

血小板微粒的研究进展*

邓新立 综述, 丛玉隆 审校(解放军总医院南楼检验科, 北京 100853)

【关键词】 血小板微粒; 结构; 生理特性; 形成

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.10.038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1227-03

血小板微粒是血小板在活化过程中释放的一种超微膜性囊泡, 直径小于 $1\ \mu\text{m}$ 。血小板微粒在体内的形成与血小板各种激活剂、剪切力、补体等有关。血小板微粒膜上表达多种活性标记物, 参与人体血栓与止血, 并与血管再生、感染性疾病有关。其测定有各种方法, 以流式细胞仪检测法为主。血液中的细胞微粒可来自多种细胞, 如血小板、红细胞、白细胞、内皮细胞。但血小板微粒占多数, 它可占循环血液中细胞微粒的 $70\% \sim 90\%$ ^[1]。血小板微粒在血液中水平的升高与多种疾病相关, 如特发性血小板减少性紫癜、溶血性尿毒症综合征、动脉血栓、肝素诱导的血小板减少症和播散性血管内凝血等。近年来, 人们对血小板微粒的结构、形成、功能、检测方法以及与临床疾病的关系进行了广泛的研究, 现综述如下。

1 血小板微粒的形成

1967 年, Wolf 发现并描述了血小板微粒, 并对上述现象进行了解释: 乏血小板血浆和血清中均存在血小板微粒, 它具有很强的促凝活性。后来的研究证实, 不但是血小板, 血液中的红细胞、白细胞等均可形成细胞微粒, 并以其细胞表面标记来分类这些微粒, 例如, 表面带 CD41 或 CD42b 的微粒为血小板微粒。

当然, 血小板微粒的形成是一个十分复杂的过程, 其具体机制并不明确。研究证实, 活化是血小板产生微粒的必需条件而非充分条件。血小板产生微粒, 必须先通过各种途径被激活, 激活途径包括常规的血小板激活剂、纤溶酶、补体 C、抗血小板抗体、高剪切力等^[2-3]。有研究表明, 血液循环中带 CD41 的微粒部分来自巨核细胞, 而且这类微粒可能占 CD41 微粒的多数^[4-5]。但是, 源自血小板的微粒和源自巨核细胞的微粒是有区别的^[4-5], 例如前者 CD62P 阳性, 而后者 CD62P 阴性; 就与疾病的相关程度而言, 前者相关性高。补体 C 是人体免疫系统的一个重要组成成分, 但它与凝血系统、止血系统有密切联系。有研究证实, 在某些疾病中, 补体 C 活化是血小板微粒形成增多的主要原因。在正常的人体血液循环中, 血小板受到不同剪切力的作用, 从 20 世纪 70 年代开始, 人们就对剪切力对血小板的作用进行了广泛的研究^[6]。人们用各种方法对血流形成剪切力, 以观察血小板的活化情况, 结果发现, 剪切力作用下, 血小板形成微粒的数量增加。剪切力作用下的血小板微粒形成机制十分复杂, 有多种血栓与止血因素参与, 可能还与补体 C 的活化有关。

2 血小板微粒的结构及生理特性

用电镜对血小板微粒进行研究, 发现血小板微粒大小不等, 其直径可小到 $0.02\ \mu\text{m}$, 但一般不大于 $1\ \mu\text{m}$ 。静息状态下

血小板膜上表达的 40 多种糖蛋白, 大多可在血小板微粒膜上表达; 血小板膜上的许多活化标记物, 如 CD62p、CD63、暴露纤维蛋白原结合位点的 GP II b/III a 也可在血小板微粒膜上表达^[7]。但是, 不同激活剂诱导形成的血小板微粒, 膜上表达的糖蛋白有可能不同^[7]。

人们研究发现, 凝血酶和胶原激活血小板, 其表达出的血小板激活因子(PAF)活性源自血小板微粒^[8], 而其他激活途径下血小板释放的血小板激活因子也大部分与血小板微粒相关, 所以血小板微粒具有很强的促凝活性, 尤其是带 β 淀粉样前体蛋白的血小板微粒^[7]。由于血小板激活因子在血栓、血小板减少症、炎症反应和过敏反应中起着重要作用, 血小板激活因子受体拮抗剂有望成为新一代的抗血小板药物, 所以血小板微粒对于抗血小板治疗研究具有重要价值。

血小板微粒不仅具有促凝活性, 也参与人体的抗凝过程^[9]。Tans 等研究证实, 血小板微粒有促进活化蛋白 C 灭活活化 V 因子的作用。他们观察到, 加入二磷酸腺苷或肾上腺素, 活化蛋白 C 灭活活化 V 因子的速度可加快 4 倍, 加入凝血酶可加快 11 倍, 加入胶原可加快 29 倍, 加入 A23187 可加快 60 倍, 这种加速作用 25% 源自血小板微粒。Bode 等研究证实, 血小板微粒可加强肝素的抗凝作用, 所以不能简单地认为血小板微粒是一种血小板激活因子样的磷脂结构。人体内的血小板微粒不仅大小各异, 形态结构不同, 而且在生理特性上也有一定的差别。例如, 并不是所有的血小板微粒都有促凝活性或抗凝活性, 不同的血小板微粒促凝活性、抗凝活性不同。

另外, 血小板微粒也参与细胞间的相互作用。Jy 等在研究白细胞与血小板相互作用时发现, 血小板微粒可与中性粒细胞结合, 并且可在 2 个中性粒细胞之间充当连接体, 使中性粒细胞连接成串珠状。后来人们发现, 血小板微粒可促进单核细胞与内皮细胞相互作用, 刺激单核细胞分泌黏附分子^[10-11]。

3 血小板微粒的检测

从血小板微粒被发现至今, 对血小板微粒的分析大致包括 3 个方面: 血小板微粒的计数和定量、血小板微粒的相关功能活性分析(如促凝活性)、探讨血小板微粒可能存在的功能活性。

3.1 显微镜观察 血小板微粒一般小于 $1\ \mu\text{m}$, 使用特殊显微镜(如激光共聚焦显微镜和电子显微镜)才可以观察到血小板微粒。使用显微镜观察虽然需要先进的仪器, 但比较直观, 而且可观察血小板微粒的形态及内部结构。

3.2 使用放射标记的单抗方法 采用这种方法一般要先将乏血小板血浆或血清超高速离心, 并用缓冲液洗涤沉淀, 然后

* 基金项目: 解放军总医院苗圃基金资助项目(01YQ06)。

用¹²⁵I 标记的抗微粒膜上相关蛋白(如 GP I b、GP II b 等)的抗体与微粒结合,再经洗涤,然后测定沉淀物的放射性,以推算血小板微粒的量。这种方法比较繁琐,且有放射性污染物的产生,现在也较少使用。

3.3 酶联免疫吸附试验 制备纯化 CD41 或 CD42b 抗体,待检的血小板微粒可与其结合,从而可采用酶联免疫吸附试验检测微粒^[12]。这种方法的优点是可检测各种不同大小的血小板微粒、标本处理简便;缺点是检测结果易受可溶性抗原干扰、与其结合的抗体性质易变。

3.4 流式细胞仪的方法 流式细胞仪是研究血小板微粒的有力工具,可以说,近 30 年来,正是由于流式细胞仪的使用,人们才对血小板微粒有了深入而广泛的认识。应用流式细胞仪分析血小板微粒,不仅操作简单,且可对其表达的蛋白进行准确测定^[13-14]。

早期应用流式细胞仪分析血小板微粒,多采用大功率激光测定前向角(反应微粒大小)的方法,这种方法较为粗糙,存在红细胞、白细胞源性微粒的干扰,但在健康人和血栓疾病患者血中血小板源性微粒占绝大多数(在 90% 以上),所以这种方法在当时也是较准确的。后来由于免疫学和荧光标记技术的发展,人们制备了针对血小板膜糖蛋白的荧光标记抗体,如异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗 GP II b/III a (CD41a)单抗,并把它们应用到流式细胞仪测定血小板微粒上,排除了红细胞、白细胞源性微粒的干扰,大大提高了血小板微粒分析的准确性。

现在的流式细胞仪激光功率虽已大为下降,它们还可以对大多数细胞进行分析,但使用这种流式细胞仪分析体积很小的血小板微粒,仅测量前向角是不够的。有实验证实,如果仅用测定前向角的方法来测量血小板微粒,80% 的血小板微粒将被遗漏。使用荧光标记的单克隆抗体就可弥补这一缺陷,它可以达到与大激光功率流式细胞仪一样的测定效果。以荧光标记的单克隆抗体分析血小板微粒的方法现已被广泛使用,使用的荧光素包括 FITC、藻红蛋白,使用的抗体包括抗 CD41、抗 CD42、抗 CD61、抗 CD62p 等。

血小板微粒分析的另一个重要方面就是其绝对计数^[13-14]。如果对流式细胞仪的进样进行严格规定,如一定的时间、一定的速度,就可以对所分析样本中的血小板微粒进行准确的定量。另外,在测定样本中加入一定量的红细胞或其他微粒,也可以用流式细胞仪对样本中的血小板微粒进行定量。当然应用上述计数进行血小板微粒的绝对计数存在较大的空间差异,影响因素包括离心速度、荧光标记单抗、测定方法、血小板的激活途径等。

4 血小板微粒与临床疾病的关系

有研究证实,血小板微粒在人体血栓与止血、细胞的相互作用及人体免疫等过程中发挥着重要作用,它与多种疾病的发生、发展及预后、防治有着密切的关系。

4.1 血栓与止血性疾病 Scott 综合征和 Castaman 缺陷主要是由于血小板微粒减少导致的。Scott 综合征是一种罕见的出血性疾病,其血小板微粒形成障碍。有研究证实,所有的血小板激活剂均不能诱导其血小板微粒的形成,且伴有活化 V 因子受体数量和功能上的缺陷。同时其红细胞也存在形成红细胞微粒的障碍。Castaman 缺陷是一种出血性疾病,出血时间延长,血小板微粒形成能力低下,同样的血小板激活剂其形成量

是健康人的 18%~25%。它和 Scott 综合征不同,其凝血酶原活酶活性正常。虽然它同 Scott 综合征一样,血清中存在大量的凝血酶原,但加入磷脂后,其凝血酶原消耗实验可纠正。

人们首先报道血小板微粒增多的病例是免疫性血小板减少性紫癜。1975 年,有人用透射电镜在这类患者中发现了血小板微粒和红细胞微粒,1991 年有人用流式细胞仪对患者的血小板微粒进行了测定,1992 年免疫性血小板减少性紫癜患者血小板微粒增多这一现象获得了学术界的认可。血小板数量的多少有时并不能预示出血发生的概率,有些患者血小板多可能出血,有些患者血小板少不出血甚至有血栓形成的危险,这其中可能是因为血小板微粒起作用。然而,免疫性血小板减少性紫癜又是这一方面的特例,因为其血小板微粒增多却有出血倾向。免疫性血小板减少性紫癜患者血小板微粒增多的原因有待进一步探讨。

由于血小板微粒的促凝活性,大多数学者认为,它可能参与动脉血栓的病理过程。它可能是动脉粥样硬化潜在的预警指标^[15-16],表达 CD62p 的血小板微粒在外周动脉性疾病和心肌梗死患者血液循环中明显增多。发生于小血管的短暂性缺血患者,血小板微粒明显升高。Lee 等曾对小血管脑中风和大血管脑中风患者的血小板微粒进行比较研究,发现小血管脑中风患者的血小板微粒浓度明显高于大血管脑中风患者,血小板微粒升高与小血管脑中风明显相关。

其他与血小板微粒升高相关的疾病还有:体外循环的患者、急性冠状动脉综合征、血中存在抗磷脂抗体的患者、药物诱发的小血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜等。

4.2 血管再生 许多研究证实,血小板微粒可诱导血管再生,并与癌的转移有关^[17]。在肿瘤生长期,血小板微粒可在成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等的介导下促进血管壁的形成。无论是在体内还是体外,血小板微粒均可诱导血管壁发芽。另外,在心肌梗死部位注射血小板微粒,可明显增加新血管形成的数量^[18]。

4.3 感染性疾病 血小板微粒可像一个带菌体,转移受体至接收细胞,进而传播感染^[19]。所以,如果患者血液循环中的血小板微粒增加,可导致感染的扩散^[19]。HIV 感染者血液循环中的血小板微粒明显增加^[20]。

活化血小板释放大量的微粒是它增加磷脂表面的一种有效方式,以便激活和集结促凝因子和抗凝因子,加速血小板活化局部的止血与血栓过程。血小板微粒在正常和病理止血过程中起着重要作用,广泛参与血栓形成、抗凝、白细胞黏附、血小板和内皮细胞的相互作用等过程,血小板微粒的研究对止血与血栓性疾病的研究与防治具有重要价值。

参考文献

- [1] Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 30: 111-142.
- [2] Zwicker JI, Trenor CC 3rd, Furie BC, et al. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(4): 728-733.
- [3] Morel O, Toti F, Jesel L, et al. Mechanisms of microparticle generation; on the trail of the mitochondrion[J]. Semin Thromb Hemost, 2010, 36(8): 833-844.

- [4] Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles [J]. Blood, 2009, 113(5):1112-1121.
- [5] Flaumenhaft R, Mairuhu AT, Italiano JE. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles [J]. Semin Thromb Hemost, 2010, 36(8):881-887.
- [6] Marcus A, Broekman MJ, Drosopoulos JH, et al. Antithrombotic activity of human endothelial cell ecto-ADPase/CD39 [J]. J Invest Med, 1997, 99(6):1351-1360.
- [7] Jy W, Horstman LL, Ahn YS. Microparticle size and its relation to composition, functional activity, and clinical significance [J]. Semin Thromb Hemost, 2010, 36(8):876-880.
- [8] Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease [J]. Hypertension, 2006, 48(2):180-186.
- [9] Owens AP 3rd, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis [J]. Circ Res, 2011, 108(10):1284-1297.
- [10] Barry OP, Pratico D, Fitzgerald G. Platelet microparticles enhance adhesive interactions between monocytes and endothelial cells [J]. J Clin Invest, 1997, 45(9):2118-2127.
- [11] Prokopi M, Mayr M. Proteomics: a reality-check for putative stem cells [J]. Circ Res, 2011, 108(4):499-511.
- [12] Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles [J]. Thromb Haemost, 2004, 2(10):1842-1851.
- [13] Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma [J]. Cytometry A, 2010, 77(6):502-514.
- [14] Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles [J]. Thromb Haemost, 2011, 105(3):396-408.
- [15] Rautou PE, Vion AC, Amabile N, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis [J]. Circ Res, 2011, 109(5):593-606.
- [16] Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(11):2358-2368.
- [17] Pap E. The role of microvesicles in malignancies [J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 714(2):183-199.
- [18] Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration [J]. Thromb Haemost, 2011, 105(Suppl 1):S13-33.
- [19] Meziani F, Delabranche X, Asfar P, et al. Bench-to-bedside review: circulating microparticles—a new player in sepsis [J]. Crit Care, 2010, 14(5):236.
- [20] Corrales-Medina VF, Simkins J, Chirinos JA, et al. Increased levels of platelet microparticles in HIV-infected patients with good response to highly active antiretroviral therapy [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010, 54(2):217-218.

(收稿日期:2012-02-12)

弥散性血管内凝血的新认识及实验诊断进展*

陆晓华^{1△}, 程礼敏², 李伟³, 丁敏²综述, 王国光³, 徐蕾⁴审校(皖南医学院:1. 机能实验中心; 2. 学生科研兴趣小组; 3. 病理生理教研室; 4. 生物化学教研室; 安徽芜湖 241002)

【关键词】 弥散性血管内凝血; 实验诊断; 发病机制; 诊断进展

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 10. 039 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)10-1229-03

自 1951 年 Schneioler 报道在产科病例中发现了弥散性血管内凝血(DIC)以来^[1], DIC 就一直是医学上的经典课题, 受到基础、临床学界的关注和重视。DIC 是在某些严重疾病基础上, 由特定诱因引发的复杂病理过程。致病因子引起人体凝血系统激活、血小板活化、纤维蛋白沉积, 导致弥散性血管内微血栓形成; 继之消耗性降低多种凝血因子和血小板; 在凝血系统激活的同时, 纤溶系统亦可激活, 或因凝血启动而致纤溶激活, 导致纤溶亢进。临床上多以出血、休克、多器官功能衰竭(MODS)以及血管病性溶血等为突出表现^[2-3]。随着科技的进步及几代医者的探索研究, 人们对 DIC 有了比较成熟的认识, 对它的病因与发病机制的研究逐步深入。目前 DIC 通过临床积极治疗主要采取: 去除潜在病因; 建立新的凝血纤溶间的动态平衡; 补充消耗的凝血因子恢复止血, DIC 的病死亡率比以前

大大降低。然而 DIC 的机制十分复杂, 许多方面至今仍未完全清楚, 临床上大多数 DIC 起病急骤、病情复杂、发展迅猛、预后凶险, 因此 DIC 仍然是当今临床上多种疾病并发的危重棘手综合征。本文通过查阅 DIC 相关资料, 就国内外近年来对 DIC 发病机制方面的新认识及其实验诊断进展作一综述。

1 国际血栓与止血学学会(ISTH)/科学标准化学会(SSC)对 DIC 的新定义

ISTH/SSC 2001 年制定的 DIC 定义为: “DIC 是指不同病因导致局部损害而出现以血管内凝血为特征的一种继发性综合征, 它既可由微血管体系受损而致, 又可导致微血管体系损伤, 严重损伤可导致 MODS”^[4]。这一定义的特点是: (1) 强调了微血管体系在 DIC 发生中的地位; (2) DIC 为各危重疾病的一个中间病理环节, DIC 终末损害多为器官功能衰竭; (3) 纤溶

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(30900243)。△ 通讯作者, E-mail: lxh480@163.com。