

本文引用: 郑家宝, 周璇, 何兆芬, 等. 血小板胆固醇、脂筏与功能间的关系探究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(10): 835-842. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.10.002.

[文章编号] 1007-3949(2024)32-10-0835-08

• 实验研究 •

血小板胆固醇、脂筏与功能间的关系探究

郑家宝¹, 周璇², 何兆芬¹, 王安妮³, 唐朝君³, 赵颖¹

1. 苏州大学苏州医学院病理与病理生理学系, 2. 苏州大学苏州医学院免疫学系, 3. 苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏省苏州市 215123

[摘要] **[目的]** 探究胆固醇对血小板脂筏含量和血小板功能的调控作用。**[方法]** 利用体外孵育甲基 β 环糊精(M β CD)和体内提升外周血总胆固醇水平来移除和负载血小板胆固醇。霍乱毒素B染色联合流式细胞术检测血小板脂筏含量;荧光抗体染色结合流式细胞术检测P选择素和活化型整合素 α IIb β 3的表达水平;Annexin V标记结合流式细胞术检测磷脂外翻水平;体外实验体系及鼠尾出血实验检测血小板的聚集能力。**[结果]** B淋巴细胞上脂筏的含量随着胆固醇的移除而降低,体外孵育M β CD移除血小板胆固醇反而显著提高其脂筏水平($P<0.05$)。与此一致,体内胆固醇负载增加B淋巴细胞上的脂筏含量却降低血小板的脂筏含量($P<0.05$)。移除胆固醇后增加的脂筏并不利于血小板的活化与聚集功能。体内胆固醇的负载下调血小板脂筏含量($P<0.05$),增强其应答低浓度刺激剂的活化聚集与凝血能力,此增强作用在移除胆固醇后消失。**[结论]** 血小板胆固醇是调控血小板脂筏含量和血小板功能的关键调节因子,可负向调节脂筏,促进血小板活化并增强其凝血功能。

[关键词] 胆固醇; 血小板; 脂筏

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Investigation of the relationships among cholesterol, lipid raft and platelet function

ZHENG Jiabao¹, ZHOU Xuan², HE Zhao fen¹, WANG Anni³, TANG Chaojun³, ZHAO Ying¹

1. Department of Pathology and Pathophysiology, 2. Department of Immunology, Soochow Medical School, Soochow University, 3. Cyrus Tang Medical Institute, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of cholesterol in the regulation of lipid raft and the function of platelets.

Methods Using *in vitro* incubation of methyl β -cyclodextrin (M β CD) and *in vivo* elevation of peripheral blood total cholesterol levels to remove and load platelet cholesterol, respectively. Cholera toxin B staining combined with flow cytometry was used to detect platelet lipid raft content, fluorescence antibody staining combined with flow cytometry was used to detect the expression levels of P-selectin and activated integrin α IIb β 3, annexin V labeling combined with flow cytometry was used to detect the level of phospholipid efflux, *in vitro* experimental system and rat tail bleeding experiment were used to detect platelet aggregation ability.

Results The content of lipid raft on B lymphocytes decreased with the removal of cholesterol, while *in vitro* incubation of M β CD to remove platelet cholesterol significantly increased its lipid raft level ($P<0.05$). Consistent with this, *in vivo* cholesterol loading increased the lipid raft content of B lymphocytes but decreased the lipid raft content of platelets ($P<0.05$). The increase in lipid raft after removing cholesterol was not conducive to platelet activation and aggregation function. *In vivo* cholesterol loading downregulated platelet lipid raft content ($P<0.05$), enhanced its ability to respond to low concentration stimulant for activation aggregation and coagulation, and this enhancing effect disappeared after cholesterol removal.

Conclusion Platelet cholesterol is a key regulator of platelet lipid raft content and platelet function, which can negatively regulate lipid raft, promote platelet activation, and enhance their coagulation function.

[KEY WORDS] cholesterol; platelet; lipid raft

[收稿日期] 2023-11-01

[修回日期] 2024-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81470564, 81970371);江苏高校优势学科建设工程资助项目

[作者简介] 郑家宝, 硕士, 研究方向为胆固醇稳态与动脉粥样硬化, E-mail: jiabaozheng01@163.com。通信作者赵颖, 博士, 副教授, 研究方向为胆固醇稳态与动脉粥样硬化, E-mail: yzhao@suda.edu.cn。

血小板是来源于巨核细胞的无核血细胞,直径 $2\sim 4\ \mu\text{m}$,在血液中寿命不足10天,经脾脏和肝脏清除^[1]。循环中的血小板主要参与止血与凝血过程,在正常生理状态下处于静息状态。当血管壁损伤暴露胶原蛋白或释放血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)时,血小板上膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 和 GPIIb α 可与之结合进而活化并牢固地黏附在受损内皮细胞表面。活化血小板内的级联信号传导引发血小板脱颗粒并释放活性介质如二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)和凝血酶等,进一步活化周围的血小板导致其大量聚集,最终形成血栓^[2-3]。ADP、凝血酶和胶原是常见的血小板致聚剂或激活剂,可与血小板膜上的特定受体结合启动各自的信号传导通路,进而诱发血小板形态改变、颗粒释放和聚集等一系列反应^[4]。ADP 是血小板的弱刺激剂,ADP 激活血小板主要通过两个 G 蛋白偶联受体(与 G_i 偶联的 P2Y₁₂ 受体^[5]及与 G_q 偶联的 P2Y₁ 受体^[6])来实现。血小板活化释放的内源性 ADP 能够增强血小板对自身及其他刺激剂的应答,进而促进血栓形成。凝血酶是血小板的强刺激剂,主要与 G 蛋白偶联受体的一个小家族蛋白酶激活受体(protease-activated receptor, PAR)结合^[7]。PAR 受体被凝血酶切割激活后启动 G_q 和 G_{13} 介导的两条信号通路,从而诱发血小板形态的改变以及脱颗粒^[8]。此外,胶原蛋白也是血小板的强刺激剂,可与血小板上 GPIIb/IIIa 和 GPIIb 受体结合介导血小板释放 ADP 和血栓素 A₂ 等,从而促进血栓形成^[9-10]。

大量研究结果显示胆固醇是调节血小板反应性的重要因素^[11-12],这极可能与血小板膜上富含胆固醇和鞘磷脂的脂筏(lipid raft, LR)结构域有关。因为血小板表面 vWF 的受体 GPIIb-IX-V 复合物^[13]以及 ADP 受体 P2Y₁₂ 偶联的 G_i 蛋白^[14]等均定位于 LR 上,LR 亦参与了凝血酶受体 PAR1 诱导的血小板活化^[15]。研究发现高脂血症患者体内的多种因素都可促进血小板活化,胆固醇负载也可提高血小板对刺激剂的应答^[16]。而体外利用甲基 β 环糊精(methyl β -cyclodextrin, M β CD)移除血小板膜上胆固醇则会抑制血小板的活化^[17]。这提示,高胆固醇血症中血小板的高反应性可能与胆固醇水平影响了 LR 的结构和功能有关。但是,血小板上的胆固醇水平与 LR 含量之间的关系以及血小板 LR 含量与血小板功能之间的关系都尚不清楚。本研究通过改变血小板上的胆固醇水平来观察其对 LR 含量的影响,并检测血小板 LR 含量与其功能之间的

关系,深入探讨血小板胆固醇稳态对血小板功能的影响及其机制,为防治心血管类疾病提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6 遗传背景的野生型小鼠与低密度脂蛋白受体基因敲除(low density lipoprotein receptor knockout, LDLR KO)小鼠购自卡文斯百格模式动物研究有限公司,饲养于苏州大学实验动物中心(SPF 级)。本研究所用实验小鼠和实验操作均通过苏州大学实验动物伦理审查委员会审批。

1.2 主要材料和试剂

血细胞分析仪(BC-2800Vet 迈瑞,中国);Eppendorf 管(Corning-Axygen,美国);流式细胞仪(BD FACS Calibur,美国);CD41 抗体、CD19 抗体、CD62p 抗体、Streptavidin 抗体、IC Fixation Buffer(eBioscience, 美国);整合素 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Emfret, 美国);PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences, 美国);胶原蛋白、凝血酶、血小板聚集仪(Chrono-log, 美国);ADP、前列腺素 E₁ (prostaglandin E₁, PGE₁)、M β CD、霍乱毒素 B 亚基(cholera toxin B subunit, CTB)-biotin、Filipin(Sigma, 美国)。

1.3 动物模型的建立

8~10 周龄的 C57BL/6 和 LDLR KO 小鼠随机分成两组:喂食普通饲料(苏州双狮)的正常饮食小鼠作为对照组($n=5$),喂食 2 周高脂高胆固醇饲料(含有 21% 脂肪、50% 糖类、20% 蛋白质,美国 Research Diet)的西式饮食(western type diet, WTD)小鼠作为实验组($n=5$)。

1.4 细胞的分离与制备

脾细胞:脾脏剪碎经研磨后用 $70\ \mu\text{m}$ 细胞筛网过滤获得脾细胞;红细胞裂解液用于清除红细胞。血小板细胞:1% 戊巴比妥钠(100 mg/kg)腹腔注射,待小鼠深度麻醉后,用胶布将其固定于平板上,沿腹白线剪开腹部,暴露出下腔静脉,1 mL 注射器抽吸下腔静脉中的血液后移至 1.5 mL Eppendorff 管,并用 Tyrode's buffer 补足 1.5 mL,1 $\mu\text{mol/L}$ PGE₁ 混匀,以抑制血小板活化。离心获取血小板沉淀,重悬于适量的 Tyrode's buffer 中,调整血小板终浓度为 1×10^8 个/mL。

1.5 M β CD 移除细胞胆固醇

B 淋巴细胞或血小板:实验组加入 M β CD(终浓度 10 mmol/L),对照组仅加入等体积的 Tyrode's buffer,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,离心去除 M β CD。

1.6 Filipin 染色检测血小板胆固醇含量

取适量 Filipin 粉末溶于 DMSO (25 g/L), 再用 PBS 稀释 100 倍, 用于染色。血小板分离之后先用 1% 多聚甲醛溶液固定 30 min, 然后按 1×10^8 浓度与等体积的 Filipin 溶液避光孵育 30 min, 最后加入 3 倍体积的 PBS 终止孵育。流式细胞仪检测后使用 FlowJo 软件分析 Filipin 的平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI)。

1.7 流式细胞术检测

B 淋巴细胞和血小板 LR 含量: 脾细胞和血小板分别于 4 °C 孵育 CD19 抗体 (1 : 200) 和 CD41 抗体 (1 : 200) 10 min, 终止孵育后用 IC Fixation Buffer 室温固定 30 min, 随后再用 50 mg/L CTB-biotin 溶液于 4 °C 孵育 30 min, 最后用 PERCP 标记的 Streptavidin 抗体 (1 : 100) 结合 FACS Calibur 流式细胞仪检测, 使用 FlowJo 软件分析 LR 的 MFI。

血小板表面活化型 α II b β 3 和 P 选择素的表达: 抗体 CD41 (1 : 400)、CD62p (1 : 200)、活化型 α II b β 3 (1 : 20) 预先加入实验组与对照组的孵育管中, 刺激剂及 CaCl_2 (终浓度为 1 mmol/L) 与实验组血小板于 37 °C 孵育 15 min, 等体积等含量 CaCl_2 的生理盐水用于孵育对照组血小板。孵育结束后加入大量 PBS (孵育体积 20 倍, 终止刺激), 30 min 内完成流式细胞仪检测, 使用 FlowJo 软件分析血小板上活化型 α II b β 3 和 P 选择素的 MFI。

血小板膜磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 的外翻: 实验组加入血小板刺激剂 [惊厥毒素 (convulxin, CVX) 30 $\mu\text{g/L}$ 或 CVX 30 $\mu\text{g/L}$ + 凝血酶 (0.01 kU/L)] 及 CaCl_2 (终浓度为 1 mmol/L), 对照组加入等体积等含量 CaCl_2 的生理盐水。室温孵育 15 min, 加入 10 倍体积的 1 $\times$ Annexin V Binding Buffer 终止刺激, 随后加入 Annexin V 抗体 (1 : 100) 和 CD41 抗体 (1 : 400), 混匀后室温避光孵育 30 min, 最后加入 Annexin V Binding Buffer 终止反应, 于 30 min 内完成流式细胞仪检测, 使用 FlowJo 软件分析 Annexin V 阳性血小板的比例。

1.8 血小板聚集实验

37 °C 预热血小板聚集仪和反应杯 10 min。先将反应杯中的血小板悬液与 CaCl_2 (终浓度为 1 mmol/L) 孵育 5 min, 再将反应杯放到样本孔, 参比物 (Tyrode's buffer) 的反应杯为对照孔, 37 °C 恒温 1 200 r/min 恒速搅拌下设置 0% 和 100% 透光率的基线, 随后用微量加样枪加入适宜浓度的血小板刺激剂, 仪器记录聚集曲线的变化, 运行 5 ~ 6 min 后停止聚集反应。

1.9 鼠尾出血时间测定

小鼠麻醉后置于 37 °C 恒温电热毯, 使其体温保持恒定, 确认小鼠进入深外科期后, 在距离鼠尾末端 3 mm 处用无菌手术刀片割断鼠尾, 浸入盛有 37 °C 生理盐水的离心管中, 从鼠尾末端出现红色血流开始计时, 待红色血流消失时停止计时, 此时间间隔即为鼠尾出血时间, 出血时间的记录上限为 10 min。

1.10 统计学分析

使用 Graphpad Prism 8 软件对数据进行统计分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较根据正态分布和标准偏差结果选用独立样本 *t* 检验或非参数检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 体外移除胆固醇增加血小板 LR 含量并抑制其活化与凝血功能

胆固醇是 LR 的主要成分。利用 M β CD 移除细胞膜上的胆固醇可显著降低免疫细胞膜上 LR 的含量^[18-19]。M β CD (10 mmol/L) 孵育可使 B 淋巴细胞 LR 的含量降低 ($P < 0.05$; 图 1A)。相反, 尽管 M β CD 孵育也使血小板上自由胆固醇的含量降低 ($P < 0.05$; 图 1B), 但其 LR 的含量却增加 ($P < 0.05$; 图 1C)。这一结果表明胆固醇对血小板和淋巴细胞 LR 含量的影响截然不同。

流式细胞术检测发现, M β CD 孵育移除胆固醇可提升 LR 对血小板活化的影响。选用凝血酶、CVX 和 ADP 激活血小板并检测其诱导表达 P 选择素的水平, 与静息状态相比, 不同刺激剂都显著上调血小板表面 P 选择素的表达; 移除胆固醇提升 LR 使静息血小板表面 P 选择素的表达量升高 ($P < 0.05$); M β CD 孵育却显著降低血小板应答强刺激剂 (凝血酶、CVX) 后 P 选择素的表达水平 ($P < 0.05$), 相反, 血小板应答弱刺激剂 (ADP) 的活化并没有因为胆固醇的移除而有所改变 (图 1D)。

血小板表面整合素 α II b β 3 的活化可与纤维蛋白原结合进而导致血小板聚集, 而活化血小板上 PS 的外翻也可加速内生凝血级联中凝血酶的生成与凝血的发生^[20]。因此, 血小板表面活化型 α II b β 3 和 PS 的水平可反映其聚集促凝血的能力。本研究发现, 移除胆固醇不仅使静息血小板上活化型 α II b β 3 的表达量降低, 还使其应答刺激剂 (凝血酶、CVX、ADP) 后的活化型 α II b β 3 表达量显著降低 (图 1E)。其中, 应答凝血酶后血小板上活化型

α II b β 3 的表达量降低约 40% ($P<0.05$), 应答 CVX 和 ADP 后血小板上活化型 α II b β 3 的表达量降低了约 85% ($P<0.05$)。尽管移除胆固醇并不影响静息状态血小板上 PS 的外翻水平, 但 M β CD 孵育的血小板在强刺激剂 (CVX、CVX+凝血酶) 作用下 PS 的外翻水平均降低 ($P<0.05$; 图 1F)。与此一致, 体

外血小板聚集实验也显示移除胆固醇提升 LR 已完全阻断了血小板应答凝血酶与胶原后的聚集 (图 1G)。

以上结果表明, 移除胆固醇尽管增加血小板 LR, 却显著地抑制了血小板的活化与凝血功能。

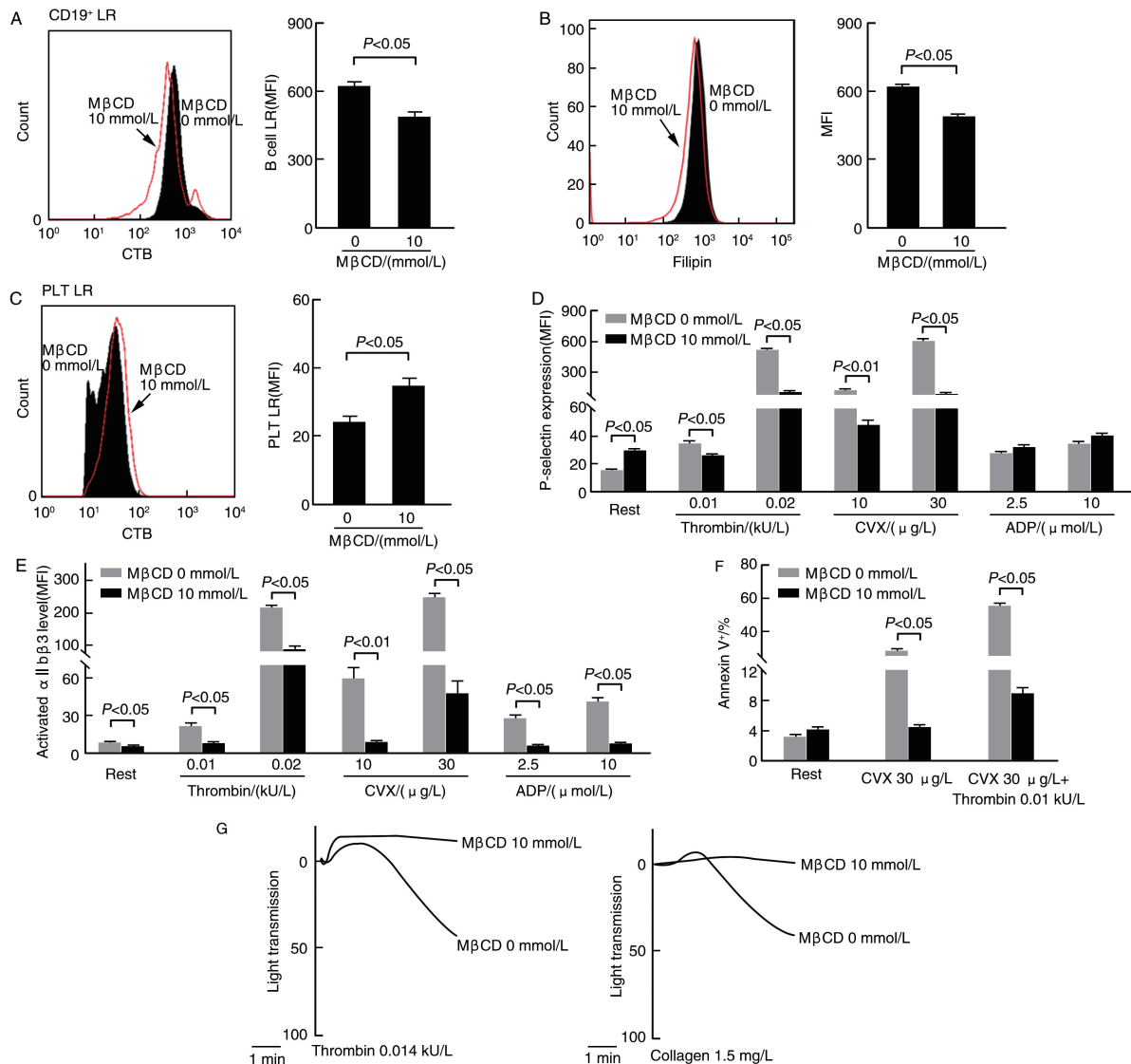


图 1. 体外移除胆固醇对血小板 LR 含量、活化与凝血功能的影响

A 为 M β CD 孵育移除胆固醇后 B 淋巴细胞上 LR 的含量, B、C 为 M β CD 孵育移除胆固醇后血小板上自由胆固醇和 LR 的含量, D、E 和 F 为移除胆固醇后血小板应答不同刺激剂表达 P 选择素与活化型 α II b β 3 的水平以及 PS 阳性血小板的比例, G 为移除胆固醇后血小板的聚集能力。

Figure 1. Effects of cholesterol removal *in vitro* on platelet LR content, activation and coagulation function

2.2 体内负载胆固醇降低血小板 LR 含量并增强其活化与凝血功能

为了探究血小板胆固醇含量增加对其 LR 含量与功能的影响, 给予野生型小鼠 2 周 WTD 来提升外

周血总胆固醇水平, 进而实现血小板的胆固醇负载。与正常饮食小鼠的血小板相比, WTD 小鼠体内血小板 LR 的含量显著降低 ($P<0.05$; 图 2A)。然而, 胆固醇的体内负载却增强了血小板的活化与聚

集能力,表现为应答低剂量刺激剂时血小板上 P 选择素的表达量升高 150% ($P < 0.05$),活化型 $\alpha IIb\beta3$ 的表达量升高 610% ($P < 0.01$)。相反,血小板对高剂量各刺激剂的应答并不受体内胆固醇负载的影响(图 2B 和 2C)。此外,胆固醇负载还使血小板应答强刺激剂(CVX、CVX+凝血酶)后 PS 的外翻水平显著提升($P < 0.05$;图 2D)。与这些结果一致,WTD 野生型小鼠的自发止血时间较正常饮食小鼠显著缩短($P < 0.05$;图 2E)。

运用 LDLR KO 来评估体内胆固醇负载对血小板功能的影响。WTD 喂养显著提升了 LDLR KO 小鼠的外周血总胆固醇水平,且 Filipin 染色显示 WTD 喂养小鼠血小板上自由胆固醇水平也显著升高($P < 0.05$;图 3A)。升高血脂负载胆固醇也使 LDLR KO 小鼠血小板 LR 的含量显著降低($P < 0.01$;图 3B)。体内负载胆固醇可使 B 淋巴细胞 LR 含量显著升高($P < 0.01$;图 3C),这也再次表明细胞膜上胆固醇含量对血小板和淋巴细胞 LR 的影响完全相反。本研究还检测了该小鼠体内负载胆固醇下调 LR 对血小板活化与功能的影响,结果发现:胆固醇负载尽管不影响 LDLR KO 小鼠血小板对高剂量刺激剂的应答,却显著增强了其对低剂量刺激剂应答后表达 P 选择素和活化型 $\alpha IIb\beta3$ 的能力(图 3D 和 3E)。其中,应答低剂量凝血酶后血小板上 P 选择素和活化型 $\alpha IIb\beta3$ 的表达量分别升高约 710% 和 500% ($P < 0.05$),而应答低剂量 CVX 后血小板上 P 选择素和

活化型 $\alpha IIb\beta3$ 的表达量分别升高约 86% 和 45% ($P < 0.05$)。在强刺激剂(CVX、凝血酶)诱导下,胆固醇负载也显著增强了 LDLR KO 小鼠血小板 PS 外翻的水平($P < 0.05$;图 3F)。与这些结果一致,胆固醇负载可显著增强 LDLR KO 小鼠血小板的聚集反应(图 3G 和 3H),而且 WTD 喂养也使 LDLR KO 小鼠的自发止血时间缩短($P < 0.05$;图 3I)。

以上结果表明,体内负载胆固醇降低了血小板 LR 的含量并增强其活化与凝血功能。

2.3 纠正胆固醇依赖性 LR 差异逆转高胆固醇血症中血小板活化与功能的增强

LDLR KO 小鼠体内环境较复杂,为了明确高血脂影响血小板 LR 含量及其功能的胆固醇依赖性,运用 M β CD 移除正常饮食与 WTD 两组 LDLR KO 小鼠血小板的胆固醇,并使两组血小板的 LR 升高至相当水平(图 4A)。结果发现,两组小鼠血小板上的胆固醇移除完全逆转了体内负载胆固醇提升的血小板对低浓度刺激剂的应答,表现为 P 选择素和活化型 $\alpha IIb\beta3$ 的表达均无显著差异(图 4B);M β CD 孵育后的两组血小板 PS 的外翻水平也无显著差异(图 4C)。与这些结果一致,体外聚集实验也发现两组小鼠血小板的聚集能力无明显差异(图 4D)。

以上结果表明,体内负载胆固醇提升血小板的活化与聚集功能确实与胆固醇调节 LR 有关,而胆固醇下调 LR 含量有利于血小板的活化与促凝功能。

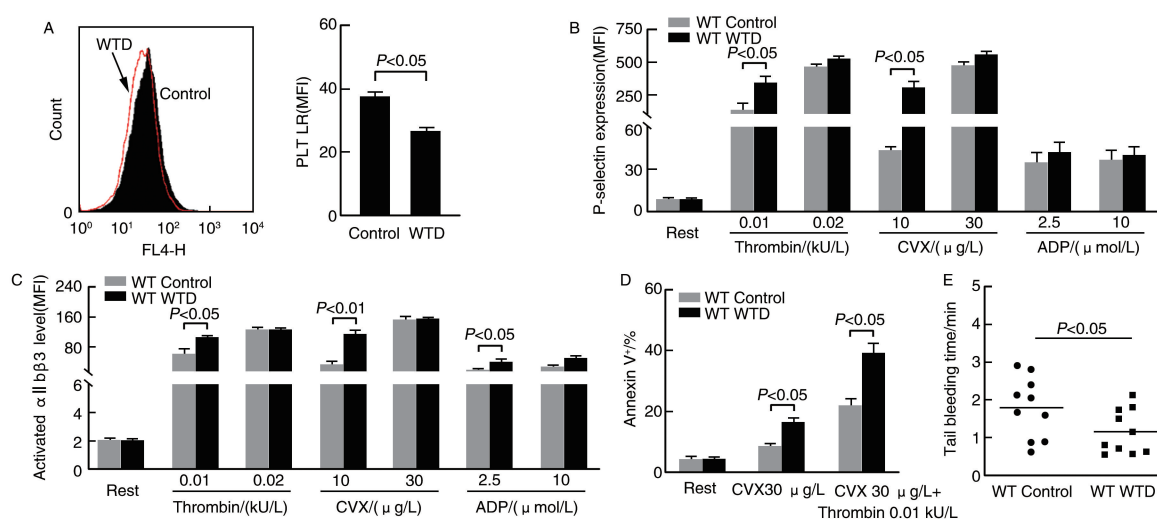


图 2. 野生型小鼠体内负载胆固醇对血小板 LR 含量、活化与凝血功能的影响

A 为野生型小鼠体内负载胆固醇后血小板 LR 的含量,B、C 和 D 为升高血脂负载胆固醇后血小板应答不同刺激剂表达 P 选择素与活化型 $\alpha IIb\beta3$ 的水平以及 PS 阳性血小板的比例,E 为野生型小鼠体内血脂升高增加血小板胆固醇负载后鼠尾的出血时间($n = 10$)。

Figure 2. Effects of *in vivo* cholesterol loading in WT mice on platelet LR content, activation and coagulation function

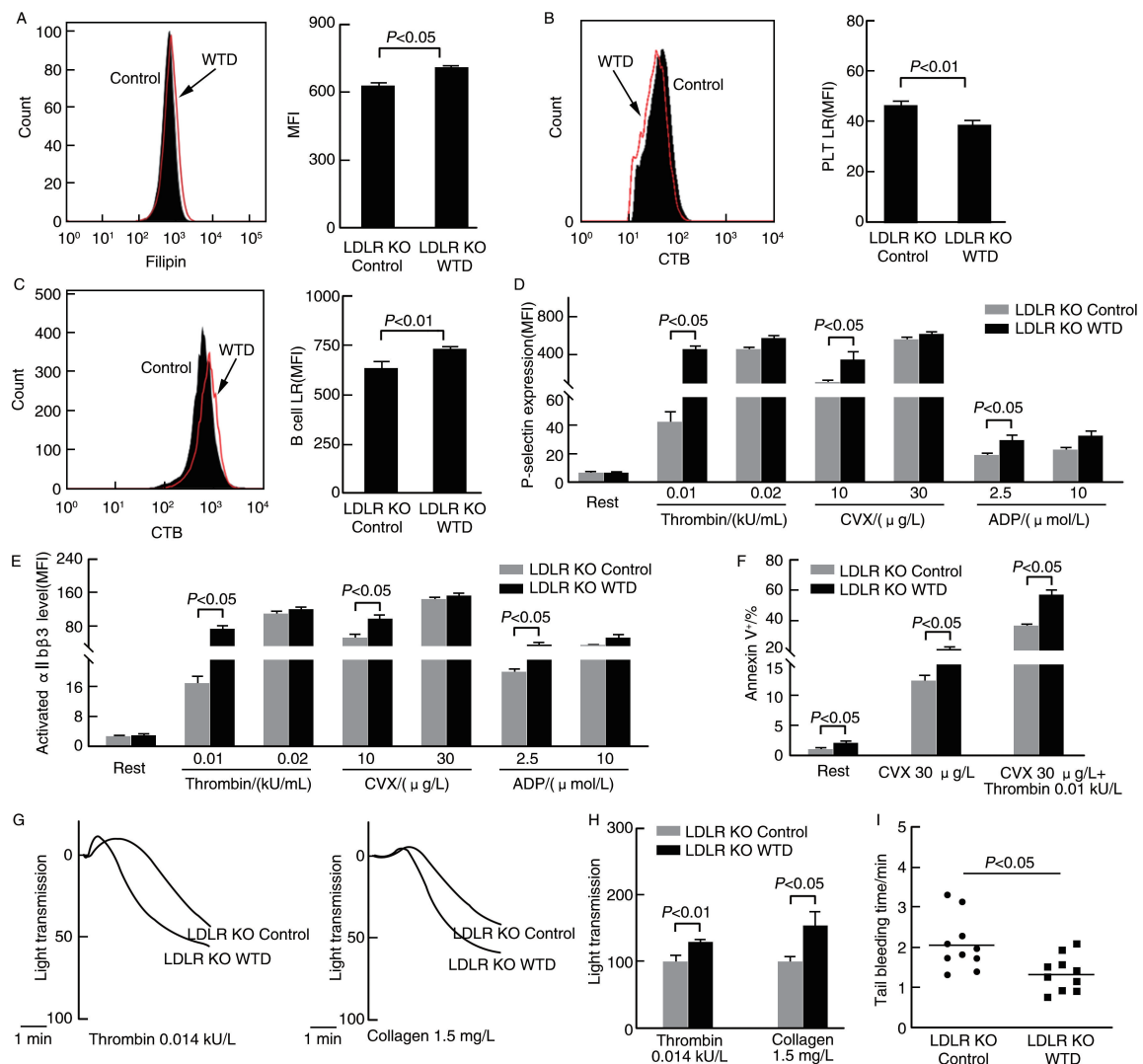


图 3. LDLR KO 小鼠体内负载胆固醇对血小板 LR 含量、活化与功能的影响

A、B 为 LDLR KO 小鼠体内负载胆固醇前后血小板上自由胆固醇和 LR 含量, C 为 LDLR KO 小鼠体内负载胆固醇前后 B 淋巴细胞上 LR 的含量, D、E 和 F 为升高血脂负载胆固醇后应答不同刺激剂表达 P 选择素与活化型 $\alpha IIb\beta 3$ 的水平以及 PS 阳性血小板的比例, G (示意图)、H (统计图) 为体内负载胆固醇后血小板的聚集能力, I 为 LDLR KO 小鼠体内血脂升高增加血小板胆固醇负载后鼠尾的出血时间 ($n=10$)。

Figure 3. Effect of *in vivo* cholesterol loading in LDLR KO mice on platelet LR content, activation and coagulation function

3 讨论

本研究发现, 血小板与免疫细胞不同, 其膜上胆固醇与 LR 的含量呈负相关。尽管胆固醇仍是调控 LR 的关键因素, 但其作用是抑制 LR 中神经节苷脂 GM1 在膜表面的聚集。而且, 血小板的反应性主要受胆固醇调控, GM1 的增多并不利于血小板的活化与聚集。

大量的研究已发现免疫细胞 (如淋巴细胞和巨噬细胞) 上胆固醇的增多可提升膜上 LR 的含量, 而利用 M β CD 移除胆固醇则显著破坏了 LR 的结构, 使 GM1 的含量减少^[21-23]。与此一致, 本研究也发现

移除胆固醇可下调脾脏 B 淋巴细胞上 LR 的含量, 但相同的处理却显著增加了血小板上 LR 的含量。考虑到 M β CD 孵育轻微上调静息血小板上 P 选择素的表达, LR 含量的升高有可能是血小板活化后 GM1 膜向转运增强的结果。然而, 体内胆固醇负载显著抑制了血小板上 LR 的含量, 这些结果提示胆固醇是血小板 LR 内 GM1 含量的负性调节因子。至于胆固醇调控血小板 LR 内 GM1 含量的机制仍有待于进一步研究。

LR 参与了许多分子的信号传导, 因此与细胞的功能密切相关。在免疫细胞上, 移除胆固醇破坏 LR 可显著抑制信号传导进而降低细胞的功能^[22-23]。

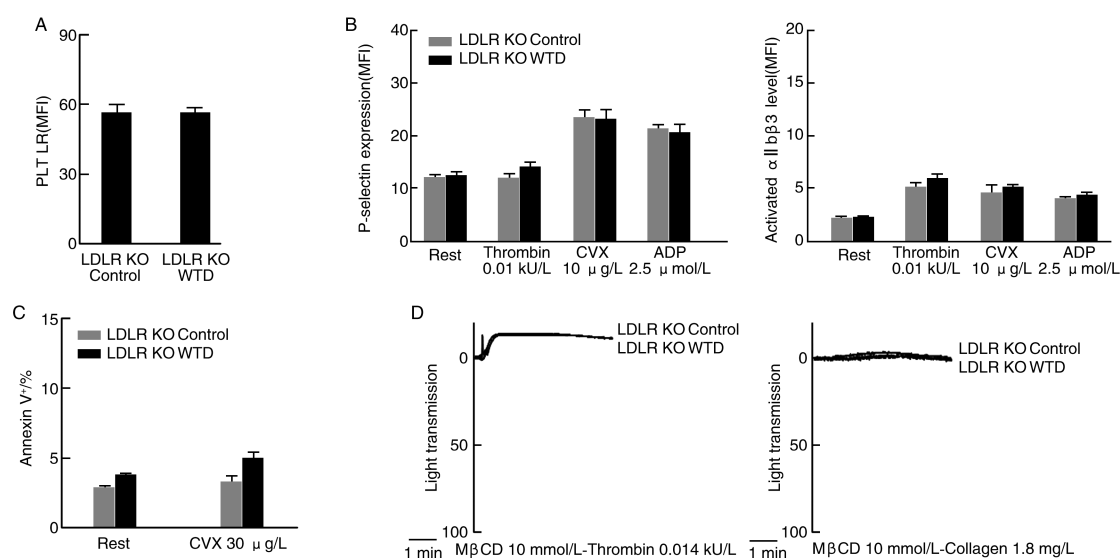


图 4. 体外胆固醇移除逆转体内胆固醇负载对血小板活化与功能的增强作用

A 为 MβCD 孵育纠正了 LDLR KO 小鼠血小板因体内胆固醇负载而减少的 LR 含量, B、C 为 MβCD 孵育逆转了 LDLR KO 小鼠血小板因胆固醇负载而增强的应答低浓度刺激剂表达 P 选择素和活化型 αIIbβ3 的水平以及 PS 的外翻水平, D 为 MβCD 孵育纠正了血小板因体内胆固醇负载而增强的聚集能力。

Figure 4. Cholesterol removal *in vitro* reversed the increase of platelet activation and procoagulation by *in vivo* cholesterol loading in LDLR KO mice

与其他研究一致,本研究也发现移除细胞膜上的胆固醇抑制了血小板的活化与聚集能力,尽管此时细胞膜上 GM1 含量显著升高。与此一致,胆固醇负载可恢复胆固醇缺乏的血小板的功能^[17]。本研究发现,体内胆固醇负载在降低膜表面 GM1 的同时反而提升了血小板的各项功能。这些结果表明胆固醇而不是 GM1 才是保证血小板 LR 上信号传导的关键脂质。已有研究发现血小板活化可改变胆固醇在不同 LR 区的分布^[24],因此推测胆固醇在 LR 上的分布可能也影响着血小板应答刺激的信号传导。

临床研究发现高胆固醇血症比高甘油三酯血症更能提升血小板的反应性^[25]。这可能是体内氧化型低密度脂蛋白通过 CD36 激活血小板的结果^[26-28]。然而,高胆固醇血症患者体内血小板膜上胆固醇浓度的提升^[29]也提示这可能是胆固醇负载增加的结果。与此一致,本研究发现 2 周高脂高胆固醇饮食提升了野生型 LDLR KO 小鼠外周血总胆固醇水平并增强了血小板的活化与聚集功能。值得注意的是,野生型小鼠体内主要提升的是高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平。虽然高密度脂蛋白具有促进胆固醇外流的作用^[30],但 HDLC 升高时,其包含的胆固醇酯是可以通过 SR-B I 介导的通路而被血小板选择性摄入。SR-B I 基因敲除小鼠体内 HDLC 水平也

升高,虽然血小板摄取 HDLC 的通路被阻断,但自由胆固醇水平的升高也增加了该小鼠体内血小板的胆固醇含量及其活化与聚集能力^[31]。这些结果都说明血小板胆固醇的提升可增强其功能,而且与胆固醇的负载方式无关。当然,本研究仍然无法完全排除潜在氧化脂质生成与系统炎症水平升高的影响。已有研究发现促炎因子 IL-12 可增强血小板的反应性^[32]。考虑到 2 周高脂高胆固醇饮食提升血脂对小鼠(尤其是野生型)系统炎症的促发作用十分有限,而且纠正因胆固醇介导的 LR 差异可逆转高脂血症提升的血小板功能,因此认为体内短时的血脂升高主要是通过增加胆固醇摄入来提升血小板的活化与聚集功能。

总之,本研究发现,血小板膜上胆固醇可能是调控血小板 LR 含量以及血小板功能的关键调节因子,其可负向调节 LR,促进血小板的活化并增强其凝血功能。

[参考文献]

- [1] VAN DER MEIJDEN P E J, HEEMSKERK J W M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(3): 166-179.
- [2] SEMPLE J W, ITALIANO J E J R, FREEDMAN J. Platelets and the immune continuum[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(4): 264-274.

- [3] SAVAGE B, ALMUS-JACOBS F, RUGGERI Z M. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow[J]. *Cell*, 1998, 94(5): 657-666.
- [4] 赵凯凯, 白俊琴, 张波. 新型 P2Y₁₂ 受体拮抗剂替格瑞洛广谱抗血小板作用机制的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(2): 180-184.
- ZHAO K K, BAI J Q, ZHANG B. Research progress on the mechanism of broad-spectrum antiplatelet effect of novel P2Y₁₂ receptor antagonist ticagrelor [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(2): 180-184.
- [5] OHLMANN P, LAUGWITZ K L, NÜRNBERG B, et al. The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins[J]. *Biochem J*, 1995, 312(3): 775-779.
- [6] OFFERMANN S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors[J]. *Circ Res*, 2006, 99(12): 1293-1304.
- [7] KAHN M L, ZHENG Y W, HUANG W, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation[J]. *Nature*, 1998, 394(6694): 690-694.
- [8] LI Z, DELANEY M K, O'BRIEN K A, et al. Signaling during platelet adhesion and activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2341-2349.
- [9] GIBBINS J M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 16): 3415-3425.
- [10] EZUMI Y, SHINDOH K, TSUJI M, et al. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets[J]. *J Exp Med*, 1998, 188(2): 267-276.
- [11] AGARWAL S, SAHA S, GHOSH R, et al. Elevated glycosylation of CD36 in platelets is a risk factor for oxLDL-mediated platelet activation in type 2 diabetes[J]. *FEBS J*, 2024, 291(2): 376-391.
- [12] NKAMBULE B B, CHAN M V, LACHAPPELLE A R, et al. The association between platelet reactivity and lipoprotein levels in Framingham heart study participants [J]. *Thromb Res*, 2023, 225: 103-109.
- [13] SHRIMPTON C N, BORTHAKUR G, LARRUCEA S, et al. Localization of the adhesion receptor glycoprotein Ib-IX-V complex to lipid rafts is required for platelet adhesion and activation[J]. *J Exp Med*, 2002, 196(8): 1057-1066.
- [14] QUINTON T M, KIM S, JIN J, et al. Lipid rafts are required in G α_i signaling downstream of the P2Y₁₂ receptor during ADP-mediated platelet activation[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(5): 1036-1041.
- [15] BODIN S, TRONCHÈRE H, PAYRASTRE B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1610(2): 247-257.
- [16] SAPUTRI F C, AZMI N U, PUTERI M U, et al. High-fat diet enhances platelet activation and is associated with proprotein convertase subtilisin kexin 9: an animal study[J]. *Nutrients*, 2023, 15(20): 4463.
- [17] SHIRAIISHI M, TANI E, MIYAMOTO A. Modulation of rabbit platelet aggregation and calcium mobilization by platelet cholesterol content[J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(3): 285-292.
- [18] ROTHBLAT G H, DE LA LLERA-MOYA M, ATGER V, et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights[J]. *J Lipid Res*, 1999, 40(5): 781-796.
- [19] SILVIUS J R. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1610(2): 174-183.
- [20] LHERMUSIER T, CHAP H, PAYRASTRE B. Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome[J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(10): 1883-1891.
- [21] ZHU X, LEE J Y, TIMMINS J M, et al. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific ABCA1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(34): 22930-22941.
- [22] MAÑES S, VIOLA A. Lipid rafts in lymphocyte activation and migration (Review) [J]. *Mol Membr Biol*, 2006, 23(1): 59-69.
- [23] PIZZO P, VIOLA A. Lipid rafts in lymphocyte activation[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(7): 686-692.
- [24] RABANI V, MONTANGE D, MENEVEAU N, et al. Impact of ticagrelor on P2Y₁ and P2Y₁₂ localization and on cholesterol levels in platelet plasma membrane [J]. *Platelets*, 2018, 29(7): 709-715.
- [25] CHETTY N, NARAN N H. Platelet hyperreactivity in hyperlipidaemia with specific reference to platelet lipids and fatty acid composition[J]. *Clin Chim Acta*, 1992, 213(1/3): 1-13.
- [26] GHOSH A, MURUGESAN G, CHEN K, et al. Platelet CD36 surface expression levels affect functional responses to oxidized LDL and are associated with inheritance of specific genetic polymorphisms [J]. *Blood*, 2011, 117(23): 6355-6366.
- [27] PODREZ E A, BYZOVA T V, FEBBRAIO M, et al. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype[J]. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1086-1095.
- [28] MAGWENZI S, WOODWARD C, WRAITH K S, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade[J]. *Blood*, 2015, 125(17): 2693-2703.
- [29] PANES O, GONZÁLEZ C, HIDALGO P, et al. Platelet tissue factor activity and membrane cholesterol are increased in hypercholesterolemia and normalized by rosuvastatin, but not by atorvastatin [J]. *Atherosclerosis*, 2017, 257: 164-171.
- [30] CALKIN A C, DREW B G, ONO A, et al. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux[J]. *Circulation*, 2009, 120(21): 2095-2104.
- [31] KORPORAAL S J, MEURS I, HAUER A D, et al. Deletion of the high-density lipoprotein receptor scavenger receptor BI in mice modulates thrombosis susceptibility and indirectly affects platelet function by elevation of plasma free cholesterol[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 34-42.
- [32] PAGE M J, BESTER J, PRETORIUS E. Interleukin-12 and its procoagulant effect on erythrocytes, platelets and fibrin(ogen): the lesser known side of inflammation[J]. *Br J Haematol*, 2018, 180(1): 110-117.