

脑络欣通调控 P2Y₁₂ 受体信号通路抑制血小板活化的分子机制

王佳琪¹, 贾学锋², 时 潇¹, 谢忠稳³, 王丽娜¹

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省第二人民医院康复医学科, 安徽 合肥 230011;

3. 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽 合肥 230036)

[摘要]目的 探究脑络欣通调控 P2Y₁₂ 信号通路抑制血小板活化的作用机制。方法 采用 P2Y₁ 抑制剂 MRS2179 构建 P2Y₁₂ 受体介导的血小板活化模型; 乳酸脱氢酶漏出率法检测脑络欣通对血小板的毒性作用, 筛选脑络欣通的最佳使用浓度; 血小板聚集仪检测模型复制效果和血小板聚集率; 血块收缩试验检测血小板收缩后血块比率; 流式细胞仪检测血小板活化标记物 P 选择素(P-selectin, CD62P)、血小板活化糖蛋白 II b/III a 复合物(platelet activated complex-1, PAC-1)的表达水平; 酶标仪及高内涵细胞成像仪检测 Fura-2AM 染色的血小板内 Ca²⁺ 相对荧光面积。结果 与对照组比较, 模型组血小板聚集率下降 8.34%, 血小板活化模型复制成功。与对照组比较, 模型组血块比率、血小板聚集率、CD62P 表达率和 PAC-1 表达率、Ca²⁺ 相对荧光面积差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 脑络欣通组血块比率、血小板聚集率显著下降 ($P<0.05$), 血小板活化标记物 CD62P、PAC-1 表达率显著下降 ($P<0.05$), 其膜内 Ca²⁺ 相对荧光面积显著减少 ($P<0.05$), 即 Ca²⁺ 浓度显著下降。结论 脑络欣通抑制血小板活化的作用机制可能是通过 P2Y₁₂ 信号通路调节血小板聚集和收缩功能。

[关键词]脑络欣通; 缺血性脑卒中; 血小板活化; P2Y₁₂ 信号通路

[中图分类号]R255.2; R743.31 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2025.06.015

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是高致死率和高致残率的疾病。动脉内膜受损导致血小板活化因子产生增多, 介导血小板活化并在受损局部黏附、聚集, 形成血栓, 是脑卒中的发病机制之一^[1]。血小板活化后释放二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP), ADP 激活血小板表面的 G 蛋白偶联受体 P2Y₁ 和 P2Y₁₂。其中 P2Y₁₂ 与 Gi 蛋白偶联, 激活磷脂酶 C, 扩大和稳定血小板聚集效应。因此, 抑制 P2Y₁₂ 受体活性是抑制血小板聚集的关键环节^[2]。

新安王氏内科结合中医学中风理论以及临床经验, 将中风病机概括为气虚血瘀络阻, 提出益气活血通络治法^[3], 创制了临床治疗 IS 的经验方——脑络欣通(Naoluo Xintong, NLXT)。NLXT 由黄芪、当归、川芎、红花、三七、天麻、蜈蚣组成, 具有抗炎、促进血管再生、保护神经干细胞等作用^[4-6]。课题组前期研究^[7]表明, NLXT 能够降低额顶叶皮质或缺血半暗带 P2Y₁₂ 受体信号通路中相关蛋白的表达水

平, 说明其抗血小板活化的机制可能与调节血小板膜表面受体有关, 但该方通过 P2Y₁₂ 受体信号通路治疗 IS 的机制仍未完全阐明。本研究以 P2Y₁₂ 受体介导的血小板活化模型为研究对象, 观察 NLXT 调控 P2Y₁₂ 信号通路对体外培养血小板活化的影响, 为临床合理应用与新药开发提供实验依据。

1 材料

1.1 血浆 兔富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP; 批号 B0154); 上海语纯生物科技有限公司。

1.2 药物 NLXT 组成: 黄芪 30 g, 当归、红花、天麻各 10 g, 川芎 6 g, 三七 4 g, 蜈蚣 2 条, 购自安徽中医药大学第一附属医院。将称取的药材用其体积 8 倍量的超纯水浸泡 30 min, 武火煮沸 10 min, 文火慢熬 50 min, 重复 2 次, 合并药液, 加入蜈蚣粉末, 搅拌均匀, 使用旋转蒸发仪浓缩后备用。氯吡格雷(批号 GC35710); 上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.3 试剂 MRS2179(批号 GC44249); 美国 GLP-BIO 公司; ADP(批号 A801493); 上海麦克林生化科技股份有限公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号 A020-2-2); 南京建成生物工程研究所有限公司; 凝血酶(批号 MB1368-1); 大连美仑生物技术有限公司; Fura-2 钙离子荧光探针(批号 MX4502-50UG)、抗荧光淬灭封片剂(批号 mm1401-5ML)、血小板活化糖蛋白 II b/III a 复合物(platelet activated complex-1, PAC-1)抗体 FITC

基金项目: 安徽中医药大学高层次人才支持计划项目(2021reyb012); 安徽中医药大学国家中医药管理局中医基础理论高水平重点学科开放课题(ZYJCLLYB-05); 茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金项目(SKLT0F20190117)

作者简介: 王佳琪(1998-), 女, 硕士研究生

通信作者: 王丽娜(1979-), 女, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, nanqihuang@163.com

染料(批号 340507)、P 选择素(P-selectin, CD62P) 抗体 PE 染料(AK-4)(批号 555524): 美国 BD 公司。

1.4 仪器 SpectraMax iD3 型酶标仪、Operetta CLS 型高内涵细胞成像仪: 美谷分子仪器(上海)有限公司; AggRAM 型血小板聚集仪: 美国海伦娜公司; Cytoflex 型流式细胞仪: 贝克曼库尔特公司。

2 方法

2.1 制作 P2Y₁₂ 信号通路作用的血小板活化模型 取兔 PRP 放入离心机, 4 000 r/min 离心 10 min, 淡黄色上清液即为贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP), 将其转移至 10 mL 离心管保存备用。底部沉积为血小板, 用无钙台式液洗涤 3 遍后重悬, 取 10 μ L 重悬液滴入玻璃计数板, 于高效荧光显微镜下观察, 加入 PPP 将重悬液的血小板数目调整为 $(100\sim300)\times10^9$, 制成 PRP。将 PRP 分为对照组与模型组, 每组 0.5 mL, 对照组加入 100 μ L 生理盐水, 模型组加入等量 P2Y₁ 受体拮抗剂 MRS2179 (终浓度为 100 μ mol/L)^[8], 预孵育 5 min, 制作基于 P2Y₁₂ 信号通路的血小板活化模型。两组分别加入等量激动剂 ADP (终浓度为 2 μ mol/L), 在室温 25 $^{\circ}$ C 条件下启动血小板聚集仪, 根据最大聚集率鉴定模型复制是否成功^[9]。聚集率正常范围为 45.4%~95.7%^[10], 若对照组和模型组均符合此范围, 但模型组数值更低, 则判定模型复制成功。

2.2 LDH 漏出率法检测 NLXT 对血小板的毒性作用 在模型复制成功的 PRP 中, 分别加入氯吡格雷(浓度分别为 2.5、5、10 mmol/L)、NLXT(质量浓度分别为 0.3、0.7、1.3、2.7 mg/mL), 再加 ADP 刺激活化。除上述 7 组之外, 另设空白组(PBS 缓冲液)、裂解液组(RIPA 裂解液+PRP 悬液)、对照组(PRP 悬液+ADP)、模型组(PRP 悬液+MRS2179+ADP)。设裂解液组为 LDH 漏出率最大值。每组各取 50 μ L 混合后的溶液放入 96 孔板中, 设置 3 个复孔, 按照试剂盒说明书进行操作, 用酶标仪检测 450 nm 波长下不同组吸光度(absorbance, A)值, 计算药物刺激血小板后 LDH 漏出率, 比较不同浓度药液对血小板的毒性作用, 筛选最佳药物使用浓度。LDH 漏出率 $=[(\text{处理组 A 值}-\text{空白组 A 值})/(\text{裂解液组 A 值}-\text{空白组 A 值})]\times100\%$ 。公式中处理组指的是对照组、模型组和 7 个不同浓度药物组。

2.3 光比浊法检测 NLXT 对血小板聚集功能的影响 根据“2.2”项实验结果, 选用对血小板膜无毒性

伤害的 5 mmol/L 氯吡格雷和 0.7 mg/mL NLXT 处理模型复制后的 PRP, 将其分为 4 组: 对照组, 模型组, 5 mmol/L 氯吡格雷组, 0.7 mg/mL NLXT 组。37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后, 予等量激动剂 ADP (终浓度为 2 μ mol/L), 在室温 25 $^{\circ}$ C 条件下运行血小板聚集仪。比较各组血小板聚集率, 观察 NLXT 对血小板聚集功能的影响。

2.4 血块收缩试验观察 NLXT 对血小板收缩功能的影响 将制备的 PRP 随机分为 4 组, 分组处理同“2.3”项, 各组溶液充分混合。每组吸取 300 μ L 溶液加入平底玻璃试管中, 放入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱, 静置孵育 10 min 后取出, 再加入 30 μ L CaCl₂ (终浓度为 25 mmol/L)、50 μ L 红细胞、100 μ L 凝血酶(终浓度为 1 U/mL)。每隔 30 min 拍照记录, 试验期间始终将平底玻璃试管放在 37 $^{\circ}$ C 恒温箱静置孵育。用 Image J 软件导入不同时间点的血块图片, 统计血块收缩前后的面积。血块比率 $=(\text{收缩后血块面积}/\text{收缩前血块面积})\times100\%$ 。

2.5 流式细胞仪检测 NLXT 对血小板活化标记物 CD62P、PAC-1 表达水平的影响 将制备的 PRP 悬液随机分为 5 组: 静置组、对照组、模型组、5 mmol/L 氯吡格雷组、0.7 mg/mL NLXT 组。在各组中加入等量 PE 和 FITC 染料, 分别标记血小板膜表面受体 CD62P 和 PAC-1。避光染色 3 h 后, 静置组加入等量生理盐水, 对照组、模型组、5 mmol/L 氯吡格雷组、0.7 mg/mL NLXT 组加入激动剂 ADP 刺激活化。每组设 3 个复管, 另设 1 个不染色的空白管、1 个单染 PE 管、1 个单染 FITC 管, 作为阴性细胞群定位标志。各组静置 30 min 上机, 启动流式细胞仪吸取血小板(每组吸取血小板 1×10^4 个), 以阴性细胞群定位, 观察 B585 通道上 CD62P 抗体和 B525 通道上 PAC-1 抗体的表达, 导出数据。将实验文件导入 Flowjo 软件, 分析血小板荧光染色情况, 计算血小板活化后 CD62P、PAC-1 表达率。

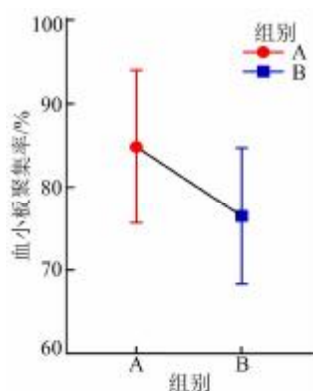
2.6 酶标仪及高内涵成像仪检测 NLXT 对血小板内 Ca²⁺ 浓度的影响 将制备的 PRP 随机分为 5 组, 分组同“2.5”项, 各组溶液充分混合。每组吸取 40 μ L 溶液加入 96 孔板中, 设置 3 个复孔, 用 20 μ L Fura-2AM (浓度为 10 μ mol/L) 标记血小板中的 Ca²⁺, 另加 100 μ L 防淬灭剂、20 μ L F-127 确保 Fura-2AM 染色效果。避光孵育 2.5 h 后, 每孔加入 100 μ L 磷酸盐缓冲溶液稀释。考虑到 Fura-2AM 可能在 352 nm 的蓝色荧光通道中出现反向染色, 即 Ca²⁺ 浓度越高时蓝色荧光越弱, 因此除静置组

外,每组在加 ADP 刺激活化前后,各在 352 nm 处检测 1 次荧光强度,结果用相对荧光单位(relative fluorescence unit,RFU)表示,通过对比血小板活化前后 RFU 变化来反映荧光强度变化,验证 Fura-2AM 是否出现荧光偏移。酶标仪检测完成后,调整高内涵镜头摄像数目为 2,选用 20×长滤镜的宽度目镜观察,采用 50 μm 共聚焦狭缝模块,用 352 nm 通道接收 Fura-2AM 荧光,加 ADP 刺激活化 5 min 后,将 96 孔板放入观察舱,拍照记录各组血小板荧光图像。再将图像导入 Image J 软件,计算相对荧光面积用来表示各组 Ca^{2+} 浓度的差异。相对荧光面积=(荧光部分的面积/整张图的面积) $\times 100\%$ 。

2.7 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.5 软件对实验所得数据进行统计学分析,数据以“均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,每种实验重复 3 次及以上。采用单因素方差分析对数据进行分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 制作 P2Y₁₂ 信号通路作用的血小板活化模型 MRS2179 处理后的血小板聚集率比对照组降低了 8.34%,说明 MRS2179 阻断 P2Y₁ 受体通路后抑制了血小板聚集,模型复制成功。见图 1。两组血小板聚集率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明血小板仍然可以与其他受体结合实现活化及聚集。在此基础上,用不同浓度的 P2Y₁₂ 拮抗剂氯吡格雷、NLXT 处理模型血小板,进行下一步实验。

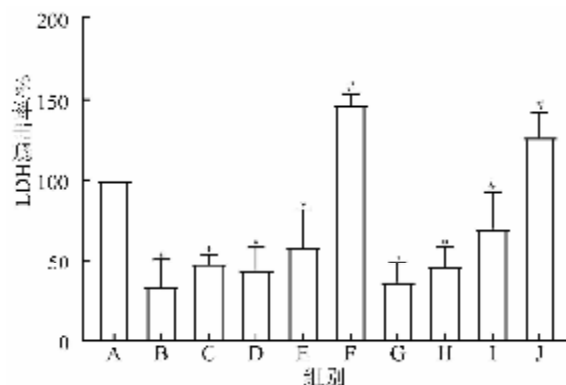


注:A. 对照组;B. 模型组

图1 MRS2179 对血小板聚集的抑制作用($n=3, \bar{x}\pm s$)

3.2 不同浓度药物对血小板膜的毒性作用 LDH 漏出率能反映血小板膜的完整性,设裂解液组的 LDH 漏出率为 100%。不同浓度的氯吡格雷或 NLXT 处理模型血小板后,与裂解液组比较,10 mmol/L 氯吡格雷组、1.3 mg/mL NLXT 组、2.7

mg/mL NLXT 组 LDH 漏出率差异无统计学意义($P>0.05$),说明药物毒性作用明显,损伤血小板膜;与对照组比较,0.3 mg/mL NLXT 组、0.7 mg/mL NLXT 组、5 mmol/L 氯吡格雷组的 LDH 漏出率有所增加,但差异无统计学意义($P>0.05$),说明 5 mmol/L 及以下浓度的氯吡格雷、0.7 mg/mL 及以下浓度的 NLXT 对血小板膜无毒性作用。见图 2。

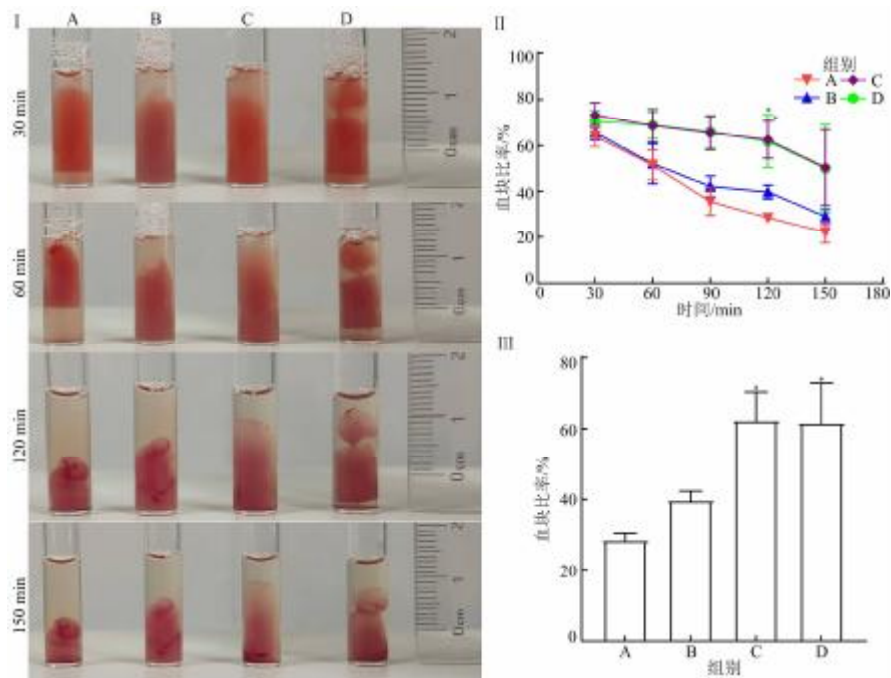


注:A. 裂解液组;B. 对照组;C. 模型组;D. 2.5 mmol/L 氯吡格雷组;E. 5 mmol/L 氯吡格雷组;F. 10 mmol/L 氯吡格雷组;G. 0.3 mg/mL NLXT 组;H. 0.7 mg/mL NLXT 组;I. 1.3 mg/mL NLXT 组;J. 2.7 mg/mL NLXT 组;与裂解液组比较,* $P<0.05$;与对照组比较,# $P<0.05$

图2 不同浓度的氯吡格雷、NLXT 对血小板膜的影响($n=3, \bar{x}\pm s$)

3.3 NLXT 抑制 P2Y₁₂ 受体介导的血小板收缩功能 根据 LDH 漏出率法的检查结果,选用对血小板膜无毒性作用的 5 mmol/L 氯吡格雷和 0.7 mg/mL NLXT 处理模型复制后的 PRP。随着时间的变化,各组血块比率差异逐渐显著,见图 3 I。在 120 min 时,与对照组比较,氯吡格雷、NLXT 处理后的血块比率显著升高($P<0.05$);与对照组比较,各时间点的模型组血块比率差异均无统计学意义($P>0.05$),说明 P2Y₁ 受体被阻断后,血小板仍可通过其他途径发挥血块收缩功能。见图 3 II。氯吡格雷和 NLXT 对 P2Y₁₂ 介导的血小板血块收缩功能均有显著的抑制作用($P<0.05$)。见图 3 III。

3.4 NLXT 抑制 P2Y₁₂ 受体介导的血小板聚集 与对照组比较,模型组血小板聚集率差异无统计学意义($P>0.05$),5 mmol/L 氯吡格雷组、0.7 mg/mL NLXT 组血小板聚集率显著降低($P<0.05$);结果表明,血小板在 P2Y₁ 通道被阻断后,仍可通过其他途径与 ADP 反应发挥聚集功能;在 P2Y₁ 通道被阻断后,氯吡格雷、NLXT 可以有效抑制 P2Y₁₂ 受体介导的血小板聚集。见图 4。



注: A. 对照组; B. 模型组; C. 5 mmol/L 氯吡格雷组; D. 0.7 mg/mL NLXT 组; 与对照组比较, * $P < 0.05$; I. 4 组 150 min 内血块收缩变化图; II. 4 组血块比率随时间变化折线图 ($n=5, \bar{x} \pm s$); III. 120 min 后 4 组血块比率比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

图 3 4 组血小板收缩功能比较

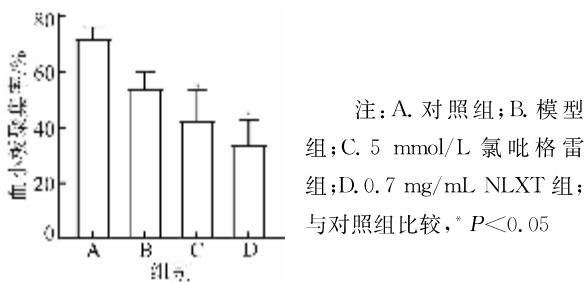


图 4 4 组血小板聚集率比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

3.5 NLXT 抑制 P2Y₁₂ 受体介导的血小板活化标记物 CD62P、PAC-1 的表达 血小板活化后, PAC-1 在血小板表面的表达水平迅速增加。与静置组比较, 对照组 CD62P、PAC-1 表达率均显著升高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 模型组 CD62P、PAC-1 表达率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 5 mmol/L 氯吡格雷组、0.7 mg/mL NLXT 组 CD62P、PAC-1 表达率显著降低 ($P < 0.05$)。结果表明, 当阻断 P2Y₁ 受体通路时, 血小板仍然可以与其他受体结合, 在 ADP 的刺激下活化; 继续阻断 P2Y₁₂ 受体信号通路后, 血小板活化率显著降低, NLXT 能够抑制 P2Y₁₂ 受体介导的血小板活化标记物 CD62P、PAC-1 的表达。见图 5、图 6。

3.6 NLXT 降低 P2Y₁₂ 介导的血小板胞浆游离 Ca^{2+} 浓度 酶标仪检测结果可见, 与未活化状态比较, 不同处理组的 RFU 均在活化后升高, 说明用 Fura-2AM 标记血小板内 Ca^{2+} , 荧光强度随 Ca^{2+} 浓

度升高而增强, 未出现荧光偏移, 可继续进行实验。见图 7。高内涵细胞成像仪检测结果可见, 与静置组比较, 对照组 Ca^{2+} 相对荧光面积显著增加 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 5 mmol/L 氯吡格雷组和 0.7 mg/mL NLXT 组 Ca^{2+} 相对荧光面积显著减少 ($P < 0.05$)。结果表明, 在 P2Y₁ 通路被抑制后, NLXT 通过 P2Y₁₂ 信号通路使血小板胞浆游离 Ca^{2+} 浓度降低, 从而抑制血小板的聚集。见图 8。

4 讨论

IS 发病的核心环节是脑血管局部阻塞, 导致供血不足。血小板活化因子在脑血管破损后大量释放, 出现血小板聚集效应, 最终形成血栓。研究^[11]表明, ADP 在血管受损后大量释放, 激活血小板活化嘌呤能受体 P2Y₁ 和 P2Y₁₂, 两者协同诱导血小板 α 颗粒的释放和血小板膜糖蛋白 CD62P、PAC-1 的表达。有研究^[12]发现, ADP 激活 P2Y₁₂ 受体后, 环磷酸腺苷含量增加, 抑制 Ca^{2+} 向血小板内释放, 抑制血小板聚集。由此可见, P2Y₁₂ 受体信号通路介导血栓的形成和稳定, 这使得 P2Y₁₂ 受体拮抗剂成为临床上治疗血栓性疾病的常用药物^[13]。

IS 可归属于中医学“中风”范畴, 气虚血瘀络阻是其主要病机。新安王氏内科创制的 NLXT 方是临床治疗 IS 的经验方, 具有益气、活血、通络之功。有研究者^[14-15]观察了脑梗死急性期气虚血瘀证患者的治疗情况, 发现 NLXT 颗粒具有抗炎、抗脂质氧

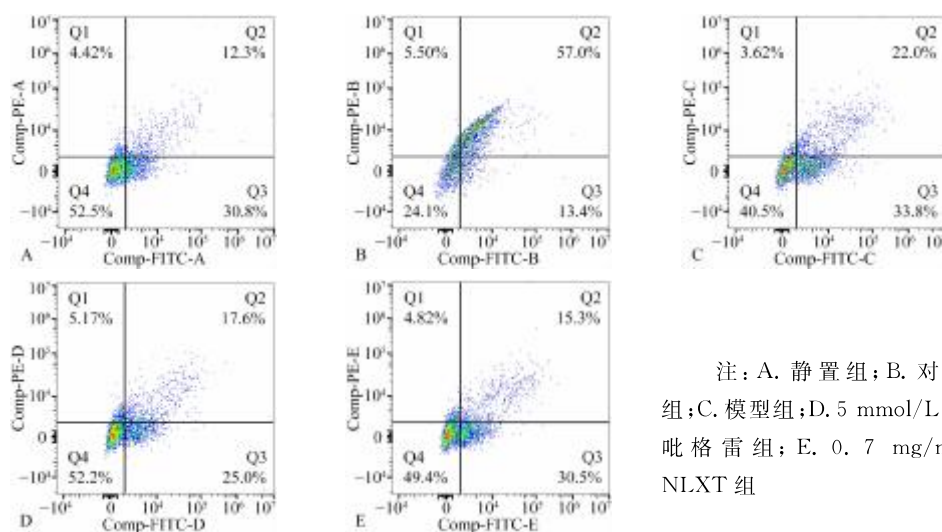
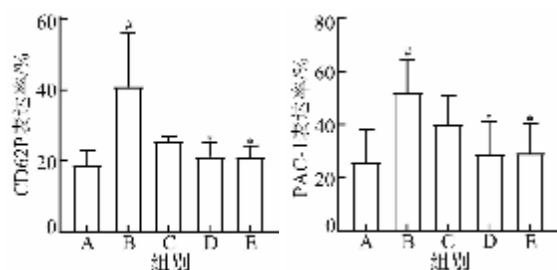
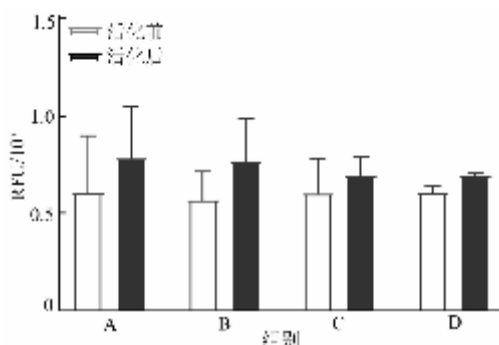
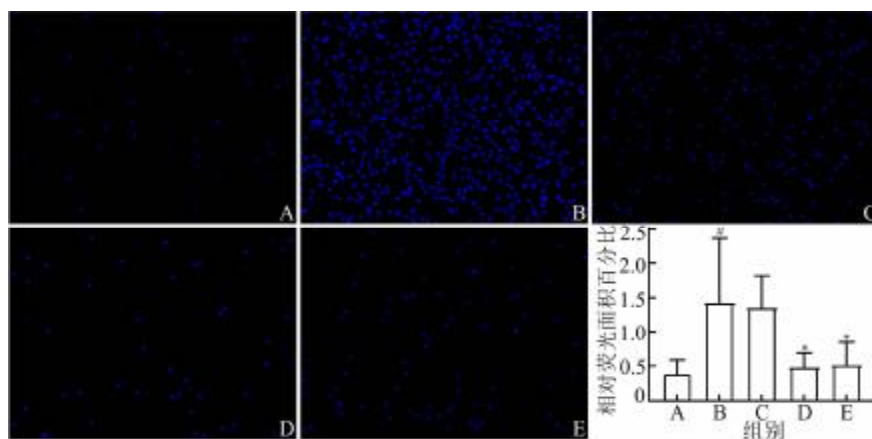


图5 5组血小板CD62P、PAC-1抗体染色流式图

图6 5组血小板CD62P、PAC-1表达率比较($n=4, \bar{x} \pm s$)
注:A. 静置组;B. 对照组;C. 模型组;D. 5 mmol/L 氯吡格雷组;E. 0.7 mg/mL NLXT 组;与静置组比较, $^{\#} P < 0.05$;与对照组比较, $^{*} P < 0.05$ 图7 4组血小板活化前后相对荧光强度比较($n=3, \bar{x} \pm s$)
注:A. 对照组;B. MRS2179 模型组;C. MRS2179 + 5 mmol/L 氯吡格雷组;D. MRS2179 + 0.7 mg/mL NLXT 组图8 5组血小板 Ca^{2+} 浓度比较(免疫荧光染色, 10×20 倍; $n=7, \bar{x} \pm s$)
注:A. 静置组;B. 对照组;C. 模型组;D. 5 mmol/L 氯吡格雷组;E. 0.7 mg/mL NLXT 组;与静置组比较, $^{\#} P < 0.05$;与对照组比较, $^{*} P < 0.05$

化,缓解神经功能损伤的作用。近年来研究^[16-17]表明,NLXT作用于大鼠脑微血管内皮,促进血管再生,通过抑制线粒体损伤实现神经保护。NLXT方中黄芪益气升提,与当归配伍,补血活血。谢雯

等^[18]研究发现,黄芪多糖能影响慢性血栓栓塞性肺动脉高压大鼠凝血功能,抑制血小板活性。麻邵契等^[19]研究表明,当归多糖能干预内源性凝血系统,延长凝血酶活化时间。川芎、红花配伍,活血散瘀。

现代研究^[20]发现,川芎嗪可减少 CD62P 的释放,解聚已形成的血栓。刘倩倩等^[21]研究发现,红花水提物可降低急性血瘀大鼠的血小板聚集率和全血黏度,减少血栓形成。三七是临床常用的止血药,王贻琳等^[22]研究表明,三七总皂苷可抑制 Ca^{2+} 内流,进而影响血小板聚集。天麻在临床上多取其祛风通络之功,但叶芮含等^[23]研究发现,天麻提取物可延长凝血时间,同样具有抗血栓的作用。蜈蚣是搜风通络药的代,“凡气血凝聚之处皆能开之”,研究^[24]显示,蜈蚣提取液能够改善局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带组织形态和脑红蛋白表达。本研究采用光比浊法和血块收缩试验观察血小板聚集功能和收缩能力。光比浊法是检验血小板聚集功能的金标准,在 PRP 中加 ADP 刺激活化,血小板凝块出现后管内溶液浊度逐渐降低,透射光强度逐渐增强,形成 5 min 内折线变化图,其中最高透射光强度即为血小板聚集率^[25]。血块收缩试验即在 PRP 中加入 Ca^{2+} 和凝血酶后,血小板边缘出现伪足,连接到纤维蛋白束上,呈向心性收缩,纤维蛋白网眼缩小,血块收缩^[26],由此计算得出的血块比率能反映血小板收缩能力。与模型组比较,NLXT 干预后的血小板聚集率和收缩功能受到显著抑制。进一步研究 NLXT 对 P2Y12 信号通路调节的作用机制,结果显示,由 P2Y12 受体介导的血小板活化后,其膜表面蛋白 CD62P、PAC-1 表达水平下降,膜内 Ca^{2+} 浓度显著下降,即 NLXT 通过 P2Y12 信号通路升高血小板中环磷酸腺苷水平,激活蛋白激酶,使蛋白磷酸化,兴奋钙泵并抑制 Ca^{2+} 从储库中释放,使血小板胞浆游离 Ca^{2+} 浓度降低,从而抑制血小板的聚集^[27]。本研究结果表明,NLXT 可通过抑制 P2Y12 信号通路削弱血小板聚集效应,抑制血小板活化,阻止血栓形成。

综上所述,血小板活化、聚集、形成血栓是 IS 发生过程中的关键环节。当 NLXT 抑制 P2Y12 信号通路时,血小板活化标志物的表达水平显著降低,血小板聚集效应减弱,因此抑制 P2Y12 信号通路可能是 NLXT 治疗 IS 的机制之一。然而,本实验仍存在一定局限性,今后计划进一步对 P2Y12 受体上游及下游的信号通路及 NLXT 在其中产生的影响进行深入研究,明确 NLXT 与 P2Y12 受体相互作用时的结合位点,为临床合理应用与新药开发提供实验依据。

参考文献:

- [1] WU L,ZHAO F,DAI M,et al. P2y12 receptor promotes pressure overload-induced cardiac remodeling via platelet-driven inflammation in mice [J]. *Hypertension*, 2017,70(4):759-769
- [2] LI X,ZHANG G,CAO X. The function and regulation of platelet P2Y12 receptor [J]. *Cardiovasc Drug Ther*, 2023,37(1):199-216.
- [3] 刘启伟,陈丽君,阚红星,等. 基于加权基因共表达网络分析探究脑络欣通调控缺血性脑卒中炎症作用及分子机制 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2024,43(6):73-79.
- [4] 谭辉,尹婷婷,邓勇,等. 益气活血中药脑络欣通促进脑缺血气虚血瘀证大鼠脑血管再生及机制 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020,36(8):712-718.
- [5] 王丽娜,曹健,朱国旗,等. 脑络欣通降低局灶性脑缺血再灌注大鼠额顶叶皮质 TLR4 及 TRAF6 和 TNF- α 蛋白的表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018,34(8):702-707.
- [6] 刘明明,张涵智,江慧慧,等. 脑络欣通方预处理的骨髓间充质干细胞外泌体促进氧糖剥夺再灌注神经干细胞增殖 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2025,44(1):102-108.
- [7] 王丽娜. 益气活血通络法对局灶性脑缺血/再灌注大鼠 P2Y12 与 SCF/c-kit 信号通路的影响 [D]. 合肥:安徽中医药大学, 2019:56-57.
- [8] 官宝怡. 川芎嗪通过 P2Y12 受体信号通路抗血小板活化的作用机制研究 [D]. 北京:中国中医科学院, 2020:48-51.
- [9] 陈莉,周坚,季文君,等. 大黄䗪虫丸中基于血小板 P2Y1 及 P2Y12 受体作用的抗血小板聚集活性成分筛选 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2022,24(8):3014-3022.
- [10] 寿玮龄,陈倩,徐雯,等. 全自动凝血分析仪检测 2 种诱导剂诱导的血小板聚集试验参考区间的建立 [J]. *临床检验杂志*, 2022,40(7):521-524.
- [11] LI F,XU D,HOU K,et al. The role of P2Y12 receptor inhibition in ischemic stroke on microglia,platelets and vascular smooth muscle cells [J]. *J Thromb Thrombolys*, 2020,50(4):874-885.
- [12] YI X,WANG Y,LIN J,et al. Interaction of CYP2C19, P2Y12, and GPIIb/IIIa variants associates with efficacy of clopidogrel and adverse events on patients with ischemic stroke [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2017,23(7):761-762.
- [13] SIROTKINA O V,LASKOVETS A B,ANDOSKIN P A,et al. Increase in GP IIb-IIIa and P2Y12 receptors in activated platelets as the possible indicator of *de novo* protein synthesis [J]. *Mol Biol*, 2016,50(1):128-135.
- [14] 陈城,张桥,杨文明. 脑络欣通颗粒对脑梗死急性期气虚血瘀证超氧化物歧化酶和丙二醛的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2018,30(3):501-504.

- [15] 李亚军,李良勇,吴云虎,等. 脑络通颗粒治疗气虚血瘀型急性脑梗死的临床疗效及对炎症因子 CRP、TNF- α 、IL-1 β 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(16):3058-3061.
- [16] 江慧慧,洪璐,刘明明,等. 脑络欣通抗缺血性脑卒中后脂质过氧化和对线粒体损伤的保护作用研究[J]. 中南药学, 2024, 22(6):1399-1405.
- [17] 秦雪梅,李佩佩,时潇,等. 脑络欣通及其拆方对右侧大脑中动脉闭塞再灌注大鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响[J]. 中医杂志, 2022, 63(12):1163-1169.
- [18] 谢雯,吴健鸿,黄芪多糖对慢性血栓栓塞性肺动脉高压大鼠的抗血栓保护作用[J]. 今日药学, 2023, 33(8):586-591.
- [19] 麻邵斐,李晓茹,吕志华,等. 当归多糖对妊娠期易栓症大鼠的抗炎作用及对凝血功能的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(3):612-617.
- [20] 张丽媛,川芎嗪、丹参素抗血小板活化作用及机制研究[D]. 天津:天津中医药大学, 2020:43-44.
- [21] 刘倩倩,王越,周婧,等. 红花对急性血瘀模型大鼠的活血化瘀作用研究[J]. 中药与临床, 2021, 12(3):62-64.
- [22] 王贻琳,李佳,刘陆,等. 三七总皂苷抑制剪切诱导血小板聚集及血栓形成的生物力药理学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(23):111-120.
- [23] 叶芮含,尚李,彭会珍,等. 5 种中药抗血栓作用对比研究[J]. 云南中医中药杂志, 2023, 44(12):67-71.
- [24] 王丽娜,贾学锋,吴生兵,等. 蜈蚣提取液对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带组织形态和脑红蛋白表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(4):74-78.
- [25] 闫小娴,余健. 应用 LTA 检测评价不同抗血小板药物对血栓性疾病患者血小板聚集功能的影响[J]. 临床医学, 2023, 43(5):97-99.
- [26] GAO D, SUN C W, WOODLEY A B, et al. Clot retraction and its correlation with the function of platelet integrin α IIb β 3[J]. Biomedicines, 2023, 11(9):2345.
- [27] ANDERSON R, THERON A J, STEEL H C, et al. ADP-mediated upregulation of expression of CD62P on human platelets is critically dependent on co-activation of P2Y1 and P2Y12 receptors [J]. Pharmaceuticals-base, 2020, 13(12):420.

(收稿日期:2024-11-27)

Molecular Mechanism of Naoluoxtong Inhibiting Platelet Activation Through the P2Y12 Signaling Pathway

WANG Jiaqi¹, JIA Xuefeng², SHI Xiao¹, XIE Zhongwen³, WANG Lina¹

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Anhui No. 2 Provincial People's Hospital, Anhui Hefei 230011, China; 3. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Resource Utilization, Anhui Agricultural University, Anhui Hefei 230036, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of action of Naoluoxtong in inhibiting platelet activation through the P2Y12 signaling pathway. **Methods** The P2Y1 inhibitor MRS2179 was used to establish a model of P2Y12 receptor-mediated platelet activation; the leakage rate of LDH was used to observe the toxic effect of Naoluoxtong on platelets and determine the optimal concentration of Naoluoxtong; a platelet aggregation instrument was used to assess the effect of modeling and measure platelet aggregation rate; the blood clot retraction test was used to measure the ratio of blood clots after platelet contraction; flow cytometry was used to measure the expression levels of the platelet activation markers P-selectin(CD62P) and platelet activated complex-1(PAC-1); a microplate reader and a high-content cell imager were used to measure the relative fluorescence area of Ca²⁺ in platelets after Fura-2AM staining. **Results** Compared with the control group, the model group had a reduction in platelet aggregation rate by 8.34%, suggesting that the model of platelet activation was established successfully. There were no significant differences between the control group and the model group in the ratio of blood clots, platelet aggregation rate, the expression rates of CD62P and PAC-1, and the relative fluorescence area of Ca²⁺ ($P > 0.05$), and compared with the control group, the Naoluoxtong group had significant reductions in the ratio of blood clots, platelet aggregation rate, the expression levels of CD62P and PAC-1 in platelets, and the relative fluorescence area of Ca²⁺ ($P < 0.05$), suggesting that there was a significant reduction in the concentration of Ca²⁺. **Conclusion** Naoluoxtong inhibits platelet activation possibly by regulating platelet aggregation and contractile function through the P2Y12 signaling pathway.

[Key words] Naoluoxtong; Ischemic stroke; Platelet activation; P2Y12 signaling pathway