

蛋白激酶C抑制剂对血小板活化与凋亡的影响

夏月,周康熙,孙成林,闫荣*,戴克胜*

苏州大学苏州医学院,苏州大学附属第一医院江苏省血液研究所,国家血液系统疾病临床医学研究中心国家卫生健康委员会血栓与止血重点实验室,血液学协同创新中心,放射医学与辐射防护国家重点实验室,苏州215006

摘要: **目的** 蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)参与调控血小板信号转导、黏附和血栓形成等过程。本研究探讨两种PKC抑制剂对凝血酶诱导的血小板活化与凋亡的影响。**方法** 取健康志愿者静脉血并分离血小板。选择两种不同的PKC抑制剂Ro31-8220和GF109203,设置不同浓度梯度,并与血小板共孵育,利用流式细胞仪检测血小板活化与凋亡指标;通过聚集和血块收缩实验进一步验证PKC抑制剂对血小板功能的影响。**结果** 两种PKC抑制剂均剂量依赖性抑制凝血酶诱导的血小板磷脂酰丝氨酸暴露、P-选择素表达、GP II b/III a活化;同时Ro31-8220对线粒体膜电位去极化、血小板聚集及血块收缩有抑制作用。**结论** 抑制PKC活性可降低凝血酶诱导的血小板凋亡与活化,这对以PKC为靶点治疗血液系统相关疾病具有重要意义。

关键词 凋亡与活化;蛋白激酶C抑制剂;凝血酶

[中图分类号] R331.1+43

[文献标志码] A

[文章编号] 1009-6213(2024)06-0269-07

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6213.2024.06.003

Effects of protein kinase C inhibitors on platelet activation and apoptosis

Xia Yue, Zhou Kangxi, Sun Chenglin, Yan Rong*, Dai Kesheng*

Medical College of Soochow University, The First Affiliated Hospital of Soochow University, NHC Jiangsu Institute of Hematology, Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, National Clinical Research Center for Hematologic Diseases, Collaborative Innovation Center of Hematology, State key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Abstract: **Objective** Protein kinase C (PKC) is involved in the regulation of platelet signal transduction, adhesion and thrombosis. This study investigated the effects of two PKC inhibitors on thrombin-induced platelet function and apoptosis. **Methods** Venous blood was collected from healthy volunteers and platelets were separated. The platelets were co-incubated with two different PKC inhibitors, Ro31-8220 and GF109203. Platelet activation and apoptosis were detected by flow cytometry; the effect of PKC inhibitors on platelet function was further verified by clot contraction and platelet aggregation experiment. **Results** High concentrations of PKC inhibitors inhibited thrombin-induced platelet PS exposure, P-selectin expression, GP II b/III a activation. And Ro31-8220 inhibited mitochondrial membrane potential depolarization, platelet aggregation and blood clot contraction. **Conclusion** Inhibition of PKC activity can reduce thrombin-induced platelet apoptosis and activation, which is of great significance for targeting PKC in the treatment of related blood diseases.

Key words: apoptosis and activation; protein kinase C inhibitor; thrombin

血小板是由巨核细胞分化而来的无核细胞,在生理性止血、维持血管完整性及某些病理过程,如

血栓形成、炎症反应、动脉粥样硬化及肿瘤生长与转移等过程中发挥关键作用^[1],而凋亡是维持体内

基金项目:国家自然科学基金重点项目(82230003),苏州市姑苏卫生人才计划人才科研项目(GSWS2022008)

*通讯作者:戴克胜,Email:kdai@suda.edu.cn;闫荣,Email:yanrongbaobao@163.com

自身血小板数目平衡的重要途径。凝血酶是一种特殊的生理性诱导剂,有研究发现其在脓毒症、糖尿病和 ITP 患者的血浆中高表达,从而诱导血小板的活化和凋亡^[2]。凝血酶可以通过 PARs 受体激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)^[3],但其诱导血小板凋亡与活化的分子机制还未完全阐明。

蛋白激酶 C 参与调控血小板骨架重组、颗粒释放和整合素 GP II b/III a 活化^[4]等生理过程。目前有报道发现,急性特发性血小板减少性紫癜 (acute idiopathic thrombocytopenic purpura, AITP) 患者外周血 T 细胞^[5]、不稳定型心绞痛 (unstable angina, UA) 及 ST 段抬高急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者血小板膜中的 PKC 活性明显高于正常人^[6],这表明 PKC 在疾病初期形成或病变发展过程中起着重要的作用。因此,通过探讨 PKC 抑制剂对血小板活化和凋亡作用影响,可为血小板相关疾病的诊疗和血小板保存等提供新的理论基础与策略。

本研究将健康志愿者洗涤血小板与两种不同的 PKC 抑制剂共孵育,凝血酶刺激后检测活化与凋亡指标变化,筛选出效果更佳的 PKC 抑制剂,探究其对血小板聚集和收缩功能的影响,为临床上将其用于治疗血小板减少症或血栓治疗等提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

JC-1 (5 mg/L) 购自上海碧云天生物技术有限公司, FITC-lactadherin (FF0805) 购于美国 Haematologic Technologies 公司, FITC-anti-human CD62P (P-Selectin) (304904) 和 FITC anti-human PAC-1 (362804) 均购自美国 BioLegend 公司。凝血酶购自上海罗氏制药有限公司, 纤维蛋白原购自美国 Sigma-Aldrich 公司。Ro31-8220 (HY-13866A) 和 GF109203X (HY-13867) 购自美国 MCE 公司。抗凝剂、CGS 缓冲液和 MTB 缓冲液所用试剂均购自苏州科创生物有限公司。

来自健康志愿者的全血样本均通过苏州大学附属第一医院医学伦理委员会批准 [2022 伦审申报批第 495 号], 并根据《赫尔辛基宣言》, 获得所有受试者知情同意。

1.2 仪器设备

全自动人用三分类血细胞计数仪 (日本,

Sysmex XP-100); 德国 Sigma 台式离心机; PB-10/C 标准型 pH 计 (上海仪电科学仪器有限公司); 一次性使用注射器 (BD/KDL 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman-Coulter FC500); 血小板聚集仪 (美国 Chrono-Log 公司)。

1.3 洗涤血小板制备

在无菌、室温 (22 °C) 条件下, 用 ACD (1:7) 抗凝一次性注射器采集健康志愿者静脉血 20 mL, 低速离心得到富含血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP), 将 PRP 再次离心, 弃上清, 用预热的 CGS 缓冲液重悬洗涤沉淀, 用 MTB 缓冲液 (pH 7.4) 重悬血小板, 使用人的三分类自动血球计数仪计数, 调整血小板浓度至 3×10^8 /mL, 室温静置 1 h 备用。

1.4 血小板线粒体膜电位与 PS 暴露的流式检测

静置后的血小板与 DMSO、不同浓度的 PKC 抑制剂 Ro31-8220 和 GF109203X (2.5、5、10、20 μ mol/L) 室温反应 10 min, 加入凝血酶 (0.01 U/mL) 37 °C 孵育 30 min 后, 加入 JC-1 (2 μ g/mL) 避光孵育 5 min, FITC-lactadherin 标记 30 min, 用流式细胞仪检测。

1.5 血小板 P-选择素表达与 GP II b/III a 活化的流式检测

实验方法同上, 加入 FITC-anti-human CD62P 和 PAC-1 抗体避光孵育 15 min 后, 进行流式细胞仪检测。

1.6 血小板聚集实验

洗涤人的血小板与不同浓度的 Ro 31-8220 (10、20 μ mol/L) 室温预处理 10 min, 再加入凝血酶 (0.01 U/mL) 于聚集仪检测血小板聚集程度 (1 200 r/min, 37 °C)。

1.7 血块收缩

静置后的血小板与 DMSO、不同浓度的蛋白激酶 C 抑制剂 Ro 31-8220 (10、20 μ mol/L) 室温反应 10 min, 加入纤维蛋白原 (150 μ g/mL) 后再加入凝血酶 (0.01 U/mL), 立刻转移至流式管并用封口膜封口, 置于 37 °C 恒温箱内, 0、10 min、20 min、30 min 等不同时间段拍照观察血块收缩状态。

1.8 统计学分析

使用 Graphpad 软件, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数值采用 one-way (单个变量) ANOVA 分析, 每次实验均重复 3~5 遍, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Ro31-8220和GF109203X对血小板P-选择素表达的影响

PKC有多种亚型,血小板表达包括 $\alpha, \beta, \zeta, \eta, \epsilon, \theta$ 和 σ 在内的亚型^[7],而不同亚型在聚集与血栓形成的不同阶段调节血小板功能。Ro31-8220是一种细胞通透性药理抑制剂^[8],对蛋白激酶C具有选择性抑制作用。研究发现,GF109203X通过竞争结合ATP结合位点抑制PKC活性,能抑制胶原和凝血酶诱导的血小板聚集与ATP分泌^[9]。因此,为了更好地比较两种PKC抑制剂与血小板活化的关系,我们检测了血小板活化后释放的 α 颗粒P-选择素的表达。结果显示,Ro31-8220和GF109203X均可剂量依赖性的抑制凝血酶诱导的P-选择素的表达,其中

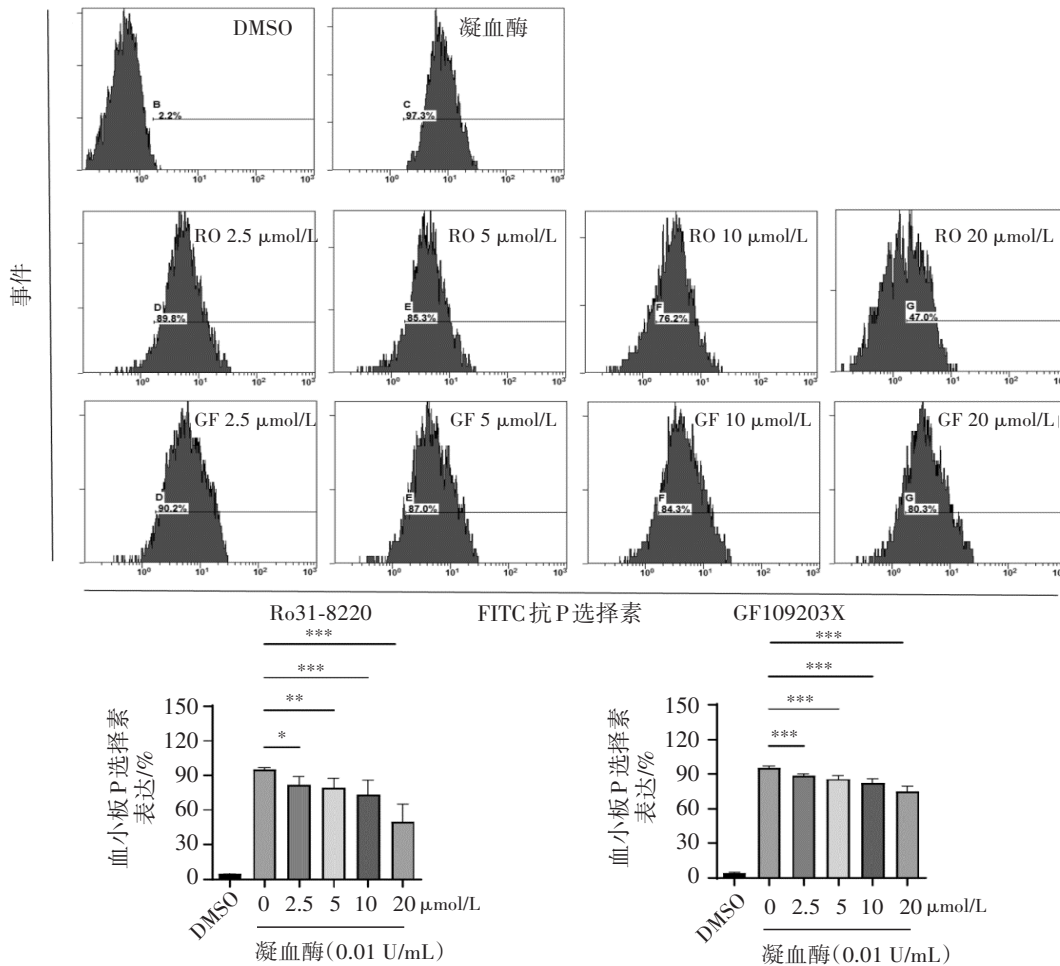
Ro31-8220抑制效果更加显著(图1)。

2.2 Ro31-8220和GF109203X对血小板GP II b/III a活化的影响

流式细胞仪检测GP II b/III a活化情况,结果显示,Ro31-8220和GF109203X均剂量依赖性的抑制凝血酶诱导的GP II b/III a活化,提示PKC抑制剂通过抑制GP II b/III a介导的“由内向外”信号通路来抑制凝血酶诱导的血小板活化。同样地,Ro31-8220抑制效果更加显著(见图2)。

2.3 Ro31-8220和GF109203X对血小板PS暴露的影响

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)通常位于质膜内小叶^[2],当血小板发生凋亡时会翻转到胞外,作为一种“吃我”信号,在免疫系统参与下,被暴露于巨噬细胞所识别并被清除^[10]。本研究使用流



注:RO表示Ro31-8220;GF表示GF109203X;流式细胞仪分别检测Ro31-8220和GF109203X处理后血小板P-选择素的表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 Ro31-8220和GF109203X体外抑制凝血酶诱导的血小板P-选择素的表达

式细胞仪检测磷脂酰丝氨酸暴露,结果显示,Ro31-8220 和 GF109203X 剂量依赖性的抑制凝血酶诱导的磷脂酰丝氨酸暴露(见图 3)。

2.4 Ro 31-8220 和 GF109203X 对血小板线粒体膜电位的影响

研究发现,无核的血小板凋亡是线粒体介导的程序性细胞死亡的内源性途径^[11]。血小板发生凋亡时,其线粒体膜电位(the mitochondrial membrane potential, $\Delta\Psi_m$)去极化。本研究使用亲脂性阳离子探针 JC-1,去极化特征是 JC-1 聚集物含量减少,反应在 FL2 荧光的减少^[12]。流式检测显示,Ro31-8220 呈剂量依赖性的抑制凝血酶诱导的线粒体膜电位去极化,而 GF109203X 没有明显的抑制作用(见图 4)。

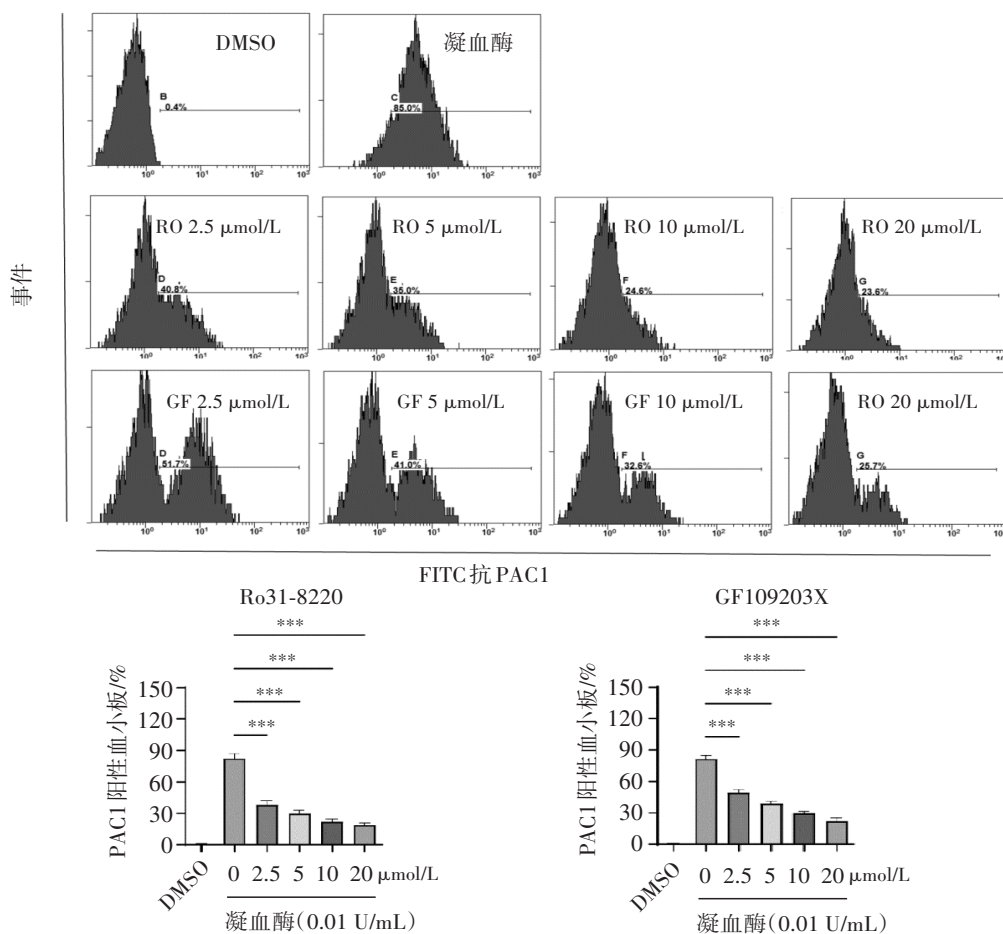
2.5 PKC 抑制剂对凝血酶诱导的血小板聚集的影响

为了探究 PKC 对血小板聚集功能的调控作用,

我们选择抑制效果更加明显的 Ro31-8220 做进一步研究。结果显示,20 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ro31-8220 几乎完全抑制凝血酶诱导的聚集(见图 5)。

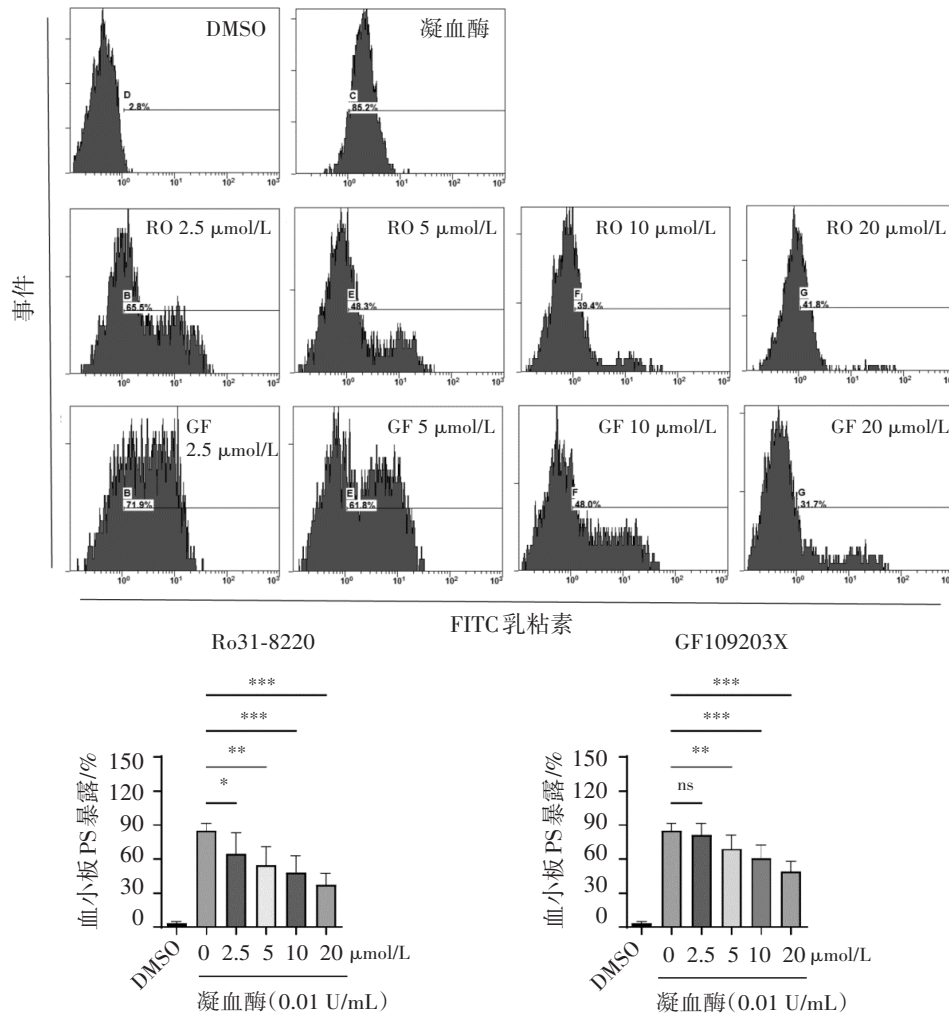
2.6 PKC 抑制剂对血块收缩的影响

当血小板被各种刺激剂激活时,肌动蛋白与非肌肉肌球蛋白 II a 相互作用^[13]产生的收缩,即血块收缩。血小板驱动的凝块收缩功能对止血及血液疾病,如中风、心脏病发作和静脉血栓栓塞等至关重要^[14]。为了探明 PKC 是否参与血块收缩,我们选择了抑制剂 Ro31-8220 处理,结果显示,高浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)的 Ro31-8220 能够显著地抑制血块收缩;而短时间内 10 μM 的 Ro31-8220 却促进血块收缩,表明在不同浓度下,Ro31-8220 对凝血酶诱导的“由外向内”信号转导有不同的影响(见图 6)。



注:RO 表示 Ro31-8220;GF 表示 GF109203X;流式细胞仪分别检测 Ro31-8220 和 GF109203X 处理后血小板 GP II b/III a 的活化情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 Ro31-8220 和 GF109203X 体外抑制凝血酶诱导的血小板 GP II b/III a 活化



注:RO表示Ro31-8220;GF表示GF109203X;流式细胞仪分别检测Ro31-8220和GF109203X处理后血小板的磷脂酰丝氨酸暴露。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 Ro31-8220和GF109203X体外抑制凝血酶诱导的血小板PS暴露

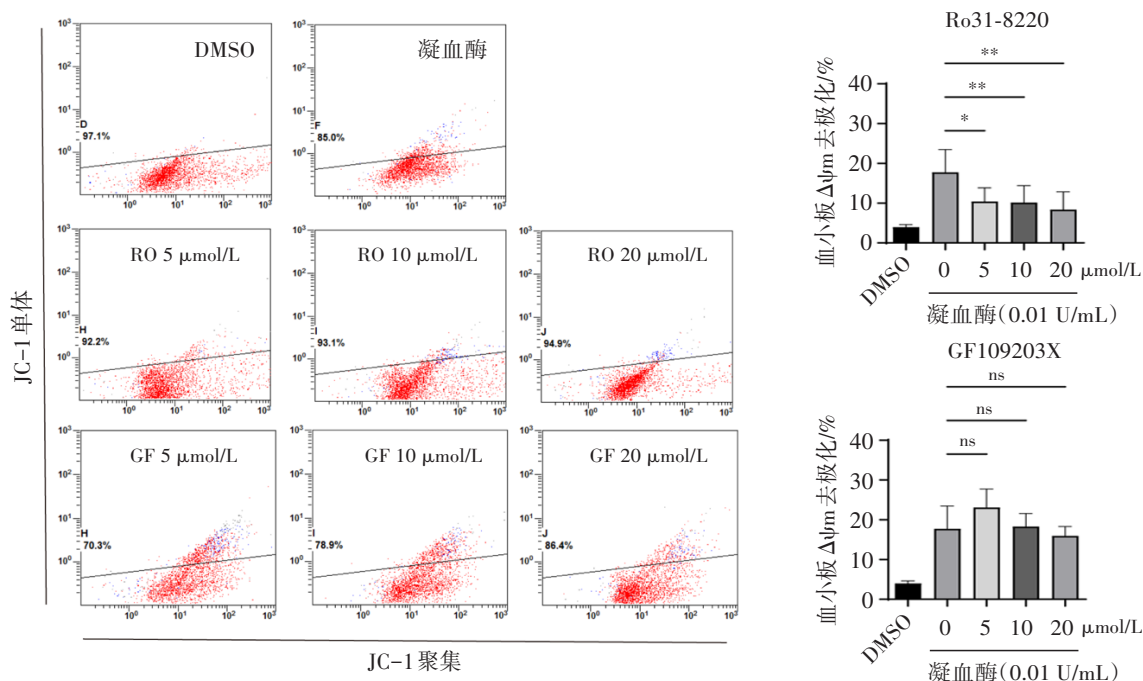
3 讨论

血小板在止血和血栓形成中起着重要的作用^[15]。在生理条件下,血小板产生与破坏受到严格调控,而凋亡是血小板数量减少的重要途径。越来越多的证据表明,许多病理刺激或药物作用如阿司匹林^[16]、卡马西平^[17]等可诱导血小板发生凋亡。研究发现,血小板凋亡及活化异常与多种疾病发生发展有关,如免疫性血小板减少症、2型糖尿病、中风等^[18]。

蛋白激酶C家族是血小板颗粒分泌、整合素激活、聚集、扩散和促凝活性的主要调控因子^[19],但PKC调控血小板凋亡与功能具体机制还未完全阐明。因此,我们选用两种不同浓度的蛋白激酶C抑

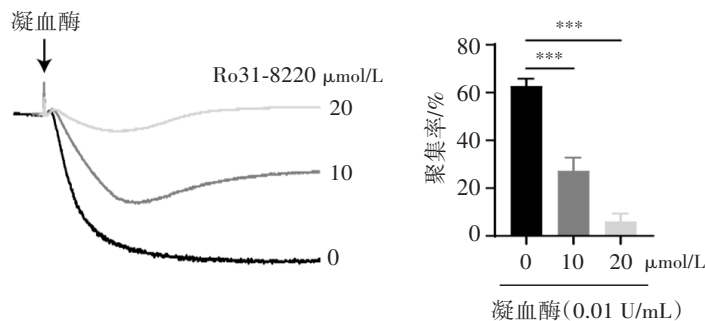
制剂Ro31-8220和GF109203X处理人的血小板,利用流式细胞仪、聚集和血块收缩实验等方法检测凝血酶诱导的血小板凋亡与活化情况。在实验中,我们发现蛋白激酶C抑制剂能剂量依赖性地抑制凝血酶诱导的血小板PS暴露、P-选择素表达、GP II b/III a活化,其中Ro31-8220抑制线粒体膜电位去极化效果更加明显。高浓度(20 μmol/L)的Ro31-8220抑制凝血酶诱导的聚集和血块收缩作用非常显著,而10 μmol/L的Ro31-8220对凝血酶诱导的血块收缩具有一定的促进作用,由于Ro31-8220是广谱性PKC抑制剂,我们猜测低浓度Ro31-8220抑制了血小板其他相关蛋白的活性,进而影响“由外向内”的信号传递,具体的机制还需后期继续探讨。

本研究揭示了蛋白激酶C在调控血小板功能和



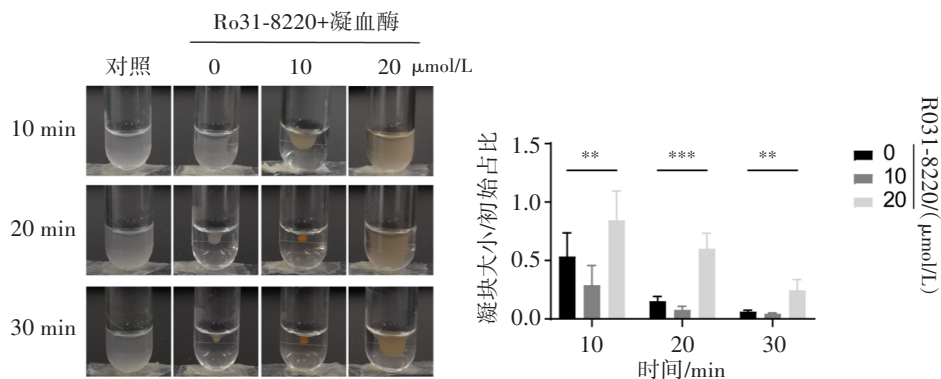
注:RO 表示 Ro31-8220;GF 表示 GF109203X;流式细胞仪分别检测 Ro31-8220 和 GF109203X 处理后血小板的线粒体膜电位去极化情况。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

图 4 Ro31-8220 体外抑制凝血酶诱导的血小板线粒体膜电位去极化



注:聚集实验检测 Ro31-8220 处理后血小板聚集功能变化。 $***P < 0.001$ 。

图 5 Ro31-8220 体外抑制凝血酶诱导的血小板聚集



注:血块收缩实验检测 Ro31-8220 处理后血小板收缩功能变化。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图 6 Ro31-8220 体外抑制血小板血块收缩

凋亡方面的重要意义,这为以蛋白激酶C为靶点治疗血小板相关疾病提供了新的理论基础与策略。但不同亚型在血小板活化与血栓形成中发挥不同的功能,有研究发现缺乏PKC α 的小鼠体内血栓形成明显减少,但没有出血缺陷,这表明PKC α 可能是有效的抗血栓靶点^[20]。同样地,其他亚型功能各异,有研究发现PKC delta影响血栓素A2释放及整合素GP II b/III a活化^[21]。而PKC θ 缺陷影响血小板“由外向内”信号转导,导致血小板在纤维蛋白原上的铺展受损^[22]。因此,通过差异调控PKCs亚型可调节血小板不同功能,但蛋白激酶C具体如何被激活并诱导血小板凋亡有待进一步研究。

作者贡献声明 夏月负责文章撰写和实验实施;周康熙和孙成林负责数据分析和论文审阅修改;闫荣和戴克胜负责研究整体指导和经费支持

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Puhm F, Boilard E, Machlus K R. Platelet Extracellular Vesicles: Beyond the Blood[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(1): 87-96.
- [2] Zhao L, Liu J, He C, et al. Protein kinase A determines platelet life span and survival by regulating apoptosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(12): 4338-4351.
- [3] Chaudhary P K, Kim S. Characterization of the distinct mechanism of agonist-induced canine platelet activation[J]. *J Vet Sci*, 2019, 20(1): 10-15.
- [4] Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, et al. Protein kinase C-theta in platelet activation[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(20): 3208-3215.
- [5] 薛俭成, 伍昌林, 李岚. 蛋白激酶C活性变化在急性ITP患者发病机制中的作用[J]. *临床输血与检验*, 2007, 9(3): 210-213.
- [6] 杨旭玲, 葛华. 血小板中蛋白激酶C活性在急性冠脉综合征患者体内的变化[J]. *中国实验诊断学*, 2006, 10(6): 611-612.
- [7] Buensuceso C S, Oberfell A, Soriani A, et al. Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-associated protein kinase C beta[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 644-653.
- [8] London F S. The protein kinase C inhibitor R0318220 potentiates thrombin-stimulated platelet-supported prothrombinase activity[J]. *Blood*, 2003, 102(7): 2472-2481.
- [9] Toullec D, Pianetti P, Coste H, et al. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(24): 15771-15781.
- [10] Leventis P A, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes[J]. *Annu Rev Biophys*, 2010, 39: 407-427.
- [11] Segawa K, Nagata S. An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure[J]. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(11): 639-650.
- [12] Carr M E Jr, Martin E J, Carr S L. Delayed, reduced or inhibited thrombin production reduces platelet contractile force and results in weaker clot formation[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002, 13(3): 193-197.
- [13] Tutwiler V, Litvinov R I, Lozhkin A P, et al. Kinetics and mechanics of clot contraction are governed by the molecular and cellular composition of the blood[J]. *Blood*, 2016, 127(1): 149-159.
- [14] Holinstat M. Normal platelet function[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2): 195-198.
- [15] Zhao L, Zhang W, Chen M, et al. Aspirin induces platelet apoptosis[J]. *Platelets*, 2013, 24(8): 637-642.
- [16] Xiao W, Zhou K, Yang M, et al. Carbamazepine induces platelet apoptosis and thrombocytopenia through protein kinase A[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 749930.
- [17] Franks Z G, Campbell R A, Weyrich A S, et al. Platelet-leukocyte interactions link inflammatory and thromboembolic events in ischemic stroke[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207: 11-17.
- [18] Chen M, Yan R, Zhou K, et al. AKT-mediated platelet apoptosis and its therapeutic implications in immune thrombocytopenia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(45): E10682-E10691.
- [19] Zaid Y, Senhaji N, Darif Y, et al. Distinctive roles of PKC delta isozyme in platelet function[J]. *Curr Res Transl Med*, 2016, 64(3): 135-139.
- [20] Harper M T, Poole A W. Diverse functions of protein kinase C isoforms in platelet activation and thrombus formation[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(3): 454-462.
- [21] Yacoub D, Théorêt J F, Villeneuve L, et al. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(40): 30024-30035.
- [22] Soriani A, Moran B, De Virgilio M, et al. A role for PKC-theta in outside-in alpha (IIb) beta3 signaling[J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(3): 648-655.

(收稿日期: 2024-06-29)

(本文编辑: 钱婷婷; 本文审校: 叶絮)