

·实验研究·

本文引用:刘惠娜,李艳玲,曹旺,邓常清.药根碱靶向凝血因子XII发挥抗凝血作用的体外研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(1):27-33.

药根碱靶向凝血因子XII发挥抗凝血作用的体外研究

刘惠娜,李艳玲,曹旺,邓常清*

(湖南中医药大学血管生物学实验室,湖南长沙410208)

〔摘要〕目的 以凝血因子XII (coagulation factor XII, FXII)为靶点探讨药根碱抗血栓作用的机制。方法 通过Ledock软件将药根碱分子与内源性凝血途径接触激活阶段关键靶蛋白FXII、活化凝血因子FXII (activated coagulation factor XII, FXIIa)、凝血因子XI (coagulation factor XI, FXI)和活化凝血因子XI (activated coagulation factor XI, FXIa)进行分子对接,以结合能低于-5 kcal/mol作为阈值判断药根碱与接触激活因子的结合活性;采用体外凝血实验法检测血浆活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、血浆凝血酶原时间(plasma prothrombin time, PT)、凝血酶时间(plasma prothrombin time, TT);因子血浆纠正试验检测FXII、FXI、凝血因子IX (coagulation factor IX, FIX)、凝血因子VIII (coagulation factor VIII, FVIII)、凝血因子X (coagulation factor X, FX)和凝血因子VII (coagulation factor VII, FVII)的活性的抑制作用;Western blot法检测药根碱对FXII蛋白激活的抑制作用。结果 (1)分子对接实验表明,药根碱与FXIIa、FXIa结合能均低于-5 kcal/mol,结合活性良好。(2)体外实验中,0.2-0.8 mg/mL药根碱均可显著延长APTT ($P<0.01$),但不延长PT和TT ($P>0.05$)。(3)药根碱各剂量均显著降低FXII活性($P<0.01$),药根碱高剂量(0.8 mg/mL)可降低FXI活性($P<0.05$),但对FIX、FVIII、FX及FVII活性无显著影响($P>0.05$)。(4)药根碱各剂量均显著抑制FXII蛋白的激活($P<0.01$)。结论 药根碱与FXIIa对接较好,显著延长APTT,抑制FXII蛋白激活,降低血浆FXII活性,提示其抗栓作用可能通过抑制FXII的活性而发挥。

〔关键词〕药根碱;内源性凝血途径;凝血因子XII;分子对接

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.01.006

Anticoagulant Effect Study of Jatrorrhizine on the Target of Coagulation Factor XII In Vitro

LIU Huina, LI Yanling, CAO Wang, DENG Changqing*

(Laboratory of Vascular Biology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the anticoagulant mechanism of jatrorrhizine with coagulation factor XII (FXII) as the target. **Methods** Factor XII (FXII), activated coagulation factor XII (FXIIa), coagulation factor XI (FXI) and activated coagulation factor XI (FXIa) which are the key target proteins in the contact activation stage of endogenous coagulation pathway, were performed molecular docking with jatrorrhizine by the Ledock software, the binding activity between jatrorrhizine and contact activation factors was determined by the threshold that binding energy lower than -5 kcal/mol; the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT) were detected by vitro coagulation test; the inhibitory effect of jatrorrhizine on the activities of FXII, FXI, coagulation factors IX (FIX), coagulation factors VIII (FVIII), coagulation factors X (FX) and coagulation factors VII (FVII) was detected by factor deficient plasma correction test; Western blot was used to detect the inhibitory effect of jatrorrhizine on activation of FXII protein. **Results** (1) The molecular docking experiments showed that the binding energies of jatrorrhizine with FXIIa and FXIa were lower than -5 kcal/mol, which indicated high binding activity. (2) Jatrorrhizine prolonged APTT at 0.2-0.8 mg/mL ($P<0.01$), but did not prolong PT and TT ($P>0.05$) in vitro experiment. (3) Various concentration of jatrorrhizine significantly decreased the

〔收稿日期〕2020-07-14

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81904148)。

〔作者简介〕刘惠娜,女,在读博士研究生,讲师,研究方向:中医药心脑血管疾病防治。

〔通讯作者〕*邓常清,男,教授,博士研究生导师,E-mail:dchangq@sohu.com。

activity of FXII ($P<0.01$), high concentration of jatrorrhizine (0.8 mg/mL) decreased the activity of FXI ($P<0.05$), but had no significant effect on the activities of FIX, FVIII, FX and FVII ($P>0.05$). (4) Various concentration of jatrorrhizine significantly inhibited the activity of FXII protein ($P<0.01$). **Conclusion** Jatrorrhizine has a good docking with FXIIa. It can significantly prolong APTT, inhibit activation of FXII protein and reduce the activity of plasma FXII. All suggested that antithrombotic effect of jatrorrhizine may be exerted by inhibiting the activity of FXII.

[**Keywords**] jatrorrhizine; endogenous coagulation pathway; coagulation factor XII; molecular docking

血栓形成是严重威胁人类健康的一种病理过程。以血栓形成为基本病理特征的心脑血管疾病如中风、心肌梗死等,起病急、病情重、死亡率高,占非传染性疾病总死亡率的 44%,已成为我国人口死亡与致残的首位原因^[1]。目前,应用的抗血栓药可分为抗血小板药、抗凝血药和溶血栓药三大类^[2]。随着人们对血栓形成机制的不断深入了解,以直接抑制凝血酶或抑制凝血因子 Xa 为作用靶点的抗栓药物也逐渐普及,但这些药物均干扰生理性止血过程,存在较严重的出血不良反应^[3]。近年来研究发现,抑制内源性凝血途径的接触激活因子凝血因子 XII (coagulation factor XII, FXII)、凝血因子 XI (coagulation factor XI, FXI)、前激肽释放酶(prekallikrein, PK)或高分子激肽原(high molecular weight kininogen, HK)具有显著的抗血栓效果却无明显的出血不良反应^[4-6],提示内源性凝血途径的接触激活因子有望成为抗血栓药物的重要靶点。许多中草药和复方特别是活血化瘀类中药均能有效地防治血栓性疾病,主要是从抗血小板、抗凝血酶和促纤溶等方面发挥作用,确有疗效且安全的以接触激活因子为靶点的抗栓药物还不多。

药根碱(jatrorrhizine)是从毛茛科植物黄连、小檗科植物功劳木及防己科植物青牛胆等植物中提取出来的异喹啉类生物碱,其结构与小檗碱类似。药根碱及其衍生物具有抑制炎症、降血糖、降血脂、抗风湿、抗肿瘤等药理作用^[7-9],但其抗血栓作用的研究尚未涉及。本课题组以往研究发现,药根碱静脉注射可延长颈动脉血栓模型血管闭塞时间,减轻动脉血栓和静脉血栓模型的血栓重量,但不显著延长小鼠尾出血时间,提示药根碱具有确切的抗动脉血栓和静脉血栓形成的作用,出血不良反应轻,其作用机制可能是通过抑制凝血因子特别是内源性凝血途径的凝血因子活性而发挥作用^[10]。为进一步研究药根碱抗血栓作用的机制,本研究从凝血因子活性探讨药根碱对凝血因子的抑制作用,明确其可能的作用靶点,

为进一步揭示其作用机制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验药物

药根碱(jatrorrhizine, CAS 3621-38-3,批号 PRF908 0441),质量分数 $\geq 95\%$,购自成都普法瑞科技开发有限公司。低分子肝素钠(达肝素, dalteparin sodium, CAS 9041-08-1,批号 MB1914)购自大连美仑生物公司,每克抗因子 Xa 活性效价为 133 000 U,使用时用生理盐水配制。玉米胰蛋白酶抑制剂(corn trypsin inhibitor, CTI,批号 1018)购自美国 Molecular Innovations 公司。

1.2 动物

新西兰大白兔,雄性,体质量 1.6~2.0 kg,动物许可证号:SCXK(湘)2015-0004,购自湖南太平生物科技有限公司。动物实验在湖南中医药大学实验动物中心完成,实验场地许可证号:SYXK(湘)2013-0005。动物的使用符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.3 主要试剂和仪器

高岭土(kaolin,批号 93-1348),购自美国 Strem Chemicals 公司。血浆活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT,批号 253259)试剂、凝血酶原时间(prothrombin time, PT,批号 253305)试剂、凝血酶时间(thrombin time, TT,批号 252465)试剂、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB,批号 252569)试剂及质控品(批号 12351,253868)、定标品(批号 253180)、乏因子 XII 血浆 (deficient XII plasma,批号 250883)、乏因子 XI 血浆 (deficient XI plasma,批号 252200)、乏因子 IX 血浆 (deficient IX plasma,批号 253639)、乏因子 X 血浆 (deficient X plasma,批号 251434)、乏因子 VII 血浆 (deficient VII plasma,批号 252767)均购自法国斯塔高公司。乏因子 VIII 血浆(deficient VIII plasma,批号 547676)购自希森美康医用电子有限公司。FXII 蛋白(factor XII protein,批号 7690-250)购

自美国 Biovision 公司。FXII 抗体(anti-factor XII, 批号 ab242123)购自 Abcam 公司。HRP 标记的羊抗兔二抗, 批号 AT0097, 购自美国 CMCTAG 公司。TBST 缓冲液(批号 MA0091)、WB 脱脂牛奶封闭液(批号 MA0097)、飞克特超敏 ECL 液(批号 MA0186)均购自大连美仑生物公司。

STA Compact Max 全自动凝血分析仪(法国斯塔高公司); CS-5100 全自动凝血分析仪(希森美康医用电子有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 分子对接法评估药根碱与接触激活因子 FXII、FXI 的结合活性 从蛋白质数据库(protein data bank, PDB) 中下载相应靶标蛋白的 PDB 文件; FXII 对应的 PDB_ID 为 4bdx, FXIIa 对应的 PDB_ID 为 4xe4, FXI 对应的 PDB_ID 为 5eok, FXIa 对应的 PDB_ID 为 4d76。选择靶标蛋白上的配体分子再通过 pymol 的 GetBox Plugin 计算对接盒子, 再使用该对接盒子通过 Ledock 软件进行靶标受体蛋白去配体、离子、水等预处理后, 导入 FXII、FXIIa、FXI 和 FXIa, 并分别通过 Ledock 软件与药根碱分子进行对接, 对接结果通过 pymol 进行可视化。评估药根碱分子和靶标蛋白的结合活性, 以结合能低于 -5 kcal/mol 作为阈值^[1], 结合能越低, 则表明结合活性越好。

1.4.2 凝固法检测药根碱在体外对 APTT、PT、TT、FIB 的影响 新西兰兔 7 只, 采血前 12 h 禁食不禁水。将家兔仰卧固定, 在左侧胸部心脏部位去毛、消毒, 于第 3 肋间胸骨左缘 3 mm 心尖处将注射针垂直刺入心脏采血, 然后与 3.8% 枸橼酸钠混匀抗凝, 3 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取上清液即兔贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP), 分装后 -80 °C 保存备用。

将超纯水、不同浓度药根碱、低分子肝素分别加入同一家兔 PPP, 编组为空白组、药根碱低剂量组(0.2 mg/mL)、药根碱中剂量组(0.4 mg/mL)、药根碱高剂量组(0.8 mg/mL)和肝素组(3.125 IU/mL), 采用全自动凝血分析仪测定 APTT、PT、TT 和 FIB。

1.4.3 乏因子血浆纠正试验检测药根碱在体外对凝血因子活性的抑制效应 为了检验药根碱对凝血途径影响的具体作用因子, 采用乏因子血浆纠正试验测定凝血因子活性, 其活性是通过待测血浆纠正乏因子血浆的能力而测得。分组同“1.4.2”, 将待测血

浆分别与凝血因子活性测定试剂盒(即缺乏 FXII、FXI、FIX、FVIII、FX、FVII 的血浆)混合, 然后应用全自动凝血仪测定血浆 FXII、FXI、FIX、FVIII、FX、FVII 活性。

进一步检验药根碱与 FXII 抑制剂是否具有相似效应, 将超纯水、不同浓度药根碱、CTI (FXII 抑制剂) 分别加入同一家兔 PPP, 编组为空白组、药根碱低剂量组(0.2 mg/mL)、药根碱中剂量组(0.4 mg/mL)、药根碱高剂量组(0.8 mg/mL)和抑制剂组(0.025 mg/mL)。然后采用乏因子血浆纠正试验测定凝血因子 XII 活性。

1.4.4 Western blot 法检测药根碱在体外对 FXII 蛋白激活的抑制作用 将等容积超纯水、FXII 抑制剂、药根碱(1.8 mg/mL)、药根碱(2.4 mg/mL) 分别加入等容积同一浓度的 FXII 蛋白(0.25 mg/mL) 中, 编组为空白组、抑制剂组(0.25 mg/mL)、药根碱低剂量组、药根碱高剂量组, 然后 37 °C 孵育 5 min 后, 加入 FXII 激活物高岭土(5 mg/mL), 再 37 °C 孵育 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 加入 5× 上样缓冲液, 沸水煮 10 min 后, 上样(每孔 10 μ L)、电泳 2.5 h、转膜 2 h、封闭 2 h, 然后 FXII 抗体 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 孵二抗 1.5 h 后显影。用 Image Pro-Plus 6.0 分析软件计算各组累积光密度值(integrated optical density, IOD)。FXII 蛋白在未激活状态下以 80 kDa 酶原形式存在, 被激活后裂解。本实验在不同干预因素处理后, 检测 80 kDa FXII 酶原含量来判断 FXII 的激活情况。80 kDa FXII 蛋白 IOD 值越高, 即 FXII 酶原含量越高, 表明被激活的 FXII 蛋白越少。

1.5 统计学分析与方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析实验数据, 各组数据计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Dunnett's T3 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药根碱与接触激活因子 FXII、FXI 的结合活性

药根碱占据了 FXIIa 蛋白中由 GLN-489、GLY-374、ARG-413、TYR-372 等残基构成的活性空腔, 其分子与 FXIIa 的 GLN-489 残基形成了 2 个氢键, 与 GLY-374 残基形成 1 氢键, 与 TYR-372 形成了

2 个 π 堆积,与 ARG-413 形成了 1 个 π 阳离子相互作用,且药根碱与 FXIIa 结合能低于-5 kcal/mol,具有强亲和力。药根碱占据了 FXIa 蛋白中由 LYS-192、ASP-189 等残基构成的活性空腔,其分子与 FXIa 的 ASP-189 残基形成了 1 个氢键,与 LYS-192 残基形成 1 个疏水键,且药根碱与 FXIa 亲和能低于-5 kcal/mol,具有较强亲和力。分子对接结果表明,药根碱分子可与 FXIIa、FXIa 结合,可能对 FXIIa、FXIa 活性具有抑制作用。见表 1、图 1。

表 1 药根碱与接触激活关键靶蛋白对接结合活性

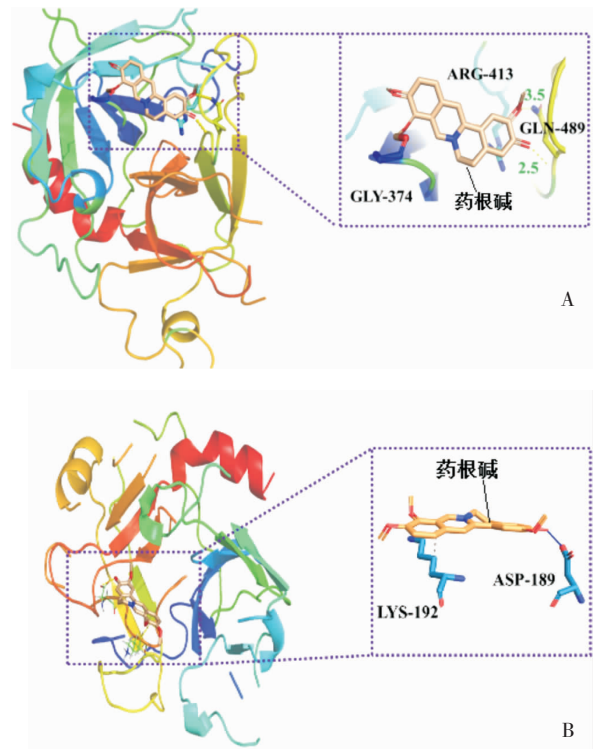
靶点名称	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
FXIIa	4XE4	-5.05
FXII	4bdx	-3.05
FVI	5eok	-2.45
FVIa	4d76	-5.63

2.2 药根碱对兔血浆 APTT、PT、TT、FIB 的影响

与空白组比较,药根碱各剂量组均可显著延长 APTT($P<0.01$),但不延长 PT、TT($P>0.05$)。低分子肝素显著延长 APTT、TT($P<0.01$)。药根碱各剂量和低分子肝素对 PT、FIB 含量无显著影响($P>0.05$)。见图 2。

2.3 药根碱在体外对兔血浆凝血因子活性的影响

2.3.1 药根碱对兔血浆 FXII、FXI、FIX、FVIII、FX 及 FVII 活性的影响 与空白组比较,药根碱各剂量组均可显著降低 FXII 因子活性($P<0.01$);药根碱高剂量组可降低 FXI 因子活性($P<0.05$);但药根碱各剂量组对 FIX、FVIII、FX 及 FVII 因子活性无显著影响($P>0.05$)。低分

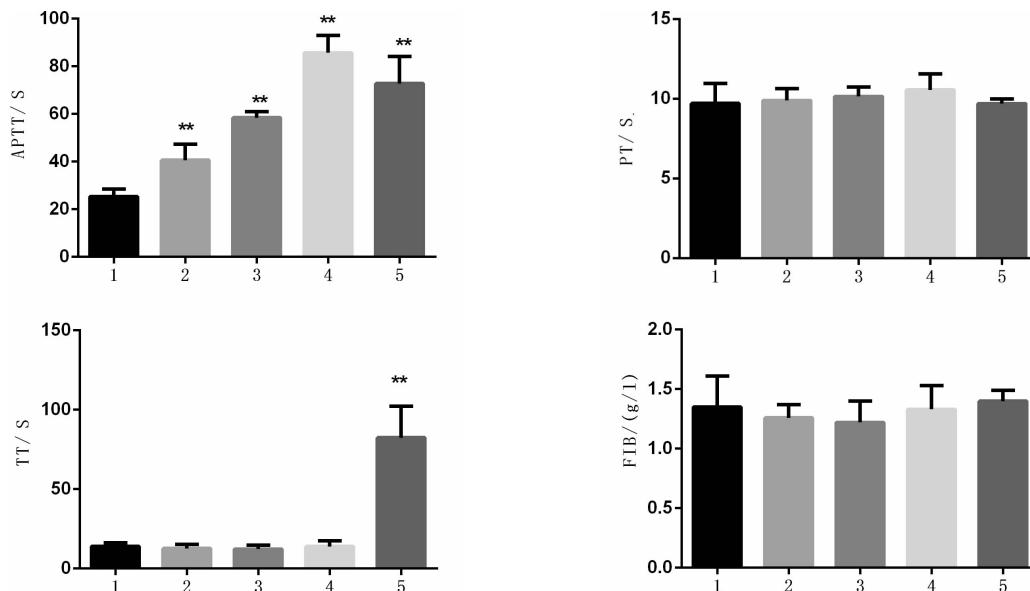


注:A.药根碱与 FXIIa;B.药根碱与 FVIa

图 1 药根碱与接触激活因子的相互作用模式图

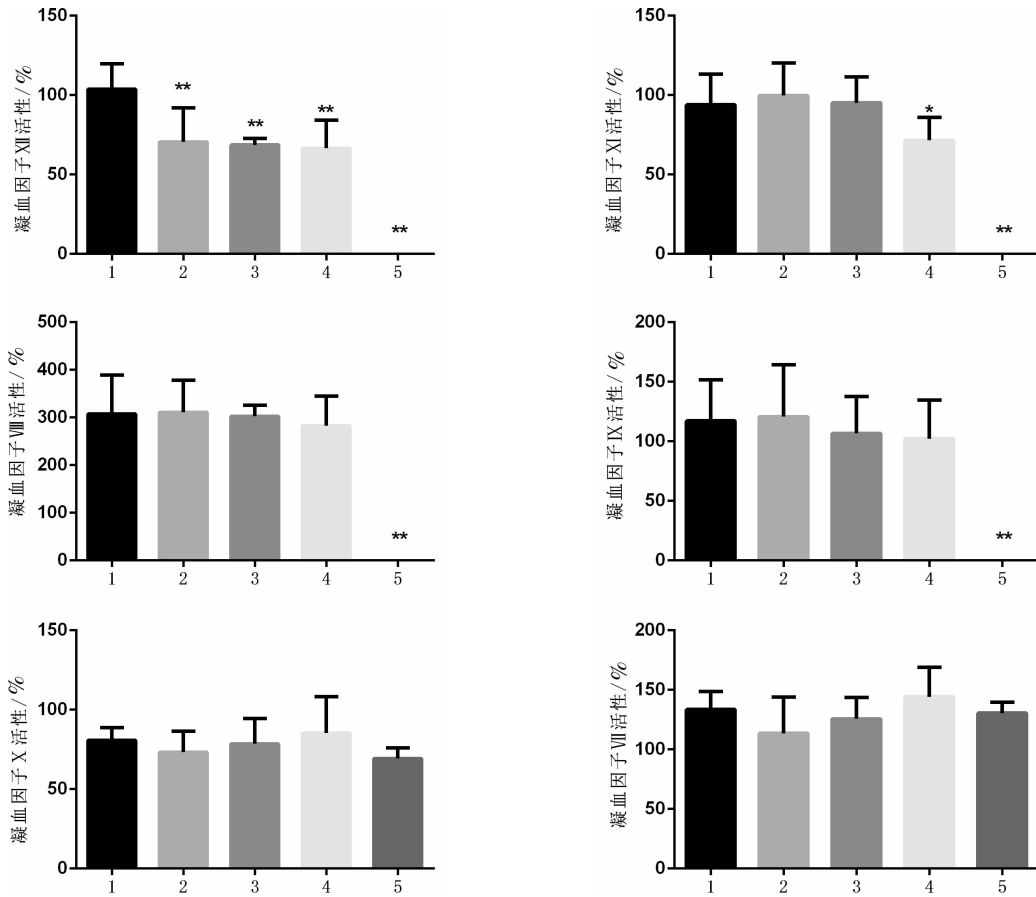
子肝素可显著降低 FXII、FXI、FIX 及 FVIII 因子活性 ($P<0.01$),但对 FX 及 FVII 因子活性无显著影响 ($P>0.05$)。见图 3。

2.3.2 药根碱对兔血浆 FXII 活性的影响 与空白组比较,药根碱各剂量组可显著降低 FXII 因子活性($P<0.01$),抑制剂组可显著降低 FXII 因子活性($P<0.01$)。与



注:1.空白组;2.药根碱低剂量组;3.药根碱中剂量组;4.药根碱高剂量组;5.低分子肝素组。与空白组比较,** $P<0.01$, $n=7$

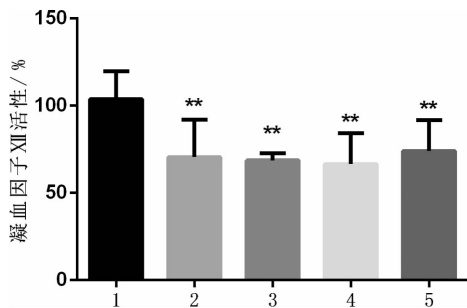
图 2 各组血浆凝血四项比较



注:1.空白组;2.药根碱低剂量组;3.药根碱中剂量组;4.药根碱高剂量组;5.低分子肝素组。与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$, $n=4-6$

图3 各组凝血因子活性比较

抑制剂组比较,药根碱各剂量组 FII 因子活性无显著差异($P>0.05$),表明药根碱具有类似 FII 抑制剂效应。见图 4。



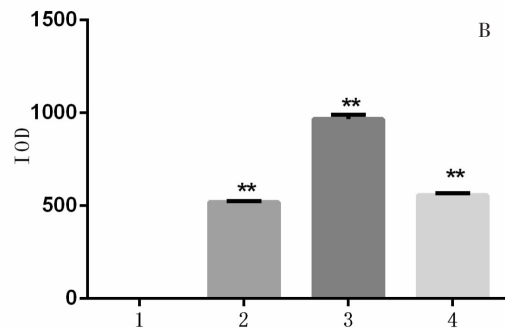
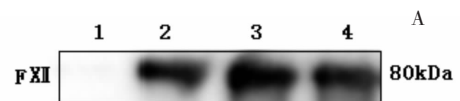
注:1.空白组;2.药根碱低剂量组;3.药根碱中剂量组;4.药根碱高剂量组;5.抑制剂组。与空白组比较,** $P<0.01$, $n=6$

图4 各组血浆 FII 活性比较

2.4 药根碱对 FII 蛋白激活的影响

空白组 FII 蛋白 IOD 为 0,表明没有抑制剂作用,FII 全部被高岭土激活。与空白组比较,抑制剂组和药根碱组 FII 蛋白 IOD 值均显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。说明药根碱和抑制剂都能抑

制高岭土对 FII 蛋白的激活。见图 5。



注:A.WB 显影图;B. 各组 FII 蛋白含量的比较。1.空白组;2.抑制剂组;3.药根碱低剂量组;4.药根碱高剂量组。与空白组比较,** $P<0.01$, $n=3$

图5 药根碱对 FII 蛋白激活的影响

3 讨论

以往研究发现通过基因剔除实验抑制内源性凝血途径的接触激活因子 FII、FXI 可抑制闭塞性血栓

形成。且抑制 FXII 无出血倾向,抑制 FXI 的出血倾向远远低于 FVIII 和 FIX 缺陷,提示接触激活因子 FXII、FXI 参与促进血栓形成的病理过程,却不是生理止血所必需的^[12-14]。在血栓形成过程中,以 FXII 为起点的内源性凝血途径的瀑布反应,产生大量凝血酶,进而产生大量纤维蛋白,使血栓增殖、稳固,从而产生闭塞性血栓。因此,以 FXII 为起点的内源性凝血途径的激活是血栓形成与稳定的关键。诸多实验亦证实,基因剔除 FXII(FXII^{-/-})小鼠可以抑制 FeCl₃ 诱导的颈总动脉和肠系膜动脉血栓形成,而注射 FXII 后,血栓就快速形成^[15-17]。在下腔静脉结扎血栓模型,FXII^{-/-}同样可以抑制深静脉血栓形成^[18]。由此,接触激活因子 FXII 有望成为抗栓药物的新靶点^[19],并且以 FXII 为靶点的抗血栓研究已取得一定进展。Yau J W 等^[20]通过寡义反核苷酸技术 ASO 下调 FXII 表达,可显著抑制小鼠下腔静脉结扎的血栓形成和 FeCl₃ 诱导的肠系膜动脉血栓形成,且同时对尾出血时间并无显著影响。但通过 ASO 下调 FXII 需要的时间长,起效慢,且存在脱靶可能。来源于骚扰蟥中肠的重组 FXIIa 的竞争性抑制物 rHA-infestin-4 具有明显的抗栓效果^[21],但 rHA-infestin-4 在高浓度时抑制 FXa 活性和纤溶酶^[22]。可以口服的小分子 FXIIa 抑制剂如 3-甲酰胺香豆素适合长期抗栓应用,但都有待进一步研究^[23]。

中医药防治心脑血管血栓性疾病疗效肯定,相比目前常用的抗血栓药,中草药可以从多途径、多靶点发挥抗血栓作用,且作用平和,不良反应少。但以往多是从保护血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)、增加 VEC 抗血栓形成,抑制血小板黏附、聚集、释放,增强抗凝、促进纤溶等方面进行研究^[24-26],且对这些药物抗栓的作用机制研究还存在诸多不足。因此,进一步从天然产物中寻找以 FXII 为靶点的抗血栓药物具有重要的应用价值。

为进一步研究药根碱抗血栓作用机制,探讨其是否可以通过抑制内源性凝血途径的激活而发挥抗血栓的作用,寻找其抗栓作用的可能靶点,本研究将药根碱分子与接触激活关键靶蛋白 FXII、FXIIa、FXI 和 FXIa 通过 Ledock 软件进行分子对接,结果显示药根碱与 FXIIa、FXIa 活性中心对接良好,提示药根碱可能对 FXIIa、FXIa 具有抑制作用。进而通过体外实验检测药根碱对家兔血浆 APTT、PT、TT 和 FIB 的

影响,发现药根碱可显著延长 APTT,但不延长 PT 和 TT,而 APTT 是反映内源性凝血途径凝血活性的指标,提示药根碱可能通过与 FXIIa、FXIa 的活性中心结合而抑制内源性凝血途径的活性,从而延长 APTT。我们进一步通过乏因子血浆纠正试验分析了药根碱对凝血过程中主要因子 FXII、FXI、FIX、FVIII、FX 和 FVII 活性的影响,结果显示不同浓度药根碱均显著降低 FXII 活性,其对 FXII 的抑制作用与 CTI(FXII 抑制剂)类似,且高浓度药根碱对 FXI 活性亦有抑制作用,但不影响 FIX、FVIII、FX 和 FVII 的活性,而抗凝药物肝素可显著降低 FXII、FXI、FIX 及 FVIII 的活性,说明药根碱可能主要抑制内源性接触激活因子 FXII 的活性,通过 FXII 影响全程的接触激活内源性凝血途径,对其他凝血因子活性影响较小,其作用不同于肝素,不会导致严重的出血不良反应。采用 Western blot 法检测药根碱在体外对 FXII 蛋白激活的抑制作用,结果显示药根碱和 CTI 类似,均能显著抑制高岭土对 FXII 蛋白的激活。进一步说明药根碱可能以 FXII 为靶点,通过与 FXII 蛋白结合,抑制其激活而抑制内源性凝血途径,从而发挥抗凝血抗栓作用。

综上所述,药根碱具有确切的抗血栓作用,其与 FXIIa 对接良好,可显著延长 APTT,通过抑制 FXII 蛋白激活,降低血浆 FXII 活性,其作用与肝素不同,且不影响血小板、抗凝和纤溶,表明药根碱可能主要作用于内源性凝血系统,可能通过抑制 FXII 蛋白激活、降低 FXII 活性而发挥抗栓作用,但具体的作用形式有待进一步阐明。

参考文献

- [1] WHO. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs sustainable development goals[R]. Geneva, WHO, 2018.
- [2] 牧童,赵思宁,杨慧,等.抗血栓药物研究进展[J].广州化工, 2020,48(11):5-8,21.
- [3] MEGA J L, SIMON T. Pharmacology of antithrombotic drugs: An assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments[J]. The Lancet, 2015, 386(9990): 281-291.
- [4] 贺石林,王东生,文志斌,等.内在凝血途径的接触激活:抗血栓形成研究的新靶点[J].血栓与止血学,2015,21(1):57-64.
- [5] WHEELER A P, GAILANI D. The intrinsic pathway of coagulation as a target for antithrombotic therapy[J]. Hematology/Oncology Clinics of North America, 2016, 30(5): 1099-1114.
- [6] DAVID T, KIM Y C, ELY L K, et al. Factor XIa-specific IgG and a reversal agent to probe factor XI function in thrombosis

- and hemostasis[J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(353): 353ra112.
- [7] 朱水兰,雷婷,高旭,等.药根碱多重调控脂肪胰岛素抵抗细胞葡萄糖转运蛋白的降糖效应研究[J].*中国中药杂志*,2018,43(6):1215-1220.
- [8] QIU H W, SUN S N, MA X M, et al. Jatro rhizine hydrochloride suppresses proliferation, migration, and secretion of synoviocytes in vitro and ameliorates rat models of rheumatoid arthritis in vivo[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1514.
- [9] WU H, HE K, WANG Y Z, et al. The antihypercholesterolemic effect of jatro rhizine isolated from *Rhizoma Coptidis* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(11): 1373-1381.
- [10] 刘惠娜,曹旺,邹芳,等.药根碱抗大鼠动脉血栓和静脉血栓形成作用的研究[J].*中药药理与临床*,2020,36(2):126-132.
- [11] 严宝飞,刘嘉,段金殿,等.基于UPLC法和网络药理学的黄芩茎叶防治新型冠状病毒肺炎潜在作用机制研究[J].*药物评价研究*, 2020,43(6):991-1002.
- [12] RENNÉ T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2012, 34(1): 31-41.
- [13] MAAS C, RENNÉ T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation[J]. *Blood*, 2018, 131(17): 1903-1909.
- [14] RENNÉ T, SCHMAIER A H, NICKEL K F, et al. In vivo roles of factor XII[J]. *Blood*, 2012, 120(22): 4296-4303.
- [15] RENNÉ T, POZGAJOVÁ M, GRÜNER S, et al. Defective Thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, 202(2): 271-281.
- [16] CHENG Q F, TUCKER E I, PINE M S, et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in Thrombus formation in vivo[J]. *Blood*, 2010, 116(19): 3981-3989.
- [17] LARSSON M, RAYZMAN V, NOLTE M W, et al. A factor XIIa inhibitory antibody provides thromboprotection in extracorporeal circulation without increasing bleeding risk [J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(222): 222ra17.
- [18] VON BRÜHL M L, STARK K, STEINHART A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209(4): 819-835.
- [19] KENNE E, NICKEL K F, LONG A T, et al. Factor XII: A novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation[J]. *Journal of Internal Medicine*, 2015, 278(6): 571-585.
- [20] YAU J W, LIAO P, FREDENBURGH J C, et al. Selective depletion of factor XI or factor XII with antisense oligonucleotides attenuates catheter thrombosis in rabbits[J]. *Blood*, 2014, 123(13): 2102-2107.
- [21] MAY F, KRUPKA J, FRIES M, et al. FXIIa inhibitor rHA-Infestin-4: Safe thromboprotection in experimental venous, arterial and foreign surface-induced thrombosis [J]. *British Journal of Haematology*, 2016, 173(5): 769-778.
- [22] XU Y M, CAI T Q, CASTRIOTA G, et al. Factor XIIa inhibition by Infestin-4: In vitro mode of action and in vivo antithrombotic benefit[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2014, 111(4): 694-704.
- [23] BOUCKAERT C, SERRA S, RONDELET G, et al. Synthesis, evaluation and structure-activity relationship of new 3-carboxamide coumarins as FXIIa inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 110: 181-194.
- [24] 阮灏,马晓娟,孙明月,等.益气活血中药抗血栓作用研究进展[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2019,17(1):71-74.
- [25] 华芳,赵玉玲,李堯,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.
- [26] 柳吉玲.活血化瘀药抗血栓作用的研究进展[J].*中国当代医药*, 2013,20(35):15-17.

(本文编辑 苏维)