

文章编号:1004-7220(2013)05-0567-07

vWF-A1A2A3 介导循环血小板翻滚运动的机制研究

杨小芳, 丁孝茹*, 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 揭示血流剪应力对 vWF-A1A2A3 介导的循环血小板翻滚行为的调控机制。方法 利用平行平板流动腔实验技术,在不同流体剪应力条件下,观察和分析血小板在铺有 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 A1A2A3 流动腔底板上的翻滚黏附行为,提取细胞滚动特征参数。结果 血小板在底板 vWF-A1A2A3 上的翻滚速度和时间、停留时间、停留频率和停留时间比率等参数均呈现双相力依赖的特性,剪应力阈值或拐点均发生在 0.8 Pa 左右;在剪切阈值水平之下,剪应力的增加可降低细胞滚动速度并增加滚动的稳定性。结论 流体壁面剪应力主要通过调节血小板在 A1A2A3 上的停留时间来影响其翻滚速度,提示相应的力学调节机制与 GPIIb/IIIa/A1A2A3 黏附键从“逆锁键”向“滑移键”的转化过程相关。

关键词: 血小板; 剪应力; 流动腔; 流动增强型黏附

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

vWF-A1A2A3-mediated rolling of circulating platelets in flows

YANG Xiao-fang, DING Xiao-ru, WU Jian-hua, FANG Ying (*Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China*)

Abstract: **Objective** To reveal the shear stress regulation mechanism on vWF-A1A2A3-mediated rolling of platelets in flows. **Methods** Platelets were perfused with various flow rates over 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vWF A1A2A3 in parallel-plate flow chamber. The rolling events of platelets near the bottom of chamber were observed and analyzed to obtain the rolling characteristics. **Results** The mean rolling velocity and time, stop frequency and fractional stop time of platelets were all found to be biphasic dependent on wall shear stress, with all the threshold/inflection points occurring under the fluid stress of 0.8 Pa. Increasing shear stress below the threshold would slow and stabilize cell rolling in flows. **Conclusions** Wall shear stress regulates velocity of A1A2A3-mediated cell rolling by adjusting the cell stop time, suggesting that a catch- to slip-bond transition serves as a mechanical regulation mechanism for platelet rolling through A1A2A3-GPIIb/IIIa interaction in flows.

Key words: Platelet; Shear stress; Flow chamber; Flow-enhanced adhesion

血小板表面受体(platelet glycoprotein Ib, GPIb)和血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)是调控血小板功能的关键黏附分子。在生理止血过程中,它们之间的相互作用是介导循环中血小板黏附到血管内皮受损部位、并启动下游级联反应关键的第1步^[1]。vWF或GPIIb/IIIa结构突变所导致两者

间反应动力学行为的失常,会引起各种出血性和血栓性疾病,如血管性血友病(von Willebrand disease, vWD)和血栓性血小板减少性紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)^[2-3]。

vWF是最大的血浆糖蛋白,通常以500~20000 kDa大小的多聚体存在于血液中。生理条件下,调

收稿日期:2013-04-11; 修回日期:2013-04-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972081, 11072080)。

通信作者:方颖,副教授, Tel:(020)39380608; E-mail:yfang@scut.edu.cn。

* 为共同第一作者

节多聚体 vWF 的大小需要金属蛋白酶 ADAMTS-13 的参与^[4-5]。每个 vWF 单体 250 kDa, 均包含 A、B、C 和 D 区 (D'-D-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2), D1-D2 区在 vWF 多聚化过程中受到弗林蛋白酶的切割, A 区 (A1A2A3) 与整合素的 I 和类 I 型区同源^[6-8], A1 区含 GPIb α 的结合位点, A2 区含 ADAMTS13 的酶切位点, A3 区含胶原 I 和 III 的结合位点^[9]。血小板表面受体 GPIb-IX-V 复合物由 GPIb α 、GPIb β 、GPIX、GPV 4 部分组成, 含有糖基化的长柄域、跨膜域和胞内域, GPIb α 的 N 端区含有 vWF 的结合位点^[10]。

血小板上 GPIb α 与 vWF-A1 的黏附反应表现出类似选择素的生物物理性质: 既有较快的结合速率, 能将血小板从高速流动的血液中捕获到受损的血管壁; 又有较快的解离速率, 以致血小板只能在管壁瞬时黏附或翻转滚动, 而不足以稳定黏附^[11-12]。同时, 与选择素介导的白细胞在发炎内皮上的滚动速度受流体剪应力调控一样^[13], 血小板在锚定有 vWF 的流动腔底部的滚动行为也随壁面剪应力的变化呈现一定的流动增强型特点, 即在一定流体剪应力范围内, 血流的增大非但没有阻止血小板的黏附, 反而使血小板黏附滚动得更加缓慢和平稳^[14-15]。迄今为止, 研究者们借助流动腔、原子力显微镜、微吸管和计算机理论模拟等手段, 从不同角度和侧面对力调节的血小板与 vWF 的反应动力学机制展开研究, 极大深化了对各种血小板功能增强性或功能失去性突变所导致血栓性及出血性疾病机理的理解^[16]。

由于平行平板流动腔实验系统比较接近真实的生理或病理条件, 除了能考察血流对细胞膜上黏附分子间相互作用的调控, 还能适度反映血管壁面效应、细胞形状和表面拓扑结构等的协同影响, 但也给测量和数据分析带来了困难。目前有关 GPIb α 与 vWF-A1 相互作用的流动腔实验的研究主要见文献 [14, 17-18], 这些工作仅关注 GPIb α 及其突变体与 vWF-A1 及其突变体的相互作用, 但实际上单体 vWF 就有 A、B、C、D 4 个结构域, 其中三联的 A1、A2 和 A3 结构域, 不仅在空间上邻近, 其功能上也有较大的关联; 但是仅文献 [18] 中对 vWF-A1A2A3 三联体介导的血小板的滚动作了粗略的分析测量。

由于血小板具有独一无二的椭圆形盘状结构, 它在管壁或流动腔底板上的运动, 不会如同白细胞

那样较有规律地滚动, 而是呈现不规则的翻转: 以长轴与来流方向成钝角的姿态与壁面黏附, 而以锐角姿态离开壁面^[19]。同时血小板的尺寸远小于白细胞, 加上不规则的翻转运动, 使得流动腔实验的数据筛选和分析极其困难。基于此, 本文利用流动腔实验技术和高速高分辨率细胞轨迹跟踪与图像处理分析技术, 研究不同流速下近壁面的血小板在铺设有 vWF 三联体 (A1A2A3) 流动腔底板上的翻转运动, 测量细胞滚动速度、翻转时间、停留时间和停留频率等参数, 旨在揭示 vWF 介导的血小板滚动黏附的力学调控机制, 进一步加深对血小板滚动黏附这一血小板发挥其凝止血功能的初始关键事件的理解。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞

A1A2A3 重组质粒获赠于 Dr. Miguel A. Cruz (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, 美国), 中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO-K1) 购于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)。

1.2 主要实验试剂

胎牛血清 (FBS)、1% 青链霉素、DMEM F12、Opti-MEM I 购于 GIBCO, 脂质体 Lipofectamine2000 和 PBS 购于 Invitrogen, HisTrapTM HP 购于 GE Healthcare, SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购于捷倍斯, 兔 IgG 抗 6 \times His 多克隆抗体 (ab9108) 和羊抗兔 IgG HRP 标记多克隆抗体 (ab6721) 购于 Abcam。

1.3 vWF -A1A2A3 的表达与纯化

A1A2A3 重组质粒转染至中国仓鼠卵巢癌细胞 (CHO-K1)。4 μ g 的 A1A2A3 重组质粒 DNA (C-端含有 6 \times His 标签) 和 10 μ L 的 Lipofectamine2000 在 500 μ L 的 Opti-MEM I 中混合, 再加入 6 孔板, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱, 培养 6 h 后更换培养基, 传代使 6 孔板中不含抗生素的 2 mL 培养基中保持 $0.5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个细胞。24 h 后, 更换为含有 500 μ g/mL 潮霉素 B 的混合培养基, 进行筛选。10 d 后, 得到稳定转染 A1A2A3 的 CHO-K1 细胞, 并将其移至培养皿中扩大培养。蛋白收集前, 再将细胞培养基更换为含有 500 μ g/mL 潮霉素 B 的 Opti-MEM I 培养基, 24 h 后收集上清 (50000 MW 超滤管 4 $^{\circ}$ C, 5 000 g 离心 15 min)。两组浓缩上清液用 10000 MW 的透析卡置于 2 L 的 Buffer A 中, 4 $^{\circ}$ C 透析过夜。透析后的

浓缩液用蛋白质分离纯化系统 AKTATMPURIFIER 进行镍柱 (HisTrap™ HP) 亲和层析,4% BufferB 3 mL/min 上样,以流速为 5 mL/min 不同浓度梯度 Buffer B 洗脱,并收集洗脱液。洗脱浓缩后的蛋白分别采用7.5% SDS-PAGE 和 Western Blot 进行检测。利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定纯化所得蛋白的浓度。

1.4 血小板的提取与纯化

选择 2 周内未服用阿斯匹林等抗生素的健康成年志愿者,每次抽取 10 mL 静脉血于 2 支 5 mL 抗凝管中,室温下 150 g 离心 15 min,离心后上层为富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP),将上层 PRP 转移至另一无菌的 15 mL 离心管中再次进行 900 g 离心 15 min,沉淀即为血小板,上清液为乏血小板的血浆 (platelet-poor plasma, PPP)。用含 5% 自体血浆的磷酸缓冲溶液 (PBS) 来稀释调整血小板的浓度至 $3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7/\text{mL}$ 。

1.5 平行平板流动腔实验

功能化流动腔底板:将浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 A1A2A3 溶液孵育在直径为 35 mm 培养皿上的 5 mm \times 2.5 mm 的区域内,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,再用含有 1% BSA 的 PBS 洗板 3 次,移除垫圈,用 800 μL 之含有 1% BSA 的 PBS 溶液填充培养皿,室温孵育 2 h。在实验中,使用负压泵 (Harvard Pump, PHD 2000) 将血小板以不同的流体剪应力灌注到底板功能化的流动腔中,利用 20 倍相差显微镜和高速摄像机 (ZEISS Axio Observer A1) 以 200 帧/s 的速度观察记录血小板的运动行为,使用 Microsoft Excel 和图像分析软件 Image Pro Plus (IPP) 分析测量数据。

1.6 翻滚速度、时间及停留时间的测量

血小板悬浮液流经流动腔底部的过程中,将经历自由输运和翻滚运动 2 个交替的过程。未与 A1A2A3 发生相互作用的血小板会高速飘过,当与 A1A2A3 发生相互作用之后,血小板将会减速,发生“快速翻转 \rightarrow 缓慢倾斜或停留 \rightarrow 快速翻转”的翻滚运动,直至因黏附键不敌流体剪切力而离开底板 (见图 1)。后一过程所经历的时间,定义为细胞接触时间,这是由于血小板与底部分子发生了相互作用。翻滚时间即细胞停留后发生加速和减速的时间段,而停留时间则为细胞的瞬时速度不高于噪声的时段,即将瞬时速度小于水动力噪声引起的血小板

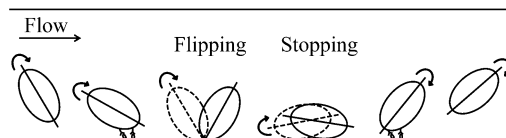


图 1 血小板在流动腔底部滚动示意图

Fig. 1 Sketch for rolling of platelets on vWF-A1A2A3

质心的波动速度定义为血小板的静止状态。

通过测量得到的血小板瞬时速度的时间历程,提取翻滚时间、停留时间和频率等参数。计算血小板的翻滚速度 v :

$$v = S/t$$

其中: t 为血小板的接触时间, S 为血小板质心在 t 时间段发生的位移。计及接触时间不小于 0.2 s 的翻滚黏附事件,每个细胞追踪记录 1.5 s,每个剪切力进行 4 组独立平行实验,每组翻滚事件数约为 100。

2 结果

2.1 血小板与底板上 vWF A1A2A3 的特异性黏附

为鉴定血小板在流动腔底板上的黏附翻滚确实是由血小板上 GPIIb α 与 vWF A1A2A3 的特异性作用介导的,特设下列对照实验:

实验组:按 1.5 节所述方法,底板铺有 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vWF A1A2A3;实验对照组:底板仅用 800 μL 1% BSA 的 PBS 溶液填充,温育 2 h 后倒去;空白对照组:底板不做任何处理。将血小板分别灌注到 3 组底板不同的流动腔中,在 0.1、0.8 和 2 Pa 3 个剪切应力下,观察记录 1 min 之内在底板上发生翻滚行为 of 血小板的个数。每个剪切力下进行 3 组独立平行实验。

结果发现,流动腔底部的功能化显著增加了血小板的滚动黏附事件 (见图 2)。不仅实验组与 2 个对照组之间,而且 2 个对照组本身之间,均存在血小板黏附事件数的显著性统计学差异 ($P < 0.01$)。表明 BSA 能够有效阻断血小板与底板的非特异性相互作用,但不会影响血小板与 A1A2A3 之间的特异相互作用。因此,本研究设计的流动腔功能化方案,可以保证血小板在底板上的滚动黏附是特异地由 A1A2A3 所介导。

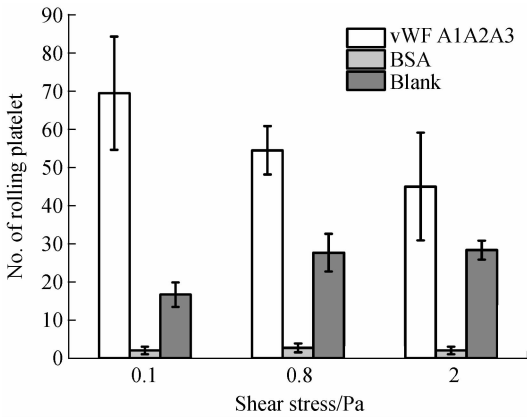


图2 血小板与 vWF A1A2A3 结合的特异性

Fig.2 Binding specificity of platelet with vWF A1A2A3

2.2 血小板的翻滚速度

实验发现,在低剪切流下,血小板翻转运动的不规则性与近壁面水动力噪声在同一量级,很难甄别细胞是否与底部分子发生相互作用;而在高剪切流下,血小板会随流高速飘过,很难与腔底有接触的机会,因此根据预实验,将剪切应力范围设定为 0.1 ~ 2 Pa。结果表明,细胞翻滚速度与剪切应力的关系

呈现非单调的两相性:随着流体剪应力的升高,翻滚速度先减小后增大,在流体剪应力为 0.8 Pa 时,速度达到最小值(见图 3(a))。说明当剪应力低于最佳值 0.8 Pa 时,血小板的翻滚随着力的增大变得更加缓慢,呈现出流动增强型滚动黏附的特点,而一旦剪应力高于 0.8 Pa,翻滚速度随着流体剪应力的增大而逐渐增大,流动增强型现象消失。

为了验证流体剪切应力对血小板翻滚稳定性的影响,选取 0.1、0.8、2 Pa 3 个不同的流体剪应力,统计血小板平均翻滚速度的分布情况(见图 3(b))。总体而言,3 个不同剪切力条件下的血小板翻滚速度,主要分布于 1 ~ 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ 的区间内,占 70% 以上,速度大于 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ 的黏附事件数已很少。但翻滚速度为 1 ~ 5 $\mu\text{m}/\text{s}$, 0.8 Pa 组(60%)要显著高于 0.1 Pa 组(37%)和 2 Pa 组(40%) ($P < 0.05$);相应地,较之 0.1 和 2 Pa 这 2 个剪应力而言,0.8 Pa 组的翻滚速度位于其他区间段的频率均较小。表明随着流体剪切力的增大,翻滚速度慢的细胞先增多后减少,从而使平均翻滚速度呈现先减小后增大的趋势。

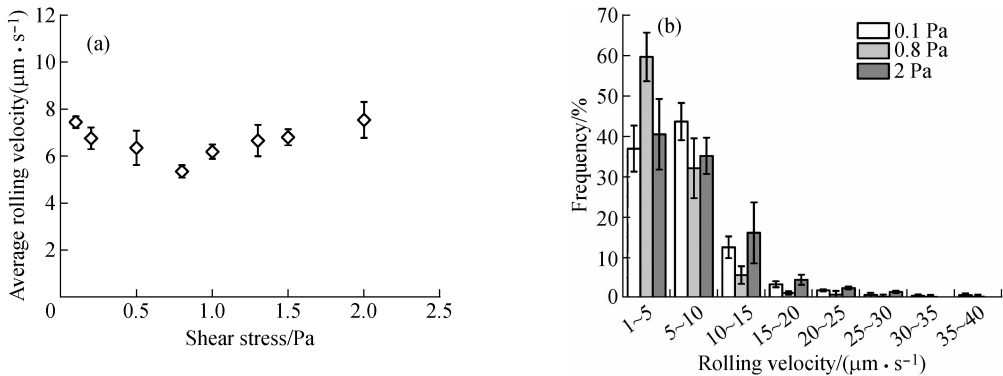


图3 不同剪应力条件下 A1A2A3 介导的血小板翻滚运动的平均速度(a)和分布(b)

Fig.3 Mean velocities (a) and velocity distribution (b) for platelets rolling on A1A2A3 under various shear stresses

2.3 血小板在 vWF A1A2A3 上的翻滚时间、停留时间及比率、频率

图 4(a)表明,血小板翻滚时间很短,位于 40 ~ 50 ms 之间,血小板的这一快速翻滚与流体剪应力相关。当剪应力小于 0.8 Pa 时,血小板翻滚时间随着流体剪应力的增大而缩短;在剪应力大于 0.8 Pa 时,随着剪应力的进一步提高,翻滚时间基本持平。

停留时间随剪应力也呈现出两相:随流体剪应力的上升先增大,再减小;与翻滚速度随剪应力变化趋势(见图 3(a))相反,转折点相近,在 0.8 Pa 处。当剪应力小于 0.8 Pa 时,剪应力的增大可能促进了血小板与 A1A2A3 的反应,也可能增强了 GPIIb α /A1A2A3 的黏附键,使键的生存时间更长,从而导致血小板的滚动时间缩短、停留时间变长,直至剪应力

到达其最佳值;随着剪应力的进一步增加,力的增大有利于 GPIb α /A1A2A3 键的解离,导致血小板停留时间的缩短。

如所预期,停留频率(1 s 内黏附翻滚的细胞处于停止状态的次数)随剪应力的变化趋势与停留时间相反,随着剪应力的增加,停留频率先降低后上

升,转换点亦发生于最佳剪应力 0.8 Pa 处。停留时间比率(总停留时间占总统计时间的比率,即平均停留时间和停留频率的乘积)随剪应力的变化趋势与停留时间基本一致,最高的停留时间比率出现在 0.8 Pa 剪应力处,约为 65% (见图 4(b))。

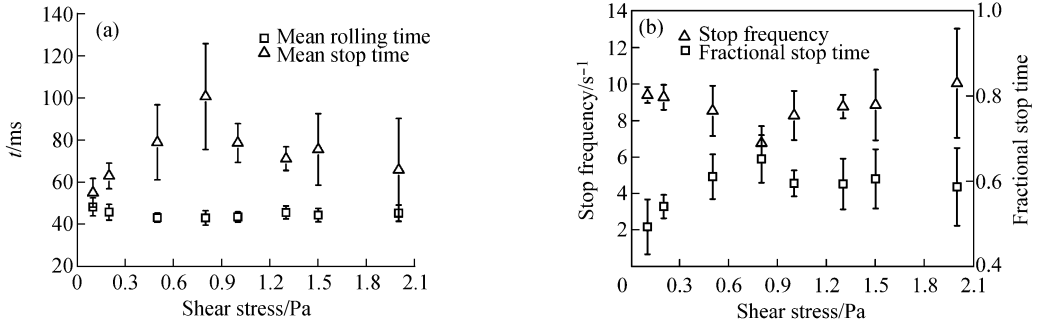


图 4 血小板在 A1A2A3 上的翻滚和停留时间 (a)、停留时间比率与停留频率 (b) 与剪切应力的关系
 Fig. 4 Mean rolling and stop time (a), stop frequency and fractional stop time (b) of platelets on A1A2A3 under various shear stresses

2.4 血小板在不同流体剪应力时的翻滚时间和停留时间的分布

为更清晰了解分析血小板的翻滚过程,针对 0.1、0.8、2 Pa 3 个不同的流体剪应力状态,统计分析血小板平均翻滚时间和停留时间的分布情况(见图 5)。结果表明,在 0.1、0.8、2 Pa 壁面剪切力下,翻滚时间都集中分布于 30 ~ 50 ms 时间段之内;尽管平均翻滚时间会随着剪应力的增大呈现出先减小后持平的趋势,但变化范围狭窄,且各个剪应力下翻滚时间的分布情况是大致相同的,故剪应力对翻滚时间(分布)的影响不显著(见图 5(a))。

与之不同,血小板停留时间的分布显著依赖于剪应力环境(见图 5(b)),不同剪切应力情形下 90% 的停留时间均分布于 0 ~ 200 ms 这一时间区间,显示出一种力依赖的、快速的、血小板解离特性。当剪应力为 0.8 Pa 时,44% 的停留时间处于 0 ~ 50 ms 的时间区间,低于相邻 0.1 和 2 Pa 组(均在 60% 附近),其中显著低于 0.1 Pa 组($P < 0.05$); 50 ~ 100 ms 时间段,3 组基本持平,没有统计学差异;而在 100 ~ 200 ms 时间段,0.8 Pa 组要高于相邻组,其中显著高于 0.1 Pa 组($P < 0.05$)。

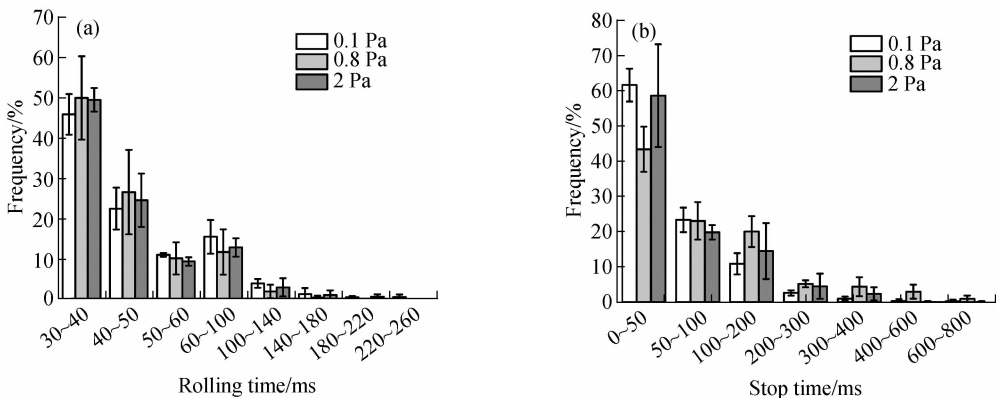


图 5 不同剪应力条件下血小板在 A1A2A3 上的翻滚时间 (a) 与停留时间 (b) 的分布
 Fig. 5 Distributions of rolling (a) and stop (b) time of platelets on A1A2A3 under various shear stresses

上述结果表明,血流剪应力主要通过调节细胞停留时间来调控血小板的滚动黏附。当剪应力从 0.1 Pa 上升到 0.8 Pa 时,更多细胞的停留时间延长,从而使平均停留时间从不到 60 ms 增加到 100 ms 附近(见图 4(a)),而平均翻滚时间基本在 43 ~ 48 ms 之间窄幅波动(见图 5(a)),使得细胞在壁面上的翻滚运动变得缓慢而稳定;随着剪应力进一步从 0.8 Pa 上升到 2 Pa,许多细胞的停留时间反而缩短,平均停留时间又下降到了 60 ms 附近(见图 4(a)),导致细胞在壁面上翻滚和停留的频率加快,翻滚速度上升。

3 讨论

鉴于 vWF 上三联的 A1、A2、A3 结构域空间上邻近、功能上密切相关,在血小板的初始黏附和后续级联反应中会发挥协同作用,本文通过流动腔研究了流体剪应力是如何调控 GPIIb α 和 A1A2A3 相互作用介导的血小板滚动行为。在 0.1 ~ 2 Pa 的流体壁面剪应力范围内,观察发现到类似于选择素介导的白细胞滚动,随着剪应力的增加,血小板在功能化的流动腔底部上的滚动,将经历一个先减速后加速的过程;流体剪应力为 0.8 Pa 时,翻滚速度达到其最小值(见图 3(a))。本研究测得的 0.8 Pa 的剪应力阈值水平与 Coburn 等^[18]的结果相吻合,尽管该剪应力阈值所对应的最小翻滚速度要小于 Coburn 等的结果。速度差异也许源于本实验中 A1A2A3 三联体浓度为 Coburn 等^[18]实验的 2 倍,也可能源于他们观察到的事件数太少(10 ~ 36),使得其实验数据存在偏倚。

本实验结果表明,在剪应力阈值(0.8 Pa)前,剪应力的增加将减少停留事件的发生,即降低停留频率,这不利于降低细胞的翻滚速度和细胞黏附。但是,剪应力的增加将显著延长翻滚细胞的停留时间,导致细胞翻滚时间周期内的停留时间比率随剪应力的增加而增加,进而呈现出剪应力对滚动速度的负向调节作用。与之相反,在剪应力阈值(0.8 Pa)后,剪应力的提高将增加停留事件的发生,或提高停留频率,这将促进细胞的黏附,降低细胞的翻滚速度。然而,剪应力的增加显著缩短翻滚细胞的停留时间,使得细胞翻滚时间周期内的停留时间比率随剪应力的增加而减少,导致剪应力呈现出对滚动速度的正

向调节作用。

上述双向力学依赖的血小板翻滚运动的行为特征可能受到 GPIIb α /A1A2A3 黏附分子键的受力解离特性的调节。在单 GPIIb α /A1A2A3 黏附分子键介导的细胞翻滚事件中,细胞翻滚时间始于旧黏附分子键的断裂,终结于新黏附分子键的生成。提示细胞翻滚时间越短,黏附分子的正反应速率越大。本研究结果表明,剪应力对细胞平均翻滚时间的调节是不显著的(见图 4),这意味剪应力对细胞滚动的调节主要是通过对细胞停留时间或黏附分子键的生存时间来实现。虽然,本文提供的实验数据并不能直接反映单键行为,但是可以认为平均停留时间与键的生存时间成正比,说明血小板翻滚受到 GPIIb α /A1A2A3 黏附分子键由逆锁键转化为滑移键的调节。

Coburn 等^[18]测量了不同剪应力下血小板在野生型 A1 上滚动的平均停留时间和滚动时间,所测定的滚动时间维持在 10 ms 左右,最长停留时间为 60 ms,发生在 1.6 Pa 的剪应力处。与之相比,本研究结果表明,血小板在野生型 A1A2A3 三联体上滚动的平均停留时间和滚动时间都要高于在 A1 上滚动的情形。形成这些差异原因可能涉及多种因素。如三联体之 A1、A2 和 A3 结构域在空间和功能上的关联将导致 A1A2A3 三联体与 GPIIb α 的结合亲和力小于 A1 与 GPIIb α 的结合亲和力。事实上, Martin 等^[20]证实, A1 和 A2 分子之间存在相互作用, A2 能够结合到被固定在底板上的 A1 分子上, A2 还能够阻断 GPIIb α 介导的血小板黏附过程。正是 A2 与 A1 的相互作用,使得三联体之 A1 上与 GPIIb α 结合位点的暴露概率远低于单一 A1,故对整个流动腔系统而言,血小板膜上 GPIIb α 与 A1A2A3 的结合速率会远低于与 A1 的结合速率。另一方面,通过原子力显微镜实验, Wu 等^[16]发现 GPIIb α /A1A2A3 黏附分子键的受力解离过程可能经历的两种情形:一是结合约 0.3 s 时间后,直接解离;二是结合后发生 A2 的失稳(解折叠),之后才是 A1 与 GPIIb α 键的断裂,在 20 pN 时失稳时间可长达 0.2 s,相当于直接解离时间的 66.67%。根据本实验结果,停留时间的频率分布(见图 5(b))显示在 0.8 Pa 时,确实有更多停留事件发生在 100 ~ 200 ms 及以上时间段,从而使最长平均停留时间达到 100 ms 左右(见图 5),远

高于血小板在 A1 上的最长停留时间 60 ms,增幅接近 66.67%,与原子力显微镜实验中 A2 解折叠时间比例相当。因此,血小板在 A1A2A3 三联体上停留时间的延长,可能源于部分黏附键发生了 A2 结构域失稳之故。由于 A2 结构域的失稳介导的停留时间的延长,一方面将使已暴露酶切位点的 A2 结构域有机会被金属剪切酶 ADAMTS-13 酶切,避免 vWF 的过度黏附,另一方面还会有利于 GPIb 胞内区信号的激活,从而有足够的时间通过由内向外的信号通路激活血小板膜上的整合素,实现血小板的稳定黏附^[21]。

总之,vWF-A1A2A3 介导的血小板翻滚黏附行为,可能受到双向力依赖的黏附分子键解离速率的调节,还可能和 A2 结构域的力学失稳与拉伸解折叠有关,以避免 vWF 过度黏附导致的血栓形成,并防止 vWF 不充分黏附所引起的止血功能失调。本研究阐释了血流剪应力调节 vWF 介导的血小板翻滚黏附行为的机理,这将有助于加深对血小板止血功能的认识。

参考文献:

- [1] Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(3): 403-412.
- [2] Bernthorp E. von Willebrand diseases [J]. *Pediat Blood Cancer*, 2013, 60(1): 34-36.
- [3] Gorge JN. Forecasting the future for patients with hereditary TTP [J]. *Blood*, 2012, 120(2): 243-244.
- [4] Shin Y, Akiyama M, Kokame K, et al. Binding of von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 to Lys-plasmin (ogen) [J]. *J Biochem*, 2012, 152(3): 251-258.
- [5] Sadler J. von Willebrand factor in its native environment [J]. *Blood*, 2013, 121(14): 2583-2584.
- [6] Zhou YF, Eng ET, Zhu J, et al. Sequence and structure relationships within von Willebrand factor [J]. *Blood*, 2012, 120(2): 449-458.
- [7] Arlinghaus FA, Eble JA. The Collagen-binding Integrin $\alpha 2\beta 1$ is a novel interaction partner of the trimeresurus flavoviridis venom protein flavocetin-A [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(2): 947-955.
- [8] Castro-Núñez C, Bloem E, Boon-Spijker MG, et al. Distinct roles of Ser-764 and Lys-773 at the N terminus of von Willebrand factor in complex assembly with coagulation factor VIII * [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(1): 393-400.
- [9] Karoulia Z, Papadopoulos G, Nomikos M, et al. Studies on the Essential Intramolecular Interaction Between the A1 and A2 Domains of von Willebrand Factor [J]. *Protein Peptide Lett*, 2013, 20(2): 231-240.
- [10] Li R, Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(4): 605-614.
- [11] Doggett TA, Girdhar G, Lawshé A, et al. Selectin-like kinetics and biomechanics promote rapid platelet adhesion in flow: The GPIb α -vWF tether bond [J]. *Biophys J*, 2002, 83(1): 194-205.
- [12] Doggett TA, Girdhar G, Lawshe A, et al. Alterations in the intrinsic properties of the GPIb α - VWF tether bond define the kinetics of the platelet-type von Willebrand disease mutation, Gly233Val [J]. *Blood*, 2003, 102(1): 152-160.
- [13] Li Q, Fang Y, Ding X, et al. Force-dependent bond dissociation govern rolling of HL-60 cells through E-selectin [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(14): 1649-1658.
- [14] Yago T, Lou J, Wu T, et al. Platelet glycoprotein Iba 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.
- [15] Marshall BT, Long M, Piper JW, et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules [J]. *Nature*, 2003, 423(6936): 190-193.
- [16] Wu T, Lin J, Cruz MA, et al. Force-induced cleavage of single VWF A1A2A3 tridomains by ADAMTS-13 [J]. *Blood*, 2010, 115(2): 370-378.
- [17] Kumar RA, Dong J, Thaggard JA, et al. Kinetics of GPIb α -vWF-A1 tether bond under flow: Effect of GPIb α mutations on the association and dissociation rates [J]. *Biophys J*, 2003, 85(6): 4099-4109.
- [18] Coburn LA, Damaraju VS, Dozic S, et al. GPIb α -vWF rolling under shear stress shows differences between type 2B and 2M von Willebrand disease [J]. *Biophys J*, 2011, 100(2): 304-312.
- [19] Mody NA, Lomakin O, Doggett TA, et al. Mechanics of transient platelet adhesion to von Willebrand factor under flow [J]. *Biophys J*, 2005, 88(2): 1432-1443.
- [20] Martin C, Morales LD, Cruz MA. Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Ib alpha [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(7): 1363-1370.
- [21] Du X. Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex [J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(3): 262-269.