

论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0864-04

融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板微粒与 THP-1 细胞结合及 Mac-1 活化的影响

刘成海,彭松,胡厚源,贝俊杰,孟璟,房兆飞 (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** 探讨融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板微粒(platelet microparticles, PMPs)与人单核细胞株 THP-1 细胞结合及 Mac-1 活化的影响。**方法** 以二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)激活人血小板并获取 PMPs。采用流式细胞仪(flow cytometry, FCM)及 PE 标记的抗 CD62P 单克隆抗体、FITC 标记的 Annexin V 检测 PMPs,以 FITC 标记的抗 CD41 单克隆抗体和 PE 标记的抗 CD154(CD40L)单克隆抗体检测 PMPs 的表面特征。采用 JC-1 试剂盒检测血小板线粒体膜电位。采用 FCM 检测 PMPs 与 THP-1 细胞的结合,以及 PMPs 诱导 THP-1 细胞表面 Mac-1(CD11b/CD18, $\alpha M\beta_2$)的活化情况,并研究 TAP-SSL5 的干预作用。**结果** PMPs 呈现 CD62P 和 Annexin V 双阳性,且 CD41 和 CD40L 的阳性率分别达到 50.8% 和 44.0%。JC-1 检测显示,ADP 对血小板线粒体膜电位无明显影响($P > 0.05$)。PMPs 与 THP-1 细胞的结合率为 $(24.80 \pm 5.16)\%$,PMPs 诱导 THP-1 细胞 Mac-1 的活化率为 $(21.17 \pm 5.92)\%$,THP-1 细胞经 10 mg/L TAP-SSL5 预处理后,PMPs 的结合率下降至 $(13.67 \pm 2.15)\%$ ($P < 0.05$),Mac-1 的活化率下降至 $(0.99 \pm 0.62)\%$ ($P < 0.01$)。**结论** TAP-SSL5 可抑制 PMPs 与 THP-1 细胞的结合及 THP-1 细胞表面 Mac-1 的活化。

[关键词] 血小板微粒;金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5;蟬抗凝血肽;融合蛋白;THP-1 细胞;Mac-1

[中图分类号] R331.143; R341; R392.1

[文献标志码] A

Fusion protein TAP-SSL5 suppresses binding of platelet microparticles to THP-1 cells and activation of Mac-1

Liu Chenghai, Peng Song, Hu Houyuan, Bei Junjie, Meng Jing, Fang Zhaofei (Department of Cardiology, Chongqing Institute of Interventional Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of anticoagulant and anti-inflammatory fusion protein TAP-SSL5 (tick anticoagulant peptide and staphylococcal superantigen like protein-5) on the binding of platelet microparticles (PMPs) to human acute monocytic leukemia cell line THP-1 and the activation of Mac-1. **Methods** PMPs were generated by adenosine diphosphate (ADP) activating human platelets. Flow cytometry (FCM) was used to identify PMPs by PE labeled mouse anti-human CD62P monoclonal antibody and FITC-Annexin V, and to check the activation and phosphatidylserine (PS) by FITC labeled mouse anti-human CD41 monoclonal antibody and PE labeled mouse anti-human CD151 monoclonal antibody (CD40L). The mitochondrial membrane potential in human platelets was checked with JC-1 kit. The binding rates of PMPs to THP-1 cells and the conformation change of Mac-1 (CD11b/CD18, $\alpha M\beta_2$) after co-incubation with PMPs were assayed by FCM. **Results** Both CD62P and PS were positive on PMPs. The positive rates of CD41 and CD40L on the ADP-induced PMPs were 50.8% and 44.0% respectively. While there was no significant change on the mitochondrial membrane potential in ADP activated platelets ($P > 0.05$). The binding rates of PMPs to THP-1 cells and the activation rates of Mac-1 on THP-1 cells were $(24.80 \pm 5.16)\%$ and $(21.17 \pm 5.92)\%$ respectively, which decreased to $(13.67 \pm 2.15)\%$ and $(0.99 \pm 0.62)\%$ after the THP-1 cells were pre-incubated with 10 mg/L TAP-SSL5 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusion** TAP-SSL5 directly inhibits the binding of PMPs to THP-1 cells, and subsequently inhibits the activation of Mac-1 on THP-1 cells.

[Key words] platelet microparticles; staphylococcal superantigen like protein-5; anti-coagulant tick anticoagulant peptide; fusion protein; THP-1 cells; Mac-1

Supported by the National Nature Science Foundation of China (81270362) and the Major Project for National New Drugs Creation and Development (2013ZX09103003-001). Corresponding author: Hu Houyuan, E-mail: houyuanhu@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81270362);国家重大新药创制课题(2013ZX09103003-001)

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

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140225.1610.017.html>(2014-02-25)

血小板微粒(platelet microparticles, PMPs)是一种超微膜性囊泡,其直径范围在0.1~1.0 μm。血小板在被激活(凝血酶、胶原、ADP、Ca²⁺载体等)或凋亡的情况下均可产生PMPs。PMPs主要由血小板的部分胞质成分和血小板膜组成。PMPs表面含有糖蛋白GP II b (CD41)、P-选择素(P-selectin, CD62P)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)和组织因子(tissue factor, TF)等^[1-5],具有促凝血活性。另外,循环中超过95%的CD40配体(CD40L, CD154)来源于血小板及其微粒^[6-7],因此,PMPs也具有显著的促炎症作用。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病^[8],炎症反应和血小板激活在动脉粥样硬化的发生、发展过程中相互促进,是动脉粥样硬化和心血管疾病防治的重要靶标。血小板激活后可释放大量的P-选择素和CD40L,分别通过与白细胞表面的P-选择素糖蛋白配体-1(P-selection glycoprotein ligand-1, PSGL-1)和CD40结合,导致白细胞活化。PMPs占循环微粒总数的70%~90%,并可在血管损伤部位大量产生和聚积。PMPs在动脉粥样硬化的发生、发展过程中具有重要作用,在急性冠脉综合征、高血压、糖尿病患者血液中,PMPs数量显著升高。因此,PMPs水平升高可能是心血管事件的预测因子之一^[9]。

在前期研究中,我们已将金黄色葡萄球菌超抗原样蛋白-5(staphylococcal superantigen like protein-5, SSL5)与凝血因子Xa(factor Xa, FXa)的强效抑制剂“蜉抗凝血肽”(tick anticoagulant peptide, TAP)通过基因重组技术相融合,成功构建了融合蛋白TAP-SSL5,其保留了TAP以及SSL5与PSGL-1结合的功能^[10],从而具有抗凝、抗炎双重活性。TAP-SSL5还可与血小板表面糖蛋白GPIIbα结合,这提示TAP-SSL5可通过抑制GPIIbα与vWF的相互作用,而进一步增强其抗血栓作用^[11];而且TAP-SSL5还可抑制血小板-粒细胞聚集体的形成^[12]。本研究探讨融合蛋白TAP-SSL5对PMPs与单核细胞结合及Mac-1活化的影响,旨在进一步了解融合蛋白TAP-SSL5的功能。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

人血小板由第三军医大学西南医院输血科提供。PE标记的小鼠抗人CD62P、CD154单克隆抗体(mAb),FITC标记的小鼠抗人CD41 mAb和Annexin V, PE或FITC标记的小鼠IgG1均为美国BD公司产品。PE标记的小鼠抗人CD11b活化部位的单克隆抗体(CBRM 1/5)购自美国eBioscience公司,二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)为Sigma公司产品,Small Bead Calibration Kits为美国Bangs Laboratories公司产品,RPMI1640为美国HyClone公司产品,JC-1试剂盒为美国Cell Technology公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 人单核细胞株 THP-1 细胞的培养 人单核细胞株

THP-1(第三军医大学西南医院病理学研究所赠送,购自ATCC),采用RPMI1640完全培养基(10%胎牛血清,100 U/mL青霉素,100 μg/mL链霉素),于37℃、5%CO₂恒温箱培养,每隔2 d换新鲜培养基,台盼蓝染色鉴定细胞活力>95%。

1.2.2 血小板的分离和血小板微粒的制备 健康成人枸橼酸钠抗凝富含血小板的血浆10 mL(由西南医院输血科提供),110×g水平离心15 min,弃上层血浆,沉淀的血小板用CGS缓冲液(120 mmol/L NaCl, 12.9 mmol/L trisodium citrate, 30 mmol/L D-glucose, pH = 7.0)710×g离心15 min洗涤2遍。将血小板沉淀重悬在Tyrode's缓冲液(150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 2 mmol/L CaCl₂, 2 mmol/L MgCl₂, 1 mg/mL D-glucose, 10 mmol/L HEPES, pH = 7.4)中,以SaxmexKX-21N(日本)血细胞自动分析仪计数血小板,调整血小板浓度至3×10⁸/mL。加入终浓度为20 μmol/L ADP,室温下孵育30 min,以激活血小板产生PMPs。再加入终浓度为200 mmol/L EGTA后,以1 250×g离心10 min,取上清液20 000×g离心30 min,将PMPs重悬在Tyrode's缓冲液中,采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度(1 μg/mL蛋白≈3.5×10⁵ PMPs/mL),分装后于-80℃保存。

1.2.3 血小板微粒及其表面特征的检测 流式细胞仪(FCM)检测PMPs,采用0.5~0.8 μm标准荧光微珠划定检测PMPs的区间,30 μL PMPs与5 μL PE-CD62P mAb和5 μL FITC-Annexin V,室温下避光孵育30 min,同时设同型抗体及荧光补偿对照,FCM检测PMPs表面CD62P的表达和PS的暴露。分别采用PE-CD154 mAb、FITC-CD41 mAb,同时设同型抗体对照,与PMPs在室温下避光孵育30 min,采用FCM检测PMPs表面CD40L和CD41的表达阳性率。

1.2.4 JC-1试剂盒检测血小板线粒体膜电位 将终浓度20 μmol/L ADP与重悬在Tyrode's缓冲液中的血小板于室温下孵育30 min,1 250×g离心10 min后去上清,加入0.5 mL JC-1在室温下避光孵育30 min,FCM检测FL2/FL1平均荧光强度比值。实验重复3次。

1.2.5 血小板微粒与 THP-1 细胞的结合

1.2.5.1 实验分组 ①对照组:不含PMPs的上清液+THP-1细胞;②PMPs组:PMPs+THP-1细胞;③TAP-SSL5组:PMPs+经10 mg/L TAP-SSL5预处理的THP-1细胞;④SSL5组:PMPs+经10 mg/L SSL5预处理的THP-1细胞。

1.2.5.2 细胞和血小板微粒准备 融合蛋白TAP-SSL5及重组SSL5蛋白的表达与纯化采用曲小龙等^[13]介绍的方法,TAP-SSL5化学纯度为98%,相对分子质量为31.913×10³,重组SSL5蛋白其纯度>90%,相对分子质量为27×10³。调整PMPs浓度至2×10⁶/mL,THP-1细胞浓度至2×10⁵/mL,干预组分别加入10 mg/L融合蛋白TAP-SSL5或10 mg/L SSL5与THP-1细胞冰上孵育30 min,0.01 mol/L PBS洗涤细胞2次,以Tyrode's缓冲液调整细胞浓度为2×10⁵/mL;取30 μL PMPs与10 μL PE-CD62P mAb避光室温下孵育30 min,同时设同型抗体对照,用于后续PMPs与THP-1细胞的结合实验。

1.2.5.3 实验步骤 取上述PE-CD62P mAb标记的PMPs(2×10⁶/mL)和THP-1细胞(2×10⁵/mL)按等体积比例混合,室温下共孵育30 min,FCM检测PMPs与THP-1细胞结合的情况。实验重复3次。

1.2.6 THP-1细胞表面Mac-1的活化 用RPMI1640培养基(1%胎牛血清)处理细胞,调整THP-1细胞数至2×10⁵/mL,

干预组分别加入 10 mg/L 融合蛋白 TAP-SSL5 或 10 mg/L SSL5 与 THP-1 细胞冰上孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 以 RPMI1640 培养基(1% 胎牛血清)处理细胞调整细胞数为 2×10^5 /mL, 取 30 μ L 细胞与等体积 PMPs 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内孵育 6 h 后, 再加入 2.5 μ L PE- CBRM 1/5 mAb, 并设同型抗体对照, 在 4 $^{\circ}$ C 的条件下孵育 30 min, PBS 洗涤细胞 2 次, 200 μ L PBS 重悬细胞, FCM 检测 TAP-SSL5 对 PMPs 诱导 THP-1 细胞表面 Mac-1 活化的影响。实验共重复 3 次。

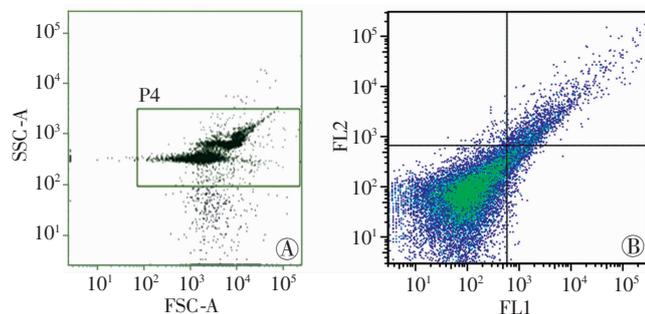
1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 血小板微粒的初步鉴定

为满足流式细胞仪所检测颗粒大小的要求, 以标准为 0.5 μ m 和 0.8 μ m 直径的荧光标记微珠设定 PMPs 最具代表性的检测范围, 而且 PMPs 表现为 CD62P 和 Annexin V 双阳性, 见图 1。

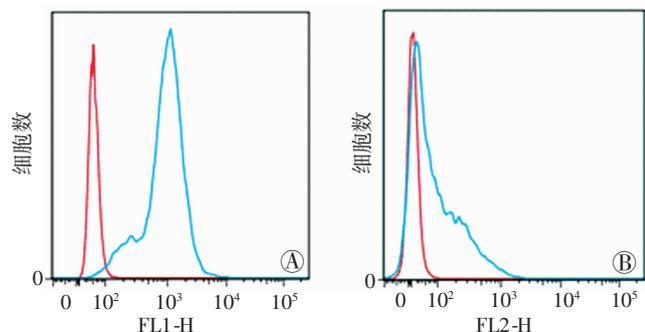


A: 0.5 μ m 和 0.8 μ m 荧光标记标准微珠; B: PE-CD62P 和 FITC-AnnexinV 标记 PMPs

图 1 流式细胞仪初步鉴定血小板微粒检测

2.2 血小板微粒表面 CD41 和 CD40L 的表达

通过与同型抗体对照进行比较, 流式细胞仪检测结果显示, ADP 激活血小板后所产生的 PMPs 表面 CD41 和 CD40L 的表达阳性率分别为 50.8% 和 44% (图 2)。



A: 红色: 同型抗体对照, 蓝色: CD41; B: 红色: 同型抗体对照, 蓝色: CD40L

图 2 流式细胞仪检测血小板微粒表面 CD41 和 CD40L 的表达阳性率

2.3 ADP 对血小板线粒体膜电位的影响

采用 JC-1 试剂盒检测的结果显示, 对照组 FL2/FL1 平均荧光强度比值为 (14.55 ± 7.54) ; ADP 组 FL2/FL1 平均荧光强度比值为 (9.73 ± 4.47) , 与对照组比较虽然有下降的趋势, 但

2 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 融合蛋白 TAP-SSL5 可抑制血小板微粒与 THP-1 细胞的结合

由于对照组采用的是获取 PMPs 时的上清液, 几乎不含 PMPs, 故 THP-1 细胞表面检测到 PMPs 的结合率极低; PMPs 组 THP-1 细胞表面 PMPs 的结合率高达 $(24.80 \pm 5.16)\%$; 在经 10 mg/L TAP-SSL5 或 10 mg/L SSL5 预处理 THP-1 细胞的干预组, PMPs 与 THP-1 细胞的结合率均较 PMPs 组有显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 1。

表 1 PMPs 与 THP-1 细胞的结合率和细胞表面 Mac-1 活化率的比较 [$n=3, (\bar{x} \pm s)\%$]

组别	PMPs 结合率	Mac-1 活化率
对照组	1.80 ± 0.52	0.25 ± 0.05
PMPs 组	24.80 ± 5.16	21.17 ± 5.92
TAP-SSL5 组	13.67 ± 2.15^a	0.99 ± 0.62^b
SSL5 组	11.89 ± 4.32^b	1.58 ± 2.05^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 PMPs 组比较

2.5 融合蛋白 TAP-SSL5 可抑制血小板微粒诱导 THP-1 细胞表面 Mac-1 的活化

在不含 PMPs 的对照组, THP-1 细胞表面 Mac-1 的活化率极低; 在 PMPs 组, THP-1 细胞表面 Mac-1 的活化率有所升高 ($P > 0.05$); 10 mg/L TAP-SSL5 或 10 mg/L SSL5 干预组 Mac-1 的活化率与 PMPs 组比较均有非常显著的下降 ($P < 0.01$), 见表 1。

3 讨论

PMPs 与单核细胞相互作用后, 可促进单核细胞进一步表达黏附分子、炎症介质 (IL-1 β 、IL-7、IL-11) 和趋化因子 RANTES^[14]。PMPs 表面有丰富的 P-选择素, 可通过 P-选择素与 PSGL-1 的相互作用, 使富含组织因子的单核巨噬细胞聚积到血管内皮损伤或斑块破裂的部位, 局部组织因子的增加进一步触发了凝血酶的生成和凝血系统激活, 因此, PMPs 具有促进凝血和炎症两方面的作用^[15]。PMPs 已被认为是血管损伤的标志物, 除了在血栓性疾病中具有预测价值之外, 在动脉粥样硬化病变过程中, PMPs 也是斑块不稳定或血栓形成的重要原因^[5, 9, 16]。最近文献报道, 在 ST 段抬高型心肌梗死患者的罪犯血管中, PMPs 数量显著增高, 利用 PCI 及时开通罪犯血管后, PMPs 的数量明显降低^[17]。因此, 干预 PMPs 与单核细胞之间的相互作用, 将有望为急性冠脉综合症的防治提供新的措施。

微粒的检测方法主要包括免疫学检测、功能检测、原子力显微镜和流式细胞仪检测, 其中流式细胞仪是最常用的方法^[18-20]。本研究采用流式细胞仪检测了 ADP 激活血小板产生的 PMPs, 其表面有 CD62P 表达和磷脂酰丝氨酸的外露, 且 CD41 和 CD40L 的阳性率也较高, 这与文献^[21]报道相一致。本研究还进一步采用 JC-1 试剂盒检测了血小板线粒体膜电位的变化, 体外检测结果表明 ADP 对血小板线粒体膜电位的影

响并不明显,但这一结果并不能代表体内的真实情况,因为对照组的血小板虽然未使用ADP激活,但在分离的过程中因受机械振动等刺激也会有一定程度的激活,使得2组检测结果不易出现统计学差异。

动脉粥样硬化基础之上的血栓形成是导致心脑血管事件的主要原因,而抑制炎症反应和血小板激活是治疗心血管疾病两个重要方面。细胞黏附、迁移是炎症反应的初始阶段,主要由细胞之间的选择素与整合素的相互作用所决定。因此,抑制细胞间选择素与整合素的相互作用对于控制炎症反应具有十分重要的作用。在前期研究中,我们构建的融合蛋白TAP-SSL5具有抑制凝血因子Xa活性,并可与粒细胞表面的PSGL-1结合,当其终浓度在30 mg/L以下时,对细胞无明显毒性作用。本研究发现,PMPs可与THP-1细胞结合,TAP-SSL5和SSL5可以抑制这一结合过程,并进而抑制PMPs所诱导的THP-1细胞表面Mac-1的活化。其机制主要包括以下两个方面:其一,TAP-SSL5和SSL5通过与THP-1细胞表面PSGL-1的结合^[10, 12-13],从而抑制了PMPs通过其表面大量存在的P-选择素(CD62P)与单核细胞的结合;其二,由于PMPs还可能通过其表面的GPIIb α 与单核细胞表面的Mac-1结合,而以往的研究表明TAP-SSL5和SSL5可与血小板表面的GPIIb α 结合^[11, 22],因此,TAP-SSL5和SSL5还可通过与GPIIb α 的结合,进而抑制PMPs与单核细胞的结合。进一步研究发现,PMPs可诱导THP-1细胞表面的Mac-1发生构象改变而活化,而采用TAP-SSL5或SSL5预先处理THP-1细胞后,Mac-1的活化率显著下降,这可能与PSGL-1信号转导途径受到抑制有关^[23]。由此可知,TAP-SSL5可通过抑制单核细胞表面Mac-1的活化,来减轻炎症反应,对于动脉粥样硬化或血管损伤部位的炎症反应都将产生一定的抑制效应。

近年来,对血小板微粒的研究主要集中在其促进凝血和炎症方面,以期为中心血管病的防治提供新的方向和措施;另外,PMPs对心血管疾病状态的监测也具有一定的意义。本研究显示,TAP-SSL5还可能通过抑制P-选择素与PSGL-1的结合,以及抑制GPIIb α 与Mac-1的结合,而最终抑制PMPs与单核细胞的结合以及细胞表面Mac-1的活化,这可能是TAP-SSL5发挥其抗炎症和抗血栓作用的重要机制之一。

参考文献:

[1] Liu M L, Williams K J. Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2012, 19(2): 121-127.
[2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(9): 2045-2051.
[3] Georgescu A, Alexandru N, Andrei E, et al. Circulating microparticles and endothelial progenitor cells in atherosclerosis: pharmacological

effects of irbesartan[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(4): 680-691.
[4] Angelillo-Scherrer A. Leukocyte-derived microparticles in vascular homeostasis[J]. *Circ Res*, 2012, 110(2): 356-369.
[5] Leroyer A S, Tedgui A, Boulanger C M. Role of microparticles in atherothrombosis[J]. *J Intern Med*, 2008, 263(5): 528-537.
[6] Semple J W, Italiano J E Jr, Freedman J. Platelets and the immune continuum[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(4): 264-274.
[7] Nurden A T. Platelets, inflammation and tissue regeneration[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(Suppl 1): S13-S33.
[8] Rosenfeld M E. Inflammation and atherosclerosis: direct versus indirect mechanisms[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2013, 13(2): 154-160.
[9] Burger D, Schock S, Thompson C S, et al. Microparticles: biomarkers and beyond[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124(7): 423-441.
[10] 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.
[11] 程彦, 房兆飞, 曲小龙, 等. 融合蛋白TAP-SSL5对人血小板功能的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(6): 477-480.
[12] 龚丽莎, 房兆飞, 胡厚源, 等. 融合蛋白TAP-SSL5对血小板与粒细胞结合的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2013, 35(8): 754-758.
[13] 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.
[14] Setzer F, Oberle V, Blass M, et al. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells; a DNA microarray study[J]. *Platelets*, 2006, 17(8): 571-576.
[15] Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(8): 1166-1174.
[16] Mause S F. Platelet microparticles: reinforcing the hegemony of platelets in atherothrombosis[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(1): 5-6.
[17] Min P K, Kim J Y, Chung K H, et al. Local increase in microparticles from the aspirate of culprit coronary arteries in patients with ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 227(2): 323-328.
[18] Zwicker J I, Lacroix R, Dignat-George F, et al. Measurement of platelet microparticles[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 788: 127-139.
[19] Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(1): 190-197.
[20] Strasser E F, Happ S, Weiss D R, et al. Microparticle detection in platelet products by three different methods[J]. *Transfusion*, 2013, 53(1): 156-166.
[21] Vasina E M, Cauwenberghs S, Feijge M A, et al. Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation[J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e211.
[22] Hu H, Armstrong P C, Khalil E, et al. GPVI and GPIIb α mediate staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) induced platelet activation and direct toward glycans as potential inhibitors[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e19190.
[23] Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, et al. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis[J]. *Thromb Res*, 2012, 129(3): 263-266.

(收稿:2013-10-20;修回:2013-12-30)

(编辑 栾嘉)