

• 基础研究 •

端粒酶抑制剂BIBR1532通过影响NF- κ B信号通路调控血小板活化

魏萌 姜哲轶 陆逸华 张鹏 张田田 张俊峰

【摘要】 目的:探讨端粒酶抑制剂 BIBR1532 对血小板活化功能的影响。 **方法:**取野生型 8~12 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 20 只,制备洗涤血小板,并分成空白对照组、阳性对照组和 BIBR1532 处理组(终浓度 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L)。经孵育后,测定血小板聚集、铺展程度和血块收缩速率及血小板活化标志物 P-选择素(CD62P)和血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa 纤维蛋白原受体(PAC-1)。采用 Western blot 法检测不同组静息和活化状态下血小板中关键信号通路蛋白质的磷酸化水平。 **结果:**与空白对照组相比, BIBR1532 处理组小鼠血小板的聚集程度更低、铺展面积更小、血块收缩速率更慢(P 均 <0.01)。流式细胞术检测提示,与阳性对照组相比, BIBR1532 5 μ mol/L 处理组的 CD62P、PAC-1 阳性表达率降低, BIBR1532 10 μ mol/L 处理组降低更明显(P 均 <0.01)。Western blot 检测结果显示,与阳性对照组相比, BIBR1532 5 μ mol/L 处理组的小血小板活化过程中核因子(NF)- κ B 通路相关的关键蛋白 p65、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 的磷酸化水平显著降低, BIBR1532 10 μ mol/L 处理组降低更明显(P 均 <0.01)。 **结论:**BIBR1532 可能通过影响 NF- κ B 信号通路中关键蛋白的磷酸化,参与调控血小板活化。

【关键词】 端粒酶抑制剂;血小板活化;核因子- κ B 通路

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2025.01.013

Telomerase inhibitor BIBR1532 regulates platelet activation via NF- κ B signaling pathway WEI Meng, JIANG Zheyi, LU Yihua, ZHANG Peng, ZHANG Tiantian, ZHANG Junfeng Department of Cardiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

【Abstract】 Objective: To investigate the impact of telomerase inhibitor BIBR1532 on platelet activation. **Methods:** Washed platelets were prepared from 20 male C57BL/6 wild-type mice (8-12 weeks), and divided into experimental and vehicle groups. The experimental group received various concentrations of BIBR1532, while the vehicle group was treated with an equivalent volume of solvent. After incubation, platelet aggregation, spreading area, clot retraction, and activation markers (CD62P, PAC-1) were assessed. Western blotting was performed to determine the phosphorylation levels of key proteins (p65, I κ B α) in the NF- κ B pathway under both resting and activated conditions. **Results:** Compared with vehicle group, BIBR1532 significantly inhibited platelet aggregation, spreading, and clot retraction (all $P<0.01$). Flow cytometry showed that compared to vehicle group, the expression level of positive CD62P and PAC-1 was lower when the platelets were treated with BIBR1532 at 5 μ mol/L, which was further decreased at a higher concentration (10 μ mol/L) (all $P<0.01$). Western blotting revealed that compared with vehicle group, the phosphorylation levels of key proteins (p65 and I κ B α) during platelet activation were reduced in BIBR1532 (5 μ mol/L) treated group, which was decreased further at a higher concentration (10 μ mol/L). **Conclusion:** BIBR1532 regulates platelet activation through

基金项目:国家自然科学基金(82270340, 81970289)

作者单位:200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院心血管内科

通信作者:张俊峰, E-mail: jfzhang_dr@163.com

blocking the phosphorylation of key proteins in the NF- κ B signaling pathway.

【Key words】 Telomerase inhibitor; Platelet activation; NF- κ B pathway

以冠状动脉血栓和脑卒中为主的动脉血栓性疾病的致死率和致残率较高,严重威胁人类健康^[1]。作为血液系统中的关键细胞,血小板在生理性止血中发挥重要作用^[2-3]。然而,血小板异常激活可能会导致病理性血栓形成,引起动脉血栓性疾病^[4]。

BIBR1532 是选择性、非竞争性的端粒酶抑制剂,可靶向抑制端粒酶逆转录酶 (TERT) 活性,阻止端粒延长。近年来, BIBR1532 被证实能抑制肿瘤细胞增殖^[5-7]。Tefferi 等^[8]发现类似 BIBR1532 的端粒酶抑制剂在治疗骨髓增生异常综合征患者时可能存在一定的出血风险,然而 BIBR1532 影响血栓形成的具体机制尚未明确。本研究旨在探讨 BIBR1532 对血小板活化功能的影响及其可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

野生型 8~12 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 20 只,体质量 18~30 g,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,由上海交通大学医学院附属第九人民医院动物房进行无特定病原体 (SPF) 级标准饲养。本研究经医院伦理委员会批准 (批号: SH9H-2023-A844-1)。

1.2 实验试剂与仪器

BIBR1532 购自美国 MCE 公司。三磷酸腺苷双磷酸酶 (Apyrase)、凝血酶、纤维蛋白原均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。胶原蛋白购自美国 Chronolog 公司。抗核因子 (NF)- κ B p65 抗体、抗磷酸化 NF- κ B p65 (p-p65) 抗体、抗 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 抗体、抗磷酸化 I κ B α (p-I κ B α) 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。抗 P-选择素 (CD62P) 抗体购自美国 BD Biosciences 公司。抗血小板膜糖蛋白 II b/ III a 纤维蛋白原受体 (PAC)-1 抗体购自德国 Emfret 公司。动物血球分析仪购自美国 HEMAVET 公司,血小板聚集仪购自美国 CHRONO-LOG 公司,流式细胞仪购自美国 Beckman 公司,红外成像系统购自美国 Odyssey 公司, TCS SP8 STED 共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 制备洗涤血小板

小鼠麻醉后经腹主动脉采集全血,与等体积生

理盐水混合,加入 Apyrase (1 U/mL) 20 μ L 和前列腺素 E1 (0.1 μ g/mL) 4 μ L,充分混匀后以 1 050 转/min 离心 10 min。取上层血浆至新管,加入 Apyrase 20 μ L 和乙二胺四乙酸二钠 (5 mmol/L) 400 μ L,再次混匀后以 2 100 转/min、离心 10 min,弃去上清液,仅保留血小板沉淀。用 1 mL 预热的 Tyrode's 缓冲液重悬血小板,使用动物血球分析仪计数,调整血小板至不同实验所需浓度,于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 1 h。

1.4 血小板聚集实验

血小板聚集仪预热至 37 $^{\circ}$ C,取洗涤血小板 2.4 mL,调整浓度为 3×10^8 /mL,分为空白对照组和实验组,每组每次 300 μ L,对照组加入溶剂二甲亚砜 0.3 μ L,实验组加入 BIBR1532 0.3 μ L (浓度为 5 μ mol/L) 进行预孵育。将 2 组洗涤血小板置于聚集管中,放入血小板聚集仪中,分别加入不同浓度的凝血酶和胶原蛋白,记录 5 min 内的血小板聚集曲线。每组实验重复 4 次。

1.5 血小板流式实验

取洗涤血小板 4.5 mL,调整浓度为 1×10^6 /mL,每组每次 100 μ L,分为空白对照组 (溶剂处理)、阴性对照组 (静息态血小板)、阳性对照组 (加入 0.1 μ L 的 1 U/mL 凝血酶激活) 和 BIBR1532 处理组 (加入不同浓度 BIBR1532,终浓度为 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L,再加入 0.1 μ L 的 1 U/mL 凝血酶激活)。每组加入 2 μ L 抗 CD62P 抗体和 1 μ L 的抗 PAC-1 抗体,混匀后于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。随后加入 4% 多聚甲醛固定,在 4 $^{\circ}$ C 下避光保存,流式细胞仪检测 CD62P 和 PAC-1 阳性率。每组实验重复 9 次。

1.6 血小板铺展实验

取洗涤血小板 4.8 mL,调整浓度为 1.5×10^7 /mL,分为空白对照组 (溶剂处理) 和 BIBR1532 处理组 (终浓度 5 μ mol/L)。将 2 组血小板均匀铺展在纤维蛋白原涂层的玻片上,37 $^{\circ}$ C 孵育 40 min。使用罗丹明标记的鬼笔环肽染色,显微镜下拍摄图像,并随机挑选 5 个视野,使用 NIH Image J 软件量化血小板铺展面积。

1.7 血小板血块收缩实验

取洗涤血小板 1.8 mL,调整浓度为 3×10^8 /mL,分为空白对照组 (溶剂处理) 和 BIBR1532 处理组

(终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$), 置于 37°C 备用。使用 4°C 的 Tyrode's 缓冲液按 1 : 10 稀释凝血酶原液并置冰上备用。取 2 组聚集管, 先加入 $300 \mu\text{L}$ 无血小板血浆, 再分别加入 $100 \mu\text{L}$ 空白对照组和 BIBR1532 处理组的血小板, 接着加入 $4 \mu\text{L}$ 稀释的凝血酶, 迅速混匀后封口。将聚集管置于 37°C 培养箱中, 每小时拍摄血栓块形成图像, 并使用 Image J 软件测量血栓块面积。每组实验重复 3 次。

1.8 血小板活化通路蛋白磷酸化水平检测

取洗涤血小板 3.6 mL , 调整浓度为 $3 \times 10^8/\text{mL}$, 分为空白对照组 (溶剂处理)、阳性对照组 (凝血酶激活) 和 BIBR1532 处理组 (终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 和 $10 \mu\text{mol/L}$)。提取 4 组蛋白质并使用二喹啉甲酸 (BCA) 法测定蛋白质浓度, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转膜, 5% 牛血清白蛋白 (磷酸化) 或脱脂奶粉封闭 1 h。抗 p-p65 (1 : 1000)、p65 (1 : 1000)、p-IkBa (1 : 1000) 和 IkBa (1 : 1000) 抗体 4°C 孵育过夜, 洗膜后室温孵育二抗 1 h, 应用 Odyssey 红外成像系统扫描条带, 并统计分析条带强度, 磷酸化蛋白表达水平通过与内参蛋白 GAPDH 归一化处理。每组实验重复 3 次。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均值 \pm 标准差表示, 数据呈正态分布且方差齐, 组间比较采用 t 检验以及方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

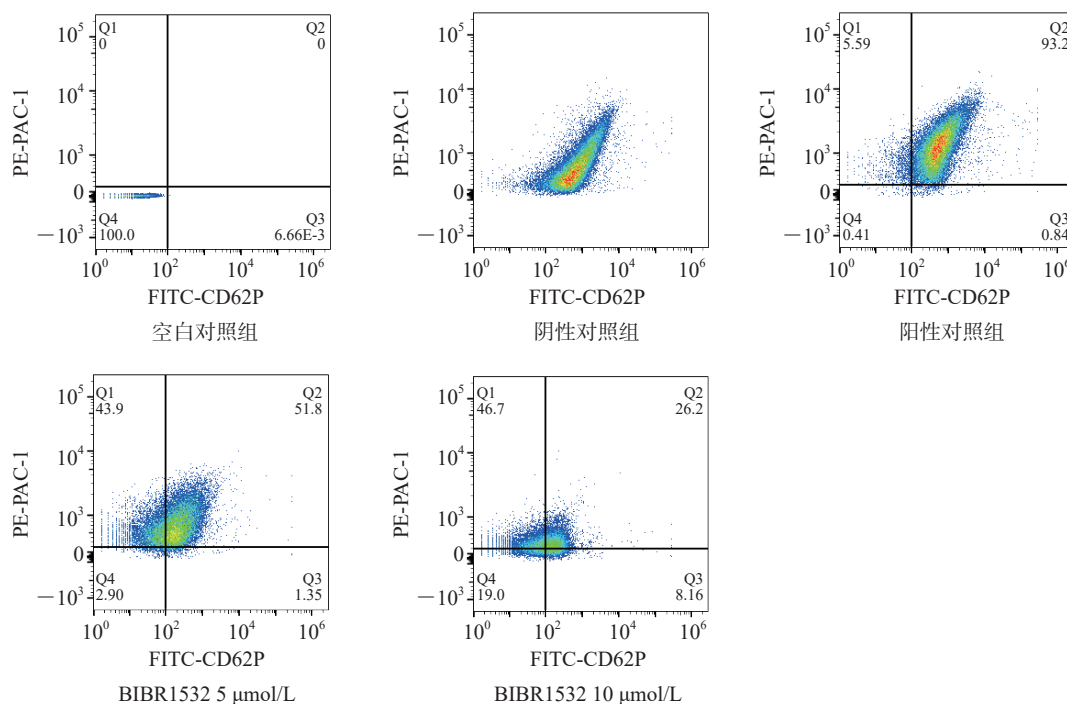
2 结果

2.1 不同刺激剂作用下 BIBR1532 对血小板聚集功能的影响

血小板聚集实验显示, 在凝血酶 (0.1 U/mL) 刺激下, 与对照组相比, BIBR1532 处理组的血小板聚集水平显著降低 [$(42.50 \pm 4.79)\%$ 对 $(68.75 \pm 1.25)\%$, $P < 0.01$]。在胶原蛋白 ($1.5 \mu\text{g/mL}$) 刺激下, 与对照组相比, BIBR1532 处理组的血小板聚集水平降低 [$(6.25 \pm 2.39)\%$ 对 $(71.75 \pm 1.18)\%$, $P < 0.01$]。

2.2 不同浓度 BIBR1532 对血小板活化标志物表达的影响

流式细胞术检测结果显示, 与阳性对照组相比, BIBR1532 $5 \mu\text{mol/L}$ 处理组的 CD62P、PAC-1 阳性表达率降低, BIBR1532 $10 \mu\text{mol/L}$ 处理组的 CD62P、PAC-1 阳性表达率降低更明显 (P 均 < 0.01)。见图 1、表 1。



注: 横坐标为 CD62P, 纵坐标为 PAC-1, CD62P 阳性表达率为 Q2+Q3, PAC-1 阳性表达率为 Q1+Q2

图1 血小板表面 CD62P、PAC-1 表达的流式检测图

表1 5组活化血小板CD62P、PAC-1阳性表达率比较/%

分组	CD62P阳性表达率	PAC-1阳性表达率
空白对照组	3.54±2.21	5.38±1.05
阴性对照组	9.91±2.36	17.15±2.08
阳性对照组	83.69±7.37 ⁽¹⁾	87.00±9.32 ⁽¹⁾
BIBR1532 5 μmol/L组	46.23±0.36 ⁽²⁾	60.11±14.31 ⁽²⁾
BIBR1532 10 μmol/L组	26.30±4.10 ⁽²⁾⁽³⁾	33.44±6.62 ⁽²⁾⁽³⁾

注：与阴性对照组相比，⁽¹⁾ $P<0.01$ ；与阳性对照组相比，⁽²⁾ $P<0.01$ ；与BIBR1532 5 μmol/L相组比，⁽³⁾ $P<0.01$

2.3 BIBR1532对血小板铺展功能的影响

与对照组相比，BIBR1532处理组血小板在纤维蛋白原上的铺展面积显著缩小[(37.62±1.69) μm²对(72.83±4.14) μm², $P<0.01$]。见图2。

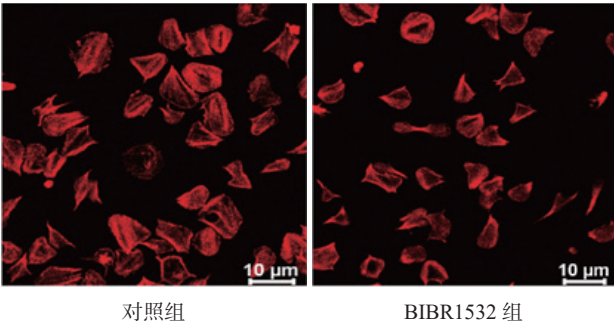


图2 血小板铺展面积图像

2.4 BIBR1532对血小板血块收缩功能的影响

栓缩发生1 h后，与对照组相比，BIBR1532处理组的血小板血块收缩速率减慢[(0.15±0.05)对(0.51±0.14), $P<0.01$]。栓缩发生2 h后，与对照组相比，BIBR1532处理组的血小板血块收缩速率减慢[(0.46±0.02)对(0.73±0.10), $P<0.01$]。

2.5 BIBR1532对血小板活化过程中通路蛋白磷酸化水平的影响

Western blot 检测结果显示，与阳性对照组相比，BIBR1532 5 μmol/L处理组血小板活化过程中NF-κB信号通路相关的关键蛋白p65、IκBα的磷酸化水平显著降低，BIBR1532 10 μmol/L处理组降低更明显(P 均 <0.01)。见表2。

表2 4组血小板活化过程中NF-κB通路关键蛋白磷酸化水平比较

分组	p-p65	p-IκBα
空白对照组	0.42±0.02	0.40±0.04
阳性对照组	0.79±0.06 ⁽¹⁾	0.80±0.09 ⁽¹⁾
BIBR1532 5 μmol/L组	0.63±0.03 ⁽²⁾	0.56±0.06 ⁽²⁾
BIBR1532 10 μmol/L组	0.47±0.04 ⁽²⁾	0.47±0.02 ⁽²⁾

注：与空白对照组相比，⁽¹⁾ $P<0.01$ ；与阳性对照组相比，⁽²⁾ $P<0.01$

3 讨论

BIBR1532作为选择性端粒酶抑制剂，能通过减少端粒酶活性，抑制肿瘤细胞增殖^[5]。本研究发现，BIBR1532能抑制血小板的多个活化过程。CD62P是血小板α颗粒膜糖蛋白，静止状态下主要存在于α颗粒内，活化时会转移至血小板表面。PAC-1是血小板表面的重要受体，活化后会发​​生构象变化并与纤维蛋白原结合，其标志着血小板的早期活化^[9]。BIBR1532可抑制CD62P和PAC-1的阳性表达，且随浓度增加抑制效应更显著。这种抑制作用不仅有助于遏制肿瘤细胞的生长，还能减少血栓事件的发生。

血小板不仅在止血和血栓形成中发挥作用，还能通过释放多种炎症介质和生长因子，参与炎症反应^[10]。NF-κB属于转录因子，在免疫反应、炎症反应、细胞生长和存活等多种生物学过程中发挥关键作用^[11-13]。在血小板中，NF-κB通过非基因组效应参与调节血小板的活化和聚集^[14]。IκBα作为NF-κB的抑制蛋白，其降解能促进释放NF-κB，使NF-κB能够在血小板中发挥非基因组功能。此外，NF-κB的p65亚单位在被激活磷酸化后，可进一步调控血小板的功能^[15]。

Nasrollahzadeh等^[16]研究发现，三氧化二砷和BIBR1532能通过抑制NF-κB信号通路，协同抑制乳腺癌细胞的增殖。在肿瘤细胞中，TERT通过与磷酸化的p65相互作用，影响启动子激活和基因转录^[17-18]。本研究发现，BIBR1532可以抑制血小板中NF-κB信号通路的关键蛋白表达，这可能与抑制血小板活化的机制有关。血小板活化涉及磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和环磷酸腺苷/蛋白激酶A(cAMP/PKA)等多种信号通路，除NF-κB通路外，BIBR1532也可能通过其他途径影响血小板活化^[19]。BIBR1532被证实可以增强非小细胞肺癌对放射治疗的敏感性，并通过激活环鸟

苷酸-腺苷酸合成酶/干扰素基因刺激因子(cGAS/STING)信号通路,促进抗肿瘤免疫反应^[20]。这一机制是否在血小板中存在值得进一步研究。

血小板的异常激活与多种心血管疾病相关^[3]。在本研究中,BIBR1532 显示出抑制血小板活化的潜力,其通过抑制血小板聚集和降低血液黏稠度,可有效降低血栓形成风险。此外,BIBR1532 预处理可通过 TERT 介导的转录重编程使神经元具备缺血耐受性,增强细胞抗氧化能力。BIBR1532 能改变 TERT 与相关抗氧化酶基因启动子结合区域的分布,以应对缺血应激导致的细胞活性氧升高,从而保护线粒体,提示 BIBR1532 在预防和治疗脑损伤以及心血管缺血性疾病中具有较高的研究价值^[21]。

本实验存在一些不足之处,未明确 BIBR1532 在血小板活化中的具体机制及 TERT 在其中的作用。未来还需深入探讨 BIBR1532 抑制血小板活化的分子机制,评估其在血栓预防和治疗中的安全性和有效性,特别是在与现有抗血小板药物联合使用时的效果。深入研究 BIBR1532 在抗血栓形成方面的潜在作用,将为临床预防和治疗心血管疾病提供新的思路和方向。

参 考 文 献

- [1] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159):1736-1788.
- [2] Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11):1423-1436.
- [3] Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(24):2482-2494.
- [4] Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(9):938-949.
- [5] Bryan C, Rice C, Hoffman H, et al. Structural basis of telomerase inhibition by the highly specific BIBR1532[J]. *Structure*, 2015, 23(10):1934-1942.
- [6] Altamura G, Degli Uberti B, Galiero G, et al. The small molecule BIBR1532 exerts potential anti-cancer activities in preclinical models of feline oral squamous cell carcinoma through inhibition of telomerase activity and down-regulation of TERT[J]. *Front Vet Sci*, 2021, 7:620776.
- [7] Chen X, Tang WJ, Shi JB, et al. Therapeutic strategies for targeting telomerase in cancer[J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(2):532-585.
- [8] Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, et al. A pilot study of the telomerase inhibitor imetelstat for myelofibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(10):908-919.
- [9] 齐茗,王晨霞. 血小板活化标志物CD62P、PAC-1与心血管病关系研究的进展[J]. *心血管康复医学杂志*, 2014, 23(1):98-100.
- [10] Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer[J]. *Blood*, 2015, 126(5):582-588.
- [11] Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3):344-362.
- [12] Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology[J]. *Cell Res*, 2011, 21(2):223-244.
- [13] Cheng WJ, Cui C, Liu G, et al. NF- κ B, a potential therapeutic target in cardiovascular diseases[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2023, 37(3):571-584.
- [14] Kojok K, El-Kadiry AE, Merhi Y. Role of NF- κ B in platelet function[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(17):4185.
- [15] Fuentes E, Rojas A, Palomo I. NF- κ B signaling pathway as target for antiplatelet activity[J]. *Blood Rev*, 2016, 30(4):309-315.
- [16] Nasrollahzadeh A, Bashash D, Kabuli M, et al. Arsenic trioxide and BIBR1532 synergistically inhibit breast cancer cell proliferation through attenuation of NF- κ B signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 257:118060.
- [17] Hussain T, Chai L, Wang Y, et al. Activation of PPAR- γ prevents TERT-mediated pulmonary vascular remodeling in MCT-induced pulmonary hypertension[J]. *Heliyon*, 2023, 9(3):e14173.
- [18] Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, et al. TERT-regulation and roles in cancer formation[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:589929.
- [19] Ferrer-Raventós P, Beyer K. Alternative platelet activation pathways and their role in neurodegenerative diseases[J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 159:105512.
- [20] Ding XF, Cheng JJ, Pang QS, et al. BIBR1532, a selective telomerase inhibitor, enhances radiosensitivity of non-small cell lung cancer through increasing telomere dysfunction and ATM/CHK1 inhibition[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2019, 105(4):861-874.
- [21] Xie XM, Li MX, Zhou MY, et al. Pharmacological preconditioning by TERT inhibitor BIBR1532 confers neuronal ischemic tolerance through TERT-mediated transcriptional reprogramming[J]. *J Neurochem*, 2021, 159(4):690-709.

(收稿:2024-08-12 修回:2024-12-10)

(本文编辑:王群)