

血小板微粒体与缺血性脑卒中的相关性研究进展

萧云综述,陈煜森 审校

(广东医学院附属医院神经内科,广东 湛江 524000)

【摘要】 血小板微粒体(Platelet microparticles,PMP)是血小板在不同刺激作用下细胞膜脱落所形成的直径小于1.0 μm的微粒。血循环的PMP形成、释放及水平反映血小板活化。PMP具有促凝血作用,并且通过将其胞膜上生物活性物质传递给靶细胞,从而影响靶细胞的生物学功能。PMP水平升高被认为是血管性疾病的标志物,如缺血性脑卒中。本文就血小板微粒体在缺血性脑卒中的研究进展作一综述。

【关键词】 血小板微粒体;缺血性脑卒中;流式细胞术

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2012)07-110-04

Research progress in the correlation of platelet microparticles and cerebral ischemic stroke. XIAO Yun, CHEN Yu-sen. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, CHINA.

【Abstract】 Platelet microparticles (PMP) are a heterogeneous population of vesicles (<1 μm) generated from the plasma membrane upon platelet activation by various stimuli. The formation, release and level of circulating PMP reveal the platelet activation. The PMP exhibit procoagulant properties and mediate intercellular transfer of bioactive molecules to change the functions of the recipient cell. Elevation of PMP levels is considered now as an important marker of vascular dysfunction, including cerebral ischemic stroke. The objective of this paper is to review the developments of PMP in cerebral ischemic stroke.

【Key words】 Platelet microparticles; Cerebral ischemic stroke; Flow cytometry

血小板微粒体(Platelet microparticles,PMP)主要为血小板在受到不同刺激作用下细胞膜向外伸展变形,细胞膜部分以出芽方式形成小囊泡或伪足脱落进入微循环而形成的细小微粒,是血小板粘附或活化的产物。PMP的体积小于正常的血小板,直径0.1~1.0 μm,但具有完整的膜结构,其膜的成分与血小板相同,表达一些血小板的膜糖蛋白(GP)、血小板活化因子(PAF)、β-淀粉样前体蛋白、Ca²⁺依赖性蛋白酶(Calpain)和有促凝作用的磷脂等。PMP是血液循环中含量最多的微粒体,占有微粒体的70%~90%,在多种生理和病理过程中起着重要作用。正常人血液中含有少量PMP。本文就血小板微粒体的生物特性、检测及其在缺血性脑卒中的研究进展做一综述。

1 血小板微粒体的生物学特点

1.1 血小板微粒体的来源及形成机制 体内PMP主要来源于活化的血小板;而体外研究PMP的产生,必须先通过各种途径激活血小板。目前研究发现高切应力和多种激活剂,如凝血酶、胶原、肾上腺素、ADP、钙离子载体A23187及终端补体复合物C5b-9、抗血小板抗体等有关,作用于血小板均可引起PMP的释放,但不同的激活剂诱导所产生的PMP

大小相差甚远。PMP的形成和释放机制目前尚不清楚,但普遍认为细胞膜极性丢失及细胞膜骨架重排起到重要的作用。

细胞膜脂质双层中的脂质成分呈不对称分布,带负电荷的氨基磷脂(磷脂酰丝氨酸和磷脂酰乙醇胺)几乎全部分布在膜靠近胞质的内层,而磷脂酰胆碱和鞘脂主要分布在膜的外层。细胞通过酶消耗能量来维持膜脂质不对称性,在此过程中氨基磷脂转移酶、翻转酶(Flippase)和磷脂爬行酶(Scramblase)起到重要作用。当细胞受到促凝、促炎症等刺激时通常引起胞外Ca²⁺内流或胞内Ca²⁺贮存库的释放,导致胞浆Ca²⁺浓度升高,进而氨基磷脂转移酶和Scramblase激活,同时Flippase受到抑制,最终致使膜磷脂重新分布,磷脂酰丝氨酸(PS)由膜内层迁移至外层,引起PS暴露、出芽。钙离子流增加还可以活化Calpain,从而引起细胞骨架蛋白分子的变化。Calpain活化使细丝蛋白与肌球蛋白裂解,打乱维持支撑细胞膜的正常细胞骨架结构,可引起细胞收缩和细胞骨架重建,细胞外形改变、出芽,这些隆起的泡状物挤压胞膜并脱落,因此脱落的细胞微粒整合了一部分的源细胞膜表面蛋白和其他成分。

作者简介:萧云(1978—),男,广东省高州市人,主治医师,在读硕士。

研究发现早期凋亡的血小板通过细胞膜骨架的重塑和出芽方式也可以产生血小板微粒体。早期凋亡的细胞产生微粒体依赖于 pho 相关的激酶 ROCK1, 这个酶是通过 CASPASE 蛋白酶裂解介导激活的, 通过裂解激活的 ROCK1 可以促进细胞膜中肌球蛋白轻链的磷酸化以及肌动蛋白肌丝耦合断裂, 进而引起细胞膜骨架的重排, 最终导致微粒体的产生。

2009年, Flaumenhaft等^[1]发现在培养中鼠和人的巨核细胞中可产生 CD₄₁ 及 CD₆₁ 阳性的微粒, 但不同于血小板分泌的 PMP, 不表达 CD₆₂ 或 LAMP-1, 而且细胞骨架含量下降, 为健康人群中 PMP 绝对组成部分。2010年, Rank等^[2]发现骨髓经过放射后, 循环血中 CD₆₁ 阳性微粒大部分消失, 而 CD₆₂ 阳性微粒继续存在, 进一步支持了巨核细胞来源的 PMP。

1.2 血小板微粒体的生物学功能。

1.2.1 促凝血功能^[3] PMP 具有促凝血活性, 来自血小板激活过程中所释放的其表面富含的 PS、VIII 因子和 Va 因子。PS 促进了细胞和细胞之间的相互作用及在 Ca²⁺ 存在的条件下促凝血; VIII 因子为 Tenase 酶复合物形成的协同因子; Va 因子结合 Xa 因子后可形成凝血酶原酶的复合物。虽然 VIII 因子连接血小板是不稳定的, 但 VIII 因子和 Va 因子可稳定地结合于 PMP 的表面, 因此 PMP 可以不依赖血小板的激活而促进凝血, 且这种促凝血活性比血小板激活所致的凝血能够持续更长的时间。PMP 经血小板活化形成之后, 又可通过其含有的 PAF、Calpain、PS 等直接活化血小板, 并且通过 GP I b 与内皮下基质结合作为底物促进血小板进一步粘附于内皮细胞。此外, PMP 还可通过与内皮细胞、单核细胞的作用而促进血小板的活化。

1.2.2 抗凝血功能 PMP 可通过抑制蛋白 C 激活 Va 因子通路而抑制凝血功能, 蛋白 C 的抑制剂可结合于血小板和 PMP 表面的磷脂酰乙醇胺, 从而有效抑制磷脂所激活的蛋白 C 的通路。目前认为 PMP 具有的抗凝活性可能与磷脂在内外小叶之间的不完全翻转有关, 但以促凝血还是抗凝血为主的具体机制仍需要进一步研究探讨^[4-5]。

1.2.3 传递生物信息的作用 PMP 通过与靶细胞发生粘附, 将其胞膜上生物活性物质或胞浆成分传递给靶细胞, 从而影响靶细胞的生物学功能。例如: PMP 可激活平滑肌细胞 MAPK p42/44 的通路^[6]; PMP 通过转移 CD₄₁ 抗原而增强骨髓来源的造血干细胞对胶原蛋白的粘附能力^[6]; PMP 表达 CXCR4, 可将其传递给 CXCR4 (-) 细胞, 结果导致这些细胞获得对 HIV 的易感性^[7]。

2 血小板微粒体的检测方法

目前大约 75% 的实验室在使用流式细胞仪 (FCM) 测定 PMP, 是最常用的检测方法。但其他细胞如红细胞、单核细胞、白细胞等也能产生直径小于 1.0 μm 的微颗粒, 细菌尘粒等污染都可能干扰 PMP 的定量测定。FCM 测定法可利用 PMP 表面的抗原荧光抗体对其膜上的特异蛋白进行标记, 进一步对其加以区别, 然后根据其前向角散射光 (FS) 及荧光强度 (FL) 进行定量检测。常用的方法有: 全血法、富含血小板血浆 (PRP) 法、乏血小板血浆 (PPP) 法、内参定位法及改良流式细胞术等。PRP 法样品处理过程简单, 只需制备 PRP, 避免了 PPP 法中多次离心所造成的 PMP 丢失, 成为大多数实验室的首选方法。

流式细胞仪检测微粒的大小受到波长的限制, 小于 0.5 μm 的微粒很难检测到, 尽管新型的流式细胞仪和使用微球定位能检测到 0.3 μm 的微粒, 甚至更小的微粒, 但是通过对比其他检测技术 (如原子力量显微镜), 发现流式细胞仪低估了 PMP 的数量^[8]。此外, 由于 PMP 亚型的性质不同, 单用某种抗体标记物也可以低估 PMP 的数量。

在检测过程中由于使用流式细胞仪机器型号、样本处理、参数设置及分析方法不同, 导致 FCM 测定的血小板微粒体数量范围在 100~40 000/μl 之间广泛波动, 因此国际血栓与止血协会的科学标准委员会发布了 FCM 标准化 PMP 检测指南^[9], 而且被证实能在不同实验室可靠检测 PMP^[10]。在检测之前, 样本的处理也同样要标准化, 包括样本的离心步骤, 冰冻、抗凝、延迟时间、运输、保存、融解等环节亦需进一步探讨^[11-12], 但这方面的报道比较少, 此外, 分析方法亦需要一个统一的标准。

一些新的技术如以阻抗为基础的流式细胞术、电化学阻抗分析、原子力量显微镜、动态光散射检测在 PMP 的检测取得很大的进展, 特别是可以不管微粒的大小检测所有的微粒, 但上述仪器昂贵稀少以致难以有效广发应用, 并且缺乏有效的抗体分子标记物。总而言之, 尽管 FCM 存在缺陷, 但因其操作简便, 速度快和结果准确, 目前仍是最好检测 PMP 的方法, 特别是临床应用。

3 血小板微粒体在缺血性脑卒中的临床意义

3.1 血小板微粒体与不同亚型缺血性脑卒中的相关性 1996年, Bulboacă^[13]用电子显微镜观察到缺血性脑卒中患者血小板活化释放微囊泡 (Microvesicles), 而健康个体中观察不到这种现象。研究发现一名特发性血小板减少性紫癜 (ITP) 伴有进展性认知

功能障碍的患者,血样中PMP数量明显增高。回顾分析这些患者发现,没有出血症状的患者比有出血症状的患者PMP增高,伴有认知功能障碍的患者PMP增高更明显,这些患有认知功能障碍的患者经MRI证实有脑缺血疾病,因此推测PMP在ITP患者中替代了血小板功能而限制出血,在高水平时诱发脑微血管的血栓形成^[14]。随后Ahn等^[15]通过增加观察样本及采用更先进的影像学检测进一步证实了上述观点。于是在非ITP的缺血性脑血管疾病患者中是否能观察到PMP增高这个问题引起了广泛兴趣。Lee等^[16]及其研究团队观察了短暂性脑缺血(TIA)、小血管脑卒中、大血管脑卒中、多发性硬化及阿尔茨海默病患者,发现除了阿尔茨海默病外,都能够观察到PMP数量增高,而且小血管脑卒中比大血管脑卒中增多得更明显,因此,推测长期及高水平的PMP或者某些亚型PMP可能会诱导脑缺血。1998年,在人工心脏瓣膜患者的研究中,Geiser等^[17]首次报告了脑血管疾病与外周血PMP之间的病理生理联系。

3.2 在缺血性脑卒中急性期的血小板微粒体变化 在脑梗死的急性期可以发现外周血PMP水平升高。2003年,Cherian等发现^[18],在脑梗塞急性期,外周血PMP升高与内皮功能异常的标记物P-选择素和E-选择素等相关,而且E-选择素血液浓度的升高与全部类型脑梗死强相关,特别是由大动脉的动脉粥样硬化所致的脑梗死。2009年,Kuriyama等^[19]发现在脑梗塞急性期血液中的PMP(ELISA法评估)水平升高,而其升高与颈动脉内膜中层厚度(IMT)和颈动脉颅内段狭窄相关。与心源性中风的患者相比,大脑前、后、中动脉脑梗死及腔隙性脑梗死患者的PMP水平显著性升高,这可能有助于心源性和血栓性中风之间的鉴别诊断。小血管闭塞或大血管闭塞所致急性期脑梗塞的PMP水平均比对照组高,其升高与伴随的IMT、颅内动脉狭窄显著性相关,这些证据是非常支持血液PMP水平可作为动脉粥样硬化斑块的生物评价的重要指标^[20]。Csongrádi等^[21]在肥胖患者中发现PMP水平与IMT以及动脉粥样硬化其他危险因素存在正相关,进一步支持上述观点。

3.3 在缺血性脑卒中慢性期中的血小板微粒体变化 在脑梗死慢性期,外周血PMP水平仍然升高,并且未受一些特殊的抗血小板治疗所影响(阿司匹林联合西洛他唑)^[22]。而相反,TIA患者经抗血小板治疗(阿司匹林和氯吡格雷的组合)可使外周血PMP下降^[23]。由于PMP的水平在脑梗死慢性期与脑梗死急性期比较仍然是不变的,因此,脑梗死患者PMP可能是脑动脉

粥样硬化斑块的剪应力增加评估的特异生物指标。Maria等^[24]在评估脑梗死慢性期血小板活性及反应性时发现,PMP水平增高与P-选择素呈负相关,血小板活性逐渐增高,PMP分离现象占主导优势,容易受到抗血小板药物的影响。由于PMP促凝作用及血栓形成的特性,不利于脑梗死预后。因此,脑梗死患者PMP的评估不仅显示血小板活化,而且可显示内皮功能障碍,可能是一个重要的预后参数。

3.4 治疗缺血性脑卒中的潜在策略 尽管目前对PMP水平增高诱发了脑梗死还是脑梗死导致PMP水平增高仍存在争议,但2008年Ahn就提出了将降低PMP作为治疗脑梗死的手段。抑制PMP的形成或者阻断各细胞来源微粒体的相互作用是两种基础的方法。目前已经清楚有几种微粒体抑制剂,例如Calpain抑制剂,然而这些药物是否适合人体内使用仍在探索阶段。PMP抑制剂还可以明显抑制来源于内皮细胞的微颗粒形成,获得收益远远超过其已知的药理学作用。

综上所述,PMP主要来源于活化的血小板,参与正常生理及病理情况下的止血过程,可反映血栓或血栓前状态。FCM检测PMP的方法具有操作简单及客观精密等优点,为其在临床的广泛应用提供了有效的检测手段。PMP的定量检测对脑梗死的诊断、治疗和预后评估有重要意义。PMP在脑缺血性疾病发病机制中起重要作用,但其具体作用机制仍不清楚;抑制PMP形成成为治疗脑梗死的新策略,但缺乏循证医学证据支持;已知几种抑制PMP生成的药物,但在人体实验中尚缺乏稳定性。深入研究PMP的生理病理效应将为进一步揭示脑梗死的发病机制、特异性治疗方法及预防提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles[J]. *Blood*, 2009, 113: 1112-1121.
- [2] Rank A, Nieuwland R, Delker R, et al. Cellular origin of platelet-derived microparticles in vivo[J]. *Thromb Res*, 2010, 126: 255-259.
- [3] Horstman LL, Ahn Y S. Platelet microparticles: a wide-angle perspective [J]. *Oncol/ Hematol*, 1999, 30(2): 111-142.
- [4] Horstman LL, Jy W, Bidot CJ, et al. Antiphospholipid antibodies: paradigm in transition[J]. *J Neuroinflammation*, 2009, 6: 3.
- [5] Moake JL. Thrombotic microangiopathies[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347: 589-600.
- [6] Baj-Krzyworzecka M, Majka M, Pratico D, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp[J]. Hematol*, 2002, 30 (5): 450-459.
- [7] Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, et al. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CX-

- CR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV [J]. AIDS, 2003, 17 (1): 33-42.
- [8] Yuana Y, Oosterkamp TH, Bahatyrova S, et al. Atomic force microscopy: a novel approach to the detection of nanosized blood microparticles[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8: 315-23.
- [9] Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7: 190-197.
- [10] Lacroix R, Robert S, Poncelet P, et al. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry using calibrated beads: results of ISTH SSC collaborative workshop [J]. J Thromb Haemost, 2010, 8: 2571-2574.
- [11] Mobarrez F, Antovic J, Egberg N, et al. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles [J]. Thromb Res, 2010, 125: 110-116.
- [12] Orozco AF, Lewis DE. Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma [J]. Cytometry A, 2010, 77: 502-514.
- [13] Bulboacă. A - Evaluarea funcționalității plachetare în boala cerebrovasculară, Teză de doctorat, UMF Cluj-Napoca, 1996.
- [14] Jy W, Horstman LL, Arce M, et al. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias [J]. J Lab Clin Med 1992, 119: 334-345.
- [15] Ahn YS, Horstman LL, Jy W, et al. Vascular dementia in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP) [J]. Thromb Res, 2002, 107: 337-344.
- [16] Lee YJ, Horstman LL, Janania J, et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias [J]. Thromb Res, 1993, 72: 295-304.
- [17] Geiser T, Sturzenegger M, Genewein U, et al. Mechanisms of cerebrovascular events as assessed by procoagulant activity, cerebral microemboli, and platelet microparticles in patients with prosthetic heart valves [J]. Stroke, 1998, 29: 1770-1777.
- [18] Cherian P, Hankey GJ, Eikelboom JW, et al. Endothelial and platelet activation in acute ischemic stroke and its etiological subtypes [J]. Stroke, 2003, 34: 2132-2137.
- [19] Kuriyama N, Nagakane Y, Hosomi A, et al. Evaluation of factors associated with elevated levels of platelet-derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction [J]. Clin Appl Thromb Haemost, 2010, 16(1): 26-32.
- [20] Kuriyama N, Nagakane Y, Hosomi A, et al. Evaluation of factors Associated with elevated levels of Platelet-derived microparticles in the Acute Phase of Cerebral Infarction [J]. Clin Appl Thromb Haemost, 2009, 4: 1076-1087.
- [21] Csongrádi E, Nagy B Jr, Fulop T, et al. Increased levels of platelet activation markers are positively associated with carotid wall thickness and other atherosclerotic risk factors in obese patients [J]. Thromb Haemost, 2011, 106(4): 683-692.
- [22] Shirafuji T, Hamaguchi H, Kanda F. Measurement of platelet-derived microparticle levels in the chronic phase of cerebral infarction using an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Kobe J Med Sci, 2008, 54: 55-61.
- [23] Serebruany VL, Malinin AI, Pokov AN, et al. Antiplatelet profiles of the fixed-dose combination of extended-release dipyridamole and lowdose aspirin compared with clopidogrel with or without aspirin in patients with type 2 diabetes and a history of transient ischemic attack: a randomized, single-blind, 30-day trial [J]. Clin Ther, 2008, 30: 249-259.
- [24] Lukasik M, Rozalski M, Luzak B, et al. Platelet activation and reactivity in the convalescent phase of ischaemic stroke [J]. Thromb Haemost, 2010, 103(3): 644-650.

(收稿日期:2011-10-30)

医药前沿

基因疗法治疗血友病获初步成功

乙型血友病又称为因子IX缺乏症或血浆凝血活酶成分缺乏症,是由于凝血因子IX编码基因突变导致该凝血因子功能缺陷而致病。目前对该病的治疗方法是定期注射凝血因子IX。最近Nathwani等采用基因疗法治疗乙型血友病取得了初步成功。小规模临床试验表明,患者只需要接受一次注射,自我凝血的能力就能大幅改善,且暂未发现副作用。

该研究采用血清型8腺相关病毒(AAV)作为载体,将表达凝血因子IX (FIX)的基因按低、中、高剂量组(每组2人),通过手臂注射的方式导入到6例乙型血友病患者的体内。所有患者随访6~16个月。结果显示,6例患者血液中FIX水平均

达到正常水平的2%~11%。其中4例患者停止常规FIX预防后未发生自发性出血现象。另2例患者两次常规FIX注射时间跨度显著延长。高剂量组中1例患者出现短暂的无症状的血清转氨酶水平增高,另1例患者出现肝酶水平轻微增高,经短期糖皮质激素治疗后,2例患者转氨酶水平很快恢复至正常水平,且FIX水平维持在正常水平的3~11%。

(摘译自:Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in Hemophilia B [J]. N Engl J Med, 2011, 365: 2357-2365)