

人参二醇通过调节 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路 诱导血小板聚集参与止血过程*

张 旭¹, 张玉尧¹, 丁 悦¹, 李 靖¹, 陈金金¹,
宿文杰¹, 赵大庆¹, 张 鹤^{1,2**}

(1. 长春中医药大学/吉林省中药生物大分子重点实验室 长春 130117;

2. 长春中医院大学附属医院 长春 130021)

摘 要:目的 目的 研究人参二醇(PD)的止血作用并探讨其作用机制。方法 在体内研究中,采用小鼠断尾和肝划痕方法,观察PD对小鼠断尾出血时间和肝划痕出血时间的影响,应用血常规分析仪检测血常规;在体外研究中,采用血凝分析仪检测凝血四项;应用血小板聚集仪检测血小板聚集度;应用流式细胞仪检测人洗涤血小板中P-选择素(CD62P)和糖蛋白 IIb/IIIa(PAC-1)表达;蛋白免疫印迹(Western blot)法检测人血小板的相关蛋白表达。结果 与空白对照组比较,PD能明显降低小鼠断尾和肝划痕的出血时间;显著增加大鼠血浆中红细胞分布宽度标准差(RDW-SD)、红细胞分布宽度变异系数(RDW-CV)、血小板数量(PLT)、血小板压积(PCT)和大型血小板比率(P-LCR);PD能显著缩短大鼠血清的活化部分凝血活酶时间(APTT)和增加纤维蛋白原的含量(FIB);在血小板聚集的结果中,大鼠和人的血小板聚集率随着PD浓度的增加而显著增加,当PD浓度为140 μ M时,最大聚集率分别为51.40%和33.40%。PD激活血小板,促进CD62P的释放和增加糖蛋白 IIb/IIIa的表达。同时,PD能显著增加磷酸肌醇3激酶(Phosphoinositide3-kinase, PI3K)、蛋白酶B(Protein Kinase B, Akt)和糖原合酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β)磷酸化水平。结论 PD具有止血作用,作用机制是通过激活内源性凝血途径和血小板的PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路促进血小板聚集,形成血栓,参与止血过程。

关键词:20(S)-人参二醇 止血机制 凝血功能 血小板聚集

doi: 10.11842/wst.20210512004 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

20(S)-人参二醇(20(S)-panoxadiol)属三萜类化合物,在皂苷中存在的原形是20(S)-原人参二醇^[1]。20(S)-原人参二醇属于人参达玛烷型皂苷^[2],包含人参皂苷Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Rg3、Rh2、CK和三七皂苷R4、Fa、Fc等,由于苷键属缩醛结构,极易被催化降解。近年来研究发现原人参二醇型皂苷在体内酸、碱、酶、微生物等条件下苷键逐步断裂,先失去糖链上

外侧糖,再失去内侧糖,最终得到皂苷元,即20(S)-原人参二醇(20(S)-Protopanaxadiol)^[3],而原人参二醇在水解时,C-20位的构型极易受酸的影响,发生脱水环合生成人参二醇^[4,5]。目前很多学者认为皂苷在体内的水解产物是重要的活性成分。现代药理学研究发现,人参二醇具有肝肾保护^[6],抗肿瘤^[7,8],中枢抑制^[9],抗辐射^[11],抗衰老^[11]等作用。高瑞兰等人^[12]研究发现人

收稿日期:2021-05-12

修回日期:2021-11-12

* 国家科学技术部重点研发计划项目(2017YFC1702100):人参产业关键技术研究及大健康产品开发,负责人:赵大庆;吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20200910KJ):基于PI3K-AKT信号通路研究三七中皂苷及苷元活血/止血双向调节作用机制,负责人:张鹤;长春中医药大学培育基金项目(2019年):基于“止血而不留瘀”研究三七皂苷及皂苷元活血/止血双向调节作用机制,负责人:张鹤。

** 通讯作者:张鹤,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要研究方向:中药物质基础研究。

参皂苷中人参二醇能促进造血细胞的增殖和诱导分化,调控造血相关基因的转录,具有一定的造血功能。课题组在前期研究中发现20(S)-原人参二醇能提高大鼠的红细胞和血小板数量,促进造血功能;同时能激活血小板、释放颗粒物质,促进血小板聚集进而参与止血过程^[13,14]。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶(PI3K/Akt)信号通路参与血小板活化过程中血小板-基质相互作用和血小板聚集^[15],进而激活下游分子糖原合酶激酶-3 β (GSK-3 β)参与止血和血栓形成过程中,因此PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路是调节血小板反应重要的信号通路^[16]。在五加科植物人参、三七^[17]等药材中皂苷水解产物均含有人参二醇。《本草纲目》记载人参“治男妇一切虚症,……吐血,嗽血,下血,血淋,血崩,胎前产后诸病”;而三七为止血要药,具有化瘀止血,活血定痛的功效,主治各种出血症,跌打损伤,瘀血肿痛。目前研究发现三七中止血成分为三七素、三七皂苷Ft1和原人参二醇。基于原人参二醇和人参二醇的结构特点,因此本文通过体内外研究人参二醇的止血作用并初步探讨其作用机制。本文的研究补充了人参具有止血的功物质基础,为临床使用皂苷类药物提供基础,防止不合理使用皂苷元类成分导致血栓类疾病的发生。

1 材料和方法

1.1 试验动物

雄性昆明小鼠(20.0 ± 2.0 g)和雄性Wistar大鼠(190.0 ± 10.0 g)购自于辽宁长生生物技术有限公司,许可证号为SCXK(吉)-2016-0003。本实验经长春中医药大学实验动物伦理学委员会批准,批准编号为20190133。鼠饲养于SPF级动物实验室内,12 h/12 h昼夜循环,室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $52 \pm 2\%$,鼠自由摄食、饮水。鼠在实验开始前适应3天。

1.2 主要试剂

20(S)-人参二醇(PD,纯度 $\geq 98\%$,批号19666-76-3),上海源叶生物科技有限公司,图1为PD化学结构式;白眉蛇毒血凝酶(Hemocoagulase),锦州奥鸿药业有限责任公司;凝血酶原(PT),活化部分凝血活酶时间(APTT),凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB)试剂盒,南京建城生物工程研究所;FITC Anti-Human CD41/CD61 (PAC-1)抗体和FITC Anti-Human-CD62P (P-选择素)抗体,美国Biolegend公司。

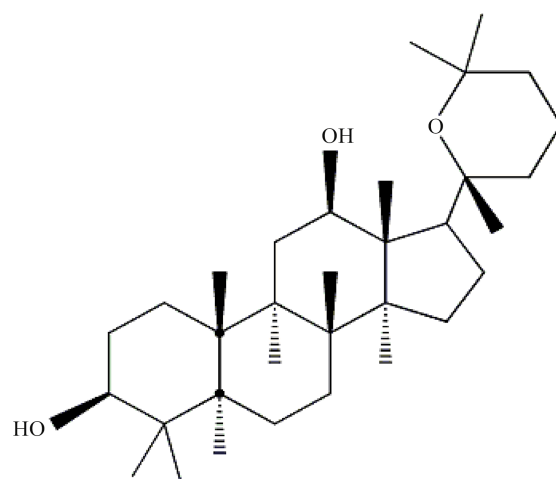


图1 20(S)-人参二醇结构式

1.3 仪器

H1201型血凝分析仪,江苏霍纳医疗器械有限公司;XT-2000i自动血液分析仪,日本Sysmex公司;700型血小板聚集仪,美国Chrono-log公司。

1.4 试验方法

1.4.1 体内实验研究

(1)小鼠断尾和肝划痕出血时间测定^[18]

小鼠断尾出血模型。取40只雄性昆明小鼠,随机分为5组,分别为空白对照组(1%CMCNa生理盐水),血凝酶组(阳性组, $1.0 \text{ KU} \cdot \text{mL}^{-1}$),PD低剂量组($2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),PD中剂量组($4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和PD高剂量组($8.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。皮下给药4 h后,腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉。麻醉后的小鼠固定于鼠板,将鼠尾浸没于 37°C 生理盐水中预温3分钟;在距尾尖10 mm处用手术刀剪断,尾巴置于 37°C 的生理盐水中,记录出血时间。

小鼠肝划痕出血模型。分组和给药方式与小鼠断尾出血模型实验相同,麻醉后的小鼠固定于鼠板上,用手术剪刀剪开腹腔,完全暴露肝脏。用2 mL注射器在右叶肝脏上划出约1 cm创口,造成肝脏出血,用滤纸每隔10 s蘸一下,直至划痕处不再出血,记录出血时间。实验结束后,小鼠脱颈处死。

(2)大鼠血常规的检测

取Wistar雄性大鼠40只,分组和给药方式与小鼠断尾出血模型实验相同。皮下注射药物4 h后,采用1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉取血10 mL,置于含EDTA的抗凝管中,颠倒混匀。应用血液分析仪进行血常规检测。

1.4.2 体外实验研究

(1)凝血四项的测定

雄性 Wistar 大鼠采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉取血 10 mL,置于含 3.8% 枸橼酸钠的抗凝管中,离心($3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min);取 1.45 mL 上清血浆,分别加入 0.05 mL 甲醇、凝血酶($0.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)或 PD ($35.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $70.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $140.0\text{ }\mu\text{M}$),放置 37°C 烘箱中孵育 10 min,根据 PT, APTT, TT 和 FIB 试剂盒说明书,应用血凝分析仪进行检测。血液标本在 4 h 内完成测定。

(2)洗涤血小板的制备

健康志愿者肘静脉采血或雄性 Wistar 大鼠腹主动脉取血,分别加入含有 3.8% 枸橼酸钠的抗凝管中;离心($800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min),取上层血浆进一步离心($2500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 8 min),取沉淀血小板,加入适量 Tyrode's buffer(包含 137 mM NaCl, 2 mM KCl, 12 mM NaHCO_3 , 5 mM HEPES, 0.35% BSA, 1 mM CaCl_2 , pH 7.4)洗涤两次,用 Tyrode's buffer 重悬血小板,用血液分析仪测定血小板数目为 $3\times 10^8/\text{mL}$,待用。

(3)血小板聚集率检测

本实验应用血小板聚集仪测定血小板聚集率,设置条件为: $1000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。取人或大鼠洗涤血小板 $270\text{ }\mu\text{L}$ 加入反应杯,然后放入血小板聚集仪,调整基线为 100%,分别加入 $30\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇、凝血酶(阳性药, $0.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)或 PD ($17.5\text{ }\mu\text{M}$ 、 $35.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $70.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $140.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $280.0\text{ }\mu\text{M}$),待聚集率达到最高停止记录。本实验重复 3 次。

(4)流式细胞仪检测 P-选择素(CD62P)表达率和糖蛋白 IIb/IIIa(PAC-1)表达率

取人洗涤血小板 $145\text{ }\mu\text{L}$,分别加入甲醇、阳性药(凝血酶, $0.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)和 PD ($35.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $70.0\text{ }\mu\text{M}$ 、 $140.0\text{ }\mu\text{M}$), 37°C 避光孵育 5 min,然后分别加入 $5\text{ }\mu\text{L}$ FITC Anti-Human-CD62P (P-选择素)抗体和 FITC Anti-Human CD41/CD61 (PAC-1)抗体,避光室温孵育 20 min,加 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS 终止反应,上流式细胞分析仪,收集 10000 个细胞,分别计算 CD62P 和 PAC-1 的表达率。

(5)蛋白免疫印迹(Western Blotting, WB)

取人洗涤血小板分别加入甲醇、凝血酶($0.5\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)或 PD ($35\text{ }\mu\text{M}$ 、 $70\text{ }\mu\text{M}$ 和 $140\text{ }\mu\text{M}$) 在 37°C 孵育 5 min,离心($3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min),弃上清,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ RIPA 裂解缓冲液(含蛋白酶/磷酸酶抑制剂)。取 30

表 1 PD 对小鼠断尾模型和肝划痕模型出血时间的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

分组	给药剂量	小鼠断尾出血时间/min	小鼠肝划痕出血时间/min
空白对照组	$10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.89 ± 0.41	1.11 ± 0.14
阳性药组	$1.0\text{ KU}\cdot\text{kg}^{-1}$	$1.41\pm 0.31^*$	$0.87\pm 0.13^*$
低剂量组	$2.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.56 ± 0.31	$0.90\pm 0.15^*$
中剂量组	$4.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$1.36\pm 0.41^*$	$0.76\pm 0.14^{***}$
高剂量组	$8.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	$1.12\pm 0.26^{***}$	$0.69\pm 0.16^{***}$

注:与空白对照组比较, $^*P<0.05$ 和 $^{***}P<0.001$ 。

μg 蛋白质进行电泳(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶),转模(聚偏二氟乙烯, PVDF)。采用脱脂奶粉封闭后,分别加入 PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), p-PI3K, AKT (Protein Kinase B, PKB), p-AKT, GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 beta), p-GSK3 β 和 β -actin 一抗(1:1000 稀释) 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜 5 次,二抗(1:1000 稀释)孵育 1 h。TBST 洗膜后,用 Ecl 化学发光试剂盒显色,并在凝胶成像系统中拍照。

1.5 统计学方法

采用 Prism 8.0 软件分析数据,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法进行组间比较,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD 对小鼠出血时间的影响

表 1 结果显示,皮下给药 4 h 后,PD 和凝血酶(阳性药)能显著缩短小鼠断尾出血时间和肝划痕出血时间。在小鼠断尾出血模型中,中剂量和高剂量 PD 均能显著缩短小鼠断尾出血时间($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。在小鼠肝划痕出血模型中,PD 三个剂量均能显著缩短小鼠肝划痕出血时间($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。以上结果表明 PD 对组织外伤导致的出血有一定的止血作用。

2.2 PD 对大鼠血常规的影响

表 2 和 3 结果显示,皮下注射 4 h 后,PD 对红细胞参数和血小板参数有显著的影响,而对其他细胞(如白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、血红蛋白等)无影响(数据略)。表 2 为 PD 对大鼠红细胞参数的影响,与空白对照组比较,低剂量和中剂量 PD 均能显著增加大鼠血浆中红细胞分布宽度标准差(red cell distribution width-standard deviation, RDW-SD) ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) 和红细胞分布宽度变异系数(red cell distribution

表2 PD对大鼠红细胞参数的作用($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	给药剂量	RBC/ $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$	HCT/%	MCV/fL	RDW-SD/%	RDW-CV/%
空白对照组	—	6.76 \pm 0.59	42.33 \pm 2.64	62.76 \pm 2.05	31.59 \pm 1.51	14.16 \pm 0.57
阳性药组	1.0 KU \cdot kg $^{-1}$	6.96 \pm 0.33	43.95 \pm 1.72	63.20 \pm 2.55	33.47 \pm 1.81	14.89 \pm 0.67
低剂量组	2.0 mg \cdot kg $^{-1}$	6.80 \pm 0.47	43.35 \pm 2.20	63.78 \pm 2.15	34.81 \pm 2.27**	15.58 \pm 1.40*
中剂量组	4.0 mg \cdot kg $^{-1}$	6.71 \pm 0.49	42.06 \pm 2.50	62.75 \pm 2.55	34.18 \pm 2.27*	15.79 \pm 1.49*
高剂量组	8.0 mg \cdot kg $^{-1}$	6.96 \pm 0.43	43.97 \pm 2.02	63.32 \pm 1.96	32.51 \pm 1.73	14.72 \pm 0.81

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$ 。(RBC:红细胞数量;HCT:红细胞压积;MCV:平均红细胞体积;RDW-SD:红细胞分布宽度标准差;RDW-CV:红细胞分布宽度变异系数)

表3 PD对大鼠血小板参数的作用($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	给药剂量	PLT/ $\times 10^9 \cdot L^{-1}$	PCT/%	MPV/fL	PDW/%	P-LCR/%
空白对照组	—	1278.88 \pm 69.82	0.95 \pm 0.14	7.61 \pm 0.27	8.48 \pm 0.40	8.76 \pm 1.60
阳性药组	1.0 KU \cdot kg $^{-1}$	1313.70 \pm 182.55	1.04 \pm 0.13	7.91 \pm 0.29	8.91 \pm 0.48	11.12 \pm 1.95*
低剂量组	2.0 mg \cdot kg $^{-1}$	1456.60 \pm 143.55	1.12 \pm 0.11	7.68 \pm 0.27	8.51 \pm 0.33	9.32 \pm 1.41
中剂量组	4.0 mg \cdot kg $^{-1}$	1578.20 \pm 167.81**	1.20 \pm 0.12**	7.64 \pm 0.27	8.57 \pm 0.40	9.48 \pm 1.75
高剂量组	8.0 mg \cdot kg $^{-1}$	1526.40 \pm 212.57*	1.19 \pm 0.17**	7.84 \pm 0.22	8.79 \pm 0.41	10.88 \pm 1.54*

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$ 。(PLT:血小板数量;PCT:血小板压积;MPV:平均血小板体积;PDW:血小板分布宽度;P-LCR:大型血小板比率)

表4 PD对大鼠凝血四项的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	给药浓度	APTT/s	PT/s	TT/s	FIB/mg \cdot dL $^{-1}$
空白对照组	—	26.50 \pm 3.04	14.67 \pm 0.75	45.50 \pm 2.30	158.20 \pm 7.99
阳性药组	0.5 U \cdot mL $^{-1}$	20.75 \pm 3.03*	14.38 \pm 0.48	33.50 \pm 3.50**	193.80 \pm 6.50*
低剂量组	35.0 μ M	23.75 \pm 1.92	14.20 \pm 0.75	43.00 \pm 2.16	195.10 \pm 14.35*
中剂量组	70.0 μ M	20.25 \pm 1.89*	14.80 \pm 0.40	43.00 \pm 1.87	197.34 \pm 8.26*
高剂量组	140.0 μ M	20.25 \pm 2.49*	15.00 \pm 0.71	44.33 \pm 4.71	201.24 \pm 14.12**

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 和** $P < 0.01$ 。(APTT:活化部分凝血活酶时间;PT:凝血酶原;TT:凝血酶时间;FIB:纤维蛋白原)

width-coefficient of variation, RDW-CV) ($P < 0.05$);而PD也能增加红细胞数量(RBC),红细胞压积(hematocrit, HCT)和平均红细胞体积(mean corpuscular volume, MCV),但与空白对照组比较没有统计学差异($P > 0.05$)。表3为血小板参数结果,与空白对照组比较,中剂量和高剂量PD能显著增加大鼠血清中血小板数量(platelet, PLT) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和血小板压积(plateletcrit, PCT) ($P < 0.01$);高剂量PD能显著增加大鼠血清中大型血小板比率(platelet larger cell ratio, P-LCR) ($P < 0.05$);同时PD能增加血小板分布宽度(platelet distribution width, PDW)和平均血小板体积(mean platelet volume, MPV),但与空白对照组比较没有统计学意义($P > 0.05$)。以上结果表明皮下注射PD能在短时间内促进大鼠血小板的生成,影响红细胞参数和血小板参数参与止血或血栓形成。

2.3 PD对大鼠凝血四项的影响

凝血四项(PT、APTT、TT、FIB)是评价药物止血效

果的重要指标。表4结果显示,与空白对照组相比,PD中剂量和高剂量均能显著减少大鼠血浆APTT ($P < 0.05$);PD的3个剂量均能增加血浆中FIB的含量 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果展现出剂量依赖性;PD对大鼠血浆TT和PT没有显著的改变($P > 0.05$)。以上结果显示PD缩短APTT同时增加FIB,表明PD可激活内源性凝血途径,促进FIB的生成而达到止血的作用。

2.4 PD促进洗涤大鼠/人血小板的聚集

表5结果显示,与空白对照组比较,PD可以增加大鼠和人洗涤血小板聚集率,同时随着PD浓度的增加聚集率显著增加。当PD浓度大于140 μ M,PD对洗涤血小板的聚集率增加趋势不显著。PD为140 μ M时,大鼠洗涤血小板的聚集率为51.40%,人洗涤血小板的聚集率为33.40%;表明PD对人血小板的聚集作用明显低于对大鼠血小板的聚集作用。综合以上结果,PD可诱导人和鼠的洗涤血小板聚集,但聚集强度明显弱于凝血酶的作用。

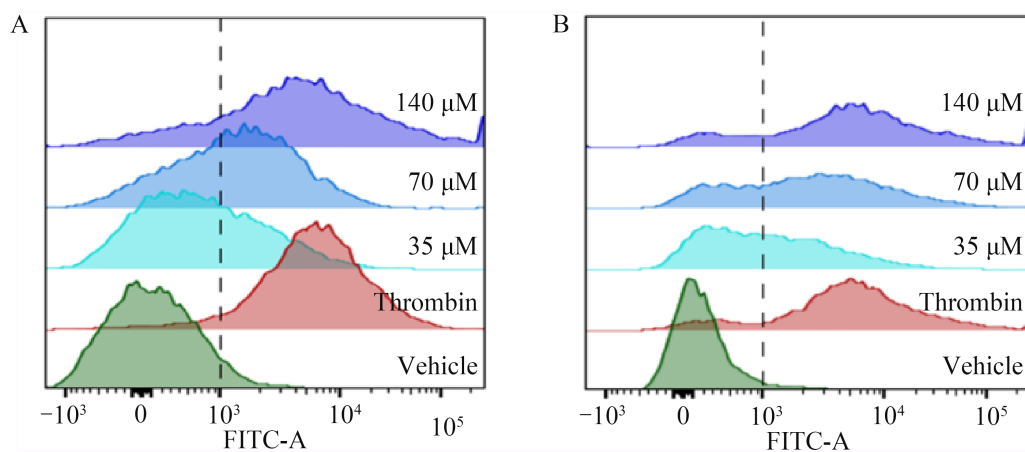


图2 流式细胞仪检测PD对人洗涤血小板CD62P(A)表达率和PAC-1(B)表达率的作用

表5 PD对洗涤的大鼠血小板的聚集作用($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

分组	给药浓度	大鼠血小板聚集率/%	人血小板聚集率/%
空白对照组	—	8.60 ± 1.02	10.00 ± 1.58
阳性药组	0.5 U·mL ⁻¹	69.25 ± 3.34***	37.80 ± 4.14***
给药组	17.5 μM	13.8 ± 3.93*	17.80 ± 0.84
	35.0 μM	32.20 ± 1.72***	21.80 ± 1.09***
	70.0 μM	43.40 ± 1.85***	27.00 ± 1.00***
	140.0 μM	48.6 ± 1.51***	33.40 ± 1.14***
	280.0 μM	51.40 ± 1.72***	35.15 ± 1.58***

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$ 和*** $P<0.001$ 。

2.5 PD能促进人洗涤血小板CD62P和PAC-1的表达

一些激动剂诱导血小板聚集过程中,血小板发生形态改变、释放颗粒物质和糖蛋白IIb/IIIa的活化。CD62P是血小板活化释放的颗粒物质;PAC-1是血小板表面糖蛋白IIb/IIIa的复合物,二者表达的增加是血小板活化的重要指标^[19]。从图2和表6可以看出,PD能显著的促进血小板CD62P和PAC-1的表达($P<0.001$),并呈现剂量依赖性。当PD浓度为140μM时,CD62P的表达率为84.32%;PAC-1的表达率为86.87%;此时PD的作用的强度相当于凝血酶(0.5 U·mL⁻¹)的作用。

2.6 PD对血小板内PI3K/Akt/GSK3β信号通路的作用

磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是血小板激活过程中的关键细胞内信号转导分子^[20]。Akt,是PI3K主要的下游效应蛋白,因此进一步地检测了PD对PI3K信号通路的作用。图3结果显示,随着PD浓度的增加,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt和p-GSK3β/GSK3β的相对表达值增加;与空白对照组比

表6 PD对人洗涤血小板CD62P的表达和PAC-1的表达

($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分组	给药浓度	CD62P/%	PAC-1/%
空白对照组	—	10.18 ± 1.06	10.95 ± 0.86
凝血酶组	0.5 U·mL ⁻¹	93.07 ± 1.64***	88.24 ± 1.74***
低剂量组	35.0 μM	41.78 ± 3.51***	67.53 ± 9.78***
中剂量组	70.0 μM	66.70 ± 6.52***	79.08 ± 3.94***
高剂量组	140.0 μM	84.32 ± 2.31***	86.87 ± 1.50***

注:与空白对照组比较,** $P<0.001$ 。

较,PD能显著增加p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt和p-GSK3β/GSK3β蛋白磷酸化水平($P<0.05$, $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。以上结果表明PD通过调节血小板内PI3K/Akt/GSK3β信号通路,激活血小板,促进血小板聚集。

3 讨论

人体的组织或血管损伤导致出血时,很多成分参与止血过程,其中包括血浆成分、血管成分、凝血因子等^[21]。本文通过体内的出血模型、血常规实验和体外血小板聚集实验评价了PD的止血作用,并初步探讨了其作用机制。结果表明PD通过激活内源性凝血途径和诱导血小板聚集参与止血过程。在我们的前期研究中,发现原人参二醇可通过激活内源性凝血途径,增加纤维蛋白原含量,同时通过与血小板表面的PAR1受体结合激活血小板,增加PAC-1和CD62P表达,促进钙离子内流,诱导血小板聚集参与体内外止血过程^[13,14]。在人参、三七和西洋参等五加科植物的皂苷中,皂苷通过水解得到皂苷元原人参二醇,而原人参二醇在体内酸、碱、酶等作用下,结构不稳定,很

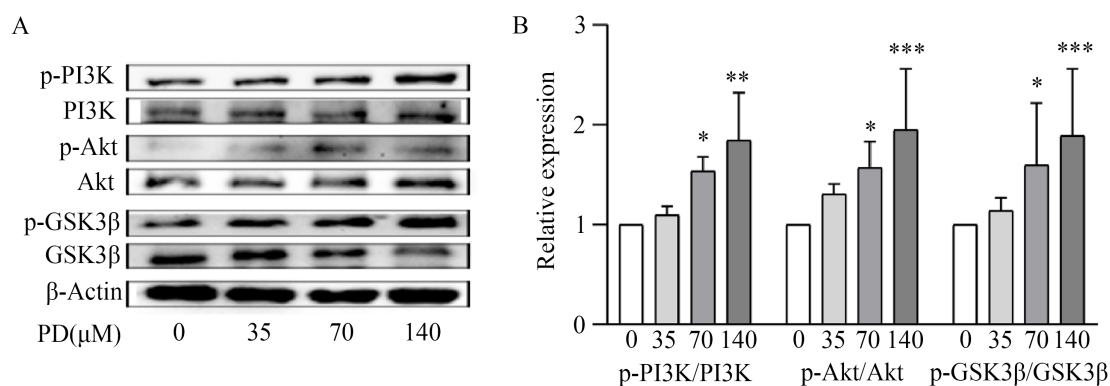


图3 PD对血小板内PI3K/Akt/GSK3β信号通路的作用($\bar{x} \pm s, n=3$)。

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$ 。

容易水解产生PD^[4]。PD和原人参二醇都属于四环三萜化合物,通过本文的研究,验证了皂苷元PD同原人参二醇一样,都具有一定的止血功效。

在PD止血的体内研究中,我们首先通过出血模型实验确定PD的止血作用,结果发现PD能显著抑制小鼠断尾出血时间和肝划痕出血时间,表明PD具有一定的止血作用。其次我们检测了PD对大鼠体内血常规的影响。给药4 h后PD能显著增加血小板参数和红细胞参数。而血小板和红细胞是参与止血的重要的血浆成分,在血管损伤中,破损处的胶原被暴露激活,富集血液循环中的血小板粘附于内膜下组织与红细胞聚集成团,加速止血^[22]。在红细胞参数中,PD能显著提高RDW-SD和RDW-CV水平。而红细胞分布宽度(RDW)常反映外周红细胞体积异质性的参数,研究发现RDW-SD和RDW-CV在血栓、脑梗等心脑血管疾病中异常增加^[23,24]。在血小板参数中,PD能显著提高PLT数量、PCT和P-LCR。PLT是血液中最小的血细胞,具有粘附、聚集、释放、收缩和吸附等作用,在止血和血栓形成过程中起着重要作用^[25]。血小板压积(PCT)受血小板平均体积(MPV)和血小板(PLT)数量的影响。PCT的增加与冠状动脉疾病相关^[26]。在生理状态下,血小板新生时体积较大,成熟之后体积变小,大型血小板多为年轻血小板,由骨髓新近释放。大型血小板比率(P-LCR)是指大型血小板占总的血小板的比例^[27]。一些临床研究发现,PCT和P-LCR增加与血栓类疾病发生密切相关^[28,29]。综合以上结果,表明皮下注射PD可在短时间内促进血小板的生成,通过影响血小板参数和红细胞参数参与体内止血的过程。

通过体内的出血模型和血常规确定了PD具有一定的止血作用。进一步的我们检测PD对凝血参数(APTT、PT、TT和FIB)的影响。凝血参数是评价药物止血效果的重要指标^[30]。APTT和PT分别反应药物参与内源性和外源性凝血途径的检测方法^[31]。TT是指在共同凝血途径中,所生成的凝血酶使纤维蛋白原转化为纤维蛋白的时间,也作为纤溶系统的筛选试验;FIB是纤维蛋白的前体,在凝血的最后阶段可将纤维蛋白原转成不溶性纤维蛋白,使血液凝固,同时反应凝血技能状态^[32]。本文结果中PD可显著缩短APTT形成时间,增加FIB的含量,表明PD可激活内源性凝血途径,促进FIB转化成不溶性的纤维蛋白,进而发挥止血作用。

在一些激动剂的作用下,如二磷酸腺苷(ADP)、凝血酶(Thrombin)、胶原(Collagen)可激活血液循环中的血小板,活化的血小板具有粘附、释放和聚集的作用。血小板活化后能够释放出致密颗粒(ADP、三磷酸腺苷、CD63、5-羟色胺等)和 α 颗粒(P-选择素、血小板因子4、血管性血友病因子等)^[33]。释放的颗粒物质(ADP、三磷酸腺苷、5-羟色胺、血管性血友病因子等)进一步激活血小板表面的受体,加速循环中的血小板粘附和聚集。在静息血小板表面P选择素(CD62P)极少,血小板被活化后P-选择素从 α 颗粒释放出来与血小板表面的胞膜融合,因此CD62P被认为是血小板活化的标志物^[34]。活化血小板上的糖蛋白II b/III a可通过结合粘附蛋白介导血小板聚集,促进其与纤维蛋白原结合,转化为不溶性的纤维蛋白。而PAC-1为GP II b/III a的特异性抗体,可用于评价血小板活化程度的指标^[19]。本文采用流式细胞仪检测人洗涤血小板中

CD62P 和 PAC-1 的表达,结果发现 PD 能促进血小板 CD62P 的释放和 PAC-1 的表达,表明 PD 能激活血小板,促进颗粒物质的释放和血小板粘附。

目前研究发现 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路为调节血小板反应的主要信号通路^[16]。PI3K 是一种细胞内的磷脂酰肌醇激酶,在血小板的功能反应和血栓形成方面起着重要的作用^[35]。而 Akt 是 PI3K 下游的信号分子,PI3K 的激活能诱导 Akt 磷酸化水平增加^[36]。研究发现蛋白激酶 C(PKC) α 和 Akt 可以通过调节 GSK3 α/β 促进凝血酶介导的整合素 α IIb β 3 的激活和颗粒物质的分泌,参与血小板活化过程^[35]。本文结果中人参二醇能够明显增加 PI3K、Akt 和 GSK3 β 磷酸化,表明人

参二醇通过影响 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路促进血小板聚集进而参与止血过程。

综上所述,PD 可能是通过激活内源性多种的凝血因子,提高血浆中 FIB 含量、PLT、PCT 和 P-LCR 和 RDW 参数,促进血小板聚集,形成血栓,进而达到止血的作用。PD 为原人参二醇型皂苷的水解产物,广泛存在于人参、三七等药材中,古籍记载人参和三七等具有止血功效,本文对 PD 的止血作用及其作用机制进行了初步的探讨,补充了人参和三七具有止血的功效的物质基础,为全面阐述人参和三七的临床功效提供理论基础,同时防止不合理使用皂苷元类成分导致血栓类疾病的发生。

参考文献

- 刘竞研. 人参总皂苷降解物的化学成分研究及人参二醇的结构修饰. 吉林大学, 2015.
- 卢聪. 四种达玛烷型三萜皂苷益智作用特点及机制研究. 北京协和医学院, 2017.
- Akao T, Kanaoka M, Kobashi K. Appearance of Compound K, a Major Metabolite of Ginsenoside Rb1 by Intestinal Bacteria, in Rat Plasma after Oral Administration. Measurement of Compound K by Enzyme Immunoassay. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 1998, 21(3): 245-249.
- 刘小妹, 施崇精, 程中琴, 等. 人参水解物中人参二醇的工艺优化及其 HPLC-ELSD 含量测定方法. *天然产物研究与开发*, 2018, 30(10): 1752-1757, 1781.
- 陈业高, 张燕. 人参达玛烷型皂甙的化学. *云南师范大学学报*, 2001, 21(3): 39-42.
- 敬华, 岳茂兴, 杨晋德, 等. 人参二醇对四氧化二氮染毒鼠肝肾脏脏损伤的保护作用. *中国医学检验杂志*, 2004, 5(3): 177-178.
- Jo H, Jang D, Sun K P, *et al.* Ginsenoside 20(S) -protopanaxadiol induces cell death in human endometrial cancer cells via apoptosis. *Journal of ginseng research*, 2020, 45(1): 126-133.
- Ying Hua Jin, JoonSeok Choi, Soona Shin, *et al.* Panaxadiol selectively inhibits cyclin A-associated Cdk2 activity by elevating p21WAF1/CIP1 protein levels in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 2003, 24(11): 1767-1772.
- Jun-Ho Lee, Seok Choi, Jong-Hoon Kim, *et al.* Effects of Ginsenosides on Carbachol-Stimulated Formation of Inositol Phosphates in Rat Cortical Cell Cultures. *Neurochemical Research*, 2003, 28(9): 1307-1313.
- Lee HJ, Kim SR, Kim JC, *et al.* In Vivo radioprotective effect of Panax ginseng C. A. Meyer and identification of active ginsenosides. *Phytother Res*, 2006, 20(5): 392-395.
- 张贵明, 赵余庆. 人参二醇的现代药学与生物活性研究进展. *中国现代中药*, 2008, 10(10): 8-10, 33.
- 卢丞文, 赵媛颖, 刘英加雯, 等. 人参皂苷抗衰老作用的研究进展. *农业与技术*, 2014, 34(10): 4.
- 宿文杰, 张玉尧, 李荣森, 等. 20(S)-原人参二醇止血作用及其机制. *中成药*, 2021, 43(3): 605-612.
- Zhang H, Pan D, Wu X, *et al.* Platelet Protease Activated Receptor 1 Is Involved in the Hemostatic Effect of 20(S) -Protopanaxadiol by Regulating Calcium Signaling. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 549150.
- Chen Z, Li T, Kareem K, *et al.* The role of PI3K/Akt signaling pathway in non-physiological shear stress-induced platelet activation. *Artificial Organs*, 2019, 43(9): 897-908.
- Laurent P A, Severin S, Gratacap M P, *et al.* Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1. *Advances in Biological Regulation*, 2014, 54(1): 162-174.
- 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展. *中草药*, 2015, 46(9): 1381-1392.
- 宿文杰. 人参二醇的止血作用研究. 长春: 长春中医药大学, 2021.
- Buitrago L, Zafar H, Zhang Y, *et al.* Dominant role of α IIb β 3 in platelet interactions with cross-linked fibrin fragment D-dimer - ScienceDirect. *Blood Advances*, 2020, 4(13): 2939-2949.
- Park C E, Lee D H. Isoscapoleitin Inhibits U46619-Induced Platelet Aggregation by Regulating PI3K/MAPK Pathway. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2021, 50(3): 246-253.
- Jalaer I, Tsakiris D A, Solecka-Witulska B A, Kannicht C. The role of von Willebrand factor in primary haemostasis under conditions of haemodilution. *Thromb Res*, 2017, 157: 142-146.
- Jurk K, Kehrel B E. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*, 2005, 31(4): 381-392.
- 孙子涵, 韩凝, 孙黎, 等. 红细胞体积分布宽度变异系数在原发性高血

- 压患者中的变化及其意义. 检验医学, 2010,25(09):728-730.
- 24 魏勇,费民忠,贺茂荣. 红细胞分布宽度与脑梗死的关系[J]. 临床神经病学杂志, 2012,25(01):23-25.
 - 25 Smyth S S, Mciever R P, Weyrich A S, *et al.* Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis & Haemostasis*, 2009, 7(11):1759-1766.
 - 26 Ergelen M, Uyarel H. Plateletcrit: a novel prognostic marker for acute coronary syndrome. *Int J Cardiol*, 2014, 177(1):161.
 - 27 练颖,付晓莉,刘淑益. 肝硬化失代偿期血小板四项参数的测定及其意义. 川北医学院学报, 1999,14(2):72.
 - 28 周红,施咏梅,刘韶华. 血小板激活及血小板参数变化在脑梗死发病机制中的作用. 临床神经病学杂志, 2006,19(01):22-25.
 - 29 黄彩芝,莫丽亚,邓永超,等. 重症肺炎患儿血小板参数与凝血指标的探讨. 中国感染控制杂志, 2015,14(2):98-100.
 - 30 Ibrahim F, Calmette L, Layka A, *et al.* PT, aPTT, TT and the hemostatic safety threshold of dabigatran and rivaroxaban. *Annales De Biologie Clinique*, 2016, 74(4):457-464.
 - 31 Lippi G, Favaloro E, Franchini M, *et al.* Milestones and Perspectives in Coagulation and Hemostasis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2009, 35(01):009-022.
 - 32 Li M, Jia Z, Hu Z, *et al.* Experimental study on the hemostatic activity of Tibetan medicinal herb *Lamiophlomis rotata*. *Phytotherapy Research*, 2008, 22(6):759-765.
 - 33 Blair P, Flaumenhaft R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, 2009,23(4):177-189.
 - 34 Kasirer-Friede A, Cozzi M R, Mazzucato M, *et al.* Signaling through GP Ib-IX-V activates α IIb β 3 independently of other receptors. *Blood*, 2004, 103(9):3403-3411.
 - 35 Moore S.F., van den Bosch M.T., Hunter R.W., *et al.* Dual Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) α/β by Protein Kinase C (PKC) α and Akt Promotes Thrombin-mediated Integrin α IIb β 3 Activation and Granule Secretion in Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 2012,288(6):3918-3928.
 - 36 O'Brien K A, Stojanovic-Terpo A, Hay N, *et al.* An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*, 2011, 118(15):4215-4223.

20-(S) Panoxadiol Effects PI3K/Akt/GSK3 β Signaling Pathway to Induce Platelets Aggregation to Participate in Hemostatic Process

Zhang Xu¹, Zhang Yuyao¹, Ding Yue¹, Li Jing¹, Chen Jinjin¹, Su Wenjie¹, Zhao Daqing¹, Zhang He^{1,2}

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Jilin Provincial Key Laboratory of BioMacromolecules of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. The Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

Abstract: Objective To investigate the hemostatic effect of panoxadiol (PD) and explore its mechanism. Methods *In vivo* experiments, the tail amputation model and liver scratch model experiments were used to observe the effect of PD on the bleeding time. Blood routine was investigated by blood analyzer. *In vitro* experiments, we used the coagulation analyzer detected coagulation parameters. The effect of PD on the rate of the washed platelet aggregation was observed by applying a platelet aggregometer. CD62P expression rate and PAC-1 binding rate were analyzed with a flow cytometer. Western blot analyzed the related proteins of human platelets. Results Compared with the control group, PD could significantly shorten the tail bleeding time and liver bleeding time of mice; PD significantly increased red blood cell distribution width-standard deviation (RDW-SD) and red blood cell distribution width-coefficient of variation (RDW-CV) in red blood cell parameters, and markedly increased platelet count (PLT), plateletcrit (PCT) and platelet-larger cell ratio (P-LCR) in platelet parameters. In the high- and medium-dose group, PD significantly decreased APTT; different concentrations of PD could significantly increase the content of fibrinogen (FIB). With the increase of PD concentration, the rat/human platelet aggregation rate increased dramatically, when the dose of PD was augmented to 140 μ M. The rat and human platelet aggregation rate was around 51.40% and 33.40%, respectively. PD could activate platelet to release the CD62P and increase the glycoprotein IIb/IIIa (PAC-1) expression. The results of western blot showed that PD increased phosphorylation level of PI3K, Akt and GSK3 β . Conclusion PD has a hemostatic effect. The mechanism of hemostatic effect of PD is related to activate the internal coagulation pathway and PI3K/Akt/GSK3 β

signaling pathway to induce platelets aggregation to form a blood clot to achieve hemostatic.

Keywords: 20(S)-panoxadiol, Hemostatic mechanism, Coagulation function, Platelet aggregation

(责任编辑: 周阿剑、刘玥辰, 责任译审: 周阿剑, 审稿人: 王瑀、张志华)