红景天苷体外抗血栓作用的实验研究*

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**：了解红景天苷(Sal)对小鼠体外血栓的影响及作用机制。**方法**：制备小鼠洗涤血小板，分为空白对照组、Sal(12.5 、25.0 、50.0、100.00 及 200.0 μmol/L)5 个剂量组和裂解液裂解组，通过乳酸脱氢酶(LDH)法检测 Sal 对血小板的毒性作用；将洗涤血小板分为空白对照组、模型组、阳性药组(替罗非班 0.5 mg/L)、Sal 低剂量组(25 μmol/L)及 Sal 高剂量组(50 μmol/L)，以凝血酶诱导血块回缩，观察各组血块回缩情况，同时采用酶联免疫吸附方法测定血栓素 B_2(TXB_2)含量。**结果**：裂解液裂解组小鼠洗涤血小板 LDH 活性明显高于空白对照组，Sal 各剂量组小鼠洗涤血小板 LDH 活性分别明显低于裂解液裂解组($P<0.01$)；模型组小鼠洗涤血小板中凝血酶能引起明显的血块回缩、血块比率明显低于空白对照组($P<0.01$)，替罗非班组则受到显著抑制、血块比率明显大于模型组($P<0.01$)，Sal 低剂量和高剂量组均可抑制凝血酶诱导的血块回缩、血块比率大于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；模型组洗涤血小板 TXB_2 含量水平明显高于空白对照组，Sal 低、高剂量组和阳性对照组小鼠低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论**：Sal 对血小板无明显毒性，可以明显抑制凝血酶诱导的血块回缩，此过程可能是通过减少血小板 TXA_2 的含量发挥作用。

[关键词] 血小板；乳酸脱氢酶类；血栓素 B_2；红景天苷；血块回缩
[中图分类号] R96 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2019)12-1408-05
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.12.008

Experimental Study on Antithrombotic Effect of Salidroside in *Vitro*

LIN Xiaojian[1], YUAN Zhaowei[1], PAN Caiyan[1], SUN Qianyun[2], WAN Lei[1]
(*1. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China;*
2. Key Laboratory of Natural Products Chemistry, Guizhou Academy of Chinese Sciences, Guiyang 550014, Guizhou, China)

[**Abstract**] **Objective**: To study the effect of Salidroside (Sal) on thrombus in *vitro* and explore its possible antithrombotic mechanism. **Methods**: The washed platelets were divided into 7 groups, namely, the blank control group, five dosages´groups of Sal (12.5 μmol/L, 25.0 μmol/L, 50.0 μmol/L, 100.0 μmol/L, 200.0 μmol/L) and Lysate lysis group. The toxicity of Sal to platelets was detected by lactate dehydrogenase (LDH) method. The platelets were incubated with normal Sal (25 μmol/L, 50 μmol/L) in advance, and the clot retraction was induced by thrombin to observe the effect of Sal on the clot retraction. Enzyme linked immunosorbent assay was used to determine the content and level of thromboxane B_2 (TXB_2) in mice induced by thrombin after incubating Sal (25 μmol/L, 50 μmol/L). **Results**: Compared with the control group, there was no significant difference in the release of lactic dehydrogenase (LDH) after the treatment of different doses of Sal on platelets ($P>0.05$). Compared with the control group, preincubated Sal platelets showed significantly inhibited clot retraction ($P<0.05$ or $P<0.01$). The TXB2 content of Sal treated platelets was significantly lower than that of the model group ($P<0.05$). **Conclusion**: Salidroside has no obvious toxicity to platelets, and can significantly inhibit thrombin induced clot retraction and reduce the expression of TXA_2.

*[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:2019-12-12 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191212.2002.008.html

[**Key words**] platelet; lactate dehydrogenase; thromboxane B_2; salidroside; clot retraction

血小板在生理性止血过程中发挥着重要作用，当血管受到某些刺激造成血管损伤而出血时，损伤部位的激活因素即可刺激血小板，使其发生聚集、黏附成为凝块，产生初级止血的作用，随后血小板经过一系列的反应，直到血块回缩产生稳定的血栓[1-2]。临床实践表明，中药及其制剂对于抗血小板、抗血栓具有良好的效果，在治疗心血管疾病方面具有疗效可靠，副作用小等优势[3]。红景天是大花红景天(*rhodiola rosea* L.)的干燥根和根茎，据药典记载，红景天具有益气活血、通脉平喘的功效，可用于治疗气虚血瘀、胸痹心痛、中风偏瘫及倦怠气喘等[4]。红景天苷(salidroside，Sal)是红景天的主要有效成分[5]，现代药理研究表明 Sal 具有保护心肌缺血-再灌注损伤[6]、缓解动脉粥样硬化[7]、抗肿瘤[8]、保护肾脏[9-10]、保护肝脏[11-12]及抗衰老[13]等多种药理作用，但对 Sal 的抗血栓作用研究较少。因此，本研究采用血块回缩实验，观察 Sal 体外抗血栓作用，并对血小板血栓素 B_2(thromboxane B2，TXB_2)水平进行检测，为进一步开发 Sal 提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　清洁级昆明小鼠，20 只，体质量 25～30 g，雌雄各半，由贵州医科大学实验动物中心提供，动物合格证号 SCXK(黔)2018-0001。实验前适应性喂养 3 d。

1.1.2　主要药物及试剂　Sal 购自上海瓦兰生物科技有限公司(批号 HJT20180812，纯度≥98%)，凝血酶(批号 SLBV2136)、纤维蛋白原(批号 SLBS4238)和前列腺素 E_1(prostaglandin E_1，PGE_1，批号 BCBQ3312V)均购自 Sigma 公司，盐酸替罗非班氯化钠注射液(批号 171201)购自远大医药中国有限公司，裂解液(批号 20180913)购自北京索莱宝科技有限公司，乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase，LDH)试剂盒(批号 20190327)购自南京建成生物工程研究所，TXB_2 试剂盒(批号 201903)购自上海将来实业股份有限公司。

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-托利多科学仪器公司产品，RP6002K 型电子天平购自常州锐品精密仪器有限公司，ELx800-MV 酶标仪购自美国柏腾仪器有限公司。

1.2　方法

1.2.1　制备小鼠洗涤血小板　实验前小鼠正常给予饲料和饮水，不给予药物干预。实验时，将小鼠麻醉(4% 水合氯醛、400 mg/kg)固定后，以 3.8% 枸橼酸钠抗凝(抗凝剂与所取血液体积之比为 1∶9)下腔静脉取血，置于 10 mL 离心管内，加入 1×Tyrode Buffer(NaCl 137 mmol/L、$NaHCO_3$ 13.8 mmol/L、KCl 2.5 mmol/L、NaH_2PO_4 0.36 mmol/L、HEPES 20 mmol/L、葡萄糖 5.5 mmol/L)等体积稀释，同时加入终浓度为 50 μg/L 的 PGE_1；220×g 离心 20 min，吸取上层富含血小板液体，转移至另一离心管(10 mL)，加入终浓度 50 μg/L PGE_1 和 1 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA)；2 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，离心管底部为血小板团块；加入适量 1×Tyrode Buffer 重悬血小板，并加入终浓度 50 μg/L PGE_1；2 000 r/min 离心 10 min，弃上清液，加入适量 1×Tyrode Buffer 重悬血小板；血细胞分析仪检测血小板数目，用 1×Tyrode Buffer 调整血小板数目至 2×10^{11} 个/L，室温静置 30 min 备用。

1.2.2　LDH 法检测 Sal 对血小板的毒性作用　将制备的洗涤血小板分为 7 组，即空白对照组(生理盐水)、Sal(12.5、25.0、50.0、100.0 及 200.0 μmol/L)5 个剂量组(Sal 为生理盐水配制)和裂解液裂解组。将血小板按照分组给予不同处理孵育 1 h 后，参照文献[14]制取待测样品，使用 LDH 试剂盒检测各组 LDH 含量，并计算 LDH 的相对释放量(%)=[给药组 LDH(U/L)/裂解液裂解组 LDH(U/L)]×100%。

1.2.3　血块回缩的检测　将制备的洗涤血小板分装到 2 mL 离心管中，每管 500 μL，分为空白对照组(5 μL 生理盐水)、模型组(5 μL 生理盐水)、阳性对照组(5 μL 替罗非班，终浓度为 0.5 mg/L)，Sal 低剂量组(终浓度 25 μmol/L)及 Sal 高剂量组(终浓度 50 μmol/L)，与药物混匀后室温孵育

10 min;各管加入 $CaCl_2$ 5 μL 和纤维蛋白原 10 μL,使 Ca^{2+} 终浓度为 1 mmol/L,纤维蛋白原终浓度为 400 mg/L,手指轻轻弹动,使其均匀混合;除空白对照组外,其余各管加入现配的 20 000 U/L 凝血酶 5 μL,使其终浓度为 200 U/L,上下轻轻颠倒几次使其混匀,37 ℃水浴放置,30 min 时进行观察和拍照,用 Image J 法计算血块比率(%)=(血块面积/血块回缩前面积)×100%[15]。

1.2.4 ELISA 法检测血小板中 TXB_2 的含量 分组同 1.2.3,在洗涤血小板中加入不同处理孵育 5 min后,加入 $CaCl_2$,使 Ca^{2+} 终浓度为 1 mmol/L,随后加入凝血酶(终浓度 2.5×10^{-5} U/L)聚集 5 min,加入 2×终止液(6 mmol/L 阿司匹林,20 mmol/L EDTA)停止反应,并于冰上静置 8 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min[16];取上清保存于 −20 ℃,样品用 TXB_2 试剂盒检测。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件分析,计量数据以 均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD* 方法。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板 LDH 活性

血小板孵育 1 h 后,与空白对照组相比,裂解液裂解组小鼠洗涤血小板 LDH 活性明显较高,差异有高度统计学意义($P<0.01$),但其余各组与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);与裂解液裂解组相比,Sal 各剂量组小鼠洗涤血小板 LDH 活性均明显较低,差异有高度统计学意义($P<0.01$),但 Sal 各剂量组 LDH 活性比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠洗涤血小板 LDH 活性及相对释放量($\bar{x}\pm s$)

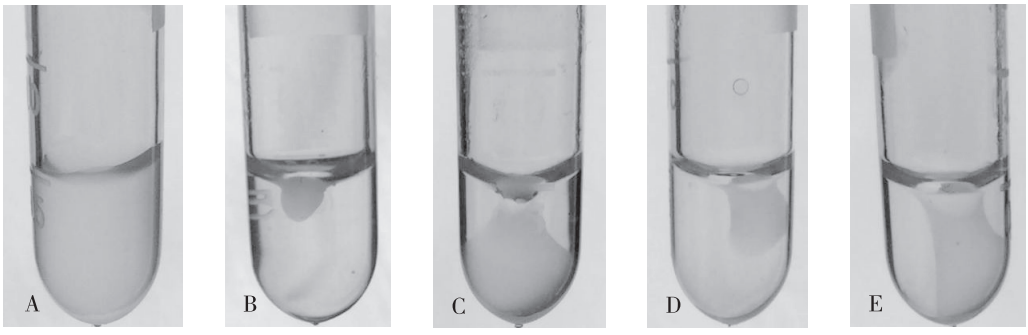
Tab. 1 The effects of Sal on the LDH release of washed platelets in mice

组别	LDH 活性(U/L)	LDH 相对释放量(%)
空白对照组	120.71±9.96	11.85±1.33
12.5 μmol/L Sal 组	121.78±11.76	11.96±1.51(2)
25.0 μmol/L Sal 组	129.21±7.51	12.68±1.12(2)
50.0 μmol/L Sal 组	122.08±10.36	11.93±0.66(2)
100.0 μmol/L Sal 组	127.06±17.91	12.39±1.38(2)
200.0 μmol/L Sal 组	135.94±17.66	13.26±1.33(2)
裂解液裂解组	1 022.08±30.70(1)	100.00±0.00(1)

注:(1) 与空白对照组相比,$P<0.01$;(2) 与裂解液裂解组相比,$P<0.01$。

2.2 血小板血块回缩

水浴静置 30 min 后,空白对照组小鼠洗涤血小板未发生血块回缩;与空白对照组相比,模型组小鼠洗涤血小板中凝血酶能引起明显的血块回缩,血块比率显著降低,差异有高度统计学意义($P<0.01$);阳性对照组小鼠洗涤血小板中血块回缩受到显著抑制,血块比率显著大于模型组,差异有高度统计学意义($P<0.01$);Sal 低、高剂量组小鼠洗涤血小板均可抑制凝血酶诱导的血块回缩,血块比率大于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见图 1、表 2。



注:A 为空白对照组,B 为模型组,C 为替罗非班组,D 为 Sal 低剂量组,E 为 Sal 高剂量组。

图 1 各组小鼠洗涤血小板的血块回缩比较

Fig. 1 Comparison of clot retraction of washed platelets in mice of each group

表 2　各组小鼠洗涤血小板血块回缩实验中血块比例($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　Comparison of clot ratio of washed platelets in mice of each group

组别	血块(%)
空白对照组	100.00 ± 0.00
模型组	19.77 ± 3.89(1)
阳性对照组	74.66 ± 3.38(3)
Sal 低剂量组	35.32 ± 4.01(2)
Sal 高剂量组	70.48 ± 2.76(3)

注:(1)与空白对照组比较,$P < 0.01$;与模型组比较,(2)$P < 0.05$,(3)$P < 0.01$。

2.3　血小板 TXB_2 含量

与空白对照组相比,模型组洗涤血小板 TXB_2 含量水平明显增大,差异有高度统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,Sal 低、高剂量组和阳性对照组小鼠洗涤血小板 TXB_2 均减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3　各组小鼠洗涤血小板 TXB_2 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3　The effect Sal on the content of platelet TXB_2

组别	TXB_2(ng/L)
空白对照组	9.38 ± 0.18
模型组	18.94 ± 0.49(1)
阳性对照组	10.16 ± 0.90(2)
Sal 低剂量组	16.70 ± 0.15(2)
Sal 高剂量组	12.69 ± 0.83(2)

注:(1)与空白对照组比较,$P < 0.01$;(2)与模型组比较,$P < 0.05$。

3　讨论

血小板又称血栓细胞,是源自骨髓巨核细胞的小片细胞质,无细胞核有细胞质,是最小的血细胞,其主要功能为凝血和止血[17]。LDH 是一种糖酵解酶,存在于机体所有组织细胞的胞质内,是能催化乳酸脱氢生成丙酮酸的酶,细胞受损时,受损细胞释放 LDH[16];血小板释放的 LDH 增加,血小板质量下降,影响血小板功能[18]。LDH 释放量反映药物对血小板的毒性,其释放量大则表明对血小板产生损伤。空白对照组血小板在静置 1 h 后有 LDH 释放到胞外,但释放量明显低于 LDH 释放较完全的裂解液裂解组($P < 0.01$),Sal 低、高剂量孵育血小板后,血小板的 LDH 释放量较少,相较于空白对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),但明显低于裂解液裂解组($P < 0.01$),本实验结果表明 Sal 各剂量组对血小板 LDH 的释放量差异均无统计学意义($P > 0.05$),提示 Sal 对血小板无明显毒性反应。血小板在纤维蛋白索上的黏着,如果血小板伪足发生收缩,被黏着的纤维蛋白索之间角度显著缩小,进而引起整个血块的收缩[19]。血小板介导的血块回缩有利于伤口的闭合,保证止血,促使形成更加稳定的栓块[20]。当机体的血小板出现功能受损或者计数过低等情况时,则血块回缩亦受到影响[19]。本研究在相同血小板计数并排除药物毒性后,进行了血块回缩实验。在 37 ℃水浴30 min后,空白对照组未发生血块回缩,加了凝血酶刺激的模型组发生了明显的血块回缩,血块比率显著低于空白对照组($P < 0.01$),阳性药组、Sal 低剂量组和 Sal 高剂量组血块比率明显大于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。本实验结果提示 Sal 对凝血酶刺激诱发的血块回缩具有显著抑制作用,这表明 Sal 在体外对血栓亦有抑制作用。

血小板质膜上具有二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)受体、GP Ⅱb/Ⅲa 受体以及凝血酶(thrombin)受体等多种受体存在,这些受体具有相应的受体激动剂并可被其激活[21-22]。血小板在正常脉管系统中处于静息状态[23],如果血小板发生粘附或被激动剂如 ADP 和凝血酶等激活,血小板随即发生一系列的后续反应,比如花生四烯酸(arachidonic acid, AA)的产生代谢,血栓素 A_2(Thromboxane A_2, TXA_2)、ADP 等进行释放。血小板发生活化以后,AA 生物转化为 TXA_2,生成的 TXA_2 与血栓素受体(thromboxane receptors,TP)相互作用有效地增强血小板活化[24-25]。血小板由于各种原因发生激活时,存在于表面的 GP Ⅱb/ⅢIa 受体发生形变,这种状态下该受体具有高亲和力,可以与配体相结合。任何刺激剂激活血小板均需通过 GP Ⅱb/Ⅲa 受体方可与邻近血小板连接,因此 GP Ⅱb/Ⅲa 受体是血小板聚集和血栓形成的最终共同通路[26]。本研究选择的阳性药为替罗非班,这是一种 GP Ⅱb/Ⅲa 受体拮抗剂,结果表明在凝血酶刺激下,模型组 TXB_2 含量明显升高($P < 0.01$),相较之下,血小板经 Sal 孵育后再由凝血酶刺激,其生成的 TXB_2 显著减少($P < 0.05$)。由于机体内 TXA_2 可在很短的时间内降解为 TXB_2,因此实验中只能通过检测 TXB_2 含量来间接反映 TXA_2 含量,Elisa 法检测结果表明 Sal 可以减少洗涤血小板的 TXB_2 含量,提示 Sal 的抗血栓作用可

能是通过减少 TXA_2 实现的。

综上所述,Sal 对血小板无明显毒性,可以明显抑制凝血酶诱导的血块回缩,此过程可能是通过减少血小板 TXA_2 的含量发挥作用的。

4 参考文献

[1] 许耘, 刘刚, 赵慧. 血小板中的磷酸肌醇信号调控[J]. 临床血液学杂志, 2014, 27(10): 909 - 912.

[2] 周雅君. 甲基莲心碱抗血小板活性及抗血栓作用的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.

[3] 刘佳, 刘强. 活血化瘀类中药治疗冠心病作用机制及安全性研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2015, 13(4):500 - 501.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 154 - 155.

[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] CHANG X Y, 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: 532.

[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] LI H, HUANG D L, HANG S Y. Salidroside inhibits the growth, migration and invasion of Wilms´ tumor cells through down-regulation of miR-891b[J]. Life Sciences, 2019,222: 60 - 68.

[9] LIU G Y, HE L Y. Salidroside attenuates Adriamycin-induced focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting the Hypoxia-inducible Factor-1α expression through phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein kinase B pathway[J]. Experimental Nephrology and Genetics: Original Paper, 2019, 142(3): 1 - 10.

[10] LI R, GUO Y J, ZHANG Y M, et al. Salidroside ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TLR4/NF-κB and MAPK signaling pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 2 - 16.

[11] CAI L L, LI Y H, ZHANG Q Q, et al. Salidroside protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by regulating the GSK-3β/Nrf2-dependent antioxidant response and mitochondrial permeability transition[J]. European Journal of Pharmacology, 2017,(806): 32 - 42.

[12] YUAN Y, WU X, ZHANG X, et al. Ameliorative effect of salidroside from Rhodiola Rosea L. on the gut microbiota subject to furan-induced liver injury in a mouse model[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, (125): 333 - 340.

[13] MAO G X, DENG H B, YUAN L G, et al. Protective role of salidroside against aging in a mouse model induced by D-galactose[J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(2): 161 - 166.

[14] 梁明露. 五甲基槲皮素抗血小板及抗血栓作用研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2016.

[15] LIU G, XIE W, HE A D. Antiplatelet activity of chrysin via inhibiting platelet IIb3-mediated signaling pathway [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2016, 60(9):1984 - 1993.

[16] 谢晓民, 陈晶. 血小板活化与相关疾病的研究进展[J]. 河北医药, 2012, 34(3): 437 - 439.

[17] 梁永生,李堃,李佐祥, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病不同时期血清 LDH 水平变化及临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(9):225 - 226.

[18] 段本荣. 血小板采集后不同时间冷冻保存对其质量的影响[J]. 中国医药导报, 2010, 7(25): 61 - 62.

[19] 王振义, 李家增, 阮长耿, 等. 血栓与止血基础理论与临床(第三版)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004.

[20] 岳明. Sterile-20 激酶 MINK1 调控血小板功能并参与止血和血栓形成的机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.

[21] 血小板糖蛋白Ⅱb/Ⅲa 受体拮抗剂在冠状动脉粥样硬化性心脏病治疗的中国专家共识(2016)专家组. 血小板糖蛋白Ⅱb/Ⅲa 受体拮抗剂在冠状动脉粥样硬化性心脏病治疗的中国专家共识(2016)[J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35(12): 923 - 932.

[22] 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.

[23] 何娟, 闫荣, 戴克胜, 等. 血小板活化的分子标志物的探讨及在疾病中意义[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(4): 207 - 208.

[24] 鲁娜, 巫冠中. 血栓素 A_2 与糖尿病心血管并发症[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(01): 180 - 183.

[25] 刘子安, 刘维. 血栓烷 A2 在临床中的应用进展[J]. 当代医学, 2018, 24(15): 184 - 186.

[26] 柳亚敏, 熊晶. 新型抗血小板多肽类药物研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(9): 666 - 670.

(2019-09-10 收稿,2019-11-20 修回)

中文编辑: 严　征; 英文编辑: 丁廷森