

蜱虫抗凝血活性物质研究进展

张欣¹ 吕士红² 王继红^{1*}

(¹辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029; ²牡丹江医学院附属二院消化内科, 牡丹江 157009)

摘要 蜱虫是一种人畜共患的皮外寄生虫, 它在吸食宿主血液时将多种病原体传播给人类, 引发人类多种疾病。为了成功地吸食宿主血液, 蜱虫经过漫长的进化过程, 使其唾液腺能够在吸血过程中产生多种抗凝物质, 比如, 凝血酶抑制剂、组织因子抑制剂、凝血因子抑制剂、激肽释放酶-激肽系统抑制剂、血小板聚集黏附抑制剂等。通过这些抗凝物质的直接单独作用或协同作用, 蜱虫可以成功阻止其在吸食过程中宿主伤口的血液凝固, 起到抗凝作用。该综述对蜱虫分泌的抗凝物质研究现状进行了阐述, 为抗血栓药物的研发提供参考和新思路。

关键词 抗凝分子; 凝血酶抑制剂; 激肽系统抑制剂; 血小板聚集抑制剂

Progress in the Study of Anticoagulant Substances from Ticks

Zhang Xin¹, Lü Shihong², Wang Jihong^{1*}

(¹School of Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China;

²Department of Digestive Internal Medicine, the Second Affiliated Hospital of Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157009, China)

Abstract Ticks are common hematophagous ectoparasites, which can transmit a broad array of pathogens between human and animals. In order to suck the blood of parasitifer, ticks can secrete various anticoagulants from the salivary gland after a long period of evolution. Many anticoagulative substances has been found, such as inhibitors of thrombin, tissue factor, coagulation factor X (FX), kallikrein-kinin system and platelet aggregation. These anticoagulative substances will work cooperatively and prevent blood clotting where the injury happened. This review summarized the progress in the studies of the anticoagulant substances from ticks, and would be valuable for novel antithrombotic drugs development.

Keywords anticoagulative substance; thrombin inhibitors; kallikrein-kinin system inhibitors; inhibitors of platelet adhesion

蜱虫是一种常见的动物体表寄生虫, 分为软蜱和硬蜱两大类, 靠吸食动物血液为生。当宿主被蜱虫叮咬后, 宿主一旦发生血管损伤, 便会在损伤部位发生一系列凝血反应, 免疫系统也会随之激活, 宿主就是利用这些抵御机制来阻止蜱虫吸食的。大量研究表明, 蜱虫为了成功地吸食宿主血液, 必须要克

服一系列障碍。首先, 要刺破宿主的皮肤, 其次, 要破坏宿主血管并确保宿主血管损伤的部位不会发生凝血。而蜱虫为了对抗宿主的这种抵御机制, 经过长期进化, 其唾液腺具有了能够分泌多种抗凝血活性物质的强大功能。这些抗凝血活性物质被蜱虫唾液腺分泌进入宿主受损的血管处, 能够阻止血块形

收稿日期: 2016-04-11 接受日期: 2016-09-06

国家高新技术研究和发展计划(863计划)(批准号: 2014AA093502)、国家自然科学基金(批准号: 30770297)和大连市科技攻关项目(批准号: 2014E12SF067)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0411-85827097, E-mail: jihongwang999@hotmail.com

Received: April 11, 2016 Accepted: September 6, 2016

This work supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Grant No.2014AA093502), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30770297) and the Major Scientific and Technological Research Projects of Dalian (Grant No.2014E12SF067)

*Corresponding author. Tel: +86-411-85827097, E-mail: jihongwang999@hotmail.com

网络出版时间: 2016-12-19 16:12:03 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161219.1612.010.html>

成, 进而使蜱虫顺利吸食^[1-2]。随着对蜱虫研究的深入, 现在已发现一系列针对宿主凝血通路上关键分子的抗凝血物质, 本文对这些物质进行了分类综述, 以期利用蜱虫抗凝血物质进行新药研制提供启发和参考。

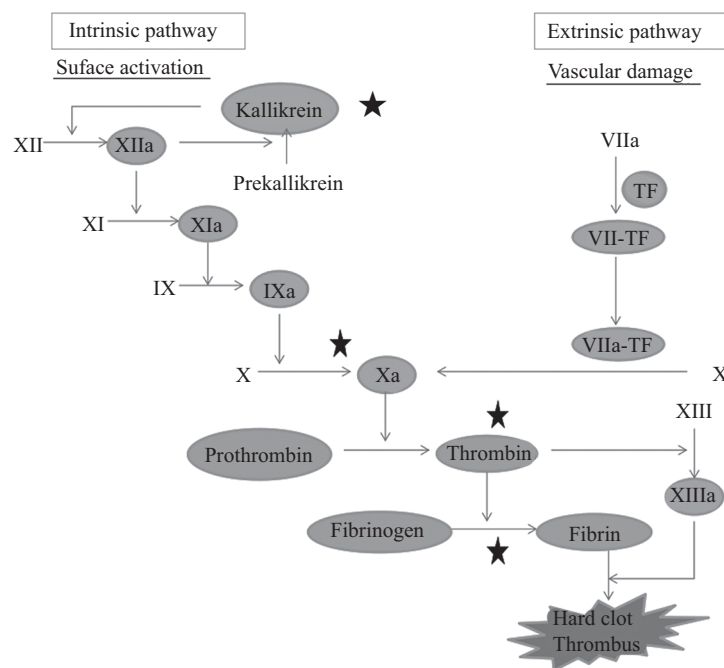
1 凝血系统与蜱虫抗凝剂的作用靶点

凝血系统也叫凝血级联反应, 存在于所有的生物体中, 可以有效地防止生物体在受到损伤后流血不止, 是一种有效的机体自我防护机制。凝血级联反应分为内源性凝血途径和外源性凝血途径。内源性凝血途径始于胶原诱导的凝血因子XII的激活, 激活后的凝血因子XII进一步激活凝血因子XI, 并使前激肽释放酶切割掉前体形成激肽释放酶, 引起机体内的炎症反应。而外源性凝血途径则始于受损血管内皮细胞中组织因子(tissue factor, TF)的释放, 组织因子释放激活凝血因子VII。整个凝血级联反应主要由多种丝氨酸蛋白酶组成, 这些丝氨酸蛋白酶彼此相互激活产生凝血瀑布效应, 启动凝血反应发生^[3](图1)。

脊椎动物出现凝血系统大约是4亿年前, 凝血

系统的出现对以吸血为生的寄生虫来说是一个相当大的阻碍。为了适应并抵抗宿主的凝血系统, 吸血为生的节肢动物们就必须不停地进化。在这个过程中, 蜱虫进化出了一系列的抗凝物质, 这些抗凝物质大部分为丝氨酸蛋白酶抑制剂, 主要存在于蜱虫的唾液腺、唾液、卵以及血液淋巴细胞中。这些抗凝物质不仅可以阻止宿主血管损伤处的血块形成、血管修复, 也可以参与调节蜱虫自身血液淋巴细胞的凝固。

蜱虫种类很多, 尽管每种蜱虫吸食血液的习惯以及吸食过程中所产生的抗凝物质不同, 但研究发现, 凝血因子X(coagulation factor X, FX)及凝血酶的激活、血小板的聚集与黏附是凝血过程中涉及到的关键性事件(图1), 因此, 这些事件中涉及到的关键分子也是所有蜱虫在进食中均要克服的抗凝靶点。如图1所示, ★标注的位置就是蜱虫经过长期进化、针对宿主凝血级联反应通路的关键步骤而产生的抗凝活性物质发生作用的位置, 蜱虫对宿主凝血的抵抗作用涉及了内源性、外源性凝血途径的多个层次, 由此可见, 其分泌的抗凝物质活性多样、作用范围广泛、作用机制与靶点也各不相同^[3-7]。



内外源凝血途径最终交汇在激活的凝血因子X处。激活的X水解凝血酶原形成凝血酶, 凝血酶将纤维蛋白原水解成纤维蛋白。★标注的是蜱虫分泌的抗凝活性物质作用的位置。

Both the extrinsic and intrinsic pathways converge at FX. Prothrombin is cleaved to thrombin by FXa, and the thrombin cleaves fibrinogen to fibrin. ★ indicates sites of inhibition by anticoagulant substances from ticks.

图1 凝血级联反应及蜱虫抗凝物质作用靶点

Fig.1 The blood coagulation cascade and the target for tick anticoagulant substance

2 凝血级联反应抑制剂

2.1 凝血酶抑制剂

凝血酶位于内外源凝血途径的共同通路上,是凝血过程中的关键。凝血酶由TF介导而产生在血管的受损部位,通常与FVIIa形成复合物并启动凝血级联反应的内外源途径,即介导激活FXI、激活血小板的聚集。凝血酶可以通过其自身的活性位点、exosites调节区域与一系列的辅助因子及受体相互作用,进而行使其功能^[3]。

目前,人们已经从软蜱和硬蜱中分离出了多种凝血酶抑制剂(表1)^[8]。研究发现,从软蜱中分离出来的凝血酶抑制剂Ornithodorin和Savignin作用机制相同,它们均通过将其N-端氨基酸残基插入凝血酶活性位点并通过其C-端氨基酸残基与凝血酶纤维蛋白原识别位点exosite相结合来发挥抗凝作用^[9]。而相反地,在硬蜱中发现的两种凝血酶抑制剂Madanin 1和Madanin 2则不需与凝血酶活性位点结合,只与纤维蛋白原识别位点exosite相结合便可发挥作用^[10]。

2.2 凝血因子抑制剂

凝血因子是参与血液凝固过程的各种蛋白质组分,按其被发现的先后次序用罗马数字进行编号:凝血因子I(coagulation factor I, FI)、II、III、IV、V、VII、VIII、IX、X、XI及XII等。其中,FX便是另一个位于内外源凝血途径的共同通路上的分子,内源性凝血途径与外源性凝血途径通过一系列反应将FX激活为激活的X水解酶源(FX activated, FXa),进而作用于凝血酶原,使凝血酶原被激活成凝血酶。由于

FXa处于凝血瀑布共同途径的起始位置,因此对FXa抑制剂的研究一直受到人们关注^[11]。

目前研究最透彻的FXa抑制剂为蜱抗凝肽(tick anti-coagulant peptide, TAP)。从毛白钝缘蜱(*Ornithodoros moubata*)中分离鉴定的TAP是一种对FXa具有高度选择性的抑制剂,其作用机制与凝血酶抑制剂Ornithodorin和Savignin的相似,同样是N-端氨基酸残基与FXa的活性位点相结合, C-端则与其阴离子结合位点exosite结合,且研究发现,在萨氏钝缘软蜱(*Ornithodoros savignyi*)中也存在作用方式类似的FXa抑制剂^[12]。此外,研究还发现了一种与TAP具有相似结构的kunitz-型蛋白酶抑制剂,即牛胰蛋白酶抑制剂(bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI)。这种kunitz-型蛋白酶抑制剂可以有效地抑制凝血酶等丝氨酸蛋白酶的活性^[13]。

此外,研究者在肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)的唾液腺提取物中分离出了Salp9、Salp14、Salp9Pac以及Salp14的旁系同源物30种,它们均为FX抑制剂的家族成员。相关研究人员通过免疫共沉淀反应以及基因沉默等实验发现,用抗Salp14的抗体与蜱虫唾液相互作用后,Salp14抗凝活性下降了87%^[14];而将Salp14及其相关的旁系同源物沉默后,FXa的活性得到恢复,并且肩突硬蜱(*I. scapularis*)的成虫在饱饮后的体重下降了50%~70%。这些实验结果都说明了Salp14在蜱虫成虫进食过程中起着重要作用^[15]。

在肩突硬蜱(*I. scapularis*)唾液腺提取物中,除了

表1 软蜱与硬蜱中的凝血酶抑制剂(根据参考文献[8]修改)

Table 1 Thrombin inhibitors from soft ticks and hard ticks (modified from reference [8])

物种	作用对象	动力学机制	分子量(kDa)	
Species	Target	Kinetic mechanism (Ki)	Mr (kDa)	
Soft ticks	<i>O. moubata</i>	Thrombin	ST, C (Ki-low pmol/L)	12
	<i>O. savignyi</i>	Thrombin	ST, C (Ki-5 pmol/L)	12
	<i>I. holocyclus</i>	Thrombin	ND	ND
	<i>I. ricinus</i>	Thrombin	ND	7
	<i>A. americanum</i>	Thrombin	ST, C (Ki-73 pmol/L)	12
	<i>A. variegatum</i>	Thrombin	NC	~3 770
Hard ticks	<i>B. microplus</i>	Thrombin	ND	ND
	<i>B. microplus</i>	Thrombin	Not ST (ND)	60
	<i>H. dromedarii</i>	Thrombin	NC (Ki-11.7 μmol/L)	3.2
	<i>H. dromedarii</i>	Thrombin	C (Ki-211 nmol/L)	15
	<i>H. longicornis</i>	Thrombin	ND	ND

ND: 未确定; ST: 缓慢紧密的结合; C: 竞争性抑制; UC: 反竞争性抑制; NC: 非竞争性抑制。

ND: not determined; ST: slow-tight; C: competitive; UC: uncompetitive; NC: non-competitive.

分离出了FXa的抑制剂家族,还分离出了Penthalaris和Ixolaris两种抑制剂。Ixolaris与Salp14、Salp9具有序列相似性,并被鉴定为免疫蛋白^[16]。Penthalaris和Ixolaris均属于kunitz类抑制剂。Ixolaris含有2个kunitz结构域,而Penthalaris含有5个kunitz结构域。这2种抑制剂均是通过结合FXa或FX,从而抑制TF/FVIIa复合物(组织因子与激活的凝血因子VII形成的复合物)的形成,进而起到抗凝作用。总而言之,Penthalaris和Ixolaris抑制TF的激活可谓宿主血管发生损伤后凝血级联反应中的第一个事件^[17]。

最近有研究人员从镰形扇头蜱(*Rhipicephalus haemaphysaloides*)中发现了一种抗凝分子rhipilin,这种抗凝分子含有2个kunitz结构域,然而其抗凝血分子的特异性暂不清楚。但由于rhipilin既可以抑制外源性凝血通路,又可以抑制内源性凝血通路,因此推测其可能以FX或凝血酶为抗凝靶点^[18]。

3 血小板黏附与聚集的抑制剂

近年来血小板聚集、激活的机制在多篇文章中有报道^[5,8]。未激活的血小板呈表面光滑的圆饼状,一旦血管发生损伤,受损部位的ADP、胶原、凝血酶、血小板激活因子、血小板反应蛋白等血小板活化激动剂便通过与血小板表面膜受体特异性结合从而激活血小板。表2为蜱虫血小板聚集抑制剂。

血小板激活前,可以通过去除血小板活化激动剂来抑制血小板活化。在这个过程中腺苷三磷酸双磷酸酶(apyrases)与蜱虫黏附抑制剂(tick adhesion

inhibitor, TAI)起到了很重要的作用。Apyrases的活性在硬蜱中的肩突硬蜱(*I. scapularis*)和软蜱中的非洲钝缘蜱(*O. Moubata*)、萨氏钝缘蜱(*O. Savignyi*)等多种蜱虫的唾液腺提取物中都有发现^[19]。Apyrases可以水解ATP和ADP,从而使聚集的血小板溶解,防止血块的形成。实验证明,肩突硬蜱中分离出的Apyrases可以使蜱虫侵染几率减少一半。这一结果为疫苗的研制提供了方向。此外,还可利用血小板抑制剂与激动剂受体结合来抑制血小板活化。例如,TAI便可以抑制血小板与基质中的胶原结合,而Moubatin则可以通过一种不明确的机制来抑制血小板的激活^[20-21]。

若血小板被活化,含有RGD(Arg-Gly-Asp)序列的纤维蛋白原与血小板表面的整合素 α IIb β 3结合引起血小板聚集,这种聚集进一步形成血栓。研究发现,非洲钝缘蜱(*O. Moubata*)中的Disagregin、变异革蜱(*D. variabilis*)中的variabilin、萨氏钝缘蜱(*O. savignyi*)中的savignygrin均含有RGD序列,它们能够凭借RGD序列与激活的血小板表面的整合素 α IIb β 3结合,进而竞争性抑制血小板与纤维蛋白原的结合,从而抑制血小板的聚集^[22]。有趣的是,有科学家发现,*Antricola delacruzii*雌性蜱虫的唾液腺中的savignygrin有着不同于*O. Savignyi*中savignygrin的序列^[23],这种不同的savignygrin则无法起到抗凝作用。

科学家还在*I. Scapularis*和*A. americanum*这2种蜱虫中发现了2种血小板聚集抑制剂,分别是PGI2和PGD2(均属于前列腺素prostacyclin)。这2种抑制剂

表2 蜱虫中的血小板聚集抑制剂(根据参考文献[8]修改)

Table 2 Platelet aggregation inhibitors from ticks (modified from reference [8])

物种 Species	成分 Compound	作用对象 Target	作用阶段 Stage	分子量(kDa) Mr (kDa)
<i>O. moubata</i>	Apyrase	ADP	PrAI	ND
	Moubatin	Collagen receptor	PtAI	17
	TAI	Collagen receptor	PrAI	15
	Disagregin	Integrin α IIb β 3	PAGI	6
<i>O. savignyi</i>	Apyrase	ADP	PtAI	67
	Savignygrin	Integrin α IIb β 3	PAGI	7
<i>D. variabilis</i>	Moubatin	Integrin α IIb β 3	PtAI	5
<i>I. scapularis</i>	PGI2	PGI2-receptor	PrAI	ND
<i>A. americanum</i>	PGD2	PGI2/D2-receptor	PrAI	ND

PrAI: 血小板激活前抑制剂; PtAI: 血小板激活后抑制剂; PAGI: 血小板聚集后抑制剂; ND: 未确定。

PrAI: pre-activation inhibition; PtAI: post-activation inhibition; PAGI: post-aggregation inhibition; ND: not determined.

则是通过抑制血小板激活过程中ADP的分泌来实现抑制作用^[24]。

4 激肽系统抑制剂

人类血浆激肽释放酶-激肽系统主要由FXII、前激肽释放酶(Prekallikrein)和高分子激肽原(high molecular weight kininogen, HK)这3种血浆蛋白质组成。体内的组织损伤导致激肽释放酶-激肽系统被激活,随后FXII与激肽释放酶相互激活,形成激肽及FXIIa。生成的激肽释放酶水解HK,从而释放血管舒缓激肽。FXIIa会对激活FXI具有催化作用进而起始内源性凝血途径。

生物体内, Prekallikrein-HK复合物结合在血管内皮细胞等表面活化部位进而激活血浆激肽释放酶-激肽系统。在这个过程中, Prekallikrein被水解为激肽释放酶(Kallikrein),并作用FXII, FXII与HK结合在带有负电荷的细胞表面,结合后FXII会自动激活并催化Prekallikrein的活化。有研究表明, Zn^{2+} 可以诱导FXII和HK构象的改变,进而促进二者与带负电荷表面的结合^[25]。

Haemaphysalin是一种在长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)中分离得到的Kunitz-型蛋白,通过抑制FXII与激肽释放酶相互激活进而抑制激肽释放酶-激肽系统。Haemaphysalin的C-端可以与 Zn^{2+} 诱导的改变了的构象的FXII和HK相结合,从而抑制它们与活化的细胞表面的结合^[26]。值得注意的是, Haemaphysalin并不是通过抑制凝血因子的活性来抑制凝血的,而是通过形成FXIIa、HK等络合物来抑制FXII与激肽释放酶的相互作用,进而达到抑制内源性凝血途径激活的目的。

5 纤维蛋白因子抑制剂

蜱虫羧肽酶抑制剂(tick carboxypeptidase inhibitor, TCI)是从扇头蜱(*Rhipicephalus bursa*)中分离得到的。TCI的C-端与其他金属羧肽酶相似,通过C-端连接哺乳动物的羧肽酶活性位点、N-端连接其exosite位点这种两端结合的方式催化体外纤维蛋白的溶解^[27]。

此外,在*I. scapularis*和*O. Savignyi*中发现了含有纤维蛋白溶解因子并可以溶解纤维蛋白的金属蛋白酶^[28]。*O. Savignyi*中的金属蛋白酶还可以通过水解纤维蛋白原与血小板的交叉耦合作用来分解聚合

在一起的血小板。

6 展望

凝血系统与血栓等疾病的形成具有十分密切的联系。例如,有研究表明,心血管疾病患者体内的一些凝血因子平均水平升高,而抗凝血因子水平降低^[29],这说明了抑制血液凝固是治疗心血管疾病中的关键所在。再如,在凝血级联反应中,凝血酶被FXa激活后,一方面可以促进纤维蛋白原转化成纤维蛋白,进而形成血栓;另一方面可以通过特有的机制增加不同凝血通路中纤维蛋白的含量,进而对血栓的形成起到促进作用^[30]。

目前抗血栓药物包括抗凝血药、抗血小板聚集药和溶血栓药3大类。其中,抗凝血药的本质就是凝血酶和凝血因子的抑制剂,已上市的代表性药物包括华法林、肝素、水蛭素、比伐卢定、阿加曲班(商品名诺保思泰)、达比加群酯(商品名Pradaxa)、FXaI、磺达肝葵钠、艾卓肝素(Idraparinux)、利伐沙班(Rivaroxaban)、阿哌沙班(Apixaban)、奥米沙班(Otamixaban)、甲苯磺酸盐(Edoxaban)、贝曲西班(Betrixaban)等。抗血小板药物的本质就是血小板聚集抑制剂,已上市的代表性药物包括阿司匹林、双嘧达莫(潘生丁)、噻氯匹啉、氯吡格雷、奥扎格雷、阿昔单抗(Abciximab)、替罗非班(Tirofiban)和埃替非巴肽(Eptifibatide)、苯磺唑酮等。溶血栓药物的本质就是直接或间接激活纤溶酶原的药物,已上市的药物包括链激酶、尿激酶、蚓激酶、组织型纤溶酶原激活物[阿替普酶(tissue-type plasminogen activator, t-PA)]、茵香院化纤溶酶原链激酶激活剂复合剂(anistreplase, APSAC)、单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(single chain urokinase 2 type plasminogen activator, scu2PA)、葡激酶等。但这些药物都有各自的局限性,比如出血性风险高、价格昂贵等^[31-32]。如本文所述,目前在蜱虫中发现的上述多种抗凝血活性物质可以分别抑制凝血级联反应中凝血因子、凝血酶原、纤维蛋白原等物质的激活,几乎囊括了凝血级联反应的各个阶段,这无疑为我们提供了抗血栓药物来源的一个巨大宝库^[33-35]。虽然这些抗凝血活性物质还未见有上市药物,但对其进行研究具有重要意义。蜱虫抗凝血活性物质的成功分离与深入研究为抗血栓药物的研制提供了新思路,研

究可以从中寻找有潜力的药物分子并对其进行改造,使之对人类健康服务。

参考文献 (References)

- 1 Kim TK, Tirloni L, Pinto AF, Moresco J, Yates JR 3rd, da Silva Vaz I Jr, et al. *Ixodes scapularis* tick saliva proteins sequentially secreted every 24 h during blood feeding. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(1): e0004323.
- 2 Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates JR 3rd, Pinto AF, et al. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: A proteomic study. *Parasit Vectors* 2015; 8(1): 1-23.
- 3 Mercer PF, Chambers RC. Coagulation and coagulation signalling in fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(7): 1018-27.
- 4 Yu Y, Cao J, Zhou Y, Zhang H, Zhou J. Isolation and characterization of two novel serpins from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks Tick Borne Dis* 2013; 4(4): 297-303.
- 5 Ibelli AM, Kim TK, Hill CC, Lewis LA, Bakshi M, Miller S, et al. A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int J Parasitol* 2014; 44(6): 369-79.
- 6 Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates JR 3rd, Pinto AF, et al. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: A proteomic study. *Parasit Vectors* 2015; 8(1): 1-23.
- 7 Mulenga A, Kim TK, Ibelli AM. Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel *Amblyomma americanum* tick saliva protein. *Int J Parasitol* 2013; 43(6): 439-51.
- 8 Bowman AS, Coons LB, Needham GR, Sauer JR. Tick saliva: Recent advances and implications for vector competence. *Med Vet Entomol* 1997; 11(3): 277-85.
- 9 乔瑞琼, 周金林. 蜱源含Kunitz功能域的丝氨酸蛋白酶抑制分子研究进展. *动物医学进展(Qiao Ruiqiong, Zhou Jinlin. Advance in tick-derived serine protease inhibitor with kunitz domains. Progress In Veterinary Medicine)* 2013; 34(11): 97-101.
- 10 Jablonka W, Kotsyfakis M, Mizurini DM, Monteiro RQ, Lukszo J, Drake SK, et al. Identification and mechanistic analysis of a novel tick-derived inhibitor of thrombin. *PLoS One* 2015; 10(8): e0133991.
- 11 陈浩, 王永庆, 孟玲, 孔毅, 魏继福. 凝血因子Xa抑制剂研究进展. *药学与临床研究(Chen Hao, Wang Yongqing, Meng Ling, Kong Yi, Wei Jifu. Advance in the development of factor Xa inhibitors. Pharmaceutical and Clinical Research)* 2013; 21(6): 655-9.
- 12 Joubert AM, Louw AI, Joubert F, Neitz AW. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Exp Appl Acarol* 1998; 22(10): 603-19.
- 13 Chang JY. Distinct folding pathways of two homologous disulfide proteins: Bovine pancreatic trypsin inhibitor and tick anticoagulant peptide. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14(1): 127-35.
- 14 Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F, et al. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol Biol* 2002; 11(6): 641-50.
- 15 Narasimhan S, Montgomery RR, DePonte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson JF, et al. Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(5): 1141-6.
- 16 Das S, Banerjee G, DePonte K, Marcantonio N, Kantor FS, Fikrig E. Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J Infect Dis* 2001; 184(8): 1056-64.
- 17 Chmelar J, Calvo E, Pedra JH, Francischetti IM, Kotsyfakis M. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *J Proteomics* 2012; 75(13): 3842-54.
- 18 Gao X, Shi L, Zhou Y, Cao J, Zhang H, Zhou J. Characterization of the anticoagulant protein Rhipilin-1 from the *Rhipicephalus haemaphysaloides* tick. *J Insect Physiol* 2011; 57(2): 339-43.
- 19 Mans BJ, Gaspar AR, Louw AI, Neitz AW. Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1998; 120(3): 617-24.
- 20 Almazán C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 2003; 21(13): 1492-501.
- 21 Waxman L, Connolly TM. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem* 1993; 268(8): 5445-9.
- 22 Mans BJ, Louw AI, Neitz AWH. Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *J Biol Chem* 2002; 277(24): 21371-8.
- 23 Ribeiro JM, Labruna MB, Mans BJ, Maruyama SR, Francischetti IM, Barizon GC, et al. The sialotranscriptome of *Antricola delacruzi* female ticks is compatible with non-hematophagous behavior and an alternative source of food. *Insect Biochem Mol Biol* 2012; 42(5): 332-42.
- 24 Bowman AS, Sauer JR, Zhu K, Dillwith JW. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem Mol Biol* 1995; 25(6): 735-41.
- 25 Herwald H, Mörgelin M, Svensson HG, Sjöbring U. Zinc-dependent conformational changes in domain D5 of high molecular mass kininogen modulate contact activation. *Eur J Biochem* 2001; 268(2): 396-404.
- 26 Kato N, Okayama T, Isawa H, Yuda M, Chinzei Y, Iwanaga S. Contribution of the N-terminal and C-terminal domains of haemaphysalin to inhibition of activation of plasma kallikrein-kinin system. *J Biochem* 2005; 138(3): 225-35.
- 27 Arolas JL, Lorenzo J, Rovira A, Castellà J, Aviles FX, Sommerhoff CP. A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: Isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization. *J Biol Chem* 2005; 280(5): 3441-8.
- 28 Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin (ogen) lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305(4): 869-75.
- 29 周长乐, 丁志坚. 凝血酶原片段1+2在心血管疾病中的作用. *医学综述(Zhou Changle, Ding Zhijian. Prothrombin fragment 1+2 in cardiovascular disease. Medical Recapitulate)* 2014; 20(15): 2711-3.
- 30 林轲倪, 杨根生. 一种新型凝血因子Xa抑制剂的合成与活性研

- 究. 广东化工(Lin Keni, Yang Gensheng. The synthesis and activity research of a new coagulation factor Xa inhibitor. *Guangdong Chemical Industry* 2014; 41(16): 15-6.
- 31 孙晓庆. 抗血栓药物研究进展. *中国实用医药*(Sun Xiaoping. Study progress of anti-thrombosis medicine. *China Practical Medicine* 2010; 5(26): 241-2.
- 32 邢峻豪, 杨凌云, 李清, 周金培, 张惠斌. 抗血栓药物的研究进展. *药学进展*(Xing Junhao, Yang Lingyun, Li Qing, Zhou Jinpei, Zhang Huibin. Study progress of anti-thrombosis medicine. *Progress in Pharmaceutical Sciences*) 2014; (3): 174-84.
- 33 Schuijt TJ, Bakhtiari K, Daffre S, DePonte K, Wielders SJ, Marquart JA, *et al.* Factor Xa activation of factor V is of paramount importance in initiating the coagulation system lessons from a tick salivary protein. *Circulation* 2013; 128(3): 254-66.
- 34 Mulenga A, Kim T, Ibelli AM. *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. *Insect Mol Biol* 2013; 22(3): 306-19.
- 35 Cameiro-Lobo TC, Schaffner F, Disse J, Ostergaard H, Francischetti IM, Monteiro RQ, *et al.* The tick-derived inhibitor Ixolaris prevents tissue factor signaling on tumor cells. *J Thromb Haemost* 2012; 10(9): 1849-58.