

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.09.008

文章编号: 1005-8982(2017)09-0039-05

临床研究·论著

## PRT318 对胶原诱导人血小板 Syk 磷酸化的影响\*

吴鸿<sup>1</sup>, 韩勇军<sup>1</sup>, 高水波<sup>1</sup>, 雷震<sup>1</sup>, 王振涛<sup>2</sup>, 韩丽华<sup>2</sup>

(河南中医药大学 1.细胞成像实验室, 2.心血管病研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:目的** 观察脾酪氨酸激酶(Syk)抑制剂 PRT060318(PRT318)在体外对人血小板聚集率及 Syk 磷酸化的影响。**方法** 采用比浊法测定 PRT318 对胶原、二磷酸腺苷(ADP)及花生四烯酸(AA)诱导的人血小板聚集率的影响;运用 Western blot 检测 Syk525/6 磷酸化水平。**结果** Syk 特异性抑制剂 PRT318 可抑制胶原诱导的人血小板聚集率,但对 ADP 或 AA 诱导的人血小板聚集率无影响。在蛋白水平上 PRT318 可促进人血小板在胶原诱导下 Syk525/6 磷酸化水平升高。酪氨酸蛋白激酶抑制剂 PP2 可抑制胶原诱导的人血小板聚集,降低人血小板在胶原诱导下 Syk525/6 磷酸化水平,并可阻断胶原诱导下 PRT318 促 Syk525/6 磷酸化作用。**结论** PRT318 对胶原诱导的血小板聚集具有抑制作用,并能促进胶原诱导的血小板膜受体糖蛋白 VI 信号通路上 Syk525/6 磷酸化,提示 PRT318 可能通过作用于 Syk525/6 磷酸化而抑制血小板聚集。

**关键词:** PRT318;胶原;血小板聚集;Syk525/6 磷酸化

**中图分类号:** R331.143

**文献标识码:** A

### Effect of PRT318 on collagen-induced Syk phosphorylation in human platelets\*

Hong Wu<sup>1</sup>, Yong-jun Han<sup>1</sup>, Shui-bo Gao<sup>1</sup>, Zhen Lei<sup>1</sup>, Zhen-tao Wang<sup>2</sup>, Li-hua Han<sup>2</sup>

(1. Laboratory of Cell Imaging, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan 450002, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of PRT060318 (PRT318), an inhibitor of spleen tyrosine kinase (Syk), on human platelet aggregation and Syk phosphorylation *in vitro*. **Methods** The effect of PRT318 on platelet aggregation induced by collagen, adenosine diphosphate (ADP) and arachidonic acid (AA) was measured by turbidimetry. The phosphorylation of Syk525/6 was detected by Western blot. **Results** The Syk-specific inhibitor PRT318 suppressed collagen-induced platelet aggregation, while it did not have significantly inhibitory effect on ADP- or AA-induced platelet aggregation. The present data showed that PRT318 promoted the phosphorylation of Syk525/6 in collagen-induced platelets. PP2, tyrosine protein kinase (Src) inhibitor, inhibited collagen-induced platelet aggregation and decreased the level of Syk525/6 phosphorylation induced by collagen. PP2 also blocked PRT318-enhanced Syk525/6 phosphorylation in collagen-treated platelets. **Conclusions** PRT318 significantly inhibits collagen-induced platelet aggregation and promotes collagen-induced phosphorylation of Syk525/6 locating in the downstream of glycoprotein VI (GPVI) signal pathway, suggesting that PRT318 may inhibit platelet activation through regulating Syk525/6 phosphorylation.

**Keywords:** PRT318; collagen; platelet aggregation; phosphorylation of Syk525/6

在血小板参与止血、血栓形成过程中,血小板膜受体糖蛋白 VI(glycoprotein VI, GPVI)是其中一个重要的受体,阻断 GPVI 下游信号通路能减少血栓形成,成为目前研发新型抗血栓药物的新靶点<sup>[1-4]</sup>。GPVI

收稿日期:2016-12-13

\* 基金项目:国家自然科学基金(No:81072968);教育部留学回国人员科研启动基金[No:教外司(20011568)];河南省重点科技攻关项目(No:102102310334)

[通信作者] 高水波, Tel: 0371-60906297; E-mail: wuzi@126.com

受体激活后,下游脾酪氨酸激酶 spleen tyrosine kinase, Syk) 磷酸化,血小板发生聚集, Syk 在该过程中起重要作用<sup>[3-4]</sup>。Syk 特异性抑制剂 PRT060318 (以下简称 PRT318) 在不同动物体内可抑制动脉血栓形成,表明 Syk 在血栓形成中起重要作用,而 PRT318 对胶原诱导人血小板 Syk 磷酸化水平的影响尚无报道<sup>[5]</sup>。本实验利用体外人血小板,观察 PRT318 对胶原诱导人血小板 GPVI 信号通路上 Syk525/6 磷酸化的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 主要试剂

Syk 抑制剂 PRT318、Src 家族激酶抑制剂 PP2 购于美国 Selleck 公司,胶原、腺苷二磷酸 adenosine diphosphate, ADP) 及花生四烯酸 arachidonic acid, AA) 购于美国 Helena 公司,兔抗 p-Syk525/6 和兔 t-Syk 抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。血小板来自本实验室健康自愿者静脉血。

### 1.2 血小板悬液制备

空腹静脉采血 2 ml 置于 3.2%枸橼酸钠抗凝管中,室温下 500 r/min 离心 10 min,取上清液,即为富血小板血浆 platelet-rich plasma, PRP)。于 PRP 中加入阿司匹林 终浓度为 1 mmol/L) 防止血小板活化, 37℃ 孵育 30 min, 室温放置 5 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 去上清液,用无  $Ca^{2+}$  台氏液悬浮[无  $Ca^{2+}$  台氏液组成:氯化钠 NaCl 140 mmol/L,氯化钾 KCl 5 mmol/L,氯化镁  $MgCl_2$  3.7 mmol/L, D-葡萄糖 D-glucose) 2 mmol/L,羟乙基哌嗪乙磺酸 hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid, HEPES) 10 mmol/L, pH=7.4], 调节血小板浓度至  $1 \times 10^8$  个/ml 备用。

### 1.3 血小板聚集率测定

为检测 PRT318 对胶原诱导血小板聚集率的影响,并验证 PRT318 对胶原作用的特异性,使用血小板聚集仪进行血小板聚集率的测定。血小板聚集仪(美国 Helena 公司)于实验前 30 min 开机预热,取专用比色杯,加入 100  $\mu$ l 血小板,分别加入 25  $\mu$ l 不同浓度的 PRT318 (终浓度分别为 1.0、2.5 和 5.0  $\mu$ mol/L) 或 PP2 (终浓度分别为 10.0、20.0 和 50.0  $\mu$ mol/L), 阴性对照组加入 25  $\mu$ l 生理盐水。37℃ 孵育 5 min,加入 100  $\mu$ l 含  $Ca^{2+}$  台氏液[含  $Ca^{2+}$  台氏液组成:NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L,氯化钙  $CaCl_2$  2.5 mmol/L,  $MgCl_2$  1.2 mmol/L, D-glucose 2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, pH 7.4], 轻轻混匀,再

分别加入 25  $\mu$ l 血小板激动剂胶原(终浓度为 2.5  $\mu$ g/ml) 或 ADP (终浓度为 5.0  $\mu$ mol/L) 或 AA (终浓度为 500.0  $\mu$ g/ml), 在磁棒搅拌下(1 200 r/min) 记录 5 min 内血小板聚集过程及最大聚集率。

### 1.4 Western blot 检测 p-Syk525/6

本实验观察 PRT318 和 Syk 上游蛋白 Src 抑制剂 PP2 对胶原诱导人血小板 Syk525/6 磷酸化的影响。取 100  $\mu$ l 血小板,加入不同浓度 PRT318 (终浓度分别为 1.0、2.5 和 5.0  $\mu$ mol/L) 或 PP2 (终浓度分别为 10.0、20.0 和 50.0  $\mu$ mol/L), 37℃ 孵育 5 min, 加入胶原, 37℃ 孵育、震荡 3 min (转速 1 200 r/min)。4℃ 下 13 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液,加入 70  $\mu$ l 蛋白裂解液,提取总蛋白。聚氧基丙烯酸正丁酯法测蛋白定量,稀释后用 5 $\times$  SDS Buffer 处理样品。配置 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离胶和 5% 浓缩胶,取蛋白 80  $\mu$ g/孔上样,300 V 恒压 30 min。半干转膜 1 h, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别加入抗体 p-Syk525/6 (1:1 000)、t-Syk (1:1 000), 4℃ 孵育过夜。二抗 37℃ 孵育 1 h 后,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL) 显色,凝胶成像系统采集图像并分析。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 Graphpad prism 5 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PRT318 对胶原诱导血小板聚集率的影响

在胶原(2.5  $\mu$ g/ml) 诱导下,血小板集聚率升高。4 组血小板集聚率比较,经方差分析,差异有统计学意义( $F=622.183, P=0.000$ )。PRT318 浓度为 2.5 和 5.0  $\mu$ mol/L 时能抑制血小板聚集,且随浓度增加抑制作用越明显,与对照组比较,差异有统计学意义。见图 1。

### 2.2 PRT318 对 ADP、AA 诱导血小板聚集率的影响

ADP(5.0  $\mu$ mol/L) 和 AA(500  $\mu$ g/ml) 均能有效诱导血小板集聚率升高。4 组血小板集聚率比较,经方差分析,差异无统计学意义( $F=0.202, P=0.892$ )。与对照组比较, PRT318(5.0  $\mu$ mol/L) 对 ADP、AA 诱导的血小板集聚率均无抑制作用,表明 PRT318 对

血小板聚集率的抑制作用具有胶原诱导选择性。见图 2。

### 2.3 PRT318 对胶原诱导血小板 Syk525/6 磷酸化的影响

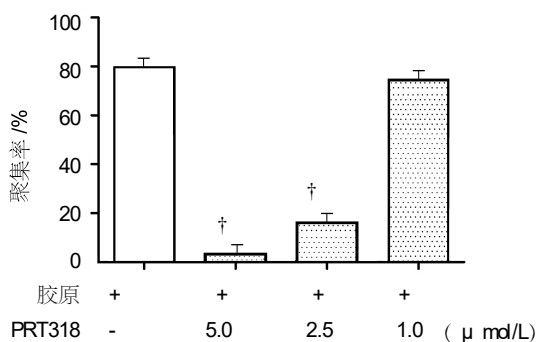
6 组磷酸化水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $F=50.655, P=0.000$ )。在未加诱导剂胶原状态下 Syk525/6 处于低磷酸化水平,而 10.0  $\mu\text{g/ml}$  胶原可诱导 Syk525/6 磷酸化水平升高。与单纯使用胶原比较,浓度分别为 0.5、1.0 和 2.5  $\mu\text{mol/L}$  的 PRT318 对胶原 (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) 诱导的血小板 Syk525/6 磷酸化有促进作用。见图 3。

### 2.4 不同浓度胶原对 PRT318 作用的血小板 Syk525/6 磷酸化的影响

4 组磷酸化水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $F=56.266, P=0.000$ )。在无胶原诱导下, PRT318 25  $\mu\text{mol/L}$  对 Syk525/6 磷酸化无促进作用,而随着胶原浓度增加, Syk525/6 磷酸化水平也逐渐增加,与对照组比较,差异有统计学意义。见图 4。

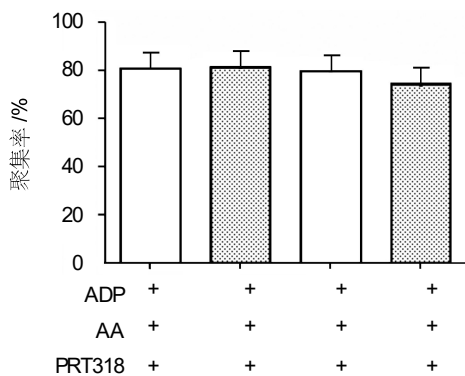
### 2.5 PP2 对胶原、ADP 和 AA 诱导血小板聚集率的影响

6 组血小板聚集率比较,经方差分析,差异有统



† 与对照组比较,  $P<0.05$

图 1 PRT318 对胶原诱导血小板聚集率的影响



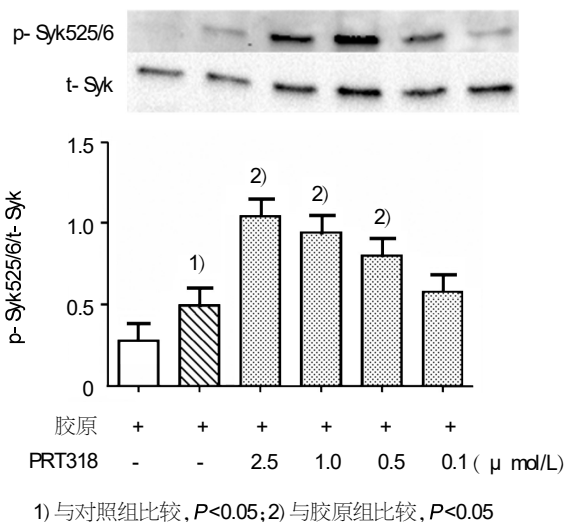
与对照组比较,  $P>0.05$

图 2 PRT318 对 ADP、AA 诱导血小板聚集率的影响

计学意义 ( $F=180.651, P=0.000$ )。与对照组比较,浓度为 10.0、20.0 及 50.0  $\mu\text{mol/L}$  的 PP2 能抑制胶原 (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 诱导的血小板聚集率。其中, PP2 浓度为 50.0  $\mu\text{mol/L}$  时对血小板聚集率的抑制作用最为显著。而 50.0  $\mu\text{mol/L}$  PP2 对 ADR (5.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 和 AA (500  $\mu\text{g/ml}$ ) 诱导的血小板聚集率无抑制作用。结果表明, PP2 只通过 GPVI 信号通路对胶原诱导的血小板聚集率产生抑制效应。见图 5。

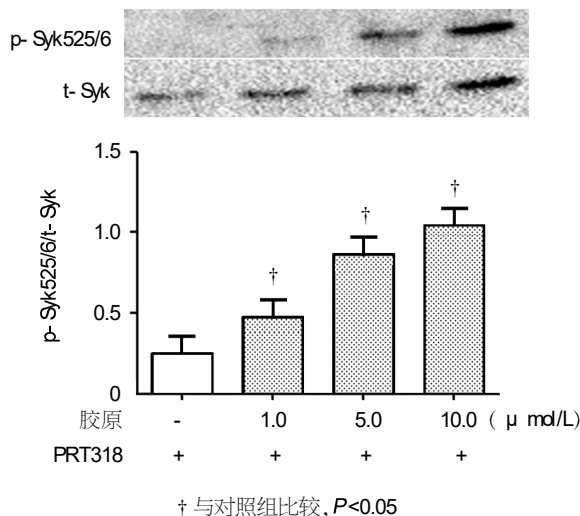
### 2.6 PP2 对胶原诱导血小板 Syk525/6 磷酸化的影响

5 组磷酸化水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $F=10.966, P=0.001$ )。与单独应用胶原比较,浓度为 10.0、20.0 及 50.0  $\mu\text{mol/L}$  的 PP2 对胶原 (10.0  $\mu\text{g/ml}$ ) 诱导的人血小板 Syk525/6 磷酸化有抑制作用。见图 6。



1) 与对照组比较,  $P<0.05$ ; 2) 与胶原组比较,  $P<0.05$

图 3 PRT318 对胶原诱导血小板 Syk525/6 磷酸化的影响



† 与对照组比较,  $P<0.05$

图 4 不同浓度胶原对 PRT318 作用的血小板 Syk525/6 磷酸化的影响

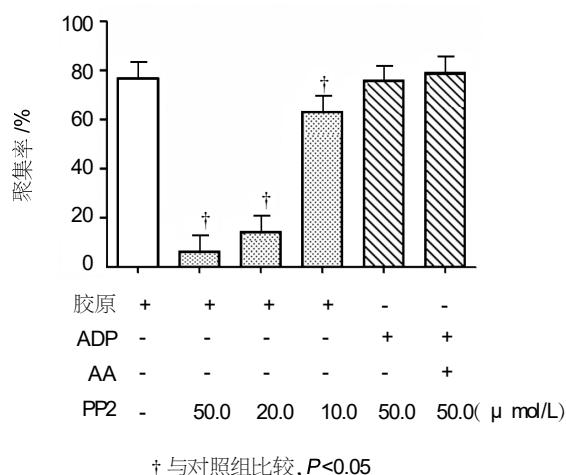


图 5 PP2 对胶原、ADP 和 AA 诱导血小板聚集率的影响

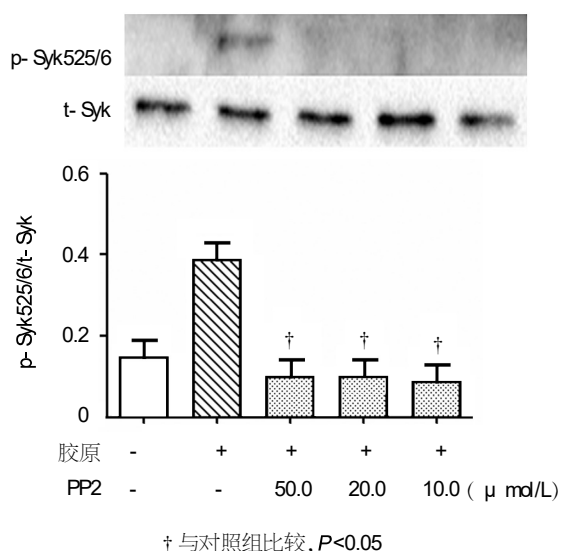


图 6 PP2 对胶原诱导血小板 Syk525/6 磷酸化的影响

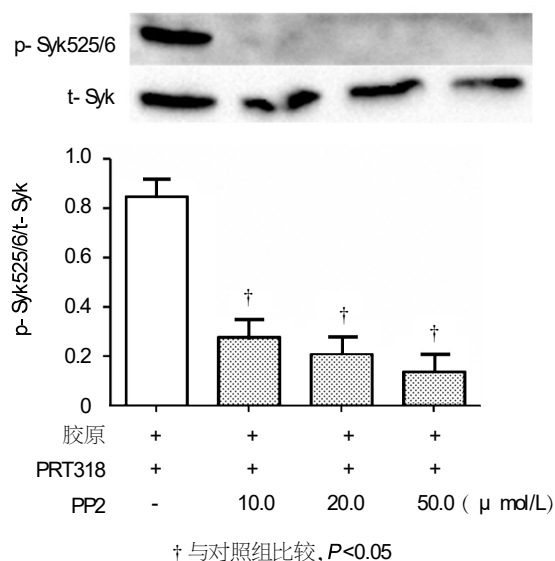


图 7 PP2 对 PRT318 促进胶原诱导 Syk525/6 磷酸化的影响

### 2.7 PP2 对 PRT318 促进胶原诱导 Syk525/6 磷酸化的影响

4 组磷酸化水平比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $F=42.983, P=0.001$ )。PRT318 能升高胶原诱导的 Syk 磷酸化水平,不同浓度的 PP2 10.0、20.0 及 50.0 μ mol/L 对其均有抑制作用。见图 7。

## 3 讨论

PRT318 是近期发现的一种新型、特异性高的 Syk 抑制剂,但 PRT318 调节胶原诱导的人血小板 GPVI 信号通路 Syk 磷酸化的作用尚不清楚。本研究第一次发现,在胶原诱导作用下,PRT318 可抑制人血小板聚集,在蛋白水平上升高 Syk525/6 的磷酸化水平。同时发现,在 PRT318 作用前提下,随着胶原浓度增加,Syk525/6 磷酸化水平也随之增加,而在缺乏 PRT318 作用时,即使增加胶原浓度,Syk525/6 磷酸化水平也未出现明显变化。

非常有趣的是,ANDRE 等<sup>[9]</sup>研究发现,PRT318 能够抑制人血小板 Syk525/6 磷酸化,与本实验结果相反。但无论是抑制或促进血小板 Syk 磷酸化,ANDRE 小组研究结果与本研究结果相同的地方是 PRT318 对血小板聚集率都表现出抑制作用。分析其原因可能为以下几个方面:① 所用血小板激动剂不同。ANDRE 等<sup>[9]</sup>所用诱导剂为 Convulxin(一种 GPVI 受体特异性激动剂),而本实验所用诱导剂为胶原,胶原受体除 GPVI 之外,还有糖蛋白 I a/II b (glycoprotein I a/II a, GP I a/II a)。当胶原与 GPVI、GP I a/II a 结合后,外部信号传递至血小板内部<sup>[6-7]</sup>,尽管 GP I a/II a 在传递胶原信号由外到内的作用相对微弱,但分析其信号网络可能与 Convulxin 参与的信号网络不同,也可能是 PRT318 对 Syk 磷酸化水平发挥不同作用的主要原因;② 所用防止血小板活化的预处理试剂不同。ANDRE 等<sup>[9]</sup>使用糖蛋白 II b/IIIa) 抑制剂埃替非巴肽对血小板进行预处理,而本实验使用的是阿司匹林,两者作用部位不同;③ 激动剂诱导血小板活化的时间不同。Andre 小组使用 Convulxin 诱导血小板 1 min,本实验使用胶原诱导的时间为 3 min。血小板在激动剂 Convulxin 刺激下,Syk 会迅速磷酸化,在 30 s 时达到最高水平,但通路也很快启动去磷酸化,在 60 s 时 Syk 磷酸化水平已开始降低,在 150 s 时 Syk 磷酸化水平显著降低。而胶原对 Syk 磷酸化和去磷酸化的作用时间轴与 Convulxin 不尽相同,亦有可能对 Syk 磷酸化水平高低具有重要



影响。有研究表明,若敲除 Syk 负调控基因 TULA-2, 则 Syk 磷酸化一直维持在较高水平<sup>[8-9]</sup>, 因此分析 PRT318 在胶原作用下可能阻碍类似 TULA-2 该类具有去磷酸功能的蛋白与 Syk 相结合, 使得 Syk 磷酸化保持高水平状态。但只有 Syk 磷酸化, 不足以活化血小板, 血小板仍保持圆盘状<sup>[10]</sup>, 血小板集聚率仍处于较低水平, 本研究结果也证明该点, 也就是说即使 PRT318 促使胶原诱导的 Syk 磷酸化水平升高, 但在 PRT318 作用下胶原诱导的血小板集聚率却处于低水平状态。

Src 家族激酶 Fyn 和 Lyn 位于 Syk 上游, 抑制 Src 激酶会抑制 Syk 激活以及 Syk 底物磷酸化<sup>[11-12]</sup>。本实验证实, Src 特异性抑制剂 PP2 可抑制血小板聚集, 并在蛋白水平上抑制 Syk525/6 磷酸化水平。在 PP2 作用下, PRT318 对胶原诱导的 Syk525/6 磷酸化的促进作用亦被阻断, 表明 PRT318 作用靶点是 Syk 蛋白磷酸化位点而不是其他。

综上所述, PRT318 可有效抑制胶原诱导的血小板聚集, 并能促进 GPVI 信号通路上 Syk525/6 磷酸化, PRT318 作用靶点位于 Syk 蛋白磷酸化位点。今后尚需对 PRT318 在胶原诱导下是如何促进人血小板 Syk525/6 磷酸化水平升高的详细机制进行探索, 并对 Syk 其他磷酸化位点的影响做进一步研究。同时需要研究在 Syk 抑制剂 PRT318 相互作用下同为 GPVI 受体激动剂的胶原和 Convulxin 对人血小板 Syk 磷酸化诱导作用差异化的原因, 分析血小板活化的调控网络。

#### 参 考 文 献:

- [1] 陈一竹, 张俊峰. 抗血小板治疗新靶点: 糖蛋白 VI[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(7): 1078-1081.
- [2] ANDREWS R K, ARTHUR J F, GARDINER E E. Targeting GPVI as a novel antithrombotic strategy[J]. J Blood Med, 2014(5): 59-68.
- [3] BERNDT M C, METHAROM P, ANDREWS R K. Primary haemostasis: Newer insights[J]. Haemophilia, 2014, 20(s4): 15-22.
- [4] MÓCSAI A, RULAND J, TYBULEWICZ V L J. The syk tyrosine kinase: A crucial player in diverse biological functions[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(6): 387-402.
- [5] ANDRE P, MOROOKA T, SIM D, et al. Critical role for syk in responses to vascular injury[J]. Blood, 2011, 118(18): 5000-5010.
- [6] MARJORAM R J, LI Z, HE L, et al.  $\alpha 2\beta 1$  integrin, GPVI receptor, and common Fc $\gamma$  chain on mouse platelets mediate distinct responses to collagen in models of thrombosis[J]. Plos One, 2014, 9(11): DOI: 10.1371/journal.pone.0114035.
- [7] SHIDA Y, RYDZ N, STEGNER D, et al. Analysis of the role of von Willebrand factor, platelet glycoprotein VI-, and  $\alpha 2\beta 1$ -mediated collagen binding in thrombus formation[J]. Blood, 2014, 124(11): 1799-1807.
- [8] THOMAS D H, GETZ TMNEWMAN T N, DANGELMAIER C A, et al. A novel histidine tyrosine phosphatase, tula-2, associates with syk and negatively regulates gpvi signaling in platelets[J]. Blood, 2010, 116(14): 2570-2578.
- [9] CHEN X, REN L, KIM S, et al. Determination of the substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase tula-2 and identification of syk as a tula-2 substrate[J]. J Biol Chem, 2010, 285(41): 31268-31276.
- [10] NEGRESCU E V, SIESS W. Dissociation of the  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3-integrin by egta stimulates the tyrosine kinase pp72 (syk) without inducing platelet activation[J]. J Biol Chem, 1996, 271(43): 26547-26553.
- [11] TOURDOT B E, BRENNER M K, KEOUGH K C, et al. Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)-mediated inhibitory signaling is regulated by sequential phosphorylation mediated by distinct nonreceptor tyrosine kinases: a case study involving PECAM-1[J]. Biochemistry, 2013, 52(15): 2597-2608.
- [12] BOULAFALI Y, HESS P R, KAHN M L, et al. Platelet ITAM signaling and vascular integrity[J]. Circ Res, 2014, 114(7): 1174-1184.

(李科 编辑)