

氟维司群抑制血小板功能的研究

马如越¹, 赵丽丽², 杨梦楠², 张蕾¹, 赵瑞琦¹, 戴克胜^{1,2*}

1. 苏州大学附属苏州九院(苏州市第九人民医院), 苏州 215299;

2. 苏州大学附属第一医院, 苏州大学唐仲英医学研究院, 江苏省血液研究所, 苏州 215006

摘要:目的 探究氟维司群对血小板功能的影响及相关机制。方法 将不同浓度的氟维司群(0.1、1和10 $\mu\text{mol/L}$)及溶剂对照(0.25%二甲基亚砜DMSO)分别与人血小板在体外进行共孵育,然后用聚集仪检测其对凝血酶、胶原、U46619刺激的血小板聚集及ATP释放的影响;流式细胞术检测血小板表面P-选择素表达和整合素 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 活化情况;荧光显微镜观察氟维司群对纤维蛋白原表面血小板铺展的影响;蛋白免疫印迹检测AKT Ser473和PKC蛋白的磷酸化水平。结果 氟维司群能够抑制凝血酶、胶原、U46619诱导的血小板聚集和ATP释放,抑制血小板P-选择素表达和整合素 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 活化和血小板铺展,降低AKT Ser473和PKC的磷酸化水平。结论 氟维司群抑制血小板聚集、释放、铺展功能,其机制与调控AKT和PKC蛋白磷酸化水平有关,可作为潜在的抗血小板药物。

关键词 氟维司群;血小板活化;AKT磷酸化;PKC通路

[中图分类号] R331.1+43

[文献标识码] A

[文章编号] 1009-6213(2024)04-0145-07

Doi:10.3969/j.issn.1009-6213.2024.04.001

Study on the inhibition of platelet function by fulvestrant

Ma Ruyue¹, Zhao Lili², Yang Mengnan², Zhang Lei¹, Zhao Ruiheng¹, Dai Kesheng^{1,2*}

1. Suzhou University Affiliated Suzhou Ninth Hospital (Suzhou Ninth People's Hospital), Suzhou 215299, China; 2. The First Affiliated Hospital of Suzhou University, Tang Zhongying Medical Research Institute of Suzhou University, Jiangsu Institute of Hematology, Suzhou 215006, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of fulvestrant on platelet function and its related mechanism. **Methods** Different concentrations of fulvestrant (0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$) and solvent control (0.25% dimethyl sulfoxide (DMSO)) were co-incubated with human platelets in vitro, and then the effects of fulvestrant on platelet aggregation and ATP release stimulated by thrombin, collagen and U46619 were detected by aggregometer. The expression of P-selectin on the platelet surface and the activation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ were detected by flow cytometry. The effect of fulvestrant on platelet spreading on the fibrinogen surface was observed by fluorescence microscopy. The phosphorylation levels of AKT Ser473 and PKC proteins were detected by western blotting. **Results** Fulvestrant could inhibit platelet aggregation and ATP release induced by thrombin, collagen and U46619, inhibit the expression of P-selectin, integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ activation and platelet spreading, and reduce the phosphorylation levels of AKT Ser473 and PKC. **Conclusion** Fulvestrant inhibits platelet aggregation, release and spreading, and its mechanism is related to the regulation of AKT and PKC protein phosphorylation levels. It can be used as a potential antiplatelet drug.

Key words: Fulvestrant; Platelet activation; AKT phosphorylation; PKC pathway

基金项目:国家自然科学基金重点国际合作项目(81820108003);国家自然科学基金项目(81770117);苏州市吴江区卫健委科教兴卫项目(WWK202201);苏州市第九人民医院内科研课题项目(YK202202)

*通讯作者:戴克胜, Email:kdai@suda.edu.cn

在许多发达国家,心血管疾病是导致死亡的主要原因^[1],与恶性肿瘤相关的所有死亡中约 50% 是由血栓事件引起的,血栓性疾病严重威胁人类的健康^[2]。当血管内皮受到损伤,血小板通过受体等与暴露的蛋白成分相互作用,使血小板黏附在损伤部位,形成血栓,起到止血作用^[3]。同时,活化的血小板还可释放促凝活性物质并提供催化表面,在启动凝血途径、凝血酶的激活、促进血栓形成中发挥关键作用^[2]。可见,血小板在生理性止血和病理性血栓形成过程中起关键的核心作用。因此,针对血小板的研究,在治疗血栓性疾病中具有重要意义。

激素治疗与动脉和静脉血栓的风险增加有关^[4-5]。在使用口服避孕药及激素替代治疗女性中,发生心肌梗死和缺血性卒中的风险显著增加^[6-8],减少雌激素剂量,可显著减少血栓发生。研究显示雌激素是导致血栓形成的危险因素,能够促进血小板凝血酶的生成诱导高凝状态^[9],增强血小板聚集^[10]。临床研究同样表明,使用激素避孕的女性人群中发现血小板增多或血小板聚集增强^[11]。雌二醇可通过雌激素受体发挥作用^[12],近年来研究发现,雌激素受体 α 和 β 均在巨核细胞和血小板中表达^[13],但其具体的功能及作用机制尚不明确,氟维司群作为新的雌激素受体拮抗剂,与雌激素受体竞争性结合,目前临床用于治疗晚期乳腺癌患者^[14],但其在血小板中的重要性和作用仍然知之甚少。本文以血小板为研究对象,通过抑制雌激素受体药物氟维司群研究其对血小板集功能的影响,并初步探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

氟维司群(fulvestrant, ICI-182780)购自 Selleck 生物技术公司;凝血酶购自德国罗氏公司,胶原蛋白、ADP 和 Lume 购自 Chrono Log; TXB2 类似物 U46619 购自 Med Chem Express (MCE) 公司, FITC-P-选择素和 FITC-PAC1 购自 BD Bioscience; Akt、Phospho-Akt (Ser473)、Phospho-PKC 底物(Phospho-Pleckstrin)、PKC 底物(Pleckstrin)和 GAPDH 的单克隆抗体购自 Cell Signaling Technology (CST) 公司; FITC-鬼笔环肽购自美国 Sigma Chemical 公司;全自动血液细胞分析仪器购自日本 Sysmex 公司;血小板聚集仪购自美国 Chrono-log 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman-Coulter 公司,荧光显微镜购自上海徕卡公司。

1.2 血小板来源

选择 5 名 18~25 岁健康成年志愿者作为采血对象,其中健康对照人群的性别分布均衡,以减少其对结果的潜在影响,排除心血管系统、肿瘤、免疫缺陷等相关疾病,并且采血前 2 周内未服用任何抗血小板药物,严格按照外科消毒流程采集肘静脉全血,此研究获得了苏州大学附属第一医院医学伦理委员会的批准[2023 伦理(申报)批第 524 号],所有的志愿者均签署知情同意。

1.3 血小板制备

从 5 名健康志愿者肘前静脉抽取血液,用 1:7 体积的 ACD (ACD: 2.5% 柠檬酸三钠, 2.0% D-葡萄糖, 1.5% 柠檬酸) 抗凝,全血室温 200 g 离心 11 min 获得富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP), 600 g 离心 PRP 获得血小板,将血小板用 CGS 缓冲液(0.123 mol/L NaCl, 0.033 mol/L D-葡萄糖, 0.013 mol/L 柠檬酸三钠, pH 6.5) 洗涤,最后在改良的 Tyrode 缓冲液(MTB)中重悬(MTB: 2.5 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 5.5 mmol/L D-葡萄糖, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, pH 7.4), 分别调整血小板最终浓度为 3×10^8 /mL, 并在使用前在室温下静置 1~2 h。

1.4 血小板聚集和释放

洗涤后的血小板分别与溶剂对照(DMSO)或氟维司群(0.1、1 和 10 μ mol/L)于 37 °C 预处理 10 min, 通过血小板聚集仪在 37 °C、250 g 剪切力条件下,检测不同诱导剂(胶原蛋白、凝血酶、U46619)刺激时的聚集反应。在血小板释放实验中,刺激前加入 CHRONO-LUME 试剂测量 ATP 释放,连续监测记录 10 min 内血小板最大聚集率的释放曲线。

1.5 流式细胞术

实验分为静息组、对照组(DMSO)、氟维司群组(0.1、1 和 10 μ mol/L), 分别在 37 °C 反应 10 min, 随后加入凝血酶刺激剂(0.05 U/mL), 静息组加入生理盐水, 37 °C 处理血小板 30 min, 取 10 μ L 反应后的血小板于流式管中, 利用 FITC 偶联的抗 CD62p 和 PE 偶联的 PAC-1 抗体在室温黑暗中反应 30 min, 随后使用流式细胞仪分析样品。

1.6 血小板铺展

用组化笔画好同等大小的圆圈的载玻片, 在 4 °C 下用 30 μ g/mL 纤维蛋白原 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.3) 中涂抹过夜, 洗净的血小板(2×10^7 /mL) 用凝血酶刺激, 让其粘附在涂有纤维蛋白原的孔上并

在 37 °C 恒温培养箱中铺展。1×PBS 洗涤后,4% PFA 固定、0.1% TritonX-100 破膜,5% BSA 固定,然后用鬼笔环肽(0.165 μmol/L)标记肌动蛋白丝,通过共聚焦显微镜观察粘附的血小板铺展情况,随机采集 5 个区域的图像,用 ImageJ 软件分析统计血小板的铺展率,并进行统计学分析。

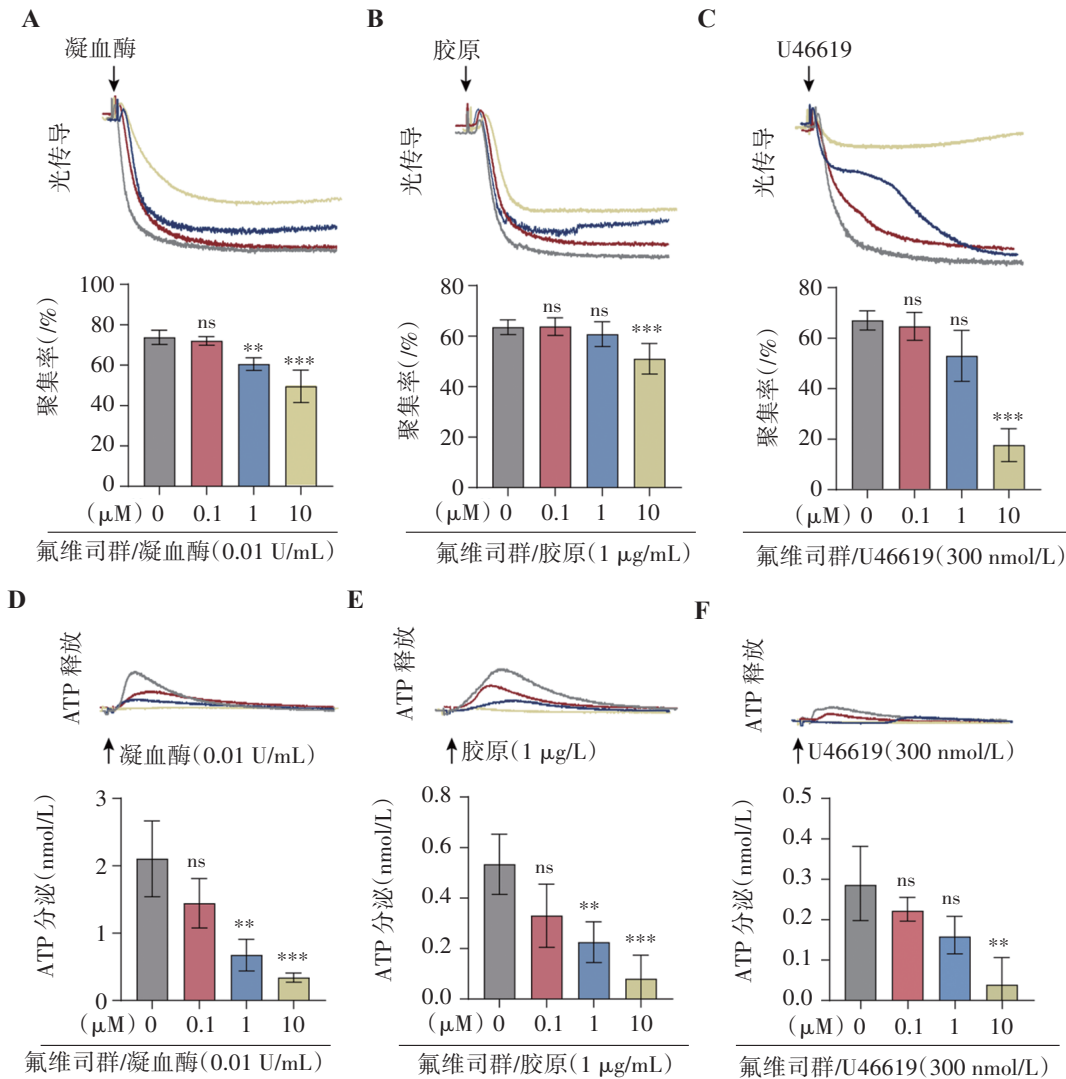
1.7 蛋白质免疫印迹

将上述洗涤人血小板分别与对照或氟维司群孵育 10 min,加入刺激剂 3 min 后,利用细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂),冰上裂解 30 min,随后加入蛋白上样缓冲液,100 °C 煮样

10 min 使蛋白变性。纯化后的细胞蛋白用 SDS-PAGE 进行电泳分离,转移到 PVDF 膜上后牛奶封闭 2 h,用不同的一抗 4 °C 条件下孵育过夜,用增强化学发光法观察免疫反应条带,通过 Image J 软件进行图像处理。

1.8 统计学分析

使用 Graphpad 软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组数据之间的比较采用独立样本 *t* 检验,多组数据之间的比较采用 *one-way ANOVA* 分析,每次实验均重复 3 遍以上,*P*<0.05 认为差异有统计学意义。



注:A-C:不同浓度的氟维司群于 37 °C 预处理 10 min 条件下,在凝血酶(0.01 U/mL)(A)、胶原(1 μg/mL)(B)、U46619(300 nmol/L)(C)诱导的人血小板聚集的代表性图像。D-F:不同浓度的氟维司群于 37 °C 预处理 10 min 条件下,在凝血酶(0.01 U/mL)(D)、胶原(1 μg/mL)(E)、U46619(300 nmol/L)(F)诱导的人血小板释放的代表性图像。数据以 5 个独立实验的平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示(*n*=5)。**P*<0.05,***P*<0.01,and****P*<0.001,ns:差异无统计学意义。数据采用单因素方差分析。

图 1 氟维司群依赖地抑制了血小板的聚集和释放

2 结果

2.1 氟维司群浓度依赖抑制血小板聚集功能

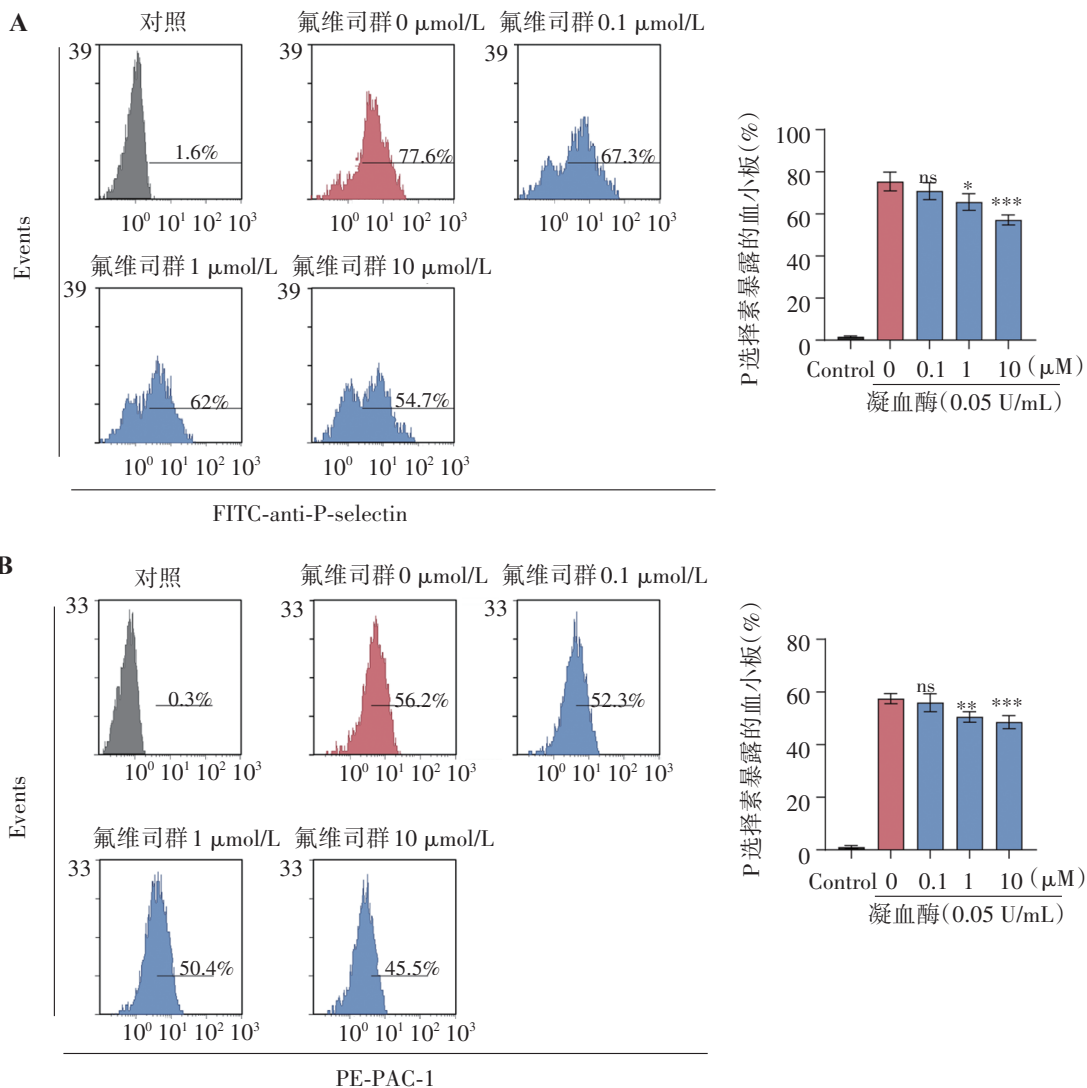
光比浊法显示,与对照组相比,氟维司群对凝血酶(图 1A)、胶原(图 1B)、U46619(图 1C)诱导的血小板聚集具有抑制作用,并呈浓度依赖性使得血小板聚集率明显减少($P<0.05$)。氟维司群同样减少凝血酶(图 1D)、胶原(图 1E)、U46619(图 1F)诱导的血小板 ATP 释放。以上结果表明,氟维司群浓度依赖性地抑制了多种刺激剂诱导的血小板聚集和 ATP 释放功能。

2.2 氟维司群抑制血小板表面 P-选择素表达和整合素 α IIb β 3 活化

与对照组相比,氟维司群呈剂量依赖性地抑制凝血酶(2A)诱导的 P-选择素表达。同样的,如图 2B 所示,氟维司群抑制凝血酶(2B)诱导的血小板表面整合素 α IIb β 3 的活化,这些结果表明,氟维司群能够显著抑制血小板 α -颗粒的释放和整合素 α IIb β 3 的激活。

2.3 氟维司群抑制血小板铺展

配体与整合素的结合触发外部信号传导,启动血小板铺展、凝块收缩和额外的颗粒分泌。血小板



注:A:不同浓度的氟维司群在凝血酶(0.05 U/mL)诱导的人血小板P-选择素暴露的影响。B:氟维司群对凝血酶(0.05 U/mL)诱导的PAC-1与人血小板结合的影响。数据以五个独立实验的平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示($n=5$)。* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,ns:差异无统计学意义。数据采用单因素方差分析。

图2 氟维司群抑制血小板P-选择素表达及整合素 α IIb β 3 活化

铺展是 α IIb β 3整合素激活由外向内信号的早期阶段。我们将不同浓度的氟维司群与5名健康志愿者的血小板孵育,在凝血酶的刺激下观察血小板铺展,结果发现氟维司群能够浓度依赖性抑制血小板对纤维蛋白原的铺展率(3A)。

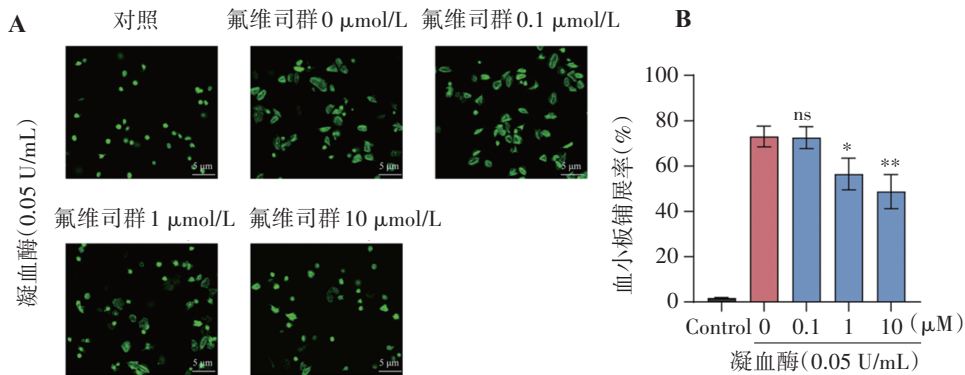
2.4 氟维司群抑制血小板中AKT和PKC蛋白磷酸化

为了进一步明确氟维司群抑制血小板活化和聚集的具体机制,将0.1、1和10 μ mol/L氟维司群预先与血小板在37 $^{\circ}$ C孵育10 min后,再使用凝血酶和U46619刺激血小板,如图4A和4B所示,通过免疫印迹法发现,氟维司群处理后,AKTser 473位点磷酸化水平被浓度依赖性地抑制,同样的,我们发现

PKC蛋白的磷酸化水平也受到抑制,实验在5名健康志愿者的血小板中重复结果一致。

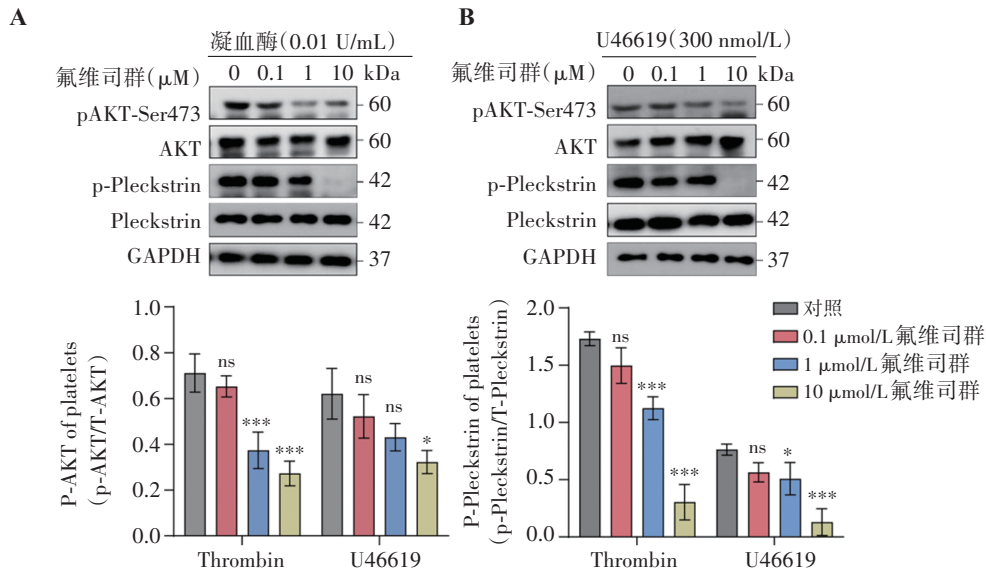
3 讨论

血小板中雌二醇受体的表达及对血小板功能的直接影响仍不清楚。在本研究中,我们证实雌二醇受体调节剂氟维司群可抑制血小板聚集、释放、铺展,其机制与调控AKT和PKC蛋白磷酸化水平有关。基于这些发现,我们的研究可为干预雌二醇诱导的血栓性疾病提供的新靶点以及潜在治疗提供数据支持。



注:数据以5个独立实验的平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示($n=5$)。通过单因素方差分析,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,ns:差异无统计学意义。数据采用单因素方差分析。

图3 氟维司群抑制凝血酶(0.05 U/mL)诱导的人血小板铺展(200 \times)



注:A:氟维司群对凝血酶(0.01 U/mL)诱导的AKT和PKC磷酸化影响的代表性印迹。下方柱状图为量化的AKT Ser473的磷酸化水平。B:氟维司群对U46619(300 nmol/L)诱导的AKT和PKC磷酸化影响的代表性印迹。量化的PKC的磷酸化水平。柱状图数据以5个独立实验的平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示($n=5$)。通过单因素方差分析,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,ns:差异无统计学意义。

图4 氟维司群对凝血酶和U46619诱导的AKT和PKC磷酸化水平的影响

当血管受损时,暴露的胶原蛋白底物驱动血小板活化和止血血栓的形成。由血小板上的特定受体诱导的血小板激活信号最终汇聚为一个共同的信号事件,即“由内而外”的信号激活整合素 $\alpha\text{IIb}\beta_3$, 纤维蛋白原与整合素结合触发由内向外的信号,导致血小板铺展、颗粒的分泌、血小板粘附和聚集的稳定以及血块收缩^[15-17]。通过血小板的聚集和释放实验,我们发现氟维司群能够抑制多种激动剂诱导的血小板聚集,胶原通过作用于血小板表面的 GPVI 及 $\alpha_2\beta_1$ 介导血小板黏附和活化,氟维司群抑制胶原诱导的血小板聚集,表明其能够参与血栓形成的早期黏附过程。血小板激活后,释放三种主要颗粒的内容物:致密颗粒、 α 颗粒和溶酶体颗粒^[18]。致密颗粒和 α 颗粒在血小板聚集和活化中发挥重要作用^[19]。血小板致密颗粒含有 ADP,有助于止血和凝血, α 颗粒含有多种生长因子和粘附分子。我们实验发现氟维司群可以降低 ATP 释放和 P-选择素的表达,表明其能够抑制血小板的颗粒释放和血小板活化。整合素 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 的活化是血小板聚集的关键,由内向外的信号传导有助于更稳定的血栓形成,我们的研究发现氟维司群能够抑制血小板的铺展,表明其能够影响整合素 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 由内向外的信号传导。

TXA₂ 通过血栓素 A₂/前列腺素 H₂(TP)受体激活血小板,而凝血酶则通过蛋白酶活化受体(PARs)激活血小板。两者均与 G_q 及 G₁₃ 通路偶联,均可导致 ADP 从致密颗粒中释放。17 β -雌二醇被报道可以增强凝血酶诱导的血小板激活^[10],氟维司群可能通过抑制 ER 来减弱激动剂介导的血小板活化。最近的研究表明抗雌激素治疗通过调节 PI3K/AKT 通路抑制乳腺癌细胞生长^[20]。在不同的细胞中,雌激素受体已被证明参与信号转导,调节 PI3K/AKT、Src 和 MAPKs 通路,参与血管生成^[21]、细胞的增殖、分化和抗凋亡^[22]。血小板中 PI3K 的下游分子 AKT1 或 AKT2 是血小板功能的重要调节因子,它能招募并激活 PLC γ 2,从而释放 IP₃ 和 DAG,导致血小板颗粒释放、活化、粘附和整合素外信号传导^[23-24]。本研究中,蛋白免疫印迹检测结果显示氟维司群抑制血小板内 AKTSer473 的磷酸化水平,说明 AKT 信号通路参与调控氟维司群抗血小板活化和聚集。但我们发现其他靶点同样参与调控。PKC 不仅影响血小板 α 颗粒和致密颗粒的释放,而且介导 GPVI 信号通路^[25-26],氟维司群抑制诱导剂的血小板聚集,蛋白免

疫印迹的结果显示同样下调 PKC 蛋白磷酸化水平,说明氟维司群还可能通过调控血小板 PKC 发挥抗血小板作用。

雌二醇受体在男性和女性的血小板中均表达^[13,27],然而血小板的反应性受性别、年龄和激素的影响^[28]。在我们的实验中,健康对照人群的血小板性别分布均衡,氟维司群对血小板功能的抑制作用不受性别差异的影响。临床研究显示对于有出血体质、血小板减少症或正在接受抗凝治疗的患者,使用氟维司群会增加出血的风险^[29]。血小板在维持正常止血中发挥重要作用。血管损伤时,血小板立即粘附在暴露的细胞外基质上,导致血小板活化和聚集形成血栓^[30]。血小板功能受损可能导致出血并发症,因此,这间接表明氟维司群对血小板功能或血液凝固过程有一定影响,但这需要更多的研究证明氟维司群在出血及血液凝固过程中的作用。

我们研究的另一个局限性在于仅在体外研究了氟维司群的抗血小板作用,并未在体内证明其是否具有抗血小板作用。另外,这些信号通路在抗血小板活化过程中是协同或独立作用的完整机制仍有待确定,因此,仍需要更多的研究来验证氟维司群在血小板活化和血栓形成中的具体作用。

作者贡献声明 马如越负责研究实施、论文撰写和修改;赵丽丽负责研究设计和数据分析;杨梦楠负责血小板制备与提取和数据收集;张蕾和赵瑞珩负责实验设计和论文审阅修改;戴克胜负责研究的具体指导和经费支持

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Pastori D, Cormaci V M, Marucci S, et al. A comprehensive review of risk factors for venous thromboembolism: From epidemiology to pathophysiology [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4):3169.
- [2] Koupenova M, Kehrel B E, Corkrey H A, et al. Thrombosis and platelets: An update [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(11): 785-791.
- [3] Gurbel P A, Jeong Y H, Navarese E P, et al. Platelet-mediated thrombosis: From bench to bedside [J]. *Circ Res*, 2016, 118(9):1380-1391.
- [4] Zhang G Q, Chen J L, Luo Y, et al. Menopausal hormone therapy and women's health: An umbrella review [J]. *PLoS Med*, 2021, 18(8):e1003731.
- [5] Morimont L, Creinin M D, Gaspard U, et al. Hormonal therapies and venous thrombosis: Estrogen matters! [J].

- Res Pract Thromb Haemost, 2023, 7(1): 100021.
- [6] Teal S, Edelman A. Contraception selection, effectiveness, and adverse effects: A review [J]. JAMA, 2021, 326(24): 2507-2518.
- [7] El Khoudary S R, Aggarwal B, Beckie T M, et al. Menopause transition and cardiovascular disease risk: implications for timing of early prevention: A scientific statement from the American Heart Association [J]. Circulation, 2020, 142(25): e506-e532.
- [8] Anamthakula P, Kyathanahalli C, Ingles J, et al. Estrogen receptor alpha isoform ERdelta7 in myometrium modulates uterine quiescence during pregnancy [J]. E Bio Medicine, 2019, 39: 520-530.
- [9] Tang X, Fang M, Cheng R, et al. Iron-deficiency and estrogen are associated with ischemic stroke by up-regulating transferrin to induce hypercoagulability [J]. Circ Res, 2020, 127(5): 651-663.
- [10] Moro L, Reineri S, Piranda D, et al. Nongenomic effects of 17beta - estradiol in human platelets: potentiation of thrombin - induced aggregation through estrogen receptor beta and Src kinase [J]. Blood, 2005, 105(1): 115-121.
- [11] Winkler U H. Hemostatic effects of third- and second-generation oral contraceptives: absence of a causal mechanism for a difference in risk of venous thromboembolism [J]. Contraception, 2000, 62(2 Suppl): 11S-20S; discussion 37S-38S.
- [12] Del Principe D, Ruggieri A, Pietraforte D, et al. The relevance of estrogen/estrogen receptor system on the gender difference in cardiovascular risk [J]. Int J Cardiol, 2015, 187: 291-298.
- [13] Khetawat G, Faraday N, Nealen M L, et al. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression [J]. Blood, 2000, 95(7): 2289-2296.
- [14] Sammons S, Kornblum N S, Blackwell K L. Fulvestrant-based combination therapy for second-line treatment of hormone receptor-positive advanced breast cancer [J]. Target Oncol, 2019, 14(1): 1-12.
- [15] Durrant T N, Van Den Bosch M T, Hers I. Integrin alpha (IIb)beta(3) outside-in signaling [J]. Blood, 2017, 130(14): 1607-1619.
- [16] Koupenova M, Clancy L, Corkrey H A, et al. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis [J]. Circ Res, 2018, 122(2): 337-351.
- [17] Shen B, Zhao X, O'Brien K A, et al. A directional switch of integrin signalling and a new anti-thrombotic strategy [J]. Nature, 2013, 503(7474): 131-135.
- [18] Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates [J]. Blood Rev, 2009, 23(4): 177-189.
- [19] Binsker U, Palankar R, Wesche J, et al. Secreted immunomodulatory proteins of staphylococcus aureus activate platelets and induce platelet aggregation [J]. Thromb Haemost, 2018, 118(4): 745-757.
- [20] Lam L, Hu X, Aktary Z, et al. Tamoxifen and ICI 182,780 increase Bcl-2 levels and inhibit growth of breast carcinoma cells by modulating PI3K/AKT, ERK and IGF-1R pathways independent of ERalpha [J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 118(3): 605-621.
- [21] Kokai D, Stanic B, Tesic B, et al. Dibutyl phthalate promotes angiogenesis in EA.hy926 cells through estrogen receptor-dependent activation of ERK1/2, PI3K-Akt, and NO signaling pathways [J]. Chem Biol Interact, 2022, 366: 110174.
- [22] Jin X, Sun J, Yu B, et al. Daidzein stimulates osteogenesis facilitating proliferation, differentiation, and antiapoptosis in human osteoblast-like MG-63 cells via estrogen receptor-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation [J]. Nutr Res, 2017, 42: 20-30.
- [23] Moore S F, Van Den Bosch M T, Hunter R W, et al. Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) alpha/beta by protein kinase C (PKC) alpha and Akt promotes thrombin-mediated integrin alphaIIb beta3 activation and granule secretion in platelets [J]. J Biol Chem, 2013, 288(6): 3918-3928.
- [24] Yin H, Stojanovic A, Hay N, et al. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib - IX induced platelet activation [J]. Blood, 2008, 111(2): 658-665.
- [25] 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.
- [26] Konopatskaya O, Gilio K, Harper M T, et al. PKCalpha regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(2): 399-407.
- [27] Jayachandran M, Miller V M. Human platelets contain estrogen receptor alpha, caveolin-1 and estrogen receptor associated proteins [J]. Platelets, 2003, 14(2): 75-81.
- [28] Hadley J B, Kelher M R, Coleman J R, et al. Hormones, age, and sex affect platelet responsiveness in vitro [J]. Transfusion, 2022, 62(9): 1882-1893.
- [29] Du Rusquec P, Palpacuer C, Champion L, et al. Efficacy of palbociclib plus fulvestrant after everolimus in hormone receptor-positive metastatic breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 168(2): 559-566.
- [30] Broos K, Feys H B, De Meyer S F, et al. Platelets at work in primary hemostasis [J]. Blood Rev, 2011, 25(4): 155-167.

(收稿日期: 2024-06-30)

(本文编辑: 钱婷婷; 本文审校: 叶絮)