

文章编号:1004-7220(2023)05-0917-07

·论 著·

流场中 vWF-A1介导的血小板表面 CD40L 表达

鄞梦珠¹, 姬彦儒¹, 黄文华², 方颖¹, 吴建华¹

(1. 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; 2. 南方医科大学 基础医学院, 人体解剖学教研室, 广东省医学生物力学重点实验室, 广东省医学 3D 打印应用转化工程技术研究中心, 广州 510515)

摘要:目的 揭示流场中 vWF-A1 介导血小板表面 CD40L 表达的力学调控机制。方法 选用原核系统表达蛋白、流式细胞仪、平行平板流动腔技术与细胞免疫荧光抗体染色技术, 探究在不同流体剪切力 (fluid shear stress, FSS) 环境中血小板由 vWF-A1 诱导活化和随后表达 CD40L 的过程。结果 vWF-A1 在静息条件下不会激活血小板; FSS 是 vWF-A1 介导的血小板 CD40L 表达的启动开关; 随着剪切应力累积 (shear stress accumulation, SSA) 的增加, 血小板 CD40L 的表达水平呈现先上升后下降的趋势, 当 SSA 达到 2 Pa·min 时, 血小板 CD40L 表达量达到峰值。结论 vWF-A1、FSS 和 SSA 调控血小板表面 CD40L 的表达, SSA 促进了血小板表达 CD40L 的能力。

关键词: 流体剪切力; CD40L; 血管性血友病因子; 血小板; 剪切应力累积

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.05.011

The VWF-A1-Mediated Platelet Surface CD40L Expression in Flow Field

YIN Mengzhu¹, JI Yanru¹, Huang Wenhua², FANG Ying¹, WU Jianhua¹

(1. Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Engineering Research Center for Translation of Medical 3D Printing Application, Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Biomechanics, Department of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract; Objective To reveal the mechanism of mechanical regulation of platelet surface CD40L expression mediated by vWF-A1 in flow field. **Methods** The prokaryotic systems expressing proteins, flow cytometry, and parallel plate flow chamber technique with cellular immunofluorescent antibody staining were selected, so as to investigate the activation and subsequent expression of CD40L induced by vWF-A1 in platelets under different fluid shear stress (FSS) environments. **Results** The vWF-A1 did not activate platelets under resting conditions. FSS was the initiating switch for vWF-A1-mediated platelet CD40L expression. With the increase of shear stress accumulation (SSA), the expression level of platelet CD40L showed a trend of increasing and then decreasing, and when SSA reached 2 Pa·min, the expression of platelet CD40L reached its peak. **Conclusions** The expression of CD40L on platelet surface is regulated by vWF-A1, FSS and SSA. SSA promote the ability of platelets to express CD40L.

Key words: fluid shear stress (FSS); CD40L; von Willebrand factor (vWF); platelet; shear stress accumulation (SSA)

收稿日期:2022-08-08; 修回日期:2022-11-09

基金项目:国家自然科学基金项目(12072117, 12172137)

通信作者:吴建华,教授,E-mail:wujianhua@scut.edu.cn

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是当代人类健康的头号杀手,而 CVD 的发展与血栓并发症息息相关^[1]。愈来愈多的研究显示,血小板是连接血栓形成与炎症反应之间的主要环节。血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 是血浆中的大型多聚体糖蛋白 (glycoprotein, GP), 在血小板止血和血栓形成过程中起关键作用^[2]。当血管内皮细胞受损时, vWF-A3 结构域可与内皮下暴露的胶原相互作用而锚定在基质中,使原本球状的 vWF 在血流冲刷下舒展,露出 A1 结构域上血小板膜受体 GPIIb/IIIa 的结合位点^[3],故可捕获循环血小板在受损内皮细胞上的初始黏附,并启动下游信号和血小板凝血级联反应^[4]。vWF-A1 与 GPIIb/IIIa 特异结合诱导的血小板的活化,不仅使血小板改变形态和发生聚集^[5],而且释放出 ADP、凝血因子和血小板源生长因子等活性物质及微粒,导致继发性止血^[6]。其中,原先贮存在 α 微粒物中的 CD40L 会表达于血小板膜表面,通过结合白细胞表面受体 CD40 募集白细胞,引起白细胞的免疫应答^[7];同时,这种血小板和白细胞的胞间通讯,可能促进和加重动脉粥样硬化的进程^[8]。

CD40L (CD154) 属于肿瘤坏死因子超家族 (tumor necrosis factor superfamily, TNF) 的 II 型跨膜蛋白,以三聚体的形式在活化的血小板、内皮细胞、B 细胞、活化的 T 细胞等上表达^[9]。经过几分钟或几个小时后,这种表达在细胞膜上的跨膜三聚体 CD40L 将被金属蛋白酶或基质金属蛋白酶切割,生成可溶性的 CD40L (sCD40L)^[10-11];释放出来并进入循环血流中的 sCD40L,会刺激血小板,进一步促进血小板的颗粒释放^[12]。目前的研究表明,CD40L 从 α 微粒物释放到血小板表面的过程受到各种外源性激动剂和流体剪切力 (fluid shear stress, FFS) 的调控^[13-14],但 vWF 和血流剪切力究竟如何协同调节血小板表面 CD40L 的原位表达,至今仍鲜见报道,其调控机制尚不清晰。

本文采用流动腔技术结合免疫荧光抗体染色技术,观察流场下 vWF-A1 底板上黏附的血小板表面 CD40L 表达水平随流体剪应力和加载时间的动态变化,以揭示 vWF-A1 介导 CD40L 原位表达的力学调控机制。本文旨在加深理解流场下血小板活化过程以及血小板在止血、血栓形成、先天性免疫

与适应性免疫中角色,为病理性血栓及炎症过激反应的临床诊断和相关药物研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试剂

VWF-A1 由华南理工大学生物科学与工程学院生物力学研究所表达纯化获得,其重组质粒获赠于美国贝勒医学院 Cruz 教授;牛血清白蛋白 (BSA, Sigma 公司,美国);腺苷酸激酶 2 (AK2, Bio-Rad 公司,美国);Anti-CD40L (Rabbit mAb, 北京义翘神州科技股份有限公司);羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488, Abcam 公司,英国);三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase, Sigma 公司,美国)。

1.2 血小板提取

从两周内未服用阿司匹林等药物的成年健康志愿者中抽取静脉血 20 mL,采用密度梯度离心法,得到富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP)^[15];向 8 mL PRP 溶液加入 80 μ L 0.2 mol/L 的 $MgCl_2$ 溶液及 40 μ L 1U/ μ L Apyrase 酶,混匀后,1 000 g 离心 10 min;离心后上层黄色血浆为少血小板血浆 (platelet-poor plasma, PPP),将 PPP 转移至离心管,用 8~10 mL 含 5% PPP 的 PBS 溶液重悬血小板沉淀,计数并调整血小板浓度为 $(3\sim6)\times 10^7$ 个/mL。特异性实验所需的 AK2 组 (特异性阻断 GPIIb/IIIa 与 vWF-A1 相互作用的抗体)则在正常血小板悬浮液中加入 20 μ L 1 mg/mL 的 AK2 抗体,于 37 $^{\circ}C$ 下避光孵育 30 min 后使用。

1.3 流式细胞仪

用 800 μ L 含 5% PPP 的 PBS 溶液重悬血小板沉淀并将血小板悬浮液平分为 4 管^[16],静置 10 min 后,向两管细胞加入 100 μ L PBS (空白组和对照组),其余两管分别加入 100 μ L 终浓度为 200 μ g/mL Collagen (Collagen 组)及 200 μ g/mL vWF-A1 (vWF-A1 组),37 $^{\circ}C$ 孵育 10 min,1 000 g 离心 5 min;去除上清,加入 2% 多聚甲醛,室温孵育 30 min 固定细胞,离心去除上清,加入 PBS 重悬清洗,用 2% BSA 重悬血小板,室温孵育 1 h 离心去除上清;用 PBS 重悬沉淀;对照组、Collagen 组及 vWF-A1 组分别加入抗 CD40L-594 共轭荧光抗体,空白组加入 PBS,于垂直混合旋转仪室温避光孵育 1 h 后离心;PBS 重悬清洗 3 次,最后重悬于 PBS 溶

液中,随后使用流式细胞仪对血小板进行分析。

1.4 平行平板流动腔实验

1.4.1 底板功能化 将底板分为4组,空白对照组孵育 PBS,阴性对照组孵育 2% BSA,实验组孵育 20 μL vWF-A1 (200 μg/mL);空白对照组与阴性对照组均在实验当天室温孵育 1 h,实验组在实验前 1 天 4 °C 孵育过夜并于实验当天用 2% BSA 室温孵育 1 h^[17]。

1.4.2 特异性黏附试验 以 0.1 Pa 壁面剪切力灌注血小板至流动腔,使用高速摄像机 (20 帧/s, 20 倍镜) 观察记录流场稳定后 1 min 内底板上黏附的血小板数目。

1.4.3 血小板 CD40L 表达实验 将血小板灌注至流动腔腔体,静止孵育 10 min;0 Pa 组不使用流动腔装置,直接使用移液枪轻柔地将血小板滴加在底板上;0.25、0.5、1 Pa 组分别灌注 PBS 刺激 1、2、4、8 min;取出小皿加入 2% 多聚甲醛室温孵育 30 min 固定;去除多聚甲醛,清洗后用 1 mL 2% BSA 室温封闭 1 h。过夜孵育 anti-CD40L (1:500) 100 μL,次日清洗,用二抗室温孵育 1 h,去除二抗,在 Ti2-U 倒置荧光显微镜 (Nikon 公司,日本) 下拍照记录,采用专业图像处理软件 Image J (National Institutes of Health,美国) 处理数据。

1.5 血小板表面 CD40L 表达相关物理量定义和测量

1.5.1 阳性率 在明场下统计总体的黏附细胞数,在荧光显微镜下统计相同视野的 CD40L 阳性细胞数,其公式如下:

$$\text{阳性率} = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{总体黏附细胞数}} \times 100\%$$

1.5.2 平均阳性面积 通过分析软件 Image J,分析整个视野血小板的荧光总面积和阳性血小板数,则平均每个阳性血小板表面 CD40L 的阳性面积计算公式如下:

$$\text{平均阳性面积} = \frac{\text{荧光总面积}}{\text{阳性血小板数}}$$

1.5.3 平均荧光强度 用 Image J 分析视野中阳性血小板的平均荧光强度以及背景平均荧光强度,计算公式如下:

$$\text{平均荧光强度} = \left[\frac{\text{血小板荧光强度} - \text{背景荧光强度}}{\text{背景荧光强度}} \right] \times \text{平均阳性面积}$$

1.6 统计分析

每个条件进行 3 次平行实验,用平均值 ± 标准

差表示,采用单因素方差分析和秩和检验进行分析,使用 Dunn 多重比较进行组间比较, $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 vWF-A1 底板与血小板的特异性黏附

为了测定流动腔系统的特异性,将血小板悬浮液分别灌注到空白底板、BSA 底板及 vWF-A1+ BSA 底板 (实验组) 中,观察并统计血小板在这 3 种不同底板上的稳定黏附数目 (见图 1)。实验结果表明,2% BSA 可有效阻断由重力作用及静电相互作用引起的血小板非特异性黏附,vWF-A1 可以特异介导血小板的黏附。为了验证实验组血小板黏附是否由 vWF-A1/GPIb α 相互作用引起,在血小板悬浮液中加入 GPIb α 的阻断抗体 AK2 并孵育 30 min,再灌注至 vWF-A1 功能化底板的流动腔中,发现底板上黏附的血小板显著下降,下降至与 BSA 底板相当的水平。本文认为,实验组血小板黏附是血小板表面糖蛋白受体 GPIb α 与底板上 vWF-A1 相互作用导致。

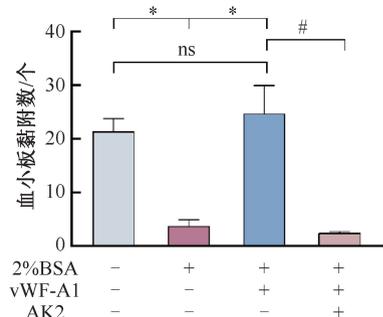


图 1 血小板的物理吸附阻断及特异性检测

Fig. 1 Platelet physisorption blocking and specificity testing

注: * $P < 0.05$,与 2% BSA 比较; # $P < 0.05$,与 2% BSA+vWF-A1 比较; ns, $P > 0.05$ 。

2.2 FSS 是触发 vWF-A1 诱导血小板表达 CD40L 的扳机

由于血液中也存在 vWF,故首先检测静止条件下,溶液中的 vWF-A1 能否诱导血小板表达 CD40L, collagen 作为阳性对照。采用 CD40L 的荧光抗体和流式细胞仪,检测血小板表面 CD40L 表达。结果表明,阴性对照组与实验组的结果几乎一致,其平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI) 均接近 1 000,两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);而已

知的血小板激动剂之一 collagen,能有效刺激血小板,平均荧光强度达到 2 500,显著高于 vWF-A1 ($P<0.01$),见图 2。本文认为,静息状态即零剪切力状态下,溶液中的 vWF-A1 无法有效激活血小板以表达 CD40L,先前研究也都说明了该结果^[18-19]。

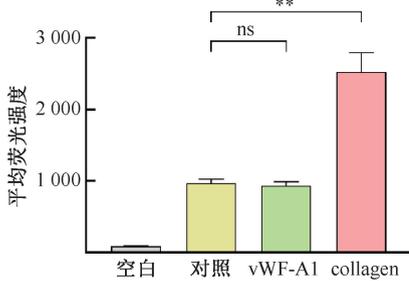


图 2 血小板 CD40L 表达的平均荧光强度

Fig. 2 Mean fluorescence intensity of CD40L expression for platelets

注: ** $P<0.01$,与空白组比较;ns, $P>0.05$ 。

由于固定在内皮细胞下基质中的 vWF,才能捕获血小板,故初始黏附的血小板会受到 FSS 作用。本文采用流动腔技术与细胞免疫荧光抗体染色技术,设计实验来比较固定的 vWF-A1 在有力与无力两种情况下血小板表面 CD40L 表达,以及仅 FSS 能否诱导血小板的活化和 CD40L 表达。实验结果表明,静止状态时,底板有无 vWF-A1 对 CD40L 阳性血小板比率没有影响;在 0.5 Pa 流场中,vWF-A1 组的小血小板阳性率显著高于 PBS 组(空白对照组或非特异黏附组);0.5 Pa 两个流场条件比较,无论底板是否固定 vWF-A1,0.5 Pa 组均显著高于 0 Pa 相应组(见图 3)。上述结果表明,仅剪切力刺激,也会激活血小板表达 CD40L,但阳性血小板比率提高幅度不大;静止情况下,无论是可溶性还是固定的 vWF-A1 均不能激活血小板表达 CD40L;当固定 vWF-A1 同时施加流场时,阳性血小板比率大幅增加。因此,血小板表面 CD40L 表达是 FSS 与 vWF-A1 协同调控,FSS 是 vWF-A1 诱导的血小板 CD40L 表达的开关。

2.3 FSS 及力学刺激时间对 vWF-A1 介导血小板 CD40L 表达的调控

为探讨 FSS 及力学刺激时间究竟如何调控 vWF-A1 底板上血小板 CD40L 的表达,分别使用 4 种 FSS(0、0.25、0.5、1.0 Pa)刺激黏附在 vWF-A1

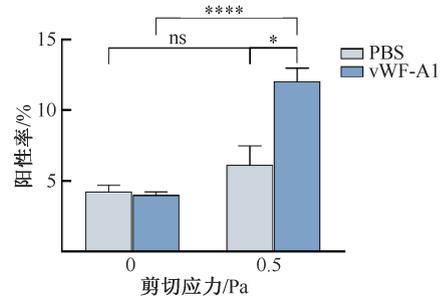
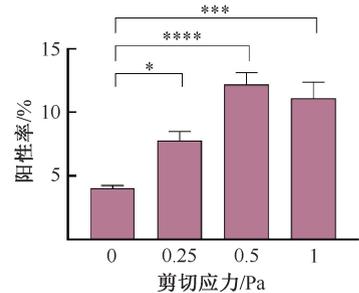


图 3 不同处理下血小板表面 CD40L 阳性率比较

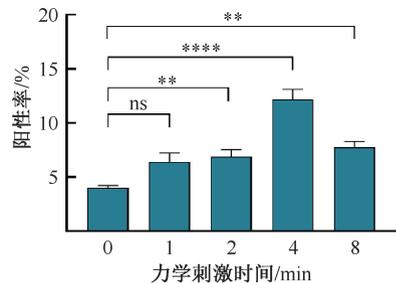
Fig. 3 Comparison of positive rate of platelet surfaces CD40L with different treatments

注: * $P<0.05$,与 0.5 Pa PBS 比较;**** $P<0.0001$,与 0 Pa 的 vWF-A1 比较;ns, $P>0.05$ 。

底板上血小板 4 min。结果表明,随着 FSS 从 0 Pa 增加到 0.5 Pa,CD40L 阳性血小板比率快速提高;当 FSS 进一步增加到 1 Pa 时,血小板的阳性率不再提高,甚至有略微地下降,但与 0.5 Pa 组比较没有统计学差异[见图 4(a)]。本文认为,FSS 正向调控 CD40L 血小板的阳性率,但存在 1 个最佳值,该最



(a) 剪切应力对血小板阳性率的影响



(b) 力学刺激时间对血小板阳性率的影响

图 4 剪切应力或力学刺激时间对 v-WF 诱导的血小板 CD40L 表达的影响

Fig. 4 vWF-induced-platelet CD40L expression in response to shear stress or mechanical stimulation time (a) Influence of shear stress on the positive rate of platelets, (b) Influence of mechanical stimulation time on the positive rate of platelets

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;ns, $P>0.05$ 。

佳值可能存在于 0.5 ~ 1.0 Pa 之间。接着,在 0.5 Pa 条件下,探究不同力学刺激时间对血小板阳性率的影响。结果表明,随着力学刺激时间增加,阳性血小板比率也随之上调,且在 4 min 时达到峰值;随着力学刺激时间进一步增加到 8 min,血小板阳性率反而下降到 2 min 左右的水平,这可能源于 4 min 后血小板酶切的启动,使部分跨膜 CD40L 被酶切后进入溶液[见图 4(b)]。本文认为,vWF-A1 介导血小板黏附后,血小板表面表达 CD40L 的阳性

率同时受到 FSS 和力学刺激时间的调控,在最佳阈值前,FSS 及力学刺激时间均正向调控血小板 CD40L 的阳性率。

2.4 应力累积对血小板 CD40L 的表达调控

为了进一步研究 FSS 与力学刺激时间对血小板表面 CD40L 表达的影响,在 0、0.25、0.5、1.0 Pa 剪切力下分别刺激血小板 0、1、2、4、8 min,检测血小板 CD40L 阳性率、CD40L 表达荧光强度及荧光面积随 FSS 和力学刺激时间的变化(见图 5)。

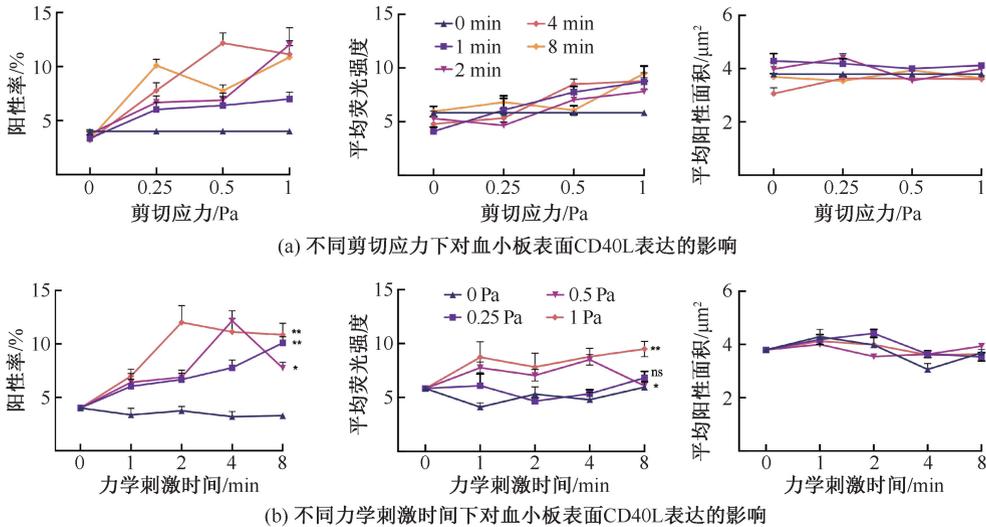


图 5 流体剪切应力与力学刺激时间对血小板表面 CD40L 表达的影响

Fig. 5 Influence of fluid shear stress and mechanical stimulation time on platelet surface CD40L expression

(a) Influence of varying shear stress on platelet surface CD40L expression, (b) Influence of varying mechanical stimulation time on platelet surface CD40L expression

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns, $P > 0.05$ 。

0 Pa 条件下所有参数差异均无统计学意义,表明静息状态下只有 vWF-A1 的刺激不会促使血小板活化表达 CD40L;施加力学刺激后,血小板阳性率均有提高,与 0 Pa 及 0 min 的对照组相比可以看出,随着 FSS 与力学加载时间的增加,部分 FSS 下的阳性血小板比率并没有随之一直增大,而是出现了先增大后减小的趋势,存在 1 个达峰时间,且达峰时间随着力的增大而缩短。阳性血小板 CD40L 平均荧光强度的变化相对平稳,但在高 FSS 与长力学刺激时间下依旧可以观察到荧光强度的逐渐增强。阳性血小板的平均荧光面积无论是零力条件或是有力条件下,组内与组间差异均无统计学意义,血小板平均荧光面积在 $4 \mu\text{m}^2$ 左右,而血小板本身直径在 $2 \sim 4 \mu\text{m}$ 内,其平均荧光

面积接近血小板与底板的接触面积;出现此现象的原因有可能是血小板本身 CD40L 表达量稍低。本实验结果表明,FSS 与力学刺激时间对 vWF-A1 介导的血小板活化、促使 CD40L 膜表达这一过程有显著影响,但现象比较复杂,没有呈现一致的规律性趋势。

引用物理学冲量概念,即作用在物体上的力在一段时间内的累积效应,使用剪切应力累积 (shear stress accumulation, SSA) 参数来整合 FSS 与力刺激时间这两个有一定关联度的实验因素,以获取力学刺激对 vWF-A1 介导的血小板表面 CD40L 表达的规律性调控。SSA 的定义如下:

$$SSA = \tau_w \times T$$

式中: τ_w 为剪切应力; T 为刺激时间。引入 SSA

参数后,本文上述实验数据得到了很好整合,并呈现了规律性的趋势(见图6)。阳性血小板比率随着SSA增加先增大后减小,在SSA为 $2\text{ Pa}\cdot\text{min}$ 时达到峰值;阳性血小板CD40L平均荧光强度随着SSA的增大先增加,当SSA增大到 $2\text{ Pa}\cdot\text{min}$ 时趋于平稳;而平均荧光面积随

SSA增加基本保持稳定,逐步趋于 $3.7\ \mu\text{m}^2$ 。本文认为,流场中vWF-A1底板上黏附的血小板的活化和CD40L的表达过程受到SSA的调控,且存在1个最佳阈值;在阈值前SSA正向调控CD40L阳性血小板比率和阳性血小板的CD40L表达水平。

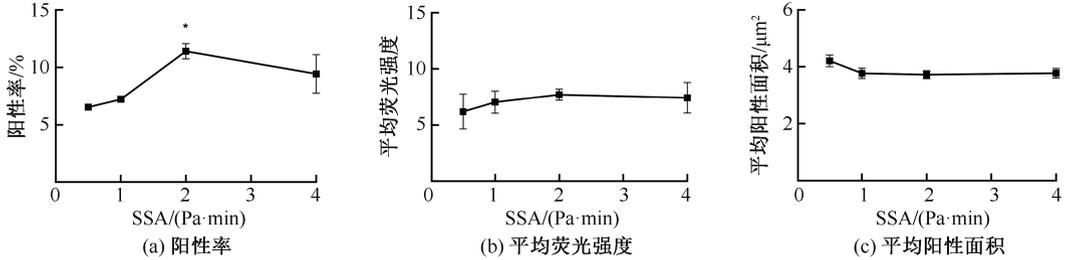


图6 SSA对vWF-A1诱导的血小板CD40L表达的调控(* $P<0.05$)

Fig. 6 Regulation of vWF-A1-induced CD40L expression of platelets by SSA (a) Ratio of positive platelet, (b) Mean fluorescence intensity, (c) Mean positive coverage

3 讨论

本研究采用流式细胞仪、平行平板流动腔技术与细胞免疫荧光抗体染色技术,探究FSS下vWF介导的血小板CD40L表达的规律。本文发现,静息状态下vWF-A1并不能激活血小板,与Dubois等^[20]的研究结果一致;而FSS是vWF-A1诱导血小板表达CD40L的开关,且正向调控血小板的活化和CD40L表达。但不同力学环境下CD40L表达的规律也有所不同,随着剪切力的加大,阳性血小板比率出现了峰值,并且达到峰值的时间随着剪切力加大而逐渐提前;然而血小板平均荧光强度需要在足够强的刺激下才能出现变化,而平均阳性面积却是几乎没有改变,这可能与血小板本身CD40L表达量及sCD40L的存在有关。血小板活化后可在短时间内表达出大量的CD40L到膜上,而跨膜状态的CD40L随着血小板的进一步活化,会被酶切裂解为sCD40L释放到血液中^[10-11]。Henn等^[21]研究表明,CD40L从血小板表面的释放是CD40L表达下降的唯一机制。Mason等^[22]研究则发现,将血小板活化后,血液中的sCD40L含量出现增加的趋势。Giannini等^[23]研究表明,活化的血小板上CD40L和P选择素表达量随出血时间增加而提高,sCD40L在血液的含量也在出血后立即上升,进一步促进凝血和炎症反应。由此可以推断,随着血小板的活化,储存在

血小板 α 颗粒内的CD40L易位到膜表面的数目越大,随后被酶切成为sCD40L而释放的量也会越大。因此,在本实验力学刺激下,CD40L表达与sCD40L释放似乎存在着一个平衡,因而平均荧光强度会趋于稳定,不再变化。

本文结果表明,血流剪切力及力学刺激时间均影响vWF介导的血小板活化及膜CD40L的表达,然而分别对这两个因素分析时结果稍显杂乱,由此使用了应力累积的概念。使用SSA将血流剪切力及力学刺激时间进行整合后发现,SSA一致的组别,其表达水平都很近似。应力累积概念由Fang等^[16]提出,该研究团队发现,SSA可单调、正向调控血小板P-选择素表达,即SSA增加时,血小板P-选择素的表达量也增加。这一趋势与本研究中SSA调控的CD40L表达有所不同。表达CD40L的阳性血小板比率呈现先增加后减少的趋势,这可能源于血小板内CD40L和P-选择素储存量的差异。许多研究证实了血小板表面P-选择表达量远高于CD40L^[24],这也可能源于CD40L的酶切。无论是血小板CD40L还是P-选择素,其表达水平均与FSS和力学刺激时间相关,应用SSA这一指标可以更准确度量力学刺激对细胞功能的影响。因此,本文认为,在未来涉及力-化学偶联介导的细胞响应研究中,SSA也可作为关键因素之一进行考量。

4 结论

血小板上 CD40L 分子的不仅与血栓形成和炎症反应相关,也与自身免疫性疾病等病理过程高度相关。血小板上表达的 CD40L 是止血反应与炎症反应之间的关键联系点,CD40L 脱落形成的 sCD40L 可以增强血小板活化与聚集,同时跨膜 CD40L 与内皮细胞或白细胞受体的结合可以上调促炎因子的释放。本研究可加深理解 CD40L 参与的止血过程、炎症反应等生理过程,也可为心血管疾病或免疫疾病的治疗或 CD40L 靶向药物的设计提供参考。

参考文献:

[1] TIMMIS A, TOWNSEND N, GALE C, *et al.* European society of cardiology; Cardiovascular disease statistics 2019 [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(1): 12-85.

[2] CHEN J, CHUNG DW. Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13 [J]. *Blood*, 2018, 132(2): 141-147.

[3] MICHIELS JJ, BATOROVA A, PRIGANCOVA T, *et al.* Changing insights in the diagnosis and classification of autosomal recessive and dominant von Willebrand diseases 1980–2015 [J]. *World J Hematol*, 2016, 5(3): 61.

[4] GOGIA S, NEELAMEGHAM S. Role of fluid shear stress in regulating VWF structure, function and related blood disorders [J]. *Biorheology*, 2016, 52(5-6): 319-335.

[5] KUMAR RA, DONG JF, THAGGARD JA, *et al.* Kinetics of GPIIb-vWF-A1 tether bond under flow: Effect of GPIIb mutations on the association and dissociation rates [J]. *Biophys J*, 2003, 85(6): 4099-4109.

[6] GOTO S, HASEBE T, TAKAGI S. Platelets: Small in size But essential in the regulation of vascular homeostasis-translation from basic science to clinical medicine [J]. *Circ J*, 2015, 79(9): 1871-1881.

[7] PUHR-WESTERHEIDE D, SCHINK SJ, FABRITIUS M, *et al.* Neutrophils promote venular thrombosis by shaping the rheological environment for platelet aggregation [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15932.

[8] LIEVENS D, ZERNECKE A, SEIJKENS T, *et al.* Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis [J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4317-4327.

[9] COGNASSE F, DUCHEZ AC, AUDOUX E, *et al.* Platelets as key factors in inflammation; Focus on CD40L/CD40 [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 825892.

[10] CHOI WS, JEON OH, KIM DS. CD40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$: sCD40L release mediated by MMP-2 [J]. *J Thromb Haemostasis*, 2010, 8(6): 1364-1371.

[11] RAHMAN M, ZHANG S, CHEW M, *et al.* Platelet shedding

of CD40L is regulated by matrix metalloproteinase-9 in abdominal sepsis [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(7): 1385-1398.

[12] ANTONIADES C, BAKOGIANNIS C, TOUSOULIS D, *et al.* The CD40/CD40 ligand system; Linking inflammation with atherothrombosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(8): 669-677.

[13] ALOUI C, PRIGENT A, SUT C, *et al.* The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(12): 22342–22364.

[14] TAMURA N, YOSHIDA M, ICHIKAWA N, *et al.* Shear-induced von Willebrand factor-mediated platelet surface translocation of the CD40 ligand [J]. *Thromb Res*, 2002, 108(5-6): 311-315.

[15] 高绪强, 刘晓玲, 吴建华. 剪切流下 VWF-A1 介导的血小板钙响应 [J]. *医用生物力学*, 2019, 34(1): 83-90.

[15] GAO XQ, LIU XL, WU JH, *et al.* VWF-A1-mediated calcium response of platelets under shear flow [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(1): 83-90.

[16] FANG J, SUN X, LIU S, *et al.* Shear stress accumulation enhances von Willebrand factor-induced platelet P-selectin translocation in a PI3K/Akt pathway-dependent manner [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 642108.

[17] 潘雨平, 冯晶晶, 蒋笑嫣, 等. 流体动力学环境中嗜中性粒细胞在固定血小板上的滚动黏附 [J]. *医用生物力学*, 2020, 35(1): 43-48.

[17] PAN YP, FENG JJ, JIANG XY, *et al.* Adhesive rolling of neutrophils on the immobilized platelets under flows [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(1): 43-48.

[18] SEMPLE JW, ITALIANO JE, FREEDMAN J. Platelets and the immune continuum [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(4): 264-274.

[19] NAGASAWA A, MATSUNO K, TAMURA S, *et al.* The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker [J]. *Int J Lab Hematol*, 2013, 35(5): 534-541.

[20] DUBOIS C, PANICOT-DUBOIS L, GAINOR JF, *et al.* Thrombin-initiated platelet activation *in vivo* is vWF independent during thrombus formation in a laser injury model [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(4): 953-960.

[21] HENN V, STEINBACH S, BÜCHNER K, *et al.* The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40 [J]. *Blood*, 2001, 98(4): 1047-1054.

[22] MASON PJ, CHAKRABARTI S, ALBERS AA, *et al.* Plasma, serum, and platelet expression of CD40 ligand in adults with cardiovascular disease [J]. *Am J Cardiol*, 2005, 96(10): 1365-1369.

[23] GIANNINI S, FALCINELLI E, BURY L, *et al.* Interaction with damaged vessel wall *in vivo* in humans induces platelets to express CD40L resulting in endothelial activation with no effect of aspirin intake [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(6): H2072-H2079.

[24] AL-TAMIMI AO, YUSUF AM, JAYAKUMAR MN, *et al.* SARS-CoV-2 infection induces soluble platelet activation markers and PAI-1 in the early moderate stage of COVID-19 [J]. *Int J Lab Hematol*, 2022, 44(4): 712-721.