文章编号:1000-5404(2012)06-0477-04

论著

融合蛋白 TAP-SSL5 对人血小板功能的影响

程 彦,房兆飞,曲小龙,胡厚源,宋治远,龚丽莎,张 静 (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)

[摘要] **目的** 探讨抗炎抗凝双效融合蛋白 TAP-SSL5 对人血小板功能的影响。**方法** 采用健康人富含血小板血浆以凝胶过滤法分离得到人血小板。流式细胞仪检测融合蛋白 TAP-SSL5 或小鼠抗人 CD42b(glycoprotein Ibα, GPIbα)单克隆抗体(HIP1)与血小板的结合情况;以人血小板表面 P-选择素的表达及 PAC-1 的结合反映血小板的激活程度;以全血电阻法定量分析 TAP-SSL5 对人血小板聚集功能的影响;为评价 TAP-SSL5 的出血风险,进一步观察了 TAP-SSL5 对小鼠尾部出血时间的影响。**结果** 融合蛋白 TAP-SSL5 可与血小板结合,并竞争性抑制 HIP1 与血小板的结合,提示 TAP-SSL5 可与血小板表面的 GPIbα 结合,进而抑制 GPIbα 与 vWF 的相互作用。但高浓度的 TAP-SSL5(终浓度 30 mg/L)也能激活血小板,使人血小板表面 P-选择素的表达增加(表达阳性率为 90.4%)和 PAC-1 的结合量上升(阳性率为 66.3%);终浓度为 10、30 mg/L 的 TAP-SSL5 可引起血小板的显著聚集。给小鼠单次尾静脉注射 10 mg/kg 的 TAP-SSL5,可显著延长尾部出血时间,由对照组的(647.1 ± 33.7)s 延长至(753.6 ± 127.3)s($P < 0.01$);而常规剂量组(3 mg/kg TAP-SSL5)尾部出血时间为(612.8 ± 79.1)s,与对照组相比无显著差异($P > 0.05$)。**结论** 融合蛋白 TAP-SSL5 保留了 SSL5 与血小板 GPIbα 结合的功能,有助于进一步提高 TAP-SSL5 的抗血栓作用,但同时也导致融合蛋白 TAP-SSL5 在高浓度情况下可延长出血时间和激活血小板。

[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;血小板;糖蛋白 GPIbα
[中图法分类号] R33-33;R331.143;R341 [文献标志码] A

Effect of TAP-SSL5 fusion protein on human platelet functions *in vitro* and *in vivo*

Cheng Yan, Fang Zhaofei, Qu Xiaolong, Hu Houyuan, Song Zhiyuan, Gong Lisha, Zhang Jing (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of anti-inflammatory and anticoagulant tick anticoagulant peptide (TAP)-staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) fusion protein on human platelet functions. **Methods** Gel-filtered platelets (GFP) were prepared from human platelet-rich plasma (PRP). Flow cytometry (FCM) was applied for the binding assay of TAP-SSL5 fusion protein and mouse anti-human CD42b (GPIbα) monoclonal antibody (HIP1) to platelets. Both the expression of P-selectin on the platelet surface and the PAC-1 binding to the platelets were assayed by FCM. Platelet aggregation induced by TAP-SSL5 fusion protein was analyzed by whole blood impedance platelet aggregometry. The mouse tail bleeding time was recorded after venous injection of TAP-SSL5 fusion protein to evaluate the bleeding risk of TAP-SSL5 fusion protein. **Results** TAP-SSL5 fusion protein could bind to platelets and competitively inhibit HIP1 to bind to platelets, indicating that TAP-SSL5 fusion protein could bind to GPIbα on platelets and inhibit the interaction between GPIbα and von Willebrand Factor (vWF). A high concentration of TAP-SSL5 fusion protein could also activate platelets, and 30 mg/L TAP-SSL5 fusion protein resulted in 90.4% P-selectin positive platelets and 66.3% PAC-1 positive platelets. TAP-SSL5 fusion protein at high concentrations promoted platelets aggregation as well (10 and 30 mg/kg). TAP-SSL5 fusion protein (10 mg/kg) significantly prolonged the mouse tail bleeding time. The mouse tail bleeding time was prolonged to (753.6 ± 127.3) s, which was significantly longer than that of

[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

the mice without the injection [(647.1 ± 33.7)s, $P < 0.01$]. However, the tail bleeding time of the conventional dose group (3 mg/kg) was (612.8 ± 79.1)s, which was not significantly different from that of the control group ($P > 0.05$). **Conclusion** TAP-SSL5 fusion protein keeps the ability of SSL5 binding to GPIbα on platelets, which may improve the anti-thrombosis function of TAP-SSL5 fusion protein and also lead to the prolongation of mouse tail bleeding time and platelets activation.

[**Key words**] staphylococcal superantigen-like protein-5; tick anticoagulant peptide; fusion protein; platelet; glycoprotein Ibα

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]。金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5 (staphylococcal superantigen like protein-5,SSL5) 为金黄色葡萄球菌 (staphylococcus aureus) 的分泌型蛋白。SSL5 可与粒细胞表面的 P-选择素糖蛋白配体-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1)结合,从而抑制粒细胞在激活的内皮细胞表面的黏附,并可抑制细胞因子对粒细胞的激活作用[3-4],同时能够抑制内皮祖细胞与 P-选择素的结合[5]。基于 SSL5 具有抑制粒细胞黏附和激活的特性,我们在前期工作中已将其与凝血因子Xa (coagulant factor Xa, FXa)的强效抑制剂蜱抗凝血肽(tick anticoagulant peptide,TAP)联合,成功构建了具有抗炎抗凝活性的双效分子——融合蛋白 TAP-SSL5,其具有抑制粒细胞在 P-选择素表面黏附、抑制血浆 FXa 活性的作用[6]。但最近的研究[7]及我们的前期研究[8]均发现,SSL5 可直接与血小板表面的糖蛋白 CD42b(glycoprotein receptors Ibα, GPIbα)和 GPVI 结合,并可激活血小板。然而,SSL5 与 GPIbα 的结合,也可能抑制 GPIbα 与 vWF 之间的相互作用,从而抑制血小板在高剪切力状态下的黏附。因此,我们进一步研究了融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板功能的影响,旨在较全面评价融合蛋白 TAP-SSL5 的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PE 标记的小鼠抗人 CD62P 单克隆抗体(AC1.2)以及 FITC 标记的 PAC-1 均购于美国 BD 公司,FITC 标记的小鼠抗人 CD42b(GPIbα)单克隆抗体(HIP1)购于美国 eBioscience 公司,Alexa Fluor 488 标记的抗 Penta·His 抗体为德国 Qiagen 公司产品,ADP 为美国 Sigma 公司产品,纤维蛋白原(Fibrinogen)为美国 Enzyme Research Laboratories 公司产品,Sepharose CL-2B 为美国 Sigma 公司产品。昆明小鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 TAP-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 cMYC 和 His6-tags 结构)的适宜酶切位点之间。随后转染感受态的大肠杆菌 BL21 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,然后进行 DNA 序列测定,确保融合蛋白 DNA 序列的准确性[6]。融合蛋白的表达与纯化同曲小龙等[6]介绍的方法。

1.2.2 人血小板的分离 静脉血采自至少 2 周未服用任何药物的健康志愿者,以 1/9 体积的枸橼酸钠抗凝,200 × g 离心 10 min 后,获得富含血小板的血浆(platelet-rich plasma,PRP),通过 CL-2B 琼脂糖凝胶柱获得凝胶滤过血小板(gel-filtered platelets,GFP),用改良 Tyrode's 缓冲液洗脱[9]。血小板以 Sysmex KX-21N(日本)血细胞自动分析仪计数,以含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 Tyrode's 液(150 mmol/L NaCl、2.5 mmol/L KCl、12 mmol/L $NaHCO_3$、2 mmol/L $MgCl_2$、2 mmol/L $CaCl_2$、1 mg/ml BSA、1 mg/ml dextrose,pH = 7.4)调整血小板浓度。

1.2.3 TAP-SSL5 与血小板结合的流式细胞仪检测 取 8 × 10^6/ml GFP 100 μl,加入不同浓度的 TAP-SSL5(0、10、30 mg/L)室温孵育 5 min,随后加入 Alexa Fluor 488 标记的抗 Penta·His 抗体 1 μl,并设同型抗体阴性对照,室温避光孵育 15 min,以 1% 多聚甲醛固定,避光,于 6 h 内以流式细胞仪(FACS)检测荧光强度,分析 TAP-SSL5 融合蛋白与血小板的结合情况,实验共重复 3 次。

1.2.4 TAP-SSL5 与 GPIbα 抗体竞争性结合的流式细胞仪检测 取血小板加入不同浓度的 TAP-SSL5(0、10、30 mg/L)室温孵育 5 min,再加入 FITC 标记的抗 CD42b(GPIbα)单克隆抗体(HIP1)孵育 15 min,并设同型抗体对照,以 1% 多聚甲醛固定,避光,于 6 h 内以流式细胞仪检测荧光强度,实验共重复 3 次。

1.2.5 小鼠尾部出血时间的检测 选取 6 ~ 8 周龄昆明小鼠 30 只,体质量 18 ~ 22 g,分为 3 组(n = 10,雌雄各半):缓冲

液组(对照组)、TAP-SSL5 3 mg/kg 组、TAP-SSL5 10 mg/kg 组。小鼠按 40 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉,各组均以同等体积(0.25 ml/10 g)行尾静脉注射,30 min 后,在距小鼠尾尖 5 mm处横断,置尾尖于 37 ℃的生理盐水液面下 1.5 cm 处,记录出血时间(超过 30 min 以上均记录为 30 min)。

1.2.6　血小板激活实验　　8×10^6/ml GFP 在室温下与不同浓度的 TAP-SSL5(终浓度 0、3、10、30 mg/L)共孵育 5 min。以 ADP(20 μmol/L)作为阳性对照,然后加入小鼠抗人 CD62P-PE 或 PAC-1-FITC 检测血小板的激活情况,相同荧光标记的小鼠 IgG_1作为同型对照。于暗处室温孵育 15 min 后,加入 1% 多聚甲醛固定,用 FACSCalibur 流式细胞仪(BD 公司,美国)分析,Cell Quest 软件处理数据。实验共重复 3 次[10]。

1.2.7　全血血小板聚集实验　　采用 Chrono-Log 血小板聚集仪检测全血血小板聚集。在育温(37 ℃)硅化反应杯中加入 0.5 ml 枸橼酸钠抗凝全血和 0.5 ml 生理盐水混合,放到检测位再育温 5 min,随后将电极插入反应杯,电极连到聚集仪上,设置磁棒的旋转速度为 1 200 r/min。选择电阻法进行检测,加入不同浓度的 TAP-SSL5(终浓度 0、3、10、30 mg/L),以 20 μmol/L ADP 作为阳性对照,让曲线运行 6 min 至其比较平稳时停止检测,记录此时的电阻值(以 Ω 为单位),电阻值越大表明血小板聚集率越高;实验共重复 3 次[11]。

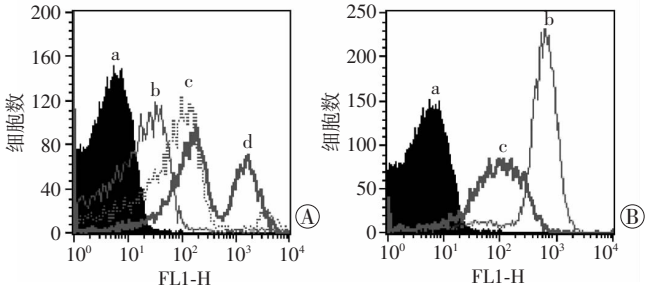
1.3　统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5.0 软件,组间比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　融合蛋白 TAP-SSL5 可与人血小板表面的 GPIbα 结合

采用 Alexa Fluo 488 标记的抗 Penta · His 抗体,以流式细胞仪检测 TAP-SSL5 融合蛋白与血小板的结合情况。结果表明,TAP-SSL5 与血小板的结合随着 TAP-SSL5 浓度的增加而显著升高(图 1A);同时,TAP-SSL5 可竞争性抑制小鼠抗人 CD42b 单克隆抗体(HIP1-FITC)与血小板的结合(图 1B)。



A: TAP-SSL5　a:同型抗体对照;b:1 mg/L TAP-SSL5;c:10 mg/L TAP-SSL5;d:30 mg/L TAP-SSL5

B: HIP1- FITC　a:同型抗体对照; b:未加 TAP-SSL5 时,血小板表面有丰富的 HIP1- FITC 结合;c:30 mg/L TAP-SSL5 显著抑制 HIP1-FITC 与血小板的结合

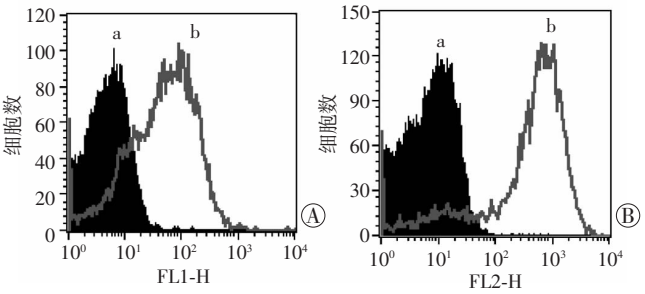
图 1　TAP-SSL5 和 HIP1-FITC 与人血小板结合的流式细胞仪检测结果

2.2　TAP-SSL5 可延长小鼠尾部出血时间

单次静脉注射 TAP-SSL5 为 10 mg/kg 剂量组,其尾部出血时间为(753.6 ± 127.3)s,较对照组(647.1 ± 33.7)s 有非常显著的延长($P<0.01$)。而 3 mg/kg TAP-SSL5 组的尾部出血时间为(612.8 ± 79.1)s,与对照组相比无显著差异($P>0.05$)。

2.3　高浓度的 TAP-SSL5 可促进人血小板表面 P-选择素(CD62P)的表达及 PAC-1 的结合

采用 PE 标记的小鼠抗人 CD62P 单抗和 PAC-1-FITC,以流式细胞仪检测 TAP-SSL5 对人血小板表面 CD62P 表达及 PAC-1 结合的影响。结果表明,高浓度的 TAP-SSL5(30 mg/L)可显著激活血小板,PAC-1 的结合阳性率达 66.3%(图 2A),CD62P 的表达阳性率为 90.4%(图 2B)。



A: PAC-1-FITC　a:同型抗体对照;b:TAP-SSL5(30 mg/L)作用于人血小板后,PAC-1-FITC 结合的阳性率为 66.3%

B: 抗 CD62P-PE　a:同型抗体对照;b:TAP-SSL5(30 mg/L)作用于人血小板后,CD62P 表达的阳性率为 90.4%

图 2　流式细胞仪检测 TAP-SSL5 对人血小板表面 CD62P 表达和 PAC-1 结合的影响

2.4　高浓度的 TAP-SSL5 可促进人血小板的聚集

采用全血血小板聚集法检测的结果显示,随着 TAP-SSL5 浓度升高,血小板的聚集程度逐渐增加,表现为检测到的电阻值增加:空白对照组(PBS)和终浓度为 3 mg/L TAP-SSL5 的电阻值均为 0;终浓度为 10 mg/L 的 TAP-SSL5 组和 30 mg/L 的 TAP-SSL5 组电阻值分别为 (9.3 ± 3.2) Ω 和 (9.7 ± 2.5) Ω,2 组与 PBS 组相比差异有统计学意义($P<0.01$);阳性对照组(20 μmol/L ADP)的电阻值为 (12.0 ± 3.6) Ω。

3　讨论

血小板不仅在止血和血栓形成中具有重要作用,而且在被激活后还可释放大量的炎症因子,或通过直接与白细胞相互作用的方式在炎症反应和组织修复中发挥重要作用。当血管内皮细胞损伤或被激活后,有大量的 vWF(von Willebrand Factor)转位至细胞表面会,血小板表面 GPIbα 与 vWF 的相互作用是高剪切力状态下血小板黏附的分子基础。有研究显示,响尾蛇毒液中的 Crotalin 和五步蛇毒液中的 Agkistin,都是

GPIbα的阻断剂,可抑制瑞斯托霉素诱导的血小板聚集以及体内血栓形成[12-13]。GPG-290是重组的人GPIbα嵌合蛋白,通过与vWF结合,而抑制血小板表面GPIbα与vWF的结合,可显著抑制犬模型中冠状动脉血栓的形成,而不延长出血时间[14]。h6B4-Fab是人源化的GPIbα单抗,也能起到抗血栓形成的作用[15]。由此可见,针对GPIbα-vWF相互作用环节的阻断剂,已成为新型抗血栓药物研究的焦点。本研究结果显示,具有抗炎和抗凝双效功能的融合蛋白TAP-SSL5还可与血小板表面的GPIbα结合,这将有助于进一步提高TAP-SSL5的抗血栓作用。由于融合蛋白TAP-SSL5具有抑制FXa活性的作用[6],抗血栓作用的进一步加强,也可能导致出血风险的增加。高浓度的TAP-SSL5可以显著延长小鼠尾部出血时间,也进一步说明了高浓度的TAP-SSL5在具有抗血栓形成作用的同时,会导致出血风险增加。

CD62P主要储存于血小板α颗粒或内皮细胞Weibel-Palade小体中。激活的血小板或内皮细胞表面均有P-选择素(P-selectin)的大量表达,进而与粒细胞表面的PSGL-1结合,导致血管壁的炎症反应,促进动脉粥样硬化病变的形成[16]。为抑制E-/P-选择素与PSGL-1结合所介导的炎症反应,同时为了抑制血栓形成,在前期研究中我们将具有PSGL-1结合作用的SSL5与凝血因子Xa(FXa)的抑制剂TAP相结合构建了融合蛋白TAP-SSL5,其保持了TAP和SSL5各自的功能,可以抑制粒细胞在P-选择素表面的黏附,并对FXa活性具有抑制作用[6]。

我们前期的研究也表明,SSL5与血小板的结合亦可导致血小板激活,体外研究显示,重组SSL5蛋白可使人血小板表面P-选择素(P-selectin, CD62P)的表达和PAC-1的结合量显著增加[8]。本研究也显示,高浓度的TAP-SSL5也能激活血小板,使人血小板表面CD62P的表达增加(表达阳性率为90.4%)和PAC-1的结合量上升(阳性率为66.3%);终浓度为10、30 mg/L的TAP-SSL5可引起血小板的显著聚集。

总之,融合蛋白TAP-SSL5保留了SSL5与血小板GPIbα结合的功能,这有助于进一步提高TAP-SSL5的抗血栓作用,但同时也导致融合蛋白TAP-SSL5在高浓度情况下可延长出血时间和激活血小板。因此,TAP-SSL5对血小板功能影响的机制尚有待深入研究。

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 Biosci, 2006, 11: 59-80.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 梁华, 曲小龙, 胡厚源, 等. 金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5抑制人脐血源性内皮祖细胞黏附功能及其机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6): 545-549.

[6] 曲小龙, 胡厚源, 李敏, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 5-8.

[7] De-Haas C J, Weeterings C, Vughs M M, *et al*. Staphylococcal superantigen-like 5 activates platelets and supports platelet adhesion under flow conditions, which involves glycoprotein Ibalpha and alpha(IIb)beta(3)[J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(11): 1867-1874.

[8] Hu H, Armstrong P C, Khalil E, *et al*. GPⅥ and GPⅠbα mediate staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) induced platelet activation and direct toward glycans as potential inhibitors[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19190.

[9] Bassler N, Loeffler C, Mangin P, *et al*. A mechanistic model for paradoxical platelet activation by ligand-mimetic alphaIIb beta3 (GPⅡb/Ⅲa) antagonists[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(3): E9-E15.

[10] Hu H, Straub A, Tian Z, *et al*. Celastrol, a triterpene extracted from Tripterygium wilfordii Hook F, inhibits platelet activation[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2009, 54(3): 240-245.

[11] Li J B, Dong H M, Jian Z, *et al*. Responsiveness to aspirin in patients with unstable angina pectoris by whole blood aggregometry[J]. Int J Clin Pract, 2009, 63(3): 407-416.

[12] Chang M C, Lin H K, Peng H C, *et al*. Antithrombotic effect of crotalin, a platelet membrane glycoprotein Ib antagonist from venom of Crotalus atrox[J]. Blood, 1998, 91(5): 1582-1589.

[13] Yeh C H, Chang M C, Peng H C, *et al*. Pharmacological characterization and antithrombotic effect of agkistin, a platelet glycoprotein Ⅰb antagonist[J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(4): 843-850.

[14] Wadanoli M, Sako D, Shaw G D, *et al*. The von Willebrand factor antagonist (GPG-290) prevents coronary thrombosis without prolongation of bleeding time[J]. Thromb Haemost, 2007, 98(2): 397-405.

[15] Fontayne A, Meiring M, Lamprecht S, *et al*. The humanized anti-glycoprotein Ⅰb monoclonal antibody h6B4-Fab is a potent and safe antithrombotic in a high shear arterial thrombosis model in baboons[J]. Thromb Haemost, 2008, 100(4): 670-677.

[16] Dole V S, Bergmeier W, Mitchell H A, *et al*. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling *in vivo*: role of P-selectin[J]. Blood, 2005, 106(7): 2334-2339.

(**收稿**:2011-11-05;**修回**:2011-12-01)

(编辑 栾 嘉)