

血小板特异性 *Rictor* 敲除抑制小鼠血小板生成和活化及血栓形成

龙清, 杨峻, 刘安玲

南方医科大学生物化学与分子生物学教研室, 广东 广州 510515

摘要:目的 探究 *Rictor* 对血小板活化和血栓形成的影响。方法 利用 PF4-Cre、*Rictor*^{fl/fl} 转基因小鼠, 构建血小板特异性 *Rictor* 敲除小鼠和野生型小鼠, 分别设为敲除组和对照组 (总实验小鼠 $n=65$), 用于后续实验。Western blotting 检测小鼠 *Rictor* 蛋白、蛋白激酶 B (AKT)、p-AKT 的表达水平。血常规检测敲除和对照组小鼠血小板数目。尾静脉出血实验检测敲除和对照小鼠止血功能。构建静脉血栓模型检测 *Rictor* 敲除对血栓形成的影响。使用 ADP 和凝血酶刺激血小板, 检测 *Rictor* 敲除对血小板聚集的影响。流式细胞术分析敲除组和对照组血小板在静息态和活化态整合素 α IIb β 3 与 CD62P 的表达水平。检测血浆中 PF4 水平。vWF 免疫组化标记巨核细胞。用 APC-CD41 抗体孵育敲除和对照小鼠的巨核细胞, 流式细胞术检测细胞倍体。扫描电镜检测敲除和对照组血小板在胶原表面的伸展变化。**结果** 与对照小鼠相比, 血小板 *Rictor* 特异性敲除小鼠 AKT 磷酸化降低 ($P<0.001$), 血小板生成减少 ($P<0.05$), 血栓形成受到抑制 ($P<0.05$), 血小板对 ADP 和凝血酶刺激的活化水平降低 ($P<0.01$), P-选择素蛋白表达水平 ($P<0.05$)、整合素 α IIb β 3 活化程度 ($P<0.01$) 受到抑制, 血小板伸展受到抑制 ($P<0.01$), PF4 的血浆含量降低 ($P<0.05$), 骨髓中巨核细胞数量减少 ($P<0.01$), 倍体降低 ($P<0.05$), 前血小板平均面积减少 ($P<0.01$)。**结论** 血小板特异性敲除 *Rictor* 抑制血小板生成和活化, 进而减少血栓形成。抑制 mTORC2 活性可能是一种潜在的抗血栓靶标。

关键词: *Rictor*; 血小板; 血栓形成

Platelet-specific *Rictor* knockout inhibits platelet production and activation and reduces thrombosis in mice

LONG Qing, YANG Jun, LIU Anling

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effects of platelet-specific *Rictor* knockout on platelet activation and thrombus formation in mice. **Methods** PF4-Cre and *Rictor*^{fl/fl} transgenic mice were crossed to obtain platelet-specific *Rictor* knockout (*Rictor*-KO) mice and wild-type mice ($n=65$), whose expression levels of *Rictor*, protein kinase B (AKT) and p-AKT were detected using Western blotting. Platelet counts of the mice were determined using routine blood tests, and hemostatic function was assessed by tail vein hemorrhage test. Venous thrombosis models were established in the mice to evaluate the effect of *Rictor* knockout on thrombosis. Platelet aggregation induced by ADP and thrombin was observed in *Rictor*-KO and wild-type mice, and flow cytometry was used to analyze the expression levels of integrin α IIb β 3 and CD62P in resting and activated platelets. Plasma PF4 levels were determined with ELISA. Megakaryocytes from *Rictor*-KO and wild-type mice were incubated by vWF immunohistochemical antibody and APC-CD41 antibody to detect the number and ploidy of megakaryocytes, respectively. Platelet elongation on collagen surface was observed with scanning electron microscopy. **Results** Compared with the wild-type mice, *Rictor*-KO mice showed significantly decreased AKT phosphorylation, decreased platelet production, reduced thrombosis, and decreased platelet activation in response to ADP and thrombin stimulation. The *Rictor*-KO mice also showed lowered expression level of P-selectin protein and activation of integrin α IIb β 3 with suppression of platelet extension, reduced plasma PF4 level and decreased number of megakaryocytes in the bone marrow. The ploidy of megakaryocytes and the mean area of proplatelets were both significantly decreased in *Rictor*-KO mice. **Conclusion** Platelet-specific *Rictor* knockout inhibits platelet generation and activation to result in decreased thrombus formation in mice, suggesting the potential of mTORC2 activity inhibition as an efficient antithrombotic strategy.

Keywords: *Rictor*; platelets; thrombosis

静脉栓塞 (VTE) 是常见的临床疾病, 研究表明其已成为致残 (死) 率第 2 大的疾病, 引起严重的社会负担^[1]。Virchow 提出的经典观点认为血液流速改变、血液成分改变及血管壁损伤是引发栓塞性疾病的三种主要因素^[2]。其中, 血液成分中的血小板, 在栓塞形成中扮演重要角色。正常生理状态下, 血小板发挥促止血作用, 是机体的一种防御机制。但在血栓高风险的患者体内, 循

环血小板粘附于细胞外基质上, 触发 G 蛋白偶联受体介导的信号级联反应, 历经粘附、活化、分泌和聚集四个不同过程, 导致静息态血小板聚集和激活, 与血液中的其他细胞及纤维蛋白凝结形成血栓^[3,4]。活化的血小板分泌 α 颗粒等促血小板活化因子, 引起级联反应, 促使分泌形成更多的粘附分子例如 P-选择素和 GPIIb/IIIa, 加剧栓塞形成^[5]。因此, 抑制血小板活性已经成为治疗血管栓塞疾病的重要靶点。

现普遍认为血小板从巨核细胞发育而来, 巨核细胞的细胞质延长形成的长臂细胞质称为前血小板^[6]。在骨髓血窦中受血流引起的剪应力作用, 前血小板片段之

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 中国博士后科学基金 (2023M731541)

作者简介: 龙清, 在读硕士研究生, E-mail: lqing2024@163.com

通信作者: 刘安玲, 副教授, 硕士生导师, E-mail: aliu@smu.edu.cn

间的细胞质桥破裂,单个血小板形成并释放到循环中^[7]。巨核细胞的分化成熟阶段时,表达的特定糖蛋白(GPs)如血浆血管性血友病因子(vWF),作为巨核细胞的分子标记^[8]。巨核细胞产生血小板时,细胞表面受体(CD41等)及胞内颗粒(P选择素等)同时在血小板中表达,以上分子会介导血小板活化及分泌过程,并在血栓形成过程中发挥重要作用^[8]。因此,骨髓中巨核细胞的多倍体化、成熟和胞质分裂等过程,对血小板的生成与活化,发挥调控作用^[3,6,9]。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为磷脂酰肌醇激酶相关激酶(PIKK)蛋白质家族成员。mTOR包括两种不同的多蛋白复合物,即mTOR复合物1(mTORC1)和mTOR复合物2(mTORC2)^[10,11]。mTORC2的核心成分是mTOR、Rictor、protor1/2、mLST8、Deptor和mSin1^[12,13]。其中,Rictor缺失会引起mTORC2活性降低^[14]。mTORC2控制与细胞生长、肌动蛋白重排和细胞存活相关的生长因子激活^[15-17]。此外,mTORC2是PI3K信号通路的关键下游调节因子,mTORC2活性及其对Akt磷酸化的调控功能在整合素 α Ib β 3介导的outside-in信号传导过程中起重要作用^[18,19]。体外实验结果证实,敲除Rictor的MO7e巨核细胞中细胞核分裂减少,细胞周期阻滞,这表明Rictor/mTORC2复合物通过调节细胞分裂和细胞周期进程来影响巨核生成^[20]。mTORC2底物PKCa是肌动蛋白细胞骨架的调节剂,而细胞骨架重排影响血小板功能变化。但是,Rictor在体内血小板活化和血栓形成中的作用仍然未知。

本研究旨在探究血小板特异性敲除Rictor的小鼠中,mTORC2对血小板功能和血栓形成的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

二磷酸腺苷(ADP)、凝血酶(Thrombin)、PGE1、apryase(Sigma)。小鼠PF4 ELISA检测试剂盒(R&D)。FITC-CD62P、PE- α Ib β 3 (JON/A) (Emfret)。APC-CD41(Ebioscience)。小鼠GAPDH抗体(1:5000,北京锐抗生物科技有限公司)。P-Akt(S473)抗体、AKT抗体、Rictor抗体(1:1000,Cell Signal Technology)。vWF抗体(1:100,Abcam)。重组血小板生成素(rTPO)(Peprotech)。BCA蛋白定量试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的饲养与繁殖 PF4-Cre小鼠(品系号:Jax # 008535,购买自Jackson实验室)。Rictor^{loxP/loxP}小鼠由南方医科大学白晓春教授馈赠。采用常规的条件性基因敲除小鼠获取方案,首先把PF4-Cre阳性小鼠与

Rictor^{loxP/loxP}小鼠交配,获得的子一代小鼠中PF4-Cre⁺-Rictor^{loxP/+}小鼠。子一代小鼠再与纯合的Rictor^{loxP/loxP}合笼,获的子二代同窝小鼠中,PF4-Cre⁺-Rictor^{loxP/loxP}为敲除鼠(KO),PF4-Cre⁻-Rictor^{loxP/loxP}为对照小鼠(Con)。所有实验小鼠饲养于SPF级动物房,并保持22℃恒温、昼夜交替,选取10~12周龄小鼠用于实验。对照和实验组小鼠分别为65只。动物实验通过南方医科大学实验动物伦理委员会伦理审查(伦理批号:2011034)。

1.2.2 小鼠基因型鉴定 取2周龄小鼠,剪取尾巴尖部3 mm长的组织,加入100 μ L鼠尾裂解液A 96℃煮60 min,瞬离后加入鼠尾裂解液B 100 μ L。混匀后12 000 r/min离心3 min,上清即为DNA模板。小鼠基因型鉴定所用的引物序列如下:PF4-F: 5'-CCCATACAGCACACCTTTTG-3',PF4-R: 5'-TGCACAGTCAGCAGGTT-3',Rictor-F: 5'-GAAGTTATTCAGATGGCCAGC-3'; Rictor-R: 5'-ACTGAATATGTTTCATGGTTGTG-3'。PF4-Cre的PCR产物为450 bp,Rictor-loxP的PCR产物分别为554和466 bp,分别对应纯合和野生两种基因型。

1.2.3 下腔静脉阻滞法诱导血栓 采用阻滞法,构建小鼠下腔静脉血栓模型。取实验小鼠,麻醉后沿腹中线剪开腹腔,用无菌生理盐水浸泡的湿纱布将小肠等包裹保护,置于动物左侧腹腔。按照已经发表的实验方法^[21],体视显微镜下,显露下腔静脉,在左肾静脉下方1~2 mm处,显微镊小心钝性分离下腔静脉与腹主动脉。从分离处穿过无菌缝合线,两次打结,结扎下腔静脉。而后将结扎点下方的细微血管分支(3~4处),逐个结扎。看到下腔静脉明显鼓起,说明结扎成功。而后将内脏小肠等放回腹腔,缝合腹腔及皮肤。造模48 h后,处死小鼠,小心剥离下腔静脉,置于PBS中,取出血栓,量取长度并称质量。

1.2.4 出血时间测定 实验小鼠麻醉后,切断鼠尾尖处2~3 mm,将鼠尾自然下垂,放置在37℃生理盐水中,并开始计时,当首次出血停止时,记录时长,评估Rictor敲除血小板的止血功能。

1.2.5 血常规分析 采用EDTA抗凝获得全血。小鼠麻醉后,用胶带以仰卧姿势固定前肢和后肢。然后用酒精棉球擦拭皮肤,沿胸骨中线剪开皮肤,采用心脏穿刺法在心脏搏动最强点穿刺收集血液,混匀。用血常规分析仪测量血常规,统计血小板数目(PLT)。

1.2.6 免疫印记检测 如上所述,获得EDTA抗凝全血。室温低速离心100 g离心10 min,收取上清为富含血小板血浆(PRP),再将PRP 1000 g离心10 min,收集上清为贫血小板血浆(PPP),沉淀即为血小板。用改良台式液(含0.5 μ mol/L PGE1,0.02 U/mL三磷酸腺苷双磷酸酶)重悬细胞沉淀,室温静置10 min,再次离心后,弃去

上清,用改良台式液重悬(含0.02 U/mL apyrase),即为静息态血小板悬液。提取血小板过程中,若悬液出现浑浊,则说明静息态血小板已经活化,则弃之不用。血小板经凝血酶(终浓度0.2 U/mL)刺激15 min后为活化状态。RIPA裂解静息态及活化态的血小板样本,样品经BCA试剂盒测定蛋白浓度,调浓度一致后加入1×SDS(含 β -巯基乙醇)充分裂解并100 °C煮10 min。进行10%的SDS-PAGE凝胶电泳1.5~2 h(恒流,24 mA/gel)。转膜条件90 V,90 min。封闭后按1:1000稀释加入一抗。4 °C孵育过夜。按1:1000稀释对应种属的二抗,室温下孵育1 h。洗涤后曝光。Image J测量相关灰度。

1.2.7 聚集实验 如上所述,获取静息状态下的血小板样本,取等量血小板,室温静置30 min。设定聚集仪工作温度为37 °C。吸取300 μ L PRP到反应池中,加入搅拌棒,用不含血小板的PPP样品作为基准。温浴PRP样本3 min,加入转子,1200 r/min。加20 μ mol/L ADP或0.2 mol/L 凝血酶,活化血小板,记录统计聚集情况。

1.2.8 血浆PF4浓度测定 血浆PF4浓度水平用ELISA试剂盒进行检测。如上所述获得PPP,后续按试剂盒步骤进行。终止反应后测量450 nm波长下的吸光度,并根据标准曲线计算待测样品浓度。

1.2.9 免疫组化 小鼠麻醉后处死小鼠,剥离股骨皮肤及肌肉,用手术刀小心分离待取股骨样本,于4%多聚甲醛中4 °C固定48 h;骨组织置于10% EDTA脱钙1个月,脱水浸蜡后包埋切片。65 °C烤片2 h,常规脱蜡水化后PBS洗涤,0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH=6.0)中60 °C热修复16 h,3% H₂O₂溶液避光孵育15 min灭活内源性过氧化物酶。PBS洗涤,正常山羊血清专用封闭液室温孵育1 h。4 °C过夜孵育一抗。PBS冲洗,37 °C孵育对应种属二抗1 h。PBS洗涤后显色,封片。

1.2.10 巨核细胞培养及倍体检测 小鼠麻醉断颈处死后,放入70%乙醇中5 min。无菌状态下获取小鼠股骨,吸取0.2 mL含10% FBS的DMEM培养基,将骨髓内容物冲入10 cm培养皿。用含有10%FBS的10 mL DMEM洗涤收获的骨髓细胞并计数。将小鼠骨髓细胞悬浮液以 1×10^7 /mL细胞的密度,加至培养板中,培养基含有50 ng/mL重组TPO,在5%CO₂培养箱中37 °C孵育3 d。胰酶消化,收集巨核细胞,加入APC-CD41抗体4 °C孵育30 min,用预冷的70%乙醇4 °C固定过夜。200×g离心5 min,1 mL PBS重悬细胞,200×g室温离心5 min。弃上清后用1 mL PI/Triton X-100(含RNase A)将细胞沉淀重悬,室温孵育30 min,流式细胞仪分析CD41阳性细胞群并统计倍体。

1.3 统计学分析

使用SPSS19.0进行数据统计学分析,数据以均数±标准差表示。组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$

表示差异有统计学意义。所有实验都至少经过3次重复。

2 结果

2.1 血小板特异性Rictor敲除小鼠模型的生成

子代小鼠2周龄时提取小鼠尾部组织DNA进行PCR实验,鉴定小鼠基因型(图1A)。结果显示,敲除小鼠在图A上半部分PF4基因电泳结果中有明亮条带,而对照小鼠则没有;在图A下半部分Rictor基因电泳结果中,敲除小鼠和对照小鼠在500 bp位置靠上部分有明亮条带。蛋白质印迹结果表明,Rictor-KO小鼠的血小板中Rictor表达显著降低(图1B)。灰度分析结果显示Rictor-KO小鼠血小板中的Rictor水平明显低于Rictor-Con小鼠血小板($P < 0.001$,图1C)。蛋白印迹结果显示Rictor-KO小鼠中Akt磷酸化水平降低($P < 0.001$,图1B、D)。与Rictor-Con小鼠相比,Rictor-KO小鼠血液中PLT值减少($P < 0.05$,图1E),敲除小鼠血小板数目显著减少。

2.2 Rictor敲除降低小鼠对血栓形成的易感性

尾出血时间实验检验凝血功能,结果显示,Rictor-KO小鼠的平均tBT远高于Rictor-Con小鼠($P < 0.05$,图2A)。对小鼠构建下腔静脉血栓阻滞模型,48 h后收取样本(图2B)。与同窝对照小鼠相比,Rictor-KO小鼠形成的血栓长度更短,血栓质量更轻($P < 0.05$,图2C、D)。

2.3 PF4-Rictor小鼠血小板功能严重受损

与对照组血小板相比,Rictor敲除血小板对ADP和凝血酶反应减弱($P < 0.01$,图3A、B)。血小板处于静息状态下时,与对照组相比,Rictor-KO小鼠中整合素 α IIb β 3(图3C)和CD62P(图3D)的表达并无变化。血小板经凝血酶处理后,在Rictor-KO小鼠中整合素 α IIb β 3的活化($P < 0.01$,图3E)和CD62P的表达减弱($P < 0.05$,图3F)。进一步检测Rictor敲除对血小板伸展的影响,结果显示Rictor敲除抑制了血小板在胶原表面上伸展($P < 0.01$,图3G)。ELISA试剂盒测定血浆中PF4水平,与对照小鼠相比,Rictor-KO小鼠的PF4水平降低($P < 0.05$,图3H)。

2.4 Rictor缺失减少巨核细胞数目

Rictor敲除小鼠骨髓中巨核细胞数量显著减少($P < 0.01$,图4A)。用APC-CD41抗体孵育敲除和对照小鼠的巨核细胞,流式细胞术检测巨核细胞倍体,结果表明,与对照小鼠相比,Rictor-KO小鼠巨核细胞倍体降低,成熟的巨核细胞数目减少($P < 0.05$,图4B)。此外,透射电镜结果表明Rictor-KO小鼠的前血小板平均面积减小($P < 0.01$,图4C)。

3 讨论

本研究首先构建了血小板Rictor敲除小鼠,

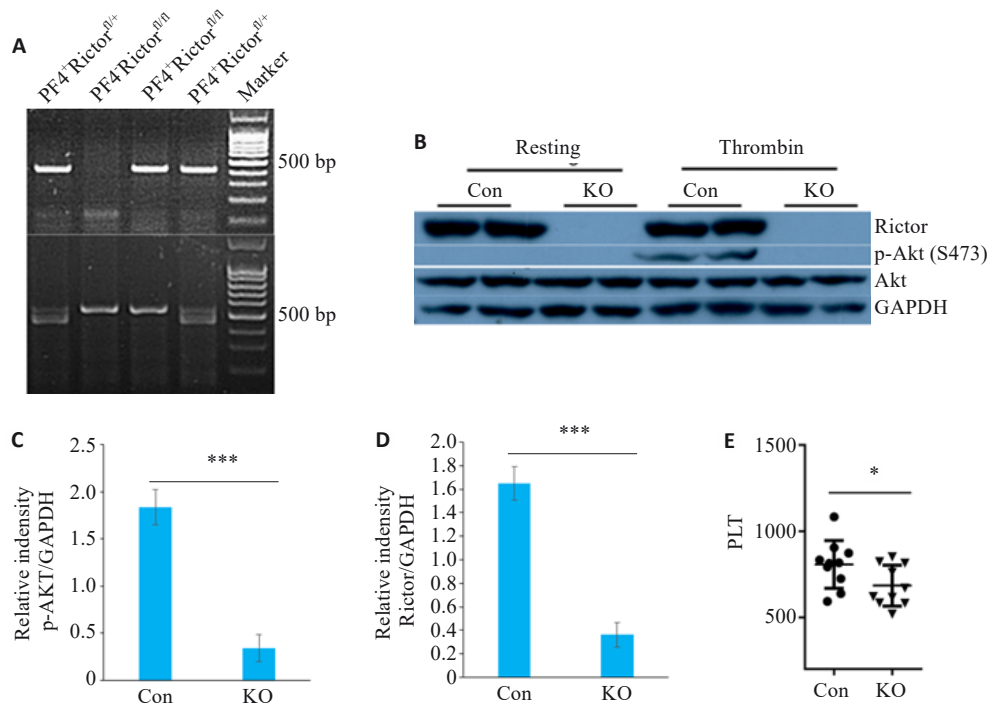


图1 血小板特异性Rictor敲除小鼠模型的生成

Fig. 1 Generation of platelet-specific Rictor knockout (KO) mouse models. A: Genotyping results. B: Immunoblotting for Rictor, Akt, and p-Akt (S473) in the platelets. C, D: Gray scale of Rictor (C) and p-Akt (D) measured by Image J. E: Platelet counts of control and KO mice. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

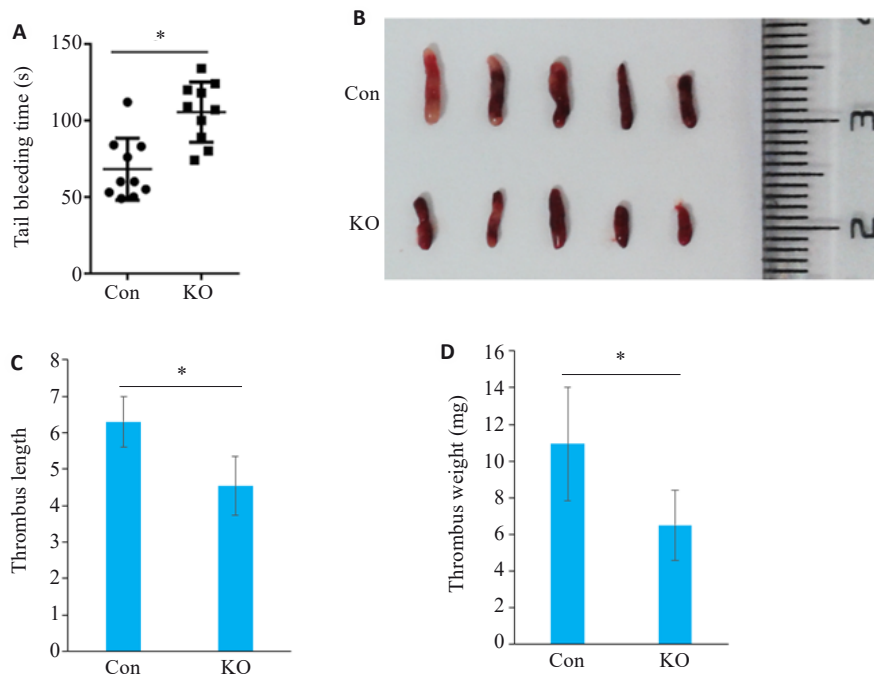


图2 Rictor敲除降低小鼠对血栓形成的易感性

Fig. 2 Rictor deletion reduces susceptibility to thrombosis in mice. A: Average tail bleeding time of Con and KO mice ($n=10$). B-D: Images (B), lengths (C), and weights (D) of thrombus from Con and KO mice. * $P < 0.05$.

Western blotting 和 PCR 的结果显示 Rictor 敲除效果显著, AKT 磷酸化水平和血清中血小板含量均显著降低。这说明 Rictor 敲除后会影 响 mTORC2 活性, 从而进一

步影响 mTORC2 对 AKT 磷酸化的调控。另外, 敲除小鼠的尾出血时间延长, 静脉血栓模型所形成的血栓长度和重量均有所减少。这说明血小板 Rictor 敲除已经影

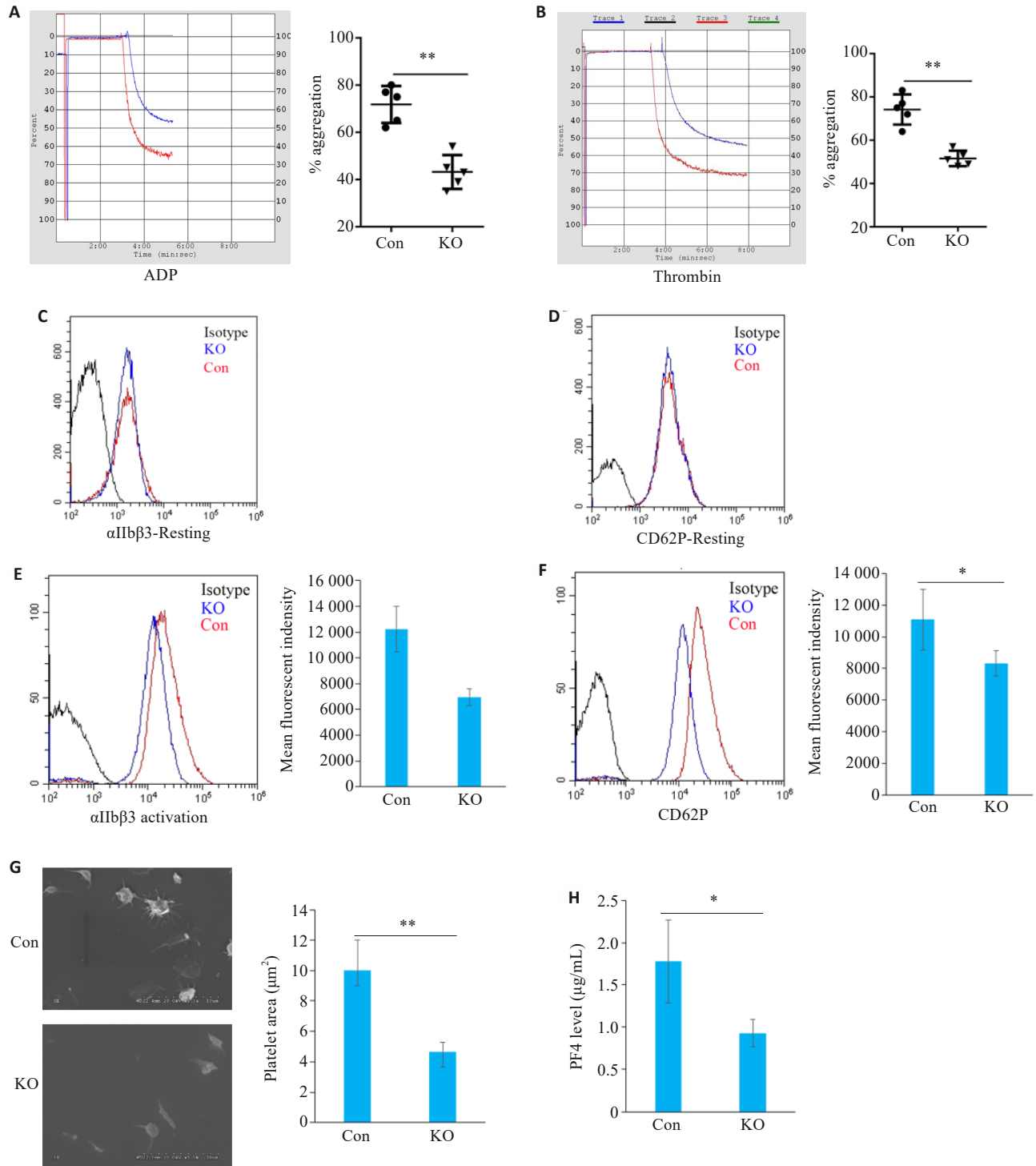


图3 PF4-Rictor小鼠血小板活化功能缺陷

Fig3 PF4-Rictor mice exhibit severe deficiency in platelet function. **A, B**: Platelet aggregation induced by ADP (**A**) and thrombin (**B**) in PRP. **C-D**: FACS analysis of α IIb β 3 (**C**) and CD62P (**D**) in resting platelets. **E, F**: FACS analysis of α IIb β 3 (**E**) and CD62P (**F**) in platelets pretreated with thrombin. **G**: Platelet spreading on fibrinogen. **H**: ELISA analysis of plasma PF4 levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

响了血小板活性,从而对凝血功能产生了影响。通过对血小板的功能进行检测,结果显示Rictor敲除的血小板对ADP和凝血酶的反应减弱,整合素 α IIb β 3和CD62P表达降低,在胶原表面的伸展亦受到抑制。PF4作为血小板的分泌物,其血浆中水平也显著降低。这说明Rictor敲除的血小板其聚集、伸展和分泌等功能均受到抑制。

进一步的vWF染色和巨核细胞倍体检测结果表明,Rictor敲除小鼠的骨髓中巨核细胞数量减少,巨核细胞倍体和血小板平均面积也显著降低。这说明敲除小鼠的血小板降低的原因,一是能够产生血小板的巨核细胞数量减少,二是巨核细胞能够产生的血小板的数目和质量降低,二者共同造成了血小板活性和数量的降低。

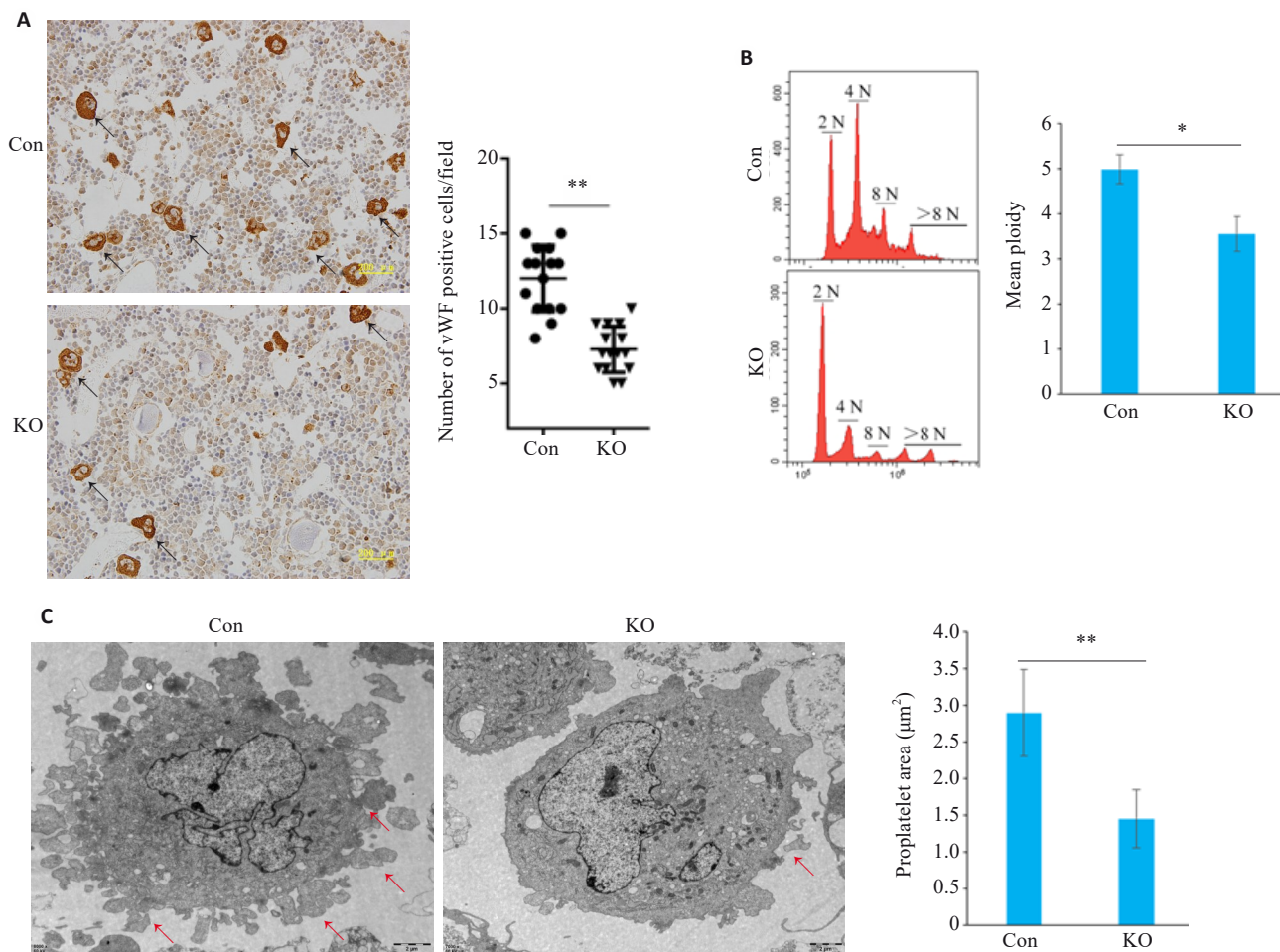


图4 Rictor 缺失抑制巨核细胞成熟

Fig.4 Rictor deletion inhibits megakaryocyte maturation. A: vWF staining of femoral bone sections from Con and Rictor-KO mice (Scale bar=200 μ m). B: Ploidy formation of 3-month-old Con and KO mice. C: Ultrastructure and proplatelet formation of megakaryocytes from Con and KO mice (Scale bar=2 μ m). * P <0.05, ** P <0.01.

已有研究表明,小鼠 Rac1 和 Cdc42 均敲除导致血小板减少症^[21],提示 mTORC2 对巨核细胞分化是不可或缺的。这些数据说明,Rictor 可能与巨核细胞有丝分裂和血小板生成有关。我们的结果也显示,Rictor 敲除小鼠的巨核细胞的数目减少,导致血小板生成降低。敲除小鼠中巨核细胞的数目减少,可能是由于细胞生长受到抑制或者细胞凋亡水平升高导致的。Zhang^[22]等研究发现,巨噬细胞特异性敲除 Rictor 小鼠,表现出细胞凋亡增加。提示巨核细胞 Rictor 敲除后,成熟巨噬细胞细胞减少,也可能是由于细胞凋亡引起的。mTORC1 调节细胞增殖、凋亡等行为,Rictor 缺失导致的 mTORC2 活性降低,是否负反馈影响了 mTORC1 活性,降低了巨核细胞的增殖能力,仍有待进一步验证。

Akt/PKB 是 PI3K 激活的关键酶,丝氨酸 473 位点被 mTORC2 磷酸化,可激发 Akt 的完全的酶活性^[23]。我们的结果表明,当使用凝血酶处理血小板时 Akt 磷酸化受到显著抑制,这表明 Rictor 在血小板活化过程中起关键作用,敲除 Rictor 使得血小板对 ADP 和凝血酶的

反应减弱。血小板伸展依赖于整合素 α IIB β 3 介导的 outside-in 信号通路驱动的细胞骨架重组^[24]。已有文献报道,mTORC2 通过促进蛋白激酶 Ca(PKC α)磷酸化和 RhoA 和 Rac1 的 GTP 负载来控制肌动蛋白细胞骨架^[25,26]。mTOR 介导 Rac1 活化对血小板扩散和聚集很重要^[27,28]。血小板活化依赖整合素 α IIB β 3 的构象变化^[29]。我们的研究结果显示 Rictor 敲除导致血小板整合素 α IIB β 3 和 CD62P 表达水平降低,提示 Rictor 敲除抑制了血小板的肌动蛋白重排和细胞骨架重组,进而抑制了血小板的增殖。Sin1 缺乏会破坏血小板中 mTORC2 复合物的完整性并延长止血时间^[30]。Rictor 敲除减缓了血小板伸展,并导致血小板聚集不稳定,这表明 mTORC2 可能通过 α IIB β 3 介导的 outside-in 信号通路促进血栓形成。巨核细胞数量和倍体减少从源头上减少了血小板的生成,前血小板的面积减小则提示我们生成的前血小板的生理状态并不良好。总之,敲除血小板 Rictor 导致小鼠凝血止血功能减弱、血栓形成受到抑制,其原因一方面在于敲除 Rictor 抑制了血小板的聚

集、分泌等细胞功能,使血小板的活化受到抑制,另一方面在于敲除 Rictor抑制了血小板的来源,即巨核细胞的成熟与生产血小板。

尽管本研究缺乏相关的临床样本验证,Tang^[30]等发现,人源血小板活化时,细胞中 Akt/mTORC2 活性升高,提示通过敲除 Rictor降低 mTORC2 活性,可能是抑制血小板活化的新靶点。进一步获取血栓病人的血液样本,验证血小板中的 Rictor 蛋白水平,将为靶向 Rictor 抑制血小板活化提供更为直接的证据。

本研究证明了 Rictor 在控制血小板活性及血栓形成方面的功能。虽然未能深入阐明 Rictor 缺失引起血小板活性降低及血栓形成减弱的分子机制,但我们已经确定 Rictor 在血小板活化及血栓形成过程中起重要作用。这项研究结果可能对治疗血管栓塞性疾病具有重要意义。

参考文献:

- [1] Næss IA, Christiansen SC, Romundstad P, et al. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study[J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(4): 692-9.
- [2] Camerer E, Kolstø AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation[J]. *Thromb Res*, 1996, 81(1): 1-41.
- [3] Rojnuckarin P, Kaushansky K. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 154-61.
- [4] Cramer EM, Norol F, Guichard J, et al. Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand[J]. *Blood*, 1997, 89(7): 2336-46.
- [5] Flaumenhaft R. A new story ARC for α -granule formation[J]. *Blood*, 2015, 126(2): 123-4.
- [6] Jr IJE. Unraveling mechanisms that control platelet production[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2013, 39(1): 15-24.
- [7] Junt T, Schulze H, Chen Z, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow[J]. *Science*, 2007, 317(5845): 1767-70.
- [8] Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE, et al. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP[J]. *Blood*, 2006, 107(7): 2736-44.
- [9] Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, et al. Platelets generated *in vitro* from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional[J]. *Blood*, 1995, 85(2): 402-13.
- [10] Brown EJ, Beal PA, Keith CT, et al. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP *in vivo*[J]. *Nature*, 1995, 377(6548): 441-6.
- [11] Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, et al. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(4): 1432-7.
- [12] Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton[J]. *Curr Biol*, 2004, 14(14): 1296-302.
- [13] Dada S, Demartines N, Dormond O. mTORC2 regulates PGE2-mediated endothelial cell survival and migration[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(4): 875-9.
- [14] Albert V, Hall MN. mTOR signaling in cellular and organismal energetics[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 55-66.
- [15] Wang SC, Wang JL, Wang SW, et al. mTOR signaling pathway in bone diseases associated with hyperglycemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9198.
- [16] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-101.
- [17] Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(11): 1122-8.
- [18] 尹承龙, 劳学军. PI3K-AKT-mTOR 信号通路的研究进展[J]. *中国医学创新*, 2016, 13(1): 145-8.
- [19] 宋晓红, 刘明明. mTOR 信号通路及相关疾病的研究进展[J]. *微循环学杂志*, 2018, 28(3): 64-70.
- [20] Fuhler GM, Tyl MR, Olthof SG, et al. Distinct roles of the mTOR components Rictor and Raptor in MO7c megakaryocytic cells[J]. *Eur J Haematol*, 2009, 83(3): 235-45.
- [21] Pleines I, Dütting S, Cherpokova D, et al. Defective tubulin organization and proplatelet formation in murine megakaryocytes lacking Rac1 and Cdc42[J]. *Blood*, 2013, 122(18): 3178-87.
- [22] Zhang XY, Evans TD, Chen S, et al. Loss of macrophage mTORC2 drives atherosclerosis *via* FoxO1 and IL-1 β signaling[J]. *Circ Res*, 2023, 133(3): 200-19.
- [23] 张浩, 包新杰, 代从新, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在无功能垂体腺瘤中的研究进展[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(47): 3874-6.
- [24] Chen X, Zhang Y, Wang YH, et al. PDK1 regulates platelet activation and arterial thrombosis[J]. *Blood*, 2013, 121(18): 3718-26.
- [25] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology[J]. *Nature*, 2002, 420(6916): 629-35.
- [26] Hervieu A, Heuss SF, Zhang C, et al. A PI3K- and GTPase-independent Rac1-mTOR mechanism mediates MET-driven anchorage-independent cell growth but not migration[J]. *Sci Signal*, 2020, 13(637): eaba8627.
- [27] Vidal C, Geny B, Melle J, et al. Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin[J]. *Blood*, 2002, 100(13): 4462-9.
- [28] Aslan JE, McCarty OJT. Rho GTPases in platelet function[J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(1): 35-46.
- [29] Joo SJ. Mechanisms of platelet activation and integrin α IIb β 3[J]. *Korean Circ J*, 2012, 42(5): 295-301.
- [30] Tang ZH, Shi H, Chen CM, et al. Activation of platelet mTORC2/akt pathway by anti- β 2GP1 antibody promotes thrombosis in antiphospholipid syndrome[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2023, 43(10): 1818-32.

(编辑:吴锦雅)