



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104087552 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201410199316. 8

A61K 35/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 12. 04

A61P 7/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

08305881. 8 2008. 12. 04 EP

(62) 分案原申请数据

200980153619. 3 2009. 12. 04

(71) 申请人 国家医疗保健研究所

地址 法国巴黎

申请人 雷卡尔巴黎大学

巴黎公共救济院

凡尔赛大学

(72) 发明人 D·巴吕什 E·克拉梅尔-博尔德

C·迪努瓦-拉德

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

C12N 5/078 (2010. 01)

C12M 1/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书16页 附图9页

(54) 发明名称

用于制备血小板的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于由成熟巨核细胞制备血小板的方法。更具体地,本发明涉及用于由成熟巨核细胞制备血小板的体外方法,所述方法包括使成熟巨核细胞悬浮液在涂覆有血管性血友病因子的固相上经历最小剪切率为 600s^{-1} 的流动。

1. 用于制备血小板的体外方法,包括使成熟巨核细胞的悬浮液在涂覆有血管性血友病因子(VWF)或其结合 GPIb 的片段或变体或类似物的固相上经历剪切率至少为 600s^{-1} 的流动。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述 VWF 的片段或变体或类似物选自下组:VWF 的 52/48-kDa 胰蛋白酶片段;金黄色葡萄球菌 V-8 蛋白酶消化的 VWF;用于治疗用途的 VWF 浓缩物和引起 2N 型血管性血友病的 VWF 突变体。

3. 通过权利要求 1 或 2 定义的方法可获得的血小板。

4. 根据权利要求 3 的血小板,其用于治疗。

5. 根据权利要求 3 或 4 的血小板,用于治疗血小板计数减少障碍。

6. 根据权利要求 5 的血小板,其中所述血小板计数减少障碍选自下组:自身免疫性血小板减少症、与生成减少有关的血小板减少症和与血小板破坏的增加有关的血小板减少症。

7. 根据权利要求 3 的血小板用于诊断目的用途。

8. 用于制备血小板的装置,包括流体室,所述流体室包括涂覆有 VWF 或其结合 GPIb 的片段或变体或类似物的固相。

用于制备血小板的方法

[0001] 本申请是申请日为 2009 年 12 月 04 日和发明名称为“用于制备血小板的方法”的 200980153619.3 号发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于由成熟巨核细胞制备血小板的方法。

背景技术

[0003] 巨核细胞 (MK) 分化是以顺序的步骤为特征的连续过程。MK 倍性通过核内有丝分裂增加,同时细胞大小平行增大。储存细胞器和质膜的合成增加,导致分隔膜的形成。胞质成熟与 MK 大小的显著增加相关。最后,成熟 MK 经历微管参与的完全细胞骨架重组,来诱导相当于前血小板 (proplatelet) 的伪足伸长 (Patel 等人,2005a ;Richardson 等人,2005)。血小板从这些包含所有血小板细胞器的前血小板的尖端释放。

[0004] 循环血小板通过粘附于血管壁和通过将第一层粘附血小板聚集到内皮下基质参与血栓形成 (Ruggeri,2003)。血管性血友病因子 (Von Willebrand factor) (VWF) 是内衬于脉管系统中的内皮细胞的主要组分。VWF 是能够在高剪切率 ($> 1000s^{-1}$) 条件中抑留循环血小板的唯一蛋白。系留的血小板通过 GPIb (又名 CD42b) 与 VWF A1 结构域的结合转位到固定基质 VWF 上 (Huizinga 等人,2002)。在血小板的瞬时系留过程中进行性发生的 $\alpha IIb \beta 3$ 整联蛋白 (又名 CD41a/CD61) 的活化包括 GPIb-介导的信号传导并使得 $\alpha IIb \beta 3$ 结合 VWF 的 RGD 序列。巨血小板综合症 (BSS) 是以严重的血小板减少和巨血小板为特征的出血性障碍 (Nurden,2005)。这是由于 GPIb-IX-V 复合物,特别是包含 VWF 结合位点的 GPIb α 亚基,的数量上或性质上的异常。在 BSS 病人的骨髓中发现正常数目的 MK,提示在该情况中观察到的巨血小板减少症与 MK 的缺陷血小板形成有关。

[0005] 由于不是经常在骨髓隙中观察到 MK 破碎成血小板, MK 需要迁移入骨髓毛细血管中 (Tavassoli 和 Aoki,1981)。血小板与前血小板脱离已在缺少流动条件的情况下描述。有趣的是,从在促血小板生成素 (TPO) 存在的情况下培养的 MK 脱落的小血小板产量远低于在最佳成熟条件中可能预期的产量 (Norol 等人,1998)。血小板脱落的许多步骤仍然是难以捉摸的。特别是从来没有证明剪切力对血小板形成的作用。VWF 受体 GPIb 和 $\alpha IIb \beta 3$ 都是在成熟过程中在 MK 表面上表达 (Debili 等人,1990)。少数成熟 MK 已经在血液循环中被识别 (Pedersen,1978 ;Tavassoli 和 Aoki,1981),其中它们暴露于在内皮细胞的内腔侧上的 VWF。

[0006] 而且,有趣的是,在最佳的 MK 培养条件下,脱落的小血小板的体外产量远低于可以由体内大的血小板日产生量预期的产量。因此,非常需要制备血小板的良好体系。

发明内容

[0007] 本发明涉及用于由成熟巨核细胞制备血小板的体外方法,所述方法包括使成熟巨核细胞的悬浮液在涂覆有血管性血友病因子的固相上经历剪切率至少为 $600s^{-1}$ 的流动。

[0008] 发明详述

[0009] 定义：

[0010] 如本发明所使用的，术语“血小板”表示参与导致形成血凝块的初级止血 (primary hemostasis) 的细胞机制的由细胞衍生的无核胞质体。

[0011] 如本发明所使用的，术语“前血小板”表示可导致血小板形成的巨核细胞或其片段的任何结构形式，例如胞质连接的血小板样颗粒。所述结构形式包括但不限于具有长的胞质延伸、突出或伪足的细胞，所述延伸、突出或伪足包含包括在各形成阶段的血小板体的膨大，例如，节结、水泡等。

[0012] 如本发明所使用的，术语“巨核细胞”表示负责产生正常止血所需的血小板的骨髓细胞。巨核细胞源自骨髓中的造血干细胞前体细胞。巨核细胞生成的原始信号是促血小板生成素或 TPO。TPO 对于诱导骨髓中的祖细胞向最终巨核细胞表型的分化是必需的。用于巨核细胞分化的其他分子信号包括 GM-CSF、IL-3、IL-6、IL-11 和促红细胞生成素。

[0013] 如本发明所使用的，术语“成熟巨核细胞”表示以稳定方式表达 GPIb 和 α IIb β 3 表面标志物的巨核细胞的群体。如本发明所使用的，表面标志物的“稳定方式表达”表示在细胞群体中，至少 70% 的细胞表达这些表面标志物。

[0014] 如本发明所使用的，术语“剪切率”表示用于表征层流的参数。在管中，层流具有抛物线流速特征，相邻流动层的渐增的流速在腔轴处达到最大值。在相邻层中径向速率增加率定义为剪切率。在平行板腔中，剪切率由公式 (γ) 给出，并对应于流动物料中的速度梯度。用于剪切率的 SI 计量单位是 s^{-1} ，表示为“倒易秒”或“倒数秒”。剪切率的公式 (γ) 是：

$$[0015] \quad \gamma = f(k)6Q/ab^2$$

[0016] 其中 γ 是剪切率 (以 s^{-1} 计)， Q 是流速 (ml/s)， a = 狭缝宽度 (cm)， b = 狭缝高度 (cm) 和 $f(k)$ 是该系统的物理参数的函数。例如，使用来自马斯特里赫特仪表 (Maastricht Instrumentation) 的流体室 (描述在 (Legendre 等人, 2006) 中)，对于剪切率 $> 100s^{-1}$ ， $f(k)$ 等于 1.03。因此，可以通过控制流速和腔室的狭缝高度来调节剪切率。

[0017] 在人体血液循环中，剪切率在最大静脉中的 $30-40s^{-1}$ 到微血管循环中的 $5000s^{-1}$ 之间变化。

[0018] 如本发明所使用的，术语“血管性血友病因子”或“VWF”表示由参与止血的几种单体组成的多聚体蛋白。人血管性血友病因子的示例性氨基酸序列可以在 GenPept 数据库中以登录号 AAB59458 找到。优选本发明的血管性血友病因子是哺乳动物血管性血友病因子，更优选鼠科动物因子或灵长动物因子，更优选人血管性血友病因子。术语“VWF”包括任何哺乳动物来源的 VWF，例如灵长动物 VWF，优选人 VWF。也可以是重组 VWF。本领域技术人员可根据本领域的标准技术容易地制备重组 VWF。

[0019] 根据本发明，VWF 因子可以是重组 VWF 或天然 VWF。在以其天然形式存在时，其可被纯化或可被包含在含有其他组分的组合物中 (例如在细胞外基质中)。

[0020] 还包括 VWF 的片段、VWF 的变体和 VWF 的类似物，其中所述片段、变体和类似物具有结合 GPIb 的能力。VWF 的片段、变体和类似物可以包括，但不限于：VWF 的 52/48-kDa 胰蛋白酶片段 (Fujimura 等人, 1986)；金黄色葡萄球菌 V-8 蛋白酶消化的 VWF (Girma 等人, 1986a；Girma 等人, 1986b)；用于治疗用途的 VWF 浓缩物 (Federici, 2005；Goudemand 等人,

2005 ;Houdijk 等人,1986) 如 Haemate-P/Humate-P(来自 Behring)、Wilfactin(来自 LFB ; 参见 (Goudemand 等人,2005)) 和 Immunate(Baxter, Vienna, Austria) ;以及引起 2N 型血管性血友病的 VWF 突变体 (其在因子 VIII 结合方面存在缺陷)。

[0021] 如本发明所使用的,术语“血小板计数减少障碍”表示血小板生成的问题或导致血小板的低浓度的血小板降解增加或因处于正常范围的血小板的异常功能导致的问题。如本发明所使用的,“血小板的低浓度”表示浓度低于 150000 个血小板 /mm³。根据本发明,血小板计数减少障碍包括但不限于自身免疫性血小板减少症、与生成减少有关血小板减少症 (中心起源) 和与任何原因的破坏增加有关血小板减少症 (外周起源)。

[0022] 如本发明所使用的,术语“受试者”表示哺乳动物,例如啮齿类动物、猫科动物、犬科动物和灵长类动物。优选本发明的受试者是人。

[0023] 用于制备血小板的方法和装置 :

[0024] 本发明涉及用于制备血小板的体外方法,所述方法包括使成熟巨核细胞的悬浮液在涂覆有血管性血友病因子的固相上经历剪切率至少为 600s⁻¹ 的流动。

[0025] 在优选的实施方式中,该流动的剪切率至少为 800s⁻¹、优选至少为 1000s⁻¹、优选至少为 1200s⁻¹、优选至少为 1400s⁻¹、更优选至少为 1600s⁻¹、至少为 1800s⁻¹ 或者至少为 2000s⁻¹。

[0026] 典型地,该流动的剪切率不超过血小板在体内可能经受的生理剪切率。典型地,所述剪切率不超过 6000s⁻¹、优选不超过 4000s⁻¹、更优选不超过 3000s⁻¹。

[0027] 在一个实施方式中,成熟巨核细胞的悬浮液呈现 0.5×10⁶ 到 4×10⁶/mL, 优选至少 1×10⁶/mL, 优选至少 2×10⁶ 细胞 /mL, 更优选至少 4×10⁶/mL 的细胞浓度。

[0028] 典型地,成熟巨核细胞的悬浮液包含悬浮在适当的细胞培养基中的巨核细胞群体。在一个实施方式中,所述细胞培养基是 Iscove's Modified Dulbecco's 培养基 (IMDM)。

[0029] 成熟巨核细胞的悬浮液可以在从血液样品或者骨髓样品分离后获得。或者,可在适当条件下使用稳定的巨核细胞细胞系 (例如 DAMI (Greenberg 等人,1988), Meg-01 (Isakari 等人,2009), UT7/TPO (Barroga 等人,2008)) 的悬浮液。根据本发明,成熟巨核细胞悬浮液经历 600s⁻¹ 的剪切率,持续足以产生血小板的处理时间。典型地,所述处理时间可以为 10 分钟到 2 小时,典型地为 15 分钟到 1 小时,更优选地为 15 分钟到 30 分钟。在优选的实施方式中,所述处理时间为约 20 分钟。

[0030] 在具体的实施方式中,固相通过与血管性血友病因子或者其片段或变体或类似物的溶液一起孵育而涂覆。

[0031] 用于涂覆固相的 VWF 的浓度通常为 5 到 100 μ g/mL。在优选的实施方式中,VWF 的浓度是 20 μ g/mL。

[0032] 在一个实施方式中,该固相涂覆有选自下组的片段或者变体或者类似物 :VWF 的 52/48-kDa 胰蛋白酶片段、金黄色葡萄球菌 V-8 蛋白酶消化的 VWF、用于治疗用途的 VWF 浓缩物和重组野生型 VWF 或引起 2N 型血管性血友病的 VWF 突变体。

[0033] 用于由成熟巨核细胞制备血小板的方法可以在流体室中进行,其中所述流体室包括涂覆有 VWF 或者其片段或变体或类似物的底壁,其中所述其片段、变体或类似物结合 GPIIb。

[0034] 本发明也涉及用于由成熟巨核细胞制备血小板的装置,所述装置包括流体室,所

述流体室包括涂覆有 VWF 或者其片段或变体或类似物的底壁,其中所述其片段、变体或类似物结合 GPIb。

[0035] 在优选的实施方式中,所述流体室由矩形腔构成。

[0036] 在进一步的实施方式中,所述流体室的底部是涂覆有本发明的因子的盖玻片。

[0037] 在进一步的实施方式中,用于制备血小板的流体室是在 (Mekrache 等人,2002) 和 (Legendre 等人,2006) 中描述的腔室。

[0038] 在另一个实施方式中,所述流体室是微流体流动系统例如玻璃微毛细管 (Kauskot 等人,2007),或微流体生物芯片和流量传感器 (Robinson 等人,2008;Williams 等人,2002),或任何其他类型的微流体流动系统(例如参见 Conant 等人,2009)。

[0039] 有利地,适合于本发明的一些流体室允许在无菌条件下工作(例如参见 Williams 等人,2002 和 Conant 等人,2009)。在优选的实施方式中,所述流体室是无菌的。

[0040] 在进一步的实施方式中,剪切率由于流体室中的电泵而获得。

[0041] 血小板和药物组合物 :

[0042] 作为另一目的,本发明涉及由上述方法可获得的血小板。

[0043] 作为本发明的进一步的目的,由上述方法可获得的血小板可用于制备药物组合物。

[0044] 因此,本发明也提供含有本发明的血小板的药物组合物。通常所述药物组合物可包含一种或多种药学可接受的和/或被认可的载体、添加剂、抗生素、防腐剂、佐剂、稀释剂和/或稳定剂。这种辅助物质可以是水、盐水、甘油、乙醇、润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。适合的载体通常是大的、缓慢代谢的分子例如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚二醇酸、聚合的氨基酸、氨基酸共聚物、脂质聚集体等。该药物组合物可以含有额外的添加剂,例如甘露醇、右旋糖酐、糖、甘氨酸、乳糖或聚乙烯吡咯烷酮,或者其他的添加剂,例如抗氧化剂或惰性气体、稳定剂或适于体内施用的重组蛋白(例如人血清白蛋白)。

[0045] 如本文中所使用的,术语“药学可接受的”意指当适当地施用于哺乳动物(特别是人)时,不会产生不利的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合物。药学可接受的载体或赋形剂意指无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或任何类型的制剂辅料。

[0046] 而且,本发明血小板和本发明药物组合物可用于治疗血小板计数减少症障碍,特别是血小板减少症和血小板病。例如,由本发明方法可获得的血小板可以以有效量输入患有血小板生成障碍的受试者中。

[0047] 在优选的实施方式中,血小板计数减少障碍可选自自身免疫性血小板减少症、与生成减少有关血小板减少症(中心起源)或与任何原因的破坏增加有关血小板减少症(外周起源)。

[0048] 本发明的相关方面涉及用于治疗患有血小板计数减少症障碍的受试者的方法,所述方法包括将有效量的本发明血小板(或其群体或其药物组合物)给药于受试者的步骤。

[0049] 在本发明的情况中,如本文所使用的术语“治疗”或“疗法”意指目的在于延迟或防止病理发作、在于逆转、缓解、抑制、延缓或停止病理症状的发展、加重或恶化、在于导致病理症状的改善和/或在于治愈病状的方法。

[0050] 如本文所使用的,术语“有效量”意指足以实现预定目的的本发明血小板(或其群体或其药物组合物)的任何量。

[0051] 有效剂量和给药方案可以基于受试者的病理性质通过良好的医疗实践容易地确定,并取决于许多因素,包括但不限于:病理症状的程度和所关注的组织或器官的损伤或退化程度,以及受试者的特征(例如,年龄、体重、性别、总体健康等)。

[0052] 为了治疗,本发明的血小板和药物组合物可以通过静脉内给药而全身性施用。给药剂量和次数可以由本领域技术人员以已知方式优化。

[0053] 而且,本发明的血小板可用于诊断目的。它们可作为用于血小板功能标准化的正常对照。

[0054] 血小板功能测试要求来自正常个体和感染个体的天然功能性状态下的新鲜血液血小板。血管性血友病是出血性疾病的最常见的单一原因。另外,高达50%的皮肤粘膜出血性疾病由血小板功能障碍所引起。血小板功能测试的标准化要求实验室应该对所进行的每批血小板功能测试进行正常对照。然而,通过静脉穿刺的连续常规血液采样引起几种健康担忧和伦理问题。血小板功能的实验室评估包括透光率集合度测定(light transmittance aggregation)和ATP释放试验、糖蛋白试验、电子显微术、促凝血功能测试、遗传测试(Pai和Hayward,2009)。

[0055] 因此本发明涉及用于诊断血小板障碍的方法,包括使用本发明的血小板以标准化血小板功能的步骤。

[0056] 通常,本发明的血小板可以由上述的巨核细胞细胞系获得。然后它们用于在体外诊断测试中标准化血小板功能。换言之,它们在测定血小板功能的体外诊断试验中用作阳性对照。

[0057] 通过以下实施例、附图和表格进一步说明本发明。

附图说明

[0058] 图1:在高剪切率、抑制剂的作用和粘性表面下前血小板形成的定量。将悬浮在IMDM中的细胞以 1800s^{-1} 在VWF上灌流10min,然后将单独IMDM灌流10min。粘附导致大的细胞形状变化并导致前血小板形成。图A显示与未变形的MK相比(阶段1),在前血小板和血小板释放之前的剪切条件下MK变形的两个阶段;早期变形以细胞质延伸为特征(阶段2);阶段3包括MK的后期变形,具有细胞极或两端的细胞骨架重组,连续的“成串珠”的长细丝,然后细胞破裂成细薄的区域。进一步暴露于剪切,所产生的血小板仍然与长细胞质血小板串或血小板双联体以及圆形血小板有关。定量化显示于图B中:(a),MK形状改变分为四类:1)转位的MK;2)早期变形的MK,丧失球形;3)晚期变形的MK和前血小板的延长;4)前血小板破碎和血小板形成。图b-f:相对于10个区域中计数的细胞总数,各类的细胞分布,随灌流时间变化。在不存在抑制剂的情况下,在VWF上灌流的脐血MK(图b)或骨髓MK(图c)的分布的改变。在GPIIb-VWF相互作用抑制剂,糖萼素(glycocalicin)的封闭抗体(图d)或抗-VWF MoAb(图e),的存在下脐血MK在VWF上的灌流显示对MK与VWF接触以及后续步骤的重大抑制,从而破坏前血小板的形成。阻断 $\alpha\text{IIb}\beta 3$ 和VWF的相互作用的阿昔单抗阻止前血小板和血小板形成(图f)。代表15个实验,比例尺代表 $10\mu\text{m}$ 。

[0059] 图2:在剪切或静态条件下粘附于VWF涂覆的盖玻片的脐血MK的光学显微外观。从流动体室中取出盖玻片并用PBS冲洗,然后在冰冷的甲醇中固定,随后进行罗曼诺夫斯基(Romanovsky)染色。在暴露于高剪切率下20min后,许多MK显示长和薄的前血小板延

伸,其方向与流动方向平行。单一的单极的、长的前血小板从在其末端具有出芽 (budding) 的细胞核心并沿着轴延伸 (左图)。作为高剪切率作用的对照,将 MK 沉积在 VWF 上并在静态条件下孵育 20min,除去非粘附细胞并用 IMDM 冲洗盖玻片。细胞显示球形形状,无任何前血小板延伸 (右图)。放大倍率 $\times 500$ 。

[0060] 图 3:微管在剪切诱导的前血小板形成中的作用。图 A:用抗微管蛋白抗体标记间接免疫荧光显示前血小板和血小板形成。将在涂覆有 VWF 的表面上暴露于 $1800s^{-1}$ 的剪切率的 MK 固定,并用鬼笔环肽 (左图) 和抗微管蛋白抗体 (右图) 染色。用共焦显微镜分析图像。没有看到肌动蛋白和微管蛋白之间的共定位。图 B:血小板脱落的 MK 延伸长和薄的前血小板,其具有血小板大小的膨胀末端。整个前血小板轴以及其尖端对微管蛋白进行标记。两个脱离的细胞片段显示特征性的微管蛋白标记:其勾勒出哑铃形的前血小板及其中心窄化,而血小板大小的片段显示圆形的标记模式。图 C:微管抑制剂对前血小板的作用。前血小板延伸的逆转通过微管蛋白的解体表征。

[0061] 图 4:暴露于导致血小板形成的高剪切率的 MK 超微结构。流出的细胞悬浮液直接从灌流室出口收获在固定剂中,并如方法部分中描述的进行处理以用于电子显微镜检查。使成熟 MK 伸长,从而延伸包围平行的纵向微管 (插入物) 的长的细胞质丝状伪足。这些前血小板显示包含胞质细胞器的规则膨大。大的球形细胞质碎片,也许是脱离的前血小板 (pp) 位于附近 (图 a)。含有致密染色质的核叶 (nuclear lobe) (N) 延长并位于细胞的一极。在流出物中收集通常不存在于 MK 培养基中的具有椭圆形的裸核和含有致密染色质的紧密核叶 (图 b)。填充有胞质细胞器的前血小板 (PP) 表现为大的细胞质碎片,无核,大致上是球形、哑铃形或伸长有细长的末端 (图 c 和 d)。观察到几个分离的血小板大小的片段 (P) (图 e)。比例尺代表 $2\mu m$ 。

[0062] 图 5:VWF 和高剪切率对前血小板形成的特异性。图 A:在静态条件 (上图) 和在高剪切率 (下图) 下形成前血小板的 MK 在 VWF 涂覆的盖玻片上的相衬图像。在静态条件中前血小板在 14h 后形成并在 16h 后最大,但在流动下仅需要 10min。图 B:甚至在没有活化的情况下 HUVEC 单层支持 MK 粘附 (上图),而 HUVEC 活化后观察到前血小板形成 (下图)。图 C:在剪切条件下在非 VWF 上的 MK 变形和前血小板的形成最少,如纤维蛋白原、纤维连接蛋白和胶原蛋白所示的。

[0063] 图 6:暴露于高剪切率的 MK 获得的血小板可被凝血酶激活。在静态条件下在纤维蛋白原粘附试验中分析暴露于高剪切率的 MK 流通 (flow-through) 中的细胞流出物,然后用共焦显微术分析,用鬼笔环肽-Alexa546 为细胞染色以可视化肌动蛋白以及用 Alexa488 为细胞染色以可视化 $\alpha IIb\beta 3$ 。由剪切暴露产生的 MK 源的血小板 (上图) 在不存在凝血酶 (左图) 的情况下或存在凝血酶 (右图) 的情况下粘附到纤维蛋白原上。非激活细胞显示弥漫性肌动蛋白染色和 $\alpha IIb\beta 3$ 膜定位。在凝血酶活化后,肌动蛋白丝组织为应力纤维。它们显示与在未暴露于剪切的独立试验中制备的洗涤血小板相似的细胞骨架组织 (下图)。比例尺代表 $10\mu m$ 。

[0064] 图 7:由凝血酶激活的释放的血小板表达 P-选择蛋白。由如图 6 的图例中所描述的由凝血酶激活或不激活细胞流出物并用流式细胞仪试验进行分析。用抗 -CD62P-FITC (FL1, P-选择蛋白) 和抗 -CD41-PE (FL2, αIIb) 标记样品。洗涤的血小板的 FSC-SSC 特征的设置用于分析流通细胞 (左上图 MK:暴露于剪切;左下图:洗涤的血小

板)。R1、R2 和 R3 区域中的 CD62P 和 CD41a 双阳性细胞的柱状图由不存在凝血酶（开放柱）或存在凝血酶（填充柱）的情况下的点图获得。仅凝血酶激活的样品含有 CD62P- 阳性细胞，而所有样品对 CD41a 都是阳性的（右上图）。流通中的激活血小板（R1）的柱状图，在存在凝血酶的情况下，用非免疫 IgG（细线，灰色背景）、抗 CD62P 或抗 -CD41a（粗线）标记后（右下图）。

[0065] 图 8 :MK 源的血小板在凝血酶活化后的超微结构改变。通过凝血酶激活或不激活细胞流出物，并通过电子显微镜进行研究。不存在凝血酶的情况下，血小板大小的碎片显示平滑表面并含有若干分散于整个细胞质的 α 颗粒 (A) 以及离散的 SCCS 潴泡（图 a）。存在凝血酶的情况下，血小板大小的碎片显示激活的血小板特征性的形态变化，即球形形状、表面伪足 (p)、SCCS 扩大潴泡内的致密材料、细胞质中没有粒形成以及微纤丝的中心束，暗示激活的血小板（图 b）。比例尺代表 $2\mu\text{m}$ 。

实施例

[0066] 材料和方法

[0067] 蛋白质

[0068] VWF 由 Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies(Lille, 法国) 赠送。纤维蛋白原来自 Hyphen BioMed(Neuville-sur-Oise, 法国)。人 VWF 和纤维蛋白原经纯化，且分别耗竭杂质纤维连接蛋白及纤维蛋白原和 VWF(Legendre 等人, 2006)。马腱胶原蛋白来自 Nycomed(Munich, Germany), 且人纤维连接蛋白来自 VWR(Fontenay-sous-Bois, 法国)。野生型和突变的 (V1316M2B 型) 重组 VWF(rVWF) 如另外 (Ajzenberg 等人, 2000) 所描述的获得。

[0069] 抗体

[0070] 单克隆抗体 (MoAb) 713, 其在瑞斯托菌素的存在下阻断 VWF 与 GPIIb α 的结合, 由 JP Girma 博士 (INSERM Unit770, Le Kremlin-Bicêtre, 法国) 惠赠 (Ajzenberg 等人, 2000)。多克隆抗糖萜素抗体, 包含 VWF 结合位点的 GPIIb α 胞外域, 由 MC Berndt 博士 (Monash University, Melbourne, Australia) 惠赠 (Cramer 等人, 1991)。藻红蛋白 (PE) 偶联的抗 -CD62P (P- 选择蛋白)、异硫氰酸荧光素 (FITC)- 偶联的抗 -CD41a (α IIb)、抗 -CD42b (GPIIb α) 和非免疫抗体来自 Beckman Coulter(Villepinte, 法国)。抗 - α 和 β - 微管蛋白 MoAb 来自 Amersham(Orsay, 法国)。抗 - β 3 整联蛋白 P37MoAb 由 Gonzalez-Rodriguez 博士 (CSIC, Madrid, Spain) 赠送 (Calvete 等人, 1991)。抗 - α IIb β 3Fab (C7E3) 阿昔单抗(Reopro®)来自 Lilly(Suresnes, 法国)。

[0071] 人巨核细胞

[0072] 用于该研究的人 MK 由从脐带血或骨髓分离的前体细胞培养。人骨髓样品（在臀部手术期间收获）和脐带血样品在经我们的学院伦理委员会 (Assistance Publique des Hôpitaux de Paris) 同意后并按照赫尔辛基宣言 (Declaration of Helsinki) 声明获得。人脐带血和骨髓 CD34+ 细胞通过免疫磁性技术 (StemCell Technologies, Grenoble, 法国) 如先前所述 (Fichelson 等人, 1999) 进行分离。细胞在补充有 15% BIT9500 血清替代物 (StemCell Technologies) 和 20nmol/L TPO 肽激动剂 AF13948 (Genosys-Sigma, Saint Quentin Fallavier, 法国) 的 Iscove' s Modified Dulbecco' s 培养基 (IMDM)

(Gibco-Invitrogen, Cergy-Pontoise, 法国) 中生长。在培养的第一天一次性加入 10ng/mL 干细胞因子 (SCF) (Amgen, Neuilly-sur-Seine, 法国)。在 TPO 存在下培养 10 到 16 天的 MK 完全成熟, 并且准备用于血小板生物发生 (Patel 等人, 2005a)。通过流式细胞计显示细胞表达 GPIb 和 α IIb β 3 (60-70% 阳性细胞)。对于剪切实验, 在第 10 天和第 16 天之间使用细胞。

[0073] 人血小板

[0074] 从在之前的两周时间内没有摄取任何药物的健康个体中获得血液。将血液吸入 pH5.8 的 15% (v/v) 的酸性柠檬酸葡萄糖 (acid citrate dextrose) (ACD) 中。在三磷酸腺苷双磷酸酶 (1U/mL) (Sigma) 和 ACD (1mL 用于 40mL) 存在下从分离的富含血小板的血浆 (PRP) 制备经洗涤的血小板 (Ajzenberg 等人, 2000)。简言之, 在洗涤后, 血小板再悬浮在含有 0.15% 牛血清蛋白 (BSA) 的 pH7.5 的 HEPES 缓冲液 (10mmol/L HEPES (N-[2-羟乙基] 哌嗪 -N'-[乙磺酸]), 136mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl 和 2mmol/L MgCl₂) 中。用电子颗粒计数器 (Model Z1, Coulter Electronics, Margency, 法国) 计数血小板, 且浓度调节到 1.5×10^8 血小板 /mL。

[0075] 小鼠巨核细胞和血小板

[0076] 使用 7-10 周大的野生型 C57BL/6J 小鼠。动物饲养和处置遵循制度规定。巨核细胞扩增并从冲洗骨髓中分离。简言之, 免疫磁性纯化的 Lin 细胞在存在 TPO-肽的情况下在适当的巨核细胞分化培养基中生长。培养 6 天后, 将成熟巨核细胞引入小型化流体室 (Conant 等人, 2009) 中并在固定的小鼠重组 VWF (Marx 等人, 2008) 上以高剪切率灌流。

[0077] 灌流研究

[0078] 使用由 Maastricht Instrumentation 获得的先前公开的流体室进行灌流研究 (Legendre 等人, 2006)。流体室由雕刻在有机玻璃 (plexiglas) 块中的 0.05mm 高、29mm 长和 5mm 宽的矩形空腔组成。该室的底部内衬有盖玻片, 该盖玻片在 4°C 下用在 Tris-缓冲盐水 (TBS, 25mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 150mmol/L NaCl) 中稀释的 VWF (20 μ g/mL) 涂覆过夜。在一些实验中, 测试另一种纯化的蛋白 (纤维连接蛋白、纤维蛋白原、胶原蛋白或 2B 型 -rVWF)。将在 IMDM 悬浮液 (2mL) 中的浓度为 $0.8-1 \times 10^6$ 细胞 /mL 的 MK 吸入 5mL 气密的玻璃微量注射器 (Exmine, Ito Corporation, Fuji, 日本) 中, 所述微量注射器通过延伸装置 (extension set) (Steritex, Codan, Lensahn, 德国) 与室连接。通过电动泵施加 225 μ L/min 的流速, 从而产生 $1800s^{-1}$ 的剪切率。细胞灌流 10min, 然后在相同剪切率下 IMDM 灌流 10min。所有的实验在利用 Minitüb 加热系统 (Minitüb Abfüll und Labortechnik, Tiefenbach, 德国) 维持的 37°C 下进行。在一些实验中, 细胞或盖玻片在灌流前用抗体预孵育 10min。在灌流结束时, 用冰冷的甲醇固定盖玻片 5min, 用蒸馏水洗涤, 干燥并染色。在室的出口处收集流出物用于进一步的研究, 包括凝血酶活化。

[0079] 视频显微镜系统

[0080] 灌流室置于倒置显微镜 (Axiovert135, Zeiss, 德国) 的夹片台上。用 CCD 照相机 (Sony, Tokyo, 日本) 显现细胞, 使用 20 \times Hoffman 调制对比度物镜。用连接到视频定时器 (video timer) (VTG, Tokyo, 日本) 上的数字图像记录仪 (Replay Software, Microvision Instruments, Evry, 法国) 进行连续记录。用 Histolab 或 Videomet 量化软件 (Microvision Instruments) 分析图像帧。

[0081] 细胞活化研究和流式细胞分析。

[0082] 收集流出细胞悬浮液,并在 0.5mmol/L 的 EDTA 存在下以 1800rpm 离心 12min,沉淀再悬浮在 IMDM 中。等分试样在不存在或存在凝血酶 (0.5U/mL) 的情况下在 37°C 下孵育 10min。悬浮液 (100 μ L) 中的细胞在室温下与 FITC-抗-CD62P 和 PE-抗-CD41a(各 5 μ L) 或非免疫偶联的对照抗体一起孵育 20min,然后加入 300 μ L PBS。然后用 FACSorr 流式细胞计 (Becton-Dickinson, Le Pont-de-Claix, 法国) 分析细胞;用血小板区域上的设置获得 10000 个结果,所述设置通过其在由未刺激的洗涤血小板在独立实验中确定的直角散射 (right-angle scatter) (SSC) 和前向角散射 (FSC) 图上的特征曲线确认。

[0083] 共焦免疫荧光

[0084] 将未激活的和凝血酶激活的细胞的等分试样 (150 μ L) 加入在静态条件下孵育 30min 的纤维蛋白原涂覆的玻璃 Lab-Tek 室载玻片上 (Nunc, Rochester, NY)。除去非粘附细胞,并用 PBS 洗涤载玻片三次,然后用在 PBS 中的 2% 仲甲醛 (Carlo Erba, Val de Reuil, 法国) 固定 30 分钟,并在 4°C 储存。对于免疫荧光染色,用 0.1% Triton X-100 的 PBS 溶液渗透细胞 5min,然后用抗- β 3P37MoAb (10 μ g/mL 的 PBS 溶液) 孵育 30min,洗涤并用 20 μ g/mL 的与 AlexaFluor488 (Molecular Probes, Eugene, OR) 偶联的二级抗体一起孵育。阴性对照使用来自小鼠腹水的相同蛋白浓度的纯化 IgG。对于肌动蛋白标记,渗透的细胞在室温下用含有 3% BSA 的 50 μ L 的 30nmol/L AlexaFluor546 鬼笔环肽 (Molecular Probes) 的 PBS 溶液孵育 30min。然后洗涤盖玻片两次并封固在含有 TOTO3 和 Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK) 的封片溶液 (mounting solution) 中。用 Leica TCS SP2A0BS 共焦显微镜分析 AlexaFluor488/AlexaFluor546 染色。

[0085] 电子显微镜检查

[0086] 流出细胞悬浮液直接在灌流室的出口处收集在戊二醛固定液 (在 0.1M、pH7.4 的磷酸盐缓冲液中的最终浓度为 1.5%) 中,在通过各种基质后,然后如先前描述 (Cramer 等人, 1997) 的进行处理以用于电子显微镜检查。一些样品首先如上由凝血酶激活并进一步处理用于电子显微镜检查。在 Jeol110-11 电子显微镜 (Jeol Ltd, Tokyo, 日本) 上进行检测。

[0087] 统计学分析

[0088] 我们使用 Student's 不配对 t 检验进行统计分析;P 值 < 0.05 被认为显著。误差棒代表平均值的标准误差 (SEM)。

[0089] 结果

[0090] MK 与 VWF 的动力学相互作用

[0091] 脐血成熟 MK 以不同的切变率在涂覆有纯化 VWF 的表面上灌流。在 1800s⁻¹ 下, MK 形成与 VWF 的瞬时相互作用,从而减慢在 VWF 上滚动的 MK 的速度并逐渐导致深刻的形态变化,其最终导致血小板从 MK 脱落。血小板形成的不同阶段概述于图 1A 中。该过程从大致球形的 MK 开始,然后细胞外缘变形和伪足在粘附的 MK 上变得可见 (阶段 2)。然后在细胞体后面和 / 或前面发生沿着流动组织化的细胞质延伸 (阶段 3)。具有成串珠外观特征的中间膨大开始显现。延伸以 21 μ m/min 的速度迅速发生,从而比在静态条件下报告的高 25 倍 (Patel 等人, 2005b)。有趣的是,破碎不仅发生在这些延伸的末端,还发生在膨大之间,特别在较薄的收缩段中,从而释放不同大小的碎片,且最经常是几个珠仍然连在一起,但是没有主细胞体 (图 1A)。最后,这些碎片进一步破碎成在稍后时间点期间清晰可见的更小

的颗粒,为血小板的大小(图 1A)。前血小板破碎在高剪切率条件下在 15-20min 内迅速发生。使用脐血源的 MK 或骨髓源的 MK 获得了相似的结果。相反,在不存在流动或在较低剪切率($< 1000s^{-1}$)的情况下,在 MK 与 VWF 接触的 20min 时间内没有观察到前血小板和血小板释放。未成熟 MK(培养少于 9 天)的剪切暴露不会发生转位和破碎。

[0092] 与 MK 受体相互作用的 VWF 在血小板形成中的特异性

[0093] 定义四个细胞种类以量化剪切暴露期间的形态变化:1) 转位的 MK;2) 早期变形 MK,丧失球形;3) 晚期变形 MK,具有前血小板延伸;和 4) 前血小板破碎和血小板释放(图 1B,图 a)。延伸细胞和前血小板和血小板的比例逐渐增加,在 20min 时达到细胞的 $27.6 \pm 4.9\%$ 。这种增加反映转位的细胞从 5min 时的 $28.2 \pm 6.5\%$ 降低到 20min 的 $3.6 \pm 1.6\%$,以及早期变形 MK 的降低(图 1B,图 b)。当测定暴露于高剪切率的骨髓 MK 的分布时,获得类似于用脐血 MK 描述的结果(图 1B,图 c)。在存在针对糖萼素或 VWF 的 GPIb 结合域的抗体的情况下, MK 转位和后续步骤(包括前血小板形成和血小板释放)完全停止(图 1B,图 d 和 e),说明 VWF-GPIb 相互作用的至关重要。在 $\alpha IIb \beta 3$ 抑制剂阿昔单抗存在下,不具有前血小板的细胞(未变形和早期变形的 MK)的比例随时间保持恒定,而前血小板延伸强烈减少,且血小板的形成几乎完全消除(图 1B,图 f)。这种前血小板形成的无效是由于与 VWF 表面的接触不良(数据未示出)。

[0094] 由 MK 暴露于高剪切率诱导的血小板形成的表征

[0095] 和在静态条件下在 VWF 上孵育细胞 20min 得到的对照(其中 MK 的形态相对于与 VWF 接触前的细胞保持不变)相比,施加于成熟 MK 的剪切力诱导特异性的形态变化(图 2)。相反, MK 灌流 20min 后涂覆有 VWF 的盖玻片的固定后染色显示, MK 在其尖端延伸长的线状伪足,且沿轴形成珠状血小板样尖突起以及较大细胞质碎片(图 2)。前血小板延伸需要对于 α 和 $\beta 1$ 微管蛋白染色的重叠微管的滑动(Patel 等人,2005b)。我们发现 MK 延伸在与肌动蛋白不同的区域中由抗微管蛋白抗体染色,证实这些延伸显示与由 Italiano 等人(Italiano 等人,2003;Italiano 等人,1999;Patel 等人,2005a;Patel 等人,2005b)的工作在前血小板形成 MK 中确认的类似的染色;微管蛋白标记跟随延伸的 MK 中的前血小板轴并在球形 MK 上、前血小板上和血小板上显示环形图案(图 3B)。微管在剪切诱导的前血小板形成中的重要性由诺考达唑(nocodazole)(微管装配抑制剂)的预孵育证实,其完全阻止流动条件下的 MK 延伸和前血小板形成(数据未显示)。为证明诺考达唑不是作用于细胞悬浮液中的预形成的血小板,在延伸后加入微管抑制剂;实时可见的效应显示,当在该过程发生之后添加时,诺考达唑可以逆转剪切诱导的延伸。逆转的特异性由微管蛋白染色证实。有趣的是,加入诺考达唑 25min 后,在前血小板和血小板中观察到微管蛋白不再组织化,从而表明延伸过程不同于系留(图 3C)。事实上,膜系留是在流动影响下从小的、局部化粘附接触延伸的动态结构,其由 VWF-GP 1b 相互作用诱导,但它们不显示任何微管蛋白染色(Dopheide 等人,2002)。

[0096] 电子显微镜检查显示从细胞核心延伸的、含有平行微管束的长的细胞质轴,且有时被胞质细胞器充满(图 4,图 a)。具有致密异染色质的核叶位于细胞的一极,偶尔观察到裸核(图 4,图 b)。没有细胞核的大的细胞质碎片大致是球状、哑铃状或延伸有细长的末端(图 4,图 c 和 d)。也可见血小板样碎片(图 4,图 e)。

[0097] 高剪切率和 VWF 加速前血小板形成

[0098] 最近表明,粘性蛋白参与前血小板形成的调节,特别是在静态条件下将 MK 平铺在 VWF 上后 16 小时发生的前血小板形成 (Balduini 等人,2008)。如图 5A 所示,我们获得了类似的发现。相反,在高剪切率存在下,该过程非常迅速地发生,因为在 20min 内,70%的脐血 MK 和 80%的骨髓 MK 形成前血小板。该作用取决于剪切率的水平 ($600-2400s^{-1}$) 以及细胞浓度 ($0.5-2 \times 10^6/mL$)。内皮细胞含有高分子量的 VWF 多聚体,其以低速率组成型释放并在炎性状态下增加 (Rondaij 等人,2006)。因此我们评估从内皮细胞基质中释放的 VWF 是否支持 MK 粘附和前血小板形成。MK 滚动并粘附在未激活 HUVEC 上,但前血小板形成发生在激活的 HUVEC 上 (图 5B)。血小板形成也发生在位于内皮细胞层之下且在去除这些内皮细胞时呈现的内皮细胞基质上。另外,我们研究了在涂覆有突变型 2B-rVWF 的表面上灌流的 MK 的前血小板形成。我们选择 V1316M 置换 (一个明确的突变),其特征在于 VWF 与血小板 GPIb 的结合增强,具有温和的血小板减少症和巨血小板 (Ajzenberg 等人,2000; Miura 等人,2000)。我们发现在 2B 型 -rVWF 上 MK 转位的平均速度 ($4.6 \pm 0.3 \mu m/s$) 远远低于在野生型 (wt)-rVWF 上的平均速度 ($33.6 \pm 2.5 \mu m/s$, $p < 0.0001$)。通过 MK 暴露于高剪切率而形成前血小板的所有步骤在 2B-rVWF 上比在 wt-rVWF 上慢,导致血小板生成减少以及前血小板集聚增加 (未显示数据)。最后,为进一步确立粘性表面在调节前血小板形成中的特异性,我们调查了在高剪切率下由 MK 在纤维蛋白原、胶原蛋白或纤维连接蛋白上灌流的前血小板形成水平。在这些表面上没有形成前血小板;唯一的变化是在纤维蛋白原上轻微的早期 MK 变形 (图 5C)。

[0099] 由 MK 剪切暴露产生的血小板是功能性的

[0100] $\alpha IIb \beta 3$ 整联蛋白介导的血小板对纤维蛋白原的粘附在不存在活化的情况下发生,并在凝血酶激活该受体时增强。为证实由 MK 剪切暴露产生的血小板在结构上和功能上类似于血液血小板,在对于纤维蛋白原的静态粘附试验中比较流通中收集的细胞和分离的血液血小板 (Mazharian 等人,2007)。在不存在凝血酶的情况下细胞牢固地粘附于纤维蛋白原,说明 $\alpha IIb \beta 3$ 在剪切诱导的血小板和前血小板中是功能性的。非激活成分显示弥漫的肌动蛋白染色和 $\alpha IIb \beta 3$ 膜定化。凝血酶活化后,肌动蛋白微丝在有核和无核成分中重新组织化,显示板状伪足 (lamellipod) 和丝状伪足形成,以及整联蛋白膜染色 (图 6)。这些由剪切暴露产生的 MK 源的血小板显示与在未暴露于剪切的分离试验中制备的洗涤血液血小板类似的细胞骨架组织 (图 6)。

[0101] 剪切暴露细胞的流式细胞计分析根据其大小显示三种 CD41 阳性细胞群。较小尺寸的群体与血小板重叠,而中间群体对应于较大的成分,包括前血小板和裸核 (图 7)。因此,与从外周血液分离的血小板比较,由暴露于剪切生成的血小板群体包括较高比例的中间尺寸的血小板。剪切的 MK 属于与未剪切的 MK 相同的大尺寸群体。响应于凝血酶刺激,在剪切产生的血小板的表面上观察到 P-选择蛋白 (CD62P) 的上调 ($11.8 \pm 1.8\%$, 与未活化血小板的 $6.2 \pm 0.9\%$ 比较, $p = 0.0005$)。与分离血液血小板的相似性由超结构数据证实 (图 8)。不存在凝血酶时,血小板样碎片显示平滑表面、若干分散在细胞质中的 α 粒以及离散的表面连接微管系统 (SCCS) (图 8)。凝血酶活化后,这些细胞显示典型的激活血小板的形态变化,即球形、表面伪足、SCCS 的集中的和扩大的褶皱内的致密材料、无细胞质粒形成以及中央的微纤丝束 (图 8)。最后,为证实血小板大小的成分由剪切暴露产生,且不是简单地在成熟 MK 的悬浮液中产生,通过裸核的存在比较在流体室中灌流前和后的流出物。暴

露于剪切的细胞的非粘附流通比在静态条件下的细胞（缺乏裸核）包含更多的裸核（未显示数据）。

[0102] 小鼠巨核细胞和血小板

[0103] 使小鼠成熟巨核细胞在小鼠 VWF 上暴露于高剪切率导致有效的血小板形成。在一系列实验中，从 6-8 只动物中提取骨髓源的细胞使得生成至少 $6-12 \times 10^6$ 个成熟巨核细胞。这些细胞在 90 分钟内暴露于 $1800s^{-1}$ 的剪切率，并完全转化为与血小板尺寸相当的小成分。由共焦免疫荧光表征小鼠血小板显示了血小板尺寸的成分中特定的微管蛋白环。在凝集计中通过标准技术确认响应于这些血小板的激动剂的聚集特性。

[0104] 将本发明血小板注射给血小板减少症小鼠挽救出血表型

[0105] 该实验旨在通过灌注如上所述通过高剪切力产生的供体小鼠血小板挽救血小板减少症受体小鼠的出血表型。

[0106] 受体小鼠经由尾部静脉注射通过来自汇集的供体小鼠的骨髓成熟巨核细胞的剪切暴露获得的血小板。血小板减少症小鼠通过施用低浓度的抗 GPIIb-IIIa 抗体 (Nieswandt 等人, 2000) 获得。在典型实验中，我们通过注射 2-3 次抗 -GPIIb 抗体使得循环血小板减少 80%。在给血小板减少症小鼠注射前，荧光标记这些血小板以用于检测和清除研究。测定输注小鼠的血小板计数、自发出血和出血时间的改正。这些循环的碎片是活性血小板，因为它们增加血小板数目并在诱导出血的体内模型中改正失血。我们使用导致限于炎症区域的大出血的刺激性接触性皮炎模型 (Goerge 等人, 2008)。在施用剪切产生的血小板之前和之后比较血小板减少症小鼠的皮肤出血。也通过体内荧光显微术利用氯化铁损伤的血栓症模型体内评估新形成血小板的功能 (Denis 等人, 1998)。该方法提供血栓形成过程的不同阶段的详细信息，包括单血小板粘附、血栓生长的速率、血栓稳定性、栓子尺寸和堵塞血管的时间 (Denis and Wagner, 2007)。我们比较了对血小板减少症小鼠施用血小板之前和之后的实时血栓形成和血小板在血栓中的结合。

[0107] 结论

[0108] 综上所述，在流动条件下成熟 MK 与 VWF 的相互作用促进人 / 小鼠前血小板形成的发现代表了了解血小板形成方面的重大突破，因此这可以发生在毛细血管或小动脉中。具有血小板生成减少的疾病的调查将极大地有利于更好地理解血小板从巨核细胞的脱落。最后，本发明人的结果提供了一种用于诊断或治疗目的的制备血小板的方法。

[0109] 参考文献：

[0110] Ajzenberg, N., A. S. Ribba, G. Rastegar-Lari, D. Meyer 和 D. Baruch. 2000. Effect of recombinant von Willebrand factor reproducing type2B or type2M mutations on shear-induced platelet aggregation. *Blood*. 95 :3796-803.

[0111] Balduini, A., I. Pallotta, A. Malara, P. Lova, A. Pecci, G. Viarengo, C. L. Balduini 和 M. Torti. 2008. Adhesive receptors, extracellular proteins and myosin IIA orchestrate proplatelet formation by human megakaryocytes. *J ThrombHaemost*6 :1900-1907.

[0112] Barroga, C. F., H. Pham 和 K. Kaushansky. 2008. Thrombopoietin regulates c-Myb expression by modulating micro RNA 150 expression. *Experimental Hematology*. 36 : 1585-1592.

- [0113] Calvete, J. J., A. Henschen 和 J. Gonzalez-Rodriguez. 1991. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem J.* 274(Pt1) :63-71.
- [0114] Conant, C. G., M. A. Schwartz, T. Nevill 和 C. Ionescu-Zanetti. 2009. Platelet adhesion and aggregation under flow using microfluidic flow cells. *J VisExp.* 32 : 1644[pii].
- [0115] Cramer, E. M., H. Lu, J. P. Caen, C. Soria, M. C. Berndt 和 D. Tenza. 1991. Differential redistribution of platelet glycoproteins Ib and IIb-IIIa after plasmin stimulation *Blood.* 77 :694-699.
- [0116] Cramer, E. M., F. Norol, J. Guichard, J. Breton-Gorius, W. Vainchenker, J. -M. Masse 和 N. Debili. 1997. Ultrastructure of Platelet Formation by Human Megakaryocytes Cultured With the Mpl Ligand. *Blood.* 89 :2336-2346.
- [0117] Debili, N., N. Kieffer, M. Nakazawa, J. Guichard, M. Titeux, E. Cramer, J. Breton-Gorius 和 W. Vainchenker. 1990. Expression of platelet glycoprotein Ib by cultured human megakaryocytes :ultrastructural localization and biosynthesis. *Blood.* 76 :368-376.
- [0118] Denis, C., N. Methia, P. S. Frenette, H. Rayburn, M. Ullman-Cullere, R. O. Hynes 和 D. D. Wagner. 1998. A mouse model of severe von Willebrand disease :Defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95 :9524-9529.
- [0119] Denis, C. V. 和 D. D. Wagner. 2007. Platelet Adhesion Receptors and Their Ligands in Mouse Models of Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27 : 728-739.
- [0120] Dopheide, S. M., M. J. Maxwell 和 S. P. Jackson. 2002. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood.* 99 : 159-167.
- [0121] Dunois-Larde, C., C. Capron, S. Fichelson, T. Bauer, E. Cramer-Borde 和 D. Baruch. 2009. Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet production. *Blood.* 114 :1875-1883.
- [0122] Federici, A. B. 2005. Management of von Willebrand disease with factor VIII/von Willebrand factor concentrates :results from current studies and surveys. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 16Suppl 1 :S17-21.
- [0123] Fichelson, S., J. -M. Freyssinier, F. Picard, M. Fontenay-Roupie, M. Guesnu, M. Cherai, S. Gisselbrecht 和 F. Porteu. 1999. Megakaryocyte Growth and Development Factor-Induced Proliferation and Differentiation Are Regulated by the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Primitive Cord Blood Hematopoietic Progenitors. *Blood.* 94 :1601-1613.
- [0124] Fujimura, Y., K. Titani, L. Z. Holland, S. R. Russell, J. R. Roberts, J. H. Elder, Z. M. Ruggeri 和 T. S. Zimmerman. 1986. von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the

domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* 261 :381-385.

[0125] Girma, J. P., M. W. Chopek, K. Titani 和 E. W. Davie. 1986a. Limited proteolysis of human von Willebrand factor by *Staphylococcus aureus* V-8 protease: isolation and partial characterization of a platelet-binding domain. *Biochemistry.* 25 : 3156-63.

[0126] Girma, J. P., M. Kalafatis, G. Pietu, J. M. Lavergne, M. W. Chopek, T. S. Edgington 和 D. Meyer. 1986b. Mapping of distinct von Willebrand factor domains interacting with platelet GPIb and GPIIb/IIIa and with collagen using monoclonal antibodies. *Blood.* 67 :1356-66.

[0127] Goerge, T., B. Ho-Tin-Noe, C. Carbo, C. Benarafa, E. Remold-O'Donnell, B.-Q. Zhao, S. M. Cifuni 和 D. D. Wagner. 2008. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood.* 111 :4958-4964.

[0128] Goudemand, J., I. Scharrer, E. Berntorp, C. A. Lee, A. Borel-Derlon, N. Stieltjes, C. Caron, J. M. Scherrmann, F. Bridey, Z. Tellier, A. B. Federici 和 P. M. Mannucci. 2005. Pharmacokinetic studies on Wilfactin, a von Willebrand factor concentrate with a low factor VIII content treated with three virus-inactivation/removal methods. *J ThrombHaemost.* 3 :2219-2227.

[0129] Greenberg, S. M., D. S. Rosenthal, T. A. Greeley, R. Tantravahi 和 R. I. Handin. 1988. Characterization of a new megakaryocytic cell line: the Dami cell. *Blood.* 72 :1968-1977.

[0130] Houdijk, W. P., M. E. Schiphorst 和 J. J. Sixma. 1986. Identification of functional domains on von Willebrand factor by binding of tryptic fragments to collagen and to platelets in the presence of ristocetin. *Blood.* 67 :1498-1503.

[0131] Huizinga, E. G., S. Tsuji, R. A. Romijn, M. E. Schiphorst, P. G. de Groot, J. J. Sixma 和 P. Gros. 2002. Structures of glycoprotein Ib α and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science.* 297 :1176-9.

[0132] Isakari, Y., S. Sogo, T. Ishida, T. Kawakami, T. Ono, T. Taki 和 H. Kiwada. 2009. Gene Expression Analysis during Platelet-Like Particle Production in Phorbol Myristate Acetate-Treated MEG-01 Cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 32 : 354-358.

[0133] Italiano, J. E., Jr., W. Bergmeier, S. Tiwari, H. Falet, J. H. Hartwig, K. M. Hoffmeister, P. Andre, D. D. Wagner 和 R. A. Shivdasani. 2003. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood.* 101 :4789-4796.

[0134] Italiano, J. E., Jr., P. Lecine, R. A. Shivdasani 和 J. H. Hartwig. 1999. Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *J Cell Biol.* 147 :1299-1312.

[0135] Kauskot, A., F. Adam, A. Mazharian, N. Ajzenberg, E. Berrou, A. Bonnefoy, J.-P. Rosa, M. F. Hoylaerts 和 M. Bryckaert. 2007. Involvement of the Mitogen-activated Protein Kinase c-Jun NH₂-terminal Kinase in Thrombus Formation. *J Biol Chem.* 282 :

31990-31999.

[0136] Legendre, P., A. Salsmann, J. Rayes, O. Trassard, N. Kieffer 和 D. Baruch. 2006. CHO cells expressing the high affinity α IIb β 3T562N integrin demonstrate enhanced adhesion under shear. *J Thromb Haemost.* 4 :236-246.

[0137] Marx, I., O. D. Christophe, P. J. Lenting, A. Rupin, M. -O. Vallez, T. J. Verbeuren 和 C. V. Denis. 2008. Altered thrombus formation in von Willebrand factor-deficient mice expressing von Willebrand factor variants with defective binding to collagen or GPIIb/IIIa. *Blood.* 112 :603-609.

[0138] Mazharian, A., S. Roger, E. Berrou, F. Adam, A. Kauskot, P. Nurden, M. Jandrot-Perrus 和 M. Bryckaert. 2007. Protease-activating Receptor-4 Induces Full Platelet Spreading on a Fibrinogen Matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca²⁺ mobilization. *J. Biol. Chem.* 282 :5478-5487.

[0139] Mekrache, M., N. Kieffer 和 D. Baruch. 2002. Activation of recombinant $[\alpha]$ IIb $[\beta]$ 3 expressed in Chinese hamster ovary cells exposes different binding sites for fibrinogen or von Willebrand factor: evidence using monoclonal antibodies to $[\alpha]$ IIb $[\beta]$ 3. *Br J Haematol.* 116 :636-644.

[0140] Miura, S., C. Q. Li, Z. Cao, H. Wang, M. R. Wardell 和 J. E. Sadler. 2000. Interaction of von Willebrand Factor domain A1 with platelet glycoprotein I α -(1-289). Slow intrinsic binding kinetics mediate rapid platelet adhesion. *J Biol Chem.* 275 :7539-7546.

[0141] Nieswandt, B., W. Bergmeier, K. Ruckebardt, J. E. Gessner 和 H. Zimber. 2000. Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. *Blood.* 96 :2520-2527.

[0142] Norol, F., N. Vitrat, E. Cramer, J. Guichard, S. A. Burstein, W. Vainchenker 和 N. Debili. 1998. Effects of Cytokines on Platelet Production From Blood and Marrow CD34⁺ Cells. *Blood.* 91 :830-843.

[0143] Nurden, A. T. 2005. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost.* 3 :1773-1782.

[0144] Pai, M. 和 C. P. Hayward. 2009. Diagnostic assessment of platelet disorders: what are the challenges to standardization? *Semin Thromb Hemost.* 35 :131-8.

[0145] Patel, S. R., J. H. Hartwig 和 J. E. Italiano, Jr. 2005a. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Invest.* 115 :3348-3354.

[0146] Patel, S. R., J. L. Richardson, H. Schulze, E. Kahle, N. Galjart, K. Drabek, R. A. Shivdasani, J. H. Hartwig 和 J. E. Italiano, Jr. 2005b. Differential roles of microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood.* 106 :4076-4085.

[0147] Pedersen, N. T. 1978. Occurrence of megakaryocytes in various vessels and their retention in the pulmonary capillaries in man. *Scand J Haematol.* 21 :369-75.

[0148] Richardson, J. L., R. A. Shivdasani, C. Boers, J. H. Hartwig 和 J. E. Italiano,

Jr. 2005. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production. *Blood*. 106 :4066-4075.

[0149] Robinson, A. J. , D. Kashanin, F. O ' Dowd, V. Williams 和 G. M. Walsh. 2008. Montelukast inhibition of resting and GM-CSF-stimulated eosinophil adhesion to VCAM-1 under flow conditions appears independent of cysLT(1)R antagonism. *J Leukoc Biol*. 83 :1522-9.

[0150] Rondaij, M. G. , R. Bierings, A. Kragt, J. A. van Mourik 和 J. Voorberg. 2006. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arterioscler ThrombVascBiol*. 26 :1002-1007.

[0151] Ruggeri, Z. M. 2003. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*. 1 :1335-42.

[0152] Tavassoli, M. 和 M. Aoki. 1981. Migration of entire megakaryocytes through the marrow--blood barrier. *Br J Haematol*. 48 :25-9.

[0153] Williams, V. , D. Kashanin, I. V. Shvets, S. Mitchell, Y. Volkov 和 D. Kelleher. 2002. Microfluidic Enabling Platform for Cell-based Assays. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. 7 :135-141.

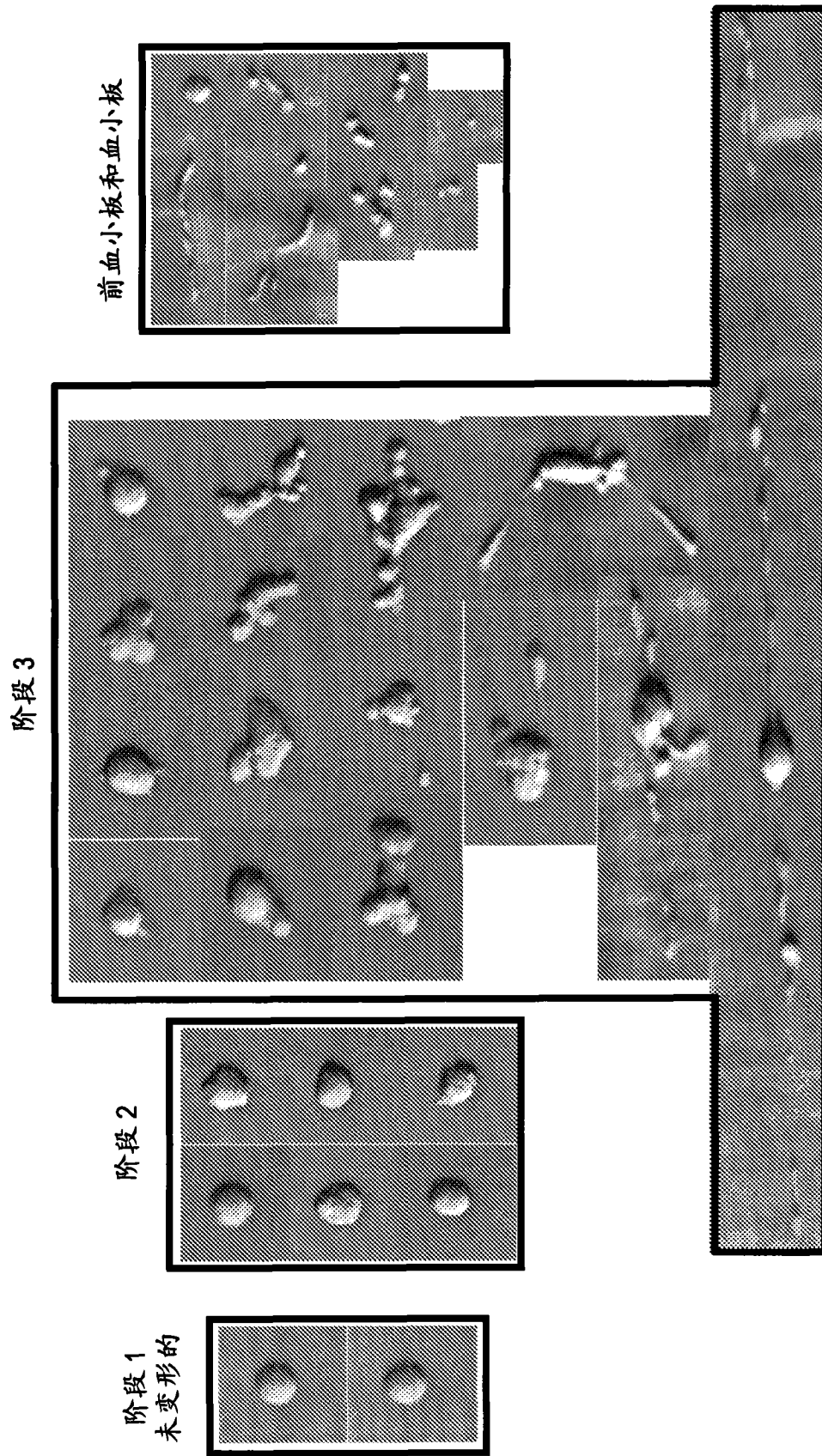


图 1A

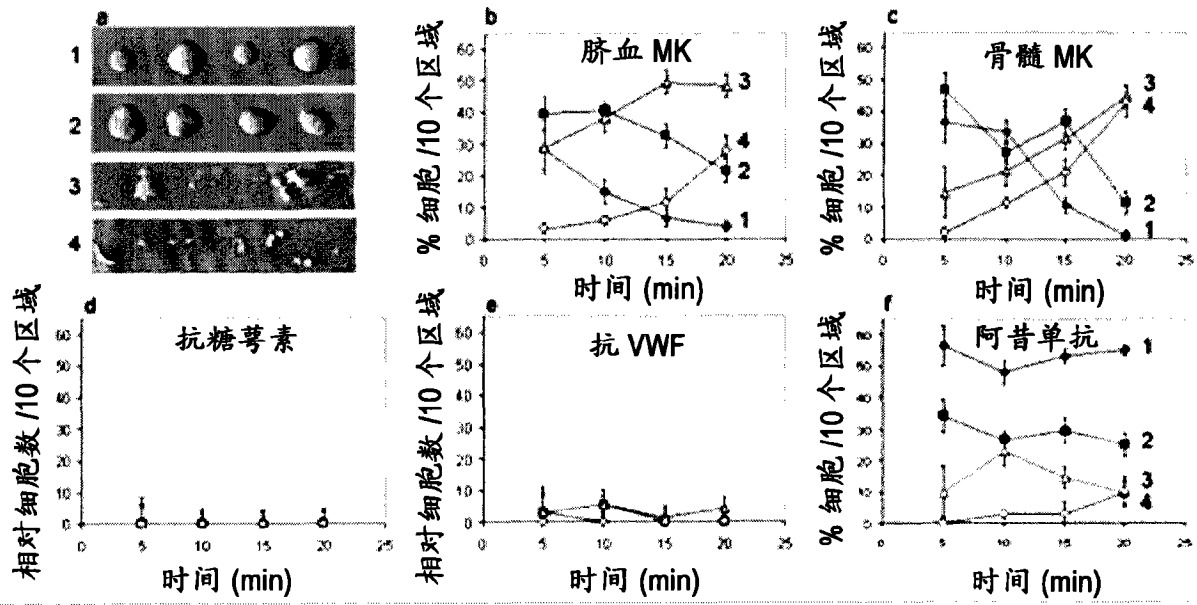


图 1B

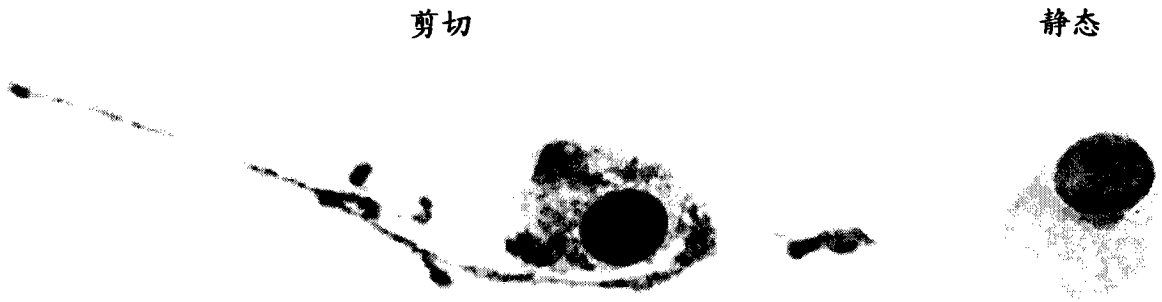


图 2

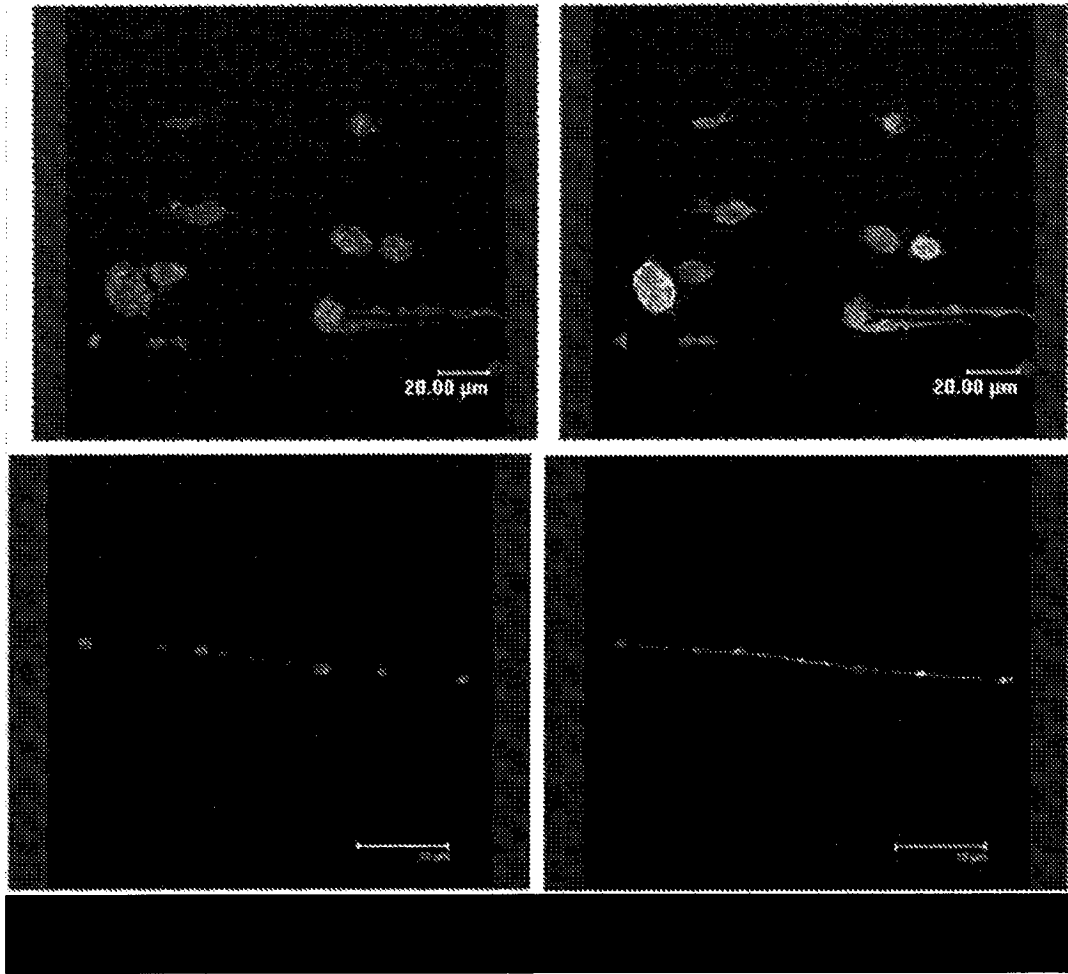


图 3A

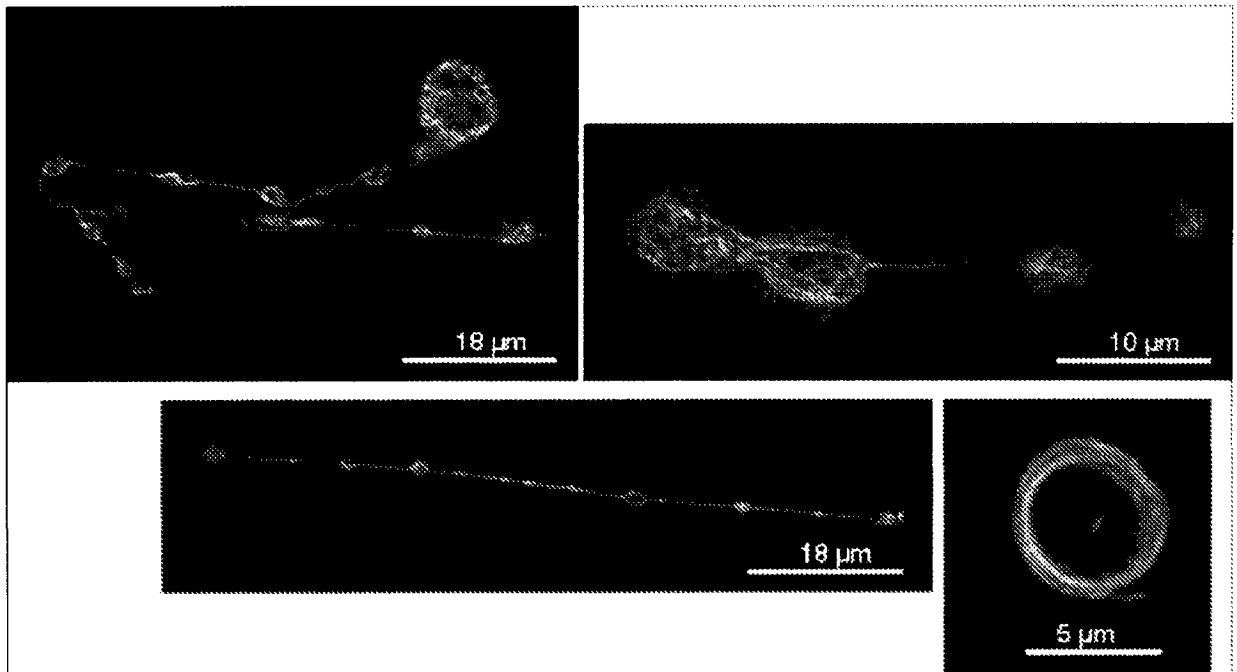


图 3B

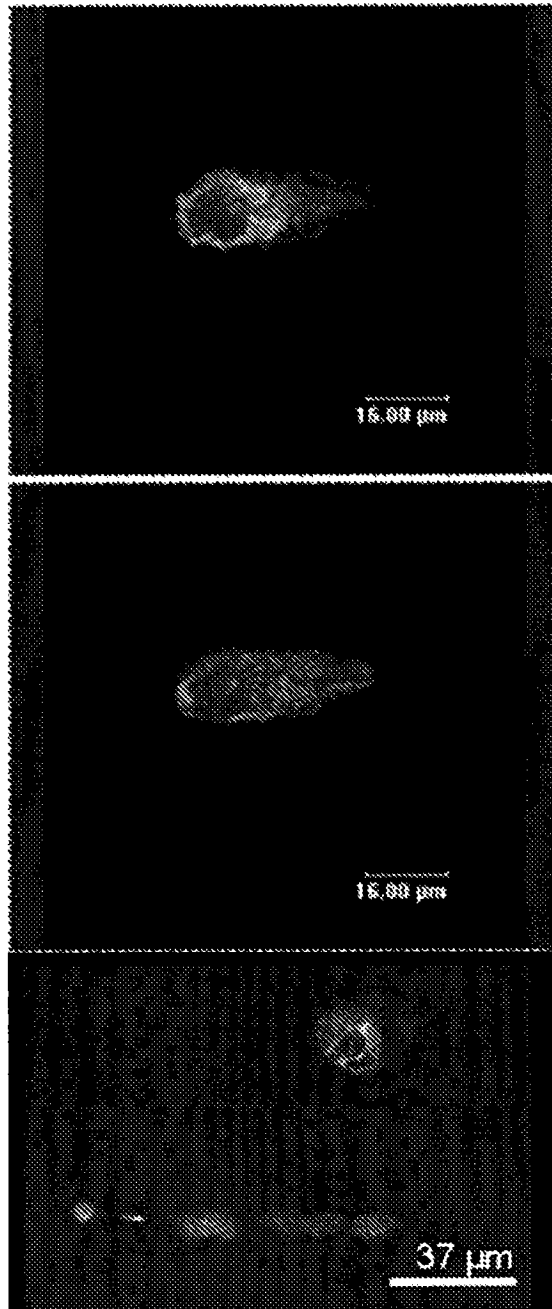


图 3C

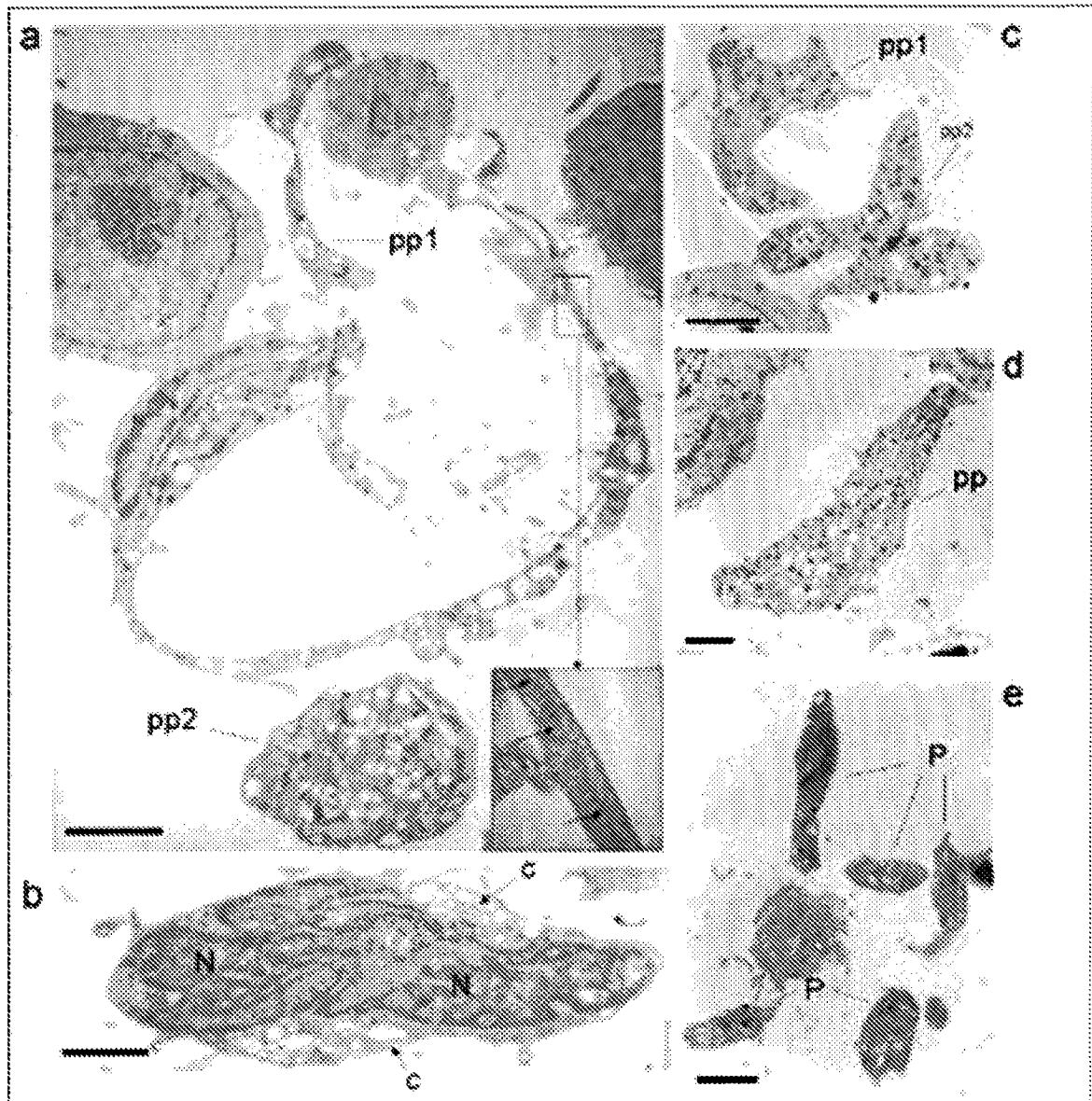


图 4

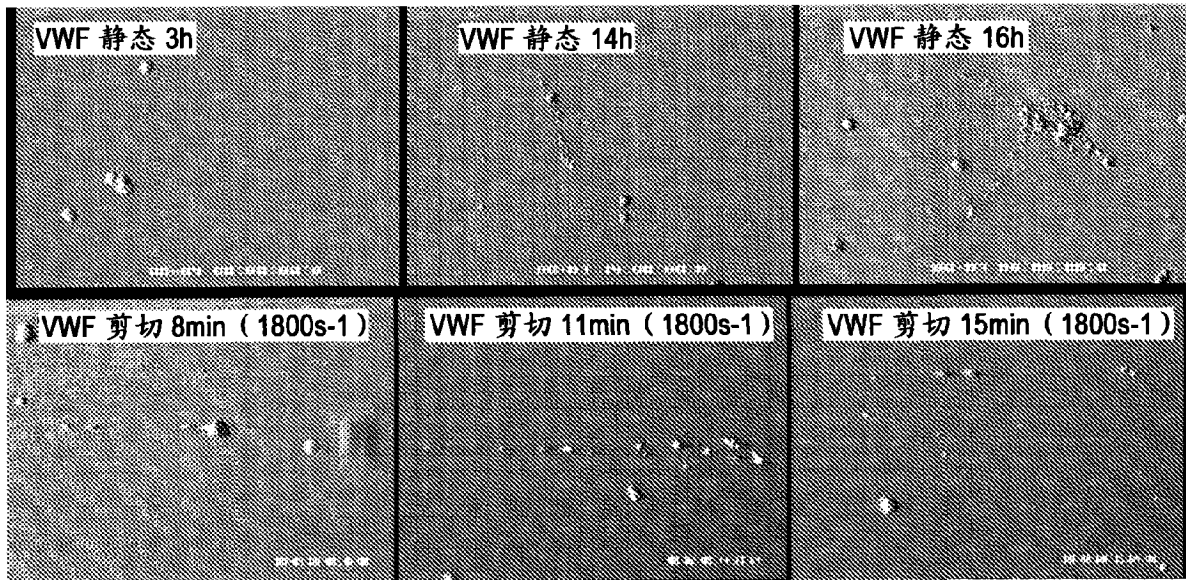


图 5A

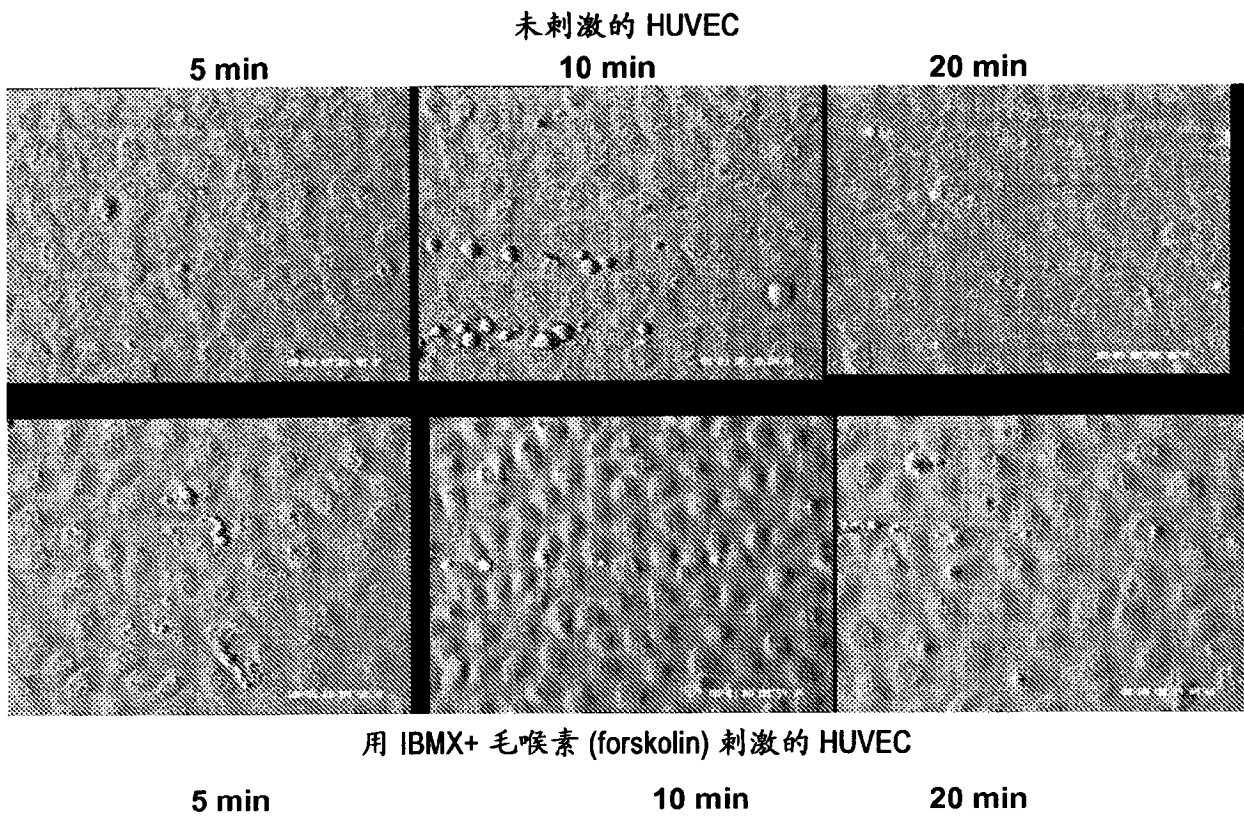


图 5B

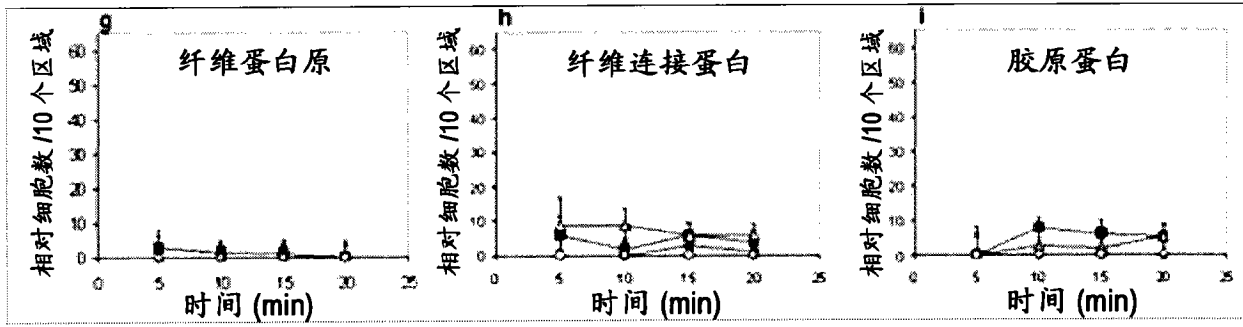


图 5C

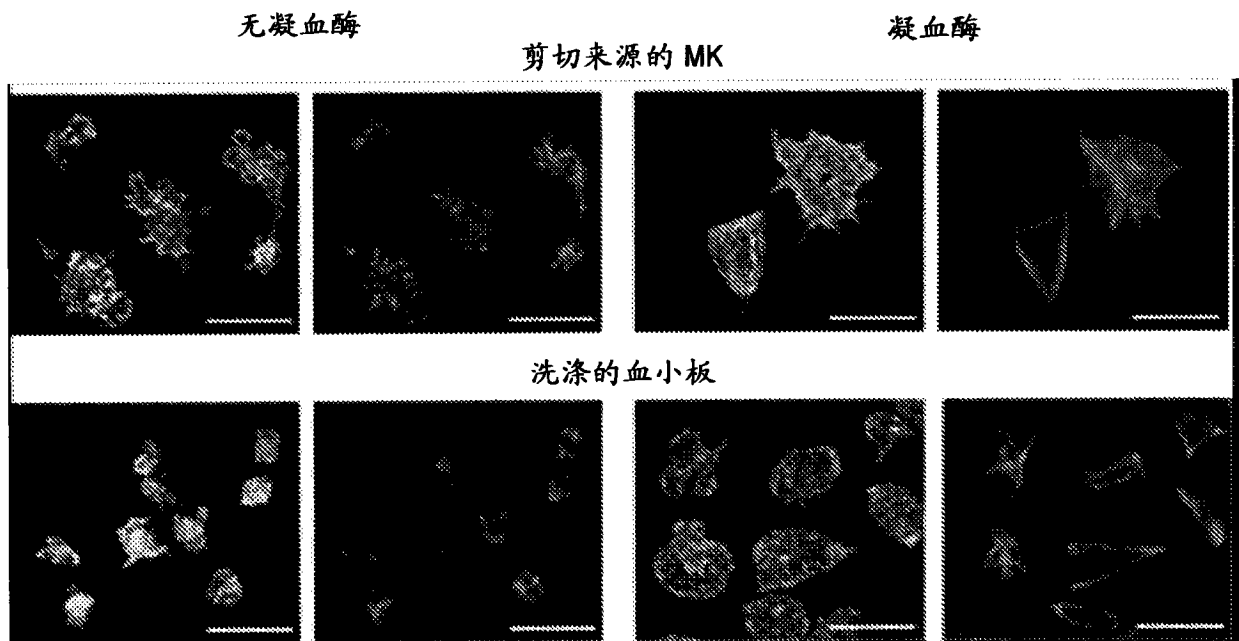


图 6

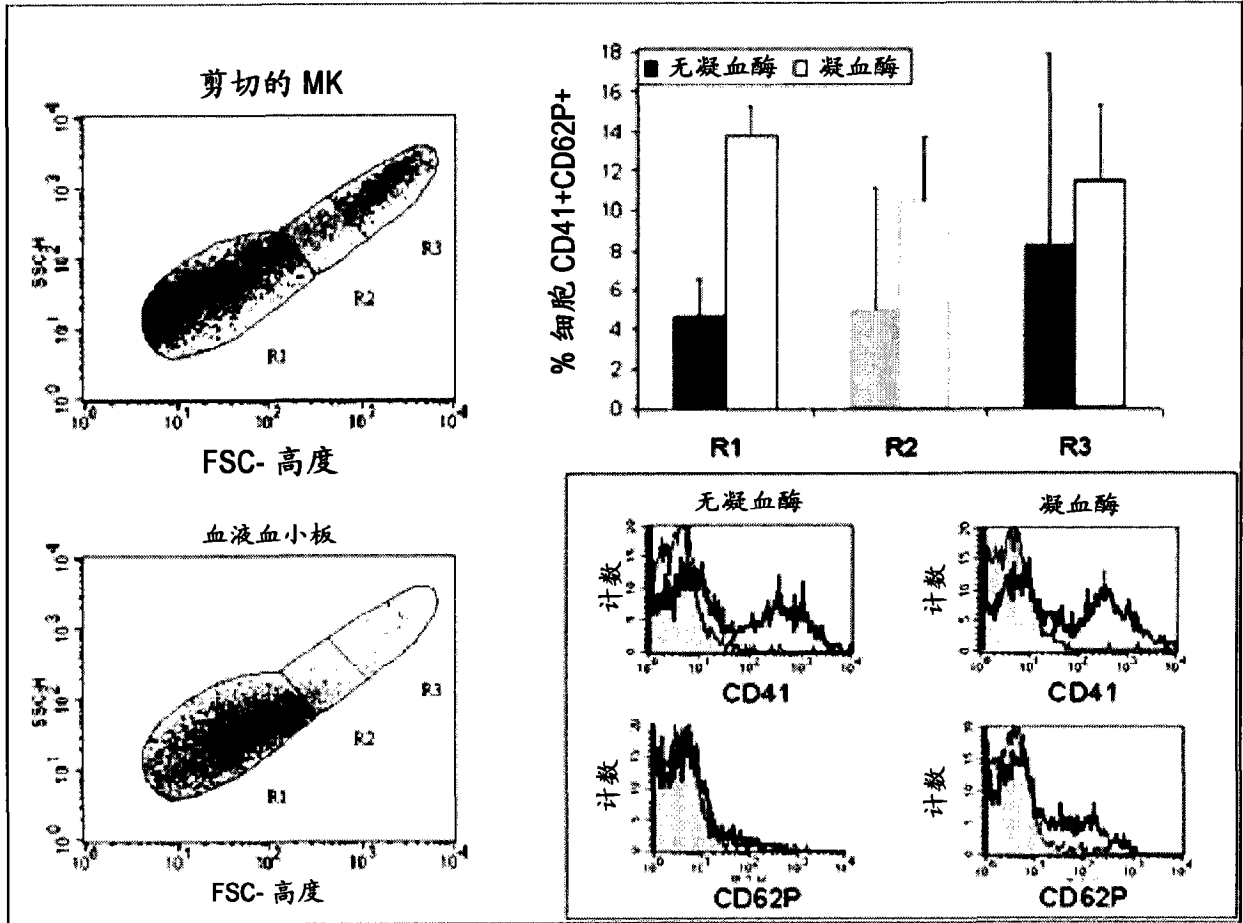


图 7

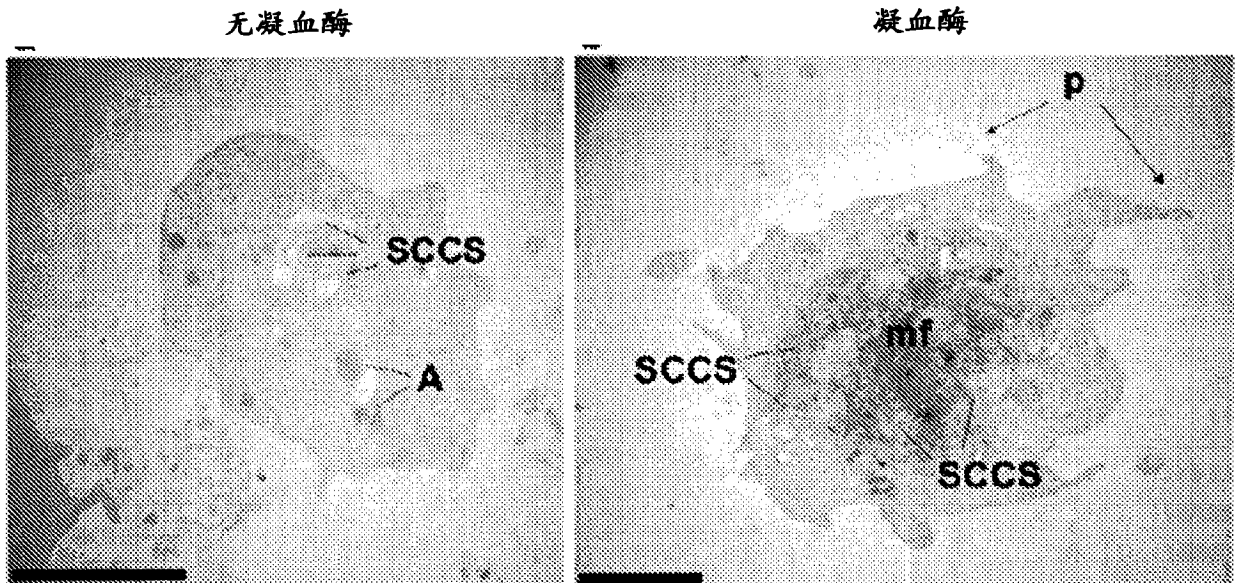


图 8