DOI:10.16016/j.2097-0927.202111025

缺氧下调血小板表面 Siglec-9 聚糖配体导致血小板功能异常活化

摄渊婷[1],曾东风[2],刘红梅[1],吴妮婷[1],贾 乙[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系药剂学教研室[1];400042 重庆,陆军特色医学中心血液科[2]

[摘要] **目的** 探讨血小板表面 Siglec-9 聚糖配体表达水平在缺氧条件下的变化及其对血小板活化功能的影响。**方法** 鉴定血小板表面表达的 Siglec-9/E 聚糖配体,并加入唾液酸酶处理血小板,分为对照组和唾液酸酶组;对 24 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠和血小板进行缺氧处理,分为对照 3 d 组、缺氧 3 d 组、对照 7 d 组和缺氧 7 d 组(n=6);将健康志愿者全血分离提取血小板放置于缺氧箱,分为对照组、缺氧 48 h 组、唾液酸神经节甘脂(Ganglioside GT1b, GT1b)组和奥司他韦组(n=3)。采用流式细胞术检测血小板上 Siglec-9/E 配体、神经氨酸酶 1(Neuraminidase-1)等表达,以及二磷酸腺苷(ADP)、胶原和凝血酶刺激后血小板活化标记物 CD62p 的表达水平;利用髓系细胞条件性 6 只 6~8 周龄雄性 Siglec-E 基因敲除小鼠(Lyz2-cre:Siglec-$E^{flox/flox}$)血小板验证 Siglec-E 对血小板活化的抑制作用。**结果** 相对分子质量约为 130×10^3 的 Siglec-9/E 配体在血小板表面广泛表达且具有唾液酸末端的聚糖结构;与对照 7 d 组相比,缺氧 7 d 组小鼠外周血血小板上该配体表达显著降低 18.03%(P<0.05),CD62p 表达在 ADP、胶原和凝血酶刺激下显著增高(P<0.01),缺氧 48 h 组培养的血小板上该聚糖配体出现了相同改变(P<0.01);与野生型比较,敲基因小鼠血小板在 ADP、胶原和凝血酶刺激下 CD62p 水平显著增高(P<0.01);Siglec-9/E 特异性配体 GT1b 处理能够逆转缺氧导致的血小板异常活化(P<0.05);神经氨酸酶抑制剂能够阻断缺氧导致的 Siglec-9 配体表达降低(P<0.05)。**结论** 缺氧激活 NEU1 降低 Siglec-9/E 聚糖配体表达,减弱了 Siglec-9/E 途径抑制血小板活化的能力,导致血小板功能异常活化。

[关键词] 缺氧;血小板;Siglec-9;聚糖配体;神经氨酸酶-1
[中图法分类号] R331.143;R363.21;R364.4 [文献标志码] A

Hypoxia-downregulated Siglec-9 glycan ligands induce abnormal activation of platelet

SHE Yuanting[1], ZENG Dongfeng[2], LIU Hongmei[1], WU Niting[1], JIA Yi[1] [1]Department of Pharmacoutics, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Haematology, Army Medical Center of PLA, Chongqing, 400042, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-9 (Siglec-9)/E ligands in hypoxic condition and its effect on platelet activation. **Methods** The distribution, molecular size and glycoprotein class of Siglec-9 ligands on platelet were determined. The platelets were divided into control group and neuraminidase group [treated with α2-3,6,8 neuraminidase (NEU1)]. Twenty-four C57BL/6 male mice (6~8 weeks old) or cultured platelets were treated with or without hypoxia, and then the mice were divided into control 3-day group, hypoxia 3-day group, control 7-day group and hypoxia 7-day group, with 6 mice in each group. The platelets were separated and extracted from the whole blood of healthy volunteers and were placed in a hypoxia chamber, and then divided into control group, hypoxia 48-hour group, GT1b group and oseltamivir group (n=3). The expression of Siglec-E/9

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673427);陆军特色医学中心创新项目(2019CXJSB020)
[通信作者] 贾 乙,E-mail:jy@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

ligands, NEU1, and CD62p which was activated by adenosine diphosphate (ADP), collagen and thrombin on the platelet were detected by flow cytometry. The inhibitory effect of Siglec-E/9 ligands was verified using conditional knockout mice Lyz2-cre: Siglec-$E^{flox/flox}$ (male, 6~8 weeks old, $n=6$). **Results** Siglec-9 ligands are sialoglycoproteins with molecular weights of about 130×10^3 and are distributed broadly on the membrane of platelet. *In vivo*, the expression of Siglec-E ligands was decreased by 18.03% in response to hypoxia treatment ($P<0.05$), and the stimulation of ADP, collagen and thrombin resulted in obviously elevated CD62p level in the platelets from the hypoxia 7-day group than those from the control 7-day group ($P<0.01$). Similar results were observed in the platelets of the hypoxia 48-hour group ($P<0.01$). Compared with the platelets from wild-type mice, the platelets from the knockdown mice had significantly higher expression of CD62p after the stimulation of ADP, collagen and thrombin ($P<0.01$). GT1b treatment could reverse the abnormal platelet activation induced by hypoxia ($P<0.05$), and treatment of oseltamivir, NEU1 inhibitor could block the decreased expression of Siglec-9 ligand caused by hypoxia ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia can decrease the expression of Siglec-9/E ligands, reduce Siglec-9/E-mediated platelet activation, and thus lead to abnormal activation of platelets, which is associated with the increased expression of NEU1.

[**Key words**] hypoxia; platelet; Siglec-9; glycan ligand; neuraminidase-1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81673427) and the Innovation Project of Army Medical Center of PLA (2019CXJSB020). Corresponding author: JIA Yi, E-mail: jy@tmmu.edu.cn

高原地区是我国国防安全和经济建设的重要战略阵地,世居平原人员在高原缺氧环境下进行长期作业,除了会诱发高原肺水肿、高原脑水肿等疾病外,还可使自发性血管栓塞的发生率增加 30 倍[1],严重危害健康。近年来,国内外的相关研究发现,高原地区的特殊环境能够影响平原移居人群的凝血功能,出现高凝和纤溶抑制状态[1],但是相关凝血异常激活的机制尚未达成共识。凝血功能异常与血小板的数量和功能异常密切相关,研究发现,高原地区平原移居人群出现血小板数量增减的结果并不一致[2-4],但多数研究支持血小板数量出现显著降低,提示导致血栓性疾病剧增的重要因素并非血小板数量,而是其功能的紊乱。现有研究结果普遍认为,CD62p 等表达异常增高可以说明血小板功能激活[5],但目前相关研究多集中在效应指标的观察,对其变化产生的机制尚缺乏深入的探索。

表达于免疫细胞的唾液酸结合性 Ig 样凝集素(sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectin, Siglec)是能与唾液酸末端的聚糖结构特异性结合的一类细胞膜蛋白,属于凝集素家族。既往研究证实,Siglec-9(人源,小鼠同系物为 Siglec-E)主要表达于单核/巨噬细胞和中性粒细胞等,激活后通过募集 SHP-1 和 SHP-2 发挥抑制炎症反应的作用[6]。最近有研究发现,血小板表面亦有 Siglec9/E 表达,并参与了血小板活化杀菌反应的调控[7],考虑到血小板内 SHP-1 富集具有抑制血小板活性的作用[8],提示 Siglec9/E 极可能会抑制血小板活化。Siglec-9/E 的生物学活性需要与其特异性配体结合才能激活,进而发挥生理学作用,如红细胞上 Siglec-9 配体能维持外周血液循环中性粒细胞“静默”[9]、人工合成的 Siglec-9 聚糖配体能够显著抑制免疫细胞炎症反应[10]等,所以其聚糖配体是实现效应的关键。但重度糖基化的血小板表面是否存在 Siglec9/E 聚糖配体尚少见报道。本课题组在前期对多种细胞上 Siglec9/E 聚糖配体生物学活性及表达调控的研究基础上[11-12],对血小板表面是否存在 Siglec9/E 配体及配体是否参与血小板活化调控,以及缺氧是否对该聚糖配体的表达产生影响进而诱发血小板异常活化进行探索,为高原缺氧导致血栓性疾病的防治提供新的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

改良台式液、抗荧光猝灭封片剂购自索莱宝公司;CGS 缓冲液购自源叶生物;RIPA 裂解液、BCA 试剂盒购自碧云天公司;anti-CD41-FITC、anti-human IgG Fc-PE、anti-CD62P-PE 荧光抗体购自 Biolegend 公司(美国);anti-Siglec-E-APC、anti-Siglec-9-APC、重组 Human Siglec-9 Fc 蛋白、重组 Mouse Siglec-E Fc 蛋白、Human Polypeptide GalNac Transferase2 antibody、Sheep IgG HRP antibody 购自 R&D 公司(美国);ST3GAL3 antibody 购自 Abcam 公司(美国);GALE(C-4) antibody 购自 Santa Cruz Biotechnology(美国);胶原购自 Chrono-Log 公司(美国);ADP 购自 MCE 公司(美国);凝血酶购自罗氏公司(德国);唾液酸神经节甘脂(Ganglioside GT1b, GT1b)购自 Millipore 公司(德国);

α2-3,6,8 唾液酸酶购自 New England BioLabs(美国);奥司他韦购自 MCE 公司(美国);流式细胞仪型号为 BD Accrui™ C6(美国)。

1.2 实验动物

本研究符合陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会制定的伦理学标准(AMUWE20210936)。24 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(湘)20190004,使用单位许可证号 SYXK(渝)20170002。6 只 6~8 周龄雄性 Siglec-E 基因敲除小鼠(Lyz2-cre:Siglec-E$^{flox/flox}$)购自江苏赛业模式生物研究中心有限公司,生产许可证为 SCXK(苏)20180003,使用单位许可证号 SYXK(渝)20170002。所有小鼠于陆军军医大学药剂学教研室动物房饲养,饲养环境温度为(22±1)℃,湿度为 50%~60%,昼夜交替时间为 12 h/12 h。

1.3 实验方法

1.3.1 人血小板分离及处理 取健康志愿者全血 10 mL,标本取材经陆军特色医学中心伦理委员会批准(医研伦审 2021 第 218 号),本人知情同意。以 1∶10 体积的柠檬酸钠溶液抗凝全血 100×*g* 离心 30 min 后,取上清以 1 500×*g* 离心 20 min 获得血小板沉淀,以 CGS 缓冲液洗涤血小板 3 次,1640 培养基重悬血小板至 3×10^8/mL。分组($n=3$):①对照组:细胞培育箱培育 48 h;②缺氧 48 h 组:缺氧箱(氧气浓度为 2%)放置 48 h;③GT1b 组:缺氧箱放置 48 h 后加入 5 μmol/L GT1b 1 h;④奥司他韦组:缺氧箱放置 48 h 后加入 0.2 μmol/L 奥司他韦 1 h;⑤唾液酸酶组:血小板样本中加入 300 U/mL α2-3,6,8 唾液酸酶,置细胞培养箱中 18 h 后进行后续检测。

1.3.2 血小板 siglec-9 本身和配体表达以及活化后 CD62p 表达 每管取 50 μL 血小板加入 anti-siglec-9-APC 室温避光孵育 20 min,加入 200 μL PBS 终止反应,使用流式细胞仪进行检测;每管取 50 μL 血小板加入一抗 Siglec-9-fc 8 μL 4℃孵育 1 h,之后加入 anti-human IgG Fc PE,室温避光孵育 20 min,加入 200 μL PBS 终止反应,用 anti-CD41-FITC 对血小板进行特异性标记,使用流式细胞仪进行检测;分别取 500 μL 血小板到 1.5 mL EP 管中,加入终浓度为 100 μmol/L ADP、2 μg/mL 胶原和 0.2 U/mL 凝血酶,37 ℃孵育 10 min;加入 anti-CD62p-PE 室温避光孵育 20 min,加入 200 μL PBS 终止反应,上机检测,统计其平均荧光强度值。

1.3.3 免疫组化 多聚甲醛重悬血小板,固定 15 min,1 500×*g* 离心,DPBS 重悬;免疫组化笔画圈将细胞滴加在圈里,放入 37 ℃烘箱烤干。5%山羊血清封闭 1 h,滴加一抗 Siglec 9-fc,4 ℃湿盒内孵育过夜。PBS 清洗 3 次,滴加 FITC 山羊抗人,室温避光孵育 2 h。PBS 清洗 30 min,抗荧光猝灭封片剂封片,荧光显微镜下观察拍照。

1.3.4 动物分组 动物分为 4 组,每组 6 只,分别为对照 3 d 组、缺氧 3 d 组、对照 7 d 组和缺氧 7 d 组。对照组正常条件饲养 3 d 或 7 d;缺氧组置于缺氧箱(氧气浓度为 10%)放置 3 d 或 7 d。小鼠自由进食和饮水。采集小鼠血液后按上述方法分离制备血小板,并测定血小板 Siglec-E 本身和配体表达以及不同刺激剂对血小板活化影响,统计其平均荧光强度值。

1.3.5 蛋白质免疫印迹法 Western blot 测定血小板糖基转移酶表达水平:收集上述各组血小板加样本后加入 RIPA 细胞裂解液,于冰上裂解 20 min 后 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,用 BCA 法测定蛋白质含量。等蛋白浓度样品 100 ℃加热 10 min,上样 SDS 凝胶电泳,转膜,5%脱脂牛奶封闭 2 h。随后用 ST3GAL3(1∶1 000)、Human Polypeptide GalNac Transferase2 antibody(1∶200)或 GALE(C-4)antibody(1∶200)4 ℃孵育过夜,PBST 清洗 3 次后加入相应二抗,室温孵育 1 h,PBST 清洗 3 次,发光液显影后采集图片。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Student's t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

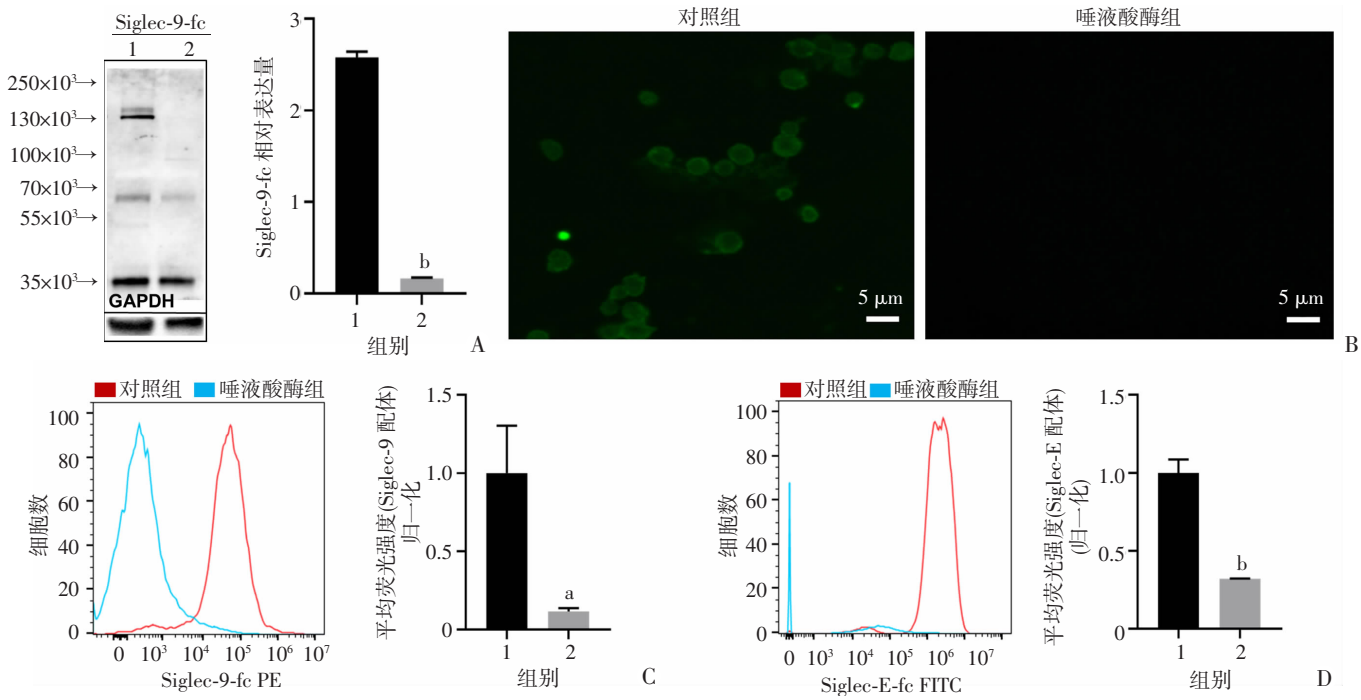
2 结果

2.1 血小板广泛表达 Siglec-9/E 聚糖配体

Western blot(图 1A)结果显示,Siglec-9 配体的相对分子质量约为 130×10^3,且经唾液酸酶处理后该条带信号消失($P<0.01$)。免疫组化(图 1B)和流式细胞术(图 1C、D)结果均显示该配体在细胞膜表面广泛表达,且经唾液酸酶处理后失去与 Siglec-9-Fc 结合的能力($P<0.05$),提示该配体是具有唾液酸末端的聚糖结构。

2.2 缺氧处理后小鼠血小板数量、Siglec-E 聚糖配体表达降低,血小板活化增加

流式细胞术检测小鼠血小板 Siglec-E 聚糖配体及活化指标 CD62p,结果显示,与对照组相比,缺氧 7 d 组小鼠血小板数量(图 2A)和 Siglec-E 配体水平(图 2B)均显著降低($P<0.05$),而血小板上 Siglec-E 表达 2 组无统计学差异(图 2C)。利用多种刺激对血小板进行活化后发现,缺氧 7 d 组小鼠血小板在各种刺激下的活化水平较对照组均显著增强($P<0.01$,图 2D)。而在缺氧处理 3 d 组的小鼠血小板中,以上指标与对照组均差异无统计学意义。



A:Western blot 检测血小板 Siglec-9 聚糖配体表达;B:免疫荧光检测血小板 Siglec-9 聚糖配体表达;C:流式细胞术检测人血小板 Siglec-9 聚糖配体表达;D:流式细胞术检测鼠血小板 Siglec-E 聚糖配体表达 1:对照组;2:唾液酸酶组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 1 血小板广泛表达 Siglec-9/E 聚糖配体 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.3 缺氧培养后血小板 Siglec-9 聚糖配体表达降低,血小板活化增加

流式细胞术检测人血小板 Siglec-9 配体及活化指标 CD62p。结果显示,缺氧处理导致血小板表面 Siglec-9 配体水平较对照组明显降低($P<0.01$,图 3A),而血小板上 Siglec-9 的表达量无统计学差异(图 3B)。与对照组比较,缺氧处理后的血小板受到 ADP、胶原和凝血酶刺激后的活化水平显著增强($P<0.01$,图 3C)。以上结果与动物模型结果一致。

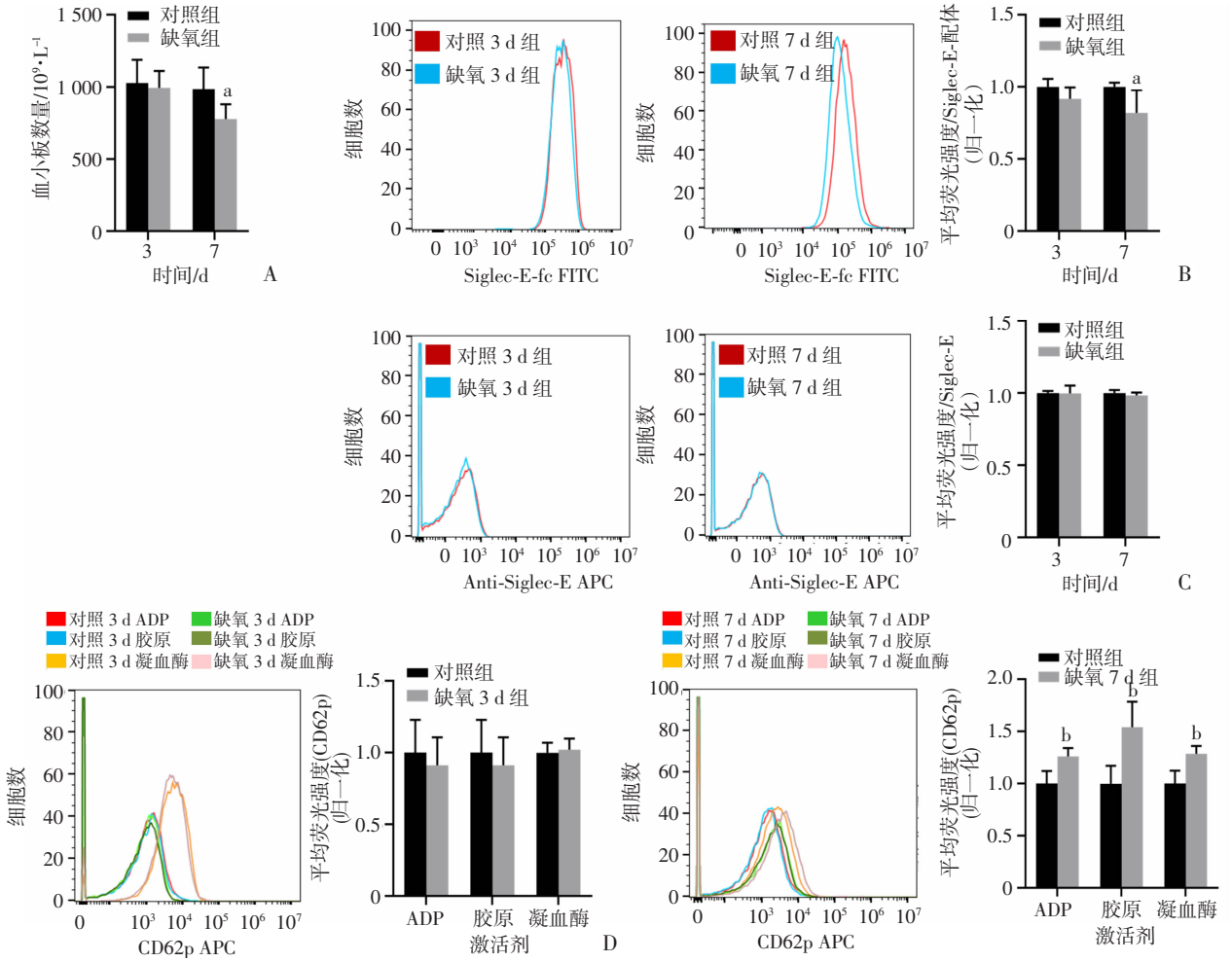
2.4 NEU1 增高导致 Siglec-E 聚糖配体表达降低

与野生型比较,敲基因小鼠血小板在 ADP、胶原和凝血酶刺激下 CD62p 水平显著增高 73.37%、143.02%和 25.81%($P<0.01$,图 4A)。外源性 Siglec-9 特异性配体 GT1b 能够逆转缺氧处理导致的血小板异常活化($P<0.05$,图 4B)。Western blot 检测缺氧处理后人血小板中聚糖合成相关酶 GALNT2、ST3GAL3、GALE 表达水平,均未发现显著变化(图 4C)。流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,缺氧处理组血小板表面 NEU1 表达水平显著升高($P<0.05$,图 4D),而神经氨酸酶抑制剂奥司他韦能够逆转由缺氧处理导致的 Siglec-9 聚糖配体表达的降低($P<0.05$,图 4E)。

3 讨论

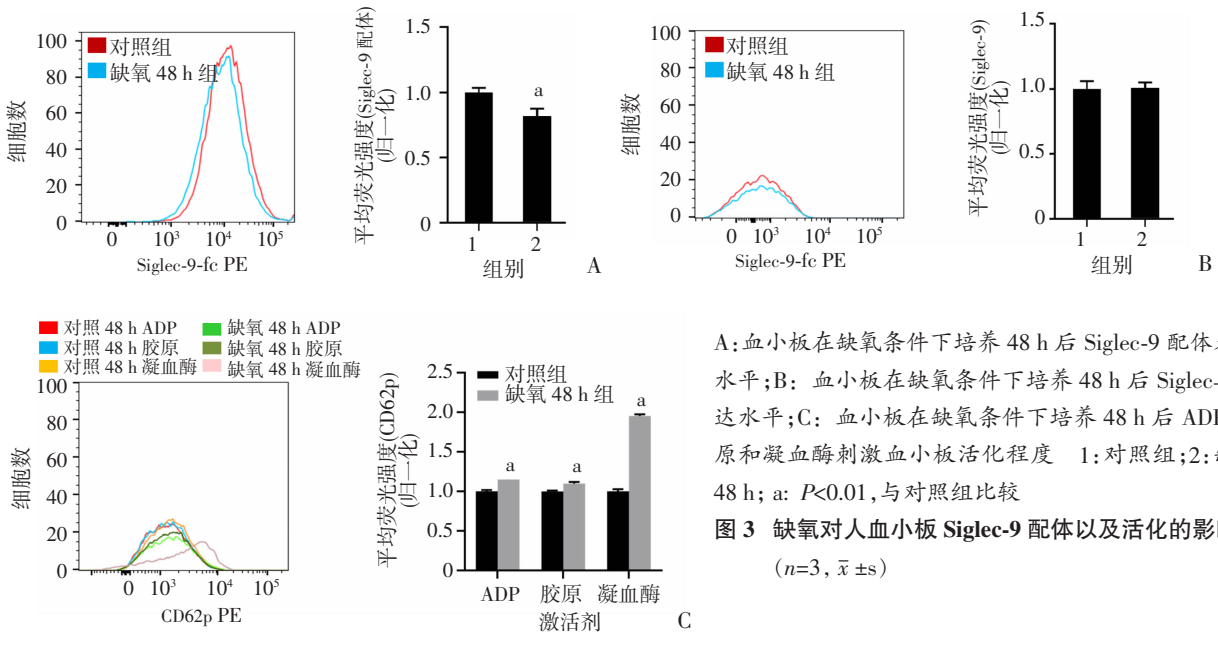
血小板是血液的重要组成部分,其活化与止血性血栓形成等多种重要过程紧密相关[13]。血小板出现异常活化可导致血栓性疾病发生[14],故维持其“静息平衡”状态具有重要的生理学意义。相关研究目前主要集中在血小板活化过程方面,发现不同刺激因素能通过各自信号通路引起血小板活化聚集[5],但对于正常条件下维持其静息的抑制性信号通路研究尚不够深入。

现有研究证实,Siglec-9/E 与特定配体结合后可发挥抑制嗜中性粒细胞等炎症细胞活性的生物学作用[9,15],且其配体的重要特征是具有 Lewis-X 聚糖结构,在不同组织中可表现为不同糖蛋白或者糖脂等。因为 Siglec-9/E 胞内部分包括了免疫受体酪氨酸抑制性基序(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif,ITIM)结构,激活后具有募集含有 Src 同源区 2 结构域的磷酸酶(Src homology region 2 domain-containing phosphatases,SHP)-1 和 SHP-2 的作用,而研究证实,血小板内 SHP-1 信号通路的激活是维持血小板静息状态的重要机制[16-17],提示 Siglec-9/E 通路激活可能具有抑制血小板活化的作用。



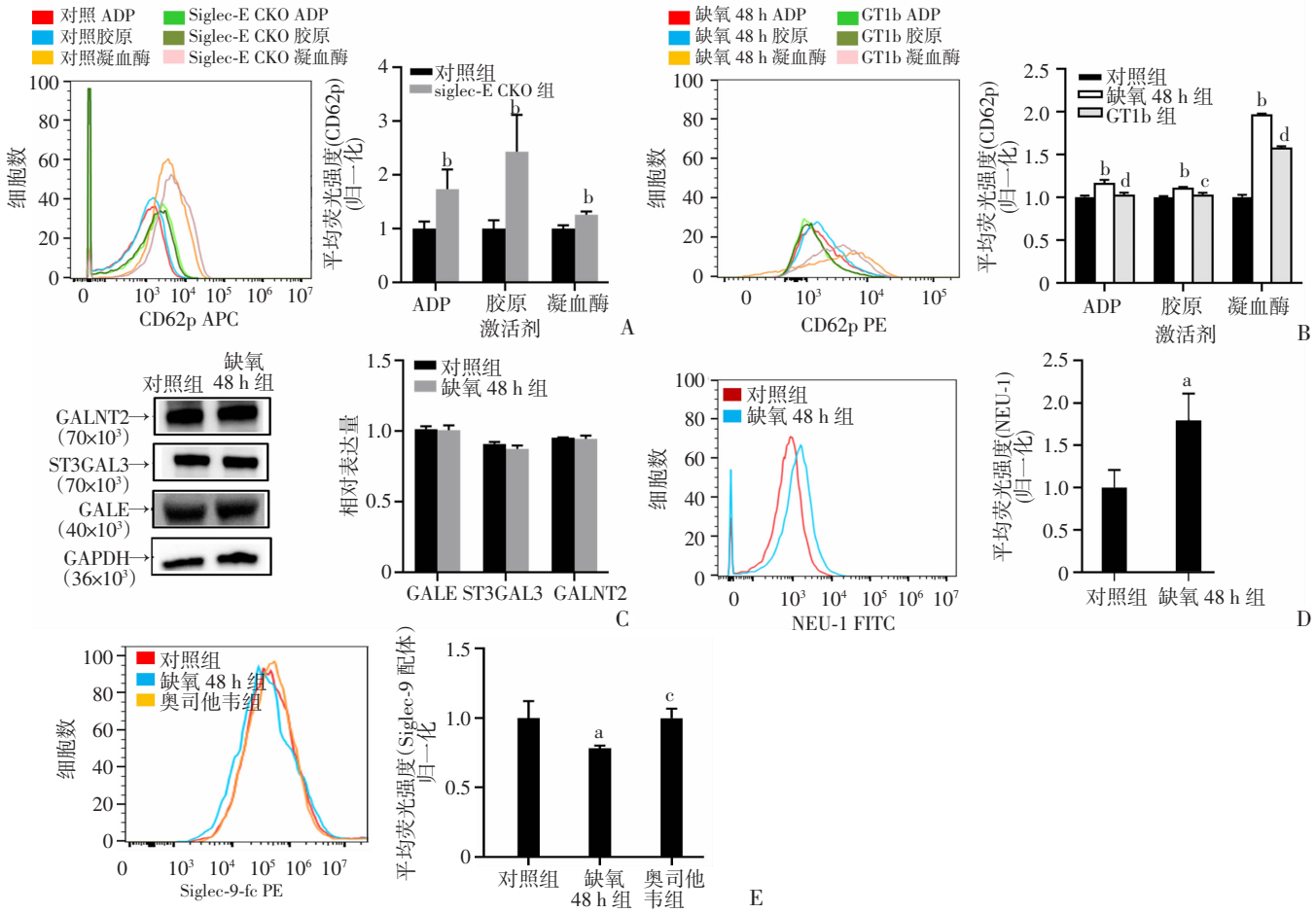
A:缺氧处理 3、7 d 小鼠血小板数量变化;B:缺氧处理 3、7 d 小鼠 Siglec-E 配体表达水平;C:缺氧处理 3、7 d 小鼠 Siglec-E 表达水平;D:缺氧处理 3 d 小鼠血小板 ADP、胶原和凝血酶刺激活化程度;E: 缺氧处理 7 d 小鼠血小板 ADP、胶原和凝血酶刺激活化程度　a:$P<0.05$,b: $P<0.01$,与对照组比较

图 2　缺氧对小鼠血小板 Siglec-E 配体和活化的影响　($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



A:血小板在缺氧条件下培养 48 h 后 Siglec-9 配体表达水平;B: 血小板在缺氧条件下培养 48 h 后 Siglec-9 表达水平;C: 血小板在缺氧条件下培养 48 h 后 ADP、胶原和凝血酶刺激血小板活化程度　1:对照组;2:缺氧 48 h; a: $P<0.01$,与对照组比较

图 3　缺氧对人血小板 Siglec-9 配体以及活化的影响
($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A:Siglec-E 特异性敲除小鼠 ADP、胶原和凝血酶刺激血小板活化程度;B:GTIb 处理缺氧培养血小板的活化程度;C:缺氧处理对聚糖合成相关酶表达水平的影响;D:缺氧处理对 NUE1 表达水平的影响;E:奥司他韦加入缺氧血小板对 Siglec-9 配体表达影响

a:$P<0.05$,b: $P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与缺氧 48 h 组比较

图 4 Siglec-E 信号通路抑制血小板活化能力 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

本研究发现,髓系细胞 Siglec-E 特异性敲除的小鼠血小板出现了异常活化的现象,分别给予 ADP、胶原和凝血酶刺激后,CD62p 水平较野生型分别增高了 73.37%、143.02%和 25.81%,证实 Siglec-E 确实参与了血小板“静息平衡”的维持机制。同时,本研究发现,血小板表面广泛表达 Siglec-9/E 的配体,与 Siglec-9/E 的结合具有唾液酸特异性。该配体与 Siglec-9/E 共同表达在血小板表面,以顺式结合的方式结合后激活 Siglec-9/E,从而发挥抑制血小板活化的作用,与单核细胞上该通路顺式激活的研究结果一致[18]。

大量临床研究结果提示,高原缺氧环境可以影响高海拔地区移居人群血小板的活化状态,进而升高血栓风险,但是具体机制尚未阐明[19]。基于以上对血小板“静息平衡”新机制的发现,本研究对缺氧对血小板 Siglec-9/E 配体表达的影响及其在血小板活性改变中的作用进行了探索。与既往研究结果一致,经过低压仓处理的小鼠在第 7 天出现了血小板的数量减少和异常活化。同时,血小板上 Siglec-E 表达未发生显著改变,而 Siglec-E 聚糖配体表达水平出现显著降低,体外培养的血小板也出现了相同的变化。结合既往研究发现,内皮细胞上 Siglec-9/E 配体表达水平增高能够增强抑制巨噬细胞炎症反应[20],以及红细胞上 Siglec-9 配体表达降低能够导致中性粒细胞异常激活[21]等结果,提示该配体表达水平可能与血小板异常活化相关。而给予 Siglec-9/E 的特异性激动剂 GT1b 能够显著逆转缺氧导致的血小板异常活化,进一步证实了该配体水平的降低是血小板在缺氧情况下发生异常活化的机制之一。

为进一步探索 Siglec-9/E 配体出现显著降低的机制,本研究对该聚糖配体表达相关的关键酶进行了检测。血小板具有相对完整的与聚糖合成和分解相关的系统[22],与该配体表达水平相关的关键酶主要包括与

聚糖合成相关的 GALNT2、ST3GAL3 和 GALE,以及与唾液酸移除相关的 NEU1 等。结果发现与聚糖合成相关的酶表达水平无显著变化,而流式细胞术检测发现血小板表面 NEU1 出现了显著升高。既往研究发现,炎症刺激能够诱导 THP-1 细胞质中 NEU1 易位到细胞表面发挥切除 Siglec-E 配体末端唾液酸的功能[23],且 NEU1 在细胞膜上水平增高导致的唾液酸剪切在多种循环性疾病中有重要作用[24],与本研究结果一致。提示缺氧导致的 Siglec-9/E 配体水平降低的机制应该与细胞膜上 NEU1 水平增高有关,而且由于成熟血小板中无细胞核,细胞膜上增加的 NEU1 应该来自于细胞质蛋白的易位,但具体机制尚待进一步探索。此外,Siglec-9/E 配体水平的变化可能源于载体蛋白表达量的变化和糖基数量的变化两个层面,本研究发现,利用神经氨酸酶抑制剂奥司他韦处理血小板能够阻止缺氧导致的 Siglec-9 配体水平的降低,提示该配体水平的变化发生在聚糖层面而非蛋白层面。

本研究证实,血小板表面 siglec-9/E 聚糖配体能通过抑制血小板活化参与维持其“静息稳态”。在此基础上,发现该配体表达减少可能是缺氧导致血小板出现异常活化的新机制,为缺氧引起血小板异常活化进而导致血栓性疾病的防治从糖生物学角度提供了新的潜在干预靶点。

参考文献:

[1] 邱义稳, 宋航, 赵婕, 等. 高原环境血小板的变化及其作用机制探讨[J]. 西南国防医药, 2015, 25(10): 1146-1148. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2015.10.041.
QIU Y W, SONG H, ZHAO J, *et al*. The changes of platelets in high altitude environment and the mechanism of action [J]. Med J Natl Defend Forces Southwest China, 2015, 25(10): 1146-1148. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2015.10.041.

[2] 周建丽, 王斌, 谢祥红, 等. 不同海拔高原驻训人员外周血小板参数变化及意义[J]. 武警医学院学报, 2010, 19(4): 304-305.
ZHOU J L, WANG B, XIE X H, *et al*. Changes of peripheral platelet count in training personnel at different altitude[J]. Acta Acad Med CPAF, 2010, 19(4): 304-305.

[3] 柯景彬, 晋军, 黄岚, 等. 急性高原暴露及短期习服对青年男性血小板相关参数的影响[J]. 解放军医学杂志, 2018, 43(3): 251-256. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2018.03.13.
KE J B, JIN J, HUANG L, *et al*. Influence of acute high altitude exposure and short-term acclimation on platelet-associated parameters in healthy young man[J]. Med J Chin PLA, 2018, 43(3): 251-256. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2018.03.13.

[4] SHANG C X, WUREN T N, GA Q, *et al*. The human platelet transcriptome and proteome is altered and pro-thrombotic functional responses are increased during prolonged hypoxia exposure at high altitude[J]. Platelets, 2020, 31(1): 33-42. DOI: 10.1080/09537104.2019.1572876.

[5] 秦芳梅, 叶洁瑜, 黄顺桦, 等. 血小板活化功能及血小板微粒对重型血友病 A 临床异质性的意义[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(13): 1362-1366. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201504095.
QIN F M, YE J Y, HUANG S H, *et al*. Significance of platelet activating capacity and platelet-derived microparticles in clinical phenotype heterogeneity of hemophlia A: report of 31 cases[J]. J Third Mil Med Univ, 2015, 37(13): 1362-1366. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201504095.

[6] MACAULEY M S, CROCKER P R, PAULSON J C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease[J]. Nat Rev Immunol, 2014, 14(10): 653-666. DOI: 10.1038/nri3737.

[7] UCHIYAMA S, SUN J, FUKAHORI K, *et al*. Dual actions of group B Streptococcus capsular sialic acid provide resistance to platelet-mediated antimicrobial killing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(15): 7465-7470. DOI: 10.1073/pnas.1815572116.

[8] KORPORAAL S J, KOEKMAN C A, VERHOEF S, *et al*. Downregulation of platelet responsiveness upon contact with LDL by the protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(3): 372-379. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.173278.

[9] LIZCANO A, SECUNDINO I, DÖHRMANN S, *et al*. Erythrocyte sialoglycoproteins engage Siglec-9 on neutrophils to suppress activation[J]. Blood, 2017, 129(23): 3100-3110. DOI: 10.1182/blood-2016-11-751636.

[10] DELAVERIS C S, CHIU S H, RILEY N M, *et al*. Modulation of immune cell reactivity with cis-binding Siglec agonists [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 19, 118(3): e2012408118. DOI: 10.1073/pnas.2012408118.

[11] JIA Y, YU H F, FERNANDES S M, *et al*. Expression of ligands for Siglec-8 and Siglec-9 in human airways and airway cells[J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 135(3): 799-810.e7. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.01.004.

[12] ZHANG Y X, ZHENG Y, LI J, *et al*. Immunoregulatory Siglec ligands are abundant in human and mouse aorta and are up-regulated by high glucose[J]. Life Sci, 2019, 216: 189-199. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.11.049.

[13] HEBER S, VOLF I. Effects of physical (in) activity on platelet function [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 165078. DOI: 10.1155/2015/165078.

[14] TOMAIUOLO M, BRASS L F, STALKER T J. Regulation of platelet activation and coagulation and its role in vascular injury and arterial thrombosis [J]. Interv Cardiol Clin, 2017, 6(1): 1-12. DOI: 10.1016/j.iccl.2016.08.001.

[15] STANCZAK M A, SIDDIQUI S S, TREFNY M P, *et al*. Self-associated molecular patterns mediate cancer immune evasion by engaging Siglecs on T cells[J]. J Clin Invest, 2018, 128(11): 4912-4923. DOI: 10.1172/jci120612.

[16] MA P S, CIERNIEWSKA A, SIGNARVIC R, *et al*. A newly identified complex of spinophilin and the tyrosine phosphatase, SHP-1, modulates platelet activation by regulating G protein-dependent signaling[J]. Blood, 2012, 119(8): 1935-1945. DOI: 10.1182/blood-2011-10-387910.

[17] COXON C H, SADLER A J, HUO J, *et al*. An investigation of hierachical protein recruitment to the inhibitory platelet receptor, G6B-B [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49543. DOI: 10.1371/journal.pone.0049543.

[18] HSU Y W, HSU F F, CHIANG M T, *et al*. Siglec-E retards atherosclerosis by inhibiting CD36-mediated foam cell formation[J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 5. DOI: 10.1186/s12929-020-00698-z.

[19] 谢玉海, 王学军. 高原地区患者术前凝血功能特征及血栓弹力图评估凝血功能的价值研究[J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(17): 80-83. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.017.
XIE Y H, WANG X J. Preoperative coagulation function of patients in plateau area and value of thrombelastography in assessment of coagulative function[J]. China J Mod Med, 2017, 27(17): 80-83. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.14.017.

[20] LIU H, ZHENG Y, ZHANG Y, *et al*. Immunosuppressive Siglec-E ligands on mouse aorta are up-regulated by LPS via NF-κB pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109760. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109760.

[21] KISER Z M, LIZCANO A, NGUYEN J, *et al*. Decreased erythrocyte binding of Siglec-9 increases neutrophil activation in sickle cell disease[J]. Blood Cells Mol Dis, 2020, 81: 102399. DOI: 10.1016/j.bcmd.2019.102399.

[22] WANDALL H H, RUMJANTSEVA V, SØRENSEN A L, *et al*. The origin and function of platelet glycosyltransferases [J]. Blood, 2012, 120(3): 626-635. DOI: 10.1182/blood-2012-02-409235.

[23] CHEN G Y, BROWN N K, WU W, *et al*. Broad and direct interaction between TLR and Siglec families of pattern recognition receptors and its regulation by Neu1 [J]. eLife, 2014, 3: e04066. DOI: 10.7554/eLife.04066.

[24] ZHANG L, WEI T T, LI Y, *et al*. Functional metabolomics characterizes a key role for N-acetylneuraminic acid in coronary artery diseases [J]. Circulation, 2018, 137(13): 1374-1390. DOI: 10.1161/circulationaha.117.031139.

(**收稿**:2021-11-03;**修回**:2021-12-03)

(编辑 张 维)