

cGMP 及其介导的信号通路在血小板聚集中的作用的研究进展

李青宴, 黄艳华, 沈磊* (大理大学药学院, 云南 大理 671000)

摘要: 血栓是缺血性心脑血管疾病的主要杀手, 血小板聚集在血栓形成过程中发挥着重要的作用。抗血小板聚集在血栓性疾病的治疗中无可替代。cGMP 对血小板功能的调节起到非常重要的作用, 且主要通过 eNOS-NO-cGMP-PKG 通路进行调节。本综述主要阐明 cGMP 在血小板聚集中的作用和机制。

关键词: 血小板聚集; 环磷酸鸟苷; 内皮型一氧化氮合酶; 一氧化氮; cGMP 依赖的蛋白激酶 G; 信号通路

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)23-3045-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.23.022

引用本文: 李青宴, 黄艳华, 沈磊, 等. cGMP 及其介导信号通路在血小板聚集中的作用的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(23): 3045-3049.

Research Progress of the cGMP Role and Its Mediated Signaling Pathway in Platelet Aggregation

LI Qingyan, HUANG Yanhua, SHEN Lei* (College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China)

ABSTRACT: Thrombosis is the main killer of ischemic cardiovascular and cerebrovascular diseases. Platelet aggregation plays an important role in the process of thrombosis. Anti-platelet aggregation is irreplaceable in the treatment of thrombotic diseases. cGMP plays a very important role in the regulation of platelet function; and its role is mainly through the eNOS-NO-cGMP-PKG pathway. This review mainly clarifies the effect and mechanism of cGMP on platelet aggregation.

KEYWORDS: platelet aggregation; guanosine 3',5'-cyclic monophosphate(cGMP); endothelial nitric oxide synthase(eNOS); NO; cGMP-dependent kinase(PKG); signaling pathway

黏附、聚集、分泌是血小板的三大基本功能。血小板与血小板之间的相互聚集成团称为血小板聚集。由病理因素引起的血小板过度活化可促进血小板聚集, 从而引起血栓性疾病。环磷酸鸟苷(guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate, cGMP)是一种细胞内普遍存在的第二信使, 由鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)作用于三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)生成^[1]。cGMP 是原核生物和真核生物中重要的信号通路分子, 参与多种生理功能, 如降低心肌代谢和收缩力, 调节平滑肌和血小板功能等^[2-3]。近年有大量研究表明 cGMP 可以调节血小板聚集, 是一个有潜力的抗血小板聚集新型靶点。因此, 本文就 cGMP 影响血小板聚集的作用和机制进行综述。

1 cGMP 对血小板聚集的影响

大部分研究表明 cGMP 水平升高可以抑制血小板聚集。通过促进 cGMP 生成、减少 cGMP 分解[如使用磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)抑制剂]或阻断血小板内的 cGMP 外排(如阻断多药耐药蛋白抑制剂 4 介导的 cGMP 外排)都能使 cGMP

水平升高^[3-6]。升高的 cGMP 通过抑制腺苷脱氢酶, 减少腺苷分解和抑制腺苷再摄取, 使血小板中环磷酸腺苷(cyclic adenosine phosphate, cAMP)及 cGMP 增加, 进而激活 cAMP 依赖的蛋白激酶(cAMP dependent protein kinase, PKA)和 cGMP 依赖的蛋白激酶 G(cGMP-dependent kinase, PKG)。2 种激酶激活后, 一方面降低胞浆内 Ca^{2+} 的水平来抑制血栓烷 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2)的生成, 另一方面增加前列环素的合成与活性, 使逆向聚集的血小板解聚, 从而产生抗血小板聚集作用^[4-5]。

少部分研究认为 cGMP 水平的降低可以起到抗血小板聚集的作用。牛雯颖等^[7-8]的研究发现, 补阳还五汤和丹参饮通过减少 cGMP 的水平来抑制血小板聚集活性, 但具体的机制还有待于进一步的深入研究。

还有研究者认为 cGMP 在调节血小板聚集中起双相调节作用。一方面, 内源性合成的低浓度 cGMP 可促进血小板活化和早期聚集反应, 并显著提高血小板对低浓度激动剂的敏感性; 另一方面, 高浓度 cGMP 及其类似物对血小板聚集有抑制作

基金项目: 云南省科技厅地方本科高校基础研究项目(2018FH001-096)

作者简介: 李青宴, 女, 硕士生 Tel: 18724983804 E-mail: 2240116487@qq.com *通信作者: 沈磊, 男, 博士, 副教授 Tel: (0872)2257412 E-mail: scort20009@163.com

用,其机制主要通过 cGMP 依赖的 cAMP 升高和 PKA 激活实现,也通过依赖于血小板中 cGMP 水平升高后产生的延迟抑制反应来实现^[9]。因此,低浓度 cGMP 促进血小板的聚集,而高浓度 cGMP 抑制血小板聚集。

2 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)-一氧化氮(nitric oxide, NO)-cGMP-PKG 信号通路与血小板聚集

cGMP 对血小板聚集的调节作用主要经 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路介导。

2.1 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路

该通路的主要成分包括:①eNOS。NOS 是一种同工酶,分为 eNOS、神经元型一氧化氮合酶和诱导型一氧化氮合酶 3 种亚型,分别由 NOS1、NOS2 和 NOS3 基因编码^[10-11]。其中 eNOS 存在于内皮细胞、平滑肌细胞和血小板等^[1,10],由人类第 7 号染色体上的 NOS3 基因编码,是这些部位 NO 合成的限速酶,对血管活性的调节发挥着重要作用,与心血管的正常生理活动密切相关^[10,12]。②NO。NO 是一种血管扩张因子,也是一种具有较高自由基活性的第二信使^[12]。在调节血小板功能中,一方面,NO 可扩张血管,抑制血小板的聚集;另一方面,NO 通过与可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)中的血红素结合,形成铁-亚硝酰复合物,从而抑制血小板的聚集以及血小板在内皮的黏附^[1,13]。③sGC。GC 是一种催化 GTP 转变为 cGMP 的酶。细胞中存在 2 种类型的 GC:sGC 和颗粒状 GC。NO 主要激活 sGC^[14]。④cGMP。cGMP 是一种第二信使分子,有 3 个主要作用靶点(PKG、cGMP 调节的 PDE 和 cGMP 门控离子通道)^[14]。在血小板功能调节中,cGMP 活化后激活 PKG,可抑制血小板聚集^[1-2]。⑤PKG。PKG 是 cGMP 依赖型蛋白激酶,能催化蛋白质的丝氨酸或苏氨酸磷酸化。PKG 有 2 种类型,即 PKGI 和 PKGII。PKGI 主要位于细胞质,由于 N'末端的剪接不同,又分为 PKGI α 和 PKGI β 2 种亚型。PKGII 主要存在于细胞膜中。血小板细胞主要表达 PKGI^[1]。

2.2 eNOS-NO-cGMP-PKG 通路介导的抗血小板聚集机制

在血管内皮细胞中,eNOS 作用于 L-精氨酸后合成并释放 NO^[10,15]。NO 一方面直接扩张血管,另一方面激活 sGC 后催化 GTP 生成 cGMP,继而活化 PKG,并降低 Ca²⁺浓度。PKG 通过自身磷酸

化生成 p-PKG,然后诱导多种蛋白的磷酸化,如血管扩张刺激磷蛋白(vasodilator stimulated phosphoprotein, VASP)、肌醇 1,4,5-三磷酸受体 I 相关蛋白等,继而触发多靶点的下游效应来抑制血小板聚集^[1,5,10,13,16-21]。PKG 在 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路中发挥着重要作用。一方面,PKG 直接刺激 eNOS 生成 NO,增加信号强度;另一方面,PKG 可通过几种非特异性的机制调节细胞内 Ca²⁺浓度。下游效应中,磷酸化的 VASP 可直接抑制肌球蛋白轻链激酶磷酸化对血小板功能的增强,并且抑制细胞内钙库中 Ca²⁺的释放^[16]。这条信号通路中,细胞内 Ca²⁺水平是 eNOS 活性的关键因素,当细胞内 Ca²⁺达到一定浓度时,钙调蛋白(calmodulin, CaM)的结构发生变化,与 Ca²⁺形成复合物 Ca²⁺-CaM。Ca²⁺-CaM 与 eNOS 结合后使 eNOS 构象发生变化,并破坏 eNOS 与小窝蛋白-1(caveolin-1)的结合,从而激活 eNOS^[1]。

调控 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路的主要上游机制是磷酸肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K)-PKB/Akt 信号通路^[22]。血小板受体激动剂诱导 PI3K 激活后将磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP₂)磷酸化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP₃)。PIP₃ 促进 3-磷酸肌醇依赖性激酶 1 和 Akt 的膜移位,使 Akt 磷酸化为活性形式^[9]后调节血小板聚集。Akt 有 3 种亚型,Akt1 通过 NO-cGMP 信号通路刺激血小板分泌和聚集;Akt2 介导 GPIIb-IX 依赖性的血小板活化,该作用也主要由 cGMP 信号通路介导;Akt3 也在血小板活化和血栓形成中起着重要而独特的作用^[23]。因此,PI3K 依次激活 Akt、eNOS 和 GC,导致 cGMP 升高,抑制血小板聚集^[22]。信号通路见图 1。

2.3 eNOS-NO-cGMP-PKG 通路的调控因素

抑制 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路中的部分成分可促进血小板聚集。如 sGC 和 cGMP 类似物 8-Br-cGMP 的抑制剂(如 ODQ),PKGI 的抑制剂能分别下调 GC、PKG 水平来促进血小板聚集^[24-25]。尼古丁能显著抑制 NO 生成和下调 eNOS 表达,从而增强血小板聚集^[26]。对冠心病全基因组的研究中发现,5 个风险基因与 NO-cGMP 信号通路有关,分别为编码 sGC α 1 亚单位的 *GUCY1A3* 基因,编码内皮型一氧化氮合酶的 *NOS3* 基因,编码磷酸二酯酶 3A 和 5A 的 *PDE3A* 和 *PDE5A* 基因,以及编码肌醇 1,4,5-三磷酸受体 I 相关蛋白的 *MRVI1* 基因,这些基因的异常表达会影响血小板聚集^[10]。

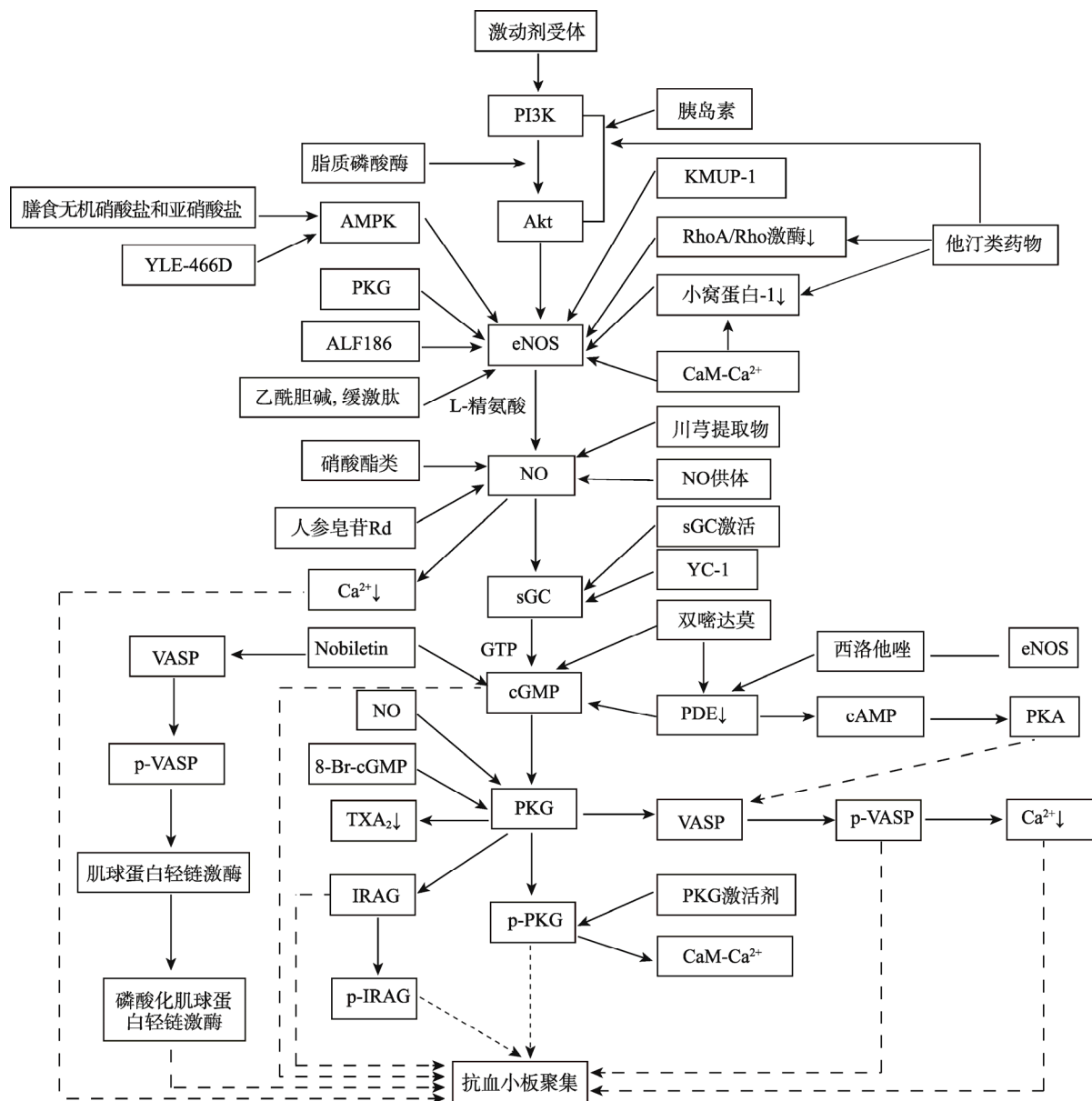


图1 eNOS-NO-cGMP-PKG 通路介导的抗血小板聚集机制图

Fig. 1 Mechanism of eNOS-NO-cGMP-PKG pathway mediated anti-platelet aggregation

激活 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路可抑制血小板聚集。这主要从 2 个方面进行调节,一方面,直接调节通路的各成分产生抗血小板聚集效应,如直接上调 eNOS、NO、cGMP、PKG 的水平。另一方面,间接作用于通路的信号分子来抗血小板聚集,如上调 eNOS 可以通过使用 eNOS 激动剂(如乙酰胆碱,缓激肽)^[10]、抑制 RhoA/Rho 激酶信号通路、抑制负调节因子 caveolin-1 的表达、使用腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK)激动剂等^[17,27];升高 NO 的释放可以使用 NO 供体(如硝普钠)^[3,15,18,20,27-28];激活 sGC 可以应用激活剂 riociguat(BAY 63-2521)、sGC 和 cGMP 类似物 8-Br-

cGMP 的诱导剂(YC-1)等^[10,25];另外 PKG 激活剂能抑制新生内膜形成和血小板聚集^[29]。

通过调节 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路的上游或下游机制也能调控血小板聚集。如脂质磷酸酶能水解 PIP₃,从而抑制 PI3K-Akt 和 cGMP 信号通路^[9,22,30];增加 PKG 和 PKA 的效应物 VASP 可以负调控血小板聚集^[5,17]。

3 靶向 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路的抗血小板药物

他汀类药物通过促进 NOS3 表达、Rho/Rho 激酶途径抑制和高胆固醇相关的 caveolin-1 表达中断机制以及激活 PI3K-Akt 通路来增强 eNOS 的

表达^[10,27], 并通过稳定 eNOS 的 mRNA, 减少超氧化物生成来增加血管细胞和血小板中 NO 的生物利用度, 诱导 NO 生成来抑制血小板聚集^[15]。胰岛素激活 PI3K/Akt 信号通路促进 eNOS 丝氨酸位点磷酸化来增加 NO 产生, 诱导血管舒张, 抑制血小板聚集, 从而维持血管内环境稳定, 对心血管系统起到保护作用^[19]。硝酸酯类药物通过酶促反应和巯基依赖途径产生 NO, 从而抑制血小板的相互聚集^[20]。AMPK 激活剂 YLF-466D、膳食无机硝酸盐和亚硝酸盐通过刺激 AMPK 磷酸化进而激活 eNOS, 从而减少血小板聚集^[13,17]。三七的主要生物活性成分人参皂苷 Rd 可以通过增强血管内皮的 NO 信号来抑制血小板聚集, 从而预防尼古丁诱发的心血管疾病^[26]。刘剑刚等^[31]实验表明, 川芎提取物能显著升高心肌缺血/再灌注损伤大鼠的 NO 水平, NO 与 GC 中的血红素部分结合, 刺激 cGMP 的生成, 从而舒张血管, 抑制血小板的黏附和聚集。双嘧达莫是腺苷转运抑制剂和 PDE 抑制剂, 通过促进 cGMP 生成和减少 cGMP 分解导致血小板内 cGMP 水平升高, 从而抑制血小板聚集^[4]。西洛他唑是新型的 PDEIII 抑制剂, 能抑制腺苷再摄取和血管平滑肌细胞增殖, 从而增加 eNOS 的磷酸化水平和促进 NO 表达, 起到抑制血小板聚集的作用, 这种作用具有可逆性, 出血反应小且出血持续时间短, 长期应用安全性好^[32-35]。新型释放分子(CORM)ALF186 能使 eNOS 水平升高, 通过调节血小板功能来对抗视网膜和大脑急性缺血性损伤^[26]。黄嘌呤和腺嘌呤生物 KMUP-1 作用于 NO-cGMP-PKG 信号通路和 MAPK 家族以应对缺氧诱导的细胞凋亡^[36]。其他一些抗血小板聚集药物如血红素依赖的 sGC 激活剂(如 YC-1、BAY 41-2272)和非血红素依赖的 sGC 激活剂(如 cinaciguat BAY 58-2667)^[10]、PKG 激活剂 Exisulind 和西地那非^[10,29]、影响 VASP 磷酸化的甲氧基黄酮类化合物 Nobletin^[16] 等都能靶向于 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路来抑制血小板聚集。

4 结语和展望

随着近年来血小板活化信号网络的不断研究, 血小板在血栓性疾病治疗中的作用已不可替代^[9,21]。靶向 cGMP 及其介导的 eNOS-NO-cGMP-PKG 信号通路是一种新型抗血小板药物的作用靶点, 该靶点为开发精准治疗血栓性疾病且不良反

应小的药物提供了重要参考。

REFERENCES

- [1] 李洋, 杨为民. eNOS-NO-cGMP-PKG 信号转导通路在心血管系统缺血再灌注损伤中的作用及研究进展[J]. 医药前沿, 2014(16): 353-355.
- [2] TAN X M. Preparation of rabbit monoclonal antibody against cGMP and development of competitive ELISA for cGMP determination[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [3] RUSSWURM M, KOESLING D. Measurement of cGMP-generating and -degrading activities and cGMP levels in cells and tissues: Focus on FRET-based cGMP indicators[J]. Nitric Oxide, 2018(77): 44-52.
- [4] 汪昊. 氯吡格雷与双嘧达莫联用对急性脑梗死患者血黏度的影响[J]. 抗感染药学, 2017, 14(5): 1033-1034.
- [5] HONG Q, MA Z C, HUANG H, et al. Antithrombotic activities of ferulic acid via intracellular cyclic nucleotide signaling[J]. Eur J Pharmacol, 2016(777): 1-8.
- [6] MENDES-SILVERIO C B, LESCANO C H, ZAMINELLI T, et al. Activation of soluble guanylyl cyclase with inhibition of multidrug resistance protein inhibitor-4(MRP4) as a new antiplatelet therapy[J]. Biochem Pharmacol, 2018(152): 165-173.
- [7] NIU W Y, YUAN Y, DENG S Y, et al. Effects of Buyang Huanwu decoction on the biological indexes in platelet in rats with blood stasis and qi deficiency[J]. China J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2019, 34(7): 3261-3265.
- [8] ZHANG Y K, FENG Y N, BIAN J Q, et al. Effects of Danshen decoction on platelet biology of model rats with blood stasis due to qi deficiency[J]. World Chin Med(世界中医药), 2019, 14(4): 848-851, 858.
- [9] ESTEVEZ B, DU X P. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling[J]. Physiol Bethesda Md, 2017, 32(2): 162-177.
- [10] WOBST J, SCHUNKERT H, KESSLER T. Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk[J]. Nitric Oxide, 2018(76): 105-112.
- [11] YI X J, ZHU J F, YU L X, et al. Combining serum pharmacokinetics and network pharmacology to explore the pharmacodynamic material basis and mechanisms of Yangxinshi tablet in treating coronary heart disease[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(16): 1954-1962.
- [12] LIU D, WANG B L, ZHANG L M. Research progress of endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide signal pathway in cardiovascular diseases[J]. Chin Heart J(心脏杂志), 2015, 27(1): 95-98.
- [13] CARLSTRÖM M, LUNDBERG J O, WEITZBERG E. Mechanisms underlying blood pressure reduction by dietary inorganic nitrate[J]. Acta Physiol (Oxf), 2018, 224(1): e13080. Doi: 10.1111/apha.13080.
- [14] PAN G Y, LIN R, WU B, et al. Relationship between activation of cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G signaling pathway and reperfusion injury salvage kinase signaling pathway[J]. J Chongqing Med Univ(重庆医科大学学报), 2013, 38(12): 1438-1444.

- [15] NI R, PELEG T, GROSS P L. Atorvastatin delays murine platelet activation *in vivo* even in the absence of endothelial NO synthase[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(11): 2609-2615.
- [16] VAIYAPURI S, ROWETH H, ALI M S, et al. Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(16): 4133-4145.
- [17] LIU Y Q, PARK J M, OH S J, et al. Antiplatelet effect of a newly developed AMP-activated protein kinase activator YLF-466D[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015(760): 81-87.
- [18] 宋麒麟, 蒋桔泉. 他汀类药物对血小板功能影响的研究进展[J]. *华南国防医学杂志*, 2016, 30(12): 823-826.
- [19] TIAN Y, ZHOU M S. Vascular insulin resistance: A Pandora's box for cardiovascular and metabolic diseases[J]. *J Shenyang Med Coll(沈阳医学院学报)*, 2020, 22(1): 1-6.
- [20] 孙昇燕. 硝酸酯类药物的抗血小板聚集和粘附作用[J]. *国外医学: 心血管疾病分册*, 2003, 30(2): 105-106.
- [21] XU D D, XU Y J, XIE S X, et al. Review of antiplatelet aggregation[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2019, 37(3): 597-601.
- [22] STOJANOVIC A, MARJANOVIC J A, BROVKOVYCH V M, et al. A phosphoinositide 3-kinase-AKT-nitric oxide-cGMP signaling pathway in stimulating platelet secretion and aggregation[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(24): 16333-16339.
- [23] O'BRIEN K A, STOJANOVIC-TERPO A, HAY N, et al. An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis[J]. *Blood*, 2011, 118(15): 4215-4223.
- [24] GUR S, SIKKA S, ALZWERI L, et al. 084 bromelain induces relaxation of human corpus cavernosum tissue *in vitro* independent nitric oxide-cGMP pathway: Possible significance for erectile dysfunction[J]. *J Sex Med*, 2019, 16(4): S44. Doi: 10.1016/j.jsxm.2019.01.095.
- [25] SCHALLNER N, ROMÃO C C, BIERMANN J, et al. Carbon monoxide abrogates ischemic insult to neuronal cells via the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60672. Doi: 10.1371/journal.pone.0060672.
- [26] ZHANG B, HU X, WANG H, et al. Effects of a dammarane-type saponin, ginsenoside Rd, in nicotine-induced vascular endothelial injury[J]. *Phytomedicine*, 2020(79): 153325. Doi: 10.1016/j.phymed.2020.153325
- [27] BALAKUMAR P, KATHURIA S, TANEJA G, et al. Is targeting eNOS a key mechanistic insight of cardiovascular defensive potentials of statins?[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(1): 83-92.
- [28] URABE S, KOKUBO K, TSUKAO H, et al. Suppression of platelet reactivity during dialysis by addition of a nitric oxide donor to the dialysis fluid[J]. *Ren Replace Ther*, 2020, 6(1): 1-7.
- [29] KIM J Y, YANG H M, LEE J E, et al. Activation of protein kinase G(PKG) reduces neointimal hyperplasia, inhibits platelet aggregation, and facilitates Re-endothelialization[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 36979.
- [30] WENG Z, LI D, ZHANG L, et al. PTEN regulates collagen-induced platelet activation[J]. *Blood*, 2010, 116(14): 2579-2581.
- [31] LIU J G, ZHANG D W, LIU Y Y, et al. Separation of extracts from Chuanxiong Rhizoma and the pharmacological effects on myocardium of ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(19): 2369-2375.
- [32] CHENG G H, QIAN J N, LI W D. Effect comparisons of Cilostazol and Ticagrelor in the treatment of acute ischemic stroke with Clopidogrel resistance[J]. *China Mod Med(中国当代医药)*, 2019, 26(22): 48-50, 64.
- [33] Guangdong Pharmaceutical Association. Guidelines on individualized pharmaceutical care for antiplatelet drugs based on pharmacogenomics[J]. *Pharm Today(今日药理学)*, 2020, 30(9): 584-591.
- [34] LIU M J. The clinical observation on cilostazole combined with aspirin in cerebral infarction interventional therapy[J]. *China Heal Stand Manag(中国卫生标准管理)*, 2018, 9(11): 86-88.
- [35] TU Q. Progress in pharmacological action and clinical application of cilostazol[J]. *Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志)*, 2017, 25(6): 644-648.
- [36] LEE M L, SULISTYOWATI E, HSU J H, et al. KMUP-1 ameliorates ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis through the NO-cGMP-MAPK signaling pathways[J]. *Molecules*, 2019, 24(7): E1376. Doi: 10.3390/molecules24071376.

收稿日期: 2020-08-03
(本文责编: 沈倩)