

红景天苷对小鼠抗血小板活性和抗血栓作用*

林晓坚¹, 袁兆伟¹, 潘彩燕¹, 孙黔云², 宛蕾^{1**}

(1. 贵州医科大学 基础医学院 药理学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省中国科学院 天然产物化学重点实验室, 贵州 贵阳 550014)

[摘要] **目的:** 探讨红景天苷(Sal)对小鼠的抗血小板活性及抗血栓作用。**方法:** 120只小鼠随机均分为对照组(生理盐水)、阳性药组(阿司匹林 100 mg/kg)、Sal 低剂量组(50 mg/kg)和 Sal 高剂量组(100 mg/kg), 雌雄各半, 各组每只小鼠腹腔注射相应试剂 1 次/d, 连续 7 d; 末次给药 30 min 时取血检测小鼠白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV), 凝血功能 4 项指标凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)及纤维蛋白原(FIB), 采用断尾流血法检测小鼠断尾出血时间; 40 只雄性小鼠按上述分组方式, 每组 10 只, 腹腔注射 1 次/d, 第 5 天给药 30 min 后腹腔注射角叉菜胶(20 mg/kg, 0.1 mL/10 g), 第 6 天、第 7 天持续给予 Sal, 分别测量并记录角叉菜胶 12、24、48 h 后的黑尾率以及黑尾长度。**结果:** 各组小鼠 WBC、RBC、PLT 和 MPV 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与对照组小鼠相比, Sal 高、低剂量组小鼠 PT、APTT、TT 及 FIB 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 阳性药组、Sal 低剂量组和 Sal 高剂量组小鼠断尾平均出血时间分别较对照组为长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 造模 12 h 时, 对照组小鼠黑尾率明显高于 Sal 高剂量组小鼠($P < 0.01$); 造模 24 h 时, 对照组小鼠黑尾率明显高于阳性药组和 Sal 高剂量组小鼠($P < 0.05$); 在造模 12 h、24 h 和 48 h 时, 与对照组小鼠相比, 阳性药组、Sal 低剂量组和 Sal 高剂量组小鼠黑尾长度均有缩短, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** Sal 对血栓形成具有明显的抑制作用, 其机制可能与抗血小板活性有关。

[关键词] 血小板; 出血时间; 角叉菜胶; 血栓形成; 红景天苷

[中图分类号] R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)09-1039-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.09.010

Experimental Study on Aantithrombotic Effect of Salidroside

LIN Xiaojian¹, Yuan Zhaowei¹, PAN Caiyan¹, SUN Qianyun², WAN Lei¹

(1. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;

2. The Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To explore the anti-platelet activity and anti-thrombotic effect of salidroside (Sal) on mice. **Methods:** 120 mice were randomly divided into the control group (normal saline), the the positive drug group (aspirin, 100 mg/kg), Sal low-dose group (50 mg/kg) and Sal high-dose group (100 mg/kg), with half male and half female. Each mouse of the groups was intraperitoneally injected with corresponding reagent once per day for 7 days. Blood samples were taken in 30 min after the last administration to detect white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), platelet count (PLT), mean platelet volume (MPV), four indexes of coagulation function, prothrombin time (PT), activated partial thrombin time (APTT), thrombin time (TT) and fibrinogen (FIB), and the bleeding time of mouse tail was detected by tail-breaking bleeding method. 40 male mice were grouped as above, 10 in each group, with intraperitoneal injection once per day, then intraperitoneal injection of carrageenan in 30 min after the administration on the 5th day, (20 mg/kg, 0.1 mL/10 g). Sal was

*[基金项目] 贵州省创新人才团队建设项目[黔科合平台人才(2016)5625]

** 通信作者 E-mail: 1325164635@qq.com

网络出版时间: 2019-09-16 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190916.2137.010.html>

continuously given on the 6th and 7th days, and the black tail rate and the black tail length of carrageenan 12 h, 24 h, and 48 h later were measured and recorded. **Results:** No significant difference was found in WBC, RBC, PLT and MPV in all groups ($P > 0.05$). Compared with the control group, there was no significant difference in PT, APTT, TT and FIB in both Sal high and low dose groups ($P > 0.05$). The average bleeding time in the positive drug group, Sal low-dose group and Sal high-dose group was longer than that in the control group respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The black tail rate of the control group was significantly higher than that of Sal high dose group ($P < 0.01$) 12 h after modeling. The black tail rate of the control group was significantly higher than that of positive drug group and Sal high-dose group ($P < 0.05$) 24 h after modeling. In 12 h, 24 h and 48 h after modeling, the black tail length of the positive drug group, Sal low-dose group and Sal high-dose group was shortened compared with the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Sal has obvious inhibitory effect on thrombosis, and the mechanism may be related to antiplatelet activity.

[**Key words**] platelet; bleeding time; carrageenan; thrombosis; salidroside

血栓性疾病是由血栓形成和血栓栓塞两种病理过程引起的一类疾病,前者是指血液中的有形成分在血管中形成栓子,造成血管部分或完全堵塞;后者则是指血栓自形成部位脱落,随血液循环部分或全部堵塞某些血管^[1]。血栓性疾病有高死亡率和高致残率的特点,其中血小板活化异常是血栓形成的重要病理学基础^[2-3]。抗血小板治疗已成为预防动脉粥样硬化性疾病,尤其是冠心病的重要治疗手段^[4],因此具有抗血小板活性的药物对于防治血栓有着重要作用。红景天是大花红景天(*rhodiola rosea* L.)的干燥根茎和根,是藏医常用药材,红景天苷(salidroside, Sal)则是红景天的主要有效成分^[5]。研究表明,Sal有广泛的药理作用,如抗氧化、抗动脉粥样硬化、心肌保护、神经保护、脑保护、抑制血小板聚集等^[6-11],但目前对其抗血小板活性和抗血栓作用研究少有报道。因此,本研究采用小鼠断尾出血时间和角叉菜胶诱导的体内血栓模型,观察Sal抗血小板活性和抗血栓作用,为临床抗血栓和抗血小板药物的研发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药物、试剂及仪器

1.1.1 实验动物 清洁级昆明小鼠160只,体质量18~22 g,雌鼠60只,雄鼠100只,由贵州医科大学实验动物中心提供,合格证号为SCXK(黔)2018-0001。实验前均适应性喂养3 d。

1.1.2 药物及试剂 Sal购自上海瓦兰生物科技

有限公司(批号HJT20180812,纯度 $\geq 98\%$),角叉菜胶购自Sigma公司(22048-25G Type κ ,批号BCBG5890V),水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司(批号20170803),二水合柠檬酸钠购自国药集团化学试剂有限公司(批号20170718),阿司匹林肠溶片购自大同市利群药业有限责任公司(批号170605)。

1.1.3 仪器 BC-5130型全自动血液细胞分析仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,5810R型高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司,移液器购自德国Eppendorf公司,XS205型万分之一电子天平购自瑞士梅特勒-托利多科学仪器有限公司,RP6002K型电子天平购自常州锐品精密仪器有限公司,RAC-1830全自动凝血分析仪购自美国Rayto公司。

1.2 方法

1.2.1 体质量及血细胞数目的测定 取40只昆明小鼠,雌雄各半,随机分为对照组(生理盐水)、阳性药组(阿司匹林100 mg/kg)、Sal高剂量组(Sal 100 mg/kg)和Sal低剂量组(Sal 50 mg/kg)。每日称重小鼠,记录体质量,按照体质量腹腔注射给药1次/d,给药体积为10 mL/kg,连续7 d;末次给药30 min后,将小鼠麻醉(4%水合氯醛,400 mg/kg)、固定、采血(3.8%枸橼酸钠抗凝,抗凝剂与血液体积之比为1:9),检测白细胞(white blood cell, WBC)、红细胞(red blood cell, RBC)、血小板计数(platelet, PLT)和平均血小板体积(mean plate volume, MPV)。

1.2.2 凝血4项的测定 取昆明小鼠40只,雌雄

各半,分组给药同 1.2.1。末次给药 30 min 后,将小鼠麻醉、固定、采血,检测凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间(thromboplastin time, TT)和纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)。

1.2.3 小鼠断尾出血时间测定 取昆明小鼠 40 只,雌雄各半,分组给药同 1.2.1。参考文献[12]末次给药 30 min 后,小鼠麻醉(4%水合氯醛,400 mg/kg),在距离尾尖 4 mm 处剪断,滤纸擦去第一滴血,随后将鼠尾放入 37 ℃生理盐水中,待小鼠尾部停止流血后,继续观察 60 s,如停止出血则以该时间为小鼠尾巴出血时间,若尾部再次出血则继续计时,到 15 min 出血未停止,则记为 15 min。

1.2.4 小鼠尾部血栓测定 取雄性昆明小鼠 40 只,随机分为 4 组,分组给药同 1.2.1。腹腔注射给药 1 次/d,至第 5 天给药 30 min 后,各组腹腔注射角叉菜胶(20 mg/kg, 10 mL/kg)^[13]第 6 天、第 7 天按分组持续给药;分别测量并记录给予角叉菜胶

12 h、24 h、48 h 后的黑尾率以及黑尾长度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用方差分析,两两比较采用 LSD 方法;计数资料以率(%)表示,小鼠黑尾率采用卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量

各组小鼠实验开始时体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);实验开始后各组小鼠每日体质量均有增长,腹腔给药第 7 天相较于给药第 1 天,各组小鼠体质量均有明显增加,差异有高度统计学意义($P < 0.01$),但同日各组小鼠体质量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 血细胞、PLT 和 MPV

实验表明,各组小鼠 WBC、RBC、PLT 和 MPV 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 各组小鼠实验期间体质量比较(g, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Sal on body weight in mice

时间	小鼠体质量			
	对照组($n = 10$)	阳性药组($n = 10$)	Sal 低剂量组($n = 10$)	Sal 高剂量组($n = 10$)
第 1 天	21.14 ± 0.92	21.74 ± 0.84	21.89 ± 0.79	21.46 ± 0.70
第 2 天	22.35 ± 0.72	22.57 ± 1.17	22.26 ± 1.43	21.99 ± 1.67
第 3 天	23.30 ± 1.05	23.24 ± 1.17	23.40 ± 1.20	23.55 ± 1.15
第 4 天	24.56 ± 0.83	24.11 ± 1.41	24.78 ± 1.39	24.73 ± 1.22
第 5 天	25.17 ± 1.40	25.76 ± 1.39	25.21 ± 1.20	25.59 ± 1.39
第 6 天	26.18 ± 1.35	26.29 ± 1.11	26.37 ± 1.24	26.61 ± 1.30
第 7 天	26.83 ± 1.41 ⁽¹⁾	27.04 ± 1.48 ⁽¹⁾	27.43 ± 1.35 ⁽¹⁾	27.34 ± 1.37 ⁽¹⁾

注:⁽¹⁾与同组第 1 天比较, $P < 0.01$ 。

表 2 各组小鼠血细胞、PLT 和 MPV($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of Sal on blood cell count, PLT and MPV in mice

指标	对照组($n = 10$)	阳性药组($n = 10$)	Sal 低剂量组($n = 10$)	Sal 高剂量组($n = 10$)	F	P
WBC($\times 10^9/L$)	3.47 ± 0.99	3.61 ± 1.04	3.33 ± 0.90	3.05 ± 0.95	0.492	0.994
RBC($\times 10^{12}/L$)	8.72 ± 0.68	8.37 ± 0.58	8.46 ± 0.57	8.65 ± 0.72	0.572	0.877
PLT($\times 10^9/L$)	559.60 ± 91.60	566.10 ± 107.30	572.60 ± 109.10	543.10 ± 146.80	0.107	0.577
MPV(fL)	5.54 ± 0.35	5.83 ± 0.39	5.63 ± 0.40	5.66 ± 0.46	0.823	0.490

2.3 凝血 4 项指标

与对照组小鼠相比,Sal 高、低剂量组小鼠 PT、APTT、TT 及 FIB 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 小鼠断尾出血时间

阳性药组、Sal 低剂量组和 Sal 高剂量组小鼠

断尾平均出血时间分别较对照组为长,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但其余各组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。

2.5 小鼠黑尾率及黑尾长度

造模 12 h 时,对照组小鼠黑尾率明显高于 Sal 高剂量组小鼠,差异有高度统计学意义($P < 0.01$),

表 3 各组小鼠凝血 4 项指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effect of Sal on four indication of coagulation in mice

指标	对照组($n = 10$)	阳性药组($n = 10$)	Sal 低剂量组($n = 10$)	Sal 高剂量组($n = 10$)
PT(s)	12.22 ± 0.55	12.44 ± 0.89	12.37 ± 0.65	12.26 ± 0.61
APTT(s)	22.60 ± 1.36	26.60 ± 2.83 ⁽¹⁾	22.80 ± 1.33	22.79 ± 1.28
TT(s)	18.99 ± 1.04	18.90 ± 1.10	19.10 ± 1.05	18.91 ± 1.07
FIB(g/L)	1.76 ± 0.14	1.73 ± 0.16	1.77 ± 0.17	1.82 ± 0.17

注:⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 4 各组小鼠断尾出血时间比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 4 Effect of Sal on mice tail bleeding time

组别	出血时间
对照组	236.5 ± 37.4
阳性药组	882.2 ± 36.8 ⁽²⁾
Sal 低剂量组	280.4 ± 50.0 ⁽¹⁾
Sal 高剂量组	296.0 ± 44.7 ⁽²⁾

注:与对照组比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

但阳性药组小鼠和 Sal 低剂量组小鼠间黑尾率比较差异无统计学意义($P > 0.05$);造模 24 h 时,对照组小鼠黑尾率高于阳性药组和 Sal 高剂量组小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$);造模 48 h 时,各组小鼠间黑尾率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在造模 12 h、24 h 和 48 h 时,与对照组小鼠相比,阳性药组、Sal 低剂量组和 Sal 高剂量组小鼠黑尾长度均有缩短,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示 Sal 有改善小鼠血栓形成的作用。见表 5、图 1。

表 5 各组小鼠黑尾率及黑尾长度

Tab. 5 Effect of Sal on black tail rate and black tail length of mice

组别	黑尾率(%)			黑尾长度(cm)		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
对照组	80	100	100	1.49 ± 1.17	2.73 ± 1.02	2.84 ± 0.99
阳性药组	40	60 ⁽¹⁾	70	0.37 ± 0.49 ⁽¹⁾	1.03 ± 0.93 ⁽²⁾	1.18 ± 0.87 ⁽²⁾
Sal 低剂量组	40	90	100	0.43 ± 0.56 ⁽¹⁾	1.55 ± 0.80 ⁽¹⁾	1.61 ± 0.69 ⁽¹⁾
Sal 高剂量组	0 ⁽²⁾	60 ⁽¹⁾	80	0.00 ± 0.00 ⁽²⁾	1.00 ± 0.97 ⁽²⁾	1.24 ± 0.85 ⁽²⁾

注:与对照组同时间比较,⁽¹⁾ $P < 0.05$,⁽²⁾ $P < 0.01$ 。

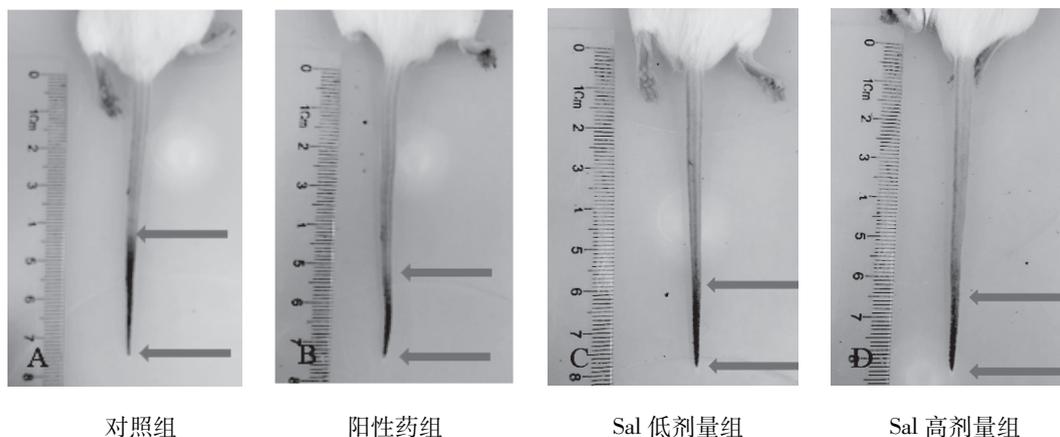


图 1 各组小鼠在角叉菜胶诱导 48 h 时黑尾长度

Fig. 1 Tail thrombosis length of different groups at 48 h after carrageenan induction

3 讨论

近年来,我国心血管疾病发病率持续升高,心血管疾病造成的死亡人数已居各类疾病死亡率的首位^[14]。血栓性疾病在心血管疾病中比例很高,其中血小板功能异常导致血栓形成和栓塞并发症是心血管疾病发病的主要原因^[15]。抗血栓药物是防治血栓性疾病的重要手段,其中中药及其制剂对于抗血小板和抗血栓有着独到的疗效,且副作用小^[16]。本研究结果显示,Sal 对小鼠的体质量增长并无明显影响,对小鼠血细胞计数以及平均血小板体积均未产生明显影响。平均血小板体积可反应血小板体积以及体积的差异程度,该指标亦可体现血小板的产率及激活,相对于血小板计数,平均血小板体积更能反映血小板功能^[17]。小鼠断尾出血是测定血小板功能的整体模型,包括血小板功能、血小板计数以及凝血系统在内的因素均可影响机体的止血功能^[18]。同时,Sal 对小鼠的凝血 4 项并无明显影响,则排除了小鼠凝血系统的影响。据此,本研究推测 Sal 可以延长小鼠出血时间,原因可能是通过抗血小板活性实现的。

角叉菜胶又名卡拉胶,是从红藻中提取的多糖物质的统称,属于较强的致炎物质,可用于复制炎症模型^[19]。已有研究显示,皮下注射以及腹腔注射一定剂量的角叉菜胶可诱导小鼠尾部形成血栓^[20]。此法复制的模型,血栓直观、肉眼可见,易于测量和观察,可用于抗血栓药物的评估^[21-22]。参考文献多采用雄性小鼠进行造模,预实验观察到雌性小鼠经相同给药途径注射相同剂量的角叉菜胶后,其尾部血栓发生率以及血栓长度均低于雄性小鼠,故本研究亦采取了雄性小鼠进行实验。研究结果表明,Sal 低、高剂量对延缓小鼠尾部血栓形成,减少尾部血栓长度均有作用,提示 Sal 对血栓形成具有明显的抑制作用。

综上所述,Sal 对血栓形成具有明显的抑制作用,可能与其抗血小板功能活性有关,从而为 Sal 用于血栓性疾病的防治提供了理论基础。

4 参考文献

[1] 陈灏珠,钟南山,陆再英,等. 内科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
[2] 赵子源,张秀军. 血管血栓性疾病的抗凝治疗及利伐沙班应用新进展[J]. 天津医药, 2015, 43(4): 446

-448.

[3] 丁忠仁. 抗血小板药: 现状、挑战及趋势[J]. 中山大学学报(医学版), 2018, 39(4): 481-492.
[4] 鲁成,王玉华,夏静雯,等. 抗血小板与活血化瘀治疗冠心病的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(29): 3300-3302.
[5] 赖文芳,张小琴,洪海棉,等. 红景天苷对大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤的神经保护作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6): 775-780.
[6] 范桂强,齐善厚,庞红霞,等. 红景天提取物与红景天苷体外抗氧化作用研究[J]. 中国药房, 2016, 27(13): 1797-1800.
[7] XING S S, YANG X Y, ZHENG T, et al. Salidroside improves endothelial function and alleviates atherosclerosis by activating a mitochondria-related AMPK/PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Vascular Pharmacology*, 2015(72): 141-152.
[8] CHANG X, ZHANG K, ZHOU R, et al. Cardioprotective effects of salidroside on myocardial ischemia - reperfusion injury in coronary artery occlusion-induced rats and Langendorff-perfused rat hearts[J]. *International Journal of Cardiology*, 2016, 215(2016): 532-544.
[9] YAN R, XU H, FU X X. Salidroside protects hypoxia-induced injury by up-regulation of miR-210 in rat neural stem cells [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, (103):1490-1497.
[10] 周林甫,石亚军,焦亚楠,等. 红景天苷对大鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤的保护作用[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(5): 561-566.
[11] 颜天华,杨伟,王秋娟,等. 红景天苷对正常动物血小板聚集的影响[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(5): 453-456.
[12] YUE M, LUO D J, YU S S, et al. Misshapen/NIK-related kinase (MINK1) is involved in platelet function, hemostasis, and thrombus formation [J]. *Blood*, 2016, 127(7): 927-937.
[13] 杨隆恩,张永平,张才,等. 海参酶解液对角叉菜胶所致小鼠血栓形成的抑制作用[J]. 广东海洋大学学报, 2018, 38(4): 57-62.
[14] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.
[15] 罗冬娇,傅圆圆,黄灵芳. 血小板中 NADPH 氧化酶的研究进展[J]. 浙江医药, 2017, 39(2): 2065-2068.
[16] 周胜元,刘玥,付滨,等. 中药复方制剂抗血栓作用机制的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 893-896.

(下转第 1048 页)