

文章编号: 1674-5566(2023)04-0874-09

DOI:10.12024/jsou.20220703923

海洋双吡啶化合物 FGFC1 对心血管血栓模型大鼠血浆 FDP、D-D、Plg 的影响

张 添¹, 张惠姝¹, 张林铃¹, 高春丽¹, 张海星¹, 朱玉平², 吴文惠¹

(1. 上海海洋大学 海洋药物与健康食品研究中心, 上海 201306; 2. 海军军医大学 基础医学实验教学中心, 上海 200433)

摘要: 建立大鼠心血管血栓模型及观察海洋双吡啶生物碱 FGFC1 溶解大鼠心血管血栓的纤溶特性。采用异硫氰酸荧光素 (Fluorescein 5-isothiocyanate, FITC) 标记的纤维蛋白诱导法建立大鼠心血管血栓模型。低场核磁、冰冻切片荧光扫描和苏木精-伊红染色 (Hematoxylin-eosin staining, H. E) 成像观察大鼠心血管血栓模型建立情况。荧光分析方法检测空白组、对照组、u-PA 阳性对照组、FGFC1 低、中、高剂量给药组大鼠的血浆荧光强度, ELISA 法测定各组大鼠血浆纤维蛋白降解产物 (Fibrin degradation product, FDP) 含量、D-二聚体 (D-Dimer, D-D) 含量以及纤溶酶原 (Plasminogen, Plg) 活性。FITC 标记的纤维蛋白原 (Fibrinogen, FIB) 在还原性 SDS-PAGE 显示为 FITC- α 、FITC- β 、FITC- γ 3 条肽链, FITC-fibrin 荧光显微镜下显示绿色荧光, 表明标记成功。低场核磁成像显示造模组大鼠心脏组织密度升高, 冰冻切片荧光扫描显示心脏血管存在荧光物质斑块, 表明心血管血栓模型建成, 同时 H. E 染色组织切片显示造模组心肌纤维异常。FGFC1 的 2.5、5.0 以及 10.0 mg/kg 剂量给药组大鼠血浆荧光值、Plg 活性水平显著低于空白组, FDP 水平、D-D 水平显著高于空白组。研究表明, 海洋双吡啶生物碱 FGFC1 针对 FITC-fibrin 诱导形成的大鼠心血管血栓模型能降低其体内 Plg 活性, 促进血栓纤维蛋白降解。

关键词: FGFC1; 心血管血栓; 组织切片; 血浆荧光值; 纤溶作用

中图分类号: R 965 **文献标志码:** A

FGFC1 (Fungi fibrinolytic compound 1) 是海洋真菌来源的吡喃并异吡啶酮化合物^[1], 通过活化纤溶酶原^[2] 实现体内溶栓作用。药物代谢动力学特征显示 FGFC1 分布于肝脏、小肠、肺、脑和心脏等器官^[3], 对大鼠肺血栓溶解具有显著效果^[4], 以此为基础, 研究 FGFC1 溶解大鼠心血管血栓的特性。

心血管血栓形成机制为心脏动静脉血液的血小板表面受体与心血管壁暴露在外的胶原及血友病因子特异性地作用于损伤部位, 启动血小板活化和聚集反应^[5], 释放凝血酶等激动剂^[6]。凝血酶作用于纤维蛋白原, 使其转换成具有活性的纤维蛋白, 纤维蛋白进一步聚集形成纤维蛋白

多聚体, 纤维蛋白多聚体黏附于斑块破裂处, 从而形成心血管血栓。除此之外, 其形成也与 TXA₂-PGI₂ 平衡^[7]、乳黏素及膜连蛋白 V^[8]、脂蛋白 (a)^[9] 等密切相关。心血管血栓是引起心肌梗塞的主要原因^[10], 在形成早期进行干预治疗能有效降低心肌梗塞的发生率^[11]。溶栓治疗^[12] 是临床上重要手段, 在发病早期使用溶栓药物能够挽救心肌, 发生梗塞后重构, 使得冠状动脉再通, 恢复对缺血心肌的血流灌注^[13-15]。

建立大鼠无损心血管血栓模型, 投与 FGFC1, 检测大鼠心脏组织形态学特征和血浆 FDP、D2D、Plg 指标, 评价 FGFC1 溶解心血管血栓的纤溶作用, 为 FGFC1 成药提供体内实验基础。

收稿日期: 2022-07-06

修回日期: 2022-10-27

基金项目: 国家自然科学基金 (82173731); 上海市自然科学基金 (21ZR1427300)

作者简介: 张 添 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物药物。E-mail: 852336193@qq.com

通信作者: 吴文惠, E-mail: whwu@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 48 只,SPF 级,健康雌性,鼠龄 8 周,体质量为 (150 ± 5) g,购买于上海杰思捷实验动物中心[生产许可证:SCXK(沪)2018-0004],控制饲养环境温度 (25 ± 1) °C,自然昼夜,自然湿度。实验方案经上海海洋大学动物伦理委员会审核批准(批准编号:SHOU-DW-2022-008),严格按照动物使用管理条例进行。

1.2 材料与试剂

FGFC1 由本实验室提取纯化得到;尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase type plasminogen activator, u-PA),上海吉至生物技术有限公司;异硫氰酸荧光素(Fluorescein 5-isothiocyanate, FITC)、纤维蛋白原(Fibrinogen, FIB),美国 SIGMA 公司;纤维蛋白降解产物(FDP)试剂盒、D-二聚体(D-D)试剂盒、纤溶酶原(Plg)试剂盒,北京格瑞通达科技有限公司。

其他化学试剂和有机溶剂为分析纯。

1.3 主要仪器

多功能酶标仪(Synergy Mx 型,美国伯腾公司);电泳仪(PowerPac™ Basic Power Supply 型,美国伯乐公司);荧光显微镜(TH4-200 型,日本奥林巴斯公司);显微镜(Eclipse ci 型,日本尼康公司);组织切片机(RM235 型,日本徕卡公司);冰冻切片机(CM1520 型,日本徕卡公司);核磁共振成像仪(MesoMR23-060H-I 型,上海纽迈电子科技有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 异硫氰酸荧光素标记纤维蛋白方法

采用 FITC 标记蛋白的方式对 FIB 进行荧光标记^[16]。将 FIB 溶解于 25 mL 磷酸缓冲液(100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L, pH 8.5),制成 20 mg/mL,于 4 °C 环境中搅拌 15 min 使之完全溶解。搅拌加入 45 mg FITC,4 °C 电磁搅拌 18 h,搅拌完成后得到 FITC-FIB,4 °C 条件下透析 3 d。使用 12.5%分离胶对其进行 SDS-PAGE 操作。

FITC-FIB 结合完成后,在烧杯中加入 121 μ L 1 000 U/mL 凝血酶,22 mL 2.58% CaCl_2 ,4 °C 反应 2 h,室温下反应 2 h,使 FITC-FIB 转化成网络状沉淀物 FITC-纤维蛋白(FITC-fibrin)。将 FITC-fibrin 反复均质、离心,成为悬浮液,全程保持避光

操作。

1.4.2 大鼠心血管血栓模型建立及检测方法

FITC-fibrin 静脉注射,构建大鼠心血管血栓模型。适应性饲养 1 周后,在实验前 12 h 对大鼠进行禁食、禁水处理。将大鼠放入跑圈中跑步 30 min,经颈静脉注射 FITC-fibrin,注射剂量为 10 mL/kg。30 min 后,乙醚麻醉脱颈处死大鼠,完整取出心脏组织,使用 10%多聚甲醛固定液对其进行固定。制作心脏组织切片,对其进行荧光显微镜观察、低场核磁共振成像和 H. E 染色,结果与正常大鼠心脏组织结果进行对比,确认造模情况。低场核磁扫描参数为:层厚 3.0 mm,层距 2.0 mm,TR/TE 为 300 ms/20.0 ms。

1.4.3 给药实验设计与处理方法

将心血管血栓模型大鼠随机分为 5 组,分别为空白(NC)组、阳性对照(PC)组、FGFC1 高(FGFC1-H)、中(FGFC1-M)、低(FGFC1-L)剂量处理组,每组 8 只大鼠。从非造模大鼠中随机选取 8 只健康大鼠,作为对照(CK)组。其中:NC 组建模后禁水禁食;PC 组在建模后 30 min 经尾静脉注射尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA),注射剂量为 5 000 U/kg;FGFC1-H 组、FGFC1-M 组、FGFC1-L 组分别在建模后 30 min 经尾静脉注射 10、5、2.5 mg/kg FGFC1 的生理盐水溶液。

1.4.4 荧光值检测方法

在给药后 0、1、2、3、4、5 和 6 h 分别对大鼠进行尾静脉取血,使用柠檬酸钠进行抗凝,静置后,3 500 r/min 离心 10 min,得到大鼠血浆。取大鼠部分血浆使用多功能酶标仪测定激发波长 485 nm、发射波长 520 nm 处的荧光值。

1.4.5 FDP、D-D、Plg 指标测定方法

选取特定时间点的各组大鼠血浆,根据 ELISA 酶标试剂盒依次加入标准品、样品稀释液、样品,37 °C 孵育 30 min,洗板 5 次,加入酶标试剂,37 °C 孵育 30 min,洗板 5 次,加入显色剂 A 和显色剂 B,37 °C 孵育 10 min,加入终止液,15 min 内读取 OD 值,计算大鼠血浆内 FDP、D-D、Plg 水平。

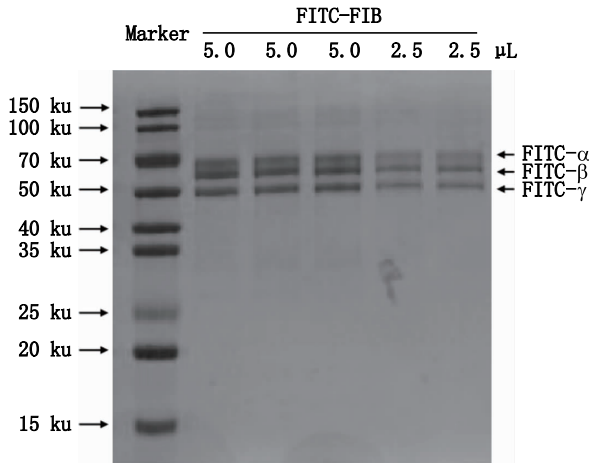
1.5 统计学处理与分析

使用 GraphPad 8.0 软件进行数据处理与分析,实验数据以平均值 \pm 标准差表示,采用 *t* 检验法来分析差异, $P < 0.05$ 代表差异显著,具有统计学意义。

2 结果与分析

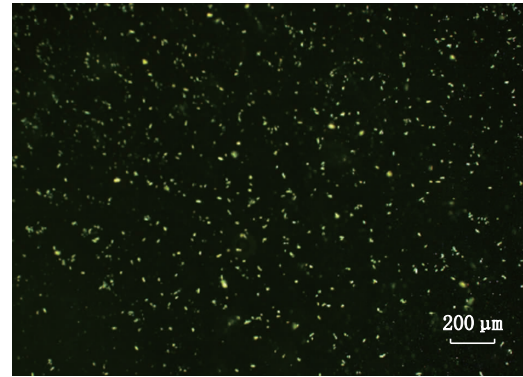
2.1 FITC-FIB 的 SDS-PAGE 及 FITC-fibrin 荧光显微镜图像分析

通过 SDS-PAGE 检测 FITC-FIB 标记情况,由



(a) FITC-FIB的SDS-PAGE图
The SDS-PAGE diagram of FITC-FIB

图 1a 可知:在 60 ku 左右有 3 条明显条带,为纤维蛋白原降解产物,分别为 FITC- α 链、FITC- β 链和 FITC- γ 链。通过荧光显微镜观察 FITC 标记 fibrin 情况,如图 1b 所示,显示具有荧光,证明 FITC 成功标记 fibrin。



(b) FITC-fibrin的荧光显微镜成像
The fluorescence microscopy of FITC-fibrin

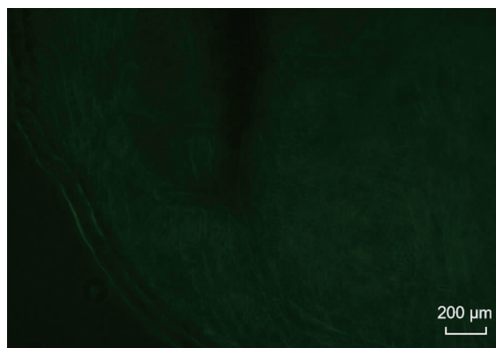
图 1 FITC 标记纤维蛋白图像分析
Fig. 1 Image analysis of FITC-fibrin

2.2 心血管血栓模型的组织形态学特征

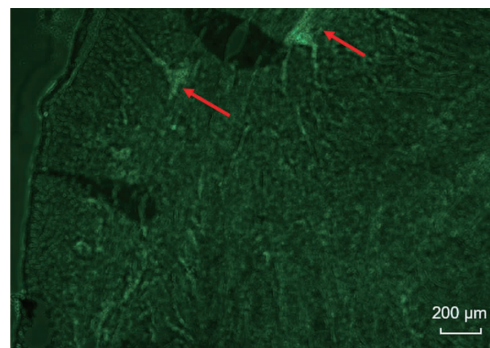
2.2.1 大鼠心血管血栓模型荧光显微镜图像分析

对造模组大鼠及正常大鼠心脏组织进行冰冻切片后荧光显微镜观察,结果见图 2,正常大鼠

心脏组织未见荧光;造模组大鼠心脏组织外缘血管部位出现明显荧光(图 2b 红色箭头所示)。表明通过颈静脉注射方法, FITC-fibrin 通过血液循环进入心脏血管,在心血管局部聚集凝结。



(a) 正常大鼠 Normal rat



(b) 造模大鼠 Modeled rat

图 2 冰冻切片荧光显微镜图
Fig. 2 Fluorescence microscope observation

2.2.2 大鼠心血管血栓模型低场核磁共振成像分析

对造模组大鼠及正常大鼠心脏组织进行低场核磁共振成像,结果见图 3,相较于正常大鼠,

造模组大鼠心脏核磁成像密度显著增大且心脏组织外缘密度也增大(图 3b 黑色箭头所示),说明造模组心脏组织发生异常^[17],辅助印证心血管血栓形成。

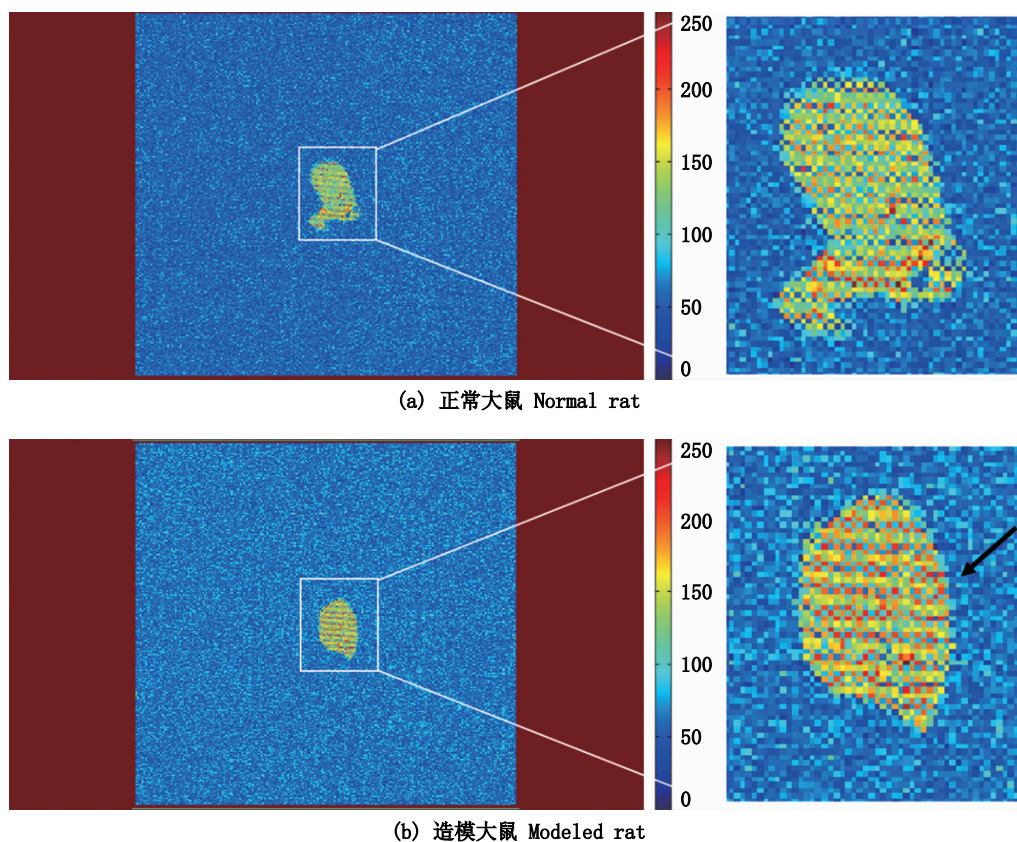


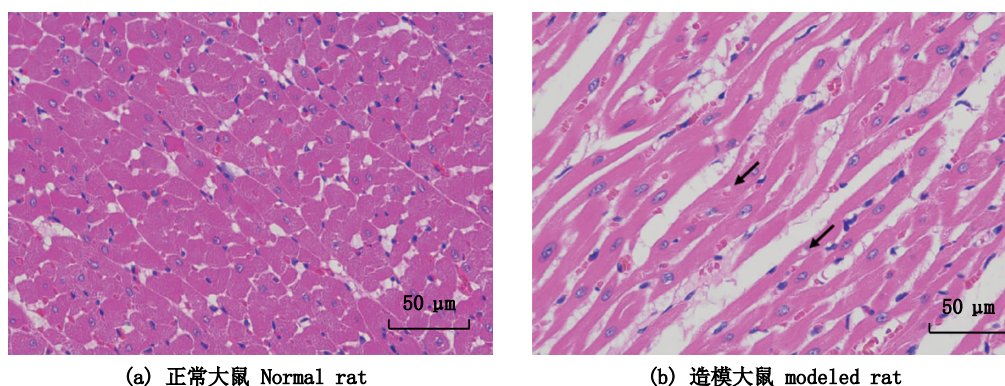
图 3 心脏组织低场核磁共振成像图

Fig. 3 Low field magnetic resonance imaging

2.2.3 大鼠心血管血栓模型的 H. E 染色病理特征

对造模组大鼠及正常大鼠心脏组织进行石蜡切片后 H. E 染色,结果见图 4。图 4a 显示正常大鼠心肌组织切片结构正常,心肌纤维排列整

齐;图 4b 显示造模组大鼠心脏组织切片出现心肌组织紊乱、核密度减少伴随心肌细胞出现空泡样变(图 4b 黑色箭头所示)等心肌梗塞特性。H. E 染色结果表明通过注射 FITC-fibrin,大鼠形成心血管血栓模型。

图 4 H. E 染色结果($\times 200$)Fig. 4 H. E staining results ($\times 200$)

2.3 FGFC1 对血浆荧光值变化影响

研究^[18]表明, FITC 与蛋白结合时的化学发光能力显著高于游离态 FITC, 因此可以通过大鼠血浆荧光值判断是否发生溶栓。血浆荧光值升高代表体内 FITC-fibrin 累积聚集形成血栓; 荧光值降低则代表 FITC 与 fibrin 解离重新成为游离态, FITC-fibrin 积聚造成的血栓溶解。

在给药后 0、1、2、3、4、5 和 6 h 分别检测对照组、空白组、阳性对照组、FGFC1 2.5、5.0、10.0 mg/kg 给药组大鼠血浆荧光值, 结果见表 1。各时间点 NC 组血浆荧光值相较于 CK 组均显著升高 ($P < 0.001$), 表明 FITC-fibrin 进入血液循环后会不断积聚, 形成心血管血栓。

除 0 h 外, 各时间段处理组大鼠血浆荧光值与 NC 组相比均显著降低 ($P < 0.001$)。以 1 h 为例, 观察各处理组荧光值发现, PC 组、FGFC1-L 组、FGFC1-M 组、FGFC1-H 组荧光强度与 NC 组相比分别降低了 34.67%、16.60%、18.73%、27.93% ($P < 0.001, P < 0.001, P < 0.001$), 表明在 1 h 时, u-PA 及 FGFC1 均已发挥纤溶活性溶解部分 FITC-fibrin。对比 0 h 及 1 h 血浆荧光强度, 1 h 的 FGFC1-L 组、FGFC1-M 组和 FGFC1-H 组血浆荧光强度分别为 0 h 的 2.93 倍、2.77 倍和 2.43 倍, 表明在 0~1 h FGFC1 对于 FITC-fibrin 的溶解效果与剂量呈正相关。

表 1 各组血浆荧光值变化 (Mean±SD)
Tab. 1 Changes of serum fluorescence value in each group (Mean±SD)

组别 Group	荧光强度 Fluorescence intensity						
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
对照组 Control group	11.33±1.25	13.00±2.45	16.33±1.70	13.00±1.63	17.33±1.70	17.33±2.05	16.67±1.70
空白组 Blank group	318.00±3.56 ^{###}	1098.00±14.72 ^{###}	1592.67±8.73 ^{###}	1387.67±16.21 ^{###}	1102.67±15.63 ^{###}	877.33±21.64 ^{###}	654.33±15.62 ^{###}
阳性对照组 Positive control group	324.33±9.28	717.33±11.15 ^{***}	413.33±6.85 ^{***}	328.67±14.06 ^{***}	167.33±20.95 ^{***}	73.33±11.52 ^{***}	58.33±3.86 ^{***}
FGFC1 低剂量处理组 FGFC1 low dose treatment group	312.33±8.99	915.67±11.57 ^{***▲▲▲}	723.±15.12 ^{***▲▲▲}	600.33±16.05 ^{***▲▲▲}	402.00±11.05 ^{***▲▲▲}	171.67±5.79 ^{***▲▲▲}	102.00±5.35 ^{***▲▲▲}
FGFC1 中剂量处理组 FGFC1 medium dose treatment group	322.00±8.16	892.33±9.98 ^{***▲▲▲}	707.67±13.57 ^{***▲▲▲}	591.33±7.76 ^{***▲▲▲}	375.00±7.87 ^{***▲▲▲}	148.33±11.44 ^{***▲▲▲}	95.67±6.60 ^{***▲▲▲}
FGFC1 高剂量处理组 FGFC1 high dose treatment group	325.33±9.46	791.33±8.37 ^{***▲▲▲}	599.67±4.99 ^{***▲▲▲}	439.00±10.42 ^{***▲▲▲}	225.66±6.84 ^{***▲▲▲}	121.67±8.17 ^{***▲▲▲}	78.67±6.02 ^{***▲▲▲}

注: #. 空白组与对照组的统计分析, $### P < 0.001$; *. FGFC1 处理组与空白组的统计分析, $* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001$; ▲. FGFC1 处理组与阳性对照组的统计分析, $▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01, ▲▲▲ P < 0.001$ 。
Notes: #. Statistical analysis of blank group vs. control group, $### P < 0.001$; *. Statistical analysis of FGFC1-treated group vs. blank group, $* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001$; ▲. Statistical analysis of FGFC1-treated group vs. positive control group, $▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01, ▲▲▲ P < 0.001$.

2.4 FGFC1 对体内纤维蛋白降解的影响

2.4.1 FGFC1 对血浆 FDP 的影响

FDP 是纤维蛋白多肽链的赖氨酸结合部位断裂溶解后产生的降解产物, 它能抑制纤维蛋白形成, 有抗凝血酶、抑制血小板黏附聚集和释放的作用。FDP 含量的高低可反映体内纤溶活性的强度。对给药后 1 h 的各组血浆进行 FDP 检

测, 结果见图 5a。PC 组、FGFC1-L 组、FGFC1-M 组和 FGFC1-H 组大鼠血浆 FDP 值分别比 NC 组高 18.63%、16.72%、19.06% 和 15.34% ($P < 0.001$); FGFC1 处理组与 PC 组无显著性差异。说明在 1 h 时 FGFC1 处理组大鼠体内较多的纤维蛋白转化为 FDP, 具有较好的纤溶效果。

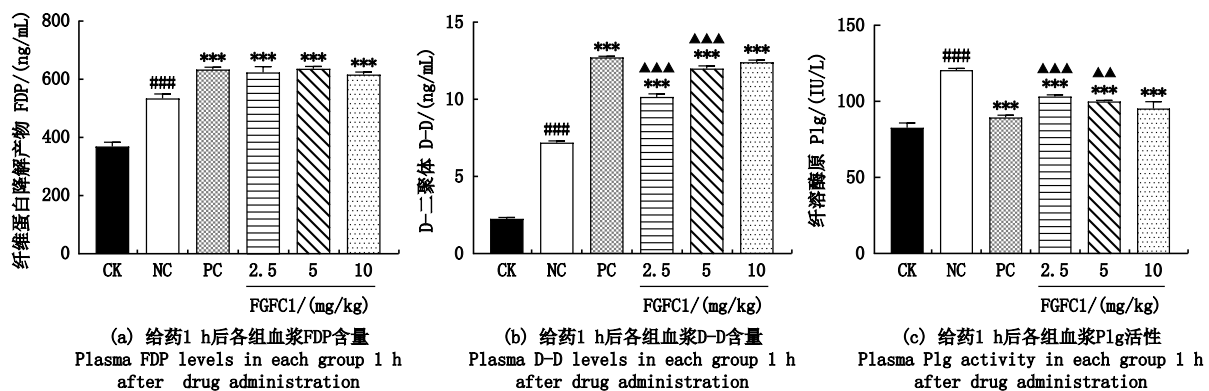
2.4.2 FGFC1 对血浆 D-D 的影响

D-D 是来源于纤溶酶水解交联纤维蛋白凝块的一种特异性的纤维蛋白降解终末产物,属于继发性纤溶的分子标志物^[19],主要反映纤维蛋白溶解功能。若在溶栓过程中 D-D 升高,表示机体内具有较高的纤溶活性。对给药后 1 h 的各组血浆进行 D-D 检测,结果见图 5b。PC 组、FGFC1-L 组、FGFC1-M 组、FGFC1-H 组大鼠血浆 D-D 值分别高于 NC 组 76.87%、41.26%、66.70%、72.45% ($P < 0.001$);FGFC1-L 组、FGFC1-M 组与 PC 组相比分别降低 20.13%、5.75% ($P < 0.001$),FGFC1-H 与 PC 组无显著性差异。这说明在 1 h 时 FGFC1 处理组均能发挥溶栓活性,降解纤维蛋白为 D 二聚体,其中 FGFC1 高剂量组能够达到 PC

组水平。

2.4.3 FGFC1 对血浆 Plg 的影响

Plg 是血浆纤维蛋白水解酶无活性的前体,可以通过检测 Plg 含量研究体内纤溶活性。若 Plg 含量降低,纤维蛋白水解酶得到活化,机体内具有较高的纤溶活性。对给药后 1 h 的各组血浆进行 Plg 检测,结果见图 5c。PC 组、FGFC1-L 组、FGFC1-M 组和 FGFC1-H 组大鼠血浆 Plg 值相较于 NC 组分别降低 25.78%、14.42%、17.16% 和 20.95% ($P < 0.001$);FGFC1-H 组相较于 PC 组无显著性差异。这说明在 1 h 时 FGFC1 处理组均能显著抑制纤维蛋白水解酶发挥溶解纤维蛋白效果,其中 FGFC1 高剂量组能达到 PC 组相近抑制效果。



#. 空白组与对照组的统计分析,### $P < 0.001$;*. FGFC1 处理组与空白组的统计分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;▲. FGFC1 处理组与阳性对照组的统计分析,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$,▲▲▲ $P < 0.001$.
#. Statistical analysis of blank group vs. control group,### $P < 0.001$;*. Statistical analysis of FGFC1-treated group vs. blank group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;▲. Statistical analysis of FGFC1-treated group vs. positive control group, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.001$.

图 5 FGFC1 对血浆纤维蛋白降解及纤溶酶原的影响
Fig. 5 Effects of FGFC1 on plasma fibrin degradation and fibrinogen

3 讨论

心血管血栓与心肌梗塞密切相关。心血管主要的冠状动脉分支包括左侧前降支动脉、左侧回旋支动脉和右冠状动脉。当左侧前降支动脉堵塞时,如果是前降支动脉的起始部堵塞则会出现广泛前壁的心肌梗死,如果前降支远端堵塞,则会出现前间壁梗死;当左侧回旋支动脉堵塞时,会出现高侧壁心肌梗死;当右冠状动脉堵塞时,可能出现下壁心肌梗死或右室心肌梗死^[20]。血栓导致的冠状动脉堵塞是造成心肌梗死的主要原因,溶解心血管内血栓能有效治疗心肌梗死,研究心血管血栓溶解的海洋新型候选药物也

是心脑血管疾病领域的前沿课题^[21]。

FGFC1 分子量 869,分子式 $C_{51}H_{69}N_2O_{10}$,分子母核为吡喃骈异咪唑酮,异戊二烯链结构部分是非极性中心、戊酸结构部分是极性中心、吡喃骈异咪唑酮结构部分是芳环中心,具有典型的三药效团结构。

通过跑步联合静脉注射 FITC-fibrin 诱导大鼠形成心血管血栓模型。剧烈运动会引起大鼠交感神经兴奋性增强^[22],心脏收缩力增强,心率加快,诱导 FITC-fibrin 积聚在心脏,进一步形成血栓斑块,通过外源异物 FITC-fibrin 诱导了凝固的瀑布式反应。

FITC-fibrin 进入体内后会发生积聚及溶解,

通过检测血浆荧光强度建立 1 种快速有效的检测方式。实验发现,给药后各时间段 FGFC1 处理组荧光强度均显著低于空白组,表明 FGFC1 能够促进纤维蛋白溶解,且纤溶效果与剂量呈正相关。如果血栓被溶解,血浆 FDP 数量、D-D 数量和 Plg 活性等直接指标将发生显著变化。如图 6 所示,给药 FGFC1 后,Plg 活性受到抑制,纤溶酶

活性增加,而纤溶酶可以水解 II、V、VII、VIII、X、XI 等多种凝血因子及降解纤维蛋白肽链上各个 Lys-Arg 相连接的部位^[23],使得纤维蛋白降解为 FDP 片段,FDP 进一步分解为 D-D 和其他片段。FDP 和 D-D 数量增高表明海洋双吡咯化合物 FGFC1 能够促进心血管血栓纤维蛋白溶解,显示出 FGFC1 作为海洋溶栓候选药物的特性。

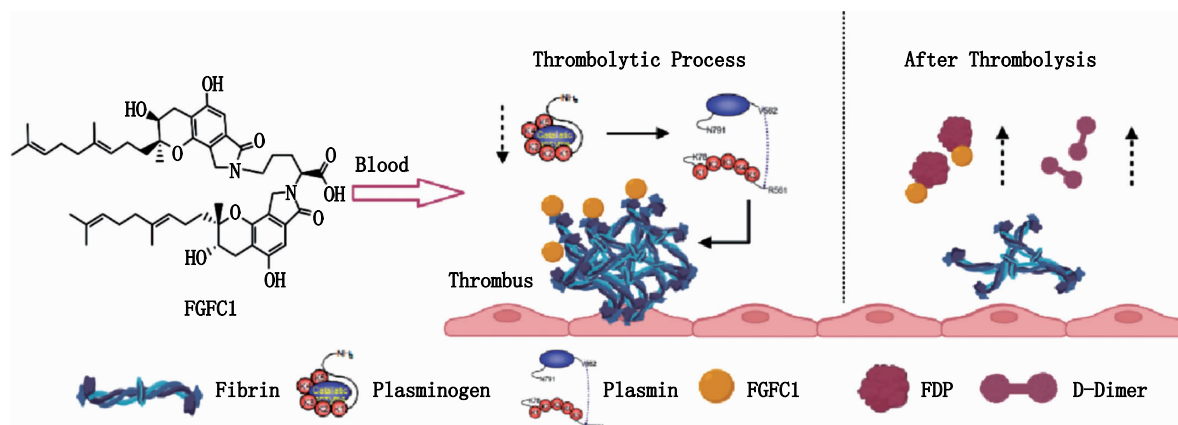


图 6 FGFC1 纤溶过程示意图

Fig. 6 Schematic diagram of FGFC1 thrombolysis process

实验证明海洋来源双吡咯生物碱 FGFC1 作用于 FITC-fibrin 诱导的心血管血栓大鼠模型时,能降低机体 Plg 活性,使得纤溶酶活性升高,促使血栓中的纤维蛋白溶解,从而发挥溶解心血管血栓作用,为 FGFC1 溶栓疗法治疗心肌梗死成药提供体内实验基础,但 FGFC1 抑制心血管血栓模型大鼠体内 Plg 活性的机制仍需进一步探究。

参考文献:

- [1] 曹玉陵,唐思敏,张添,等. 一株稀有海洋真菌 *Stachybotrys longispora* FG216 的 *De novo* 测序及基因组学分析[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3457-3471.
CAO Y L, TANG S M, ZHANG T, et al. *De novo* sequencing and genomics analysis of a rare marine fungus *Stachybotrys longispora* FG216 [J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3457-3471.
- [2] 杨晶,钱士云,张本帅,等. 海洋纤溶活性化合物 FGFC1 和 FGFC2 影响血小板聚集特性的研究[J]. 中国海洋药物, 2019, 38(3): 33-39.
YANG J, QIAN S Y, ZHANG B S, et al. Effects of marine fibrinolytic active compounds FGFC1 and FGFC2 on platelet aggregation[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2019, 38(3): 33-39.
- [3] 张本帅,姜胜男,杨晶,等. 溶栓候选药物双吡咯海洋生

物碱 FGFC1 的转化特性[J]. 上海海洋大学学报, 2019, 28(4): 634-642.

ZHANG B S, JIANG S N, YANG J, et al. Transformation of biindole marine alkaloid FGFC1 by hepatic microsome system [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2019, 28(4): 634-642.

- [4] 傅诗情,严婷,吴文惠,等. 海洋微生物代谢产物 FGFC1 的纤溶促进作用[J]. 药学服务与研究, 2015, 15(2): 99-102.
FU S Q, YAN T, WU W H, et al. Fibrinolysis promoting activity of a novel metabolic product of marine microbe-FGFC1[J]. *Pharmaceutical Care and Research*, 2015, 15(2): 99-102.
- [5] SANDRINI L, IERACI A, AMADIO P, et al. Impact of acute and chronic stress on thrombosis in healthy individuals and cardiovascular disease patients[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7818.
- [6] HULSHOF A M, HEMKER H C, SPRONK H M H, et al. Thrombin-fibrin(ogen) interactions, host defense and risk of thrombosis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(5): 2590.
- [7] ZHANG Y Y, JIANG M, WANG J, et al. The hemostatic mechanism of "Treated the Spleen" therapy on immune thrombocytopenia based on the characteristics of vasoactive factors[J]. *Annals of Palliative Medicine*, 2021, 10(4):

- 4612-4622.
- [8] HU Y, LIU G B, ZHANG H, et al. A comparison of [^{99m}Tc]duramycin and [^{99m}Tc]annexin V in SPECT/CT imaging atherosclerotic plaques[J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2018, 20(2): 249-259.
- [9] KAMSTRUP P R. Lipoprotein(a) and cardiovascular disease [J]. *Clinical Chemistry*, 2021, 67(1): 154-166.
- [10] TANTRY U S, NAVARESE E P, MYAT A, et al. Combination oral antithrombotic therapy for the treatment of myocardial infarction: recent developments [J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2018, 19(7): 653-665.
- [11] MOOSAVI J, SHAFE O, ALIZADEHASL A, et al. Half-dose thrombolytic therapy in patients with right heart thrombi [J]. *Journal of International Medical Research*, 2019, 47(7): 3400-3407.
- [12] BOUREZG A, BOCHATON T, MEWTON N, et al. Atrial fibrillation, intra-ventricular thrombus, and other anticoagulant indications relationship with adverse outcomes in acute anterior myocardial infarction patients [J]. *Journal of Cardiology*, 2018, 72(4): 277-283.
- [13] HARTER K, LEVINE M, HENDERSON S O. Anticoagulation drug therapy: a review [J]. *Western Journal of Emergency Medicine*, 2015, 16(1): 11-17.
- [14] CAMBRONERO-CORTINAS E, BONANAD C, MONMENEU J V, et al. Incidence, outcomes, and predictors of ventricular thrombus after reperfused ST-segment-elevation myocardial infarction by using sequential cardiac MR imaging [J]. *Radiology*, 2017, 284(2): 372-380.
- [15] KALA P. Thrombolysis in ST-elevation myocardial infarction is not dead [J]. *EuroIntervention*, 2021, 16(14): 1129-1130.
- [16] 覃光炯, 高云华. 同步荧光法测定大鼠血浆中牛血清白蛋白的研究 [J]. *影像科学与光化学*, 2010, 28(5): 354-361.
- QIN G J, GAO Y H. Study on the determination of bovine serum albumin in rat plasma by synchronous fluorescence spectrometry [J]. *Imaging Science and Photochemistry*, 2010, 28(5): 354-361.
- [17] 朱建. 3.0T 成人核磁共振在颈动脉斑块和大鼠心脏结构成像中的应用方法研究 [D]. 南京: 东南大学, 2019.
- ZHU J. 3.0T magnetic resonance imaging method research for carotid atherosclerosis plaque and rat heart structure [D]. Nanjing: Southeast University, 2019.
- [18] 黄春保, 慈云祥, 常文保. 异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白标记物的化学发光反应 [J]. *分析化学*, 2002, 30(4): 447-449.
- HUANG C B, CI Y X, CHANG W B. Study on chemiluminescence reaction of fluorescein isothiocyanate labelled protein by flow injection method [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2002, 30(4): 447-449.
- [19] OLSON J D. D-dimer: An overview of hemostasis and fibrinolysis, assays, and clinical applications [J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2015, 69: 1-46.
- [20] LU L, LIU M, SUN R R, et al. Myocardial infarction: symptoms and treatments [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2015, 72(3): 865-867.
- [21] DWIVEDI R, POMIN V H. Marine antithrombotics [J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(10): 514.
- [22] MORAES-SILVA I C, RODRIGUES B, COELHO-JUNIOR H J, et al. Myocardial infarction and exercise training: evidence from basic science [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2017, 999: 139-153.
- [23] KUMAR S S, SABU A. Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1148: 345-381.

Effects of marine bisindole compound FGFC1 on plasma FDP, D-D and Plg in rats with cardiovascular thrombosis model

ZHANG Tian¹, ZHANG Huishu¹, ZHANG Linling¹, GAO Chunli¹, ZHANG Haixing¹, ZHU Yuping², WU Wenhui¹

(1. Marine Medicine and Health Food Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Basic Medicine Experimental Teaching Center, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: To establish a rat cardiovascular thrombosis model and to observe the fibrinolytic properties of the marine bisindole alkaloid FGFC1 (Fungi Fibrinolytic Compound 1) in dissolving rat cardiovascular thrombus, a rat cardiovascular thrombosis model was established using fluorescein 5-isothiocyanate (FITC)-labeled fibrin induction method. Myocardial tissue morphology was imaged by low-field NMR, fluorescence scanning of frozen sections and hematoxylin-eosin staining (HE) of paraffin sections. Plasma fluorescence intensity was measured in the blank group, control group, u-PA positive control group and FGFC1 low, medium and high dose groups. , and plasma fibrin degradation product (FDP), D-dimer (D-D) and plasminogen (Plg) were measured by ELISA. FITC-FIB was successfully labeled as FITC- α , FITC- β , FITC- γ peptide chains by reduced SDS-PAGE, and the FITC-fibrin showed green fluorescence under fluorescence microscopy. Low-field NMR imaging showed increased density of cardiac tissue in the modeling group, and fluorescence scanning of frozen sections showed the presence of fluorescent material plaques in cardiac vessels, indicating the establishment of a cardiovascular thrombosis model, while HE staining of tissue sections showed abnormal myocardial fibers in the modeling group. activity levels were significantly lower than those of the blank group, and FDP levels and D-D levels were significantly higher than those of the blank group. FITC-fibrin induced the formation of cardiovascular thrombosis model in rats, and the marine bisindole alkaloid FGFC1 could reduce the Plg activity and promote the degradation of thrombus fibrin in rats.

Key words: FGFC1; cardiovascular thrombosis; tissue section; plasma fluorescence value; fibrinolytic effect