DOI:10.16016/j.2097-0927.202212175

三七三醇皂苷主要成分抑制剪切力诱导的血小板活化和聚集

黄小静,张天聪,高雪梅,宦宣容,李 远 402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院中心实验室

[摘要] **目的** 研究三七三醇皂苷主要成分对剪切力诱导的血小板活化和聚集的影响。**方法** 建立狭窄微流控芯片模型,采用微流控芯片技术评价在不同浓度(0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL)及不同剪切率(1 500、4 500、9 000 s^{-1})条件下 Rg1、Re 和 R1 对剪切力诱导的血小板聚集影响;采用流式细胞术定量分析 Rg1、Re 和 R1 对高剪切力诱导的血小板活化(P-选择素和 PAC-1)的影响;采用 PL-12 分析仪检测 Rg1、Re 和 R1 对 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集的影响。**结果** Rg1、Re 和 R1 呈浓度依赖性抑制高剪切力诱导的血小板聚集($P<0.01$),而对较低剪切力无抑制作用,其中 Re 抑制作用最强,三者的 IC_{50} 分别为 0.1、0.07、0.2 mg/mL,当 3 种化合物在相同浓度下联合使用时没有观察到协同作用。Rg1、Re 和 R1 抑制 P-选择素和 PAC-1 的表达($P<0.01$),抑制效果与聚集实验结果一致。Rg1、Re 和 R1 能够抑制 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集($P<0.05$)。**结论** 三七三醇皂苷主要成分通过抑制剪切力诱导的血小板聚集发挥新的抗血小板活性。

[关键词] 人参皂苷 Rg1;人参皂苷 Re;三七皂苷 R1;剪切力;血小板聚集
[中图法分类号] R285.5; R331.143; R364.15 [文献标志码] A

Main components of *Panax notoginseng* saponins inhibit platelet activation and aggregation induced by shear stress

HUANG Xiaojing, ZHANG Tiancong, GAO Xuemei, HUAN Xuanrong, LI Yuan Clinical Laboratory Centre, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 402160, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of main components (Rg1, Re and R1) of *Panax notoginseng* saponins on platelet activation and aggregation induced by shear stress. **Methods** A narrow microfluidic chip model was established, and used to evaluate the effects of Rg1, Re and R1 at different concentrations (0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 mg/mL) on shear-induced platelet aggregation under different shear rates (1 500, 4 500 and 9 000 s^{-1}). Flow cytometry was used to quantitatively detect the shear-induced platelet activation (P-selectin and PAC-1) after the treatment of Rg1, Re and R1. PL-12 analyzer was performed to measure the effects of Rg1, Re and R1 on platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA) and adenosine diphosphate (ADP). **Results** Rg1, Re and R1 inhibited platelet aggregation induced by high shear stress in a concentration-dependent manner ($P<0.01$), but had no such inhibitory effect under lower shear stress. Among the 3 components, Re had the strongest inhibitory effect, and their IC_{50} value was 0.1, 0.07, and 0.2 mg/mL, respectively. No synergistic effect was observed when the 3 components were used together at the same dose. Rg1, Re and R1 inhibited the expression of P-selectin and PAC-1 ($P<0.01$), which was consistent with the results of the aggregation experiment. In addition, the 3 components also could inhibit platelet aggregation induced by AA and ADP. **Conclusion** The main components of *Panax*

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(11702047);重庆市科卫联合医学科研项目中青年高端人才项目(2023GDRC008);重庆医科大学附属永川医院研究生创新基金项目(YJSCX202202)

[通信作者] 李 远,E-mail:liyuan_1985999@163.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

notoginseng saponins exert their antiplatelet activity by inhibiting shear-induced platelet aggregation.

[**Key words**] ginsenoside Rg1; ginsenoside Re; notoginsenoside R1; shear stress; platelet aggregation

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (11702047), the Project of Young and Middle-Aged Top Talents of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2023GDRC008), and the Graduate Innovation Fund of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University (YJSCX202202). Corresponding author: LI Yuan, E-mail: liyuan_1985999@163.com

在病理条件下,血小板迅速活化,并通过形成血小板聚集体在受伤的血管壁周围形成稳定的止血栓[1]。尽管血小板的活化和聚集对正常止血很重要,但在血栓形成性疾病如冠状动脉性疾病和缺血性中风的发病机制中也起着至关重要的作用[2]。临床上常用阿司匹林、氯吡格雷等抗血小板药物预防和治疗这些血栓性疾病[3-4]。然而,目前的抗血小板治疗存在一些局限性,如出血并发症的风险增加,以及与阿司匹林和氯吡格雷相关的耐药性。因此,亟需寻找选择性抑制血栓形成而不影响正常止血过程的新型抗血小板药物。

剪切力诱导的血小板聚集(shear stress-induced platelet aggregation,SIPA)是一种独特的血小板反应,在病理性血栓形成中起主要作用。大量研究表明,剪切力通过血管性血友病因子(vWF)与血小板糖蛋白(GP) Ibα 受体的结合,对血小板的活化和聚集产生直接影响[5-6]。瞬时血流加速和减速产生的剪切梯度诱导循环中的血小板机械感应导致其聚集在狭窄区域[7-8]。GPIbα 与 vWF 的结合介导了剪切作用下血小板在 vWF 上的束缚和滚动,这被认为是剪切介导的血小板活化的第一步。随后机械流体剪切力在与 vWF 结合的血小板中触发一系列信号事件,导致整合素 GP Ⅱb/Ⅲa 的配体结合功能激活,其传递“外-内”信号,介导稳定的血小板黏附、聚集和血栓形成[9-10]。这些事件可以在没有外源性化学激动剂的情况下发生,因此,SIPA 被认为在病理性动脉血栓形成中起关键作用,而对正常止血过程作用很小[11]。

三七三醇皂苷(*Panax* notoginseng saponins,PTS)是三七的主要成分之一,由人参皂苷 Rg1(Rg1)、三七皂苷 R1(R1)和人参皂苷 Re(Re)组成。PTS 作为 IST 的抗血小板聚集剂和神经保护剂在中国临床应用已超过 17 年。在 PTS 中,Rg1 具有最强的抗血小板活性,可通过抑制血小板聚集、降低血液粘度、增强纤维蛋白溶解系统活性,促进血管内皮 NO 的释放来实现抗血栓形成;R1 可以抑制过氧化物的产生和白细胞的黏附;Re 可以增强腺苷酸环化酶活性、血小板细胞 Ca^{2+} 水平,抑制血小板活化[12-13]。PTS 的抗血小板作用研究多是对激动剂诱导的血小板聚集影响[13-15],作用机制尚未完全清楚,特别是在系统和深入解释与抗血小板聚集相关的靶点和途径方面,这影响了 PTS 药物目前的临床价值。本文研究 PTS 主要成分 Rg1、Re 和 R1 对剪切力诱导的血小板活化和聚集的影响,为其临床应用提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

IX71 倒置荧光显微镜(Olympus 公司,美国);单色制冷 CCD 相机(Photometrics 公司,美国);PSP01-CS 双向推拉型精密注射泵(苏州讯飞科学仪器有限公司);PDG-32G-2 等离子清洗机(Harrick 公司,德国);Streampix 7.0 视频录制软件(Norpix 公司,加拿大);CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,美国),Aggrestar(PL-12)多参数血小板功能分析仪(江苏英诺华医疗技术有限公司,南京)。

人参皂苷 Rg1、Re 和三七皂苷 R1(上海源叶生物科技有限公司);Calcein AM 荧光染料、Anti-Hu CD61-PerCP-eFluor™710、Anti-Hu CD62P-PE 和 Anti-Hu PAC-1-FITC(Invitrogen 公司,美国);二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP,Topscience 公司,美国);花生四烯酸(arachidonic acid,AA,MCE 公司,美国)4%多聚甲醛溶液(上海碧云天生物技术有限公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA,ORTHO 公司,美国)。

1.2 血液采集与处理

12 名健康志愿者,男性 7 名,女性 5 名,年龄(28.3±5.7)岁,由重庆市血液中心永川分中心招募。纳入标准:2 周内无服药史、手术史和酗酒史,其血常规和凝血功能检测指标[活化部分凝血酶时间(activated partial thromboplatin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)]均在正常参考范围内。排除标准:有出血和血栓栓塞史;正在服用抗血小板药物或抗凝血治疗;血细胞计数异常,包括血小板减少(<150 ×10^9/L)和凝血障碍,纤维蛋白原<2.0 g/L 或>4.0 g/L,PT>15.5 s,APTT>39 s。本研究经重庆医科大学附属永川医院伦理委员会批准(2023 年审 020),志愿者均被告知和签署知情同意书。利用 3.2%柠檬酸钠真空采血管采集志愿者肘前静脉全血样品,室温放置,2 h 内使用。

1.3 微流控芯片设计与制作

微通道设计参考课题组前期研究[16]。每块芯片

由 6 个平行排列的流动室组成,设计用于安装在标准 25 mm×75 mm 显微镜载玻片上。每个流动室包含狭窄微通道、样品池和出口。流动室的尺寸为 0.7 mm 宽、0.07 mm 高、10 mm 长(图 1A、B)。狭窄区域宽度为 0.14 mm,以形成 80%的狭窄。芯片的制作如前所述[17]。聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)微通道加工采用感光干膜软光刻工艺,通过氧等离子处理(30 W,1 min)将 PDMS 微通道和载玻片进行不可逆键合,制备成玻璃-PDMS 微通道芯片。

1.4　微通道内流场仿真分析

设置出口体积流量为 9、27、52 μL/min,进口为静压,采用 Solidworks 软件进行微通道结构设计,并通过其流体仿真分析模块进行流体动力学(computational fluid dynamic, CFD)模拟,分析微通道内壁剪切率和速度分布。假设流体性质为稳定的、不可压缩的层流,在模型内创建 92 215 个网格,通过求解器运算 CFD 解。

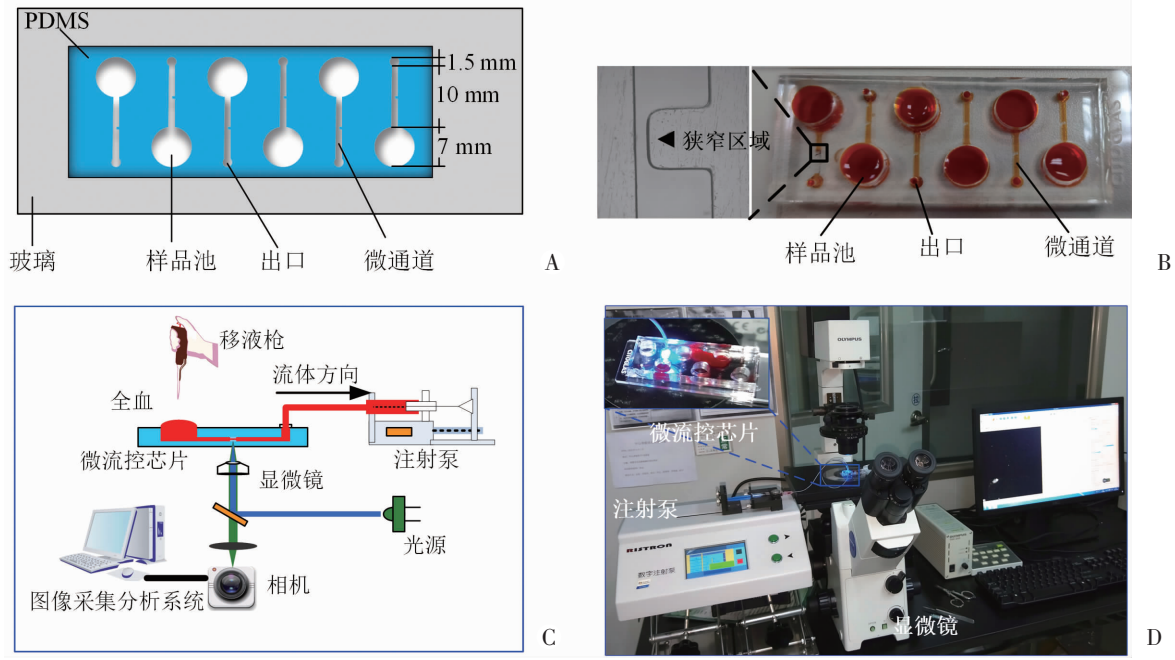
1.5　微流控芯片检测血小板聚集行为

1.5.1　不同药物浓度实验　全血样本与不同浓度的 Rg1、Re 和/或 R1(终浓度为 0、0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL)混合,最后加入 Calcein AM 荧光染料(终浓度为 4 μmol/L)在 37 ℃静止孵育 30 min。使用注射泵以 52 μL/min 的速度将全血样本灌注到狭窄微通道,持续 150 s。或 3 种化合物在相同浓度下联合使用,以探究是否具有协同作用。

1.5.2　不同的剪切率实验　全血样品与生理盐水(对照组)或 0.5 mg/mL Rg1、Re、R1 混合,加入 Calcein AM 荧光染料后在 37 ℃静止孵育 30 min。将全血样本加载到样品池中,设置注射泵为回拉模式,分别以 9、27、52 μL/min 的速度抽出样本(图 1C、D)。使用 Streampix 7.0 软件控制单色制冷 CCD 相机以每秒 1 帧的速度捕捉图像,使用 ImageJ 软件分析图像,以表面覆盖率为量化指标。

1.6　流式细胞术测定血小板活化情况

采用流式细胞术评估 Rg1、Re 和 R1 对剪切诱导的血小板活化的影响。用 3% BSA 封闭狭窄微通道 1 h,使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗微通道。将全血样本与生理盐水或 0.5 mg/mL Rg1、Re、R1 在 37 ℃孵育 30 min,将处理后的全血样本以 52 μL/min 速度灌注通过 BSA 封闭的狭窄微通道,收集剪切后的血液样本。取 5 μL 样本与抗人 CD61- PerCP-eFluor™710、PAC-1-FITC 和 CD62P-PE 抗体黑暗中孵育 20 min。抗 CD62P 和 PAC-1 抗体分别作为 P-选择素表达和 GPⅡb/Ⅲa 激活的标志物,而血小板则由抗 CD61 抗体识别。取 5 μL 未处理的血液灌注前标记作为阴性对照,Rg1、Re、R1 处理组以剪切后的全血作为实验组,生理盐水处理组剪切后的全血作为阳性对照。标记后将血小板固定在 1%多聚甲醛中。使用 CytoFLEX 流式细胞仪进行分析,使用蓝色(488 nm)和红色(633 nm)激光器作为激发光源。荧光检测器的滤光片配置为:APC-A700 715/25、FITC 525/40 和 PE 585/42。通过前向散射光(FSC)和 CD61 单克隆抗体识别血小板群体,测定血小板表面 CD62P 和 PAC-1 的表达水平。



A:微流控芯片示意图;B:微流控实物图(橙色为染料);C:微流控芯片分析系统的流程图;D:微流控芯片分析系统实物图

图 1　微流控芯片分析系统

1.7 PL-12 血小板功能分析仪测定血小板功能

PL-12 分析仪具有基于阻抗的自动血细胞分析仪和激动剂试剂盒;可以在固定的时间间隔内自动和连续地计算在添加激动剂前后柠檬酸钠全血中血小板计数的变化。全血与生理盐水(对照组)或 0.5 mg/mL Rg1、Re、R1 在 37 ℃孵育 30 min,将 300 μL 全血样本加入到聚碳酸酯试管中混匀并插入测量位置,按下开始键进行自动检测。血小板计数在检测开始时测定 2 次,以获得平均基线值。在第 3 个检测点前,在血样中加入激动剂 AA(5 mmol/L)和 ADP(100 μmol/L)以激活血小板,激动剂用量为全血样品的 1/10。由于聚集产生的结构太大而不能被算作单个血小板,因此随着血小板聚集的增加,单个血小板计数下降。PL-12 分析仪对血小板进行数次计数,直到获得最低水平的单个血小板计数。每个样本的最大血小板聚集率(maximum aggregation rate,MAR)使用以下公式计算:MAR=[(基线血小板数量-最低水平血小板数量)/基线血小板数量]×100%。

1.8 统计学分析

所有计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件,多组间比较采用单因素方差分析,采用 Dunnett's 多重检验进行两两比较,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

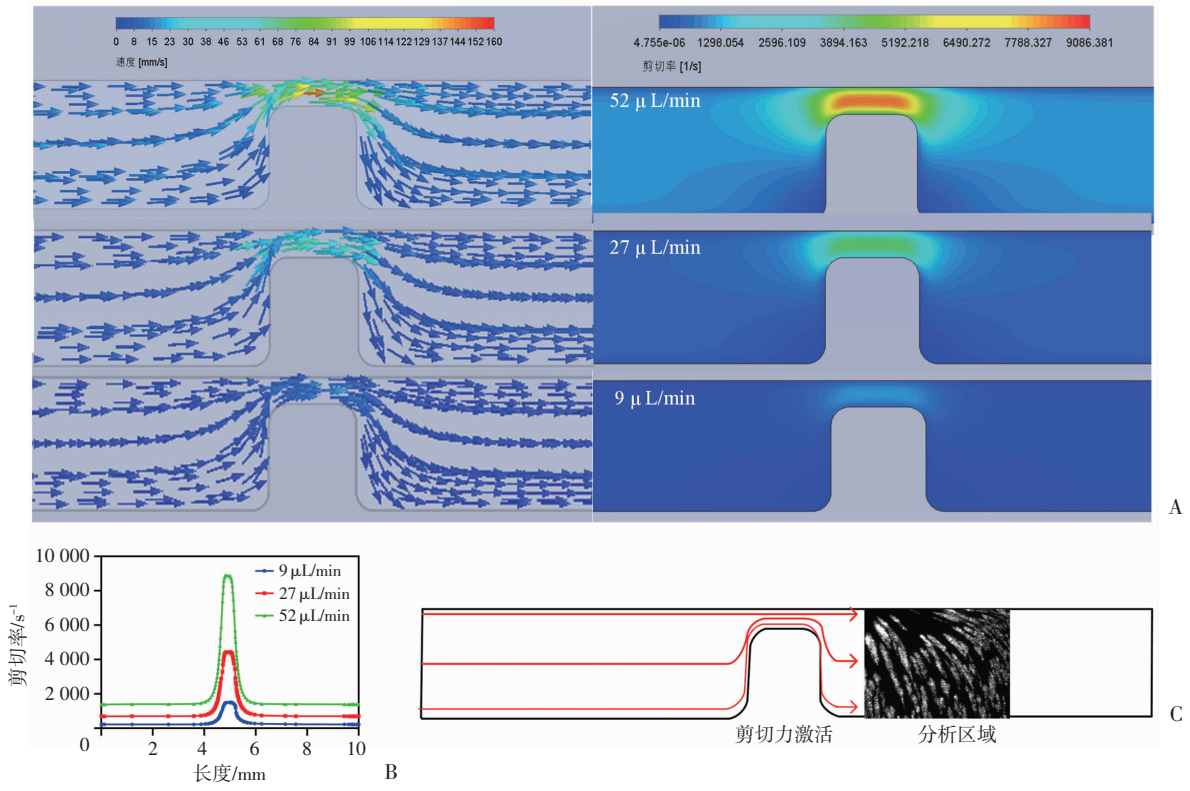
2 结果

2.1 流体仿真分析

管壁剪切率在狭窄伪影上呈对称分布,在输入剪切率为 300、800、1 500 s^{-1}(9、27、52 μL/min)时,血小板通过狭窄处时剪切率增加到 1 500、4 500、9 000 s^{-1}。当靠近狭窄处时,剪切率高,流体速度快。狭窄后区域,剪切率和速度恢复到与狭窄前区域相同(图 2A、B)。血液样本灌注到狭窄微通道中,由黏附的血小板形成聚集体,主要在狭窄出口区域形成聚集体(图 2C)。

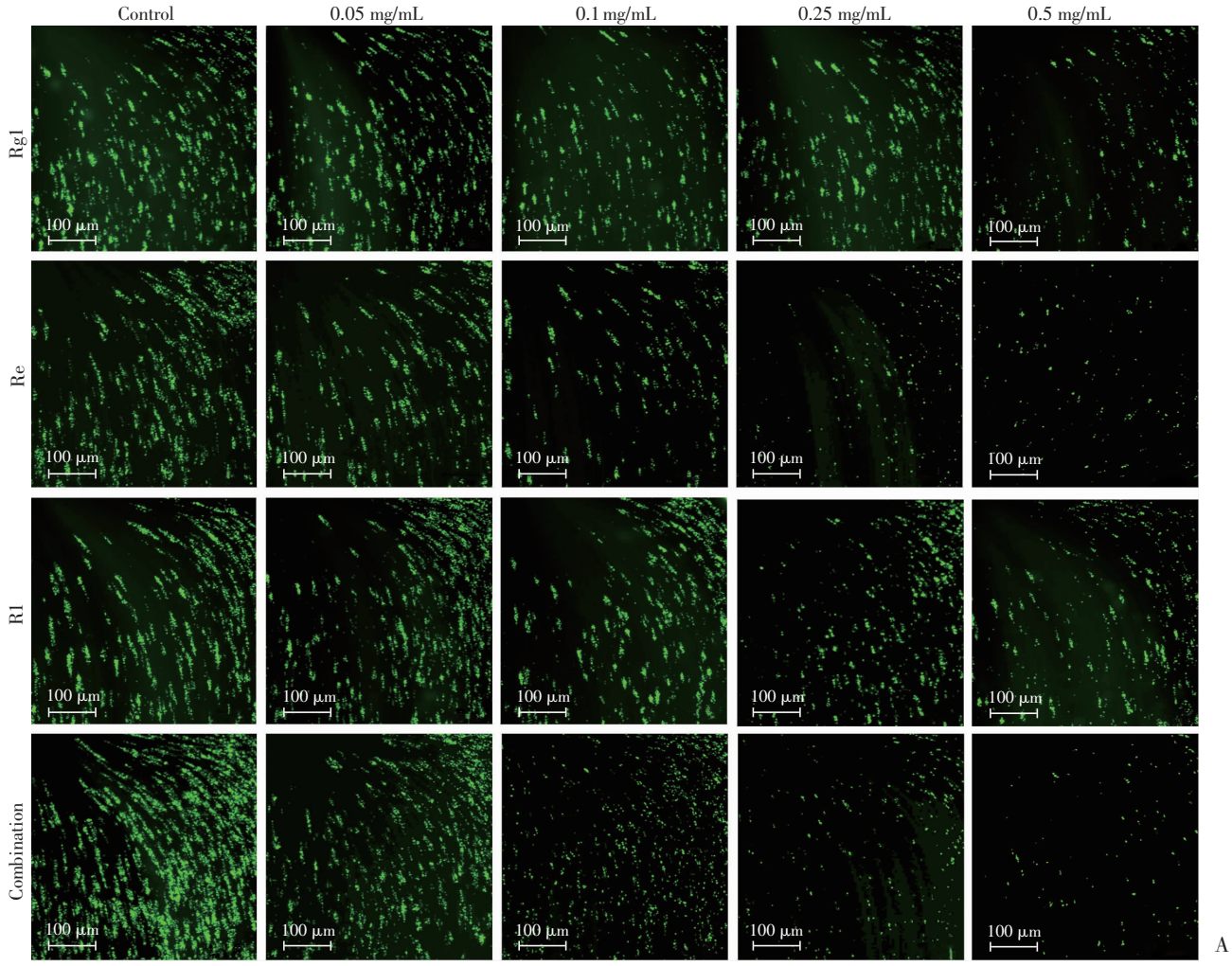
2.2 三七三醇皂苷主要成分具有抗 SIPA 活性

不同浓度 Rg1、Re、R1 处理后的样本在 9 000 s^{-1} 剪切率条件下黏附聚集的典型荧光图像如图 3A 所示,随着药物浓度增加,血小板聚集体的大小和数量随之减少。Rg1、Re 和 R1 均呈浓度依赖性显著抑制剪切诱导的血小板聚集($P<0.01$,图 3B)。通过血小板聚集体表面覆盖率计算每个药物浓度对应的抑制率,结果表明 Re 对 SIPA 抑制作用最强,Rg1 次之,R1 作用最弱。此外,当 3 种化合物在相同浓度下联合使用时,对剪切力诱导的血小板聚集有明显的抑制作用,没有表现出协同作用。根据 Rg1、Re 和 R1 浓度与抑制率量效曲线进一步分析,依次计算出 Rg1、Re 和 R1 对血小板聚集的半抑制率(IC_{50})分别为 0.1、0.07、0.2 mg/mL。



A:速度和壁面剪切率分布;B:微通道底部中心线壁剪切率的变化;C:狭窄微通道图形

图 2 狭窄微通道的 CFD 仿真分析



A:使用微流控技术观察血小板的聚集;B:血小板聚集体表面覆盖率 a:$P<0.01$,与对照组比较;C: Rg1、Re 和 R1 抑制血小板聚集的量效关系

图 3 不同浓度条件下 Rg1、Re 和 R1 抗 SIPA 活性

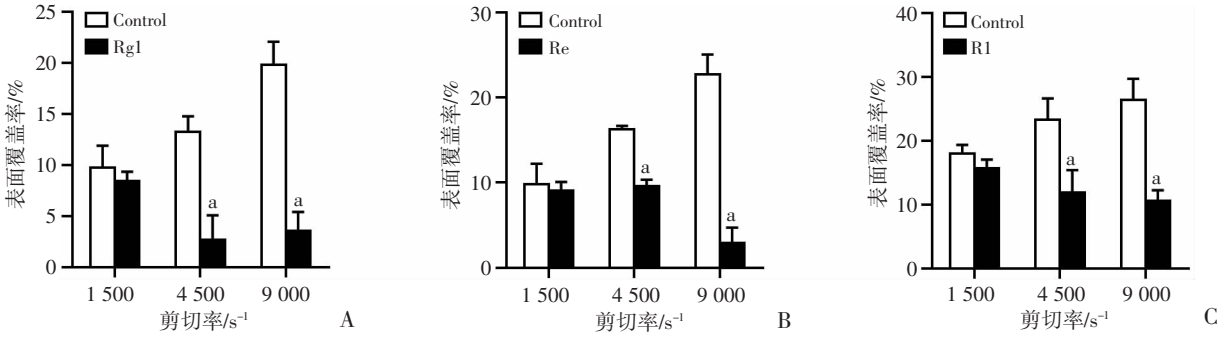
在 1 500、4 500、9 000 s^{-1} 剪切率条件下,随着剪切率的增加血小板聚集体大小随之增大,在 1 500 s^{-1} 剪切率下,血小板聚集体呈不规则分布,而在 4 500 s^{-1} 和 9 000 s^{-1} 剪切率条件下,血小板聚集体沿流动方向分布且呈条索状。Rg1、Re 和 R1 处理后血小板聚集体大小和数量均减少。Rg1、Re 和 R1 在 4 500、9 000 s^{-1} 剪切率条件下显著抑制血小板的聚集(P<0.05,图 4)。

2.3 三七三醇皂苷主要成分抑制剪切诱导的血小板活化

采用流式细胞术分析血小板表面活化标志物(P-选择素和 GPⅡb/Ⅲa)表达情况。结果显示,当血小板处于静息状态时,几乎不会发生活化(CD62P 和 PAC-1 表达<2%)。经过高剪切力诱导后,血小板活化程度显著升高(P<0.01)。Rg1、Re 和 R1 处理后,P-选择素的表达和 GPⅡb/Ⅲa 的活化显著降低(P<0.01),且与 R1 相比,Rg1 和 Re 抑制程度较强,与聚集实验结果一致(图 5)。

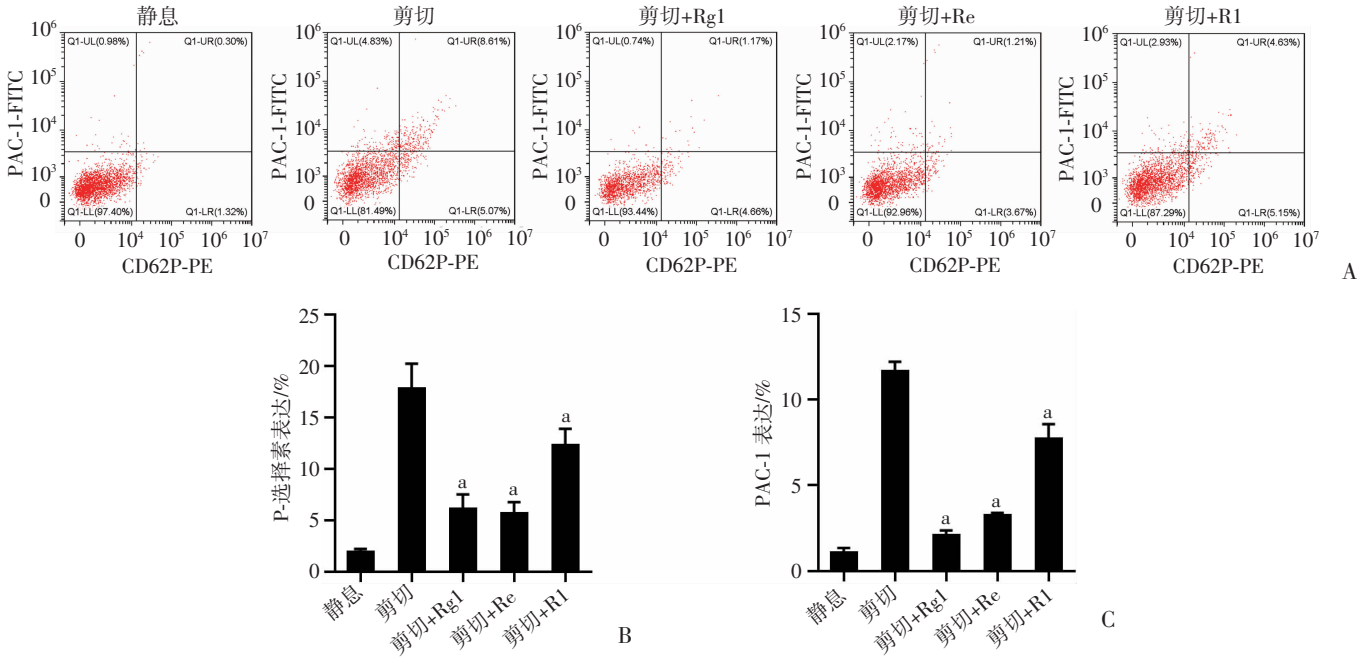
2.4 三七三醇皂苷主要成分抑制激动诱导的血小板聚集

采用 PL-12 分析仪检测 Rg1、Re 和 R1 对 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集的影响。结果显示,Rg1、Re 处理后,经 AA 诱导的 MAR 显著降低(P<0.05),而 R1 无显著变化(图 6A)。对于 ADP 诱导的血小板聚集,Rg1 和 R1 显著影响 MAR 值(P<0.05),R1 降低 MAR 值,但差异无统计学意义(图 6B)。



a:P<0.05,与对照组比较

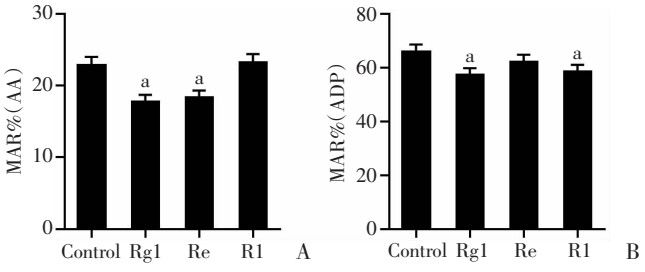
图 4 不同剪切率条件下 Rg1(A)、Re(B)和 R1(C)抗 SIPA 活性



a:P<0.01,与剪切组比较

A:流式细胞术分析血小板的活化指标 CD62P 和 PAC-1;B: P-选择素表达百分比;C: PAC-1 表达百分比

图 5 剪切诱导的血小板活化分析



a:$P<0.05$,与对照组比较

A: AA 诱导的血小板聚集;B:ADP 诱导的血小板聚集

图 6 Rg1、Re 和 R1 对激动剂诱导的血小板聚集影响

3 讨论

尽管剪切力在血栓形成中起主要作用,但目前靶向剪切力诱导的抗血小板药物少有研究,而中草药抗 SIPA 活性的研究更少。本研究探讨了三七三醇皂苷主要成分对 SIPA 的影响。PTS 包含 3 种主要成分人参皂苷 Rg1、Re 和三七皂苷 R1。先前的研究表明,PTS 对胶原、凝血酶和 ADP 等不同激动剂的刺激具有抗血小活性[14]。本研究探讨 PTS 3 种主要成分对 SIPA 的作用,以及 3 种成分的联合是否具有协同作用。结果表明,Rg1、Re 和 R1 呈浓度依赖性抑制高剪切力诱导的血小板聚集,而对于相对较低的剪切力,抑制作用无统计学意义。通过计算 IC_{50} 发现,Re 抑制作用最强,并且 Rg1、Re 和 R1 三者联合没有协同作用。许多研究表明 vWF 与 GPIb 的结合启动了高剪切诱导的血小板聚集。XU 等[18]通过分子对接实验表明 Rg1、Re 和 R1 均能够与 GPIb 稳定结合,并且表面等离子共振技术结果表明 Re 与 GP Ⅰb 结合活性最高,Rg1 次之,最低是 R1。Re 表现出更强的抑制效果可能与其容易结合 GPIb 有关,Re 与 GPIb 结合干扰血小板聚集。Rg1、Re 和 R1 抑制高剪切诱导的血小板聚集,而对低剪切诱导的血小板聚集无显著影响,这可能是由于低剪切诱导的血小板聚集主要由纤维蛋白原和 GP Ⅱ/Ⅲa 介导,很少或没有涉及 GPIb 与 vWF 的结合,这支持了 Rg1、Re 和 R1 是通过抑制 vWF 与 GPIb 的结合抑制高剪切诱导的血小板聚集。

本研究进一步探索了 Rg1、Re 和 R1 对剪切力诱导的血小板活化的影响,通过流式细胞术定量分析血小板活化指标 P-选择素和 GP Ⅱb/Ⅲa 来表征流过狭窄微通道的血小板活化情况。P-选择素主要定位于血小板的 α 颗粒或内皮细胞的 WeibeL-Palade 小体,静息状态时无表达或持续低表达。血小板活化后,P-选择素通过 α 颗粒与血小板膜的融合在血小板膜表面迅速表达。GP Ⅱb/Ⅲa 是由钙依赖性 a 亚单位(GP Ⅱb)和 b 亚单位(GP Ⅲa)组成的异二聚体。在静息血小板中,GP Ⅱb/Ⅲa 对其配体(纤维蛋白原和 VWF)的亲和力较低。血小板活化触发细胞内信号传递导致 GP Ⅱb/Ⅲa 构象改变,从而增加其与纤维蛋白原和 vWF 的亲和力[19]。升高的剪切力可促进血浆 vWF 与 GP Ⅰb/Ⅸ/Ⅴ复合体结合,进而启动细胞间信号级联,导致钙离子动员增加,肌动蛋白收缩和细胞骨架重排等进程[20],最终导致 P-选择素释放、GP Ⅱb/Ⅲa 激活等,本研究结果与理论相符。Rg1、Re 和 R1 抑制 P-选择素表达和 GP Ⅱb/Ⅲa 活化,提示通过抑制 vWF-GPIb 相互作用抑制血小板的活化。

ADP 是 G 蛋白偶联受体 $P2Y_1$ 和 $P2Y_{12}$ 的有效配体[23],AA 是血小板内血栓素 A2 的前体,通过环氧合酶和血栓素合成酶转化为 TXA_2[24]。本研究结果表明,PTS 主要成分的抗血小板活性与激动剂类型无关,提示 PTS 可能不是作为一种拮抗剂来抵消 2 种激动剂与质膜上的血小板受体结合。Rg1、Re 和 R1 对激动剂诱导的血小板聚集的抑制作用可以增强其自身抗血小板活性。

与以往由外源性激动剂作为诱导剂的研究相比,本研究纳入了流体动力学作为血小板的诱导剂。微流控芯片技术可模拟体内狭窄动脉,在体外实现病理流动环境,研究三七三醇皂苷主要成分对血小板功能的影响。然而,本研究也存在不足之处,虽然证明了 Rg1、Re 和 R1 能够抑制高剪切力诱导的血小板聚集而对低剪切力诱导的血小板聚集无影响,但实验所涉及的剪切率值为 1 500、4 500、9 000 s^{-1},对于其在剪切率值高于 9 000 s^{-1} 时发挥怎样的作用,以及其在什么剪切率范围内能够最大程度发挥作用还有待探明。

综上所述,本研究探讨了三七三醇皂苷主要成分对 SIPA 的影响,结果表明:Rg1、Re 和 R1 抑制高剪切力诱导的血小板聚集,三者单独使用时 Re 的作用最强,三者联合使用时不具有协同作用。此外,Rg1、Re 和 R1 显著抑制剪切力诱导的血小板活化。Rg1、Re 和 R1 通过选择性抑制 SIPA 发挥新的抗血小板活性,具有成为新一代抗血小板药物的潜力。后续将研究其对下游信号通路的调节,以期明确 PTS 成分单体如何发挥抗 SIPA 活性。

参考文献:

[1] YE T, SHI H X, PHAN-THIEN N, *et al*. The key events of thrombus formation: platelet adhesion and aggregation[J]. Biomech Model Mechanobiol, 2020, 19(3): 943-955. DOI: 10.1007/s10237-019-01262-x.

[2] KOENEN R R, BINDER C J. Platelets and coagulation factors: established and novel roles in atherosclerosis and atherothrombosis[J]. Atherosclerosis, 2020, 307: 78-79.

DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.07.008.

[3] XIONG Y Y, BATH P M. Antiplatelet therapy for transient ischemic attack and minor stroke[J]. Stroke, 2020, 51(11): 3472-3474. DOI: 10.1161/STROKEAHA.120.031763.

[4] KAMRAN H, JNEID H, KAYANI W T, *et al*. Oral antiplatelet therapy after acute coronary syndrome: a review[J]. JAMA, 2021, 325(15): 1545-1555. DOI: 10.1001/jama.2021.0716.

[5] SHIOZAKI S, TAKAGI S, GOTO S. Prediction of molecular interaction between platelet glycoprotein ibα and von Willebrand factor using molecular dynamics simulations[J]. J Atheroscler Thromb, 2016, 23(4): 455-464. DOI: 10.5551/jat.32458.

[6] PUSHIN D M, SALIKHOVA T Y, ZLOBINA K E, *et al*. Platelet activation *via* dynamic conformational changes of von Willebrand factor under shear[J]. PLoS One, 2020, 15(6): e0234501. DOI: 10.1371/journal.pone.0234501.

[7] NESBITT W S, WESTEIN E, TOVAR-LOPEZ F J, *et al*. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation[J]. Nat Med, 2009, 15(6): 665-673. DOI: 10.1038/nm.1955.

[8] JAIN A, GRAVELINE A, WATERHOUSE A, *et al*. A shear gradient-activated microfluidic device for automated monitoring of whole blood haemostasis and platelet function[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10176. DOI: 10.1038/ncomms10176.

[9] SHATTIL S J, NEWMAN P J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets[J]. Blood, 2004, 104(6): 1606-1615. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1257.

[10] GONG H X, SHEN B, FLEVARIS P, *et al*. G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIbbeta3 and mediates integrin "outside-in" signaling[J]. Science, 2010, 327(5963): 340-343. DOI: 10.1126/science.1174779.

[11] RANA A, WESTEIN E, NIEGO B, *et al*. Shear-dependent platelet aggregation: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 141. DOI: 10.3389/fcvm.2019.00141.

[12] GAO Y, GAO C Y, ZHU P, *et al*. Ginsenoside Re inhibits vascular neointimal hyperplasia in balloon-injured carotid arteries through activating the eNOS/NO/cGMP pathway in rats[J]. Biomedecine Pharmacother, 2018, 106: 1091-1097. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.044.

[13] ZHOU Q, JIANG L, XU C H, *et al*. Ginsenoside Rg1 inhibits platelet activation and arterial thrombosis[J]. Thromb Res, 2014, 133(1): 57-65. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.10.032.

[14] QI H Y, HUANG Y L, YANG Y, *et al*. Anti-platelet activity of panaxatriol saponins is mediated by suppression of intracellular calcium mobilization and ERK2/p38 activation[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 174. DOI: 10.1186/s12906-016-1160-7.

[15] 闫海峰, 代向东, 樊克涛, 等. 人参皂苷 Re 对 ADP、PAF、AA 诱导家兔血小板聚集功能的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(5): 310-313.
YAN H F, DAI X D, FAN K T, *et al*. Effection of ginsenoside Re on ADP, PAF, AA-induced platelet aggregation[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2016, 35(5): 310-313.

[16] ZHANG T C, LIU L, HUANG X J, *et al*. Application of microfluidic chip technology to study the inhibitory effect of tetramethylpyrazine on platelet aggregation, activation, and phosphatidylserine exposure mediated by pathological high shear rate[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2023, 34(1): 47-60. DOI: 10.1097/MBC.0000000000001179.

[17] 张天聪, 陈丹, 廖娟, 等. 生理性流动条件下血小板在玻璃表面的聚集行为[J]. 医用生物力学, 2022, 37(3): 425-432.
ZHANG T C, CHEN D, LIAO J, *et al*. Platelet aggregation on glass surface under physiological flow condition[J]. J Med Biomech, 2022, 37(3): 425-432.

[18] XU Z Y, XU Y, XIE X F, *et al*. Anti-platelet aggregation of *Panax notoginseng* triol saponins by regulating GP1BA for ischemic stroke therapy[J]. Chin Med, 2021, 16(1): 12. DOI: 10.1186/s13020-021-00424-3.

[19] VARGA-SZABO D, PLEINES I, NIESWANDT B. Cell adhesion mechanisms in platelets[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(3): 403-412. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.150474.

[20] FEGHHI S, MUNDAY A D, TOOLEY W W, *et al*. Glycoprotein ib-IX-V complex transmits cytoskeletal forces that enhance platelet adhesion[J]. Biophys J, 2016, 111(3): 601-608. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.06.023.

[21] YIN H, STOJANOVIC A, HAY N, *et al*. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation[J]. Blood, 2008, 111(2): 658-665. DOI: 10.1182/blood-2007-04-085514.

[22] CHEN Z S, LI T L, KAREEM K, *et al*. The role of PI3K/Akt signaling pathway in non-physiological shear stress-induced platelet activation[J]. Artif Organs, 2019, 43(9): 897-908. DOI: 10.1111/aor.13465.

[23] LEON C, ALEX M, KLOCKE A, *et al*. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation[J]. Blood, 2004, 103(2): 594-600. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1385.

[24] RIVERA J, LOZANO M L, NAVARRO-NÚÑEZ L, *et al*. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation[J]. Haematologica, 2009, 94(5): 700-711. DOI: 10.3324/haematol.2008.003178.

(**收稿**:2022-12-29;**修回**:2023-07-06)

(编辑 邓强庭)