

## · 基础研究 ·

## 芍药苷联合川芎嗪对肌动蛋白微丝诱导血小板活化及血小板凝溶胶蛋白水平的干预效应研究

刘 玥 殷惠军 陈可冀

**摘要** **目的** 研究肌动蛋白微丝(F-actin)体外刺激对血小板活化及血小板凝溶胶蛋白(gelsolin)浓度的影响,同时观察活血化瘀中药赤芍-川芎有效成分配伍的体外干预效应。**方法** 以人水洗血小板作为研究对象,分为低(2.5  $\mu\text{mol/L}$ )、中(5  $\mu\text{mol/L}$ )、高(10  $\mu\text{mol/L}$ )浓度 F-actin 组以及花生四烯酸(AA)、二磷酸腺苷(ADP)、凝血酶(thrombin)组,同时设中药 F-actin(10  $\mu\text{mol/L}$ )组和中药 AA 组使用芍药苷和川芎嗪联合干预,阿司匹林 F-actin(10  $\mu\text{mol/L}$ )组和阿司匹林 AA 组使用阿司匹林作为干预药物,另设对照组。采用流式细胞术检测血小板活化标志物 CD62p 的表达,使用血小板聚集仪测定最大血小板聚集率(PAR),采用 ELISA 法测定血小板 gelsolin 浓度。**结果** 与对照组比较,不同浓度 F-actin 及 AA、ADP、thrombin 均可引起 PAR 和 CD62p 表达升高( $P<0.01$ ),且 F-actin 呈浓度依赖性。与 AA 组比较,低、中浓度 F-actin 组 PAR 与 CD62p 表达下降( $P<0.01$ ),高浓度 F-actin、ADP、thrombin 组则无明显差异( $P>0.05$ )。与对照组比较,中、高浓度 F-actin 组及 AA 组可诱导血小板 gelsolin 浓度增高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与 AA 组比较,低、中浓度 F-actin 以及 ADP、thrombin 组 gelsolin 浓度下降( $P<0.05$ )。与高浓度 F-actin 组或 AA 组比较,川芎嗪和芍药苷与阿司匹林均可抑制 F-actin 和 AA 诱导的 PAR 和 CD62p 表达升高( $P<0.05$ )。与高浓度 F-actin 组或 AA 组比较,川芎嗪和芍药苷可降低 F-actin 或 AA 诱导的 gelsolin 升高( $P<0.05$ ),但阿司匹林无此效应( $P>0.05$ )。**结论** F-actin 体外能够激活血小板导致其聚集、活化,10  $\mu\text{mol/L}$  浓度能够诱导血小板大量分泌 gelsolin,其效应与 AA 相似。血小板 gelsolin 可能是芍药苷和川芎嗪体外抗血小板聚集、活化的一个有效干预靶点。

**关键词** 芍药苷;川芎嗪;体外研究;血小板活化;血小板聚集;凝溶胶蛋白

**Effect of Paeoniflorin and Ligustrazine on the F-actin-induced Platelet Activation Level and Platelet Gelsolin *in vitro*** LIU Yue, YIN Hui-jun, and CHEN Ke-ji Cardiovascular Disease Centre, Xiyuan Hospital of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the effect of Paeoniflorin and Ligustrazine on the F-actin-induced platelet aggregation, platelet activation level and platelet gelsolin *in vitro*. **Methods** Washing platelets were divided into low (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ), medium (5  $\mu\text{mol/L}$ ) and high (10  $\mu\text{mol/L}$ ) F-actin group, AA, ADP and thrombin group. Meanwhile, we took combination of Paeoniflorin and Ligustrazine as the intervention drugs for Chinese medicine F-actin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) group and Chinese medicine AA group, aspirin for aspirin F-actin (10  $\mu\text{mol/L}$ ) group and aspirin AA group. The control group was set up separately. The platelet CD62p expression was detected by FCM (flow cytometry), platelet aggregation rate (PAR) was detected by platelet aggregation analyzer, and the platelet gelsolin was detected by ELISA. **Results** Compared with control group, F-actin of different concentrations, AA, ADP and thrombin groups all could increase PAR and CD62p expression ( $P<0.01$ ). In addition, F-actin showed concentration-dependent. Compared with AA group, the PAR and CD62p expression decreased in low and medium F-actin group ( $P<0.01$ ), while there were no

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81102845);北京市科技新星计划资助项目(No. Z171100001117027);中国中医科学院优秀青年科技人才(创新类)培养专项(No. ZZ13-YQ-001)

作者单位:中国中医科学院西苑医院心血管病中心(北京,100091)

通讯作者:陈可冀, Tel: 010-62835039, E-mail: kjchenvip@163.com

DOI: 10.7661/j. cjm. 20191010. 339

difference in high F-actin, ADP and thrombin group ( $P>0.05$ ). Compared with control group, platelet gelsolin increased in medium, high F-actin group and AA group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with AA group, platelet gelsolin decreased in low, medium F-actin group and ADP group, thrombin group ( $P<0.05$ ). Compared with high F-actin group or AA group, paeoniflorin and ligustrazine, aspirin could inhibit the increasing of PAR and CD62p expression induced by F-actin or AA ( $P<0.05$ ). Compared with high F-actin group or AA group, Paeoniflorin and ligustrazine could inhibit the increasing of gelsolin induced by F-actin or AA ( $P<0.05$ ), but aspirin had no similar effect ( $P>0.05$ ). **Conclusions** F-actin can induce platelet aggregation/activation *in vitro*, and  $10\text{ }\mu\text{mol/L}$  of F-actin can increase the platelet gelsolin level of activated platelet, which has the similar effect with AA. Platelet gelsolin may be an specific effective target for paeoniflorin and ligustrazine against platelet aggregation and activation *in vitro*.

**KEYWORDS** Paeoniflorin; Ligustrazine; platelet activation; *in vitro*; gelsolin

根据课题组前期研究发现,细胞骨架蛋白可能在冠心病血瘀证的形成发展过程中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。细胞骨架组成的基本单元是肌动蛋白( actin ),而 actin 在细胞内以聚合态的肌动蛋白微丝(F-actin)和游离态的球状肌动蛋白 G-actin 两种状态并存。F-actin 为聚合纤维状蛋白,具有重要的生物学功能,双股 F-actin 螺旋式组装形成微丝是构成细胞骨架的主要部分。但是在病理状态下 G-actin 会大量聚合形成过量的 F-actin,而后者具有明显的细胞毒性,能够引起血小板聚集、阻塞血管形成微血栓<sup>[2,3]</sup>。此外,笔者发现在冠心病血瘀证患者血浆中 F-actin 较健康对照人群明显增多,同时伴有血小板活化程度增高以及血小板凝溶胶蛋白(gelsolin)含量异常增多<sup>[4]</sup>。但 F-actin 体外是否可以引起血小板活化,同时诱导血小板分泌 gelsolin 尚不明确。

本研究以人水洗血小板为研究对象,以不同浓度的 F-actin 作为体外血小板活化诱导剂,以花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)以及凝血酶(thrombin)作为阳性对照诱导剂,同时以活血化瘀中药配伍赤芍-川芎有效成分芍药苷和川芎嗪联合作为干预药物,观察其对血小板活化及血小板 gelsolin 浓度的影响。

## 材料与方法

**1 研究对象** 选取 15 名健康志愿者,健康状况良好,近 2 周未发生感冒、泌尿系统感染、消化系统疾病等炎症、感染性疾病,未服用任何药物和保健品,女性不在月经期及哺乳期。年龄 22~35 岁,平均( $24.92\pm 8.17$ )岁,男性 9 人,女性 6 人。所有入选对象均签署知情同意书。

## 2 仪器与试剂

**2.1 仪器** 流式细胞分析仪, Beckman Coul-

ter EPICS ELITE; 血小板聚集仪, 北京利普生 LBY-NJ2; 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 3-18K; 遥控酶标仪, TECAN A-5082 SUNRISE。

**2.2 试剂** AA (批号: 10923583), Helena Biosciences Co., USA; ADP (批号: 01905), SIGMA Life Science, USA; thrombin (批号: T6884), SIGMA Life Science, USA; G-Actin (批号: A2522), SIGMA Life Science, USA; 芍药苷 (批号: 110736-201035, HPLC $\geq 98\%$ ), 中国药品生物制品检定所, 配成  $20\text{ }\mu\text{g}/20\text{ }\mu\text{L}$  的工作液 ( $1\text{ mg/mL}$ ); 川芎嗪 (批号: 110773-200611, HPLC $\geq 98\%$ ), 中国药品生物制品检定所, 配成  $20\text{ }\mu\text{g}/20\text{ }\mu\text{L}$  的工作液 ( $1\text{ mg/mL}$ ); Mouse Anti Human CD61-FITC (批号: 348093), 美国 Becton Dickinson 公司; Mouse Anti Human CD62P-PE (批号: 348107), 美国 Becton Dickinson 公司; Mouse Anti Human IgG1-PE (批号: 349043), 美国 Becton Dickinson 公司; gelsolin Elisa 试剂盒 (批号: E0372h), 美国 R&D 公司; ACD 液: 枸橼酸钠 22.0 g、枸橼酸 8.0 g、葡萄糖 24.5 g, 加水至 1 000 mL, pH=7.3; Hepes-Tyrode buffer 缓冲液: 10 mmol/L Hepes、137 mmol/L 氯化钠、2.68 mmol/L 氯化钾、0.42 mmol/L 磷酸二氢钠、1.7 mmol/L 氯化镁、11.9 mmol/L 碳酸氢钠、5 mmol/L 葡萄糖。

**3 血小板及 F-actin 制备** 参照文献[5], 用枸橼酸钠抗凝真空采血管采集 17 mL 空腹全血, 将前 2 mL 弃用, 余 15 mL 全血分装在 3 个真空采血管里, 轻轻平置采血管混匀, 每个采血管中加入 0.4 mL ACD, 轻轻混匀, 在 150 r/min 离心 10 min, 取上层富含血小板血浆(platelet rich plasma, PRP); 在 PRP 中加入前列腺素( $\text{prostaglandin I}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ), 轻轻混匀, 在 800 r/min 离心 10 min, 去上清, 得血小板沉

淀。在血小板沉淀中加入 Hepes-Tyrode buffer 和  $\text{PGI}_2$ , 轻轻重悬血小板, 在 800 r/min 离心 10 min, 去上清。再加入 Hepes-Tyrode buffer, 轻轻重悬血小板, 调血小板数至  $8 \sim 10 \times 10^8/\text{mL}$ , 室温下孵育 30 min。分装备用。

参照文献[2], 将单体 G-actin 的溶解液中加入 1.5 mmol/L NaCl 和 20 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  后在室温下孵育 1 h G-actin 即可聚合成丝状体 F-actin, 加入鬼笔环肽固定后备用。

4 分组及药物干预: 上述操作方法获得的水洗血小板样品按照以下处理。

4.1 F-actin 浓度筛选 将血小板分为以下几组, 并采用相应血小板活化诱导剂: (1) 对照组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +纯水; (2) 低浓度 F-actin 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +低浓度 (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) F-actin; (3) 中浓度 F-actin 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +中浓度 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) F-actin; (4) 高浓度 F-actin 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +高浓度 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) F-actin; (5) AA 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +10  $\mu\text{mol/L}$  AA; (6) ADP 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +10  $\mu\text{mol/L}$  ADP; (7) thrombin 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +0.1 U/mL Thrombin。

4.2 药物干预效应观察 将血小板分为以下几组并加入相应药物及血小板活化诱导剂: (1) 中药 F-actin 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +芍药苷 1 mg/mL+川芎嗪 1 mg/mL+10  $\mu\text{mol/L}$  F-actin; (2) 中药 AA 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +芍药苷 1 mg/mL+川芎嗪 1 mg/mL+10  $\mu\text{mol/L}$  AA; (3) 阿司匹林 F-actin 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +阿司匹林 10  $\mu\text{mol/L}$ +10  $\mu\text{mol/L}$  F-actin; (4) 阿司匹林 AA 组: 血小板 350  $\mu\text{L}$ +阿司匹林 10  $\mu\text{mol/L}$ +10  $\mu\text{mol/L}$  AA。中药 F-actin 组、中药 AA 组、阿司匹林 F-actin 组、阿司匹林 AA 组预先用相应药物体外孵育血小板样品 40 min 后(避免震荡)再加入相应血小板聚集、活化诱导剂, 具体方法参考文献[5]。

## 5 检测指标及方法

5.1 血小板活性检测 采用流式细胞仪检测各组中 CD62p 的表达。

5.2 血小板聚集率 (platelet aggregation rate, PAR) 检测 采用比浊法, 使用血小板聚集仪检测各组中最大 PAR, 按照血小板仪器使用说明进行检测。

5.3 血小板 gelsolin 浓度测定 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测各组中 gelsolin 的浓度。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间计量资料比较采用方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组 PAR 以及 CD62p 表达比较(图 1) 与对照组比较, 低、中、高浓度 F-actin 以及 AA、ADP、thrombin 均可引起 PAR 和 CD62p 表达升高 ( $P < 0.01$ ), 且 F-actin 呈浓度依赖性。与 AA 组比较, 低、中浓度 F-actin 组 PAR 与 CD62p 表达下降 ( $P < 0.01$ ), 高浓度 F-actin、ADP、thrombin 组 PAR 与 CD62p 表达无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

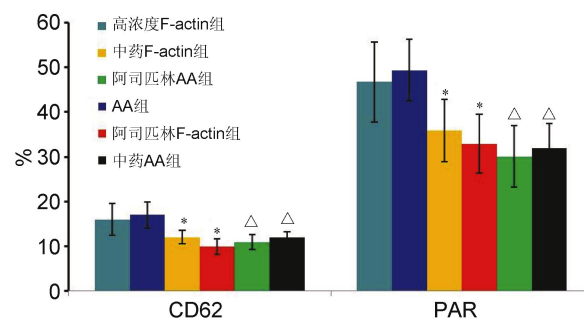
2 各组血小板 gelsolin 浓度的比较(表 1) 与对照组比较, 中、高浓度 F-actin 组以及 AA 组均可诱导血小板 gelsolin 浓度升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 AA 组比较, 低、中浓度 F-actin 以及 ADP、thrombin 组 gelsolin 浓度下降 ( $P < 0.05$ )。其余各组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组血小板 gelsolin 浓度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

| 组别          | n  | gelsolin 浓度                    |
|-------------|----|--------------------------------|
| 对照          | 15 | 389.13 $\pm$ 33.71             |
| 低浓度 F-actin | 15 | 396.12 $\pm$ 29.22 $^{\Delta}$ |
| 中浓度 F-actin | 15 | 418.57 $\pm$ 30.73 $^*$        |
| 高浓度 F-actin | 15 | 464.57 $\pm$ 35.88 $^{**}$     |
| AA          | 15 | 444.49 $\pm$ 19.20 $^{**}$     |
| ADP         | 15 | 399.89 $\pm$ 42.67 $^{\Delta}$ |
| thrombin    | 15 | 379.12 $\pm$ 36.78 $^{\Delta}$ |

注: 与对照组比较,  $^* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ ; 与 AA 组比较,  $^{\Delta} P < 0.05$

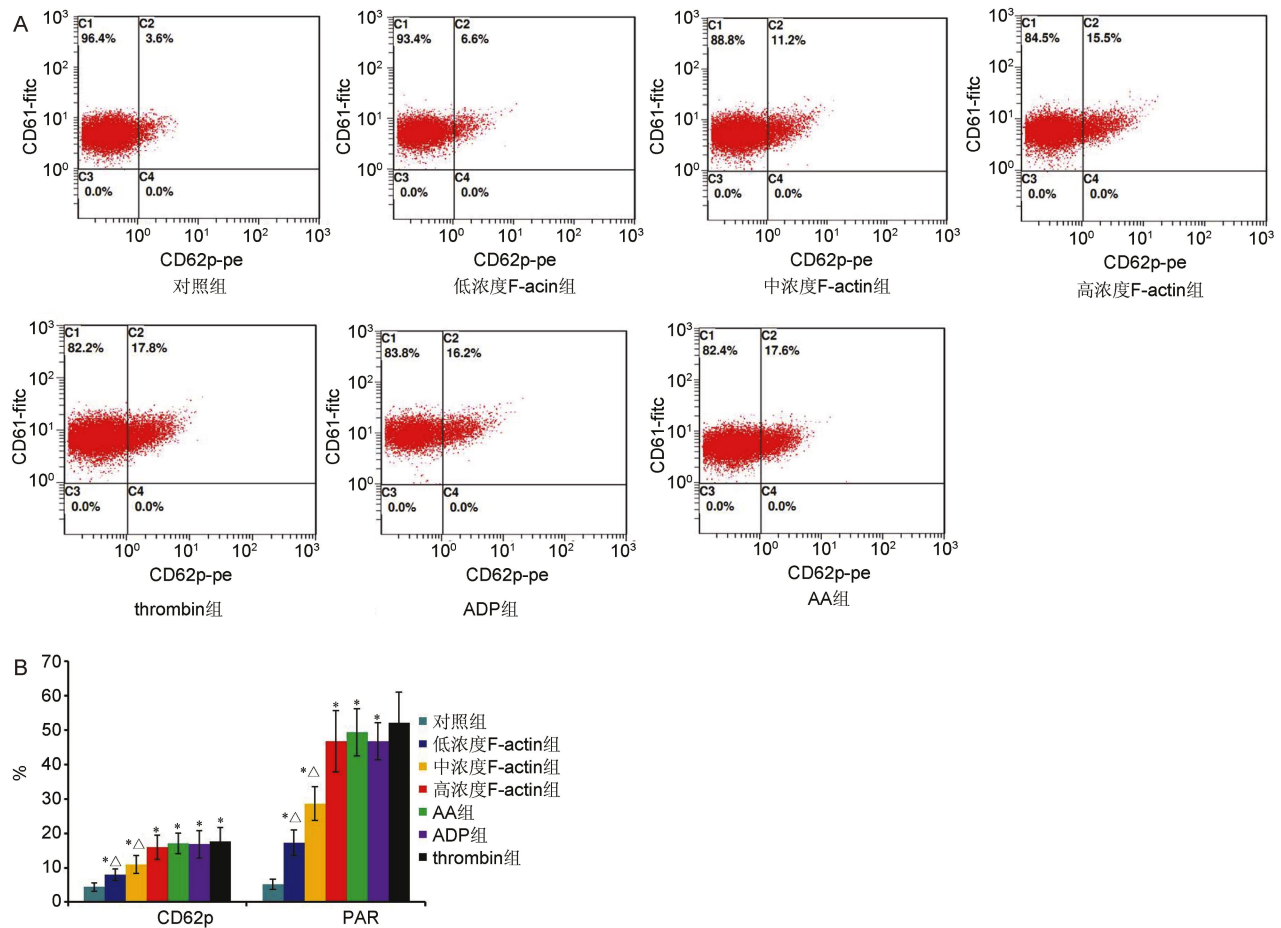
3 药物干预对 PAR 以及 CD62p 表达的影响(图 2) 与高浓度 F-actin 组比较, 中药 F-actin 组、阿司匹林 F-actin 组 PAR 以及 CD62p 表达下降 ( $P < 0.01$ )。与 AA 组比较, 中药 AA 组、阿司匹林 AA 组 PAR 以及 CD62p 表达下降 ( $P < 0.01$ ), 两者间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。



注: 与高浓度 F-actin 组比较,  $^* P < 0.01$ ; 与 AA 组比较,  $^{\Delta} P < 0.01$

图 2 药物干预对 PAR 以及 CD62p 表达的影响

4 药物配伍体外干预对血小板 gelsolin 浓度的影响(表 2) 与高浓度 F-actin 组比较, 中药 F-actin 组



注:A 为 CD62p 表达代表性流式图,B 为 CD62p 表达及 PAR 柱状图;与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ;与 AA 组比较,  $\Delta P < 0.01$ 。

图 1 各组血小板 PAR 以及 CD62p 表达比较

gelsolin 浓度下降 ( $P < 0.05$ ),阿司匹林 F-actin 组无明显差异 ( $P > 0.05$ )。与 AA 组比较,中药 AA 组 gelsolin 浓度下降 ( $P < 0.05$ ),阿司匹林 AA 组无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

表 2 药物干预对血小板 gelsolin 浓度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/mL)

| 组别           | n  | gelsolin 浓度             |
|--------------|----|-------------------------|
| 高浓度 F-actin  | 15 | 464.57 ± 35.88          |
| 中药 F-actin   | 15 | 395.21 ± 41.11          |
| 阿司匹林 F-actin | 15 | 442.68 ± 32.54          |
| AA           | 15 | 444.49 ± 19.20          |
| 中药 AA        | 15 | 389.62 ± 45.41 $\Delta$ |
| 阿司匹林 AA      | 15 | 433.57 ± 63.43          |

注:与高浓度 F-actin 组比较, \*  $P < 0.05$ ;与 AA 组比较,  $\Delta P < 0.05$

## 讨 论

血小板活化是指血小板由平滑的、非黏性状态转变为黏性的、有突起的状态,释放和表达生物活性物质,并获得结合血浆纤维蛋白原的能力。当血小板暴露于化学刺激物,通常称为活化诱导剂时,活化过程便可以迅速发生。本研究结果显示,2.5、5、10  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 F-actin 以及

AA、ADP 和 thrombin 均可引起 PAR 和血小板活化程度明显升高,且 F-actin 随浓度的增加其致血小板聚集和活化程度不断增高,呈现浓度依赖性。高浓度 F-actin 与同浓度的 AA、ADP 及 thrombin 组 PAR 与 CD62p 表达无明显差异。同时发现,2.5  $\mu\text{mol/L}$  F-actin、ADP 及 thrombin 诱导对血小板 gelsolin 浓度无明显影响,5、10  $\mu\text{mol/L}$  F-actin 以及 AA 均可诱导血小板 gelsolin 浓度明显增高。10  $\mu\text{mol/L}$  F-actin 诱导的血小板 gelsolin 浓度与同浓度的 AA 无明显差异。

以上结果提示,循环中 F-actin 的大量出现直接可以诱导血小板的聚集及活化,同时可以诱导血小板 gelsolin 浓度的异常增多,进一步验证了笔者对前期临床研究结果的猜测,即冠心病血瘀证患者血小板 gelsolin 浓度的增高可能是由于大量血浆 F-actin 直接诱导血小板致其聚集、活化,引起血小板 gelsolin 病理性大量分泌所致。值得注意的是,ADP 和 thrombin 体外诱导对血小板 gelsolin 浓度无明显影响,因此 F-actin 的活化血小板的途径可能与 AA 途径相似,gelsolin 可能

是 AA 途径上一个较为特异的血小板活化靶点。

中医学的“血瘀证”与血小板聚集、活化状态密切相关,笔者团队从中医“血瘀”理论和活血化瘀治法的作用机理出发,探索活血化瘀中药的抗血小板功能,并获得较多进展,但其治疗靶点及通路尚未完全明确<sup>[6]</sup>。抗血小板治疗已经成为冠心病药物治疗的基石,发现更多有效的抗血小板治疗靶点对冠心病的防治具有重要临床意义。川芎和赤芍是目前抗血小板活化研究领域具有代表性的活血化瘀药对之一<sup>[7]</sup>,药理研究表明有较好的抗血小板聚集及抗血栓形成的作用<sup>[8,9]</sup>。芍药苷和川芎嗪分别是中药赤芍和川芎的有效化学组分,芍药苷可显著调节机体微循环,改善血液流变学状态,抑制 ADP 诱导的血小板聚集,并抑制机体内、外源性凝血系统功能,具有多角度的活血化瘀作用<sup>[9]</sup>。川芎嗪又名四甲基吡嗪,是从中药川芎中提取的有效生物碱,研究表明其具有抗凝、抑制血小板聚集、扩张血管、改善微循环,抗内皮素和保护血管内皮,抗氧化和钙拮抗作用<sup>[10,11]</sup>。

本研究显示,川芎嗪和芍药苷联合体外可以明显抑制由同浓度的 F-actin 和 AA 诱导的血小板聚集和活化反应,与阿司匹林相比无明显差异。同时本研究还观察到,水洗血小板预先用川芎嗪和芍药苷联合孵育后,再用 F-actin 或 AA 诱导,可明显降低血小板 gelsolin 浓度,但预先用阿司匹林体外孵育无此效应。结果提示血小板 gelsolin 可能是赤芍、川芎有效成分芍药苷和川芎嗪体外抗血小板聚集、活化的一个特异性有效干预靶点。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] 李雪峰,蒋跃绒,高铸焯,等. 冠心病血瘀证血小板差异功能蛋白筛选、鉴定及功能分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 467-473.
- [2] Carol A. Vasconcellos, Stuart E. Lind. Coordinated Inhibition of actin-induced platelet aggregation by

plasma gelsolin and vitamin D-binding protein [J]. Blood, 1997, 82(12): 3648-3657

- [3] Haddad JG, Harper KD, Guoth M, et al. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(4): 1381-1385.
- [4] Liu Y, Yin HJ, Chen KJ. Research on the correlation between platelet gelsolin and blood-stasis syndrome of coronary heart disease [J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(8): 587-592.
- [5] Huang ZS, Zeng CL, Zhu LJ, et al. Salvianolic acid A inhibits platelet activation and arterial thrombosis via inhibition of phosphoinositide 3-kinase [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(6): 1383-1393.
- [6] 刘玥,殷惠军,史大卓,等. 活血化瘀中药与抗血小板治疗[J]. 科学通报, 2014, 59(8): 647-655.
- [7] 刘玥,高铸焯,付长庚,等. 活血化瘀药物防治冠心病: 循证与展望[J]. 中国循证医学杂志, 2018, 18(11): 1145-1150.
- [8] 周尹铁凡,李益萍,高俊杰,等. 活血化瘀类中药抗血小板作用机制研究进展[J]. 中成药, 2018, 40(3): 659-662.
- [9] 张育贵,张淑娟,边甜甜,等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740.
- [10] Zhao Y, Liu Y, Chen K. Mechanisms and clinical application of tetramethylpyrazine (an interesting natural compound isolated from *ligusticum walliichii*): current status and perspective [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 2124638.
- [11] Guo M, Liu Y, Shi D. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tetramethylpyrazine (Active component isolated from rhizoma chuanxiong): roles and mechanisms [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 2430329.

(收稿: 2019-08-04 在线: 2019-12-05)

责任编辑: 邱 禹