

许林,魏颖,徐书静,等. 中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 316-325.

Xu L, Wei Y, Xu SJ, et al. Effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 316-325.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.003

中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响

许林^{1,2}, 魏颖^{1,2}, 徐书静¹, 张启云², 郭静^{2,3}, 周舒婷², 孙黔云^{1,2*}

(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014;
3. 山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006)

【摘要】 目的 研究中华眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响。**方法** 体外实验采用中华眼镜蛇毒及其分离峰与大鼠全血孵育,测定血栓弹力图;体内采用尾静脉或肌肉注射眼镜蛇毒,取不同时间点全血测定血栓弹力图;取体内外实验分离的血浆测定LDH活力、血红蛋白、vWF、P-selectin含量并采用酶切发色底物法测定凝血相关酶活性。**结果** 体内外实验结果表明,眼镜蛇毒及其部分分离峰可明显引起大鼠凝血功能的异常,表现为凝血因子减少、纤维蛋白原水平低下、血小板功能减弱;同时大鼠血浆血红蛋白含量及LDH活力显著升高。体外实验中眼镜蛇毒及其部分分离峰可显著下调酶切凝血酶及纤溶酶底物活性。体内实验中肌肉注射后血浆中P-selectin含量0.5 h时显著升高,酶切凝血因子Xa底物活性6 h内显著上调;尾静脉注射后血浆酶切凝血酶底物活性2 h内显著上调,6 h内vWF含量明显升高。**结论** 中华眼镜蛇毒能明显引起大鼠凝血功能的异常,其作用主要与激活凝血系统导致凝血因子消耗、纤维蛋白原减少以及血小板消耗等有关。

【关键词】 中华眼镜蛇毒;凝血功能;蛇伤;血栓弹力图

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0316-10

Effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats

XU Lin^{1,2}, WEI Ying^{1,2}, XU Shujing¹, ZHANG Qiyun², GUO Jing^{2,3}, ZHOU Shuting², SUN Qianyun^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China. 2. the Key Laboratory of Chemistry for Natural Products, Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014. 3. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Corresponding author: SUN Qianyun. E-mail: sunqy@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of *Naja atra* venom on blood coagulation in rats. **Methods** Whole blood was incubated with *Naja atra* venom or various fractions *in vitro* and a thromboelastogram was obtained. In an *in vivo* experiment, *Naja atra* venom was injected via the tail vein or intramuscularly and whole blood samples were collected at various time points to obtain the thromboelastogram. LDH, hemoglobin, vWF, and P-selectin were measured in plasma. The activity of coagulation-related enzymes in plasma was measured by the chromogenic substrate method. **Results** The *in vitro* and *in vivo* result showed that *Naja atra* venom and some of its fractions obviously induced an abnormality in the coagulation function in rats, which was characterized by a lack of coagulation factors, low level of fibrinogen, and lowering of the platelet count and function, while the plasma hemoglobin content and LDH activity were increased significantly. *In vitro*, *Naja atra* venom and its fractions significantly decreased the enzymatic activities of cleaving S2238 and S2251. *In vivo*, after intramuscular injection, the content of P-selectin was significantly increased at 30 min and the enzymatic activity of cleaving S2765 was significantly increased within 6 h. After tail vein injection, the enzymatic activity of cleaving S2238

【基金项目】 国家自然科学基金项目(32160129),贵州省科技计划及平台人才项目(黔科合人才[2016]4018号、黔科合支撑[2018]2828号、黔科合平台人才[2019]5702号)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China(32160129), Guizhou Provincial Science and Technology Foundation (QKHC[2016]4018, QKHZC[2018]2828, QKHPTRC [2019]5702)。

【作者简介】 许林(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:天然毒素蛋白的结构与功能及应用。Email:xulin9712@163.com

【通信作者】 孙黔云(1968—),男,研究员,博士,研究方向:动物毒素结构与功能及应用。Email:sunqy@hotmail.com

was increased significantly within 2 h and vWF content was increased obviously within 6 h. **Conclusions** *Naja atra* venom induces an obvious abnormality in the blood coagulation function of rats. Its effect is mainly related to the consumption of coagulation factors and fibrinogen caused by activation of the coagulation system and the consumption of platelets.

[Keywords] *Naja atra* venom; blood coagulation function; snakebite; thromboelastogram.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

蛇伤是危害劳动者生命健康的全球公共卫生问题,根据世界卫生组织报道,每年毒蛇咬伤多达 270 万人,其中眼镜蛇伤较为普遍^[1]。在我国,眼镜蛇伤的发病率居蛇伤的第二位(16.68%),病死率为 1.6%,其临床表现主要有局部水肿,坏死,麻痹,运动障碍等^[2-3]。临床眼镜蛇伤患者中有的表现出凝血功能的异常^[4],而有的患者没有表现出凝血功能的异常^[5],由于临床蛇伤的复杂性,对于凝血功能的异常是否是眼镜蛇伤的必然结果并没有明确的结论,迄今关于眼镜蛇毒对凝血功能的影响研究较少,且早期研究大多采用血浆测定凝血 4 项^[6-7],测定过程无血细胞参与,无法完全反映凝血变化过程,因此有必要进一步开展眼镜蛇毒对凝血功能的影响研究。本研究基于全血凝血功能测定的方法,进行眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响,以期临床救治及相关新药研究提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

80 只 6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2019-0008】。SPF 级饲料购于北京华阜康生物科技股份有限公司【京饲证(2019)06076】,饲养环境:相对湿度 40% ~ 70%,温度控制在 22 ~ 25℃,饲养期间各组大鼠自由饮水,饲养于贵州医科大学天然产物化学重点实验室【SYXK(黔)2018-0001】。实验动物方案经贵州医科大学实验动物伦理委员会审查通过(审批号:No. 2101082),动物福利均符合相关实验动物管理条例。

1.1.2 主要试剂与仪器

中华眼镜蛇毒(*Naja atra* venom)冻干粉(贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室),蛋白分离介质 SP Sephadex C-25(GE Healthcare 公司,美国),血栓弹力图试剂盒普通杯(北京乐普生物技术有限公司,中国),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司,中国),vWF 以及

P-selectin 试剂盒(武汉基因美科技有限公司,中国);纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,中国),纤溶酶底物 S2251、凝血因子 Xa 底物 S2765、凝血酶底物 S2238、组织型纤溶酶原激活剂底物 S2288、血浆激肽酶底物底物 S2302(上海船夫生物技术有限公司,中国),其他所用试剂均为国产分析纯,符合实验要求。

CFMS LEPU-8800 血栓弹力图仪(北京乐普生物技术有限公司,中国),Spectra MAX-190 连续波长酶标仪(Molecular Devices 公司,美国),Milli Q 超纯水系统(Millipore 公司,美国),5810R 冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 眼镜蛇毒及其分离峰制备

称取 0.1 g 眼镜蛇毒冻干粉溶于 1 mL PBS 缓冲液,3000 rpm 离心 10 min,取上清分装冻存。

经 SP Sephadex C-25 柱分离眼镜蛇毒,参照文献^[8]收集样品,编号为 FI ~ FVII。测定 OD 值后换算成蛋白含量,再使用含 0.15 mol/L NaCl 的醋酸钠缓冲液稀释成所需要的浓度后分装冻存。

1.2.2 动物样本采集

(1)体外实验:10 只 SPF 级雄性 SD 大鼠适应性喂养 3 d 后禁食 12 h,腹腔注射 10 mg/mL 戊巴比妥钠麻醉,经腹主动脉取血,枸橼酸钠抗凝管中混匀,每两只混合后共制备 60 mL 全血,一共 5 批全血供实验使用。取眼镜蛇毒、FI ~ FVII 分离峰不同浓度 50 μ L 加入至 1 mL 大鼠全血中,以 PBS 为对照,混匀,37℃ 孵育 30 min,取 340 μ L 血样测定血栓弹力图,其余血样 3000 rpm 离心 10 min,取上清分装冻存。

实验设置眼镜蛇毒高、中、低剂量组为 125、12.5、1.25 μ g/mL;FI ~ FVII 为 25 μ g/mL;FI 高、中、低剂量组为 25、2.5、0.8 μ g/mL;FVI 高、中、低剂量组为 50、25、12.5 μ g/mL。上述浓度均为终浓度。

(2)体内实验:70 只 SD 大鼠适应性喂养 3 d,随机分为肌肉注射组、尾静脉注射组和 PBS 对照组,每组 6 ~ 9 只不等,分别将眼镜蛇毒 0.5 mg/kg 一次性尾静脉注射和 1 mg/kg 一次性肌肉注射至大

鼠体内,于注射后 0.5、1、2、6 h 取血,将血样混匀后取 340 μ L 血样进行血栓弹力图测定,其余血样 3000 rpm 离心 10 min,取上清分装冻存。

1.2.3 血栓弹力图(TEG)测定

血栓弹力图普通杯测试试剂盒恢复至室温,血栓弹力图仪升温至 37℃,取全血血样 1 mL 与试剂 1 混合,颠倒 4 ~ 5 次后静置 4 min,取 340 μ L 血样加入普通杯杯槽中,加入 20 μ L 试剂 2,测定血栓弹力图。

1.2.4 LDH 活性测定

取体内或体外制备的大鼠血浆按照酶活测定方法测定 LDH 活性。

按式(1)计算 LDH 活性(U/L):
$$\text{LDH 活性} = \frac{\text{测定 OD}_{450} - \text{对照 OD}_{450}}{\text{标准 OD}_{450} - \text{空白 OD}_{450}} \times 0.2 \times 1000(1)$$

1.2.5 血浆血红蛋白含量测定

取体内或体外制备的血浆用 PBS 稀释 10 倍后取 200 μ L 加入 96 孔板,于 412 nm 处测定吸光度,以 $A_{412\text{ nm}}$ 值表示血红蛋白含量。

1.2.6 酶切发色底物活性测定

参考文献^[9],取体内或体外制备的血浆采用单一时间点法和酶动力学方法测定酶切纤溶酶底物 S2251、凝血因子 Xa 底物 S2765、凝血酶底物 S2238、组织型纤溶酶原激活剂底物 S2288、血浆激肽酶底物 S2302 活性,以 1 mg/mL 原矛头蝮蛇毒(*Protobothrops mucrosquamatus* venom, PMV)为阳性对照,PBS 为阴性对照,取血浆 20 μ L 或 40 μ L、相关底物 40 μ L 或 20 μ L、PBS 40 μ L,总体系为 100 μ L,混匀后 37℃ 恒温避光孵育,设置孵育时间 4 或 6 h、间隔检测时间 15 或 30 min 测定 $A_{405\text{ nm}}$ 。

1.2.7 FIB、P-selectin、vWF 含量

取制备的血浆采用 ELISA 法测定 P-selectin、

vWF 含量,采用凝固法测定 FIB 含量。

1.3 统计学分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 22.0 软件进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 眼镜蛇毒分离峰的制备

眼镜蛇毒经 SP Sephadex C-25 分离后获得 7 个主要分离峰(图 1)。命名为 FI ~ FVII。

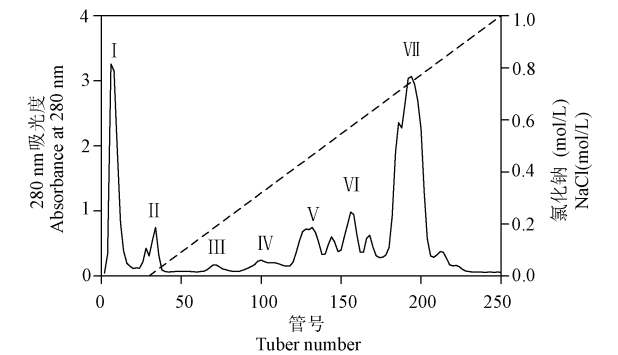


图 1 眼镜蛇毒 SP-Sephadex C-25 层析图

Figure 1 Ion-exchange chromatography of *Naja atra* venom on a SP-Sephadex C-25 column

2.2 体外实验结果

2.2.1 血栓弹力图结果

表 1 显示,与空白组相比,FI、FVI、FVII 分离峰能显著延长 R 值($P < 0.05$),提示凝血因子性低凝。FIV、FV、FVI 分离峰显著减小 Angle 值($P < 0.05$),表明纤维蛋白原功能性低凝。FIII、FIV、FV、FVI、FVII 分离峰 CI 值显著减小($P < 0.05$),提示血液处于低凝状态。

表 2 可知,与空白组相比 FI (25、2.5 μ g/mL) 及 FVI (50 μ g/mL) 均延长 R 值($P < 0.01$)。除 FI

表 1 FI ~ FVII 血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of TEG of FI ~ FVII($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	凝血因子激活时间(min) R(min)	血块形成速率(min) K(min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA(mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	1.73 $\pm$ 0.06	0.80 $\pm$ 0.00	79.47 $\pm$ 0.80	75.10 $\pm$ 3.05	6.00 $\pm$ 0.36
FI	30.13 $\pm$ 2.15**	—	—	—	—
FII	2.03 $\pm$ 0.21	1.07 $\pm$ 0.38	75.93 $\pm$ 5.57	70.03 $\pm$ 3.99	4.80 $\pm$ 1.04
FIII	2.27 $\pm$ 0.50	1.10 $\pm$ 0.30	75.03 $\pm$ 3.75	70.40 $\pm$ 3.70	4.60 $\pm$ 0.70*
FIV	3.57 $\pm$ 1.10	1.30 $\pm$ 0.36	71.63 $\pm$ 4.44*	69.27 $\pm$ 4.20	3.27 $\pm$ 0.78**
FV	3.23 $\pm$ 0.81	1.10 $\pm$ 0.17	73.90 $\pm$ 1.95**	69.97 $\pm$ 2.97	3.83 $\pm$ 0.55**
FVI	3.57 $\pm$ 0.68*	1.63 $\pm$ 0.42	65.40 $\pm$ 4.03**	67.17 $\pm$ 2.06*	2.47 $\pm$ 0.95**
FVII	2.67 $\pm$ 0.42*	0.87 $\pm$ 0.12	76.57 $\pm$ 3.27	73.03 $\pm$ 2.68	4.83 $\pm$ 0.32*

注:与空白组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。(下表同)
Note. Compared with control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. (The same in the following tables)

(25 μg/mL),FI、FVI其余各浓度均增大 K 值($P < 0.05$),减小 Angle 值($P < 0.05$),提示纤维蛋白原功能性低凝。FVI(50、25 μg/mL)减小 MA($P < 0.05$),提示血小板性低凝。FI、FVI各浓度均降低 CI 值($P < 0.05$)。

表 3 显示,眼镜蛇毒(125、12.5 μg/mL)延长 R 值($P < 0.01$)。3 个浓度均降低 Angle 值($P < 0.01$),降低 CI 值($P < 0.01$),且浓度越大,CI 值

越小。

图 2 可知眼镜蛇毒 12.5 μg/mL、FI 2.5 μg/mL、FVI 25 μg/mL 浓度下血栓弹力图与对照组相比均产生明显变化。

2.2.2 LDH 结果

图 3 显示,与空白组相比,眼镜蛇蛇毒(125、12.5 μg/mL)、FI(25、2.5 μg/mL)、FIV 及 FVII 分离峰孵育后血浆显著增高 LDH 活力($P < 0.05$)。

表 2 FI 和FVI血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

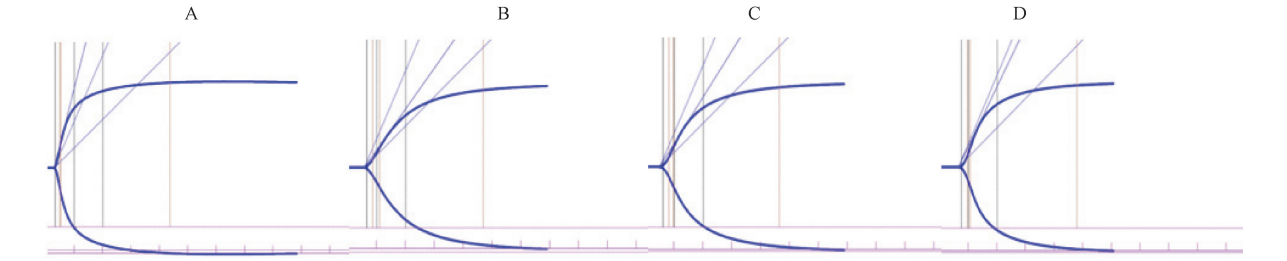
Table 2 Results of TEG of FI and FVI($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	1.73 ± 0.06	0.80 ± 0.00	79.47 ± 0.8	75.10 ± 3.05	6.00 ± 0.36
FI	25.0 30.13 ± 2.15**	—	—	—	—
	2.5 2.80 ± 0.26**	1.73 ± 0.21*	66.67 ± 2.74**	64.77 ± 6.38	2.70 ± 0.95**
	0.8 3.20 ± 0.95	1.43 ± 0.21*	70.43 ± 2.19**	68.77 ± 2.11*	3.33 ± 0.50**
FVI	50.0 3.07 ± 0.15**	1.70 ± 0.10**	66.67 ± 2.20**	60.43 ± 6.16*	2.03 ± 0.91**
	25.0 3.07 ± 0.64	1.37 ± 0.12*	68.60 ± 3.39**	67.10 ± 2.17*	3.10 ± 0.26**
	12.5 2.27 ± 0.32	1.37 ± 0.15*	70.90 ± 1.08**	67.53 ± 8.51	3.83 ± 0.92*

表 3 眼镜蛇毒不同浓度血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Results of TEG with different concentrations of *Naja atra* venom($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	1.73 ± 0.06	0.80 ± 0.00	79.47 ± 0.80	75.10 ± 3.05	6.00 ± 0.36
眼镜蛇毒 <i>Naja atra</i> venom	125.00 6.23 ± 0.06**	2.40 ± 0.44*	59.87 ± 5.20*	63.03 ± 5.45*	0.23 ± 0.40**
	12.50 3.63 ± 0.29**	1.60 ± 0.60	65.23 ± 2.98**	71.40 ± 3.91	2.93 ± 0.72**
	1.25 2.80 ± 0.00	1.13 ± 0.06**	74.30 ± 0.72**	69.50 ± 0.85*	4.10 ± 0.10**



注:A:对照;B:眼镜蛇毒 12.5 μg/mL;C:FI 2.5 μg/mL;D:FVI 25 μg/mL

图 2 体外孵育后大鼠全血血栓弹力图变化

Note. A. Control. B. *Naja atra* venom 12.5 μg/mL. C. FI 2.5 μg/mL. D. FVI 25 μg/mL.

Figure 2 Changes of whole blood TEG in rats after *in vitro* incubation

2.2.3 血红蛋白含量

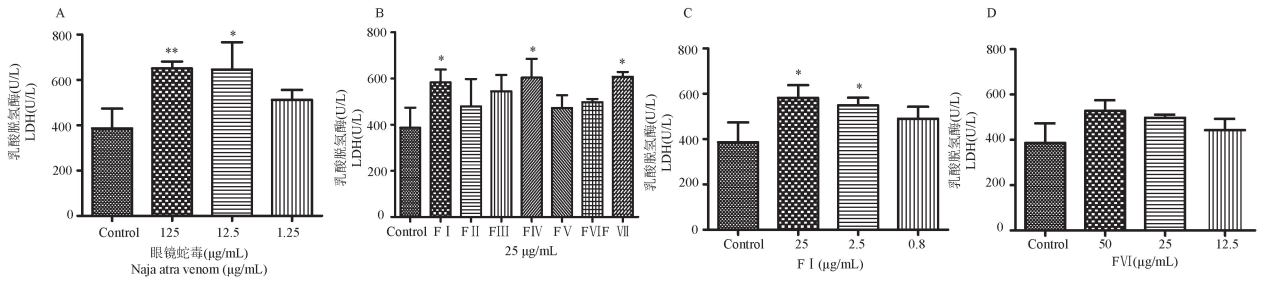
图 4 可知眼镜蛇蛇毒(125、12.5、1.25 μg/mL)、FI(25、2.5、0.8 μg/mL)、FII、FIV、FVI(50、25、12.5 μg/mL)及 FVII 分离峰血红蛋白含量显著升高($P < 0.05$)。

2.2.4 酶切发色底物活性测定结果

由图 5A、5B、5C、5D 可知与空白组相比眼镜蛇毒(125、12.5、1.25 μg/mL)及 FVI 分离峰(50、25

μg/mL)均下调酶切凝血酶 S2238 底物活力($P < 0.05$)。

由图 5E、5F 可知空白组相比眼镜蛇毒(125、12.5、1.25 μg/mL)酶切纤溶酶 S2251 底物活性随浓度增加而减小($P < 0.05$)。图 5G、5H、5I、5J、5K、5L 可知 FI、FII、FIII、FVI(50、25 μg/mL)、FVII 分离峰酶切纤溶酶底物 S2251 活性均显著上调($P < 0.05$)。

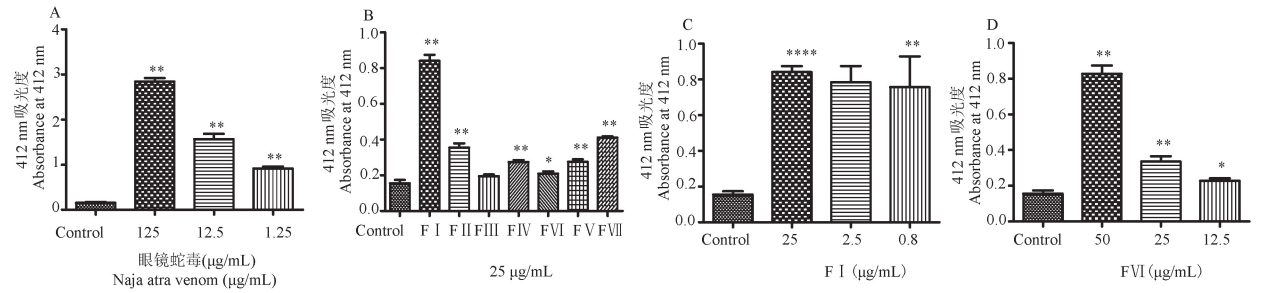


注:A:不同浓度眼镜蛇毒;B:FI ~FⅦ;C:不同浓度 FI ;D:不同浓度 FⅥ;与空白相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下同)

图 3 体外孵育后大鼠血液中 LDH 变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A. *Naja atra* venom in different concentrations. B. FI ~FⅦ. C. FI in different concentrations. D. FⅥ in different concentrations. Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures).

Figure 3 Changes of LDH in the blood of rats after *in vitro* incubation($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注:A:不同浓度眼镜蛇毒;B:FI ~FⅦ;C:不同浓度 FI ;D:不同浓度 FⅥ。

图 4 体外孵育后大鼠血液中血红蛋白含量变化

Note. A. *Naja atra* venom in different concentrations. B. FI ~FⅦ. C. FI in different concentrations. F. FⅥ in different concentrations.

Figure 4 Changes of hemoglobin content in rat blood after *in vitro* incubation

2.3 体内实验结果

2.3.1 血栓弹力图结果

表 4 可知,肌肉注射组 0.5、2、6 h 内 K 值显著增大($P < 0.05$),Angle 及 CI 值 6 h 内显著减小($P < 0.01$),1 ~ 6 h MA 值显著减小($P < 0.01$),且该注射方式 6 h 出现一定程度的纤溶亢进,与空白组

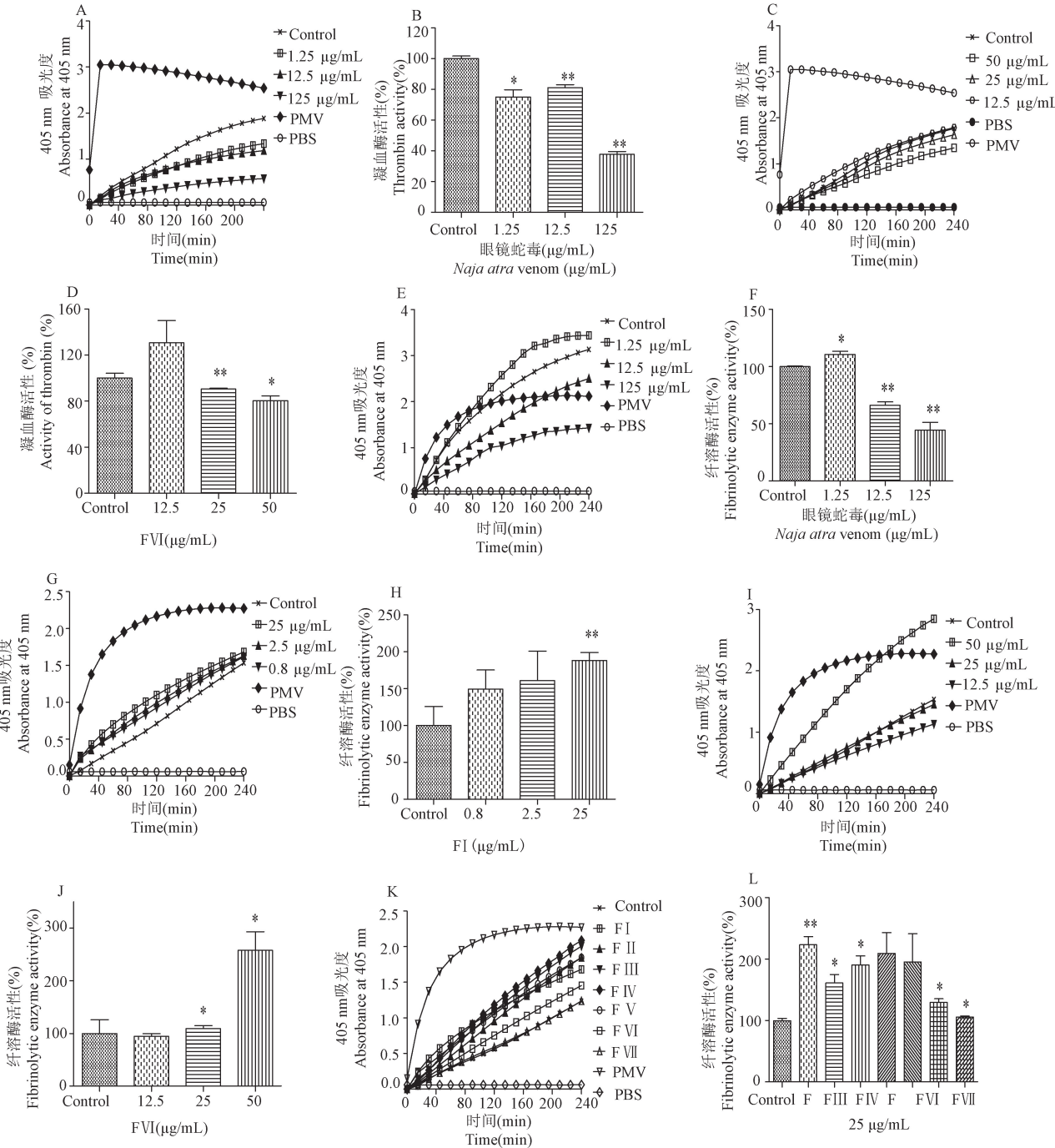
相比具有显著性差异($P < 0.01$),提示低凝出血风险增大。由表 5 可知,静脉注射眼镜蛇毒 1 h 内 K 值显著增大($P < 0.05$),Angle、MA、CI 显著减小($P < 0.01$),1 h 达最小值,提示低凝出血风险增大。由图 6 可知肌肉注射和尾静脉注射组血栓弹力图与空白组相比均有明显变化。

表 4 肌肉注射组不同时间点血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Results of TEG at different time points in intramuscular injection group($\bar{x} \pm s$)							
组别 Groups	<i>n</i>	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI	纤溶速率(%) LY30(%)
对照 Control	6	1.78 ± 0.57	0.80 ± 0.00	81.87 ± 1.96	75.42 ± 1.84	6.17 ± 0.56	0.00 ± 0.00
0.5 h	7	2.96 ± 1.05 *	1.04 ± 0.21 *	75.09 ± 3.74 **	70.76 ± 4.97	4.23 ± 1.27 **	0.00 ± 0.00
1 h	7	2.44 ± 0.96	1.03 ± 0.25	75.77 ± 4.11 **	69.71 ± 3.33 **	4.15 ± 1.07 **	0.00 ± 0.00
2 h	9	2.43 ± 0.66	1.14 ± 0.36 *	74.47 ± 5.28 **	67.78 ± 5.44 **	4.13 ± 1.46 **	0.00 ± 0.00
6 h	6	2.50 ± 0.43 *	0.95 ± 0.14 *	76.78 ± 1.75 **	69.68 ± 4.00 **	4.58 ± 0.46 **	8.65 ± 8.01 **

表 5 尾静脉注射组不同时间点血栓弹力图测定结果($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Results of TEG at different time points in intravenous injection group($\bar{x} \pm s$)						
组别 Groups	<i>n</i>	凝血因子激活时间(min) R (min)	血块形成速率(min) K (min)	血凝速率(°) Angle(°)	最大振幅(mm) MA (mm)	综合凝血指数 CI
对照 Control	6	2.27 ± 0.49	0.85 ± 0.12	79.82 ± 2.65	74.48 ± 2.07	5.58 ± 0.74
0.5 h	8	3.16 ± 1.13	1.28 ± 0.43 *	72.18 ± 5.91 *	66.93 ± 3.80 **	3.50 ± 1.46 **
1 h	8	3.36 ± 1.06 *	1.29 ± 0.44 *	71.94 ± 5.89 **	65.71 ± 4.69 **	3.06 ± 1.68 **
2 h	7	3.24 ± 1.29	0.99 ± 0.38	75.60 ± 5.20	70.73 ± 5.07	4.11 ± 1.90
6 h	6	2.55 ± 0.34	0.87 ± 0.16	78.50 ± 2.89	69.95 ± 4.65	4.73 ± 0.68

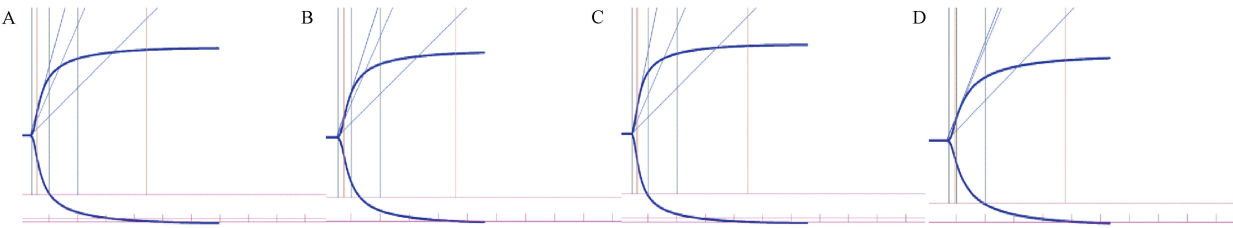


注:A,B:不同浓度眼镜蛇毒酶切 S2238 底物酶动力学曲线及酶活力变化;C,D:不同浓度 FVI 酶切 S2238 底物酶动力学曲线及酶活力变化;E,F:不同浓度眼镜蛇毒酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化;G,H:不同浓度 FI 酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化;I,J:不同浓度 FVI 酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化;K,L:FI ~ FVII 酶切 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化

图 5 体外孵育后血浆酶切 S2238 和 S2251 底物酶动力学曲线及酶活力变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. A, B. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2238 of *Naja atra* venom in different concentrations. C, D. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2238 of FVI in different concentrations. E, F. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of *Naja atra* venom in different concentrations. G, H. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of FI in different concentrations. I, J. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of FVI in different concentrations. K, L. Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2251 of FI ~ FVII.

Figure 5 Changes of enzyme kinetic curves and enzymatic activities of cleaving S2238 and S2251 in plasma after incubation *in vitro*($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注:A:肌肉注射对照组;B:肌肉注射 2 h;C:尾静脉注射对照组;D:尾静脉注射 1 h。

图 6 注射眼镜蛇毒后大鼠血栓弹力图变化

Note. A. Intramuscular injection control. B. Intramuscular injection 2 h. C. Intramuscular injection control. D. Intramuscular injection 1 h.

Figure 6 Changes of TEG after injection of *Naja atra* venom in rats

2.3.2 LDH 结果

由图 7 可知与空白组对比,两种注射方式 6 h 内 LDH 活力显著增高($P < 0.05$)。

2.3.3 血浆血红蛋白含量

由图 8 可知,与空白组相比,肌肉注射组 1、6 h 时血红蛋白含量显著增高($P < 0.05$),静脉注射组 2 h 内血红蛋白含量显著增高($P < 0.01$)。

2.3.4 FIB 测定结果

由图 9 知尾静脉注射组 FIB 含量在 1 h 和 6 h 时与空白组相比存在显著性差异($P < 0.05$),肌肉

注射组各时间点 FIB 含量均有一定降低,但无统计学意义(数据未列出)。

2.3.5 酶切发色底物活性实验结果

由图 10A,10B 可知尾静脉注射组在 2 h 内酶切凝血酶底物 S2238 活性与空白组相比产生显著性差异($P < 0.05$)。由图 10C,10D 可知肌肉注射组 6 h 内酶切凝血因子 Xa 底物 S2765 活性与空白组比较具有显著性差异($P < 0.01$)。酶切纤溶酶底物 S2251、血浆激肽酶底物 S2302 及组织型纤溶酶原激活剂底物 S2288 活性与空白组相比无显著性差异(数据未列出)。

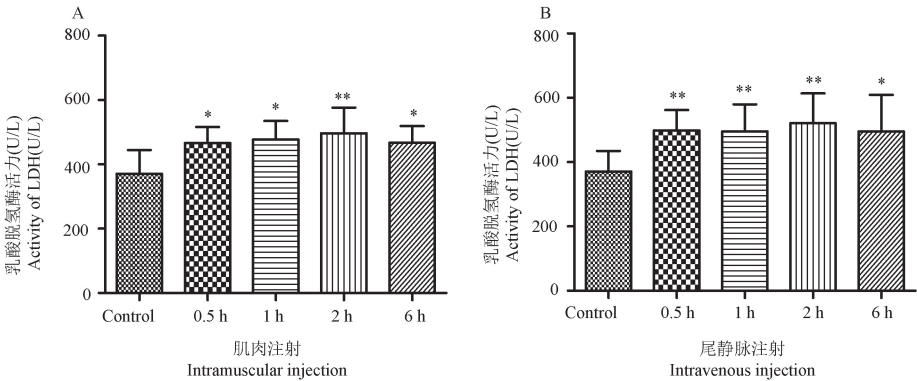


图 7 大鼠注射眼镜蛇毒后不同时间点 LDH 变化

Figure 7 Changes of LDH at different time points after injection of *Naja atra* venom in rats

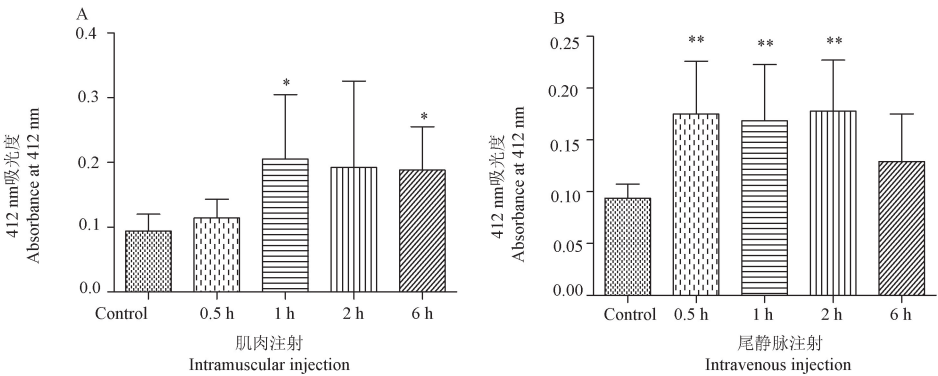


图 8 大鼠注射眼镜蛇毒后不同时间点血红蛋白含量变化

Figure 8 Changes of hemoglobin content at different time points after injection of *Naja atra* venom in rats

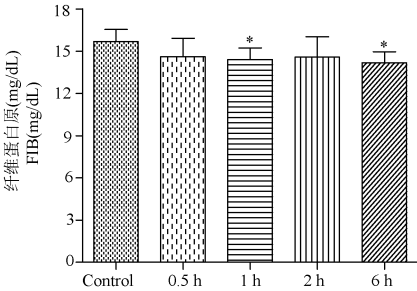
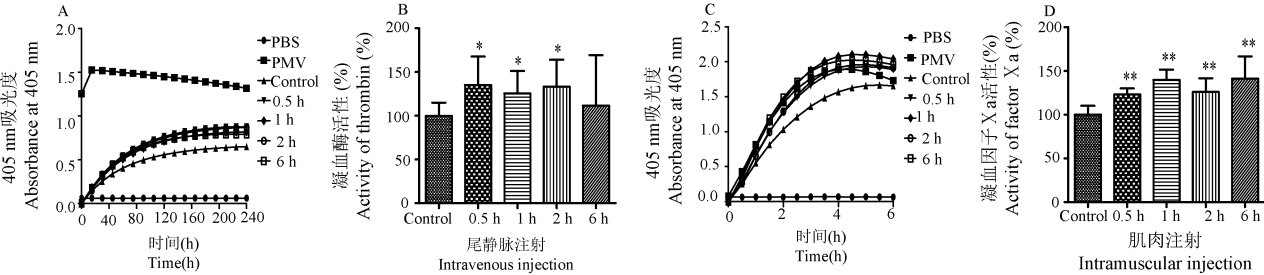


图 9 尾静脉注射眼镜蛇毒后不同时间点 FIB 变化
Figure 9 Changes of FIB at different time points after injection of *Naja atra* venom into the tail vein



注:A,C:酶切 S2238 及 S2765 底物动力学曲线变化;B,D:酶切 S2238 及 S2765 底物活力变化。
Note. A, C. Changes of the enzyme kinetics curves of cleaving S2238 and S2765. B, D. Changes of enzymatic activities of cleaving S2238 and S2765.
Figure 10 Changes of enzyme kinetics curves and enzymatic activities of cleaving S2238 and S2765 after injection of *Naja atra* venom in plasma of rats

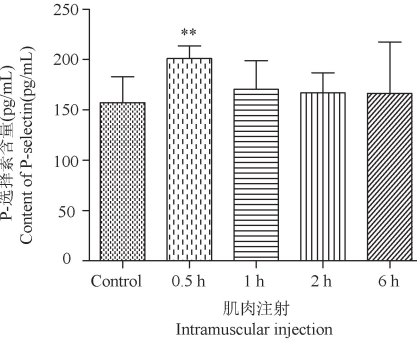


图 11 肌肉注射眼镜蛇毒后大鼠血液中 P-selectin 变化
Figure 11 Changes of P-selectin in rats blood after injection of *Naja atra* venom

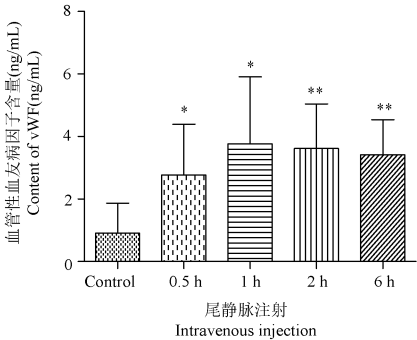


图 12 注射眼镜蛇毒后大鼠血液中 vWF 变化
Figure 12 Changes of vWF in rats blood after injecting *Naja atra* venom

2. 3. 6 P-selectin 测定结果

由图 11 可知,肌肉注射眼镜蛇毒 0.5 h 时 P-selectin 含量显著增高($P < 0.01$)。静脉注射 0.5 h 时 P-selectin 有上调但无统计学意义(数据未列出)。

2. 3. 7 vWF 测定结果

由图 12 可见,尾静脉注射眼镜蛇毒后 6 h 内 vWF 含量显著增高($P < 0.05$),1 h 时变化最为明显。肌肉注射组有一定升高但无统计学意义(数据未列出)。

3 讨论

临床上眼镜蛇伤病人情况复杂,部分眼镜蛇伤病例中凝血功能障碍不明显^[10],但少部分急危重症眼镜蛇伤病人伴有凝血功能的异常,主要表现为活化部分凝血活酶时间(APTT)延长、凝血酶原时间(PT)延长、凝血酶时间(TT)延长、纤维蛋白原(FIB)下降^[11-12],眼镜蛇伤是否与凝血功能障碍有必然联系,尚未能完全确定。目前眼镜蛇伤相关研究多聚焦在其神经毒、细胞毒等毒素方面的影响^[13-14]。关于眼镜蛇毒对凝血功能影响的基础研究不多,从 1973 年到 2021 年,在 CNKI、维普网、万方数据、PubMed 数据库上可查询到文献较少,且早期研究多采用血浆测定凝血四项,常规凝血四项主要采用抗凝血浆检测 APTT、PT、TT、FIB,血浆中不含血细胞,只检测血浆本身凝血功能,故不能完全反应凝血变化的病理生理过程。因此有必要从基础研究的角度进一步认识和阐明眼镜蛇毒对凝血功能的影响情况。针对凝血四项的不足,血栓弹力图可用全血监测血液凝固动态全过程,能比较好地弥补传统凝血检测中无血细胞参与的不足,更接近临床实际凝血变化。基于此,本研究利用血栓弹力

图研究和评价眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响,以便进一步认识眼镜蛇伤中凝血功能的影响,为临床救治和新药研究提供科学参考。

研究表明眼镜蛇毒属于混合型毒素,既有血液毒,又有神经毒,其主要功能组分有神经毒素、细胞毒素、金属蛋白酶、眼镜蛇毒因子、氧化酶类、水解酶类等成分^[15]。为进一步认识眼镜蛇毒不同组分对凝血功能的影响,本研究体外实验中采用能较好地将眼镜蛇毒组分分开的 SP-Sephadex C-25 凝胶进行分离,得到 7 个分离峰,其中 FI 峰含有磷脂酶 A2、L-氨基酸氧化酶、眼镜蛇毒因子、蛇毒金属蛋白酶^[16-17],FII 中主要含有乙酰胆碱酯酶,FIII 中主要含有磷酸二酯酶^[17],FIV、FV 峰中富含半胱氨酸蛋白、蛇毒金属蛋白酶及神经生长因子^[16],FVI 中主要含有神经毒素^[17],FVII 中主要含有细胞毒素^[17]。血栓弹力图实验及相关活性结果表明 FI 峰孵育后全血 R 值显著延长,血液未凝固,说明血液凝血功能异常,这可能由于 FI 峰中磷脂酶 A2、L-氨基酸氧化酶、蛇毒金属蛋白酶抑制血小板聚集所引起^[18-19],同时血浆中血红蛋白含量显著上升,LDH 活力升高,表明细胞膜完整性遭到破坏,这可能由眼镜蛇毒因子激活补体生成攻膜复合物、磷脂酶 A2 酶切卵磷脂产生溶血卵磷脂等引起^[20-21]。FIV 峰综合凝血指数 CI 显著降低,血红蛋白含量升高,提示该峰中的金属蛋白酶可通过抑制血小板等表现出抗凝作用,除此之外可能存在细胞毒素,造成血红蛋白的升高。FV、FVI 峰血栓弹力图结果显示凝血因子减少,纤维蛋白原减少,血小板功能减弱,可能是 FV 峰中某些金属蛋白酶切割直接凝血因子,水解纤维蛋白原,抑制血小板聚集所导致^[22]。此外 FVI、FVII 峰孵育后血浆血红蛋白含量升高,说明 FVI、FVII 组分含有细胞毒素可破坏细胞,溶解红细胞造成血红蛋白含量升高^[17]。酶切发色底物结果表明,随眼镜蛇毒浓度增大,孵育处理后血浆切割凝血酶底物、纤溶酶底物活性显著下调,这与血栓弹力图中表现出凝血因子减少这一变化保持一致。

体内血栓弹力图实验表明眼镜蛇毒具有显著的抗凝作用,0.5 mg/kg 浓度下尾静脉注射组大鼠及 1 mg/kg 浓度下肌肉注射组大鼠均表现出凝血因子、纤维蛋白原减少,血小板功能的减弱,1 h 内尾静脉注射组大鼠抗凝效果略优于肌肉注射组。大鼠注射眼镜蛇毒后凝血因子的减少可能是凝血系统激活导致凝血因子的消耗。文献报导大鼠注射

眼镜蛇毒后能够延长 APTT、PT,该结果也提示凝血因子存在减少或缺乏^[6]。通过测定纤维蛋白原的含量发现,尾静脉注射后大鼠血浆各时间点纤维蛋白原均有一定的下降,这可能是体内凝血系统被激活导致纤维蛋白原消耗也可能是纤维蛋白原被酶切水解所致。同时体内注射眼镜蛇毒后 P-selectin、vWF 含量、血红蛋白含量及 LDH 活力均有不同程度的增加。P-selectin 是内皮细胞和血小板含有的黏附分子,vWF 是内皮细胞含有的分子,二者均可作为血小板活化和内皮细胞损伤的标志物^[23-25]。P-selectin、vWF 含量上调提示眼镜蛇毒在体内引起内皮细胞、血小板激活与消耗,从而在血栓弹力图中表现为 MA 值降低,血小板功能的减弱。同时血浆血红蛋白含量及 LDH 活力增高提示细胞损伤,其原因为眼镜蛇毒中细胞毒素,磷脂酶 A2 等造成细胞膜的破坏,进一步造成继发性凝血功能紊乱。酶切发色底物活性测定结果表明两种注射方式酶切凝血酶、凝血因子 Xa 底物活性均有一定上调,提示眼镜蛇毒注射到大鼠体内后激活了凝血系统,导致凝血因子被消耗,从而表现出凝血因子的减少。

本研究基于大鼠全凝血功能评价,结合血管内皮损伤等指标,通过体内体外实验展示了眼镜蛇毒对大鼠凝血功能的影响,其作用与激活凝血系统导致凝血因子消耗、纤维蛋白原减少、血小板消耗等有关。上述结果能够进一步认识眼镜蛇毒对凝血功能毒性机理,本研究有助于为临床蛇伤防治策略及新药研究提供参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] World Health Organization. Snakebite envenoming [EB/OL]. [2021-05-17]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.
- [2] 林正奎, 罗毅. 中华眼镜蛇咬伤治疗研究概况 [J]. 蛇志, 2018, 30(2): 327-330.
Lin ZK, Luo Y. A survey of research on treatment of *Naja atra* bite [J]. J SNAKE, 2018, 30(2): 327-330.
- [3] Faiz MA, Ahsan MF, Ghose A, et al. Bites by the monocled cobra, *Naja kaouthia*, in chittagong division, bangladesh: epidemiology, clinical features of envenoming and management of 70 identified cases [J]. Am J Trop Med Hyg, 2017, 96(4): 876-884.
- [4] 谢勤丽, 王灿, 李涛. 重庆地区蛇咬伤后急救处理 [J]. 创伤外科杂志, 2015, 17(3): 236-239.
Xie QL, Wang C, Li T. Research of emergency treatment of snakebite in Chongqing [J]. J Traumatol Surg, 2015, 17(3): 236-239.
- [5] 冯庆金. 凝血功能在毒蛇咬伤治疗前后变化规律的研究 [J]. 黑龙江中医药, 2021, 50(2): 407-408.

- Feng QJ. Study on the changes of coagulation function before and after treatment of snakebite [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2021, 50(2): 407-408.
- [6] 杨嘉琳, 孔天翰. 危急重症眼镜蛇伤大鼠多项凝血指标动态变化 [J]. 蛇志, 2010, 22(3): 198-202.
- Yang JL, Kong TH. Dynamic changes of multiple blood coagulation functions in a rat model with intensive *Naja atra* cantor snakebite [J]. J SNAKE, 2010, 22(3): 198-202.
- [7] 唐荣德, 李景新, 蒋三员, 等. 眼镜蛇伤模型造模探讨及多项指标的动态观察 [J]. 蛇志, 2003, 15(2): 25-28.
- Tang RD, Li JX, Jiang SY, et al. Exploration of making models with cobratox in and trending observation of many indices for models [J]. J SNAKE, 2003, 15(2): 25-28.
- [8] 孙黔云, 李敏, 杨付梅. 眼镜蛇毒中一个弱纤维蛋白原水解活性金属蛋白酶的纯化和性质研究 (英文) [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(10): 835-843.
- Sun QY, Li M, Yang FM. Purification and characterization of a metalloproteinase with weak fibrinogenolytic activity from *Naja atra* venom [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2007, 23(10): 835-843.
- [9] 李亚男, 孙黔云, 路青瑜. 原矛头蝮蛇毒及其分离峰对凝血功能的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(2): 284-290.
- Li YN, Sun QY, Lu QY. Effect of *Protobothrops mucrosquamatus* venom and its fractions on blood coagulation [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2015, 29(2): 284-290.
- [10] 贺华. 眼镜蛇咬伤中毒的临床特征与院前急救策略分析 [D]. 衡阳: 南华大学; 2015.
- He H. The clinical features and pre-hospital first aid strategies of patients with cobra bites: a retrospective analysis of 115 cases [D]. Hengyang: University of South China; 2015.
- [11] 周冬林, 陈宇, 胡春安, 等. 中药加血液灌流治疗眼镜蛇咬伤的临床观察 [J]. 江西医药, 2015, 50(12): 1450-1452.
- Zhou DL, Chen Y, Hu CA, et al. Clinical observation on treatment of Cobra bite with traditional Chinese medicine and hemoperfusion [J]. Jiangxi Med J, 2015, 50(12): 1450-1452.
- [12] 吴鑫钟, 曾林生, 赵强, 等. 蛇毒清合剂/放血疗法联合西医常规治疗眼镜蛇咬伤的临床效果 [J]. 中国当代医药, 2021, 28(11): 182-185.
- Wu XZ, Zeng LS, Zhao Q, et al. Clinical effect of Sheduqing mixture, bloodletting combined with routine western medicine in the treatment of *Naja bite* [J]. Chin Mod Med, 2021, 28(11): 182-185.
- [13] Zhao C, Zhao J, Yang Q, et al. Cobra neurotoxin produces central analgesic and hyperalgesic actions via adenosine A1 and A2A receptors [J]. Mol Pain, 2017, 13: 1744806917720336.
- [14] Chiou JT, Wang LJ, Lee YC, et al. *Naja atra* cardiotoxin 1 induces the FasL/Fas death pathway in human leukemia cells [J]. Cells, 2021, 10(8): 2073.
- [15] Liu CC, Lin CC, Hsiao YC, et al. Proteomic characterization of six Taiwanese snake venoms: Identification of species-specific proteins and development of a SISCAPA-MRM assay for cobra venom factors [J]. J Proteomics, 2018, 187: 59-68.
- [16] 云南省动物研究所第四研究室. 蛇毒的研究和利用 II. 湖南产眼镜蛇毒(*Naja Naja atra*)的柱层析分离及各分离峰的毒性和酶活力测定 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1976, 8(2): 157-160.
- Fourth Laboratory, Yunan Institute of Zoology (Kunming). Studies on snake venoms and their utilization. II. Identification of toxins and enzymes in the venom of *naja naja atra* (from hunan) after fractionation by chromatography [J]. Acta Bioch Bioph Sin, 1976, 8(2): 157-160.
- [17] Sun QY, Bao J. Purification, cloning and characterization of a metalloproteinase from *Naja atra* venom [J]. Toxicon, 2010, 56(8): 1459-1469.
- [18] Kazandjian TD, Arrahman A, Still KBM, et al. Anticoagulant activity of *Naja nigricollis* venom is mediated by phospholipase A2 toxins and inhibited by varespladib [J]. Toxins (Basel), 2021, 13(5): 302.
- [19] Ullah A. Structure-function studies and mechanism of action snake venom L-Amino acid oxidases [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 110.
- [20] Vogel CW, Finnegan PW, Fritzinger DC. Humanized cobra venom factor: structure, activity, and therapeutic efficacy in preclinical disease models [J]. Mol Immunol, 2014, 61(2): 191-203.
- [21] Trento MVC, Sales TA, de Abreu TS, et al. Exploring the structural and functional aspects of the phospholipase A2 from *Naja spp* [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 140: 49-58.
- [22] Sun QY, Wang CE, Li YN, et al. Inhibition of platelet aggregation and blood coagulation by a P-III class metalloproteinase purified from *Naja atra* venom [J]. Toxicon, 2020, 187: 223-231.
- [23] 李嘉琳, 李梦诗, 李斌, 等. P-选择素缺失对小鼠生理特征的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 14-19.
- Li JL, Li MS, Li B, et al. Effects of P-selectin gene knockout on the biological characteristics of mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 14-19.
- [24] 刘正泉, 赵自刚. 防治内毒素休克凝血功能紊乱的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 146-150.
- Liu ZQ, Zhao ZG. Advances in prevention and treatment drug therapy for coagulation disorders during endotoxin shock [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(11): 146-150.
- [25] Thomazini CM, Sachetto ATA, de Albuquerque CZ, et al. Involvement of von Willebrand factor and botrocetin in the thrombocytopenia induced by Bothrops jararaca snake venom [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2021, 15(9): e0009715.