

动脉粥样硬化血栓形成中的血小板突触分子

朱 力

(苏州大学唐仲英血液学研究中心 苏州大学附属第一医院 江苏省血液研究所卫生部血栓与止血重点实验室, 苏州市 215400)

[作者简介] 朱力, 苏州大学医学特聘教授, 博士研究生导师。任苏州大学唐仲英血液学研究中心教授、江苏省血液学研究所教授、卫生部血栓与止血重点实验室教授。1984 年毕业于吉林大学医学部(原白求恩医科大学), 获学士和硕士学位。1992 年由卫生部“郑氏奖学金”资助, 赴美国加州大学旧金山分校(UCSF)攻读博士学位。后在美国宾夕法尼亚大学(University of Pennsylvania)做博士后和高级研究员。主要从事血栓与止血和血管性疾病的研究。近期主要研究成果:(1) 首先发现血小板表达轴突导向分子旗语家族成员 Sema4D, 并证明在血小板激活过程中 Sema4D 被金属蛋白酶 ADAM17 切割酶;(2) 功能上, 首次证明 Sema4D 通过“接触依赖性信号传递”参与血小板激活、血栓形成过程;(3) 利用基因工程小鼠, 首次证明敲除 SEMA4D 能够降低高脂血症状态下血小板对激活剂的敏感性, 并可减缓动脉粥样硬化的发生与发展。先后在 PNAS、ATVB、BLOOD 等国际核心期刊上发表相关科研论文多篇, 为《临床研究杂志》(J Clin Invest) 等国际科学期刊撰写综述和评述, 参与 Platelets (ed. Alan D. Michelson) 等医学书刊的撰写。获得美国专利 1 项, 并获得美国心脏学会(AHA) 科研经费 1 项, 承担美国国家卫生研究院(NIH) 项目 1 项。应邀参加美国心脏学会和爱尔兰国家卫生研究院科研经费评审工作。现为国际血栓与出血学会、美国血液学会和美国心脏学会会员, 担任《中国病理生理学杂志-动脉粥样硬化分会》委员和《中国动脉硬化杂志》编委, 并得到《江苏省六大人才高峰》和《国家自然科学基金》项目资助。已建立了细胞信号与血管性疾病研究平台, 其团队包括 2 名研究助理、2 名博士和 5 名硕士研究生。在研项目包括(1) 血小板活化和血栓形成的信号传递;(2) 细胞导向分子与血管新生和动脉粥样硬化;(3) 心脑血管疾病临床急性血栓事件的机制与干预。



[关键词] 血小板; 动脉粥样硬化; 血栓形成; 轴突导向分子; 接触依赖性事件

[摘 要] 动脉粥样硬化血栓性疾病的特征是动脉粥样硬化脂质斑块的破裂和血栓形成, 血小板活化和聚集对这一疾病的病理生理和临床表现起重要作用。血栓形成过程中血小板之间也形成类似神经突触或免疫突触的突触性结构, 即血小板突触(platelet synapse), 在此微环境中进行着血小板间的信号传递, 称为血小板接触依赖性事件(contact-dependent events), 对动脉血栓的形成和稳定起重要作用。在参与这一过程的血小板突触分子中, 轴突导向分子(如 Ephrins 和 Semaphorins) 开始引起人们的关注。除轴突生长导向作用外, 轴突导向分子已证明在免疫应答、肿瘤转移、血管新生、血栓形成等病理生理过程中发挥作用。更为重要的是其中某些分子(如 Sema4D) 的敲除可降低血脂异常状态下的血小板的高反应性, 延缓动脉粥样硬化斑块的发展。本文将回顾近十年来对此类分子在动脉粥样硬化血栓形成中作用机制的研究进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Platelet Synaptic Molecules in Atherosclerosis

ZHU Li

(Cyrus Tang Hematology Center, Jiangsu Institute of Hematology & the First Affiliated Hospital, Soochow University & Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis of Ministry of Health, Suzhou, 215400, China)

[KEY WORDS] Platelets; Atherosclerosis; Thrombosis; Axonal Guidance Molecules; Contact-Dependent Events

[ABSTRACT] The features of atherothrombotic diseases are the rupture of atherosclerotic plaques and thrombosis.

Platelet activation and aggregation play a pivotal role in the pathogenesis and clinical manifestation. Similar to neuronal

[收稿日期] 2011-4-12

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(NO 81070410)和江苏高校优势学科建设工程资助项目

and immunological synapse, synaptic structure is also formed between platelets during thrombus formation. The microenvironment of platelet synapse facilitates signal transduction that has been accepted as contact-dependent events due to their occurrence after platelet contact begins, which is believed to play a role in the thrombus formation and stability. Axonal guidance molecules (eg Ephrins and Semaphorins) have been found in platelet synapse. In addition to axonal guidance, axonal guidance molecules have been shown to participate in the pathophysiological processes, including immune response, tumor metastasis, angiogenesis, and thrombosis. Most recently, it was found that deletion of a semaphorin family member, Sema4D, attenuated platelet hyperreactivity in the setting of dyslipidemia and protected from the development of atherosclerotic plaques. This article summarizes the progress in the understanding of the molecular mechanisms by which axonal guidance molecules affect atherothrombosis.

我国心脑血管疾病发病人数已超过 2000 万, 每年死亡病人高达 250 万, 占总病死率的 50% 以上。其中, 动脉粥样硬化血栓形成是导致人类致病和致死的主要原因。尽管人们在诊断和治疗方面已做了坚持不懈的努力, 但由于对发病机制认识的局限性, 对心脑血管疾病的早期诊断和有效治疗尚不十分满意, 以致死亡率居高不下。血小板活化、聚集以及血栓的形成和稳定对心脑血管疾病的发病过程和临床表现起重要作用。血小板的功能是通过其表面受体和胞内信号转导实现的, 对血小板已知分子(如 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、GPIIb)的研究和应用已对阐明血栓形成机制和干预心脑血管疾病的血栓性发作收到了一定效果。然而, 抗血小板制剂临床应用的副作用(如出血倾向)提示研究者仍需加深对血小板活化和血栓形成机制的认识。因此, 除对已知分子和机制的进一步研究外, 发现血小板新分子或已知分子新功能以及血栓形成新机制, 将有利于对动脉粥样硬化血栓形成机制的认识和寻找干预的靶点。

1 血小板突触和接触依赖性事件

血小板动脉血栓形成后并不意味着其病理和生理功能的结束, 仍有许多细胞分子过程在进行, 如接触依赖性信号传递, 可能参与调控血栓的生长、消退和稳定。这是一个迄今并未被认识的领域, 探明这一领域的相关问题对研究血栓机制, 特别是血栓性疾病的干预十分重要。

1.1 血小板活化和动脉血栓形成

血小板的许多重要性质, 如形状、分泌颗粒成分、黏附受体密度以及促进凝血酶生成的能力, 都是基于在高流量的内环境下, 为止血的需要而形成的。循环中的血小板必须能在反复接触正常血管壁的情况下而不被激活, 并能分辨出破损血管壁, 顶着血流的冲击, 发现并停留在血管损伤处, 与其他血小板黏附, 形成大小合适的稳定血栓, 直到血管壁损伤修复完成而不再需要其止血功能^[1]。血栓形成大致分

为 3 个阶段。(1) 起始阶段: 在血管受损时, 流动的血小板被暴露的胶原蛋白和活化的 vWF 捕获, 而形成血小板单层, 这个过程的关键是血小板表面的受体和胶原蛋白($\alpha_2\beta_1$ 和 GPIIb)及 vWF(GP Ib α 和 $\alpha_{IIb}\beta_3$)的结合, 启动血小板细胞内信号。在血栓和炎症情况下, 血小板还可以通过 PAR 家族中 G 蛋白偶联受体, 被凝血酶活化。(2) 延伸阶段: 更多的血小板被募集和活化, 相互黏附, 在血小板单层上面聚集。在此过程中, 凝血酶、ADP 和血栓烷 A2(TXA2)起重要的作用, 这些激动剂能够活化血小板磷脂酶 C (PLC), 提高胞浆钙离子浓度并抑制 cAMP 的合成。参与这些过程的受体通常都是 G 蛋白偶联受体。这些受体和胶原蛋白受体共同支持 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的活化, 从而使血小板之间具有黏附作用, 这对血栓的形成是非常重要的。(3) 稳固阶段: 在血小板血栓形成的后期, 血小板之间的相互紧密接触稳固了血小板凝块并阻止其过早的解聚

1.2 血小板接触依赖性信号概念的形成

上述血小板激活过程是通过血小板表面受体及其下游的信号分子和信号途径实现。在多数情况下, 血小板的激活开始于 PLC 亚基的激活, 后者是通过水解细胞膜上的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸盐产生第二信使, 使细胞质内 Ca^{2+} 浓度升高, 通过 CalD-AG-GEF、Rap1、RIAM、kindlin 和 talin 等导致整合素的活化。PLC 的哪一个亚类被激活取决于激动剂。胶原激活 PLC γ_2 , 而凝血酶、ADP 和 TXA2 激活 PLC β 。talin 与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的胞质区域结合能触发整合素的构象改变, 为纤维蛋白原暴露出一个连接位点。使血小板之间通过二价的纤维蛋白原相互黏附。然而, 血栓形成后并不意味着其病理和生理功能的结束, 相当多的细胞和分子间的相互作用仍在进行。第一, 血管损伤后血小板的聚集和血栓形成过程具有空间和时间的不均一性, 并且血小板的黏附是瞬时的^[2-4], 比如血小板血栓的核心为活化血小板, 而外周为静息血小板(内部交流)。因此, 血小板之间

的相互作用是必然发生的。第二,不论是止血性血栓还是病理性血栓,都会产生血小板之间的紧密接触,形成微环境。相邻的血小板的表面分子互相作用,传递信息,称为接触依赖性事件,参与调节血栓的稳定性。在这一过程起主要作用的为整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$,通过纤维蛋白原在血小板之间形成桥梁。然而研究表明越来越多的蛋白发现参与此细胞过程,包括轴突导向分子。第三,血小板的颗粒分泌和膜蛋白胞外区脱落可参与接触依赖性事件,调节血栓稳定性(图 1)。

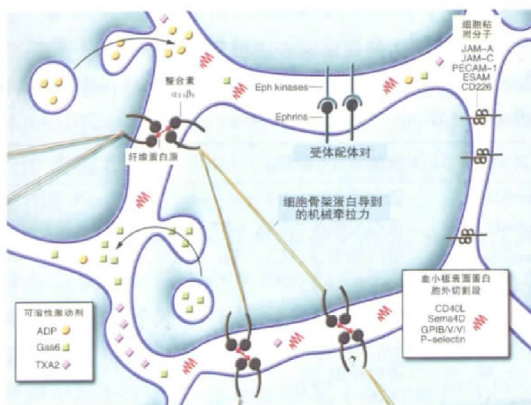


图 1. 参与血小板接触依赖性事件的分子

Figure 1. Molecules involved in the contact-dependent events in the platelet synapse (Brass, et al. J Clin Invest, 2007)

总之,血栓形成过程中血小板接触依赖性信号传递的概念已为人们所接受,然而,有关机制及其对血栓形成和血栓性疾病的调控的研究一直受到研究方法和手段限制,而进展缓慢,某些理论仍属推测性的。数码共聚焦活体显微镜和动物血管损伤模型的应用,推动了本领域的研究进展,使得某些过去的实验结果得到验证,并能让人们直观的看到血管损伤血栓形成的病理和生理过程以及血小板的血液细胞在这一过程中的行为和作用。但仍存在需继续研究的问题,如血栓形成中血小板如何形成类似神经突触结构的紧密接触,血小板突触分子间的接触依赖性信号传递作用机制,接触依赖性信号传递对血栓的形成和稳定的影响。阐明这些问题将有利于人们对血栓形成机制的认识,并为血栓性血管疾病的干预提供理论基础。

2 轴突导向分子及其受体在血小板中的表达和作用

发现血小板新分子并研究其功能有利于阐明血

小板活化和血栓形成的机制,可为血栓性疾病的干预提供理论依据。随着新技术新方法的应用,如蛋白质组学,越来越多的分子被发现在血小板中表达,如轴突导向分子旗语蛋白和 Ephrins。

2.1 旗语蛋白家族成员及受体的分类

旗语蛋白 (Semaphorins) 家族为轴突导向分子四大家族 (ephrins, netrins, semaphorins, and slits) 之一,最初发现在诱导神经元发育生长中发挥作用^[5]。其细胞外段含有一 Sema 功能区。到目前为止,已经发现至少 25 种旗语蛋白家族成员,共分 8 类。旗语蛋白 2、3、8 类属分泌型,1、4、5、6 类为跨膜糖蛋白,而第 7 类则是通过葡萄糖磷酸肌醇 (GPI) 锚着位点结合到细胞膜上。在神经系统外,已在多种组织中检测到旗语蛋白。旗语蛋白参与多种生物过程,包括器官发生、血管新生以及免疫细胞调控^[6]。旗语蛋白引起的多种生物反应是由细胞表面蛋白 Plexin 家族成员介导^[7,8]。脊椎动物的 9 种 Plexin 成员分为 4 类,命名为 A-D,也含有一个胞外 Sema 功能区(图 2)。最近一些结构研究证实,旗语蛋白二聚体上的 Sema 功能区与 Plexin 上的 Sema 功能区结合,使 Plexin 形成二聚体^[9,10]。

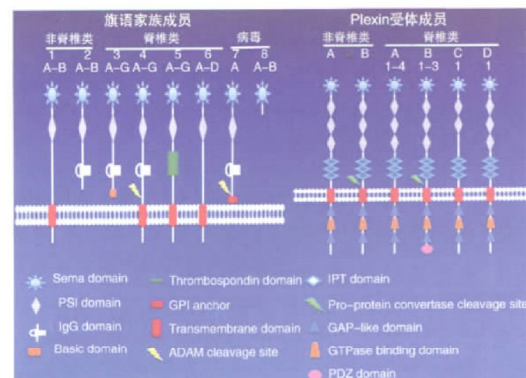


图 2. 旗语家族成员 (Semaphorins) 和受体 (Plexins) 的结构模式图

Figure 2. Semaphorin family members and their receptors, plexins (Wannemacher, et al. Platelets in press, 2011)

2.2 血小板旗语蛋白及受体的功能

用传统检测方法(免疫印记、mRNA 和流式细胞技术),前期研究已在血小板中检测到 Sema4D (CD100),并首先报道了 Sema4D 在血小板中的功能^[11]。Sema4D 是分子量为 150 kDa 的跨膜蛋白,胞外区含有多个潜在的 N-连接糖基化位点和一个保守的半胱氨酸残基,胞内区有一个保守的酪氨酸磷酸化位点和多个保守的丝氨酸磷酸化位点^[12]。

Sema4D 具有多种生物功能,包括参与免疫应答^[13],促进内皮细胞的血管生成^[14,15],抑制轴突生长^[16],参与血小板活化和血栓形成^[11]等。Sema4D 受体有 CD72^[17]、Plexin B1^[8]、Plexin B2^[18]及 Plexin C1^[19]。Plexin B1 为 Sema4D 的高亲和力受体,Plexin B2 为 Sema4D 的低亲和力受体。Sema4D 可以被裂解生成 120 kDa 的可溶性片段^[20]。本实验室也发现 Sema4D 同样也从活化的血小板表面被切割下来,并且这种切割需要一种金属蛋白酶 ADAM17^[11]。由于可溶性的 Sema4D 能诱导内皮细胞的迁移和血管新生^[15],来源于血小板的可溶性 Sema4D 可能在血管损伤部位调节损伤修复。在体外,Sema4D (-/-)的血小板对胶原刺激的聚集降低,酪氨酸激酶 Syk 磷酸化减少,PLC γ 2 磷酸化以及胞内钙离子的释放减少。有趣的是,只有血小板之间相互接触时,Sema4D (-/-)的血小板缺陷才可被观察到,并且,Syk 高水平磷酸化需要血小板与血小板之间的相互接触,因此,Sema4D 是以一种接触依赖性的方式加强 Syk 磷酸化的重要的调节分子,并且,Sema4D 介导的 Syk 的活化需要 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 的参与,但是又明显不同于由外而内信号通路^[21]。前期研究也报道过血小板表达 Sema4D 的受体:Plexin B1 和 CD72^[11]。但现在还不清楚哪一个是在血小板中作为 Sema4D 的受体,因为来自于单基因敲除鼠的血小板并没有表现出任何可检测的表型以及与人类血小板缺乏相关的功能。

另一旗语家族成员 Sema7A (CD108) 是膜相关性 GPI 抛锚蛋白^[21]。由于已在血小板中检测到 Sema7A,更重要的是该分子在 Sema 功能区含有能与整合素结合的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 序列,因此,Sema7A 有可能参与血小板活化和血栓形成。有报道 Sema7A 通过激活 MAPK 促进轴突生长。Sema7A 在 T 细胞表达,刺激巨噬细胞/单核细胞产生促细胞因子,Sema7A 与整合素 $\alpha 1\beta 1$ 的相互作用对炎症部位 T 细胞介导的巨噬细胞活化十分重要^[22]。另有报道 Sema7A 通过其受体 Plexin C1 介导嗅神经发育^[23]。

血小板还表达 Neuropilin-1 和 Plexin A 家族成员 (A1-A3)^[24],但是 Plexin A1-A3 还需要在蛋白质水平上进一步确认。Neuropilin-1 和 Plexin A 成员形成 Sema3A 的功能性受体,Sema3A 为二聚体蛋白,由内皮细胞分泌。重组 Sema3A 可抑制 ADP、U46619、TRAP 和 convulxin 诱导的 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活化及 TRAP 诱导的血小板在纤维蛋白原上的铺展。此外,Sema3A 减弱 TRAP 诱导的 Rac1 活化、cofilin 的磷酸化和 F-actin

的生成,提示 Sema3A 对细胞骨架有调节作用^[24]。与此相反,在神经元中,Sema3A 与 Neuropilin-1 结合促进 Rac1 的活化和 cofilin 的磷酸化^[7]。尽管如此,Kashiwagi 等^[24]认为内皮分泌的 Sema3A 主要用于维持循环血小板处于静息状态或限制损伤后的血栓增长。血栓形成过程中这种抑制机制如何关闭还不清楚。血小板蛋白组学的应用又发现几个 Plexin 和旗语家族成员。Lewandrowski 等检测到 Neuropilin-2 和 Plexin 家族成员 A3、A4、B2、B3 和 C1^[25]。Brass 实验室也检测到了 Sema4B^[26](表 1)。

表 1. 血小板表达的旗语家族成员及其受体

Table 1. Semaphorins and their receptors expressed in platelets. (Wannemacher et al. Platelets in press, 2011)

蛋白质	检测方法(种属)
Sema4B	蛋白质组学(人)
Sema4D	蛋白质组学(人); mRNA、WB、FC (人、鼠)
Sema7A	蛋白质组学(人); WB、FC (人、鼠)
Plexin A1	mRNA (人)
Plexin A2	mRNA (人)
Plexin A3	mRNA (人); 蛋白质组学(人)
Plexin A4	蛋白质组学(人)
Plexin B1	cWB (人)
Plexin B2	蛋白质组学(人); WB (人)
Plexin B3	蛋白质组学(人)
Plexin C1	蛋白质组学(人)
Neuropilin - 1	WB、FC (人)

2.3 血小板 Eph 激酶受体和配体的功能

Eph 激酶受体和配体为细胞跨膜蛋白,邻近细胞 Eph 激酶受体和配体的相互作用对神经网络形成和血管生成起重要作用。Prevost 等^[27]发现人血小板表达 Eph 激酶受体 EphA4、EphB1 和配体 ephrinB1。EphA4 或 ephrinB1 的聚合 (clustering) 导致细胞骨架重排,血小板与纤维蛋白原的黏附,以及颗粒分泌。ephrinB1 的聚合还可使 Ras 家族成员 Rap1B 活化。在 ADP 诱导血小板聚集中,EphA4 与两个酪氨酸激酶 Fyn 和 Lyn 以及细胞黏附分子 L1 形成复合体。机制上,认为 ephrinB1 或 EphA4 通过整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 导致血小板与纤维蛋白原的黏附,并需要 PI3K 和 PKC 的参与。Eph/ephrin 信号可加强血小板激动剂引起的血小板聚集^[28]。进一步的研究发现血小板静息状态下,EphA4 与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 相连,血小板活化后膜表面 EphA4 增加,并且与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 在血小板接触部位共定位。Eph 与 ephrin 的相互作用可支撑流动状态下血小板在胶原表面的稳定聚集,通过稳定血小板聚集和加速 $\beta 3$ 胞内区酪氨酸磷酸化参与 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 由外向内 (out-

side-in) 的信号传递^[29]。

3 轴突导向分子在动脉粥样硬化血栓形成中的作用

由于血小板目前还不能培养传代,因此对一些蛋白在血栓形成中的功能研究,多基于基因敲除小鼠和血管损伤动物模型。然而,某些分子(如 Eph 激酶受体和配体)在小鼠血小板未检测到。因此,主要介绍 Sema4D 在动脉粥样硬化血栓形成中的作用。

3.1 Sema4D 与血栓形成

在研究血栓形成机制的各种方法中,虽然各实验室或各厂商销售的仪器种类繁多,但原理上不外乎离体体外方法和体内方法。我们主要采用离体体外流体小室、动物活体微循环提举肌小血管损伤血栓形成模型(intravital imaging)和三氯化铁颈动脉损伤模型。

3.1.1 利用离体体外流体小室观察 Sema4D 敲除对血小板在胶原蛋白表面的黏附聚集及稳定性的影响 离体体外流体装置目前有多种,本实验室采用的离体体外流体小室(microfluidic chamber)是美国宾夕法尼亚大学生物工程系 Diamond 博士实验室研制的,具有用量少、速度快、高通量等特点^[30]。小鼠全血经 93 $\mu\text{mol/L}$ 的 PPACK 抗凝,用 Alexa-Fluor® 488 偶联的 CD41 单克隆抗体(终浓度为 10 mg/L)标记血小板,以动脉剪切率 800 s^{-1} 的流速,灌注到表面由胶原包被的微流体流动腔中,以模拟血管微环境。用配有 Hamamatsu 数码相机 C9300 (Hamamatsu Digital Camera C9300) 的尼康偏执 TE2000-U 倒置显微镜(Nikon Eclipse TE2000-U inverted microscope)观察血小板聚集的动态。我们首先观察到血小板黏附到胶原上,并发生聚集,形成血栓。然后在灌注 5 min 后将流速升至 10 000 s^{-1} ,观察血栓在高剪切力下的稳定性。结果表明 Sema4D 敲除血小板的血小板黏附和血栓的稳定性均低于野生鼠(图 3A、3B)。我们又进一步利用 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 抗体 Leo. H4 (EMFRET Analytics),观察 Sema4D 的作用是否为接触依赖性的。结果表明阻止血小板接触可消除 Sema4D 敲除导致的血小板对胶原的黏附和聚集的稳定性。提示 Sema4D 以接触依赖性方式参与血栓形成(图 3C、3D)。

3.1.2 应用动物活体微循环血管损伤模型观察 Sema4D 敲除对小鼠血管损伤后微循环血栓形成的影响 动物活体微循环血管损伤模型(intravital imaging)是一种能够从时空角度比较全面的观察血栓

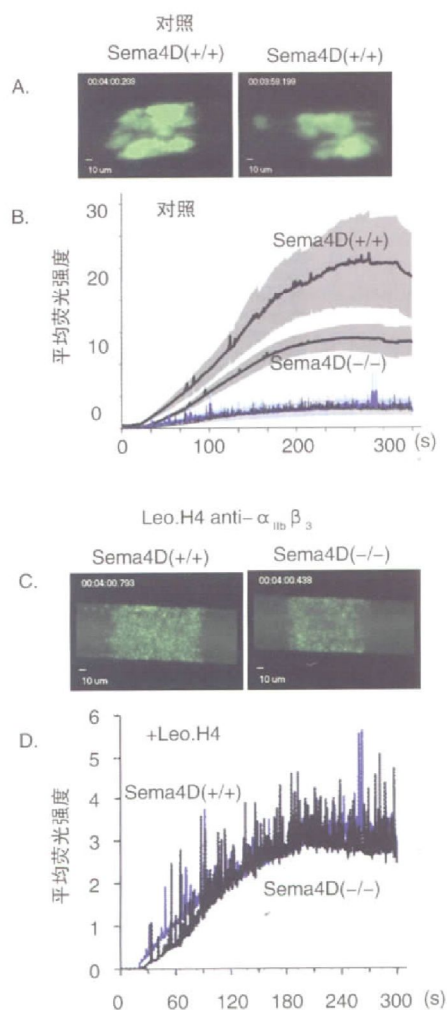


图 3. 离体体外流体小室观察 Sema4D 敲除降低血小板对胶原表面的黏附和聚集的稳定性

Figure 3. The formation of an initial platelet monolayer on a collagen-coated surface under flow visualized using a microfluidic device (Wannemacher, et al. Blood, 2010)

形成全过程和血栓成分的有效仪器。由于造价昂贵,目前国际上只有为数不多的实验室在使用。我们实验室使用的是由哈佛大学 Furie 博士实验室最早报道的仪器配置 31。以下是我们根据孟加拉玫瑰红在 555 nm 的绿光下可被光敏化激活产生活性氧,从而导致血管壁内皮细胞的损伤,暴露内皮下基质中的胶原的特点,造成小鼠提举肌小动脉损伤,并且荧光标记的血小板特异性蛋白整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 抗体,观察、记录和分析了血管损伤微循环血栓形成的全过程。如图 4 所示,Sema4D(-/-)鼠(图 4A)在血管损伤的各个时间段的血栓均明显小于野生型小鼠(图 4B)的血栓,更为重要的发现是,野生型小鼠有 47% 的损伤导致小动脉阻塞,而 Sema4D(-/-)鼠

则无阻塞性血栓发生。这一结果提示轴突导向分子 Sema4D 参与血栓的形成和稳定。另外,对于大中型动脉血管血栓形成的研究多采用三氯化铁颈动脉损

伤模型,该法相对简单、应用普遍。由于篇幅所限,不在此介绍。

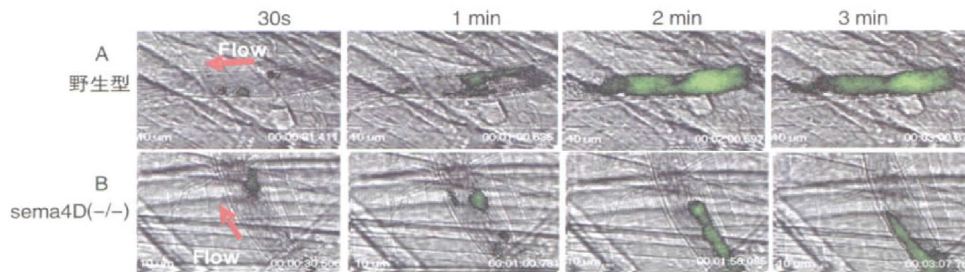


图 4. Sema4D 敲除小鼠血管损伤后微循环血栓形成障碍

Figure 4. Impaired thrombus formation in the microcirculation of Sema4D knockout mice upon vascular injury (Zhu, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2007)

3.2 旗语蛋白 Sema4D 与动脉粥样硬化

血小板和血管壁的相互作用不仅限于急性损伤时的止血作用,血小板也与动脉粥样硬化和动脉粥样硬化斑块破裂的发展和后果紧密相关。在血脂异常状态,血小板对刺激剂呈现出高反应性^[32]。由于我们发现 Sema4D 对血小板功能呈正向调节,所以我们检测了 Sema4D 敲除能否降低血脂异常情况下血小板的高反应性和动脉粥样硬化斑块的发展。我们制备了 Sema4D 和低密度脂蛋白受体 LDLR 双敲除 (Sema4D^{-/-} LDLR^{-/-}) 小鼠,高胆固醇饲料喂养 6 个月后,观察主动脉脂质斑块的大小。与 LDLR 单敲除 (LDLR^{-/-}) 小鼠相比,LDLR 双敲除 (Sema4D^{-/-} LDLR^{-/-}) 小鼠的动脉粥样硬化斑块减小 23% ($P=0.02$),这一差别在降主动脉更加明显,可降低 39% ($P=0.005$;图 5)。机制研究方面,体内和体外实验表明双敲除 (Sema4D^{-/-} LDLR^{-/-}) 小鼠的血小板反应性和动脉微循环血栓的形成和稳定性均降低,说明 Sema4D 可能通过影响血小板活化和血栓形成参与动脉粥样硬化斑块的发展。然而, Sema4D 也在免疫细胞表达,T 细胞 Sema4D 也可能在动脉粥样硬化中发挥作用。该问题可望用 Sema4D 组织特异性敲除小鼠得到证实。

4 结 语

如上所述,对功能研究轴突导向分子早已超出神经系统的范畴,除细胞生长导向作用外,已证明在免疫应答、血管新生、肿瘤转移等过程中发挥作用。在血栓形成过程中,活化的血小板彼此靠近,相邻血小板表面分子之间的相互连接,形成一个反应微环

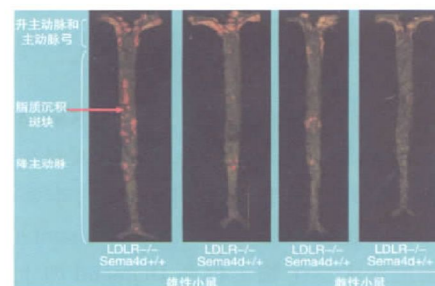


图 5. Sema4D 缺失延缓动脉粥样硬化斑块的形成

Figure 5. Sema4D deletion protects from the development of atherosclerotic plaques. (Zhu, et al. Arteriol Thromb Vasc biol, 2009)

境,在这个微环境中,某些轴突导向分子及其受体,正如它们在神经元突触中支持神经元件信号的传播以及在免疫应答突触中介导免疫细胞间信息的交换一样,在血小板活化、动脉粥样硬化血栓形成等血栓相关性疾病中发挥作用。这些发现无疑为研究血栓和血管性疾病的发病机制、寻找预防诊断和干预的靶点提供了新的亮点。

【参考文献】

- [1] Leslie M. Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets [J]. Science, 328 (5 978): 562-564.
- [2] Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, et al. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation [J]. Nat Med, 2009, 15 (6): 665-673.
- [3] Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, et al. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress [J]. Blood, 2006, 108 (6): 1 903-910.
- [4] Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, et al. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle forma-

- tion under high shear stress [J]. *Blood*, 2006, 107 (9) : 3 537-545.
- [5] Raible DW, McMorris FA. Oligodendrocyte differentiation and progenitor cell proliferation are independently regulated by cyclic AMP [J]. *J Neurosci Res*, 1993, 34 (3) : 287-294.
 - [6] Roth L, Koncina E, Satkauskas S, et al. The many faces of semaphorins: from development to pathology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66 (4) : 649-666.
 - [7] Negishi M, Oinuma I, Katoh H. Plexins: axon guidance and signal transduction [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62 (12) : 1 363-371.
 - [8] Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, et al. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates [J]. *Cell*, 1999, 99 (1) : 71-80.
 - [9] Janssen BJ, Robinson RA, Perez-Branguli F, et al. Structural basis of semaphorin-plexin signalling [J]. *Nature*, 467 (7 319) : 1 118-122.
 - [10] Nogi T, Yasui N, Mihara E, et al. Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor [J]. *Nature*, 467 (7 319) : 1 123-127.
 - [11] Zhu L, Bergmeier W, Wu J, et al. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (5) : 1 621-626.
 - [12] Hall KT, Boumsell L, Schultze JL, et al. Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (21) : 11 780-785.
 - [13] Wang X, Kumanogoh A, Watanabe C, et al. Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses [J]. *Blood*, 2001, 97 (11) : 3 498-504.
 - [14] Basile JR, Afkhami T, Gutkind JS. Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25 (16) : 6 889-898.
 - [15] Basile JR, Barac A, Zhu T, et al. Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B [J]. *Cancer Res*, 2004, 64 (15) : 5 212-224.
 - [16] Moreau-Fauvarque C, Kumanogoh A, Camand E, et al. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion [J]. *J Neurosci*, 2003, 23 (27) : 9 229-239.
 - [17] Ishida I, Kumanogoh A, Suzuki K, et al. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses [J]. *Int Immunol*, 2003, 15 (8) : 1 027-034.
 - [18] Deng S, Hirschberg A, Worzfeld T, et al. Plexin-B2, but not Plexin-B1, critically modulates neuronal migration and patterning of the developing nervous system in vivo [J]. *J Neurosci*, 2007, 27 (23) : 6 333-347.
 - [19] Chabbert-de Ponnat I, Marie-Cardine A, Pasterkamp RJ, et al. Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and plexin B1, respectively [J]. *Int Immunol*, 2005, 17 (4) : 439-447.
 - [20] Delaire S, Billard C, Tordjman R, et al. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration [J]. *J Immunol*, 2001, 166 (7) : 4 348-354.
 - [21] Yamada A, Kubo K, Takeshita T, et al. Molecular cloning of a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CDw108 [J]. *J Immunol*, 1999, 162 (7) : 4 094-100.
 - [22] Suzuki K, Okuno T, Yamamoto M, et al. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin [J]. *Nature*, 2007, 446 (7 136) : 680-684.
 - [23] Pasterkamp RJ, Peschon JJ, Spriggs MK, et al. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs [J]. *Nature*, 2003, 424 (6 947) : 398-405.
 - [24] Kashiwagi H, Shiraga M, Kato H, et al. Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A [J]. *Blood*, 2005, 106 (3) : 913-921.
 - [25] Lewandrowski U, Wortelkamp S, Lohrig K, et al. Platelet membrane proteomics: a novel repository for functional research [J]. *Blood*, 2009, 114 (1) : e10-19.
 - [26] Fong KP, Barry C, Tran AN, et al. Deciphering the human platelet sheddome [J]. *Blood*, 117 (1) : e15-26.
 - [27] Prevost N, Woulfe D, Tanaka T, et al. Interactions between Eph kinases and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation once cell-to-cell contact has occurred [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (14) : 9 219-224.
 - [28] Prevost N, Woulfe DS, Tognolini M, et al. Signaling by ephrinB1 and Eph kinases in platelets promotes Rap1 activation, platelet adhesion, and aggregation via effector pathways that do not require phosphorylation of ephrinB1 [J]. *Blood*, 2004, 103 (4) : 1 348-355.
 - [29] Prevost N, Woulfe DS, Jiang H, et al. Eph kinases and ephrins support thrombus growth and stability by regulating integrin outside-in signaling in platelets [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (28) : 9 820-825.
 - [30] Neeves KB, Maloney SF, Fong KP, et al. Microfluidic focal thrombosis model for measuring murine platelet deposition and stability: PAR4 signaling enhances shear-resistance of platelet aggregates [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6 (12) : 2 193-201.
 - [31] Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, et al. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse [J]. *Nat Med*, 2002, 8 (10) : 1 175-181.
 - [32] Akkerman JW. From low-density lipoprotein to platelet activation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40 (11) : 2 374-378.
 - [33] Zhu L, Stalker TJ, Fong KP, et al. Disruption of sema4d ameliorates platelet hypersensitivity in dyslipidemia and confers protection against the development of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29 : 1 039-045.
 - [34] Yukawa K, Tanaka T, Kishino M, et al. Deletion of sema4d gene reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein e-deficient mice [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26 : 39-44.

(此文编辑 李小玲)