DOI:10.16016/j.1000-5404.201911253

血小板微囊泡对人微血管内皮细胞功能的影响

潘丽娜[1*],汪泽扬[1,2*],陈丽媛[1],张润军[1],肇炜博[1],胡厚源[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院心血管内科[1];430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院心血管内科[2]

[**摘要**] **目的** 探讨血小板微囊泡(platelet microvesicles, PMVs)对人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cells, HMECs)功能的影响。**方法** 取柠檬酸钠抗凝的健康人全血分离血小板,采用二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)激活血小板产生 PMVs,然后以不同浓度(10、20、50 μg/mL)的 PMVs 作用于 HMECs,并设立台式液作为空白对照组(control, Con 组)和不含 PMVs 的上清组(supernatants, Sup 组)。ELISA 检测 HMECs 培养上清中血栓素 A2(thromboxane A2, TXA2)和前列腺素 I2(prostaglandin I2, PGI2)的稳定代谢产物 TXB2 和 6-keto-PGF1α、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和 E-选择素(E-selectin)的水平。Western blot 检测 HMECs 中内皮素-1(endothelin-1, ET-1)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的磷酸化水平。荧光探针检测 HMECs 中一氧化氮(nitric oxide, NO)含量。采用流式细胞仪定量检测 HMECs 培养上清中内皮微囊泡(endothelial microvesicles, EMVs)的含量。**结果** 与 Con 组和 Sup 组比较,PMVs 可使 HMECs 培养上清 TXB2 的水平升高($P<0.05$),6-keto-PGF1α 的水平降低($P<0.05$),均呈时间和剂量依赖性;PMVs 可使 HMECs 中 eNOS 的磷酸化水平和 NO 含量显著下降,ET-1 水平升高;经 PMVs 作用后,HMECs 培养上清中 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 的表达水平亦显著升高($P<0.05$)。与 Con 组和 Sup 组比较,50 μg/mL PMVs 作用于 HMECs 24 h 后,培养上清中 EMVs 的水平显著增加($P<0.05$)。**结论** PMVs 可导致微血管内皮细胞的功能紊乱和损伤。这可能是血小板参与微循环功能障碍发生的重要机制之一。

[**关键词**] 血小板微囊泡;微血管内皮细胞;血栓素 A2;内皮型一氧化氮合酶;血管细胞黏附分子-1;内皮微囊泡

[**中图法分类号**] R322.13; R329.28; R331.143 [**文献标志码**] A

Effect of platelet microvesicles on the function of human microvascular endothelial cells

PAN Lina[1], WANG Zeyang[1,2], CHEN Liyuan[1], ZHANG Runjun[1], ZHAO Weibo[1], HU Houyuan[1] [1]Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Cardiology, General Hospital of Central Theater Command, Wuhan, Hubei Province, 430070, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of platelet microvesicles (PMVs) on the function of human microvascular endothelial cells (HMECs). **Methods** Blood samples from healthy volunteers were collected and anticoagulated with one-tenth volume of citrate solution to isolate platelet-rich plasma (PRP). PMVs released from adenosine diphosphate (ADP)-activated human platelets was collected by centrifugation. HMECs were cultured and grouped as following: Tyrode's buffer as control (Con) group, final concentration of PMVs at 10, 20, 50 μg/mL respectively, and supernatant (Sup) of PMVs (almost PMVs free) for 24 h. ELISA was used to detect the contents of thromboxane B2 (TXB2) and 6-keto-PGF1α, the stable metabolites

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81470561, 81770433)

* 同等贡献者

[**通信作者**] 胡厚源, E-mail: houyuanhu@hotmail.com

of TXA2 and prostaglandin I2 (PGI2) respectively, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin in the culture supernatant of HMECs. The expression of endothelin-1 (ET-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) phosphorylation in HMECs were determined by Western blotting. Nitric oxide (NO) production in HMECs was measured by fluorescent probe. Endothelial microvesicles (EMVs) secreted by HMECs in the culture supernatant were determined by flow cytometry. **Results** Compared with Con group and Sup group, PMVs significantly upregulated the level of TXB2 and decreased that of 6-keto-PGF1α in the supernatant of HMECs in a time- and dose-dependent manner ($P<0.05$). After incubation with PMVs, the phosphorylated eNOS and the production of NO in HMECs were reduced, while the expression levels of ET-1, ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in the supernatant of HMECs were increased significantly ($P<0.05$). The concentration of EMVs induced by 50 μg/mL PMVs for 24 h was were increased obviously when compared with con group and Sup group ($P<0.05$). **Conclusion** PMVs may induce the to dysfunction and damage of microvascular endothelial cells. This might be one of the important mechanisms by which platelets are involved in microcirculation dysfunction.

[**Key words**] platelet microvesicles; human microvascular endothelial cells; thromboxane A2; endothelial nitric oxide synthase; vascular cell adhesion molecule-1; endothelial microvesicles

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470561, 81770433). PAN Lina and WANG Zeyang contributed equally to this work. Corresponding author: HU Houyuan, E-mail: houyuanhu@hotmail.com

冠状动脉微血管疾病(coronary microvascular disease, CMD)是动脉内径<400 μm 的微血管结构和功能异常所导致的冠状动脉疾病。在具有明显心肌缺血症状的冠脉非阻塞性病变患者中,CMD 的发生率为45%~60%[1]。糖尿病、高脂血症、高血压、心肌缺血再灌注损伤、吸烟和慢性炎症等因素均可导致 CMD。微血管内皮细胞功能紊乱和结构改变是导致 CMD 发生的重要原因[2]。研究表明,心血管疾病的许多危险因素均可能引起微血管内皮细胞中一氧化氮(nitric oxide, NO)/内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、血栓素 A2(thromboxane A2, TXA2)/前列腺素 I2(prostaglandin I2, PGI2)的比值失衡,出现微血管内皮功能紊乱和通透性增加,同时增加粒细胞在局部的浸润,可最终导致微血管闭塞,从而引发心肌缺血和心血管不良事件。因此,进一步探讨微血管内皮细胞功能障碍发生的机制对 CMD 的防治具有重要意义。

血小板和内皮细胞之间的相互作用所导致的局部炎症反应是内皮功能障碍的重要原因之一[3]。当血管内皮细胞被激活或损伤时,血小板可快速黏附、聚集于该部位,释放多种炎症介质和趋化因子,粒细胞通过与激活的血小板和内皮细胞之间的相互作用,迅速聚集在受损血管部位,进一步加重炎症反应和损伤。此外,被激活的血小板可释放出大量的血小板微囊泡(platelet microvesicles,PMVs),发挥更广泛的促炎症和促血栓形成作用[4]。PMVs 是直径为 0.1~1 μm 的膜性微囊泡,由脂质双分子层、血小板膜蛋白和内容物所组成,含有线粒体、microRNAs 和细胞因子等多种生物活性物质。PMVs 与细胞接触后可通过内饮和膜融合等方式将生物活性物质递送给靶细胞,实现对细胞功能的调控[5]。亦有研究表明,在急性冠脉综合征患者血浆中,PMVs 水平较稳定型冠心病患者显著升高,且与心血管风险和不良临床预后呈正相关。

本课题组前期研究发现,PMVs 具有促进动脉粥样硬化斑块形成和血管新生的作用[6-7],但 PMVs 对微血管功能的影响尚不清楚。本研究采用二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)激活血小板后产生的 PMVs 作用于人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cells, HMECs),检测和分析 TXB2/6-keto-PGF1α(实际反映 TXA2/PGI2 的比值)和 NO/ET-1 比值的变化、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的磷酸化水平,以了解微血管内皮细胞功能改变;通过检测 HMECs 培养上清中细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和 E-选择素(E-selectin)的水平,以及内皮微囊泡(endothelial microvesicles, EMVs)的含量,进一步评价 PMVs 对 HMECs 是否具有损伤作用。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

通过静脉采集健康志愿者的全血,以 1∶10 体积的柠檬酸钠溶液抗凝。血栓素 A2(TXA2)和前列腺素 I2

(PGI2)的稳定代谢产物 TXB2 和 6-keto-PGF1α 的 ELISA 检测试剂盒购自 Cayman Chemical 公司(USA);磷酸化 eNOS 的抗体购自 Abcam 公司(USA);内皮素-1(ET-1)抗体购自 Santa Cruz 公司(USA);ICAM-1、VCAM-1 的 ELISA 试剂盒购自上海信裕公司;DAF-FMDA(NO 荧光探针)、E-selectin ELISA 购自索莱宝生物公司;HMECs 购自 ATCC(USA)。

1.2 细胞培养

HMECs 采用 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清和 1%青/链霉素),在 37 ℃,5% CO_2 的孵育箱中培养。采用第 3~10 代的 HMECs 用于实验。

1.3 人血小板分离及 PMVs 的制备

取柠檬酸钠抗凝的健康人全血,110×*g* 离心 15 min 获得富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP),取 PRP 以 710×*g* 离心 15 min 获得血小板沉淀,以 CGS 缓冲液洗涤血小板 3 次,台式液重悬血小板至 3×10^8/mL;血小板悬液中加入终浓度 20 μmol/L 的 ADP,37 ℃孵育 10 min 以激活血小板。710×*g* 离心 15 min 去除活化的血小板(沉淀部分),上清部分于 4 ℃以 20 000×*g* 离心 60 min,得到的沉淀即为 PMVs,同时保留此上清作为对照(Sup 组),以台式液作为空白对照(control, Con 组)。采用 BCA 试剂盒测定 PMVs 的蛋白浓度[7]。

1.4 ELISA 检测

50 μg/mL PMVs 与 HMECs 孵育 6、12、24 h,或采用不同浓度(10、20、50 μg/mL)的 PMVs 与 HMECs 孵育 24 h,收集细胞培养上清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TXB2、6-Keto-PGF1α、ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 的水平。

1.5 NO 含量测定

HMECs 以 2×10^4 个/孔接种至 96 孔板中。采用不同浓度(10、20、50 μg/mL)的 PMVs 与 HMECs 孵育 24 h 后,弃去细胞培养基,加入 NO 荧光探针(3 μmol/L DAF-FM-Da)继续孵育 30 min,荧光显微镜(激发波长为 515 nm)下观察并拍照。每个视野中统计 25 个细胞的荧光强度并采用 Image J 软件进行定量分析。

1.6 Western blot 检测

采用不同浓度(10、20、50 μg/mL)的 PMVs 孵育 HMECs 24 h。RIPA 裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)裂解细胞,收集细胞上清后采用 BCA 法检测蛋白浓度。各组取等量蛋白进行凝胶电泳,转膜(PVDF 膜),并用 5%的牛奶室温封闭。PVDF 膜加入抗 ET-1、磷酸化 eNOS(p-eNOS)和 GAPDH 的一抗,置于摇床上 4 ℃孵育过夜后,加二抗于室温下孵育 1 h 后洗涤。采用化学发光仪曝光条带,扫描后分析相关数据。

1.7 流式细胞仪检测 EMVs 含量

采用不同浓度的 PMVs(10、20、50 μg/mL)孵育 HMECs 24 h 后收集细胞培养上清。取 100 μL HMECs 培养上清,分别加入 $CD31^-$PE 抗体和 Annexin V-FITC 抗体各 5 μL,室温避光孵育 20 min。以 0.2 ~1 μm 的微珠作为参考,采用流式细胞仪(Verse,BD 公司)检测 HMECs 培养上清中 EMVs($CD31^+$/Annexin V^+)的含量。

1.8 统计学分析

实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析,两组间比较采用 *t* 检验,多样本采用单因素方差分析,检验水准:$\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 PMVs 可使内皮细胞 TXB2/6-keto-PGF1α 比值升高

ELISA 检测 TXA2 和 PGI2 的稳定代谢产物 TXB2 和 6-keto-PGF1α。结果显示,PMVs 可使 HMECs 分泌的 TXB2 的水平增加,并呈剂量和时间依赖性(图 1A、B),而 6-keto-PGF1α 的水平则明显降低(图 1C、D),导致 TXB2/6-keto-PGF1α 的比值显著升高(图 1E、F);其中 50 μg/mL PMVs 组 TXB2/6-keto-PGF1α 的比值较对照组升高约 12 倍($P<0.05$),表明 PMVs 可导致 TXA2/PGI2 比例的明显上升。

2.2 PMVs 可降低 HMECs 中 NO 含量和 eNOS 的磷酸化水平,促进 ET-1 表达

荧光探针检测结果显示,50 μg/mL PMVs 可显著降低 HMECs 中 NO 的含量(图 2)。eNOS 是诱导内皮细胞 NO 合成的限速酶。eNOS 蛋白 Ser1177 位点的磷酸化水平降低可导致 eNOS 酶活性降低、NO 生成减少。同时,Western blot 检测结果显示,PMVs 可显著抑制 eNOS 蛋白的磷酸化水平(图 3)。这说明 PMVs 能降低 eNOS 的磷酸化活性,进而减少 NO 的释放量。

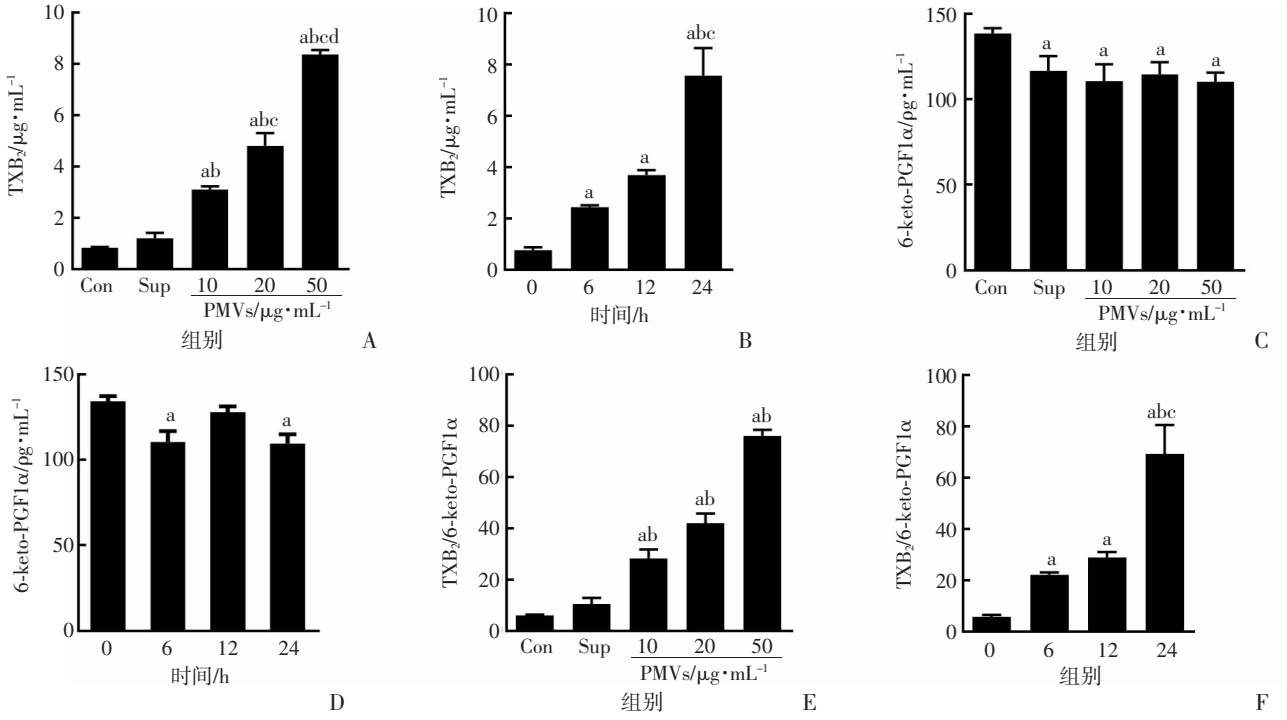
ET-1 是由血管内皮细胞分泌的一种强烈的血管收缩调节因子,在维持基础血管张力和内皮功能稳态中具有重要作用。Western blot 检测结果显示,与对照组比较,PMVs 能够显著增加 HMECs 中 ET-1 蛋白的表达(图 3)。

2.3 PMVs 可促进 HMECs 培养上清中 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 表达

10、20、50 μg/mL PMVs 刺激 HMECs 24 h 后,ELISA 检测细胞培养上清中的 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin(图 4)。结果显示,与对照组比较,50 μg/mL PMVs 可促进 HMECs 分泌 ICAM-1、E-selectin,差异具有统计学意义($P<0.05$)。10、20、50 μg/mL PMVs 均可促进 HMECs 分泌 VCAM-1,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

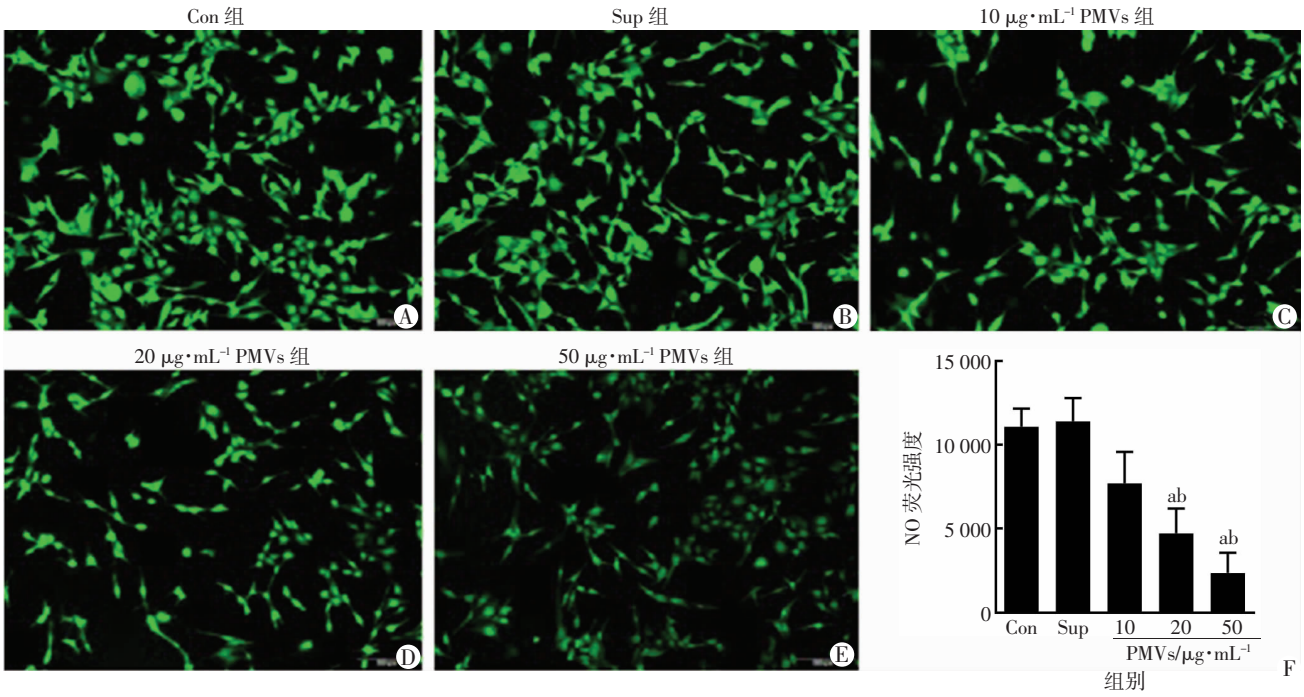
2.4　PMVs 可促进 HMECs 产生 EMVs

流式细胞术定量检测结果显示,20、50 μg/mL PMVs 刺激 HMECs 24 h 后,EMVs 的释放较 Con 组和 Sup 组明显增加($P<0.05$,图 5、6)。



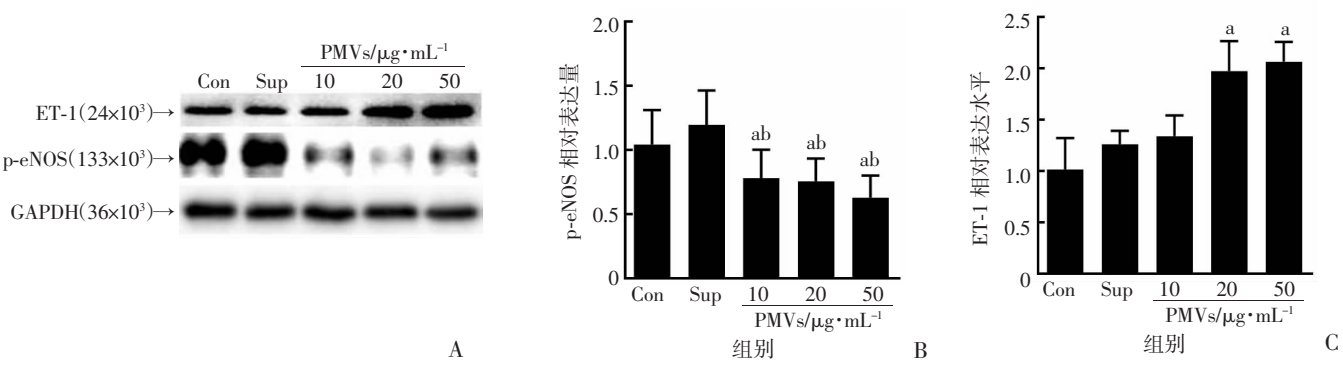
A、C、E: 各组作用于 HMECs 细胞 24 h　a:$P<0.05$,与 Con 组比较;b:$P<0.05$,与 Sup 组比较;c:$P<0.05$,与 10 μg/mL PMVs 组比较;d:$P<0.05$,与 20 μg/mL PMVs 组比较;B、D、F: 50 μg/mL PMVs 作用于 HMECs 不同时间　a:$P<0.05$,与 0 h 比较;b:$P<0.05$,与 6 h 比较;c:$P<0.05$,与 12 h 比较

图 1　PMVs 对 HMECs 培养上清中 TXB2 和 6-keto-PGF1α 水平的影响　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



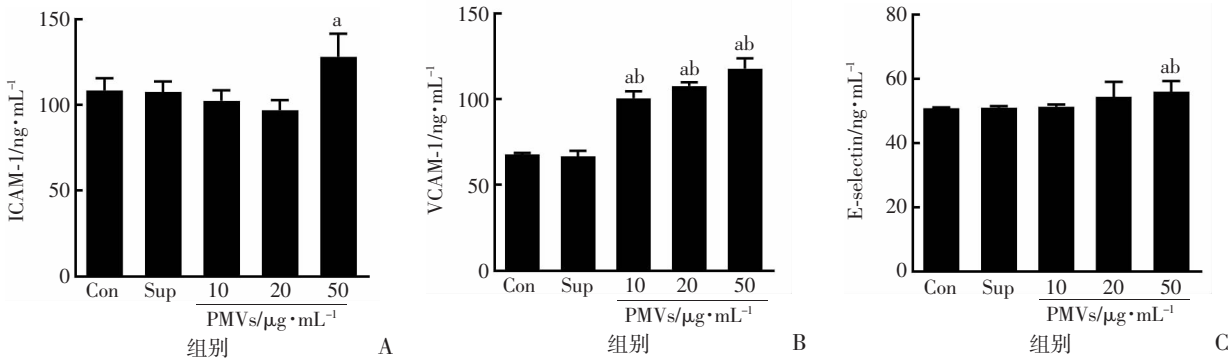
A~E:荧光显微镜下观察各组 HMECs 中 NO 含量的变化;F:各组作用 24 h 后 HMECs 中 NO 含量的变化　a:$P<0.05$,与 Con 组比较;b:$P<0.05$,与 Sup 组比较

图 2　PMVs 对 HMECs 中 NO 水平的影响　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:Western blot 检测 p-eNOS 和 ET-1 的蛋白含量;B-C:半定量分析结果;a:$P<0.05$,与 Con 组比较;b:$P<0.05$,与 Sup 组比较

图 3 Western blot 检测 PMVs 对 HMECs 中 ET-1 和 p-eNOS 表达的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A-C: PMVs 孵育 24 h 后检测细胞培养上清中 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 的分泌 a:$P<0.05$,与对照组(Con)比较;b:$P<0.05$,与 PMVs 上清(Sup)组比较

图 4 PMVs 对 HMECs 培养上清中 ICAM-1、VCAM-1 和 E-selectin 水平的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

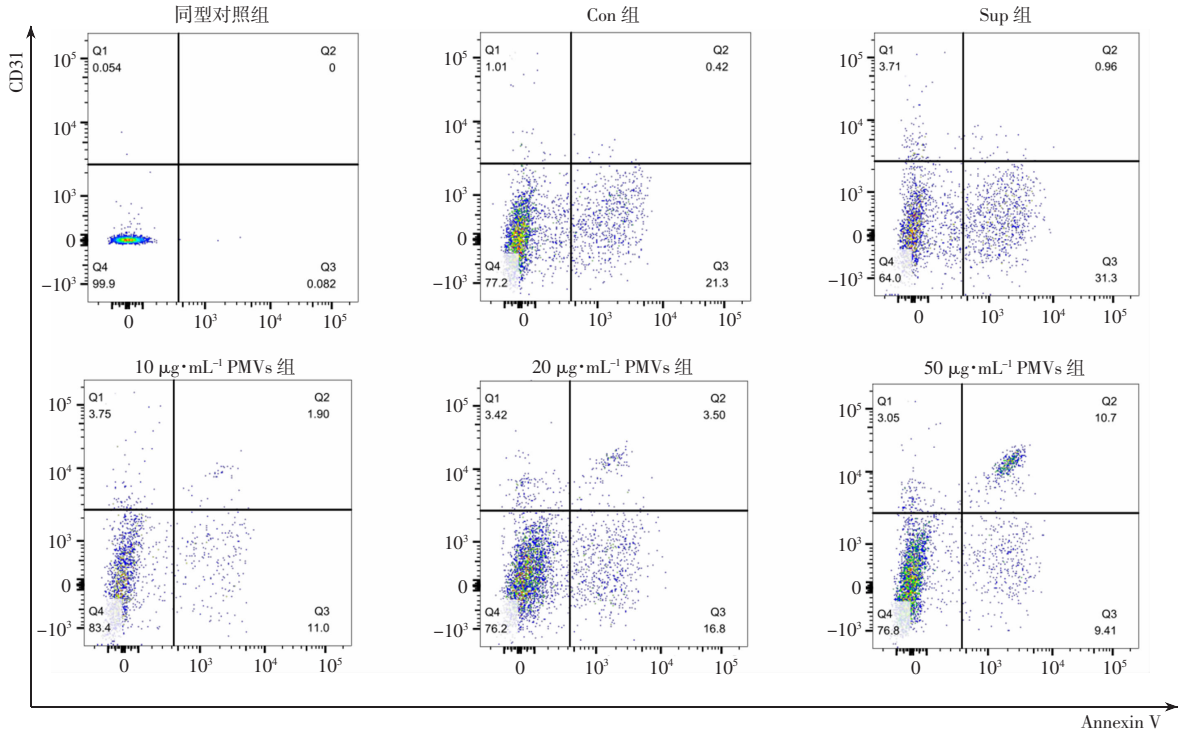
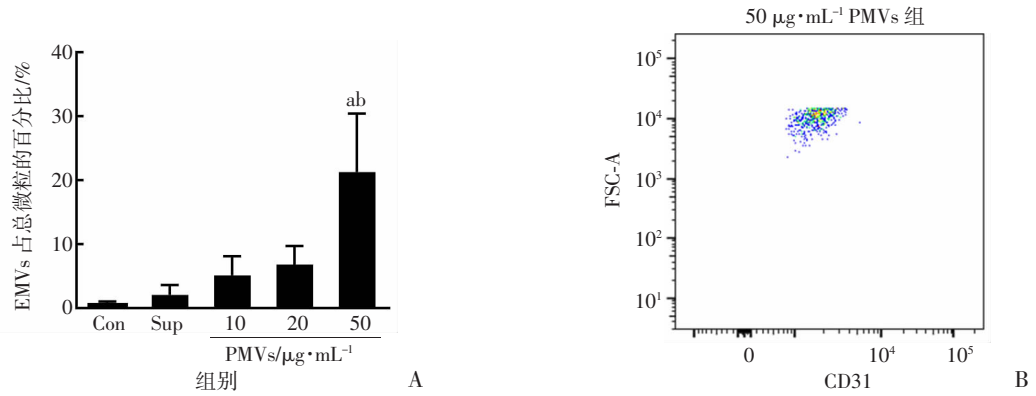


图 5 流式细胞术检测各组 HMECs 培养上清中的 EMVs($CD3^+/Annexin\ V^+$) ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:各组流式细胞术检测结果　a:$P<0.05$,与 Con 组比较;b:$P<0.05$,与 Sup 组比较;B:EMVs 的 FSC-A 散点图

图 6　PMVs 对各组 HMECs 培养上清中 EMVs 含量的影响　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

3　讨论

微血管内皮细胞是血液和微血管壁之间的一层高度选择性屏障,通过调节微血管的通透性和完整性,参与血液和组织间的物质能量代谢。此外,微血管内皮细胞也是一种具有分泌功能的细胞,可通过合成和释放多种细胞因子和血管活性物质,如 TXA2、PGI2、NO、ET-1、ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 等调节血管收缩和舒张,从而维持血管稳态和血管功能。微血管内皮功能障碍是微血管内皮细胞在多种病理因素刺激下出现的功能异常,表现为微血管张力调节障碍和黏附分子表达异常,是众多疾病发生的始动环节。例如,在心血管疾病高危因素如高血压、糖尿病、炎症、吸烟、血脂异常等的参与下,冠脉内皮细胞受损,导致了 CMD 的发生[8]。此外,心肌缺血再灌注所导致的微血管内皮损伤被认为是 PCI 术后"无复流"现象发生的重要原因之一[9]。血小板是血管壁炎症反应的重要参与成分。血小板募集到血管损伤部位后,迅速被激活,黏附、聚集于微血管内皮,导致微血栓形成和微血管阻塞[10]。活化的血小板及其激活后产生的 PMVs 还可释放大量细胞因子和趋化因子,招募白细胞黏附至受损血管壁局部,加剧局部炎症反应,导致内皮细胞通透性增加,微血管渗漏增多,微血管功能障碍[11]。

TXA2/PGI2 的动态平衡在调控内皮细胞通透性、维持微血管功能方面具有重要作用。PGI2 主要由血管内皮细胞产生,PGI2 可通过激活腺苷酸环化酶,上调血小板 cAMP 水平,拮抗 TXA2 的促血管收缩和血小板聚集作用。病理情况下,二者间平衡被打破,导致内皮损伤和功能障碍。TXA2 和 PGI2 的半衰期较短且不稳定,因此在研究中主要通过检测 TXA2 和 PGI2 的稳定代谢产物 TXB2 和 6-keto-PGF1α 以反映其水平[12]。本研究发现,PMVs 可明显增加 HMECs 培养上清中 TXB2 水平,同时降低 6-keto-PGF1α 水平,导致 HMECs 培养上清中 TXB2/6-keto-PGF1α 的比值显著升高。表明 PMVs 能干扰内皮细胞 TXA2/PGI2 的平衡状态,导致内皮依赖性血管舒缩功能受损。

NO 和 ET-1 是由血管内皮细胞合成和分泌的一对血管舒缩因子,两者保持一定的平衡是维持正常血管功能状态的重要因素。NO 是 L-精氨酸在 eNOS 的催化作用下合成的一种促血管舒张物质。此外,NO 还具有抑制白细胞与内皮细胞黏附、抑制血小板黏附和聚集等作用。而 ET-1 是一种内皮源性的强效血管收缩肽,在调节血管张力中发挥着重要的作用。本研究发现,PMVs 可通过下调 HMECs 中 eNOS 蛋白磷酸化水平(Ser1177 位点)而降低 eNOS 的活性,导致 NO 的生成和释放缺陷,同时促进 ET-1 蛋白的表达,从而破坏 NO/ET-1 平衡,使得血管内皮细胞表现为收缩功能优势而舒张功能障碍的状态,导致内皮细胞功能紊乱的发生。正常情况下,血管内皮细胞中 ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 的表达量很低,当内皮细胞炎症或损伤时,能在多种细胞因子的触发下迅速升高。本研究发现血小板活化后产生的 PMVs 能上调内皮细胞中 ICAM-1、VCAM-1 及 E-selectin 的表达水平,表明血小板可通过释放 PMVs 参与白细胞和血管内皮细胞之间的黏附级联反应从而加重炎症反应。

细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs)是细胞分泌的一类超微膜性囊泡,包括外泌体(exosomes)、微囊泡(microvesicles, MVs)和凋亡小体(apoptotic bodies)[13-14]。外泌体是由多囊泡体与细胞膜融合形成的直径为 30~150 nm 的 EVs,微囊泡则是由细胞膜出芽形成的直径为 100~1000 nm 的 EVs[15]。EMVs 是内皮细胞激活或凋亡时释放的微囊泡。临床研究发现,糖尿病、血管钙化等心血管疾病发生时,病人血浆

中 EMVs 的分泌增加,加重了血管局部炎症反应[16]。循环血中 EMVs 在所有微粒组分中所占比例的升高可作为内皮细胞损伤和功能紊乱的标志。本研究发现,PMVs 可显著促进 HMECs 释放 EMVs,提示 PMVs 对 HMECs 具有损伤作用。

本研究发现,PMVs 可使 HMECs 中 TXA2/PGI2 的比值升高,而 NO/ET-1 的比值下降,从而导致内皮细胞功能障碍;同时上调 HMECs 中 ICAM-1、VCAM-1、E-selectin 的水平,以及促进 EMVs 的分泌,提示 PMVs 可能通过上述影响导致内皮细胞损伤和内皮通透性增加。本研究进一步阐明了血小板与微血管功能障碍之间的关系,可望为微血管功能障碍和冠状动脉微血管疾病的防治提供新的思路。

参考文献:

[1] 张运, 陈韵岱, 傅向华, 等. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的中国专家共识[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2017.05.003.
ZHANG Y, CHEN Y D, FU X H, *et al*. Chinese expert consensus on the diagnosis and treatment of coronary microvascular disease [J]. Chin Circ J, 2017, 32(5): 421-430. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2017.05.003.

[2] TAQUETI V R, DI CARLI M F. Coronary microvascular disease pathogenic mechanisms and therapeutic options: JACC state-of-the-art review [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(21): 2625-2641. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.09.042.

[3] HAMILOS M, PETOUSIS S, PARTHENAKIS F. Interaction between platelets and endothelium: from pathophysiology to new therapeutic options[J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2018,8(5): 568-580. DOI: 10.21037/cdt.2018.07.01.

[4] ZALDIVIA M T K, MCFADYEN J D, LIM B, *et al*. Platelet-derived microvesicles in cardiovascular diseases [J]. Front Cardiovasc Med, 2017, 4: 74. DOI: 10.3389/fcvm.2017.00074.

[5] BEI J J, LIU C, PENG S, *et al*. Staphylococcal SSL5-induced platelet microparticles provoke proinflammatory responses via the CD40/TRAF6/NFκB signalling pathway in monocytes[J]. Thromb Haemost, 2016, 115(3): 632-645. DOI: 10.1160/TH15-04-0322.

[6] 汪泽扬, 潘丽娜, 陈丽媛, 等. 血小板微粒对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化斑块形成及稳定性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(6): 514-520. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811130.
WANG Z Y, PAN L N, CHEN L Y, *et al*. Effects of platelet microparticles on atherosclerotic plaque formation and stability in ApoE-/-mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(6): 514-520. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201811130.

[7] SUN C, FENG S B, CAO Z W, *et al*. Up-regulated expression of matrix metalloproteinases in endothelial cells mediates platelet microvesicle-induced angiogenesis [J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(6): 2319-2332. DOI: 10.1159/000475651.

[8] XU J, LO S, JUERGENS C P, *et al*. Assessing coronary microvascular dysfunction in ischaemic heart disease: little things can make a big difference[J]. Heart Lung Circ, 2020, 29(1): 118-127. DOI: 10.1016/j.hlc.2019.05.187.

[9] GAO X M, SU Y D, MOORE S, *et al*. Relaxin mitigates microvascular damage and inflammation following cardiac ischemia-reperfusion[J]. Basic Res Cardiol, 2019, 114(4): 30. DOI: 10.1007/s00395-019-0739-9.

[10] SCHANZE N, BODE C, DUERSCHMIED D. Platelet contributions to myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1260. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01260.

[11] BURBANO C, VILLAR-VESGA J, OREJUELA J, *et al*. Potential involvement of platelet-derived microparticles and microparticles forming immune complexes during monocyte activation in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Front Immunol, 2018, 9: 322. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00322.

[12] PÉREZ-CREMADES D, BUENO-BETÍC, GARCÍA-GIMÉNEZ J L, *et al*. Extracellular histones disarrange vasoactive mediators release through a COX-NOS interaction in human endothelial cells[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(8): 1584-1592. DOI: 10.1111/jcmm.13088.

[13] STAHL P D, RAPOSO G. Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis[J]. Physiology (Bethesda), 2019, 34(3): 169-177. DOI: 10.1152/physiol.00045.2018.

[14] BOULANGER C M, LOYER X, RAUTOU P E, *et al*. Extracellular vesicles in coronary artery disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(5): 259-272. DOI: 10.1038/nrcardio.2017.7.

[15] SHAO H L, IM H, CASTRO C M, *et al*. New technologies for analysis of extracellular vesicles[J]. Chem Rev, 2018, 118(4): 1917-1950. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00534.

[16] HIJMANS J G, BAMMERT T D, STOCKELMAN K A, *et al*. High glucose-induced endothelial microparticles increase adhesion molecule expression on endothelial cells [J]. Diabetol Int, 2019, 10(2): 143-147. DOI: 10.1007/s13340-018-0375-x.

(**收稿**:2019-11-29;**修回**:2020-02-01)

(编辑 汪勤俭)