

文章编号:1004-7220(2017)02-0188-06

# 流体剪应力作用下 VWF-A1A2A3 介导的 血小板 P-选择素的原位表达

刘思璐, 刘晓玲, 吴建华, 方颖

(华南理工大学 生物科学与工程学院, 生物力学研究所, 广州 510006)

**摘要:** **目的** 探讨流体剪应力(fluid shear stress, FSS)对 VWF-A1A2A3 介导的血小板表面 P-选择素表达的影响。**方法** 利用平行平板流动腔实验系统,以 CD62P:FITC 作为血小板表面 P-选择素表达的指示剂,采用荧光显微镜观察分析在不同 FSS 条件(0、1、2 Pa)下,血小板经由 VWF-A1A2A3 特异介导黏附后 P-选择素表达随时间的变化过程,提取特征参数。**结果** FSS 扣动了血小板激活并产生 P-选择素表达的扳机,激活比率受 FSS 大小和持续时间的正向调节,在 1 Pa 和 2 Pa 时的最高激活比率分别为 9.42% 和 14.59%;P-选择素表达水平随 FSS 作用时间的延长先提高后降低,呈现一个“双相”的变化过程,最佳作用时间为 7.5 min;P-选择素表达的荧光峰值随剪应力的增加而上升。**结论** 血小板 P-选择素表达受 FSS 和 VWF-A1A2A3 的协同调控,表达水平与力信号的持续时间相关。

**关键词:** 血小板 P-选择素; 血管性血友病因子; 流体剪应力; 血小板活化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2017.02.014

## VWF-A1A2A3-mediated expression of P-selectin in platelets under flow shear stress

LIU Si-lu, LIU Xiao-ling, WU Jian-hua, FANG Ying (*Institute of Biomechanics, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China*)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of fluid shear stress (FSS) on VWF-A1A2A3-mediated expression of platelet surface P-selectin. **Methods** Using a parallel plate flow chamber system and mouse anti-human CD62P: FITC as the indicator of P-selectin expression, the alteration of platelet P-selectin expression level with increasing exposure time under different FSS conditions (0, 1, 2 Pa) specifically mediated by VWF-A1A2A3 was observed and analyzed by fluorescence microscope to obtain the activation characteristics. **Results** FSS triggered platelet activation and P-selectin expression. The activation ratio of platelet was positively regulated by FSS and their exposure time, reaching the maximum value, 9.42% and 14.59% under FSS of 1 Pa and 2 Pa, respectively. The level of P-selectin expression exhibited two-phase tendency with the shear stress-exposure time increasing, uplifted at first, then decreased, with the best action time at 7.5 min. The fluorescence peak intensity increased when FSS was enhanced. **Conclusions** The level of platelet P-selectin expression is co-regulated by VWF-A1A2A3 and FSS, and is closely related to force-signaling exposure time.

**Key words:** Platelet P-selectin; VWF-A1A2A3; Flow shear stress (FSS); Platelet activation

血管破损之后,超大的血管性血友病因子 (ultra-large von Willebrand factor, UL-VWF) 将从破损处内皮细胞中分泌出来,并迅速被血浆蛋白裂解酶 ADAMTS-13 水解,生成较小、活性较低的血浆 VWF<sup>[1-2]</sup>。这些血浆 VWF 将结合到破损内皮下胶原,通过与血小板膜表面糖蛋白 (glycoprotein Ib, GPIb $\alpha$ ) 相互作用将循环血小板捕获至血管壁,介导其在壁面的拴缚和滚动<sup>[3]</sup>;进而诱导胞内第 2 信使 (Ca<sup>2+</sup> 离子) 的释放和整合素的活化<sup>[4]</sup>,促使血小板的稳定黏附;随着下游信号的进一步激活,这些稳定黏附的血小板会伸展和变形,随后释放  $\alpha$  颗粒物和 P-选择素<sup>[5]</sup>,使血小板聚集并捕获白细胞,产生止血栓以防止血液的继续渗漏。因此,凝血过程是一个复杂的信号级联反应,从胞外到胞内涉及许多重要的生物分子<sup>[6]</sup>。其中,VWF 中 A 结构域包括空间上相邻、功能上相互关联的 A1A2A3 三联体,因 A1、A2 和 A3 分别含有与血小板 GPIb $\alpha$ 、金属蛋白酶和胶原的结合位点,在诱导血小板凝血与止血反应中发挥着关键作用,被形象地比喻为星球大战中的绝地战士<sup>[7]</sup>,受到广泛关注<sup>[8-9]</sup>。

除上述生物分子外,凝血过程中的每个环节都受到血流动力学环境的调控。首先,流动腔实验表明,VWF 介导的血小板的滚动黏附呈现流动增强型特点<sup>[10-11]</sup>;原子力显微镜和光镊实验从单分子水平证明,VWF/GPIb $\alpha$  分子键的生存时间随外力的增强呈现先增大后减小趋势<sup>[12-13]</sup>;采用分子动力学模拟手段可以从原子水平揭示,2B 型和 2M 型血管性血友病是缘由 A1 突变导致的力学调控机制的失调<sup>[14-15]</sup>。随后在血小板胞内第 2 信使——钙信号的产生以及  $\beta_1$ 、 $\beta_3$  整合素的激活所导致的血小板的稳定黏附中,尽管信号传递路径尚不清晰,但已有实验数据表明,流体剪切力 (fluid shear stress, FSS) 与化学信号同样发挥着重要作用<sup>[16-17]</sup>。Gitz 等<sup>[18]</sup> 利用荧光共振能量转移 (forster resonance energy transfer, FRET) 技术,通过荧光显微镜观察到剪切力可提高由 VWF/GPIb $\alpha$  介导的下游信号的激活水平;Zijp 等<sup>[16]</sup> 采用钙离子荧光指示剂发现,在 GPIb 抗体和胶原介导下剪切力可大大缩短血小板的激活时间。在级联反应后期,持续激活的血小板将向胞外释放颗粒物和 P-选择素<sup>[5]</sup>。血小板 P-选择素的表达是该活化阶段的重要标志之一,在止血反应和招募白细胞

到血管受损部位发挥止血和炎症反应中发挥了关键作用<sup>[19-20]</sup>。目前的研究大多局限于不同化学诱导剂 (如  $\alpha$ -凝血酶、蛇毒素、PMA、VWF 和胶原等) 不同浓度对 P-选择素表达的影响<sup>[21-23]</sup>。也有研究表明,仅高剪切力就能上调 P-选择素的表达<sup>[24-26]</sup>。而有关力-化学偶联诱导的血小板 P-选择素的表达研究鲜有报道。

本文采用流动腔实验系统和荧光检测手段,模拟血流流动状态下,血小板黏附于底板包被 VWF-A1A2A3 三联体上 P-选择素释放表达的动力学过程。通过系统研究不同 FSS 下 VWF-A1A2A3 介导的血小板的激活比率和 P-选择素表达水平随时间的变化,揭示 VWF-A1A2A3 诱导的 P-选择素活化过程的力学调控机制。研究结果将丰富现有关于力、化学诱导的 P-选择素表达的知识,并有助于深化对血小板凝血止血反应过程的理解。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、细胞、蛋白与试剂

VWF-A1A2A3 重组质粒获赠于美国贝勒医学院 Cruz 教授,中国仓鼠卵巢细胞 (CHO-K1) 购于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),VWF-A1A2A3 蛋白的表达纯化同本实验室前期工作<sup>[11]</sup>。三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase) 购买于 Sigma 公司,mouse anti-human CD62P:FITC 购买于 AbD Serotec 公司,磷酸缓冲液 (PBS) 等溶液购于 Gibco 公司。

### 1.2 流动腔底板功能化

硅胶垫圈铺在直径为 35 mm 的培养皿中间,形成 5.0 mm  $\times$  2.5 mm 的流动腔底部工作区域。将 400 mg/L 的 VWF-A1A2A3 孵育在该工作区内,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;用含有 1% BSA 的 PBS 清洗 3 次,移除垫圈,再用 800  $\mu$ L 含有 1% BSA 的 PBS 溶液孵育整个底板,室温下孵育 2 h。

### 1.3 血小板的提取与纯化

实验过程中分离的血小板来源于两周内未服用阿司匹林等药物的成年健康志愿者,抽取 20 mL 静脉血于 4 支 5 mL 的抗凝管中。首先分离血小板和红细胞,室温 1 000  $\times$  g 离心 1 min,离心后上层为富含血小板的血浆 (platelet-rich plasma, PRP),将上层 PRP 转移到新的 15 mL 离心管中;再用 800  $\times$  g 离心 1 min,将上层 PRP 转移到离心管中;最后用 500  $\times$  g

离心 1 min, 将上层 PRP 转移到离心管中。然后分离血小板和血浆, 将收集到的 PRP 用  $1\ 000 \times g$  离心 15 min, 离心后上清为贫血小板的血浆 (platelet-poor plasma, PPP), 弃上清, 沉淀为血小板。用含有 5% 血浆的 PBS 稀释, 调整血小板的浓度到  $(3 \sim 30) \times 10^6/\text{mL}$ 。最后加入 5 U/mL 的 Apyrase 和 2 mmol/L 的  $\text{MgCl}_2$  (Apyrase 在二价离子存在的条件下抑制血小板聚集)<sup>[4]</sup>, 颠倒 5 ~ 10 次直到充分混匀。

#### 1.4 黏附特异性实验

对流动腔底板进行 3 种不同处理。① 实验对照组: 底板不铺蛋白分子, 直接用 800  $\mu\text{L}$  含 1% BSA 的 PBS 溶液室温阻断 2 h, 阻断物理吸附; ② 空白对照组: 底板不做任何处理, 直接加入 800  $\mu\text{L}$  的 PBS 溶液; ③ 实验组: 底板进行功能化处理。将血小板分别灌注到 3 组不同底板的流动腔中, 在生理条件的血流 FSS 范围内 (实验分别采用 0.1、1、2 Pa FSS), 观察并记录 1 min 内在底板上黏附的血小板个数。每种 FSS 下进行 3 组平行实验, 作双因素方差分析。

#### 1.5 血小板激活表达 P-选择素

在 10 倍相差显微镜下 (Axio Observer A1, ZEISS, 德国), 通过负压泵 (PHD 2000, Harvard Apparatus 公司, 美国) 将血小板悬浮液灌注到平行平板流动腔中 (Glyco Tech 公司, 美国), 孵育 10 min, 以便与底板分子充分结合。流动腔工作段的几何尺寸为: 高  $H = 0.127\ \text{mm}$ , 宽  $W = 2.5\ \text{mm}$ , 长  $L = 5\ \text{mm}$ 。然后用 PBS 缓冲液分别以 1、2 Pa 的 FSS 冲刷黏附在底板上的血小板, 分别在 2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 min 后加入 5 mg/L 的 P-选择素的荧光抗体 mouse anti human CD62P; FITC 孵育 15 min 后<sup>[21]</sup>, 检测荧光强度并用彩色数码摄像机 (2000R, Qimaging 公司, 加拿大) 录像, 采用专业图像分析软件 Image Pro Plus 6.1 (Mediacy 公司, 美国) 和 Microsoft Excel 分析处理数据。无流场条件下的血小板 P-选择素表达作为对照组: 先在底板上孵育 10 min, 吸掉没有结合的血小板, 再在 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 min 后, 加入 P-选择素荧光抗体, 检测细胞的荧光强度。

#### 1.6 血小板 P-选择素表达相关物理量定义和测量

**1.6.1 激活比率** 在不同实验条件下, 采用 P-选择素荧光抗体 CD62P; FITC 作为指示剂, 若血小板

活化并产生 P-选择素表达, 其表面荧光强度一定会高于未表达 P-选择素的血小板。因此, 统计黏附于流动腔底部发光的细胞数 (激活事件数) 及总黏附数 (黏附事件数), 则血小板的激活比率为激活事件数/黏附事件数。

**1.6.2 相对荧光强度** 血小板激活后 P-选择素表达所导致的荧光强度的变化, 反映 P-选择素的表达水平。为扣除背景噪声, 其计算公式为:

$$\text{相对荧光强度} = \frac{\text{实际荧光强度} - \text{背景荧光强度}}{\text{背景荧光强度}}$$

#### 1.7 数据统计分析

所有数据用 3 组独立平行实验的均值表示, 采用  $t$  检验、 $F$  检验进行统计学处理。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血小板与 VWF-A1A2A3 的特异性黏附

为鉴定血小板在流动腔底板上的黏附确实是由 VWF-A1A2A3 的特异性作用介导, 按照 1.4 节所述方法进行实验, 结果如图 1 所示。在任一 FSS 条件下, 底板包被有 VWF-A1A2A3 的实验组的黏附细胞数极显著高于 BSA 实验对照组 ( $P < 0.01$ ); 而实验对照组又极显著低于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 说明 BSA 能够有效阻断血小板与底板之间的物理黏附, 但又不影响血小板与 VWF-A1A2A3 间的特异性相互作用。因此, 本研究设计的流动腔功能化方案可以保证血小板与底板上的黏附由 VWF-A1A2A3 特异性介导。

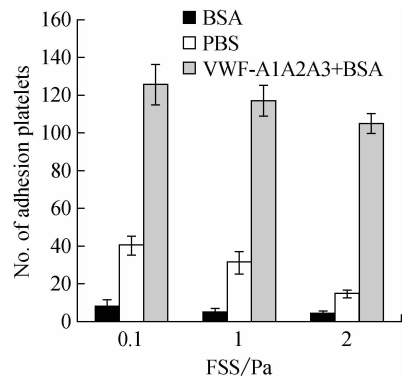
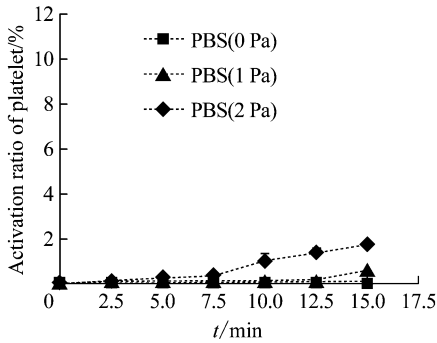


图 1 血小板与 VWF-A1A2A3 结合的特异性

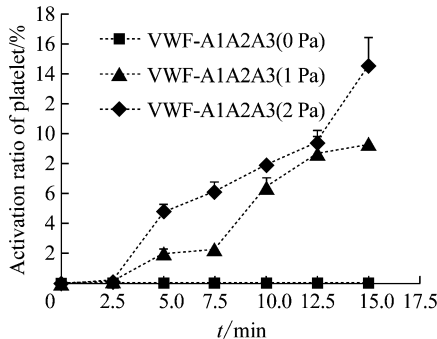
Fig. 1 Binding specificity of platelet with VWF-A1A2A3

## 2.2 力触发由 VWF-A1A2A3 介导的血小板激活和 P-选择素表达

预实验发现,在低 FSS 下,经由 VWF-A1A2A3 诱导激活血小板表面表达 P-选择素的水平极低且数目很少,而在高 FSS 下,血小板会被冲走很难稳定黏附在底板上,故设定 FSS 为 1、2 Pa。每个 FSS 条件下不同的持续作用时间点,均进行 3 组独立平行实验,每组观察到的黏附数目均大于 250 个。图 2 所示为血小板激活而表达 P-选择素的比率随 FSS 持续作用时间的关系。当血小板非特异性黏附于流动腔底部,静息条件下的激活比率几乎为 0;在 1、2 Pa 高 FSS 作用下,其激活比率呈极缓慢的线性上升趋势,在 2 Pa FSS 作用 15 min 后的最高激活比率仅为 1.73% [见图 2(a)]。当血小板由 VWF-A1A2A3 介导特异黏附于流动腔底板时,静息条件下的激活比率依然可忽略;但在 FSS 作用下,激活比率显著提高,在 0~15 min 随作用时间单调递增,在 1 Pa 和 2 Pa FSS 时激活比率最高值分别可分别达到 9.42%、14.59%;在各作用时间点,2 Pa FSS 下的



(a) 物理黏附



(b) 400 mg/L VWF-A1A2A3

图 2 不同 FSS 条件下血小板的激活比率  
 Fig. 2 Activation ratio of platelet under various shear stress conditions (a) Physical adhesion, (b) 400 mg/L VWF-A1A2A3

激活比率一般都显著高于 1 Pa 情形 ( $P < 0.05$ ), 2.5、12.5 min 时两者非常接近[见图 2(b)]。上述结果表明,血小板黏附并发生 P-选择素表达的细胞比率受化学信号——VWF-A1A2A3 和 FSS 的共同调控,两者缺一不可;当存在化学信号特异诱导时, FSS 是打开下游信号级联并产生 P-选择素表达的开关,力学信号的持续时间对激活比率实现正向调节。

## 2.3 FSS 对血小板表面 P-选择素表达水平的影响

当血小板由 VWF-A1A2A3 介导特异黏附于流动腔底部后,为探究 FSS 对血小板 P-选择素表达水平的影响,在不同 FSS(0、1、2 Pa)作用下,持续观察记录血小板 P-选择素表达水平随 FSS 作用时间的变化过程。每个数据点均进行 3 组独立平行实验,每组视窗内观察的细胞数大于 10 个,实验结果如图 3 所示。

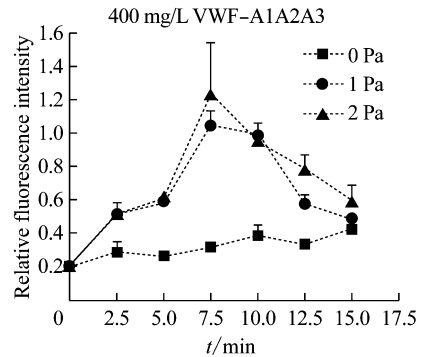


图 3 不同 FSS 条件下血小板 P-选择素的相对荧光强度  
 Fig. 3 Relative fluorescence intensity of platelet P-selectin under various FSS conditions

在静息和 1、2 Pa FSS 作用下,P-选择素表达的相对荧光强度主要分布范围为 0.2~1.4。静止情况下,相对荧光强度主要为 0.2~0.4,趋势比较平稳,表明 P-选择素表达水平并未发生明显的上调。外加流场时,荧光强度明显增大,并随作用时间呈现先增强后减弱的趋势。在 0~7.5 min,荧光强度逐渐增大,7.5 min 时达到最高值;随后逐渐下降,至 15 min 时其相对荧光强度几乎已回复至静息状态。比较 1 Pa 与 2 Pa FSS,尽管 7.5、12.5 min 时,后者的荧光强度更高,但两者总体趋势接近,说明 FSS 作用力大小(1、2 Pa)对 P-选择素表达的调控不如 FSS 持续作用时间重要;但该结果进一步证实,血小板特异性初始黏附后,FSS 扣动了激活的扳机,导致 P-选择素在细胞膜上的表达。

上述结果表明,血小板表面 P-选择素的表达水平并没有随着 FSS 作用时间的延长而持续上调达到最终的饱和态,而是呈现先提高后降低这样一个“双相”的过程,存在一个最佳作用时间——达峰时间。1、2 Pa FSS 情况下,达峰时间均为 7.5 min,两者对 P-选择素表达水平的调控并无明显差异。

## 2.4 VWF-A1A2A3 对血小板表面 P-选择素表达水平的影响

探究 VWF-A1A2A3 浓度对血小板 P-选择素表达的影响,设定 3 个不同的浓度梯度(0、200、400 mg/L),其中 0 mg/L 表示血小板非特异(物理)黏附于流动腔底部。浓度为 0 mg/L 时,荧光显微镜视窗内观察到的细胞数较少,一般为 5~6 个;200 与 400 mg/L 浓度时,每组观察的细胞数均大于 10。每个实验条件下均进行 3 组独立平行实验。

FSS 为 2 Pa 时,不同 VWF-A1A2A3 浓度对血小板 P-选择素表达水平动态过程的影响如图 4(a)所示。当血小板物理黏附时,仅 2 Pa 的 FSS 并不能促使荧光强度的显著增强,只是在一个很窄的区域波动。VWF-A1A2A3 的特异介导显著上调了血小板 P-选择素表达水平,使相对荧光强度从低于 0.4 一直提升到高于 1.2。但 200 与 400 mg/L 组并无显著不同,不仅表现为相同的趋势,且各时间点的荧光强度值非常接近,达峰时间均为 7.5 min。

FSS 为 1 Pa 时,血小板表面的荧光强度随时间的变化与 2 Pa FSS 呈现非常类似的趋势。VWF-A1A2A3 浓度及 FSS 大小对 P-选择素的荧光峰值强度的影响如图 4(b)所示。静息情况下,血小板 P-选

择素的表达水平很低,3 个浓度组间无显著差异;当存在 FSS 作用时,无论浓度为 200 mg/L 还是 400 mg/L,峰值均显著增大( $P < 0.05$ ),但 2 组间并无显著差异。

## 3 讨论

鉴于 VWF-A1A2A3 在血小板的滚动和黏附等级联反应中发挥重要作用,本文利用流动腔实验系统结合荧光显微镜,在流场中对 VWF-A1A2A3 介导的血小板活化标志物之一——P-选择素表达的动态过程进行系统的观察分析,以深入探索 FSS 对血小板黏附后活化过程的调控。

实验结果表明,FSS 是诱导 P-选择素表达的“开关”,并正向调节血小板的激活比率;P-选择素的表达受力和 VWF-A1A2A3 的共同调控,两者缺一不可(见图 2)。Gyulkhndanyan 等<sup>[23]</sup>研究表明,仅化学兴奋剂或 FSS 就能促使血小板表达 P-选择素,该结果与本文结论矛盾。究其原因,首先是化学兴奋剂不同,无论是  $\alpha$ -凝血酶、钙离子载体 A23187 还是胶原<sup>[23]</sup>,它们均是添加在溶液中,直接与血小板上膜受体结合或进入胞内以激活血小板。而溶液中的 VWF-A1A2A3 是球状结构的低亲和力构象,不能与血小板 GPIIb $\alpha$  结合,只有固定在壁面并在 FSS 作用下发生构象改变,才能键合 GPIIb $\alpha$  以黏附血小板,故以 VWF-A1A2A3 为化学刺激剂必须有力的作用才能启动下游信号。其次,Chen 等<sup>[26]</sup>研究发现,采用 25、125 Pa 远远偏离生理条件的 FSS 刺激,在无化学诱导剂的情况下,血小板活化表达 P-选择素;这可能源于超高 FSS 导致血小板变形后,启动了膜骨架上连接的力敏感蛋白的激活<sup>[27]</sup>。本实验结果也体现了这种力在细胞信号级联反应中的作用,力信号的增强确实显著上调了血小板的激活比率,而且加快了激活的速率[见图 2(b)]。

此外,通过对 FSS 下血小板 P-选择素表达水平的动态监测发现,恒稳力学信号的持续刺激时间对 P-选择素的表达水平有重要影响。随着 FSS 持续时间的延长,P-选择素的表达水平先逐步提高,达到峰值后,再逐渐下降,存在一个最佳时间点(见图 3),FSS 大小对峰值强度有影响(见图 4)。该研究结果揭示了 FSS 对血小板表面 P-选择素表达过程的调控,提示活化血小板表面 P-选择素表达不能无限增

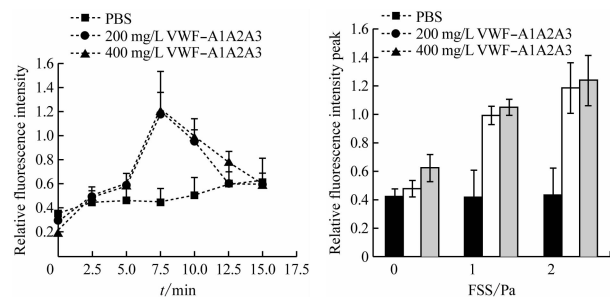


图 4 不同浓度 VWF-A1A2A3 对血小板表面 P-选择素表达水平的影响

Fig. 4 Effects of VWF-A1A2A3 at various concentrations on platelet P-selectin (a) Relative fluorescence intensity, (b) Relative fluorescence peak intensity

加或一直维持在高水平状态,当胞外无相应 P-选择素配体存在时,膜表面的 P-选择素可能通过内在化路径重返到  $\alpha$ -颗粒内。上述推论得到 Mutlu 等<sup>[23]</sup> 实验数据的部分支持,他们用流式细胞仪测量经凝血酶和钙离子载体 A2318787 刺激后血小板表面 P-选择素的表达水平,共检测了 3 个刺激时间 15、30 和 90 min,结果发现,P-选择素水平依次下降。本文关于 VWF-A1A2A3 介导的 P-选择素表达的力学调控机制的研究和初步结论,有助于深入理解生理条件下由 VWF/GPIIb $\alpha$  相互作用介导的血小板黏附与活化过程,为进一步探索 FSS 如何传递、参与并调控下游信号通路提供前期基础。

### 参考文献:

- [1] DONG JF, MOAKE JL, BERNARDO A, et al. ADAMTS-13 metalloprotease interacts with the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(32): 29633-29639.
- [2] DONG JF. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(3): 1710-1716.
- [3] YAGO T, LOU J, WU T, et al. Platelet glycoprotein Iba $\alpha$  forms catch bonds with human WT vWF but not with type 2B von Willebrand disease vWF [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3195-3207.
- [4] MAZZUCATO M, PRADELLA P, COZZI MR, et al. Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Iba $\alpha$  mechanoreceptor [J]. *Blood*, 2002, 100(8): 2793-2800.
- [5] STENBERG PE, MCEVER RP, SHUMAN MA, et al. A platelet  $\alpha$ -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation [J]. *J Cell Biol*, 1985, 101(3): 880-886.
- [6] ANDREWS RK, BERNDT MC. Platelet physiology and thrombosis [J]. *Thromb Res*, 2004, 114(5-6): 447-453.
- [7] SPRINGER TA. Von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream [J]. *Blood*, 2014, 124(9): 1412-1425.
- [8] SPRINGER TA. Biology and physics of von Willebrand factor concatamers [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9 (Suppl 1): 130-143.
- [9] 窦甜甜, 吴建华, 刘广建, 等. 一种基于分子动力学模拟来识别 GPIIb $\alpha$  与 vWF-A1 结合面上重要残基的新方法 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(6): 606-614.
- [10] COBURN L, DAMARAJU V, DOZIC S, et al. GPIIb $\alpha$ -vWF rolling under shear stress shows differences between type 2B and 2M von Willebrand disease [J]. *Biophys J*, 2011, 100(2): 304-312.
- [11] 杨小芳, 丁孝茹, 吴建华, 等. vWF-A1A2A3 介导循环血小板翻滚运动的机制研究 [J]. *医用生物力学*, 2013, 28(5): 567-573.
- [12] WU T, LIN J, CRUZ MA, et al. Force-induced cleavage of single VWF-A1A2A3 tridomains by ADAMTS-13 [J]. *Blood*, 2010, 115(2): 370-8.
- [13] YING J, LING Y, WESTFIELD LA, et al. Unfolding the A2 domain of von Willebrand factor with the optical trap [J]. *Biophys J*, 2010, 98(8): 1685-1693.
- [14] LIU G, FANG Y, WU J. A mechanism for localized dynamics-driven affinity regulation of the binding of von Willebrand factor to platelet glycoprotein Iba $\alpha$  [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26658-26667.
- [15] 李红, 刘文平, 刘广建, 等. 采用分子动力学模拟探究 VWF-A1 突变体 G561S 的亲合力变化机制 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(5): 433-439.
- [16] LI H, LIU WP, LIU GJ, et al. Mechanism of affinity alterations in VWF-A1 domain mutant G561S studies by molecular dynamics simulation [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(5): 433-439.
- [17] VAN ZIJP H, BARENDRECHT A, RIEGMAN J, et al. Quantification of platelet-surface interactions in real-time using intracellular calcium signaling [J]. *Biomed Microdevices*, 2014, 16(2): 217-227.
- [18] KONG F, GARC AAJ, MOULD AP, et al. Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand [J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(7): 1275-1284.
- [19] GITZ E, KOOPMAN CD, GIANNAS A, et al. Platelet interaction with von Willebrand factor is enhanced by shear-induced clustering of glycoprotein Iba $\alpha$  [J]. *Haematologica*, 2013, 98(11): 1810-1818.
- [20] KIM KH, BARAZIA A, CHO J. Real-time imaging of heterotypic platelet-neutrophil interactions on the activated endothelium during vascular inflammation and thrombus formation in live mice [J]. *J Vis Exp*, 2013, 74(1): e50329.
- [21] ZARBOCK A, POLANOWSKA-GRABOWSK RK, LEY K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation [J]. *Blood Rev*, 2007, 21(2): 99-111.