

注射用丹参多酚酸对血小板功能的影响

张燕欣^{1,2}, 陈璐³, 邹志文⁴, 万梅绪^{1,2}, 李智^{1,2}, 李德坤^{1,2*}, 鞠爱春^{1,2*}

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

3. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200

4. 天津医科大学, 天津 300070

摘要: 目的 评价注射用丹参多酚酸(SAFI)对血小板功能的影响。方法 采用大鼠体内实验和家兔体外实验。在体内实验中, 40只大鼠缺血-再灌注模型(MCAO/IR)大鼠随机分为模型组, SAFI低、中、高剂量(5.8、11.6、23.2 mg/kg)组和阳性药(银杏内酯注射液, 2 mL/kg)组, 另取8只切开颈部皮肤作为假手术组。尾静脉iv给药14 d后分别取血, 凝血时间检测试剂盒检测活化凝血时间(ACT)和活化部分凝血活酶时间(APTT), 利用ELISA试剂盒测定各组血清中5-羟色胺(5-HT)、P选择素(CD62P)、β球蛋白(β-TG)和血小板膜糖蛋白IIa/IIIb(GPIIa/IIIb)含量。体外实验中, 采用腺苷二磷酸(ADP), 血小板活化因子(PAF)和花生四烯酸(AA)为诱导剂, 诱导家兔血小板聚集, 通过血小板分析仪测定不同浓度的SAFI对血小板聚集率的影响。结果 体内实验结果表明: 低、中、高剂量SAFI均能明显延长大鼠血液凝血时间, 且能有效降低模型大鼠血液中5-HT、CD62p、β-TG和GPIIb/IIIa的水平($P < 0.05$ 、 0.01)。体外实验结果表明: SAFI均可显著降低血小板聚集率、抑制血小板聚集($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 SAFI可有效抑制血小板活化, 改善血小板的黏附、聚集、释放等功能。

关键词: 注射用丹参多酚酸; 凝血时间; 血小板聚集; 血小板活化; 腺苷二磷酸; 血小板活化因子; 花生四烯酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2391-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.014

Effect of Salvianolic Acids for Injection on platelet function

ZHANG Yanxin^{1,2}, CHEN Lu³, ZOU Zhiwen⁴, WAN Meixu^{1,2}, LI Zhi^{1,2}, LI Dekun^{1,2}, JU Aichun^{1,2}

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Safety Evaluation Enterprise of Traditional Chinese Medicine Injections, Tianjin 300410, China

3. Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

4. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objectives To explore the effect of Salvianolic Acids for Injection (SAFI) on platelet function. **Methods** The effects were evaluated by rats experiment *in vivo* and rabbits experiment *in vitro*. *In vivo* experiments, cerebral ischemia-reperfusion model (MCAO/IR) rats were constructed by carotid artery embolization, and 40 rats that were successfully modeled were randomly divided into model group, SAFI low-dose group (5.8 mg/kg), medium-dose group (11.6 mg/kg) and high-dose group (23.2 mg/kg), and positive drug group (Ginkgolides Injection, 2 mL/kg). Another eight rats were cut into the neck skin without modeling as the sham operation group. Blood samples were collected after 14 days of caudal vein administration. Activated coagulation time (ACT) and activated partial thrombin time (APTT) were measured using a clotting time detection kit. The contents of 5-HT, CD62P, β-TG and GPIIa/IIIb in serum of each group were determined by ELISA kit. *In vitro* experiment, adenosine diphosphate (ADP), platelet activating factor (PAF) and arachidonic acid (AA) were used as inducers to induce platelet aggregation in rabbits. **Results** The results of *in vivo* experiments showed that low, medium and high dose SAFI can significantly prolong the blood coagulation time of rats, and effectively reduced the levels of 5-HT, CD62p, β-TG and GPIIa/IIIb in blood of model rats ($P < 0.05$, 0.01). The results of *in vitro* experiments showed that SAFI could significantly reduce the platelet aggregation rate and inhibit platelet aggregation in

收稿日期: 2021-07-28

第一作者: 张燕欣, 女, 工程师, 研究方向为中药注射剂安全性评价、中药药理和药物警戒。E-mail: zhangyanxin2013@tasly.com

*共同通信作者: 李德坤, 男, 高级工程师, 研究方向为中药工艺、质量控制、中药药理及药物警戒。E-mail: lidekun@tasly.com

鞠爱春, 男, 正高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。E-mail: juach@tasly.com

ADP, PAF and AA induced platelet aggregation ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusions** SAFI can effectively inhibit platelet activation and improve platelet adhesion, aggregation and release.

Key words: Salvianolic Acids for Injection (SAFI); coagulation time; platelet aggregation; platelet activation; adenosine diphosphate (ADP); platelet activating factor (PAF); arachidonic acid (AA)

血栓性疾病是指由血栓形成以及血栓栓塞所导致的疾病^[1]。血栓会阻塞形成部位的血液流动或者脱落后阻塞下游部位的血液流动,导致组织器官缺血进而坏死^[2],临床上常表现为静脉血栓栓塞、缺血性脑梗死(脑卒中)和心肌梗死。近年来血栓性疾病的发病率在各类疾病中居于首位,有逐渐增长的趋势,极大威胁人类的健康^[3]。目前血栓性疾病的预防和治疗主要依靠阿司匹林、蛋白酶激活受体拮抗剂、血小板膜糖蛋白IIa/IIIb(GP IIa/IIIb)受体拮抗剂、P2Y₁₂受体拮抗剂等抗血小板药物^[4]。这些药物大多通过单一靶点发挥作用,易出现药物抵抗,且在治疗血栓性疾病时均存在出血等副作用^[5]。从现代医学的角度看,血瘀与血小板功能被过度激活密切相关,以活血化瘀为主的中药注射剂,因具有多靶点及多种作用机制的特点,在血栓性疾病的治疗中具有明显优势^[6]。

注射用丹参多酚酸(SAFI)是天津天士力之骄药业有限公司于2011年获批的五类新药,临床上主要用于缺血性脑卒中和急性脑梗死的治疗^[7]。SAFI提取丹参中的水溶性酚酸类物质并采用现代生产工艺制成的冻干粉针注射剂,疗效显著、副作用小,是治疗血栓性疾病中的常用活血化瘀类中药注射剂^[8]。临床研究表明SAFI可抑制血小板活化后的黏附和聚集^[9-10],降低血液黏度,改善血液流变学指标^[11],但对于血小板释放反应和膜蛋白表达水平的影响还未明确,抑制血小板活化的机制未见报道。

本研究通过开展大鼠体内实验,建立大脑中动脉阻塞再灌注模型(MCAO/IR)大鼠,探究SAFI对病理状态下大鼠血液凝血时间以及血液中5-羟色胺(5-HT)、P选择素(CD62P)、β球蛋白(β-TG)和GP IIa/IIIb水平的影响,明确其对凝血、血小板聚集功能和释放功能的影响;通过开展家兔体外血小板聚集实验,研究不同浓度SAFI对二磷酸腺苷(ADP)途径、血小板活化因子(PAF)途径和血小板聚集功能(AA)途径下的血小板聚集的影响,在明确其发挥活血化瘀作用的机制的同时,为推广临床应用提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,体质量160~180 g,雄性,购自

于北京维利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2016-0011。动物于温度18~29℃、湿度40%~70%屏障环境中饲养,自由进食并饮水。经天津天士力之骄药业有限公司批准,动物实验批准伦理号:TSLZJ2021002。

普通级日本白兔,体质量2.0~2.5 kg,购自于天津裕达实验动物养殖有限公司,动物许可证号SYXK(津)2021-0001。动物于温度18~29℃、湿度40%~70%普通环境中饲养,自由进食并饮水。经天津天士力之骄药业有限公司批准,动物实验批准伦理号:TSLZJ2021003。

1.2 仪器

Matrx VIP 3000 气体麻醉机(Midmark); T1000 电子天平(深圳市朗普电子科技有限公司); XS105 Dual Range 电子分析天平(Mettler Toledo 公司); 高速冷冻离心机(赛默飞世尔公司); Model 700 血小板聚集测定仪(CHRONO-LOG 公司); MODEL INFINITE 200 酶标仪(TECAN 公司)。

1.3 药品与试剂

注射用丹参多酚酸(天津天士力之骄药业有限公司,130 mg/支,生产批号20191208); 银杏内酯注射液[成都百裕制药有限公司,每支2 mL(含萜类内酯10 mg),批号021906101]; 腺苷二磷酸(ADP, CHRONO-LOG 公司,批号3490); PAF(东京化成工业株式会社,批号PPCAM-PB); 花生四烯酸(AA, Avanti Polar Lipids Inc 公司,批号840009P-5MG-C-060); 异氟烷(香港友诚生物科技有限公司,批号045742); 二水合柠檬酸钠(SIGMA 公司,批号SLBZ2215); 活化凝血时间(ACT)检测试剂盒(批号0123A15),活化部分凝血活酶时间(APTT)检测试剂盒(批号0123A21),均购自雷根生物科技有限公司; 大鼠β-TG ELISA 试剂盒(批号20210317-30169B)、大鼠5-HT ELISA 试剂盒(批号20210317-30019B)、大鼠GP IIa/IIIb ELISA 试剂盒(批号20210317-30949B)、大鼠CD62P ELISA 试剂盒(批号20210317-30158B),均购自上海酶联生物科技有限公司。

2 方法

2.1 大鼠体内血小板活化因子的检测

2.1.1 MCAO/IR 模型的建立 SD 大鼠实验前15 h

禁食,称质量后按0.4 mL/kg iv给予10%水合氯醛麻醉。待大鼠失去翻正反射后,剃去颈部毛发,进行颈动脉栓塞手术,1 h后拔栓恢复大鼠脑部血流,详细造模步骤参见文献报道^[12]。其中假手术组大鼠只进行颈动脉切开术,不插栓。

2.1.2 动物分组及给药 造模完成后24 h,采用改良Lunga评分法^[13]对造模大鼠进行评分,评分 ≥ 1 分的可入组并给药。将造模成功后的大鼠40只随机分为模型组,SAFI低、中、高剂量组和阳性药组(银杏内酯注射液)。

SAFI低剂量组按照5.8 mg/kg剂量(临床等效剂量1/2)iv给药;SAFI中剂量组按照11.6 mg/kg(临床等效剂量)iv给药;SAFI高剂量按照23.2 mg/kg剂量(临床等效剂量2倍)iv给药;银杏内酯注射液按照2 mL/kg剂量(临床等效剂量)iv给药,模型组和假手术组每天iv给予0.9%氯化钠注射液2 mL/kg,所有组别均连续给药14 d,1次/d。

2.1.3 血凝时间相关指标检测 (1)ACT检测:给药14 d结束后,取大鼠静脉血,静脉血离体后按照ACT试剂盒测定血液完全凝固所需时间。(2)APTT检测:取大鼠新鲜待测静脉血与柠檬酸钠抗凝剂(109 mmol/L)按9:1混合,混匀,3 000 r/min离心10 min,收集上清液,转移至离心管,以防止血小板被激活。按照APTT试剂盒说明书测定缺乏血小板血浆凝固所需时间。

2.1.4 血清中 β -TG、GPIIb/IIIa、5-HT和CD62p含量测定 给药14 d结束后,经腹主动脉取血使大鼠致死。血液静置2 h后,3 500 $\times$ g离心20 min,将收集的血清于-80 $^{\circ}$ C条件下储存,待用。按照ELISA试剂盒说明书检测血清中 β -TG、GPIIb/IIIa、5-HT和CD62p水平。

2.2 家兔体外血小板聚集实验

2.2.1 血浆的制备 家兔腹主动脉取血,血浆用3.8%柠檬酸钠1:9抗凝,以1 000 r/min离心10 min,收集上清液于50 mL离心管中,得富血小板血浆(PRP),并敞口放置30 min使其充分与空气平衡,随后分装于2 mL离心管中待用。取完上清液后,剩余部分以3 000 r/min转速离心10 min,收集上清液,得贫血小板血浆(PPP)。

2.2.2 3种途径诱导剂最佳浓度的确定 采用比浊法测定家兔血小板聚集率,取300 μ L PPP加入专用比色杯中,调节100%透光度后取出。取20 μ L对照样品(0.9%氯化钠注射液)+274 μ L PRP加入专用比色杯中,在1 200 r/min转速下,37 $^{\circ}$ C孵育5 min $\pm$

15 s后加入不同浓度的ADP、PAF和AA(表1),每个浓度设置3个平行对照样本并测定血小板聚集率,选择聚集率应在40%~70%,且3个平行样本RSD $<10\%$ 为最佳反应浓度。

表1 ADP、PAF和AA的浓度设置

Table 1 Concentration setting of ADP, PAF and AA

ADP浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	PAF浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	AA/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
100	102.4	160
500	25.6	80
250	6.4	40
125	1.6	4
62	0.4	0.4

2.2.3 SAFI血小板聚集率的测定 采用比浊法测定家兔血小板聚集率,取300 μ L PPP加入专用比色杯中,调节100%透光度后取出。取不同浓度SAFI药液20 μ L+274 μ L PRP加入专用比色杯中(每个SAFI药液浓度设置3个平行对照样本,即加入0.9%氯化钠注射液20 μ L),37 $^{\circ}$ C孵育5 min $\pm$ 15 s后分别加入上述确定的最佳浓度的ADP、PAF和AA诱导血小板聚集,计算5 min内的最大聚集率。当0 $<$ 血小板聚集抑制率 $<100\%$ 时,说明该浓度下SAFI有抑制血小板聚集的作用。计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组最大聚集率} - \text{给药组最大聚集率}}{\text{对照组最大聚集率}}$$

2.3 统计数据处理

采用统计软件Graphpad prism 8.0软件进行单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 凝血时间检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠血液ACT和血浆APTT均显著缩短($P<0.01$);与模型组相比,SAFI低、中、高剂量组和阳性药组的大鼠血液ACT和血浆APTT均有不同程度的延长($P<0.05, 0.01$),说明SAFI具有抗凝血的作用。见表2。

3.2 大鼠体内血小板活化因子检测结果

与假手术组相比,模型组大鼠血清 β -TG、GPIIb/IIIa、5-HT和CD62p表达水平明显升高($P<0.01$);与模型组相比,低、中、高剂量SAFI组和阳性药组的大鼠血清 β -TG、GPIIb/IIIa、5-HT和CD62p表达水平均有不同程度的降低($P<0.05, 0.01$)。见表3。

3.3 家兔体外血小板聚集实验结果

3.3.1 3种途径诱导剂最佳浓度的确定 由表4可

表2 SAFI对MCAO大鼠凝血时间的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Effect of SAFI on coagulation time of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量	ACT/s	APTT/s
假手术	2 mL·kg ⁻¹	74.17±11.87	44.56±1.90
模型	2 mL·kg ⁻¹	57.50±10.03 ^{##}	22.70±1.64 ^{##}
SAFI	5.8 mg·kg ⁻¹	60.52±3.57*	24.50±1.73*
	11.6 mg·kg ⁻¹	65.43±9.20**	34.00±2.38**
	23.2 mg·kg ⁻¹	69.00±5.80**	39.70±1.92**
银杏内酯	2 mL·kg ⁻¹	65.50±2.55**	33.00±1.48**

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

知,当ADP浓度为125 $\mu\text{mol/L}$ 、PAF浓度为1.6 $\mu\text{mol/L}$ 、AA浓度为4 $\mu\text{mol/L}$ 时,3个平行对照样本的聚集率在40%~70%,且3个平行样本RSD<10%,因此选定上述浓度为3种途径的最佳浓度。

3.3.2 ADP诱导家兔体外血小板聚集实验 由血小板聚集分析仪测定ADP诱导的血小板聚集实验结果可知,当SAFI质量浓度为2.85~21.08 mg/mL时,可显著降低血小板聚集率($P < 0.01$),抑制血小板聚集。结果见表5。

3.3.3 PAF诱导家兔体外血小板聚集实验 由血小板聚集分析仪测定PAF诱导的血小板聚集实验结果可知,当SAFI浓度为11.92~130.00 mg/mL时,可

显著降低血小板聚集率($P < 0.01$),抑制血小板聚集。结果见表6。

3.3.4 AA诱导家兔体外血小板聚集实验 由血小板聚集分析仪测定AA诱导的血小板聚集实验结果可知,当SAFI质量浓度为42.60~203.13 mg/mL时,可显著降低血小板聚集率($P < 0.01$),抑制血小板聚集。结果见表7。

4 讨论

5-HT属吲哚胺类化合物,在外周中分布广泛。当血管内皮损伤、胶原暴露时,血小板活化导致致密颗粒与血小板膜融合并释放5-HT等活性物质,5-HT与血小板表面的5-HT受体结合,进一步促进血小板的活化、聚集以及释放反应,导致血小板二次聚集,促进血栓形成^[14-16]。CD62p是一类膜糖蛋白,相对分子质量为 1.40×10^5 ,可与中性粒细胞和单核细胞结合,并通过Ca²⁺依赖的方式介导血小板与这两类细胞的黏附,进而使血小板聚集,促进血栓形成^[17-18]。 β -TG是血小板分泌的一种蛋白质,与特异性受体结合后可抑制前列环素I₂(PGI₂)的合成,打破PGI₂和血栓烷A₂(TXA₂)之间的动态平衡,引起血小板黏附、聚集^[19-20]。CD62p和 β -TG均储存于血小板 α 颗粒(特殊颗粒)中,其中CD62p位于血小板 α 颗粒膜上, β -TG位于颗粒内部。正常情况下,CD62p和 β -TG仅少量表达于血小板表面或出现在

表3 β -TG、GPIIb/IIIa、5-HT和CD62p表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Detection results of β -TG, GPIIb/IIIa, 5-HT and CD62p expression levels ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量	5-HT/(ng·mL ⁻¹)	CD62 p/(pg·mL ⁻¹)	β -TG/(ng·mL ⁻¹)	GPIIb/IIIa/(U·mL ⁻¹)
假手术	2 mL·kg ⁻¹	1.53±0.15	4.69±0.71	2.98±0.55	103.98±10.96
模型	2 mL·kg ⁻¹	1.98±0.24 ^{##}	5.18±0.38 ^{##}	7.76±0.73 ^{##}	162.37±12.47 ^{##}
SAFI	5.8 mg·kg ⁻¹	1.84±0.16	5.05±0.11	5.86±0.57**	148.49±20.57
	11.6 mg·kg ⁻¹	1.70±0.20*	4.64±0.21*	5.61±0.46**	144.25±13.23**
	23.2 mg/kg	1.65±0.24*	4.57±0.18**	4.88±0.97**	122.31±20.67**
银杏内酯	2 mL/kg	1.65±0.23**	4.36±0.53**	4.03±1.12**	131.00±12.32**

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham operation group, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group表4 不同浓度ADP、PAF和AA的空白样品聚集率($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Blank sample aggregation rates of different concentrations ADP, PAF and AA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

ADP浓度($\mu\text{mol/L}$)	聚集率/%	RSD/%	PAF浓度($\mu\text{mol/L}$)	聚集率/%	RSD/%	AA浓度($\mu\text{mol/L}$)	聚集率/%	RSD/%
100	100.00±0.00	0.00	102.4	98.25±1.26	1.28	160	87.75±1.26	1.43
500	93.00±2.59	2.78	25.6	88.75±2.22	2.50	80	87.50±1.73	1.98
250	78.75±2.22	2.82	6.4	79.75±3.30	4.14	40	79.75±2.22	2.78
125	42.00±2.94	7.01	1.6	61.75±1.71	2.77	4	61.75±2.22	3.29
62	29.50±1.29	4.38	0.4	38.50±2.08	5.41	0.4	36.50±3.11	8.52

表5 SAFI对ADP诱导的家兔体外血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 *In vitro* effect of SAFI on ADP-induced platelet aggregation in rabbits ($\bar{x} \pm s, n=3$)

SAFI浓度/(mg·mL ⁻¹)	对照组聚集率/%	SAFI聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
21.08	41.80±0.57	1.28±0.14**	96.95
15.81	41.92±1.20	8.56±0.39**	79.58
11.86	42.32±0.77	16.56±0.98**	60.87
8.85	42.04±1.02	23.00±0.92**	45.29
6.75	42.00±0.60	27.76±0.73**	33.9
4.95	42.08±1.08	32.56±1.09**	22.62
3.75	41.84±1.09	33.96±1.30**	18.83
2.85	42.16±1.45	36.84±1.46**	12.62

与对照组比较:** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group表6 SAFI对PAF诱导的家兔体外血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 *In vitro* effect of SAFI on PAF-induced platelet aggregation in rabbits ($\bar{x} \pm s, n=3$)

SAFI浓度/(mg·mL ⁻¹)	对照组聚集率/%	SAFI聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
130.00	61.30±0.56	12.23±0.60**	80.04
78.00	61.03±0.91	38.07±1.32**	37.63
46.80	60.97±1.39	47.30±2.13**	22.42
32.68	64.43±0.85	53.10±0.40**	17.59
28.27	64.13±1.15	52.93±1.40**	17.46
21.20	64.27±1.62	54.23±0.93**	15.61
15.90	66.33±0.76	54.97±1.40**	17.14
11.92	66.03±0.86	58.30±1.25*	11.71

与对照组比较:** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group

血液中;当血小板受到刺激被激活后 α -颗粒膜与质膜融合使得CD62p在血小板表面表达, β -TG释放到血液中,因此血液中这两种物质的水平上升表明血小板活化、 α 颗粒与质膜融合, α -颗粒的内容物释放入血^[21]。GPIIb/IIIa是只存在于血小板膜上的受体,占血小板蛋白总数的1%~2%。当血小板活化后,GPIIb/IIIa发生变构反应,与纤维蛋白原以较高亲和力和力结合形成血小板-纤维蛋白原-血小板结合状态,引起血小板聚集,导致血栓的形成^[22]。因此,5-HT、CD62p、 β -TG和GPIIb/IIIa为血小板活化特异性标志物。本研究通过构建MCAO-IR大鼠体内实验证明了SAFI可降低大鼠在病理状态下5-HT、CD62p、 β -TG和GPIIb/IIIa的水平,即SAFI可通过

表7 SAFI对AA诱导的家兔体外血小板聚集的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 7 *In vitro* effect of SAFI on AA-induced platelet aggregation in rabbits ($\bar{x} \pm s, n=3$)

SAFI浓度/(mg·mL ⁻¹)	对照组聚集率/%	SAFI聚集率/%	血小板聚集抑制率/%
203.13	63.97±1.06	2.01±0.65**	96.85
162.50	64.23±0.91	18.97±1.41**	70.47
130.00	65.07±1.32	28.20±1.14**	56.66
104.00	64.97±0.91	38.77±1.66**	40.33
83.20	61.27±1.05	42.93±1.30**	29.92
66.56	61.13±2.31	52.97±1.31**	13.36
53.25	62.23±1.14	54.37±1.96**	12.64
42.60	62.23±1.96	56.10±1.15**	9.86

与对照组比较:** $P<0.01$ ** $P<0.01$ vs control group

减弱血小板活化信号转导的终点反应、抑制血小板 α 颗粒和致密颗粒内的血小板活化诱导物质释放来抑制血小板的活化,进而发挥治疗血栓性疾病的效果。

血小板的活化主要有3条途径,分别为ADP途径、PAF途径和AA途径^[20,23]。本研究通过体外血小板聚集实验证实SAFI对ADP、PAF、AA 3种诱导剂诱导的血小板聚集均有明显抑制作用,且通过对比3种途径中SAFI抗血小板聚集的最低有效浓度可知,各途径抑制作用的强弱为ADP>PAF>AA。通过对比3种途径的信号转导过程,3种途径的信号转导过程中均涉及到了IP3和DAG这两个第二信使,并且在PAF途径中IP3和DAG起到了主要作用^[24],因此推测SAFI的作用机制可能与其抑制了PLC酶活性或降低该通路中下游某关键的酶或蛋白质的活性有关。通过对比ADP和PAF信号转导通路的异同并综合SAFI对ADP途径的抑制作用大于对PAF途径的抑制作用这一结果推测,在ADP途径中,SAFI可能主要通过抑制P2Y₁₂受体转导的信号通路起作用^[25]。

中药丹参作为活血化瘀中药有悠久的历史^[26],SAFI是从丹参中提取的水溶性酚类物质制成的注射剂,解决了中药注射给药及快速起效的难题。SAFI对血小板功能的影响,本研究已经证实了SAFI可通过多种靶点抑制血小板活化,对血小板的黏附、聚集、释放等功能具有有效的改善作用,但对于其在血小板活化信号转导通路中的具体作用靶点仍有待研究。由于SAFI的主要成分包含多种酚

酸类物质,在未来对其具体的作用靶点的研究中需要逐一探明每个单体对血小板功能的影响,同时利用生物化学手段确定每个单体在血小板活化信号转导通路中所作用的酶、蛋白质或受体,最终确定SAFI发挥抑制血小板活化的机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘 丽, 季婷婷, 戴淑娟, 等. 血栓性疾病的药物治疗研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2018, 39(23): 2807-2808.
Liu L, Ji T T, Dai S J, et al. Research progress in drug treatment of thrombotic diseases [J]. J Qiqihar Med Coll, 2018, 39(23): 2807-2808.
- [2] 刘莅欣, 胡桃红. 血栓性疾病抗栓治疗的研究进展[J]. 中国临床医生, 2013, 41(5): 15-17.
Liu L X, Hu T H. Research progress in antithrombotic therapy for thrombotic diseases [J]. Chin Clinician, 2013, 41(5): 15-17.
- [3] 韩聪凡, 冯文化. 血栓性疾病抗血小板聚集药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(12): 1363-1369.
Han C F, Feng W H. Research progress of anti-platelet aggregation drugs for thrombotic diseases [J]. Chin J New Drugs, 2016, 25(12): 1363-1369.
- [4] 孙双勇, 靳 京, 孔晓华, 等. 抗血小板药物研究进展及新靶点药物的发现[J]. 药物评价研究, 2021, 44(1): 213-221.
Sun S Y, Jin J, Kong X H, et al. Research progress of antiplatelet drugs and discovery of new target drugs [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(1): 213-221.
- [5] Roald H E, Sakariassen K S. Axial dependence of collagen - induced thrombus formation in flowing non-anticoagulated human blood [J]. Thromb Haemost, 1995, 73(1): 126-131.
- [6] 高红燕, 武建霞. 活血化瘀类中药抗血小板的作用机制研究进展[J]. 当代医学, 2019, 25(35): 190-192.
Gao H Y, Wu J X. Research progress on the antiplatelet mechanism of traditional Chinese medicines for promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. Contemp Med, 2019, 25(35): 190-192.
- [7] 李德坤, 苏志刚, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸药理作用及临床应用研究进展[J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 353-361.
Li D K, Su Z G, Wan M X, et al. Research progress in pharmacological effects and clinical application of salvianolic acid for injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(2): 353-361.
- [8] 周鸿杰, 阎雪莹. 注射用丹参多酚酸研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2017(11): 73.
Zhou H J, Yan X Y. Research progress of *Salvia miltiorrhiza* polyphenolic acid for injection [J]. Heilongjiang Sci Technol Inform, 2017(11): 73.
- [9] 朱 含. 丹参多酚酸治疗心绞痛对患者症状转归及血小板功能的影响[J]. 中国药物经济学, 2019, 14(8): 58-60, 63.
Zhu H. The effect of *Salvia miltiorrhiza* polyphenolic acid in the treatment of angina pectoris on patient's symptom outcome and platelet function [J]. Chin J Pharmacoeconom, 2019, 14(8): 58-60, 63.
- [10] 夏志宏, 张媛媛, 尚晓丽. 丹参多酚酸辅助双联抗血小板方案对后循环缺血性脑卒中病人血小板功能及Chemerin的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(18): 3091-3094.
Xia Z H, Zhang Y Y, Shang X L. Effects of *Salvia miltiorrhiza* polyphenolic acid-assisted dual antiplatelet regimen on platelet function and Chemerin in patients with posterior circulation ischemic stroke [J]. J Integr Tradit Chin West Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2020, 18(18): 3091-3094.
- [11] 栗延伟, 张军艳, 兰春伟. 丹参多酚酸联合阿加曲班治疗进展性脑梗死疗效观察[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(4): 357-360.
Li Y W, Zhang J Y, Lan C W. *Salvia miltiorrhiza* polyphenolic acid combined with argatroban in the treatment of progressive cerebral infarction [J]. J Xinxiang Med Coll, 2019, 36(4): 357-360.
- [12] 康 涛, 张 洪. 经颈总动脉和经颈外动脉制作大鼠MCAO模型比较[J]. 中华脑血管病杂志: 电子版, 2013, 7(3): 29-33.
Kang T, Zhang H. Comparison of rat MCAO model made via common carotid artery and via external carotid artery [J]. Chin J Cerebrovasc Dis: Electr Ed, 2013, 7(3): 29-33.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 闫桂芳, 闫 睿, 李路霞. 血清25-羟维生素D3及5-HT水平与脑卒中后抑郁的相关性[J]. 临床心身疾病杂志, 2019, 25(5): 9-12.
Yan G F, Yan R, Li L X. The correlation between serum 25-hydroxyvitamin D3 and 5-HT levels and post-stroke depression [J]. J Clinic Psychosom Dis, 2019, 25(5): 9-12.
- [15] 宋 扬, 刘 津, 臧大维, 等. 神经递质功率及血浆5-羟色胺水平与脑卒中后抑郁的相关性[J]. 中国老年学, 2017(2): 439-440.
Song Y, Liu J, Zang D W, et al. The correlation between neurotransmitter power and plasma serotonin levels and post-stroke depression [J]. Chin Gerontol, 2017(2): 439-440.

- [16] Radja F, Descarries L, Dewar K M, et al. Serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors in adult rat brain after neonatal destruction of nigrostriatal dopamine neurons: A quantitative autoradiographic study [J]. Brain Res, 1993, 606(2): 273-285.
- [17] 钟璐, 张义, 罗亨勤. 氯吡格雷与阿司匹林联合治疗对短暂性脑缺血患者CD63及CD62p的影响 [J]. 云南医药, 2018, 39(3): 226-228.
Zhong L, Zhang Y, Luo H Q. The effect of combined treatment of clopidogrel and aspirin on CD63 and CD62p in patients with transient cerebral ischemia [J]. Yunnan Med, 2018, 39(3): 226-228.
- [18] Valkonen S, Mallas B, Impola U, et al. Assessment of time-dependent platelet activation using extracellular vesicles, CD62P exposure, and soluble glycoprotein V content of platelet concentrates with two different platelet additive solutions [J]. Transfus Med Hemother, 2019, 46(4): 1-9.
- [19] Kortekaas K A, Vries D, Roest M, et al. No indications for platelet activation in acute clinical myocardial or renal ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Trans Res, 2018, 10(3): 816.
- [20] 季传平, 徐露, 李慧琴. 银杏内酯注射液和银杏内酯ABC对血小板活化因子诱导的家兔血小板聚集作用比较 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(7): 1174-1178.
Ji C P, Xu L, Li H Q. Comparison of the effects of ginkgolide injection and ginkgolide ABC on platelet activating factor-induced platelet aggregation in rabbits [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(7): 1174-1178.
- [21] 黄玉芬, 邹励宏, 李辉, 等. 血小板黏附作用相关因子研究进展 [J]. 武警后勤学院学报: 医学版, 2016, 25(4): 327-331.
Huang Y F, Zou L H, Li H, et al. Research progress of factors related to platelet adhesion [J]. J Logist Coll Armed Police Force: Med Ed, 2016, 25(4): 327-331.
- [22] 朱建中, 惠杰. 非多肽类 GPIIb/IIIa受体拮抗剂临床应用进展 [J]. 基层医学论坛, 2014, 18(19): 2557-2559.
Zhu J Z, Hui J. Progress in clinical application of non-peptide GPIIb/IIIa receptor antagonists [J]. Forum Prim Med, 2014, 18(19): 2557-2559.
- [23] 乔文豪, 王秀, 王佳丽, 等. 抗血小板药物药理作用和临床应用的研究进展 [J]. 安徽医药, 2014, 18(9): 1621-1625.
Qiao W H, Wang X, Wang J L, et al. Research progress in the pharmacological effects and clinical application of antiplatelet drugs [J]. Anhui Med, 2014, 18(9): 1621-1625.
- [24] 张鹏, 刘东升, 张俊峰. 血小板活化相关信号转导机制研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2020, 41(10): 1078-1081.
Zhang P, Liu D S, Zhang J F. Research progress on platelet activation-related signal transduction mechanisms [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2020, 41(10): 1078-1081.
- [25] 卞敬琦, 冯月男, 牛雯颖, 等. 血小板活化信号转导机制研究进展 [J]. 天津医药, 2018, 46(1): 99-103.
Bian J Q, Feng Y N, Niu W Y, et al. Research progress in platelet activation signal transduction mechanism [J]. Tianjin Med, 2018, 46(1): 99-103.
- [26] 万新焕, 王瑜亮, 周长征, 等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 788-798.
Wan X H, Wang Y L, Zhou C Z, et al. Advances in chemical constituents and pharmacological effects of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(3): 788-798.

[责任编辑 李红珠]