

文章编号:1004-7220(2019)01-0083-08

剪切流下 VWF-A1 介导的血小板钙响应

高绪强, 刘晓玲, 吴建华, 方颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 生物力学研究所, 广州 510006)

摘要:目的 探讨血流剪切率和 VWF-A1 偶联介导的血小板钙响应。方法 以 Flou-4 AM 为胞内钙离子的荧光指示剂, 结合平行平板流动腔实验系统和荧光显微镜, 实时观测血小板在不同剪切率下流经不同浓度 VWF-A1 底板滚动、黏附后胞内钙离子浓度的变化。分析力、化学信号对钙响应强度及快慢的影响。结果 在流场条件下, VWF-A1 可特异性介导血小板的黏附并发生钙响应。血流剪切率和底板分子浓度正向调节血小板的激活比率, 反向调节钙响应的延迟时间。剪切率 500 s^{-1} 时激活比率是静息条件下的 37 倍。底板 VWF-A1 的浓度从 60 mg/L 提高到 240 mg/L , 钙响应延迟时间缩短 10 s 。结论 血流剪切率和 VWF-A1 协同调控血小板的钙响应。研究结果有助于深化对血流环境下血小板凝血止血反应过程的理解。

关键词: 血小板; 钙响应; 流体剪切率

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2019.01.013

VWF-A1-Mediated Calcium Response of Platelets under Shear Flow

GAO Xuqiang, LIU Xiaoling, WU Jianhua, FANG Ying

(Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: **Objective** To investigate the shear rate and VWF-A1-mediated platelets calcium response. **Methods** Flou-4 AM was used as the fluorescent indicator of intracellular calcium, and the intracellular calcium concentrations of adherent platelets on VWF-A1 with different concentrations at different shear rates were detected by parallel plate flow chamber system combined with fluorescence microscope. The effect of shear stress and chemical signaling on intensity and speed of calcium response was also analyzed. **Results** VWF-A1 specifically mediated platelet adhesion and calcium response under flow. The shear rate and molecular concentrations had positive regulation of platelets activation ratio and negative regulation of delay time of calcium response. Compared with static conditions, the activation ratio was increased by 37 times at shear rate of 500 s^{-1} . When the concentration of VWF-A1 was increased from 60 mg/L to 240 mg/L , the delay time of calcium response was shortened by 10 s . **Conclusions** The shear rate could modulate the calcium response of platelets in cooperation with VWF-A1. The result of this study will be helpful to deepen the understanding about the process of hemostatic reaction of platelet coagulation in bloodstream.

Key words: platelets; calcium response; fluid shear rate

收稿日期:2018-02-10; 修回日期:2018-03-26

基金项目:国家自然科学基金项目(11672109, 11432006, 11272125), 中央高校专项基金(华南理工大学 D2156960)

通信作者:方颖, 副教授, E-mail: yfang@scut.edu.cn

血管性血友病因子 (von Willebrand factor, VWF) 是最大的血浆糖蛋白, 通常以多聚体的形式存在血浆中, 由 11 个结构域组成。其中, A1 结构域上含有血小板表面受体 (glycoprotein Ib α , GPIb α) 的结合位点^[1]。生理止血过程中, GPIb α 与 VWF-A1 的相互作用是启动凝止血级联反应至关重要的第 1 步^[2], 它不仅介导血小板在血管壁面的栓缚和滚动^[3], 还诱导血小板胞内钙离子 (Ca²⁺) 和 ADP 释放, 进一步活化整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$, 引起胞外 Ca²⁺ 内流, 促使血小板稳定黏附^[4]。随着下游信号的激活, 稳定黏附的血小板会表达 P-选择素^[5], 通过 P-选择素和白细胞膜上 P-选择素糖蛋白配体-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) 相互作用, 招募并激活白细胞, 诱导白细胞整合素的构象改变^[6], 从而介导白细胞黏附到血管受损部位。

Ca²⁺ 作为胞内信号转导的第 2 信使, 是血小板活化的重要标志之一^[7], 受到人们的广泛关注^[8-9]。胞浆内 Ca²⁺ 浓度提高的来源主要有两个, 一是血小板内 Ca²⁺ (胞内钙库) 的释放, 二是外钙离子进入胞内。前者的过程为: 磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 活化水解磷酸酰肌醇 (phosphoinositide-4, 5-bisphosphate, PIP₂), 生成三磷酸肌醇 (inositol-1, 4, 5-trisphosphate, IP₃), IP₃ 激活内质网上的受体 (IP₃ receptors, IP₃R), IP₃R 作为直接的钙离子通道释放 Ca²⁺ 到胞浆中^[10]。后者涉及膜上的多种离子通路^[8, 10]。体外实验证实, 整合血小板胞内 Ca²⁺ 或添加抑制剂阻断内钙释放均抑制了外钙内流^[11-12], 说明内钙释放对血小板胞内的信号转导有着极其重要的作用。

大量的研究表明, 力信号的影响贯穿正常的生理止血和病理的血栓形成全过程。剪切力不仅通过调控 VWF-A1/GPIb α 相互作用^[3], 进而介导了血小板的流动增强型滚动黏附^[13], 还开启并调节胶原和 VWF 介导的血小板 P-选择素的表达^[5]。同样, 力信号对细胞的钙响应也有显著影响。研究表明, 流场下 I 型胶原可以介导血小板胞内两种不同类型的 Ca²⁺ 波动^[14]。本实验室研究结果也显示, 剪切率参与调节选择素介导的中性粒细胞和 HL-60 的钙响应^[15-16]。采用微流控实验技术给淋巴内皮细胞提供间歇性的剪切力, 也观测到剪切力越大, 细胞的钙响应水平越高^[17]。但有关力是如何调控

血小板钙响应, 多数研究关注于外钙的内流, 而内钙的释放却鲜有报道。

本文采用平行平板流动腔结合荧光显微镜技术, 实时观测了剪切流下 VWF-A1 介导的血小板钙响应过程, 揭示力-化学偶联调控血小板胞内 Ca²⁺ 释放。研究结果可深化理解血小板凝止血过程, 并为心血管疾病的临床治疗和康复提供新思路。

1 材料与方法

1.1 质粒、大肠杆菌、蛋白与试剂

VWF-A1 重组质粒获赠于美国贝勒医学院 Cruz 教授, 大肠杆菌 M15/DH5 α 购买于北京全式金生物公司, VWF-A1 蛋白的表达纯化工作同本实验室前期工作^[18]。三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase) 和牛血清白蛋白 (BSA) 均购买于 Sigma 公司 (美国), 荧光染料 Flou-4 AM 购买于 Invitrogen 公司 (美国), 磷酸缓冲液 (PBS) 等溶液购买于 Gibco 公司 (美国)。

1.2 流动腔底板功能化

采用规格为 20 mm \times 2.5 mm \times 0.127 mm 的流动腔腔体。将中间镂空区域为 5.0 mm \times 2.5 mm 的硅胶垫圈铺在直径为 35 mm 的圆形培养皿中间, 将 20 μ L 蛋白分子铺在工作区域, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用含 2% BSA 的 PBS 清洗底板 3 次, 移除垫圈后加入 800 μ L 含 2% BSA 的 PBS 室温孵育 1 h。

1.3 血小板提取与标记

从两周内未服用阿司匹林等药物的健康成年志愿者中, 抽取 20 mL 静脉血, 离心得到富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP)^[13], 再向 PRP 中加入 8 μ mol/L Ca²⁺ 指示剂 Flou-4 AM, 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min^[11]。同时, 用不含 2 价离子的 HEPES-Tyrode buffer (140 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、0.4 mmol/L NaH₂PO₄、10 mmol/L NaHCO₃、5 mmol/L Glucose、10 mmol/L HEPES, pH 6.5) 洗涤红细胞, 重复 3 次。标记结束后加入 5 U/mL 的 Apyrase 和 2 mmol/L 的 MgCl₂, 再加入适量的洗涤后的红细胞 (红细胞的比容维持在 0.42~0.45), 混合均匀后 1 000 g 离心 15 min, 去除上层的血浆。将下层的血小板和红细胞混合物重悬在含有丙磺舒 (probenecid, 防止 Flou-4 AM 从血小板中泄漏^[19]) 的 HEPES-Tyrode buffer (不含 Ca²⁺, pH 7.5) 中, 调整血小板的浓度到 (2~8) \times 10⁷/mL。黏附实验时直

接离心 PRP,将下层沉淀的血小板重悬在含 5% 血浆的 PBS 中。

1.4 平行平板流动腔实验

1.4.1 黏附特异性实验 用负压泵 (PHD 2000, Harvard Apparatus 公司,美国)将血小板以不同的流速灌注到空白底板和功能化的底板,20 倍显微镜下记录 5 min 内底板上黏附的血小板个数。

1.4.2 钙响应实验 将标记后的血小板灌注到功能化的底板上,在 63 倍显微镜 (Axio Observer A1, ZEISS 公司,德国)下观察黏附的血小板荧光强度变化,并采用彩色数码摄像机 (2000 R, Qimaging 公司,加拿大)以 20 帧/s 录像 3 min。用专业图像分析软件 Image Pro Plus 6.1 (Mediacy 公司,美国)分析数据。

1.5 钙响应实验相关物理量的定义和测量

1.5.1 激活比率 在不同实验条件下,以 Flou-4 AM 作为荧光指示剂,若血小板活化并胞内 Ca^{2+} 释放,其荧光强度会高于未活化的血小板。因此,统计黏附于底板发光的小血小板数目 (激活事件数) 和总黏附数目 (黏附事件数),则血小板的激活比率为:

$$\text{激活比率} = \frac{\text{激活事件数}}{\text{黏附事件数}} \times 100\%$$

1.5.2 延迟时间 血小板从黏附到底板至胞内 Ca^{2+} 浓度开始升高这段平台期的时间。

1.5.3 达峰时间 血小板荧光强度开始增强至荧光强度达到最大值这段时间。

1.5.4 半衰期 血小板荧光强度从最大值到衰减 1/2 时间。

1.5.5 相对荧光强度与荧光增加比率 血小板激活后发生钙响应所导致的荧光强度变化,反映胞内 Ca^{2+} 浓度水平。为扣除背景噪声,计算公式为:

$$\text{相对荧光强度} = \frac{\text{实际荧光强度} - \text{背景荧光强度}}{\text{背景荧光强度}}$$

荧光强度峰值与平台期荧光强度之间的差值为峰值差,则荧光增加比率为:

$$\text{荧光增加比率} = \frac{\text{峰值相对荧光强度} - \text{平台期相对荧光强度}}{\text{平台期相对荧光强度}} \times 100\%$$

1.6 数据统计分析

所有实验条件均进行 3 组独立平行实验,每组

统计的血小板数目均大于 12 个,采用均值 \pm 标准差表示。采用 t 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板与底板 VWF-A1 的特异性黏附

为了检验血小板在底板上的黏附是否为黏附分子特异性介导的,设置 3 种不同的流动腔底板:空白对照组 (PBS)、实验对照组 (2% BSA)、VWF-A1+2% BSA (VWF-A1 的浓度为 120 mg/L),按照 1.4.1 节所述的实验方法进行实验。实验结果表明,在 100 s^{-1} 剪切率下,空白对照组中血小板与底板有较强的物理黏附,黏附数高达 107 个,而实验对照组只黏附 9 个血小板,故 2% BSA 可以有效阻断血小板的非特异性黏附;与 2% BSA 底板相比,包被 VWF-A1 分子的底板上血小板黏附数目提高了 9 倍以上,两者具有显著差异 ($P < 0.01$),说明 2% BSA 不会影响 VWF-A1 与血小板间的特异性黏附。随着剪切率的提高,血小板黏附数依次减少,但组别间的差异保持不变 (见图 1)。因此,本文设计的流动腔底板功能化方案可以保证血小板在底板上的黏附是由 VWF-A1/GPIIb/IIIa 相互作用特异性介导。

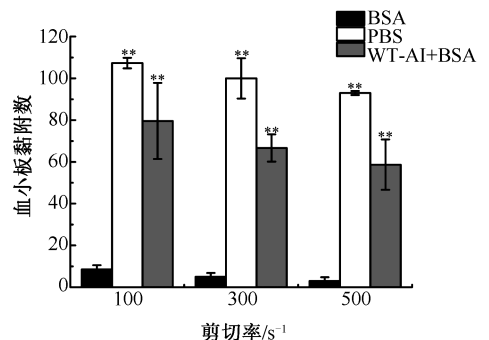


图 1 血小板与 VWF-A1 结合的特异性 (与同组 BSA 比较, $**P < 0.01$)

Fig.1 Binding specificity of platelets with VWF-A1

2.2 力触发并调控由 VWF-A1 介导的血小板活化和钙响应

为探究力是否与 VWF-A1 偶联介导血小板胞内 Ca^{2+} 的释放,观察比较静息和 500 s^{-1} 剪切率条件下血小板钙响应的差异,它们各自典型的钙响应荧光变化历程如图 2(a) 所示。流场条件下,血小板进入视窗约 4 s 后稳定黏附下来,4 (t_1 时刻) ~ 33 s (t_2

时刻)期间荧光强度有缓慢、微弱提升;33 s后(t_2 时刻)荧光强度开始迅速增强,35 s(t_3 时刻)时达到峰值;接着荧光快速下降,到38 s(t_4 时刻)时已达到峰值一半,后下降趋缓,至58 s(t_5 时刻)时荧光基本恢复到初始水平。与之形成对比,2 min内静止孵育的血小板荧光强度并没有出现类似变化过程。

为探明剪切率对VWF-A1介导血小板黏附的钙响应的影响,在 $50 \sim 500 \text{ s}^{-1}$ 范围内,让血小板以不同剪切率灌注流经底板包被有 120 mg/L VWF-A1的流动腔,首先统计分析不同剪切率条件

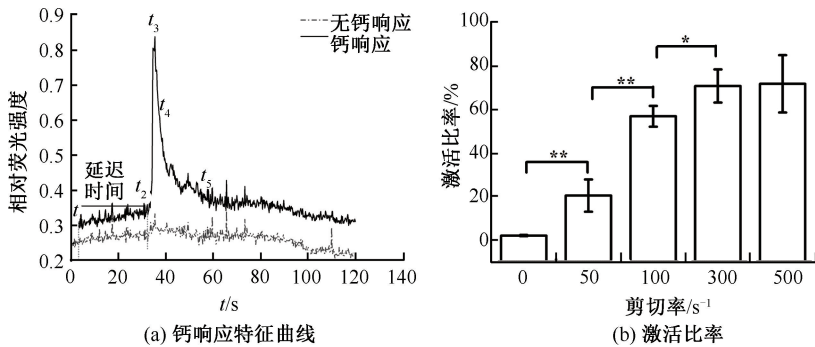


图2 静息和剪切率下血小板钙响应(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.2 Platelets calcium response under static conditions and shear rate (a) Characteristic curve of calcium response, (b) Ratio of platelets activation

接着,研究剪切率对血小板钙响应强度、延迟时间、达峰时间及半衰期等特征值的调控。由于剪切率为 50 s^{-1} 时激活比率低(20.38%),在高剪切率(1000 s^{-1})条件下血小板难以稳定黏附到底板上,故实验剪切率设定为 $100, 300, 500 \text{ s}^{-1}$,每组实验条件下观察的事件数均大于12个。由于是单细胞水平的实验数据,尽管细胞个体间的差异很大,但还是呈现了一定的趋势性。

通过检测血小板荧光强度的变化来判断胞内 Ca^{2+} 浓度的大小,荧光增加比率代表了血小板胞内增加的 Ca^{2+} 浓度,反映了钙响应的水平。在不同剪切率条件下,荧光增加比率都达到了96%以上[见图3(a)],表明血小板胞质内的 Ca^{2+} 浓度在激活后有明显的提高,且剪切率的增加对荧光增加比率几乎没有影响。当血小板黏附在底板后要经过一段平台期,钙响应才会启动,其时间的长短反映了血小板将由VWF-A1/GPIIb/IIIa接收到的外源力信号传导到胞内的快慢,是钙响应的重要特征参

数。当剪切率从 100 s^{-1} 提高到 500 s^{-1} 时,延迟时间也从27.7 s缩短到了20.8 s,力信号的增强加快了钙响应启动的速度,两者有显著差异($P < 0.05$),见图3(b)。同时,钙响应的达峰时间和半衰期也保持着相同的趋势,随着剪切率的增大而减小[见图3(c)、(d)]。

基于此,得出结论:只有经由血小板表面受体GPIIb/IIIa特异性地识别VWF-A1,同时接收到外源力学信号,才能触发血小板钙响应。随着剪切率的增加,作用在血小板上的剪切力越大,力信号强度的增加不仅提高血小板产生钙响应的比率,而且缩短延迟时间、达峰时间以及半衰期,即加速细胞内钙库的释放和回收。当血小板钙响应一旦开启,内质网中储存的 Ca^{2+} 都将释放到胞浆中,瞬间提高胞浆 Ca^{2+} 浓度。因为血小板胞内钙库的量有限,故在不同剪切率下血小板胞内增加的 Ca^{2+} 浓度差异不显著,这一实验结果验证了本研究关注的是胞内 Ca^{2+} 释放而不是外钙的内流。

下血小板的激活比率。实验结果如图2(b)所示:静息条件下激活比率只有1.94%,仅给血小板提供微弱的流场环境(50 s^{-1}),激活比率就增加到了20.38%,两者具有显著性差异($P < 0.01$); 100 s^{-1} 时激活比率是 50 s^{-1} 的2.79倍,并随剪切率的提高进一步增加;但剪切率达到 300 s^{-1} 后,其激活比率的上升趋势已趋于平缓;剪切率为 500 s^{-1} 组与 300 s^{-1} 组激活比率无统计学差异。上述结果表明:静息时血小板几乎不发生钙响应,剪切流的参与则可以显著地提高血小板的激活比率并触发钙响应。

数。当剪切率从 100 s^{-1} 提高到 500 s^{-1} 时,延迟时间也从27.7 s缩短到了20.8 s,力信号的增强加快了钙响应启动的速度,两者有显著差异($P < 0.05$),见图3(b)。同时,钙响应的达峰时间和半衰期也保持着相同的趋势,随着剪切率的增大而减小[见图3(c)、(d)]。

基于此,得出结论:只有经由血小板表面受体GPIIb/IIIa特异性地识别VWF-A1,同时接收到外源力学信号,才能触发血小板钙响应。随着剪切率的增加,作用在血小板上的剪切力越大,力信号强度的增加不仅提高血小板产生钙响应的比率,而且缩短延迟时间、达峰时间以及半衰期,即加速细胞内钙库的释放和回收。当血小板钙响应一旦开启,内质网中储存的 Ca^{2+} 都将释放到胞浆中,瞬间提高胞浆 Ca^{2+} 浓度。因为血小板胞内钙库的量有限,故在不同剪切率下血小板胞内增加的 Ca^{2+} 浓度差异不显著,这一实验结果验证了本研究关注的是胞内 Ca^{2+} 释放而不是外钙的内流。

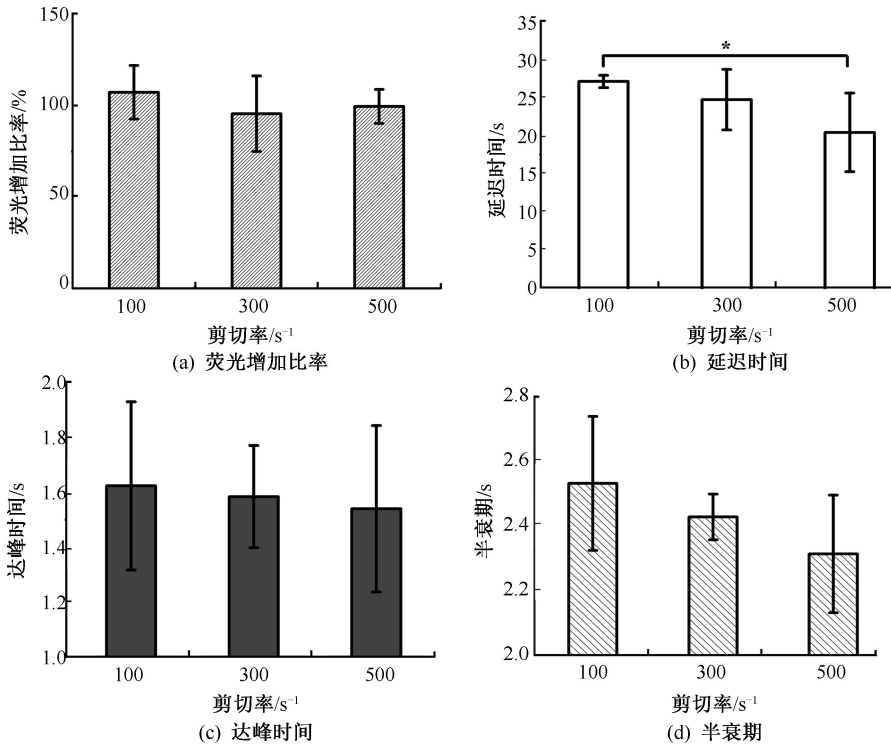


图3 不同剪切率下 120 mg/L VWF-A1 介导的血小板钙响应 (* $P < 0.05$)

Fig.3 120 mg/L VWF-A1-mediated platelets calcium response at various shear rate (a) Percentages of fluorescence increase, (b) Delay time, (c) Time to peak, (d) Full duration at half-maximum

2.3 剪切率和 VWF-A1 浓度对血小板钙响应的协同影响

为了探明剪切率和 VWF-A1 浓度对血小板钙响应的协同影响,设置实验并统计血小板在 3 组剪切率下 3 种浓度 VWF-A1 底板上发生钙响应过程的差异。结果表明,剪切率对不同浓度 VWF-A1 介导的血小板钙响应的调控是一致的。不同浓度 VWF-A1 介导的血小板钙响应延迟时间、达峰时间和半衰期均随着剪切率的增加而呈递减的趋势,同时激活比率均呈递增的趋势。

当提供 $100 s^{-1}$ 剪切率时,底板 VWF-A1 的浓度从 60 mg/L 增加到 240 mg/L 时,血小板钙响应的延迟时间从 30.1 s 缩短到 27.5 s,两者无统计学差异。提高剪切率到 $500 s^{-1}$,血小板在 60 mg/L VWF-A1 底板上黏附 23.8 s 才启动钙响应;浓度提高 1 倍后,钙响应启动时间缩短了 3 s;当浓度继续增加到 240 mg/L 时,血小板启动钙响应的的时间只需 60 mg/L 时的 58%,两者差异显著 ($P < 0.01$),见图 4(b)。在低剪切率下 ($100 s^{-1}$),3 种不同浓度的 VWF-A1 均

可以介导血小板发生钙响应,其激活比率都达到了 54% 以上,浓度间差异不显著;高剪切率下 ($500 s^{-1}$),随着底板分子浓度的增加,发生钙响应的血小板数目也在增加,浓度从 60 mg/L 提高到 240 mg/L,激活比率提高了 8%,达到 76% [见图 4(a)]。此外,钙离子的达峰时间和半衰期均在 3 s 以内完成,并随浓度的增加有减小的趋势 [见图 4(c)、(d)]。因此,增加 VWF-A1 与血小板 GPIIb/IIIa 间的相互作用可以加快外源力信号转导,加速血小板胞内 Ca^{2+} 释放。

同时,为了比较分析 VWF-A1 浓度、剪切率及其它们对血小板钙响应特征参数的协同影响,对实验数据进行双因素方差分析(见表 1)。VWF-A1 浓度对血小板钙响应的激活比率和延迟时间均有显著的影响 ($F > F_{0.05}$),而力对两者的影响极显著 ($F > F_{0.01}$),力和 VWF-A1 浓度之间的交互作用对延迟时间也有显著的影响 ($F > F_{0.05}$)。

基于上述实验结果可得出结论:剪切率和 VWF-A1 浓度协同调控血小板的钙响应,正向调节

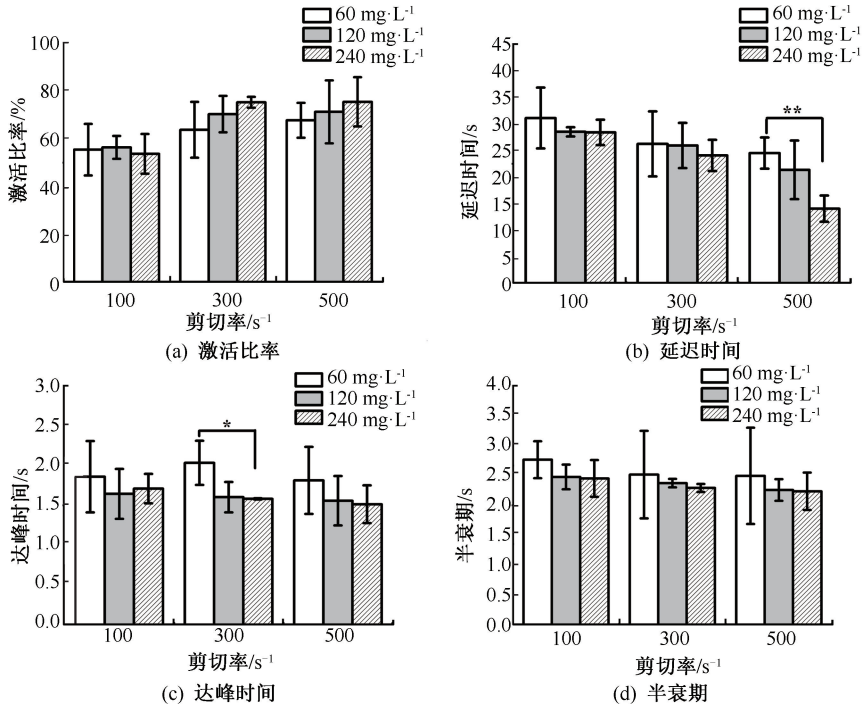


图4 力和VWF-A1的浓度对血小板钙响应影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig.4 Effect of shear rate and concentrations of VWF-A1 on calcium response of platelets (a) Ratio of activation, (b) Delay time, (c) Time to peak, (d) Full duration at half-maximum

表1 激活比率和延迟时间方差分析表

Tab.1 Variance analysis of activation ratio and delay time

| 差异源 | 激活比率 | | | | | | | 延迟时间 | | | | | | |
|--------|---------|----|---------|------------|---------|------------|------------|-----------|----|-----------|-------------|---------|------------|------------|
| | SS | df | MS | F | P 值 | $F_{0.05}$ | $F_{0.01}$ | SS | df | MS | F | P 值 | $F_{0.05}$ | $F_{0.01}$ |
| 浓度 | 0.015 9 | 2 | 0.007 9 | 4.18696 * | 0.032 1 | 3.554 6 | 6.012 9 | 94.865 6 | 2 | 47.432 8 | 7.860 6 ** | 0.003 5 | 3.554 6 | 6.012 9 |
| 剪切率 | 0.153 7 | 2 | 0.076 8 | 40.5326 ** | 0.000 0 | 3.554 6 | 6.012 9 | 369.688 1 | 2 | 184.844 1 | 30.632 6 ** | 0.000 0 | 3.554 6 | 6.012 9 |
| 浓度×剪切率 | 0.015 1 | 4 | 0.003 8 | 1.9958 | 0.138 4 | 2.927 7 | 4.579 0 | 77.685 8 | 4 | 19.421 4 | 3.218 5 * | 0.037 0 | 2.927 7 | 4.579 0 |
| 误差 | 0.034 1 | 18 | 0.001 9 | | | | | 108.616 0 | 18 | 6.034 2 | | | | |
| 总变异 | 0.218 8 | 26 | | | | | | 650.855 5 | 26 | | | | | |

血小板激活比率,反向调节延迟时间、达峰时间和半衰期。

3 讨论

鉴于VWF-A1/GPIb α 相互作用在介导循环血小板在血管壁上栓缚和滚动的重要作用,且血小板的黏附和聚集均涉及复杂的力依赖的胞内信号转导过程,而这一过程通常具有钙依赖的特性。本文观测了流场下VWF-A1介导的血小板活化的指标之一——钙响应的时程和特性,以深入探索力对血小板黏附后活化过程的调控。

实验结果显示,力是启动血小板钙响应的“钥

匙”。静息条件下发生钙响应的比率显著低于流场条件下(见图2)。这一实验结果和Yuan等^[20]研究结果一致,他们利用微细管研究了表达有GPIb α 的CHO细胞在牛VWF上的钙响应,零力条件下未检测到发生钙响应的细胞,而施加150 s⁻¹或1500 s⁻¹剪切率,均观察到了钙响应事件。但Nesbict等^[21]采用共聚焦显微镜观测抑制整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活化的血小板胞内Ca²⁺变化,结果表明,无力条件下VWF/GPIb α 相互作用也足以导致血小板胞内Ca²⁺波动,该结果与本文结论相悖。究其原因如下:①该实验采用共聚焦显微镜观测荧光,仪器的灵敏度更高,能观察到更细微的Ca²⁺波动,而未激活的血小板胞

浆中含有微量的 Ca^{2+} ; ② 该实验在含有外钙的条件下进行, 血小板细胞膜上含有 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换通道^[10], 猜测静息条件下外钙离子会经此通道进入血小板胞质, 导致胞内 Ca^{2+} 浓度的波动。

同时, 力正向调节了血小板下激活比率, 低剪切率 (50 s^{-1}) 和高剪切率 (500 s^{-1}) 的激活比率分别为 20.38%、71.82%, 相差了 51.44% [见图 2(b)]。利用人源的全长 VWF 研究血小板的钙响应, 在剪切率为 500 s^{-1} 左右时, 激活比率只有 2%~5%^[11,20], 与本文的统计结果相差较大。推测造成上述结果差异的原因是: 自然状态的 VWF 是球状结构, VWF-A1A2A3 为闭合状态, 需要在更高的剪切率下将闭合构象转变为开放状态, 暴露 A1 上 GPIIb α 的结合位点^[22], 而本文选用的分子 VWF-A1 可直接与血小板相互作用, 不需要力介导构象的转变。其随后的实验也观察到当剪切率逐步提高到 $3\ 000 \text{ s}^{-1}$, 激活比率也随之逐渐上升^[11,20], 这一结果与本文的实验结果契合。

此外, 力反向调节血小板钙响应的延迟时间、达峰时间和半衰期。这一结论也得到了相关工作的支持。P-选择素介导 HL60 细胞钙响应, 剪切力在 20、200 mPa 时的延迟时间分别为 160、100 s, 钙响应启动时间缩短了 $60 \text{ s}^{[15]}$; 采用流动腔系统研究内皮细胞在流场下的胞内钙信号, 发现达峰时间和半衰期均随着剪切率的增大而缩短^[23]; Jafarnejad 等^[17] 利用线性拟合得出淋巴内皮细胞钙信号衰减常数, 也发现衰减常数随着力的增加而减小。

4 结语

本文通过平行平板流动腔系统给血小板施加流场环境, 黏附后的血小板活化并启动钙响应具有力依赖性和 VWF-A1 浓度依赖性。研究结果有助于加深对血小板跨膜转导的力信号转导过程的了解, 为进一步探讨力对血小板黏附后活化的影响提供参考。

参考文献:

[1] COBURN LA, DAMARAJU VS, DOZIC S, et al. GPIIb α -vWF rolling under shear stress shows differences between type 2B and 2M von Willebrand disease [J]. *Biophys J*, 2011, 100(2): 304-312.

[2] VARGA-SZABO D, PLEINES I, NIESWANDT B. Cell ad-

hesion mechanisms in platelets [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(3): 403-411.

[3] YAGO T, LOU J, WU T, et al. Platelet glycoprotein Ibalph forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3195-3207.

[4] MAZZUCATO M, COZZI MR, PRADELLA P, et al. Distinct roles of ADP receptors in von Willebrand factor-mediated platelet signaling and activation under high flow. [J]. *Blood*, 2004, 104(10): 3221-3227.

[5] 刘思璐, 刘晓玲, 吴建华, 等. 流体剪应力作用下 VWF-A1A2A3 介导的血小板 P-选择素的原位表达 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(2): 188-193.

LIU SL, LIU XL, WU JH, et al. VWF-A1A2A3-mediated expression of P-selectin in platelets under flow shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(2): 188-193.

[6] 陈岱琳, 吴建华, 方颖. 流体剪应力作用下趋化因子 CXCL12 诱导的白细胞整合素 LFA-1 的激活 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(6): 548-554.

CHEN DL, WU JH, FANG Y. Shear force-induced activation of integrin LFA-1 by chemokine CXCL12 under flows [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(6): 548-554.

[7] ASSINGER A, VOLF I, SCHMID D. A novel, rapid method to quantify intraplatelet calcium dynamics by ratiometric flow cytometry [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122527.

[8] 黄玲芳, 张二云, 高波, 等. 血小板信号转导及相关抗血小板药物的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2014, 25(3): 378-383.

[9] JU L, CHEN Y, XUE L, et al. Cooperative unfolding of distinctive mechanoreceptor domains transduces force into signals [J]. *Elife*, 2016, doi: 10.7554/eLife.15447.

[10] VARGA-SZABO D, BRAUN A, NIESWANDT B. Calcium signaling in platelets [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(7): 1057-1066.

[11] MAZZUCATO M, PRADELLA P, COZZI MR, et al. Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Iba mechanoreceptor [J]. *Blood*, 2002, 100(8): 2793-2800.

[12] KERMODE JC, MILNER EP, ZHENG Q. Release from intracellular stores is responsible for calcium signaling with von Willebrand factor in human platelets [J]. *Thromb Haemostasis*, 2002, 87(4): 699-705.

[13] 杨小芳, 丁孝茹, 吴建华, 等. vWF-A1A2A3 介导循环血小板翻滚运动的机制研究 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(5): 567-573.

YANG XF, DING XR, WU JH, et al. vWF-A1A2A3-mediated rolling of circulating platelets in flows [J]. *J Med Biomech*, 2013, 28(5): 567-573.

[14] MAZZUCATO M, COZZI MR, BATTISTON M, et al. Dis-

- tinct spatio-temporal Ca^{2+} signaling elicited by integrin $\alpha 2\beta 1$ and glycoprotein VI under flow [J]. *Blood*, 2009, 114(13): 2793-2801.
- [15] HUANG B, LING YC, LIN JG, *et al.* Mechanical regulation of calcium signaling of HL-60 on P-selectin under flow [J]. *Biomed Eng OnLine*, 2016, 15(2): 637-646.
- [16] 张力, 吴建华, 方颖. 流体剪应力作用下 E-选择素介导的中性粒细胞钙响应[J]. *医用生物力学*, 2018, 33(2): 150-156.
ZHANG L, WU JH, FANG Y. E-selectin mediated-calcium response of neutrophils under fluid shear stresses [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(2): 150-156.
- [17] JAFARNEJAD M, CROMER WE, KAUNAS RR, *et al.* Measurement of shear stress-mediated intracellular calcium dynamics in human dermal lymphatic endothelial cells [J]. *Am J Physiol Heart C*, 2015, 308(7): H697-H706.
- [18] 王依璐, 刘晓玲, 丁孝茹, 等. 血管性血友病因子 A1 分子在大肠杆菌中的可溶性表达及功能鉴定[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 38(18): 6153-6159.
- [19] KERMODE JC, ZHENG Q, COOK EP. Fluorescent indicators give biased estimates of intracellular free calcium change in aggregating platelets: Implication for studies with human von Willebrand factor [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 1996, 22(3): 238-253.
- [20] YUAN Y, KULKARNI S, ULSEMER P, *et al.* The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(51): 36241-36251.
- [21] NESBITT WS, KULKARNI S, GIULIANO S, *et al.* Distinct Glycoprotein Ib/V/IX and Integrin IIb 3-dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(4): 2965-2972.
- [22] JU L, CHEN Y, ZHOU F, *et al.* Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Iba in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics [J]. *Thromb Res*, 2015, 136(3): 606-612.
- [23] SCHEITLIN CG, JULIAN JA, SHANMUGHAPRIYA S, *et al.* Endothelial mitochondria regulate the intracellular Ca^{2+} response to fluid shear stress [J]. *Am J Physiol Cell Ph*, 2016, 310: C479-C490.