

血小板活化相关信号转导机制研究进展

张鹏 刘东升 张俊峰

(上海交通大学医学院附属第九人民医院心血管内科, 上海 201900)

【摘要】 动脉血栓的形成是一个十分复杂的病理生理过程, 涉及血小板、血管以及凝血抗凝系统间的相互作用, 而血小板活化是动脉血栓形成的关键环节。现通过回顾近年相关文献并结合最新研究结果, 对以黏附受体和 G 蛋白偶联受体为核心的血小板活化相关信号转导过程, 以及抗血小板药物的临床使用与研发进行综述。

【关键词】 血小板活化; 信号转导; 黏附受体; G 蛋白偶联受体; 抗血小板药物

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.10.019

Signal Transduction Mechanism Related to Platelet Activation

ZHANG Peng, LIU Dongsheng, ZHANG Junfeng

(Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201900, China)

【Abstract】 The formation of arterial thrombosis is an extremely complex pathophysiological process, which involves the interaction between platelets, blood vessels and the coagulation and anticoagulation system, and platelet activation plays a crucial role in the formation of arterial thrombosis. By reviewing the recent literatures and combining with the latest research results, we reviewed the signal transduction process related to platelet activation with adhesion receptor and G-protein-coupled receptor as the core, as well as the clinical application and research of antiplatelet drugs.

【Key words】 Platelet activation; Signal transduction; Adhesion receptors; G-protein-coupled receptors; Antiplatelet drugs

近年来, 以心肌梗死和缺血性卒中为主的动脉血栓性疾病患者众多而致死、致残率高, 严重影响中国居民的健康^[1]。动脉血栓的形成是一个十分复杂的病理生理过程, 涉及血小板、血管以及凝血抗凝系统间的相互作用, 而血小板活化是动脉血栓形成过程中的关键环节。

血小板活化相关信号转导过程主要由黏附受体和 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCR) 这两大类受体介导。胶原通过黏附受体激活血小板, 血小板受刺激后会释放大量可溶性激动剂, 和局部产生的凝血酶一起通过 GPCR 进一步促进血小板活化。事实上, 血小板活化过程非常复杂, 涉及多种激动剂和信号通路。本文结合最新研究结果, 对血小板活化相关信号转导过程及抗血小板药物现状做一综述。

1 胶原通过黏附受体介导的信号转导

1.1 血小板黏附受体

1.1.1 糖蛋白 Ib-IX-V 复合物

糖蛋白 (glycoprotein, GP) Ib-IX-V 复合物高表达于血小板表面, 类属富含亮氨酸的重复蛋白家族。血小板的募集需该复合物中的 GP Ib α 亚基特异性识别并结合血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 的 A1 结构域, 而血小板的活化则需二者之间的机械传感信号^[2]。GP Ib α 上存在一个机械敏感区域, 当受到依赖 vWF 的拉力时, 该区域会发生去折叠和延伸^[3]。其亮氨酸重复结构域也能在 vWF 介导的拉力下去折叠, 亮氨酸重复结构域和机械敏感区域的构象变化在依赖 vWF 的拉力传导中通过不同的作用, 触发由 Ca²⁺ 升高引起的细胞内信号转导^[4]。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81670316)

通信作者: 张俊峰, E-mail: jfzhang_dr@163.com

1.1.2 免疫受体酪氨酸激活基序偶联受体

1.1.2.1 GPVI: GPVI 是一种血小板特异性 I 型跨膜受体,它与含有 Fc 受体 γ 链的免疫受体酪氨酸激活基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs, ITAM) 非共价结合。胶原诱导的 GPVI 聚集导致 Src 家族酪氨酸激酶磷酸化 Fc 受体 γ 链从而启动酪氨酸磷酸化级联反应^[5],激活磷脂酶 C 亚型、3-磷酸肌醇激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 和小 G 蛋白家族等效应蛋白。

1.1.2.2 C 型凝集素样受体-2: C 型凝集素样受体-2 是一种 C 型凝集素样的 II 型跨膜受体,在血-淋巴分离的发育过程中起关键作用,与血栓的形成和稳定性有关。通常认为, C 型凝集素样受体-2 的半免疫受体酪氨酸激活基序先在 Src 家族的作用下发生磷酸化,然后通过酪氨酸激酶的 SH2 结构域相互作用,加强半免疫受体酪氨酸激活基序的磷酸化以促进信号转导^[5],但 Haining 等^[6]最近研究发现 C 型凝集素样受体-2 可不依赖该序列活化,只作为黏附受体发挥作用。

1.1.3 整合素受体

血小板的牢固黏附由整合素受体介导,它们是由 α 和 β 链组成的异源二聚体跨膜蛋白家族。血小板表达多种整合素受体,其中 $\alpha 2\beta 1$ (胶原受体) 和 $\alpha IIb\beta 3$ (也称 GPIIb/IIIa) 最为重要。 $\alpha IIb\beta 3$ 的主要配体是纤维蛋白原,此外还有纤维蛋白和 vWF 等。在激动剂刺激下,整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 的细胞质尾巴与细胞内蛋白 (kindlin 和 talin) 结合,导致细胞外结构域的构象变化,暴露出配体的结合位点,使 $\alpha IIb\beta 3$ 对其配体从低亲和力转为高亲和力状态。目前认为,整合素的完全激活需二者的协作^[7], kindlin 的二聚体形式可桥接 talin 激活的整合素^[8],从而增强 talin 与 $\beta 3$ 整合素膜近端结构域的相互作用,而 kindlin 不能单独激活整合素^[9]。

1.2 胶原对血小板的活化作用

一般情况下,血管内皮破损会显露出下层胶原,血浆中的血小板在 vWF 的协助下可通过 GPIIb-IX-V 复合物黏附在受损处的胶原上。与此同时,血小板还可凭借 GPVI 直接与下层胶原结合,共同启动血小板活化。各种血小板激活信号最终诱导整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 从低亲和力转为高亲和力状态,通过与其配体结合形成稳定的血小板血栓。

2 激动剂通过 GPCR 介导的血小板活化

2.1 GPCR 的结构与种类

GPCR 是一大类膜蛋白受体的统称,其偶联的 G 蛋白具有 $\alpha\beta\gamma$ 三个亚基。激动剂与 GPCR 结合会刺激 G 蛋白的 α 亚基与另两个亚基分离, G 蛋白随之激

活,而具体的下游效应与 α 亚基的种类有关。人类血小板表达的 $G\alpha$ 分别属于 G_s 、 G_i 、 G_q 和 $G_{12/13}$ 家族。

2.2 GPCR 介导的信号转导

2.2.1 $G\alpha_q$ 介导的信号转导

与 $G\alpha_q$ 偶联的受体包括 P_2Y_1 受体、蛋白酶激活受体 (protease-activated receptor, PAR) 和 TP 受体,分别由二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP)、凝血酶和血栓素 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 激活。 $G\alpha_q$ 可活化磷脂酶 C,进而水解磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸产生 1,4,5-三磷酸肌醇和二脂酰甘油 (diacylglycerol, DAG),二者分别可提高细胞内 Ca^{2+} 的浓度和激活蛋白激酶 C。

血小板内 Ca^{2+} 浓度的升高触发许多关键事件,如通过 CaDAG-GEF/Rap1/RIAM 途径激活整合素。 Ca^{2+} 浓度的升高促进了与 DAG 调控相关鸟嘌呤核苷酸交换因子 (CaDAG-GEF) 的释放, CaDAG-GEF 可刺激 GDP 交换 GTP,形成结合 GTP 的小 GTP 酶 RAS 相关蛋白 (Rap1) 活性形式^[10]。以往认为,活性 Rap1 与接头分子 (Rap1-interacting adaptor molecule, RIAM) 结合,启动由 RIAM 介导的 talin 的募集与活化,从而促进整合素的激活。虽然 RIAM 对白细胞的整合素激活具有关键作用,但 RIAM 缺乏并不影响血小板整合素的激活。最新研究发现, Rap1-talin 直接相互作用对调节小鼠血小板整合素的活化具有重要作用^[11]。Gingras 等^[12]发现 talin F1 结构域有一个独特的环,该环与膜脂结合会形成瞬时螺旋结构,引发的电荷变化可激活整合素。Talin F1 结构域中检测到一个新的 Rap1 结合位点, Rap1 可通过该位点与 talin 直接相互作用,引起整合素的激活。Bromberger 等^[13]对成纤维细胞的整合素活化过程进行了研究,表明 talin 与 Rap1 的相互作用还需其 F0 结构域和膜脂的协助,血小板也可能存在类似机制。

蛋白激酶 C 是丝/苏氨酸激酶,可磷酸化多种蛋白酶的丝/苏氨酸残基,促进整合素激活、激动剂释放和血小板聚集,是 $G\alpha_q$ 途径的一个关键酶。

2.2.2 $G\alpha_i$ 和 $G\alpha_s$ 介导的信号转导

与 $G\alpha_i$ 偶联的受体包括 P_2Y_{12} 受体和肾上腺素 α_2 受体,分别由 ADP 和肾上腺素激活。 $G\alpha_i$ 可抑制环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 形成和激活下游效应器,如 PI3K、Src 家族成员和 Rap1b 等。

ADP 和前列环素可分别通过 P_2Y_{12} 受体和 IP 受体激活对应的 $G\alpha_i$ 和 $G\alpha_s$ 。 $G\alpha_s$ 能刺激腺苷酸环化酶促进 cAMP 的合成, $G\alpha_i$ 则抑制该反应。研究表明,作为第二信使的 cAMP 水平降低能显著促进血小板的活化,其水平升高则表现为抑制, $G\alpha_i$ 激活引起的 cAMP 减少对促进血小板活化非常重要^[14]。

人血小板表达四种 PI3K 亚型(α 、 β 、 γ 和 δ)，PI3K β 在血小板活化的信号转导中起主要作用，其他三种亚型起辅助作用，如低浓度 GPVI 激动剂刺激血小板活化，需 PI3K α 通过促进 ADP 的分泌来促进 PI3K β 和蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的完全激活^[15]。研究证实，血小板中 PI3K 的效应物包括 Akt 和 Rap1 等。血小板表达的 Akt 有三种亚型 (Akt1、Akt2 和 Akt3)，三者都在血小板的活化中发挥重要作用。Laurent 等^[16] 证实，在高血流量剪切力下，Akt 可通过磷酸化糖原合成酶激酶-3 β 而抑制其活性，促进整合素活化信号的转导，糖原合成酶激酶-3 β 已被证明对血小板活化、凝块回缩和血栓稳定性具有负性调节作用。G α_i 还可通过激活 Src 家族成员以及下调负调控因子 Ras-GTP 酶激活蛋白-3 来持续激活 Rap1b 发挥作用^[17]。

2.2.3 G α_{13} 和 G α_q 介导的细胞骨架重组

与 G α_{13} 和 G α_q 偶联的受体包括 PAR、P₂Y₁ 受体和 TP 受体，分别由凝血酶、ADP 和 TXA₂ 激活。G α_q 和 G α_{13} 可调节血小板的细胞骨架重组，导致血小板形状改变，形成丝足或板足，促进血小板的活化。血小板形状的变化是血小板对激活剂的起始反应，先于血小板聚集。

血小板形状变化的主要调节机制是肌球蛋白轻链的磷酸化，至少涉及两条效应通路：G α_{13} 可通过 RhoA/ROCK 途径激活 Rho 激酶 ROCK，由 ROCK 直接磷酸化蛋白轻链或抑制轻链磷酸酶，减少轻链的去磷酸化水平。G α_q 下游的 Ca²⁺ 可激活轻链激酶，从而增强其磷酸化水平，促进蛋白轻链的依赖性收缩^[18]。RhoA 要从结合 GDP 的非活性形式转换成结合 GTP 的活性形式才能发挥作用，这一转化过程需鸟嘌呤核苷酸交换因子的催化，包括 p115RhoGEF、LARG、Arhgef12 和 Arhgef1 等^[19-20]。

2.3 血小板激动剂对血小板的活化

2.3.1 ADP

ADP 以高浓度储存于血小板内，在血小板受刺激时释放，通过三种嘌呤能受体发挥作用。P₂Y₁ 受体和 P₂Y₁₂ 受体分别偶联 G α_q 和 G α_{13} 发挥效应，而 P₂X₁ 受体是一个 ATP 门控的 Ca²⁺ 通道。Jones 等^[21] 发现 P₂X₁ 和 P₂Y₁ 受体在功能上存在协同作用，由 P₂X₁ 受体引发的 Ca²⁺ 内流可增强 P₂Y₁ 受体激活的 Ca²⁺ 信号和 ADP 诱导的血小板聚集。

2.3.2 凝血酶

凝血酶是血小板强效激活剂，通过 PAR (PAR1 和 PAR4) 激活偶联的 G α_q 和 G α_{13} 发挥作用。PAR4 对凝血酶的亲和力较低，以 P₂Y₁₂ 依赖的方式参与血小板的持续激活，PAR4 和 P₂Y₁₂ 能形成二聚体，二者特异性

直接相互作用可促进 Akt 的激活。最近发现 GP Ib-IX 信号和 PAR 信号之间的协同作用可促使血小板在低浓度凝血酶的作用下活化，这对体内血栓的形成非常重要^[22]。

2.3.3 TXA₂

血小板内不储存 TXA₂，当其被激活时，在血栓素合成酶作用下临时合成并释放 TXA₂，促进活化信号的传递。人血小板表达两种 TP 受体 (TP α 和 TP β)，通过偶联 G α_q 和 G α_{13} 发挥作用。TP 受体在发挥功能时可能需形成二聚体结构，Capra 等^[23] 提出无法形成同源二聚体会导致 TP α 受体介导的血小板活化功能受损。

此外，5-羟色胺和肾上腺素等弱激动剂可增强其他激动剂对血小板的激活作用。这些激动剂通过 GPCR 激活相应的 G 蛋白可引起血小板形状改变、TXA₂ 的合成、胞浆 Ca²⁺ 增加和蛋白磷酸化等多种下游效应，招募并活化更多血小板，促进血小板血栓的形成。

3 总结和展望

目前观点认为，血管内皮破损会显露出下层胶原，vWF 首先和胶原结合，通过与 GP Ib-IX-V 复合物相互作用，使血小板黏附在胶原上，形成不稳定的单层血小板血栓。随后黏附受体 α IIb β 3 活化，与配体结合能力增强，由配体充当桥梁，血小板彼此相连聚集成团，形成稳定的血小板血栓。血小板受刺激后释放大量的激动剂如 ADP 和 TXA₂ 等，通过 GPCR 进一步促进血小板的活化、黏附和聚集，加速血小板血栓的形成。两大类受体介导的信号通路之间存在信号交叉，协同诱导产生复杂的细胞反应。

目前临床上广泛使用的抗血小板药物都是阻断血小板活化过程，如：(1) 阿司匹林抑制环氧化酶活性，最终减少 TXA₂ 的产生；(2) 氯吡格雷、替格瑞洛与 P₂Y₁₂ 受体结合，抑制 ADP 发挥作用；(3) 替罗非班和阿昔单抗抑制 α IIb β 3 和配体结合，阻止血栓形成稳定结构；(4) 双嘧达莫和西洛他唑抑制降解酶活性，稳定 cAMP 的水平。这些经典药物在动脉血栓性疾病的防治中具有重要作用。

此外，为了解决现有抗血小板药物抵抗以及出血等并发症问题，一些针对血小板活化过程其他靶点的新药正在研发。如：(1) Anfiatide (也称 Agkicetin)，是 GPIb-IX-V 抑制剂，Lei 等^[24] 证实其可竞争性地结合 vWF 的识别区，阻止高切变率下血小板的黏附和活化。Anfiatide 不仅可选择性地抑制 GPIb-vWF 的相互作用，而且还能阻碍 GPIb 介导的其他血栓形成途径。一期临床试验结果表明，其对非 ST 段抬高心肌梗死患者是安全且有效的。(2) Cangrelor (商标为 Kengreal)，是一种可逆的 P₂Y₁₂ 抑制剂，目前 FDA 已批准作为 PCI 的辅助

药物,用于降低未接受其他 P_2Y_{12} 抑制剂或 GPIIb/IIIa 拮抗剂治疗的患者围手术期心肌梗死、支架血栓形成和重复冠状动脉血运重建的风险^[25]。(3) Vorapaxar(商标为 Zontivity), 是 PAR1 的可逆竞争性拮抗剂, 已被 FDA 和 EMA 批准用于外周动脉疾病或既往心肌梗死患者, 以降低血栓性事件的发生率^[26]。(4) 由于 PAR1 抑制药物会引发出血, 针对 PAR4 的拮抗剂也在研发。在 Wong 等^[27] 构建的实验动物的出血时间模型中, 抗 PAR4 抗体未造成出血时间的明显延长, 说明它具有进一步研发的价值, 且已完成了与阿司匹林联合用于预防卒中复发的二期临床试验。

血小板活化过程中的多种激动剂、受体和蛋白酶都可能成为研发抗血小板药物的重要靶点, 因此为更好地防治动脉血栓性疾病, 对血小板活化相关信号转导过程的深入研究仍具有显著意义。

参考文献

- [1] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
- [2] Hansen CE, Qiu Y, McCarty OJT, et al. Platelet mechanotransduction[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2018, 20: 253-275.
- [3] Zhang XF, Zhang W, Quach ME, et al. Force-regulated refolding of the mechanosensory domain in the platelet glycoprotein I b-IX complex[J]. Biophys J, 2019, 116(10): 1960-1969.
- [4] Ju L, Chen Y, Xue L, et al. Cooperative unfolding of distinctive mechanoreceptor domains transduces force into signals[J]. Elife, 2016, 5: e15447.
- [5] Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2[J]. J Clin Invest, 2019, 129(1): 12-23.
- [6] Haining EJ, Cherpokova D, Wolf K, et al. CLEC-2 contributes to hemostasis independently of classical hemiTAM signaling in mice[J]. Blood, 2017, 130(20): 2224-2228.
- [7] Gao J, Huang M, Lai J, et al. Kindlin supports platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$ activation by interacting with paxillin[J]. J Cell Sci, 2017, 130(21): 3764-3775.
- [8] Li H, Deng Y, Sun K, et al. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(35): 9349-9354.
- [9] Haydari Z, Shams H, Jahed Z, et al. Kindlin assists talin to promote integrin activation[J]. Biophys J, 2020, 118(8): 1977-1991.
- [10] Stefanini L, Bergmeier W. RAP GTPases and platelet integrin signaling[J]. Platelets, 2019, 30(1): 41-47.
- [11] Bromberger T, Klapproth S, Rohwedder I, et al. Direct Rap1/Talin1 interaction regulates platelet and neutrophil integrin activity in mice[J]. Blood, 2018, 132(26): 2754-2762.
- [12] Gingras AR, Lagarrigue F, Cuevas MN, et al. Rap1 binding and a lipid-dependent helix in talin F1 domain promote integrin activation in tandem[J]. J Cell Biol, 2019, 218(6): 1799-1809.
- [13] Bromberger T, Zhu L, Klapproth S, et al. Rap1 and membrane lipids cooperatively recruit talin to trigger integrin activation[J]. J Cell Sci, 2019, 132(21): jcs235531.
- [14] Raslan Z, Naseem KM. The control of blood platelets by cAMP signalling[J]. Biochem Soc Trans, 2014, 42(2): 289-294.
- [15] Laurent PA, Hechler B, Solinac R, et al. Impact of PI3K α (phosphoinositide 3-kinase α) inhibition on hemostasis and thrombosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(9): 2041-2053.
- [16] Laurent PA, Severin S, Hechler B, et al. Platelet PI3K β and GSK3 regulate thrombus stability at a high shear rate[J]. Blood, 2015, 125(5): 881-888.
- [17] Stefanini L, Paul DS, Robledo RF, et al. RASA3 is a critical inhibitor of RAP1-dependent platelet activation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(4): 1419-1432.
- [18] Feghli S, Tooley WW, Sniadecki NJ. Nonmuscle myosin IIA regulates platelet contractile forces through Rho kinase and myosin light-chain kinase[J]. J Biomech Eng, 2016, 138(10): 1045061-1045064.
- [19] Lu DH, Hsu CC, Huang SW, et al. ARHGEF10 knockout inhibits platelet aggregation and protects mice from thrombus formation[J]. J Thromb Haemost, 2017, 15(10): 2053-2064.
- [20] Qasim H, Karim ZA, Hernandez KR, et al. Arhgef1 plays a vital role in platelet function and thrombogenesis[J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8(9): e011712.
- [21] Jones S, Evans RJ, Mahaut-Smith MP. Ca^{2+} influx through P2X1 receptors amplifies P2Y1 receptor-evoked Ca^{2+} signaling and ADP-evoked platelet aggregation[J]. Mol Pharmacol, 2014, 86(3): 243-251.
- [22] Estevez B, Kim K, Delaney MK, et al. Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein I b-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation[J]. Blood, 2016, 127(5): 626-636.
- [23] Capra V, Mauri M, Guzzi F, et al. Impaired thromboxane receptor dimerization reduces signaling efficiency: a potential mechanism for reduced platelet function in vivo[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 124: 43-56.
- [24] Lei X, Reheman A, Hou Y, et al. Anfibatide, a novel GP I b complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis[J]. Thromb Haemost, 2014, 111(2): 279-289.
- [25] Franchi F, Rollini F, Angiolillo DJ. Antithrombotic therapy for patients with STEMI undergoing primary PCI[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(6): 361-379.
- [26] Dery JP, Mahaffey KW, Tricoci P, et al. Arterial access site and outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention with and without vorapaxar[J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2016, 88(2): 163-173.
- [27] Wong PC, Seiffert D, Bird JE, et al. Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding[J]. Sci Transl Med, 2017, 9(371): eaaf5294.

收稿日期: 2020-05-04