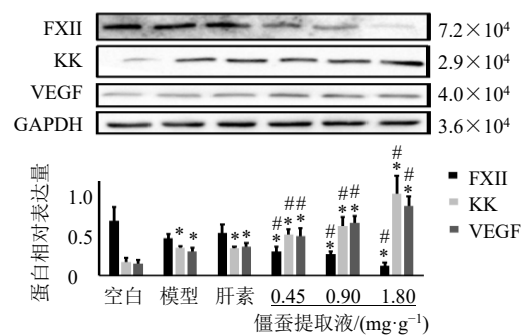
Fig. 5 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on cerebral morphology in rats with ischemia reperfusion (HE, $\times 200$)

下可见大量的细胞凋亡, 部分细胞核固缩, 胞质成空泡状。僵蚕提取液干预后, 核固缩细胞明显减少, 细胞纹理清晰, 空泡减少, 呈剂量相关性。

3.6 僵蚕提取液对缺血再灌注大鼠脑组织脑激肽释放系统和血管新生的影响

如图 6 所示, 与空白组比较, 模型组和肝素组 FXII 蛋白激活不明显, KK 和 VEGF 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 僵蚕提取液组 FXII 原型蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性, 提示蛋白大量激活; KK 和 VEGF 蛋白表达进一步升高 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。

如图 7 所示, 在 KK 的免疫荧光实验中也得到 Western blotting 类似的结果, 与空白组比较, KK 表达在各组中均增加 ($P < 0.05$), 但僵蚕提取液组更佳, 且剂量相关性。在免疫荧光实验中, 与空白组比较, 模型组、肝素组 CD31 和 Brdu⁺/vWF⁺未见明



与空白组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 7 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as Fig. 7

图6 僵蚕提取液对缺血再灌注损伤大鼠脑激肽释放系统蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on contact system protein expressions in rats with ischemia reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

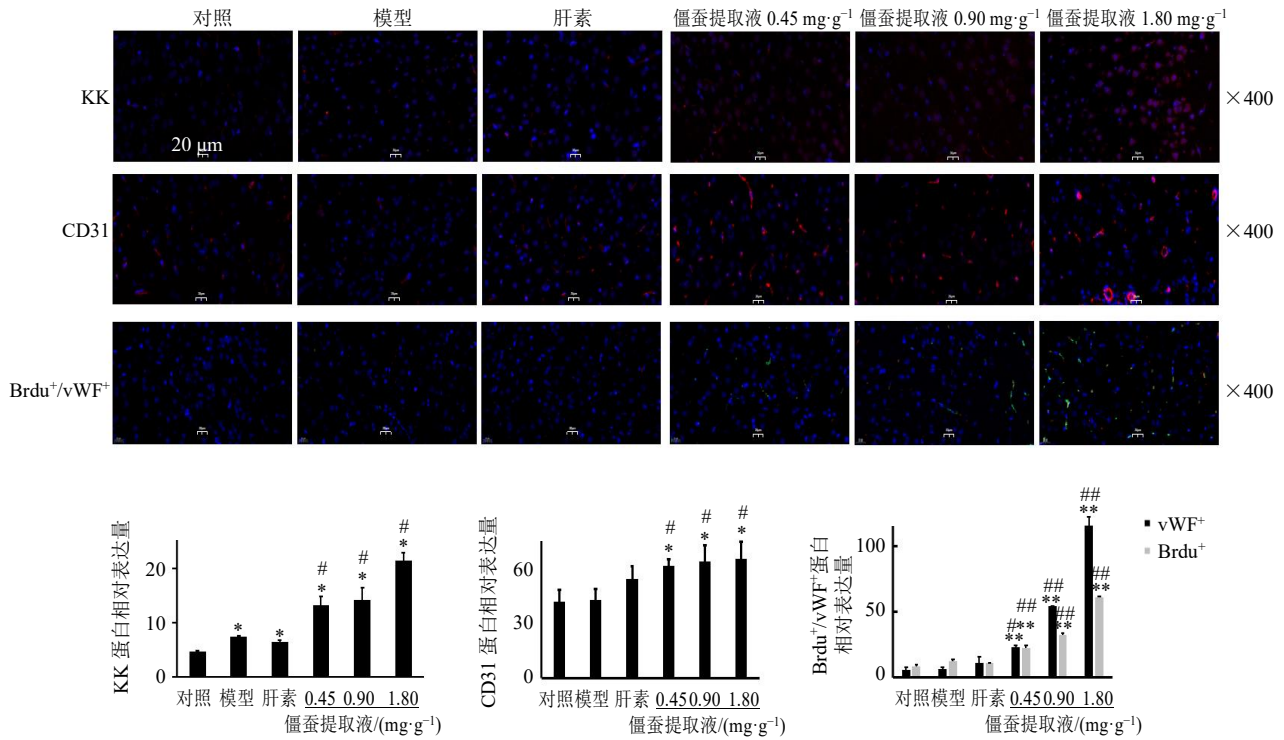


图 7 僵蚕提取液对缺血再灌注损伤大鼠脑血管生成相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on angiogenesis protein expressions in rats with ischemia reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

显增加；与模型组比较，僵蚕提取液组 CD31 和 Brdu⁺/vWF⁺有明显表达 ($P < 0.05, 0.01$)，且剂量相关性。

3.7 僵蚕提取液对氧糖剥夺模型大鼠脑微血管内皮细胞形态学变化的影响

如图 8 所示，在同时造模后，各组细胞均有所

改变，出现细胞固缩、透光性降低改变，空白血浆组和 FXII 激活剂组有明显的纤维蛋白生成，镜下可见明显的纤维蛋白团块和纤维蛋白丝。空白组、肝素组、空白血清组和 BKR2 抑制剂组虽未见明显的纤维蛋白凝块，但贴壁细胞数量明显减少，固缩明显，透光性差，细胞增殖不良。僵蚕提取液和大鼠

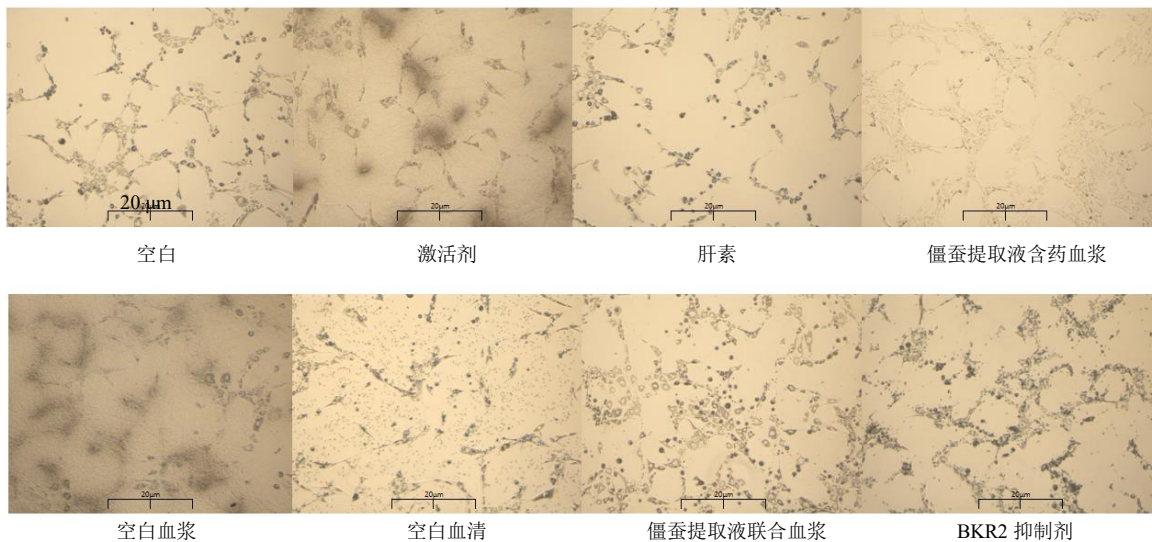


图 8 僵蚕提取液对氧糖剥夺模型大鼠脑微血管内皮细胞形态的影响 ($\times 100$)

Fig. 8 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on morphology of cerebral microvascular endothelial cells in rats with oxygen and sugar deprivation model ($\times 100$)

血浆共同干预下，未见明显纤维蛋白团块，其细胞数量也明显高于血浆组，但细胞可见部分死亡和固缩现象。僵蚕提取液含药血浆组细胞状态明显优于其他处理组，细胞透光性强，未见明显细胞死亡和形态改变。

3.8 僵蚕提取液对氧糖剥夺模型大鼠脑微血管内皮细胞增殖的影响

如图 9 所示，与空白血浆组比较，肝素组、僵蚕提取液联合血浆组和僵蚕提取液含药血浆组内皮

细胞增殖明显，其中僵蚕提取液含药血浆组效果最为明显 ($P < 0.01$)。但与空白组和空白血浆组比较，仅僵蚕提取液联合血浆组和僵蚕提取液含药血浆组 VEGF 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。

3.9 LC-MS 鉴定僵蚕提取液非靶代谢物

LC-MS 共鉴定僵蚕提取液非靶代谢物 809 个，其中，正离子模式鉴定代谢物 479 个，负离子模式鉴定代谢物 330 个，共计有 21 个含量较高的代谢物 (峰面积/总面积 $\geq 1.0\%$ ，见图 10 和表 1)。

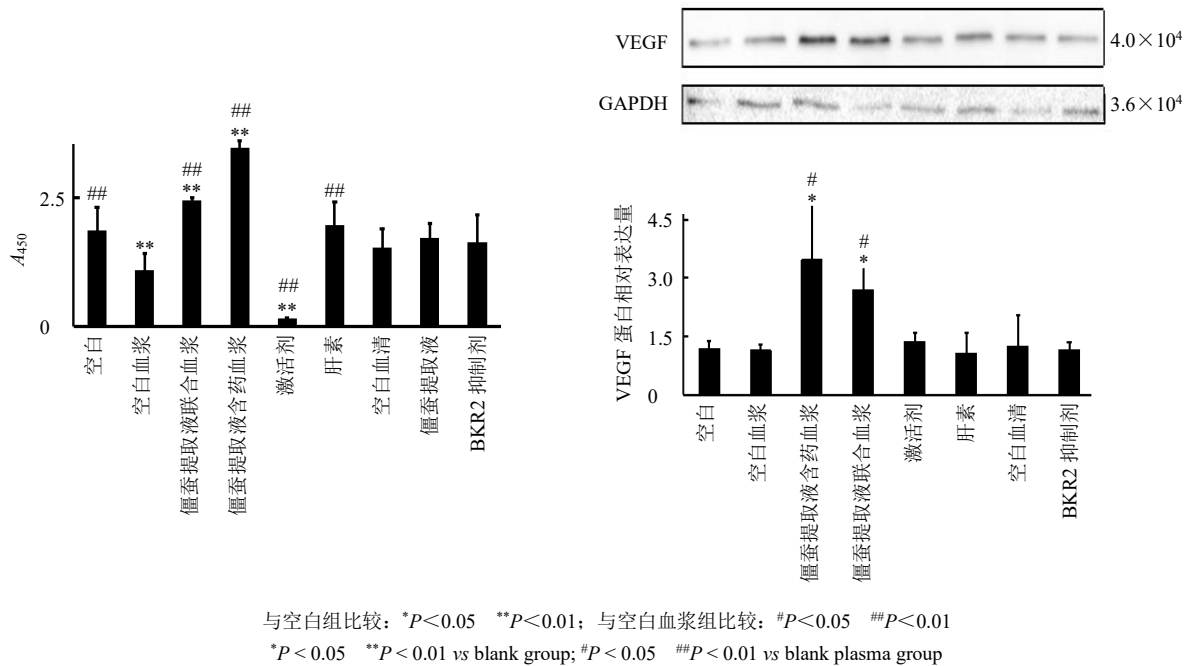


图 9 僵蚕提取液对氧糖剥夺模型大鼠脑微血管内皮细胞增殖情况 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 9 Effect of *Bombyx Batryticatus* extracts on proliferation of cerebral microvascular endothelial cells in rats with oxygen and sugar deprivation model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

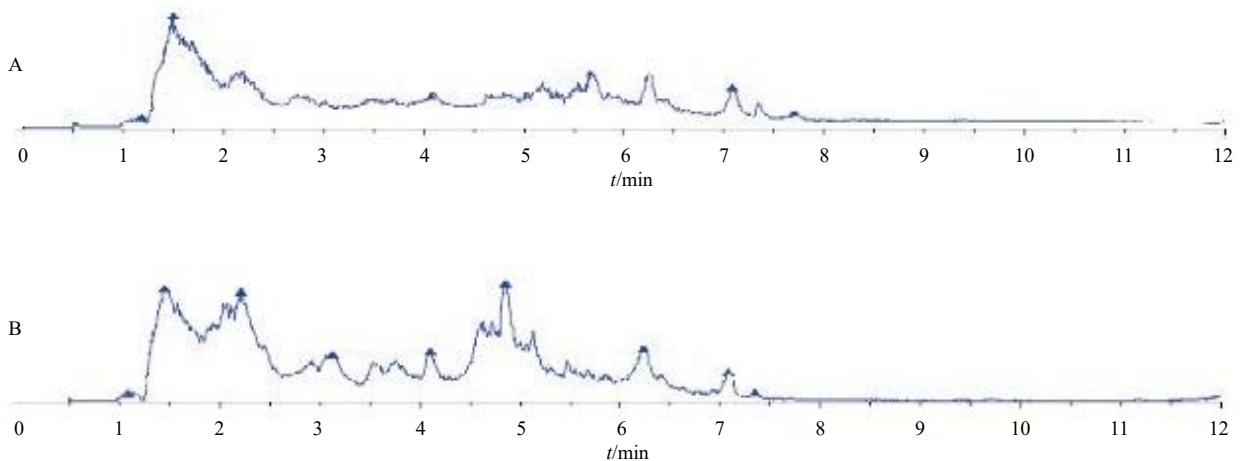


图 10 正 (A)、负 (B) 离子模式下的僵蚕提取液 TIC 图

Fig. 10 TIC of *Bombyx Batryticatus* extracts in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 僵蚕提取液 21 个高含量代谢物

Table 1 Information of 21 substances with relatively high concentration in *Bombyx Batryticatus* extracts

序号	代谢物	分子式	相对分子质量	<i>t_R</i> /min
1	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	192.026 95	2.174
2	尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	168.028 16	1.777
3	烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032 10	4.243
4	鸟苷-3',5'-环磷酸	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P	345.046 74	2.780
5	丙二酸甲酯	C ₄ H ₆ O ₄	118.026 63	2.275
6	氯乙酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	328.224 51	6.383
7	(9 <i>S</i> ,10 <i>R</i> ,12 <i>Z</i>)-9,10-二羟基-12-十八碳烯酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	314.245 12	7.360
8	奎尼酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.063 26	1.338
9	5-氧代丙烷	C ₅ H ₇ NO ₃	129.042 52	2.012
10	戊烯二酸	C ₅ H ₆ O ₄	130.026 53	1.590
11	腺苷 3',5'-环磷酸	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	329.051 97	2.352
12	亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.094 66	5.661
13	<i>N</i> -乙酰- <i>DL</i> -谷氨酸	C ₇ H ₁₁ NO ₅	189.063 58	1.837
14	半乳糖醇	C ₆ H ₁₄ O ₆	182.078 87	1.340
15	4-氧代丙烷	C ₅ H ₇ NO ₃	129.042 53	2.274
16	4-吡啶氧酸	C ₈ H ₉ NO ₄	183.053 03	3.690
17	单磷酸鸟苷	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	363.057 54	2.180
18	顺乌头酸	C ₆ H ₆ O ₆	174.016 31	1.898
19	2,4-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₄	154.026 69	5.699
20	2-羟基苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	135.068 52	5.122
21	苹果酸	C ₄ H ₆ O ₅	134.021 45	1.358

4 讨论

IS 是一种高发病率、高致死率的疾病，随着发病率的逐年增加，呈年轻化趋势，其病机和开发新的防治药物仍为研究的热点。目前认为 IS 病程转归不但与血栓形成有关，炎症导致的无复流现象也影响疾病的预后。FXII 是内源性凝血途径的启动因子^[13]，研究认为 FXII 促进血栓的形成，引起局部组织水肿，不利于 IS 的恢复，但 FXII 激活对下游底物的作用效果并不同步。研究表明 FXII 活化后最先激活 PK，导致 BK 生成。在肿瘤研究中发现 BK 可通过与细胞表面 BKR2 结合，促进 VEGF 生成，参与血管新生，提示了 FXII 在 IS 发病中可能还发挥着有利的生理功能。

《本草纲目》记载僵蚕具有“治风化痰，散结行经”之功，常被用于治疗 IS 的配伍方剂中，以助活血化痰之效。本课题组前期研究证实僵蚕经提取后具有延长兔凝血时间的作用，与肝素类似^[12]。本研究中将僵蚕按原法再次提取，在人血浆体外实验中得到了相同结果，再次证实了僵蚕提取液良好的抗凝活性。然而，这种提取工艺下的僵蚕提取液在与 FXII 共孵育后，降低了 FXII 原型蛋白含量，提示其导致蛋白水解。为证实 FXII 的激活，检测了一系列下游蛋白的活化情况。结果显示，僵蚕提取液干

预后血浆中 KK 含量明显增多，这一效果在缺乏 FXII 血浆中消失。但其作用弱于 FXII 激活剂高岭土和 Bismuth subgallate，这可能与僵蚕提取液水解 FXII 的位点有关。提示僵蚕提取液对 FXII 的激活作用主要导致了接触系统的活化。

为阐明僵蚕提取液在其中的作用，本课题组运用大鼠缺血再灌注模型观察僵蚕的药效机制。在均一造模条件下，随着僵蚕提取液干预浓度的增加，大鼠脑神经元损伤程度减轻，脑组织中 FXII 原型蛋白减少，但外周血 FXII 的含量无明显改变，且抗凝效果明显弱于体外实验，提示僵蚕提取液中活性成分并非直接激活血液中的 XII 发挥 IS 干预效应。同时，造模后脑内 KK 和 VEGF 的生成也有增加，但并无血管新生，只有僵蚕提取液干预下可见明显新生血管。新生的血管可提高缺血区血供，有利于缓解脑缺血后的组织损伤，僵蚕提取液可能从这一途径改善了大鼠脑缺血再灌注的转归。为证实这一假说，通过细胞实验开展进一步研究。本研究用僵蚕提取液直接干预大鼠脑微血管内皮细胞发现其并无增殖效应，提示僵蚕提取液并不能直接作用导致细胞增殖。基于此，本研究以血浆作为基质，以期提供 FXII、PK、HK 等接触系统相关蛋白。氧糖剥夺实验显示空白血浆干预组由于血浆中凝血因子被激

活, 细胞培养基内有明显纤维蛋白团块生成, 而僵蚕提取液联合血浆组和僵蚕提取液含药血浆组纤维蛋白团块明显减少或消失, 提示僵蚕提取液具有明显抗凝作用, 但含药血浆的抗凝效应明显弱于联合干预组, 提示僵蚕提取液在体内可能经过相关代谢减弱了其抗凝效应。然而, 血清组和肝素组由于凝血因子缺乏或抑制, 也表现出明显抗凝作用, 但细胞凋亡明显, 提示其药效不仅来源于抗凝效应。进一步实验显示, 僵蚕提取液干预下脑微血管内皮细胞内 VEGF 的表达明显增高, 内皮细胞增殖明显, 其中, 僵蚕提取液含药血浆组效应优于僵蚕提取液联合血浆组, 提示经过体内代谢, 僵蚕提取液的促血管增殖效应增强, 但使用 BKR2 阻断剂后, 细胞增殖作用消失, 提示 BKR2 是僵蚕发挥血管新生的关键靶点。

本研究以 FXII 介导接触系统激活为基础进一步证实了其在 IS 发病过程中血管新生的可能机制, 而僵蚕提取液通过促进 FXII 的激活加速了该过程的发生。基于此, 本研究通过 LC-MS 对僵蚕提取液的代谢产物进行了鉴定, 809 个已鉴定代谢物中有大量有机酸类化合物、氨基酸及脂肪族化合物等, 与僵蚕虫类药属性相符。后续拟进一步鉴定比对入血和入脑化合物, 以期阐明僵蚕提取液的药效物质基础。FXII 参与了 IS 接触激活和血管生成, 而僵蚕提取液改善了缺血再灌注大鼠神经功能损伤, 可能与抗凝联合激活 FXII 导致缓激肽生成, 介导 VEGF 生成和血管内皮细胞增殖有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] GBD Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990—2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.

- [2] Kain V, Halade G V. Role of neutrophils in ischemic heart failure [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 205: 107424.
- [3] Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation [J]. *Blood*, 2018, 131(17): 1903-1909.
- [4] Didiasova M, Wujak L, Schaefer L, et al. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond [J]. *Cell Signal*, 2018, 51: 257-265.
- [5] Kenne E, Nickel K F, Long A T, et al. Factor XII: A novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation [J]. *J Intern Med*, 2015, 278(6): 571-585.
- [6] Jukema B N, de Maat S, Maas C. Processing of factor XII during inflammatory reactions [J]. *Front Med*, 2016, 3: 52.
- [7] Nickel K F, Long A T, Fuchs T A, et al. Factor XII as a therapeutic target in thromboembolic and inflammatory diseases [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(1): 13-20.
- [8] Yu H S, Wang S W, Chang A C, et al. Bradykinin promotes vascular endothelial growth factor expression and increases angiogenesis in human prostate cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(2): 243-253.
- [9] Zhou Y, Wang W, Wei R, et al. Serum bradykinin levels as a diagnostic marker in cervical cancer with a potential mechanism to promote VEGF expression via BDKRB2 [J]. *Int J Oncol*, 2019, 55(1): 131-141.
- [10] 庞国凤, 郝二伟, 周凯, 等. 中药抑制血栓形成中组织因子表达的研究概况 [J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(3): 709-712.
- [11] 曾劲松, 喻坚柏, 刘检, 等. 脑泰方对血红蛋白诱导的大鼠皮质神经元损伤的保护作用及机制 [J]. *北京中医药大学学报*, 2019, 42(10): 825-832.
- [12] 彭延古, 曾序求, 雷田香, 等. 僵蚕抗凝成分对内毒素休克伴弥散性血管内凝血大鼠的保护作用研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(2): 80-82.
- [13] Thangaraj S S, Christiansen S H, Graversen J H, et al. Contact activation-induced complex formation between complement factor H and coagulation factor XIIa [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18(4): 876-884.

[责任编辑 李亚楠]