文章编号:1000-5404(2010)01-0005-04

论著

抗炎、抗凝双效融合蛋白 TAP-SSL5 表达载体的构建及其功能研究

曲小龙[1],胡厚源[1],李 敏[2],黄德兴[3],梁 华[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所[1],护理系心理学教研室[2];8008 Australia Melbourne,BakerIDI Heart & Diabetes Institute[3])

[摘要] **目的** 构建一种具有抗炎和抗凝双效功能的融合蛋白,并对其功能进行初步鉴定。**方法** 将重组金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5(staphylococcal superantigen-like protein-5, SSL5)与蜱抗凝血肽(tick anticoagulant peptide, TAP)融合,从金黄色葡萄球 NCTC8325 菌株中克隆 SSL5 基因;经 DNA 重组技术,将编码 pelB 前导序列、SSL5 和 TAP 的基因重组并克隆于原核表达载体 pHOG21 中,再转染于大肠杆菌 BL21 中扩增表达,制备融合蛋白 SSL5-TAP 或 TAP-SSL5,采用流式细胞仪检测融合蛋白是否和 SSL5 一样,具有与粒细胞表面 P-选择素糖蛋白配体-1(P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)结合的特性;采用反应底物法在体外检测融合蛋白对活化的凝血因子 X(factor Xa,FXa)活性的抑制作用。**结果** TAP-SSL5 保留了 SSL5 与 PSGL-1 结合的特性,并且融合蛋白 TAP-SSL5 可显著抑制 FXa 的活性($P<0.01$),抑制率达 39.5%。**结论** 融合蛋白 TAP-SSL5 是一种以 PSGL-1 为靶向的新型抗炎、抗凝双效分子。

[关键词] 金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5;蜱抗凝血肽;融合蛋白;P-选择素糖蛋白配体-1;凝血因子 Xa
[中图法分类号] R394-33; R345.13; R972.6 **[文献标志码]** A

Construction of a novel fusion protein TAP-SSL5 and evaluation of its function as anti-inflammatory and anticoagulant protein *in vitro*

Qu Xiaolong[1], Hu Houyuan[1], Li Min[2], Huang Dexing[3], Liang Hua[1] ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, [2]Department of Psychology, College of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China; [3]BakerIDI Heart & Diabetes Institute, Melbourne 8008, Australia)

[Abstract] **Objective** To construct a double-effect fusion protein functioning as an anti-inflammatory and anticoagulant, which can inhibit the inflammatory response and thrombosis simultaneously in atherosclerosis lesions. **Methods** Firstly, staphylococcal superantigen-like protein-5 (SSL5) gene sequence was cloned by PCR from *Staphylococcus aureus* (strain NCTC8325). Secondly, N-terminal pelB leading sequence, SSL5 gene sequence, tick anticoagulant peptide (TAP) gene sequence, with C-terminal both c-Myc and His6 tags were cloned into the pHOG21 expression vector using recombined DNA technique, and the obtained recombinant were further transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells to express the fusion protein TAP-SSL5. Flow cytometry was used to investigate whether the fusion protein could bind with P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on monocytes as SSL5. Finally, the inhibitory effect of TAP-SSL5 on factor Xa (FXa) activity were detected by chromogenic substrate assay *in vitro*. **Results** TAP-SSL5 fusion protein binded to PSGL-1 on HL60 monocytes, and inhibited the FXa activity *in vitro* as well, with an inhibitory rate of 39.5% ($P<0.01$). **Conclusion** The fusion protein TAP-SSL5 is a novel molecule targeting PSGL-1, which has an double-effects of anti-inflammation and anticoagulation.

[Key words] staphylococcal superantigen-like protein-5; tick anticoagulant peptide; fusion protein; P-selectin glycoprotein ligand-1; factor Xa

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 program, 2009AA02Z115) and the National Natural Science Foundation of China (30770851, 30871059). Corresponding author: Hu Houyuan, Tel: 86-23-68765167, E-mail: houyuanhu@hotmail.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)病变的发生、发展与炎症反应或/和凝血系统激活有关,凝血系统的激活与炎症反应之间又可相互促进,是导致斑块不稳定和局部血栓形成的重要原因[1,2]。目前,AS 的治疗药物仅具有单一的抗炎或抗凝作用。为达到更好的治疗效果,临床上常采取联合用药的方法,但存在服用麻烦、患者易漏服或依从性差,易发生出血并发症等问题。

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2009AA02Z115);国家自然科学基金(30770851,30871059)
[通信作者] 胡厚源,电话:(023)68765167,E-mail: houyuanhu@hotmail.com

P-选择素糖蛋白配体1(P-selectin glycoprotein ligand 1,PSGL-1)是表达于白细胞表面的黏附分子,与P-选择素有高度亲和性,同时也能与E-选择素和L-选择素结合。PSGL-1与选择素分子的结合可使白细胞在血管内皮细胞上滚动,进而逐步活化并稳定黏附于血管内皮,对召集白细胞到达炎症部位具有重要作用,因此,PSGL-1是抗炎药物的重要靶点[3]。金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5(staphylococcal superantigen like protein-5,SSL5)是目前发现的最为理想的PSGL-1抑制剂。有研究发现,SSL5可与PSGL-1特异性结合,竞争性拮抗PSGL-1与选择素的相互作用,显著抑制白细胞的黏附,同时不具有标准超抗原的免疫系统非特异性激活作用[4]。

凝血因子Xa(factor Xa,FXa)是凝血过程中最为重要的活性因子和关键环节之一。蜱抗凝血肽(tick anticoagulant peptide,TAP)是从毛白钝缘蜱(*ornithodoros moubata*)唾液中分离的FXa强效抑制剂[5]。本研究通过基因重组技术,将TAP与SSL5进行融合,构建具有抗炎、抗凝双重功效的融合蛋白,并对其功能进行初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌和质粒 金黄色葡萄球菌NCTC8325菌株由澳大利亚Monash大学微生物学研究室Howden博士馈赠,其培养采用脑心浸出液(BHI broth,由墨尔本市Alfred医院提供)。感受态大肠杆菌BL21(DE3)菌株购自北京天根生化科技有限公司。pHOG21/TAP质粒由BakerIDI心脏和糖尿病研究所血栓与血管生物学中心Peter教授惠赠。

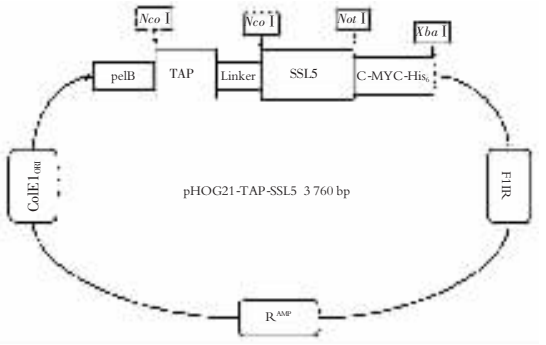
1.1.2 细胞株 人早幼粒白血病细胞株HL-60细胞由第三军医大学全军免疫学研究所馈赠。

1.1.3 主要试剂 $Vent_R$® DNA聚合酶购自美国New England Biolabs公司,*Nco* Ⅰ和*Not* Ⅰ内切酶为TaKaRa(大连)公司产品,T_4 DNA连接酶、蛋白纯化所用的镍螯合亲和层析胶体(Ni-NTA Agarose)为美国Invitrogen公司产品,FXa及其发色底物S2765为法国Hyphen BioMed公司产品,绿色荧光Alexa Fluor 488标记的抗Penta·His抗体为德国Qiagen公司产品,PE标记的抗PSGL-1单抗KPL-1为美国BD Biosciences Pharmingen公司产品。

1.2 方法

1.2.1 重组SSL5基因的获取[4] 将培养的金黄色葡萄球菌NCTC8325离心(2 800 r/min)获得沉淀,采用DNeasy® DNA提取试剂盒按说明书提取基因组DNA。上游引物为5′-GTTCCATGGCTAGTGAACATAAAGCAAAATATGAA-3′(CCATGG为*Nco* Ⅰ内切酶位点);下游引物为5′-GTTGCGGCCGCTCTAATGTTGGCTTCTATTTTTTC-3′(GCGGCCGC为*Not* Ⅰ内切酶位点),以$Vent_R$® DNA聚合酶扩增。PCR反应条件:95 ℃预变性2 min;95 ℃变性30 s,55 ℃退火20 s,72 ℃延伸60 s,35个循环后,72 ℃最终延伸5 min。

1.2.2 TAP与SSL5融合蛋白表达载体的构建 先将SSL5和TAP基因(来自pHOG21/TAP质粒)的PCR产物分别以*Not* Ⅰ、*Nco* Ⅰ酶切,然后将酶切产物及pelB的DNA双链序列分步插入pHOG21质粒(含C-MYC和His_6-tags结构,以便于蛋白表达后的纯化及鉴定)的适宜酶切位点之间。随后转染感受态大肠杆菌DH5α菌株,将其接种于含氨苄青霉素的LB-琼脂培养基中。采用PCR技术对单个菌落进行筛选,在确认为所需的重组DNA后,进行质粒DNA提取和纯化并测序。图1为融合蛋白TAP-SSL5表达载体的结构示意图。



R^{AMP}:氨苄青霉素抗性基因;$ColE1_{ORI}$(coli origin of plasmid replication):大肠杆菌复制子;f1IR(intergenic region of phage f1):丝状噬菌体基因间隔区;pelB:pelB信号肽的编码序列;TAP:蜱抗凝血肽的编码序列;Linker:连接肽的编码序列;SSL5:金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5的编码序列;C-MYC-His_6:C-MYC标签和组氨酸标签的编码序列

图1 构建于pHOG21表达质粒中的融合蛋白TAP-SSL5的结构示意图

1.2.3 融合蛋白的表达与纯化 挑取阳性克隆置于5 ml含有100 U/ml氨苄青霉素的LB培养基中,经活化并扩大,培养至*D*(600)为0.8时,于表达菌中加入IPTG(终浓度1 mmol/L),37 ℃诱导表达4 h。收集菌液离心后,按5 ml/g细菌的比例于细菌沉淀中加入含8 mol/L尿素的变性缓冲液(Tris-磷酸缓冲液,10 mmol/L Tris base,100 mmol/L NaH_2PO_4,0.5 mol/L NaCl,pH=8.0)重悬细菌,超声破菌30 s(占空比40%~50%)。以12 000 r/min于4 ℃离心20 min,收集含目的蛋白的上清液。然后以Ni^{2+}-NTA层析柱进行纯化,按照层析柱说明书操作,以pH值分别为6.3和5.9的变性缓冲液先后洗脱非特异性结合蛋白,再以pH值为4.5的变性缓冲液洗脱目的蛋白,接下来逐步降低Tris-磷酸缓冲液中尿素浓度,对洗脱出的目的蛋白进行透析,最后以磷酸盐缓冲液(PBS)彻底透析,使蛋白复性。

1.2.4 TAP-SSL5融合蛋白的鉴定 取纯化的表达产物,用5%的浓缩胶、12%的分离胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),待电泳完毕后,将胶切开,一半进行考马斯亮蓝染色分析;另一半转印聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,洗膜封闭后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗组氨酸标签单克隆抗体,置温度37 ℃孵育1 h,洗膜后显色,进行免疫蛋白印迹(Western blot)分析。

1.2.5 HL-60细胞培养 HL-60细胞以含10%小牛血清的RPMI1640培养液培养,在37 ℃、5% CO_2恒温培养箱内培养并传代。

1.2.6 TAP-SSL5融合蛋白与PSGL-1特异性结合方面的研究 TAP-SSL5融合蛋白与单核细胞结合能力的研究:取HL-60

细胞,加入 TAP-SSL5 融合蛋白(终浓度 10 μg/ml)孵育,再加入 Alexa Fluor 488 标记的抗组氨酸标签单克隆抗体,同时设同型抗体阴性对照,以流式细胞术(FACS)检测荧光强度,分析 TAP-SSL5 融合蛋白与单核细胞的结合情况。并以 SSL5-TAP 融合蛋白为对照。

TAP-SSL5 融合蛋白与 KPL-1 的竞争性结合实验:取 HL-60 细胞,加入 TAP-SSL5 融合蛋白(终浓度 10 μg/ml)孵育,洗涤,再加入 PE 标记的抗 CD162(CD162 即 PSGL-1)单克隆抗体,孵育,同时设同型抗体阴性对照;以 FACS 检测荧光强度,分析 TAP-SSL5 融合蛋白和抗 CD162 单克隆抗体与单核细胞表面的 PSGL-1 竞争性结合的情况。

免疫共沉淀检测 TAP-SSL5 融合蛋白与 PSGL-1 的结合作用:在预冷的细胞裂解液(0.1 mol/L PBS,含 150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100、50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.4)中加入 HL60 细胞,再加入蛋白酶抑制剂(Roche 公司),浓度为 10 mmol/L 的氟化钠(NaF),浓度为 1 mmol/L 的正钒酸钠(Na_3VO_4)和浓度为 10 mmol/L 的焦磷酸钠(NaP_2O_7),超声破碎 10 s,13 000 r/min 离心 10 min,收集上清,即得 HL60 细胞裂解液;取 HL60 细胞裂解液,加入 5 μg TAP-SSL5 融合蛋白共同孵育,再加入 3 μg 抗 CD162 单克隆抗体进行免疫共沉淀,制得免疫复合物,然后加入 30 μl 琼脂糖珠-蛋白 G(Amersham 公司),于温度 4 ℃孵育 1 h,离心,将上清转入另一含有 5 μg TAP-SSL5 融合蛋白和 3 μg 抗 CD162 单克隆抗体的试管中,于温度 4 ℃孵育 2 h 后,加入 30 μl 琼脂糖珠-蛋白 G,于温度 4 ℃孵育过夜以形成琼脂糖珠-免疫复合物,离心,弃上清,琼脂糖珠-免疫复合物用细胞裂解液洗涤 5 次,再加入 40 μl SDS-PAGE 上样缓冲液,于温度 95 ℃加热 10 min,离心,12 000 r/min 弃沉淀(琼脂糖珠),取上清(免疫复合物)作为上样样品;同时设同型抗体阴性对照(以小鼠 IgG_1 替代抗 CD162 单克隆抗体);取上样样品进行 Western blot 分析。

1.2.7　TAP-SSL5 抑制 FXa 活性功能的检测　　采用显色底物降解法,将 TAP-SSL5 融合蛋白或 TAP 用 PBS 配制成浓度均为 200 nmol/L 或 400 nmol/L 的溶液,再分别加至 96 孔板中,每孔 175 μl,随后加入 0.1% 的人血清白蛋白 10 μl 和 10 nmol/L FXa 溶液 10 μl,置室温下振摇孵育 10 min,再加入显色底物 S2765 15 μl,置室温下避光孵育 15 min,最后加入 0.1 mol/L 的硫酸溶液 50 μl 终止反应,于波长 405 nm 处测定光密度值 $D(405)$;同时设阳性对照(以 PBS 替代 TAP-SSL5 融合蛋白或 TAP)和阴性对照(以 PBS 替代 TAP-SSL5 融合蛋白或 TAP,同时不加入 FXa);计算 TAP-SSL5 融合蛋白或 TAP 对 FXa 活性的抑制率。实验重复 5 次,每次均设有复孔。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,FXa 活性的组间比较采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行单因素方差分析。

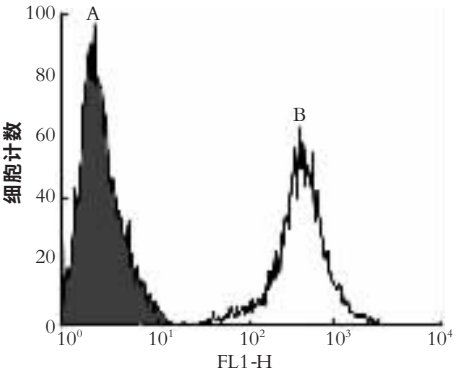
2　结果

2.1　TAP-SSL5 融合蛋白的鉴定

SDS-PAGE 电泳和 Western blot 的结果显示,TAP-SSL5 融合蛋白的相对分子质量为 33.7×10^3。

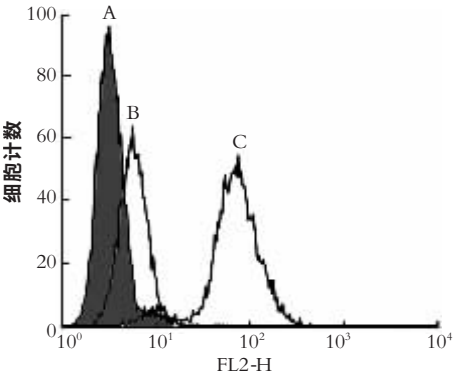
2.2　TAP-SSL5 融合蛋白与 PSGL-1 的结合能力

2.2.1　TAP-SSL5 融合蛋白与单核细胞的结合　　从流式细胞仪检测结果可以看出,TAP-SSL5 融合蛋白与单核细胞具有较强的结合能力。同时,TAP-SSL5 融合蛋白可竞争性抑制 KPL-1(抗 CD162)单克隆抗体与 HL60 细胞的结合。见图 2、3。



A 峰:同型抗体阴性对照;B 峰:TAP-SSL5 融合蛋白(10 μg/ml)

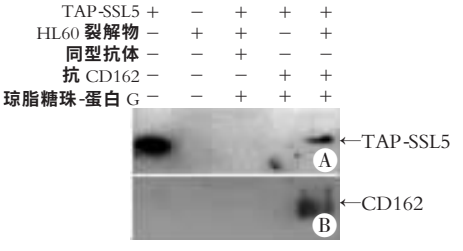
图 2　融合蛋白 TAP-SSL5 与 HL60 细胞结合的流式细胞仪检测



A 峰:同型抗体阴性对照;B 峰:先加入终浓度 10 μg/ml 的 TAP-SSL5 融合蛋白孵育后,KPL-1 与 HL60 细胞的结合受到抑制;C 峰:KPL-1 与 HL60 细胞的结合情况

图 3　KPL-1 与 HL60 细胞结合的流式细胞仪检测

2.2.2　TAP-SSL5 融合蛋白与 PSGL-1 的免疫共沉淀　　免疫共沉淀检测进一步表明,TAP-SSL5 融合蛋白能够与 PSGL-1 特异性结合。见图 4。



A:HRP 标记的抗 His 抗体检测结果;B:同一张膜以抗 CD162 单抗检测结果

图 4　TAP-SSL5 融合蛋白与 CD162 结合作用的免疫共沉淀分析

2.3　TAP-SSL5 融合蛋白的抗 FXa 活性

体外实验显示,TAP-SSL5 融合蛋白和 TAP 均能够抑制 FXa 的活性($P < 0.01$),但 TAP-SSL5 融合蛋白抑制 FXa 活性的作用稍弱于 TAP,抑制率分别为 39.5% 和 51.0%。

3　讨论

血管内皮细胞在被激活或受损伤后,其表面会有大量的黏附分子(如 E-selectin、P-selectin、ICAM-1、

VCAM-1 和 vWF 等)表达,使单核细胞、中性粒细胞以及血小板在受损内皮的表面滚动、黏附和聚集,导致血管壁的炎症反应;另一方面,损伤的内皮细胞可释放出组织因子(tissue factor, TF)和血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)激活凝血系统[1,2,6]。Bestebroer 等[4]的研究发现,SSL5 不但可与粒细胞表面的 PSGL-1 结合而抑制粒细胞在激活的内皮细胞表面的黏附,还可与 G 蛋白偶联受体结合,抑制 IL-8(CXCL8)、C3a 和 C5a 等对白细胞的激活作用[7]。

本研究采用 SSL5 与多肽类的 FXa 抑制剂 TAP 构建融合蛋白,以期该融合蛋白能保留二者各自的功能,使其既具有与 PSGL-1 结合而抑制粒细胞在内皮表面黏附的作用,同时又具备 TAP 的抗 FXa 活性。我们构建了融合蛋白 TAP-SSL5 和 SSL5-TAP,进一步研究发现,SSL5-TAP 的融合方式失去了 SSL5 所具有的与粒细胞结合的特性;而融合蛋白 TAP-SSL5 具有与 PSGL-1 结合的能力。鉴于 SSL5 的 C-末端结构域是其与 PSGL-1 相结合的部位[8],由此可以认为,以 SSL5-TAP 的融合蛋白构建方式可能系影响了 SSL5 C-末端结构域而失去了与 PSGL-1 的结合功能。TAP 是由 60 个氨基酸组成的天然多肽,具备作为融合表达的抗凝剂所需的特性,且融合后能发挥正常作用。Hagemeyer 等[9,10]采用基因重组技术,将 TAP 与作用于纤维蛋白的单链抗体 scFv59D8 或作用于血小板糖蛋白 Ⅱb/Ⅲa(GP Ⅱb/Ⅲa)的单链抗体 ScFvanti-LIBS 构建成融合蛋白,能够很好地发挥以血栓为靶向的抗凝效应,且并不延长出血时间,因此不会增加出血风险。本研究表明,融合蛋白 TAP-SSL5 在体外具有抑制 FXa 的活性作用($P<0.01$),抑制率为 39.5%,但其抑制 FXa 活性的能力稍弱于单纯 TAP 的抑制率(51.0%)。

PSGL-1 作为 P-/E-/L-选择素的配体,广泛存在于单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的表面,它可介导细胞外信号的转导,促进白细胞活化[11,12]。血小板、内皮细胞、白细胞被激活后可释放大量 P-/E-/L-选择素,它们在与其配体 PSGL-1 结合后,可诱导上调并激活单核细胞和中性粒细胞表面的黏附分子 Mac-1($\alpha_M\beta_2$),Mac-1 可与内皮表面的细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)以及细胞外基质蛋白结合,使单核细胞、中性粒细胞在受损内皮处黏附和聚集;另外,P-/E-/L-选择素与 PSGL-1 结合后,还可刺激单核细胞与中性粒细胞释放含有组织因子的促凝性微粒(procoagulant microparticles, PMP)。因此,白细胞、血小板与内皮细胞之间的相互作用导致了炎症反应和凝血系统激活之间的相互促进[3,13,14]。融合蛋白 TAP-SSL5 将通过与 PSGL-1 结合,而同时抑制炎症和凝血过程。基于 SSL5 可与 PSGL-1 特异性结合,融合蛋白 TAP-SSL5 也就具有了以 PSGL-1 为靶向的抗炎抗凝特性,其作用更有针对性,抗炎的同时不影响白细胞的正常生理功能,抗凝的同时也不会因为过度或广泛抗凝而导致出血并发症。

本研究初步表明,我们利用基因重组方法所构建的融合蛋白 TAP-SSL5 保持了 SSL5 和 TAP 的各自功能,是一种具有抗炎和抗凝活性的双效分子,有望为动脉粥样硬化及其血栓并发症的防治提供新的途径。

参考文献:

[1] Schwarz M, Meade G, Stoll P, *et al*. Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets[J]. Circ Res, 2006, 99(1): 25-33.

[2] Strukova S. Blood coagulation-dependent inflammation. Coagulation-dependent inflammation and inflammation-dependent thrombosis[J]. Front Biosc, 2006, 11: 59-80.

[3] Constantin G. PSGL-1 as a novel therapeutic target[J]. Drug News Perspect, 2004, 17(9): 579-586.

[4] Bestebroer J, Poppelier M J, Ulfman L H, *et al*. Staphylococcal superantigen-like 5 binds PSGL-1 and inhibits P-selectin-mediated neutrophil rolling[J]. Blood, 2007, 109(7): 2936-2943.

[5] Jordan S P, Waxman L, Smith D E, *et al*. Tick anticoagulant peptide: kinetic analysis of the recombinant inhibitor with blood coagulation factor Xa[J]. Biochemistry, 1990, 29(50): 11095-11100.

[6] Hansson G K, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(7): 508-519.

[7] Bestebroer J, van-Kessel K P, Azouagh H, *et al*. Staphylococcal SSL5 inhibits leukocyte activation by chemokines and anaphylatoxins[J]. Blood, 2009, 113(2): 328-337.

[8] Baker H M, Basu I, Chung M C, *et al*. Crystal structures of the staphylococcal toxin SSL5 in complex with sialyl Lewis X reveal a conserved binding site that shares common features with viral and bacterial sialic acid binding proteins[J]. J Mol Biol, 2007, 374(5): 1298-1308.

[9] Hagemeyer C E, Tomic I, Jaminet P, *et al*. Fibrin-targeted direct factor Xa inhibition: construction and characterization of a recombinant factor Xa inhibitor composed of an anti-fibrin single-chain antibody and tick anticoagulant peptide[J]. Thromb Haemost, 2004, 92(1): 47-53.

[10] Stoll P, Bassler N, Hagemeyer C E, *et al*. Targeting ligand-induced binding sites on GP Ⅱb/Ⅲa *via* single-chain antibody allows effective anticoagulation without bleeding time prolongation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(5): 1206-1212.

[11] van-Gils J M, Zwaginga J J, Hordijk P L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(2): 195-204.

[12] Fang Y, Wu J, McEver R P, *et al*. Bending rigidities of cell surface molecules P-selectin and PSGL-1[J]. J Biomech, 2009, 42(3): 303-307.

[13] Pendu R, Terraube V, Christophe O D, *et al*. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor[J]. Blood, 2006, 108(12): 3746-3752.

[14] von-Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2007, 100(1): 27-40.

(**收稿**:2009-09-06;**修回**:2009-10-27)

(编辑 栾 嘉)