丹参饮对高脂血症模型大鼠血小板生理特性和功能的影响机制Δ

张玉昆[1,2*]，冯月男[1]，卞敬琦[1]，刘欣欣[1]，肖洪彬[1]，牛雯颖[1#]（1.黑龙江中医药大学实验实训中心，哈尔滨 150040；2.黑龙江中医药大学教育部北药基础与应用研究重点实验室，哈尔滨 150040）

中图分类号 R965　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2023）07-0790-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.07.05

摘　要　目的 基于血小板膜糖蛋白4（CD36）/磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路探讨丹参饮对高脂血症模型大鼠血小板生理特性和功能的影响机制。**方法** 通过喂养高脂饮食复制高脂血症模型大鼠，将其随机分为模型组、辛伐他汀组（0.004 g/kg）和丹参饮高、低剂量组（3.6、0.9 g/kg），另设空白组（喂养基础饲料），每组10只。各给药组大鼠每天灌胃相应药物，其余组灌胃等体积生理盐水，连续4周。末次给药后，检测大鼠血脂生化指标[总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）]含量，全血黏度、血浆黏度和血浆中纤维蛋白原（FIB）含量，血小板相关参数[血小板计数（PLT）、血小板分布宽度（PDW）和血小板平均体积（MPV）]，血小板生理特性和功能相关因子[血管性血友病因子（vWF）、纤维连接蛋白（Fn）、磷脂酶A2（PLA2）、血栓素B2（TXB2）、6-酮-前列腺素F1α（6-keto-PGF1α）、血栓素A2（TXA2）、前列腺素（PGI2）、环磷酸腺苷（cAMP）、环磷酸鸟苷（cGMP）、β-血小板球蛋白（β-TG）]水平，血小板聚集率（最大聚集率、60 s聚集率、180 s聚集率）和纤溶系统相关因子[组织型纤溶酶原活化剂（t-PA）、纤溶酶原激活物抑制剂1（PAI-1）]水平，血小板中CD36/PI3K/Akt信号通路相关蛋白[CD36、黏着斑激酶（FAK）、磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶（PIP5K）、PI3K、磷酸化Akt（p-Akt）、p-Akt1/2/3]表达水平。**结果** 与空白组比较，模型组大鼠血浆中TC、TG、LDL-C含量，全血黏度、血浆黏度、血浆中FIB含量，血浆中PLT、MPV、vWF、Fn、PLA2、TXB2、TXA2、cGMP、β-TG水平，血小板最大聚集率、60 s聚集率，血浆中PAI-1水平，CD36、FAK、PIP5K、PI3K、p-Akt、p-Akt1/2/3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；HDL-C含量和6-keto-PGF1α、PGI2、t-PA水平均显著降低（$P<0.05$）。经丹参饮干预后，上述大部分指标均显著逆转（$P<0.05$）。**结论** 丹参饮可改善高脂血症模型大鼠血小板生理特性和功能，其作用机制可能与下调CD36/PI3K/Akt信号通路活性、降低血小板活化程度有关。

关键词　高脂血症；丹参饮；血小板活化；血小板膜糖蛋白4/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路

Effects and mechanism of Danshen decoction on physiological characteristics and function of platelet in hyperlipidemia model rats

ZHANG Yukun[1,2], FENG Yuenan[1], BIAN Jingqi[1], LIU Xinxin[1], XIAO Hongbin[1], NIU Wenying[1]（1. Experimental Training Center, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Key Laboratory of Basic and Applied Research of Northern Medicine Approved by Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects and mechanism of Danshen decoction influencing platelet physiological characteristics and function in hyperlipidemia model rats based on platelet membrane glycoprotein 4 (CD36)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. **METHODS** The hyperlipidemia model rats were induced by feeding high-fat diet, and then randomly divided into model group, simvastatin group (0.004 g/kg), Danshen decoction high-dose and low-dose groups (3.6, 0.9 g/kg), and blank group (fed with basic feed), with 10 rats in each group. Rats in each administration group were intragastrically administered with corresponding drugs every day, and the other groups were intragastrically administered with equal volume of normal saline for 4 weeks. After the last administration, the contents of blood lipid biochemical indexes [total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)], whole blood viscosity, plasma viscosity and fibrinogen (FIB) content in plasma, platelet-related parameters [platelet count (PLT), platelet distribution width (PDW) and mean platelet volume (MPV)] were detected. The levels of platelet physiological characteristics and function-related factors [von Willebrand factor (vWF), fibronectin (Fn), phospholipase A2

Δ **基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.82074326）；黑龙江省博士后基金资助项目（No.LBH-Z20195）；黑龙江省中医药科研项目（No. ZHY2020-084）；国家中医药考试2022年度科研课题（No. TC2022021）

＊ **第一作者** 高级实验师。研究方向：方剂药理学与药学研究。E-mail：zhang520-888@163.com

\# **通信作者** 研究员。研究方向：方剂药理学及药学研究。E-mail：121505982@qq.com

(PLA2), thromboxane B2 (TXB2), 6-keto-prostaglandin F1α (6-keto-PGF1α), thromboxane A2 (TXA2), prostaglandin I2 (PGI2), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), β-thromboglobulin (β-TG)], platelet aggregation rate (maximum aggregation rate, 60 s aggregation rate, 180 s aggregation rate) and fibrinolytic system-related factors [tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)] and the expressions of CD36/PI3K/Akt signaling pathway-related proteins [CD36, focal adhesion kinase (FAK), phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K), PI3K, phosphorylated Akt (p-Akt), p-Akt1/2/3] in platelet were all determined. **RESULTS** Compared with blank group, the contents of TC, TG and LDL-C in plasma, whole blood viscosity, plasma viscosity, the plasma levels of FIB, PLT, MPV, vWF, Fn, PLA2, TXB2, TXA2, cGMP and β-TG, maximum platelet aggregation rate, 60 s aggregation rate, the expressions of PAI-1 in plasma, protein expressions of CD36, FAK, PIP5K, PI3K, p-Akt and p-Akt1/2/3 were significantly increased in the model group ($P<0.05$). The content of HDL-C and the levels of 6-keto-PGF1α, PGI2 and t-PA were significantly decreased ($P<0.05$). After the intervention of Danshen decoction, most of the above indexes were significantly reversed ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Danshen decoction can improve the physiological characteristics and function of platelets in hyperlipidemia model rats, and its mechanism may be related to the down-regulation of CD36/PI3K/Akt signaling pathway activity and the reduction of platelet activation.

KEYWORDS hyperlipemia; Danshen decoction; platelet activation; platelet membrane glycoprotein 4/phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway

当前，高脂血症发病率居高不下，血脂异常导致血小板反应性增强，进而引起动脉粥样硬化性疾病或血栓性疾病[1]。中医学认为高脂血症引起血小板活化的发生与发展属于血瘀证范畴，而活血化瘀类方剂在该类疾病的临床应用中可取得较好疗效[2-3]。

丹参饮是活血化瘀经典方剂，出自《时方歌括》，由丹参、檀香、砂仁3味中药组成，具有活血化瘀、行气止痛之功，常用于治疗血瘀证相关疾病。以往的临床研究、实验研究均已证明丹参饮能够显著改善血脂异常以及该状态下血小板的生理特性和功能异常，然而相关机制的研究尚不深入[4-5]。

血小板膜糖蛋白4（platelet membrane glycoprotein CD36）位于血小板细胞膜上，其作为受体能与多种配体（异常血脂成分是其最主要的配体）相结合发挥功能，并激活细胞内磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）信号通路，进而活化血小板，增加心脑血管疾病的发生概率[6-7]。基于此，本研究采用高脂饲料喂养大鼠以复制高脂血症模型，通过检测CD36/PI3K/Akt信号通路关键蛋白表达情况，探讨丹参饮对模型大鼠血小板生理特性和功能的影响及机制，以期为丹参饮治疗高脂血症奠定实验基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有TGL-16G型高速台式离心机（苏州捷美电子有限公司），7600-020型全自动生化分析仪（日本Hitachi公司），LBY-N7500B型全自动血液流变仪、C2000-A型全自动血凝仪（北京普利生仪器有限公司），X500i型全自动血液细胞分析仪（日本Sysmex公司），iMark型酶标仪（美国Bio-Rad公司），LE204E型分析天平（瑞士Mettler Toledo公司），DYY-7C型电泳仪、DYCZ-40D型转移槽、WD-9413B型凝胶成像系统（北京六一仪器有限公司），NANO 2000型紫外分光光度计（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

1.2 主要药品与试剂

丹参饮（汤剂）由本实验室自制，处方为丹参30 g、砂仁3 g、檀香3 g，3味中药饮片均购自黑龙江中医药大学附属第一医院，经黑龙江中医药大学药学院田明教授鉴定均符合2020年版《中国药典》标准。将上述药材处方量按比例扩大7倍，然后用8倍量（mL/g）水浸泡0.5 h后回流提取2次，时间分别为90、60 min，合并2次煎液，浓缩至每毫升药液含生药总量0.36 g。

辛伐他汀片购自哈药集团三精明水药业有限公司（批号201706001）；总胆固醇（total cholesterol，TC）、三酰甘油（triglyceride，TG）、高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoprotein cholesterol，HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol，LDL-C）试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司（批号分别为182022、187831、180961、180671）；血管性血友病因子（von Willebrand factor，vWF）、纤维连接蛋白（fibronectin，Fn）、磷脂酶A2（phospholipase A2，PLA2）、血栓素B2（thromboxane B2，TXB2）、6-酮-前列腺素F1α（6-keto-prostaglandin F1α，6-keto-PGF1α）、血栓素A2（thromboxane A2，TXA2）、前列腺素（prostaglandin I2，PGI2）、环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）、环磷酸鸟苷（cyclic guanosine monophosphate，cGMP）、β-血小板球蛋白（β-thromboglobulin，β-TG）、组织型纤溶酶原活化剂（tissue plasminogen activator，t-PA）、纤溶酶原

激活物抑制剂1（plasminogen activator inhibitor 1，PAI-1）试剂盒均购自南京建成生物工程研究所（批号均为20181126）；纤维蛋白原（fibrinogen，FIB）试剂盒购自北京普利生仪器有限公司（批号为1812077）；全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒、ECL发光液，兔源CD36、黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）、PI3K、Akt、磷酸化Akt（p-Akt）单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔β-actin单克隆抗体（二抗）均购自沈阳万类生物科技有限公司（货号分别为WLA019、WLA004、WLA013、WLA003、WL02390、WL03550、WL03380、WL0003b、WLP001a、WL01845）；兔源磷脂酰肌醇4-磷酸5-激酶单克隆抗体（phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase，PIP5K）购自武汉三鹰生物技术有限公司（批号13361-1-AP）；兔源p-Akt1/2/3单克隆抗体购自美国Affinity公司（批号AF3262）。

1.3 实验动物及饲料

本研究所用动物为Wistar大鼠，共70只，雄性，健康清洁级，体质量为220～240 g，由哈尔滨医科大学提供，实验动物生产合格证号为SCXK（黑）2016-001。大鼠饲养于黑龙江中医药大学动物实验中心，环境22～25 ℃，12 h光照与12 h黑暗循环交替；每5只大鼠一笼，自由摄食饮水。本实验获得黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号为2018121510），实验过程严格执行伦理委员会相关要求。本研究所用高脂饲料配方组成为63.6%基础饲料、15%猪油、20%蔗糖、1.2%胆固醇、0.2%胆酸钠，购自北京科澳协力饲料有限公司。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

将70只大鼠适应性喂养7 d后，随机分为基础组（14只）和高脂组（56只）。基础组大鼠喂养基础饲料，高脂组大鼠喂养高脂饲料以复制高脂血症模型；于第8周检测大鼠血脂水平，参考《药理实验方法学》中标准——当血脂4项中有一项水平异常，则造模成功。将基础组大鼠作为空白组，造模成功的大鼠随机分为模型组、辛伐他汀组（阳性对照，0.004 g/kg，剂量为临床等效剂量）和丹参饮高、低剂量组（3.6、0.9 g/kg，以生药量计，高剂量为临床等效剂量），每组10只。各给药组大鼠每天灌胃相应药物，其余组大鼠灌胃等体积生理盐水，连续4周。本研究进行过程中，空白组大鼠继续喂养基础饲料，其余组大鼠继续喂养高脂饲料；各组大鼠均有一定死亡。

2.2 样品采集

给药4周后，大鼠禁食、不禁水，于末次给药30 min后进行麻醉取材。髂主动脉分叉处采血，分别置于放有不同抗凝剂的采血管中，其中枸橼酸钠抗凝血浆用于FIB测定、酶联免疫吸附测定、血小板聚集率测定；EDTA-K2抗凝血浆用于血小板相关参数分析；肝素钠抗凝血浆用于全血黏度和血浆黏度测定；柠檬酸-葡萄糖抗凝血浆用于蛋白表达测定。

2.3 血脂生化指标含量的测定

取“2.2”项下枸橼酸钠抗凝血浆，以3 000 r/min离心12 min，取上清液，严格按照TC、TG、HDL-C、LDL-C试剂盒说明书方法操作，应用全自动生化分析仪检测上述指标的含量。

2.4 全血黏度、血浆黏度和血浆中FIB含量的测定

取“2.2”项下肝素钠抗凝血浆适量，设置全自动血液流变仪高（200）、中（60）、低（10）3种不同的剪切参数，进行全血黏度测定。另取肝素钠抗凝血浆适量，以3 000 r/min离心12 min，取上层血浆，采用全自动血液流变仪测定血浆黏度。取枸橼酸钠抗凝血浆适量，根据FIB试剂盒说明书方法操作，采用全自动血凝仪测定FIB。

2.5 血小板相关参数的测定

取“2.2”项下EDTA-K2抗凝血浆，采用全自动血细胞分析仪测定其中血小板计数（platelet count，PLT）、分布宽度（platelet distribution width，PDW）和平均体积（mean platelet volume，MPV）。

2.6 血小板生理特性和功能相关因子水平的测定

取“2.2”项下枸橼酸钠抗凝血浆适量，依据vWF、Fn、PLA2、TXB2、6-keto-PGF1α、TXA2、PGI2、cAMP、cGMP、β-TG试剂盒说明书操作，采用酶标仪测定上述指标水平。

2.7 血小板聚集率和纤溶系统相关因子水平的测定

取“2.2”项下枸橼酸钠抗凝血浆适量，以800 r/min离心10 min，得上层富血小板血浆，再以3 000 r/min离心10 min，得上层乏血小板血浆。采用全自动血小板聚集仪测定血小板最大聚集率、60 s聚集率、180 s聚集率。另取枸橼酸钠抗凝血浆适量，依据PAI-1、t-PA试剂盒说明书方法操作，采用酶标仪测定上述指标水平。

2.8 血小板中CD36/PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达水平的测定

取“2.2”项下柠檬酸-葡萄糖抗凝血浆适量，第1次以800 r/min离心15 min，取2/3体积的上清液进行第2次离心（以2 800 r/min离心10 min），分离上清液，得下层血小板，调整血小板浓度为2×10^8个/mL。向调整浓度后的血小板中加入1 mL含蛋白酶抑制剂的裂解液，冰浴静置30 min，以12 000 r/min离心10 min，取上清液采用BCA法测定蛋白浓度后，进行SDS-PAGE凝胶电泳；转膜，以5%脱脂奶粉室温封闭1 h，分别加入相应一

抗（p-Akt1/2/3、β-actin的稀释度为1∶1 000，CD36、FAK、PIP5K、PI3K、Akt、p-Akt的稀释度均为1∶500），4℃孵育过夜，以TBST洗膜3次，每次5 min；次日加入相应二抗（稀释度均为1∶5 000），孵育2 h，以TBST清洗3次，每次5 min；采用ECL显色，用凝胶成像系统进行灰度分析，以目的蛋白与β-actin蛋白的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。多组间比较用单因素方差分析，组间两两比较用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 丹参饮对高脂血症模型大鼠血脂生化指标含量的影响

与空白组比较，模型组大鼠血浆中TC、TG、LDL-C含量均显著升高（$P<0.05$），HDL-C含量显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，辛伐他汀组和丹参饮高、低剂量组大鼠血浆中TC、TG、LDL-C（丹参饮低剂量组LDL-C除外）含量均显著降低（$P<0.05$）；丹参饮高剂量组大鼠血浆中HDL-C含量显著升高（$P<0.05$）。结果见表1。

表1 各组大鼠血脂生化指标含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$，mmol/L）

组别	例数/只	TC	TG	LDL-C	HDL-C
空白组	9	1.62±0.36	0.34±0.12	0.66±0.14	1.08±0.15
模型组	8	2.43±0.72[a]	0.47±0.16[a]	0.84±0.21[a]	0.89±0.17[a]
辛伐他汀组	7	1.67±0.55[b]	0.32±0.16[b]	0.61±0.19[b]	0.97±0.24
丹参饮高剂量组	9	1.67±0.54[b]	0.30±0.10[b]	0.67±0.13[b]	1.05±0.14[b]
丹参饮低剂量组	9	1.70±0.50[b]	0.30±0.08[b]	0.68±0.17	1.02±0.16

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.2 丹参饮对高脂血症模型大鼠全血黏度、血浆黏度和血浆中FIB含量的影响

与空白组比较，模型组大鼠全血黏度、血浆黏度、血浆中FIB含量均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，辛伐他汀组和丹参饮高、低剂量组大鼠上述指标含量均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

3.3 丹参饮对高脂血症模型大鼠血小板相关参数的影响

与空白组比较，模型组大鼠血浆中PLT、MPV均显著增加（$P<0.05$）。与模型组比较，辛伐他汀组和丹参饮高、低剂量组大鼠血浆中PLT、PDW、MPV均显著减小（$P<0.05$）。结果见表3。

表2 各组大鼠全血黏度、血浆黏度、血浆中FIB含量的测定结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数/只	全血黏度/(mPa·s)			血浆黏度/(mPa·s)	FIB/(g/L)
		低切	中切	高切		
空白组	9	7.20±1.13	4.58±0.47	3.84±0.33	1.20±0.04	1.97±0.16
模型组	8	9.79±2.21[a]	5.55±0.97[a]	4.15±0.41[a]	1.34±0.07[a]	2.41±0.57[a]
辛伐他汀组	7	6.72±0.76[b]	4.49±0.43[b]	3.73±0.21[b]	1.26±0.07[b]	1.86±0.19[b]
丹参饮高剂量组	9	6.70±0.93[b]	4.40±0.49[b]	3.73±0.39[b]	1.19±0.02[b]	1.95±0.44[b]
丹参饮低剂量组	9	7.30±1.03[b]	4.51±0.37[b]	3.81±0.23[b]	1.18±0.03[b]	1.87±0.25[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

表3 各组大鼠血小板相关参数的测定结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数/只	PLT/($\times10^9$ L^{-1})	PDW/fL	MPV/fL
空白组	9	653.8±37.1	7.05±0.14	6.45±0.12
模型组	8	751.1±62.8[a]	7.28±0.32	6.74±0.29[a]
辛伐他汀组	7	665.1±43.3[b]	6.94±0.30[b]	6.39±0.20[b]
丹参饮高剂量组	9	667.8±79.3[b]	6.95±0.23[b]	6.48±0.23[b]
丹参饮低剂量组	9	699.1±67.4[b]	6.86±0.27[b]	6.36±0.24[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.4 丹参饮对高脂血症模型大鼠血小板生理特性和功能相关因子水平的影响

与空白组比较，模型组大鼠血浆中vWF、Fn、PLA2、TXB2、TXA2、cGMP、β-TG水平均显著升高（$P<0.05$），6-keto-PGF1α、PGI2水平均显著降低（$P<0.05$），cAMP水平差异无统计学意义。与模型组比较，辛伐他汀组大鼠血浆中vWF、Fn、TXB2、β-TG水平均显著降低（$P<0.05$），PGI2水平显著升高（$P<0.05$）；丹参饮高剂量组大鼠血浆中vWF、Fn、TXB2、TXA2、β-TG水平均显著降低（$P<0.05$），6-keto-PGF1α、PGI2水平均显著升高（$P<0.05$）；丹参饮低剂量组大鼠血浆中vWF、PLA2、TXB2、TXA2、cGMP水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

3.5 丹参饮对高脂血症模型大鼠血小板聚集率和纤溶系统相关因子水平的影响

与空白组比较，模型组大鼠血小板最大聚集率、60 s聚集率以及血浆中PAI-1水平均显著升高（$P<0.05$），t-PA水平显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，辛伐他汀组和丹参饮低剂量组大鼠血小板最大聚集率、60 s聚集率、180 s聚集率以及血浆中PAI-1水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表5。

表4 各组大鼠血浆中血小板生理特性和功能相关因子水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数/只	vWF/(U/L)	Fn/(μg/L)	PLA2/(μg/L)	TXB2/(ng/L)	6-keto-PGF1α/(ng/L)	TXA2/(ng/L)	PGI2/(ng/L)	cAMP/(nmol/L)	cGMP/(nmol/L)	β-TG/(μg/L)
空白组	9	518.4±103.8	20.26±5.58	7.44±1.89	95.63±23.65	519.50±141.43	408.5±70.1	309.4±78.7	64.55±14.17	31.83±6.18	15.62±7.40
模型组	8	673.7±121.6[a]	30.44±5.32[a]	9.69±1.57[a]	116.48±21.39[a]	400.28±120.17[a]	478.3±82.8[a]	210.8±70.5[a]	60.60±9.89	40.51±6.32[a]	27.32±11.46[a]
辛伐他汀组	7	406.6±113.8[b]	21.64±7.42[b]	9.54±2.16	106.48±21.68[b]	463.68±111.96	520.9±113.4	328.5±92.8[b]	60.76±14.71	36.39±6.67	14.29±5.48[b]
丹参饮高剂量组	9	535.7±114.1[b]	20.94±7.57[b]	8.86±1.17	93.64±20.75[b]	499.35±53.28[b]	403.7±78.8[b]	273.3±60.2[b]	66.19±15.09	36.59±6.65	11.54±6.19[b]
丹参饮低剂量组	9	531.8±144.6[b]	26.58±7.33	7.77±1.51[b]	90.23±23.30[b]	415.73±98.28	394.6±100.8[b]	247.0±65.5	64.04±12.33	34.36±5.50[b]	20.98±5.65

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

表5　各组大鼠血小板聚集率和纤溶系统相关因子水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数/只	血小板最大聚集率/%	血小板60 s聚集率/%	血小板180 s聚集率/%	PAI-1/（ng/mL）	t-PA/（ng/mL）
空白组	9	54.67±12.40	50.20±6.11	55.00±13.06	26.74±7.02	10.92±2.70
模型组	8	69.00±11.61[a]	58.37±8.64[a]	62.75±14.94	35.99±7.33[a]	8.51±1.44[a]
辛伐他汀组	7	57.00±9.21[b]	37.28±12.41[b]	49.66±11.38[b]	25.12±5.03[b]	7.81±1.88
丹参饮高剂量组	9	63.63±8.31	57.00±16.44	59.50±16.56	31.39±9.20	9.89±2.81
丹参饮低剂量组	9	59.60±5.75[b]	51.77±6.59[b]	43.77±15.99[b]	24.31±10.14[b]	9.62±2.81

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.6　丹参饮对高脂血症模型大鼠血小板中CD36/PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响

与空白组比较，模型组大鼠血小板中CD36、FAK、PIP5K、PI3K、p-Akt、p-Akt1/2/3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，各给药组上述蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图1、表6。

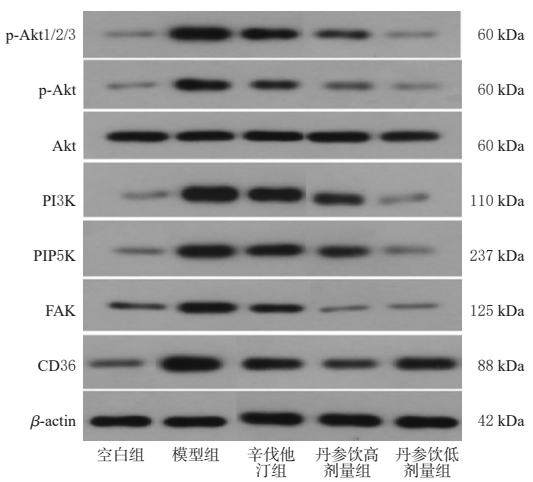


图1　各组大鼠血小板中CD36/PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的电泳图

表6　各组大鼠血小板中CD36/PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	CD36	FAK	PIP5K	PI3K	Akt	p-Akt	p-Akt1/2/3
空白组	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.08
模型组	3.97±0.28[a]	2.18±0.25[a]	4.13±0.51[a]	4.94±0.83[a]	1.04±0.10	3.92±0.80[a]	4.56±0.55[a]
辛伐他汀组	2.42±0.34[b]	1.63±0.14[b]	3.16±0.49[b]	3.57±0.55[b]	1.01±0.07	2.37±0.59[b]	3.71±0.37[b]
丹参饮高剂量组	1.35±0.33[b]	0.51±0.11[b]	2.12±0.24[b]	2.17±0.42[b]	1.01±0.11	1.61±0.40[b]	2.07±0.46[b]
丹参饮低剂量组	2.51±0.46[b]	0.52±0.10[b]	1.03±0.15[b]	0.92±0.21[b]	1.10±0.19	0.96±0.17[b]	0.97±0.27[b]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

4　讨论

《中国成人血脂异常防治指南（2016年修订版）》指出，我国成人血脂异常的总体患病率高达40%，血清胆固醇水平的升高将导致心血管病事件增加，其主要原因与血脂异常引起血小板功能改变密切相关[8]。因此，深入研究血脂异常状态下血小板的活化机制，对血栓性疾病的预防和治疗具有重要意义。

全血黏度、血浆黏度、FIB含量可以从宏观上反映血液成分变化而引起血液流变学的改变；血浆黏度受血浆中蛋白质影响，脂蛋白含量升高，可使肝脏合成FIB增多，从而升高血浆黏度[9]。除脂蛋白含量升高可代偿性增加FIB含量外，血小板活化也可增加FIB生成[1]。本研究结果显示，高脂血症模型大鼠全血黏度、血浆黏度以及血浆中FIB含量均升高；经丹参饮干预后，上述指标含量均降低。这提示丹参饮可通过改善高脂血症模型大鼠的血脂水平，从而改善其血液流变学。

PLT有助于临床对血小板止血功能和血栓性疾病的辅助诊断；PDW和MPV的临床意义基本相似，与血小板活化程度直接相关[10]。本研究结果显示，高脂血症模型大鼠PLT、PDW、MPV均增加；经丹参饮干预后，上述指标均减小。这提示丹参饮能抑制高脂血症模型大鼠血小板活化程度。

血脂异常情况下，胶原极易与vWF连接，介导血小板的活化，增强血小板的黏附功能和聚集功能，且vWF是早期血小板活化的标志物[11]。Fn存在于血小板颗粒中，在血小板活化后释放到细胞外，能增强血小板黏附功能和聚集功能[12]。TXA2具有收缩血管和促血小板聚集的作用，PGI2具有舒张血管和抗血小板聚集的作用，TXA2和PGI2在正常体内具有相互拮抗作用，且两者处于动态平衡，其代谢产物分别为TXB2和6-keto-PGF1α[13]。β-TG能使PGI2分泌减少，从而促进血小板聚集[14]。t-PA和PAI-1二者的动态平衡对维持血浆纤溶系统的稳态具有决定性作用[15]。PLA2是花生四烯酸、前列腺素及血小板活化因子等生物活性物质生成的限速酶[16]。本研究结果显示，高脂血症模型大鼠血小板聚集率（最大聚集率、60 s聚集率、180 s聚集率）和血浆中vWF、Fn、PLA2、TXA2、TXB2、β-TG、PAI-1水平均升高，PGI2、6-keto-PGF1α水平均降低；经丹参饮干预后，以上指标水平均有所逆转。这提示丹参饮可通过影响纤溶系统平衡，改善高脂血症模型大鼠血小板的聚集和释放。

vWF和TXA2均能促进PI3K的活化，PI3K产物触发Ser/Thr激酶Akt的募集、磷酸化和活化，引起血小板聚集、活化，甚至血栓生成[17]。血脂异常产生的氧化型低密度脂蛋白可与CD36特异性结合，从而刺激FAK和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶2产生活性氧，并通过调节cGMP信号通路促进血小板的高反应性；在这一过程中，PI3K/Akt信号通路处于重要的调节位置[7]。本研究结果显示，高脂血症模型大鼠血小板中CD36、FAK、PIP5K、PI3K、p-Akt、p-Akt1/2/3蛋白表达水平和血浆中cGMP水平均升高；经丹参饮干预后，上述指标水平均降低。这提示丹参饮可通过下调CD36/

PI3K/Akt信号通路活性，降低血小板相关活化因子活性，从而抑制血小板活化。

综上所述，丹参饮可改善高脂血症模型大鼠血小板生理特性和功能，其作用机制可能与下调CD36/PI3K/Akt信号通路活性、降低血小板活化程度有关。

参考文献

[1] LI L, ZHOU J W, WANG S, et al. Critical role of peroxisome proliferator-activated receptor α in promoting platelet hyperreactivity and thrombosis under hyperlipidemia [J]. Haematologica, 2022, 107(6): 1358-1373.

[2] 陈可冀，李连达，翁维良. 血瘀证与活血化瘀研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2005，3(1)：1-2.

[3] 赖丽娜，李金霞，郑彩杏，等. 五首活血化瘀方对血瘀证新西兰兔血脂代谢、肝脏组织及ABCA1、PPARγ表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28(15)：78-84.

[4] 曹程浩，董晓瑞，黄斌. 丹参饮合二陈汤加减对颈动脉粥样硬化血管内膜损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(7)：86-91.

[5] LIM C, LIM S, LEE B, et al. Effect of methanol extract of Salviae Miltiorrhizae Radix in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice[J]. Chin Med, 2017, 12: 29.

[6] YANG M A, KHOLMUKHAMEDOV A, SCHULTE M L, et al. Platelet CD36 signaling through ERK5 promotes caspase-dependent procoagulant activity and fibrin deposition *in vivo*[J]. Blood Adv, 2018, 2(21): 2848-2861.

[7] MAGWENZI S, WOODWARD C, WRAITH K S, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade[J]. Blood, 2015, 125(17): 2693-2703.

[8] 诸骏仁，高润霖，赵水平，等. 中国成人血脂异常防治指南：2016年修订版[J]. 中国循环杂志，2016，31(10)：937-953.

[9] ZHENG J, LIU B, LUN Q. Longxuetongluo capsule improves erythrocyte function against lipid peroxidation and abnormal hemorheological parameters in high fat diet-induced ApoE-/- mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016: 2603219.

[10] SIKORA J, KOSTKA B, MARCZYK I, et al. Effect of statins on platelet function in patients with hyperlipidemia [J]. Arch Med Sci, 2013, 9(4): 622-628.

[11] 凌爽，冯月男，刘思莹，等. 补阳还五汤对高脂血症模型大鼠血液流变学和血小板相关生物学指标的影响[J]. 中国药房，2021，32(7)：801-806.

[12] WU Y P, VINK T, SCHIPHORST M, et al. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von Willebrand factor-glycoprotein Ⅰb interaction and inhibited by von Willebrand factor-glycoprotein Ⅱb/Ⅲa interaction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(6): 1661-1667.

[13] FAN H J, LIM, YU L, et al. Effects of Danhong injection on platelet aggregation in hyperlipidemia rats[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 212: 67-73.

[14] LI Z Y, DELANEY M K, O'BRIEN K A, et al. Signaling during platelet adhesion and activation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(12): 2341-2349.

[15] 张玉昆，冯月男，卞敬琦，等. 丹参饮对气虚血瘀模型大鼠的血小板生物学[J]. 世界中医药，2019，14(4)：848-851，858.

[16] 牛雯颖，袁茵，邓思瑶，等. 少腹逐瘀汤对高脂血症模型大鼠血脂及血小板生物学指标的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(3)：1688-1692.

[17] LIU Y Y, HU M J, LUO D J, et al. Class Ⅲ PI3K positively regulates platelet activation and thrombosis via PI(3)P-directed function of NADPH oxidase[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(11): 2075-2086.

（收稿日期：2022-09-26　修回日期：2023-02-27）

（编辑：唐晓莲）

（上接第789页）

[15] 冯楚辉. 加味金匮肾气丸联合温针灸治疗脾肾阳虚型早泄的临床研究[D]. 广州：广州中医药大学，2021.

[16] JIANG T, ZHANG Y, DAI F, et al. Advanced glycation end products and diabetes and other metabolic indicators [J]. Diabetol Metab Syndr, 2022, 14(1): 104.

[17] JIAO N, CHEN Y P, ZHU Y H, et al. Protective effects of catalpol on diabetes mellitus-induced male reproductive damage via suppression of the AGEs/RAGE/Nox4 signaling pathway[J]. Life Sci, 2020, 256: 116736.

[18] RATO L, ALVES M G, DIAS T R, et al. Testicular metabolic reprogramming in neonatal streptozotocin-induced type 2 diabetic rats impairs glycolytic flux and promotes glycogen synthesis[J]. J Diabetes Res, 2015, 2015: 973142.

（收稿日期：2022-09-22　修回日期：2022-10-18）

（编辑：唐晓莲）