论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201504095

血小板活化功能及血小板微粒对重型血友病A临床异质性的意义

秦芳梅,叶洁瑜,黄顺桦,李志涛,易正山,郑忠信,刘 阳,孙 竞 (510515 广州,南方医科大学南方医院血液科)

[摘要] **目的** 应用流式细胞术检测血小板表面特异性抗原和血小板微粒(platelet microparticles, PMPs),并探讨血小板活化程度及PMPs对重型血友病A患者临床表现异质性的意义。**方法** 应用特异性荧光单抗CD41a-APC, CD42b-PE ,CD61-FITC, CD62P-PE, and CD63-PE及标准荧光校准微珠流式细胞术检测血小板微粒,比较不同临床表型重型血友病A患者(FⅧ: C <2%)外周血血小板CD62P和CD63表达率和PMPs水平,其中轻度表型10例(年出血次数<6) ,重度表型21例(年出血次数≥24),正常对照者17例。**结果** 重度表型组和轻度表型组CD62P阳性率均值高于正常对照组[(36.2±9.27)% *vs*(22.06±10.72)%,P=0.001];[(49±11.81)% *vs* (22.06±10.72)%,P=0.000];轻度表型组CD62P表达阳性率高于重度表型组[(49±11.81)% *vs*(36.2±9.27)%,P=0.0408)]。重度出血表型组和轻度出血表型组CD63阳性率均值高于正常对照组[(34.82±7.13)% *vs* (19.08±17.05)%, P=0.04; (51.15±14.30)% *vs* (19.08±17.05)%, P=0.000];轻度表型组较重度表型组CD63阳性率均值高[(51.15±14.3)% *vs* (34.82±7.13)%, P=0.004 4]。轻度表型组PMPs高于重度表型组及正常对照组高[(2.06± 1.33)% *vs* (0.95±0.64)%, P=0.02];[(2.06±1.33)% *vs* (1.06±1.20)%, P=0.02]。**结论** 血小板活化功能及血小板微粒是影响重型血友病A临床表型的因素,轻度表型患者血小板活化功能、血小板微粒水平较重度表型高。

[关键词] 血友病A; 临床表型; 异质性; 流式细胞术; 微粒

[中图法分类号] R331.143; R446.61; R554.1 [文献标志码] A

Significance of platelet activating capacity and platelet-derived microparticles in clinical phenotype heterogeneity of hemophlia A: report of 31 cases

Qin Fangmei, Ye Jieyu, Huang Shunhua, Li Zhitao, Yi Zhengshan, Zheng Zhongxin, Liu Yang, Sun Jing (Department of Hematology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the levels of platelet specific antigens and platelet-derived microparticle (PMPs) by flow cytometry (FCM) in hemophlia A patients, and analyze their clinical significances in the phenotype heterogeneity of the patients with severe hemophlia A. **Methods** Thirty-one patients with severe hemophlia A (aged from 18 to 33, median 23.5) were enrolled in this study. They were 10 with mild type (annualized bleed rates <6) and 21 with moderate and severe type (annualized bleed rates ≥ 24). Another 17 healthy male volunteers served as normal controls. Their supernatant plasma samples were measured for baseline PMPs count, with phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies CD41. Fluorescent microspheres of 1.0 μm and standard fluorescent microbeads (0 to 1.0 μm) in diameter were used to set the microparticle gate, and the antibodies of CD41a-APC, CD42b-PE, CD61-FITC, CD62P-PE, and

[基金项目] 广东省自然科学基金(S2011010003897)

[通信作者] 孙 竞,E-mail: jingsun.cn@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150629.1433.004.html(2015-06-29)

CD63-PE specific to platelets derived from platelets were employed to analyze the expression of corresponding platelet activating antigens by flow cytometry. **Results** The expression percentage of CD62P and CD63 was obviously higher in the mild type than the sever type patients (mean ± SD: 49 ± 11.81 *vs* 36.2 ± 9.27, P = 0.040 8); (mean ± SD: 51.15 ± 14.3 *vs* 34.82 ± 7.13, P = 0.004 4) and a higher mean level of PMPs counts in mild type patients compared to severe type (mean ± SD: 2.06 ± 1.33 *vs* 0.95 ± 0.64, P = 0.02). **Conclusion** Platelet activating capacity and PMPs exert certain effect on clinical phenotypes of hemophlia A. The mild patients have stronger platelet activating capacity and higher PMPs count than the severe ones.

[**Key words**] hemophlia A, phenotype; heterogeneity; flowcytometry ; mircoparticle

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (S2011010003897). Corresponding author: Sun Jing, E-mail: jingsun.cn@gmail.com

血友病A是一种较罕见的X染色体连锁的隐性遗传性出血性疾病,以自发性关节和肌肉出血为主要临床表现。通常根据其血浆中FⅧ水平(FⅧ:C)分为亚临床型、轻型、中型、重型。在未经治疗的情况下,重型血友病患者平均每月可发生1~6次自发性关节、肌肉及软组织出血,重型患者往往反复发生关节出血而导致关节残疾。然而近年来对血友病人群调查发现,约有10%~15%的重型血友病A患者仅表现为轻度的出血(年出血≤6次/年),称作重型血友病A的临床表现异质性[1-3]。我们前期工作也发现了存在异质性的现象。

血友病临床表现异质性影响因素的研究在FⅧ基因突变类型、纤溶蛋白等方面已有较多,血小板在凝血过程中起着至关重要的作用,然而与血小板相关的因素在血友病临床表型方面研究还很少。本研究拟通过比较重型血友病A不同临床表型的患者及正常人群血小板活化功能和活化的血小板释放的PMPs来探索血小板对于重型血友病A患者临床表现异质性的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

依据Bethil TC分型方案,以FⅧ活性(FⅧ:C)<2%界定重型血友病A患者,分别以自发性出血频率6次/年、24次/年为分界点,年出血频率≤6次/年为临床表现轻度组,>24次/年为临床表现重度组[1],2012年2月至2014年4月间,从广东省血友病病例信息管理中心(南方医科大学南方医院血液科)筛选出登记有完整病史资料的重型血友病A患者共367例,选取年满18岁、1年内未进行连续3个月以上预防治疗且未合并其他基础疾病的门诊随访患者,排除FⅧ抑制物阳性患者。经知情告知,有31例患者(18~33岁,中位年龄23.5岁)自愿加入本项研究,其中重度表型组21例,轻度表型组10例,另有17名健康成年男性志愿者自愿加入本试验。各组间年龄、体质量均匹配,体质量指数(BMI)在正常范围内。该试验获取知情同意,并通过本院伦理审核。

1.2 标本制备与检验

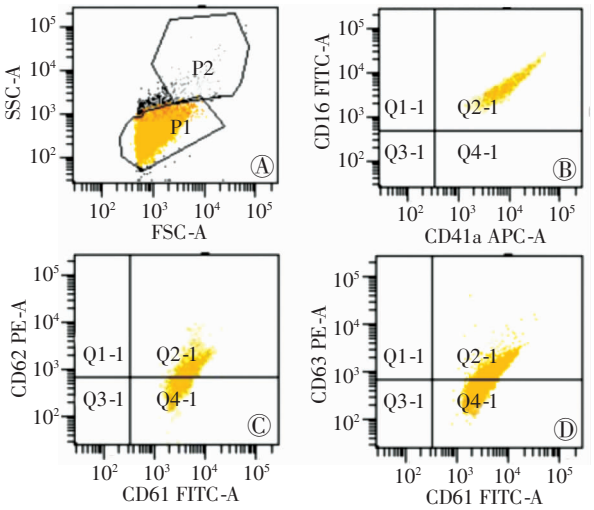
1.2.1 富血小板血浆(PRP)制备 72 h之内无出血事件、无用药记录的患者清晨空腹静息状态下第2管静脉血2.7 mL以枸橼酸钠抗凝,轻轻混匀,800 r/min室温离心5 min,分离血浆,上层液为PRP。

1.2.2 无血小板血浆(PFP)制备 取富血小板血浆以1 550×g室温离心20 min,取上清液以18 000×g 20 ℃离心20 min,此为无血小板血浆,取样进行全自动血细胞分析仪计数,确认血小板血小板浓度为0×10^9/L[3]。

1.2.3 血小板表面CD62P和CD63的表达检测 每管取新鲜PRP标本5 μL加入10 μL荧光素标记单抗,抗体组合为①IgG1-APC+CD61-FITC;②CD61-FITC+CD41a-APC+CD42b-PE;③CD61-FITC+CD62P-PE;④CD61-FITC+CD63-PE。室温避光静置15 min,使抗体与细胞表面标记充分结合;加入5 mL的pH 7.4 PBS洗涤,3 000 r/min离心5 min,弃液,除去多余的未结合的单克隆抗体,加入1%多聚甲醛0.5 mL进行稀释,即刻上机收集:以FSS-SSC,做双参数散点图,圈取血小板群,分析血小板群中CD61、CD62P或CD61、CD63双阳性细胞的百分率,所得结果FACSDiva Version 6.1.3软件进行分析后输出(图1)。

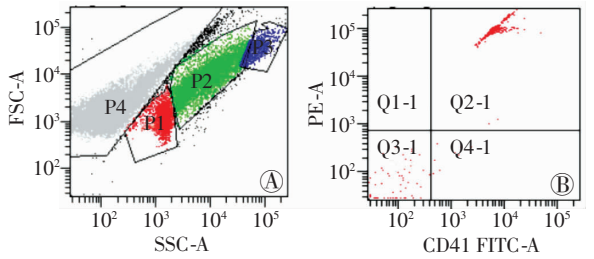
1.2.4 PMPs流式细胞仪检测 每管取PFP 10 μL加入1 μL标准荧光微珠,同型对照加入IgG1-PE 5 μL,测定管加入CD41-FICT 5 μL,加样后室温避光孵育30 min,使荧光单抗与血小板微粒特异性结合,检测前用PBS溶液将容积调整至0.5 mL,上机检测。以直径

1 μm 标准荧光微球进行定位对照及设门，对门内颗粒（微颗粒直径在 0～1 μm）进行分析[4]，CD41-FITC 阳性颗粒为 PMPs。结果经 FACSDiva Version 6.1.3 软件进行分析后输出（图 2）。



A：做 FSS-SSC 双参数散点图，对 CD61 阳性颗粒圈门；B～D：分析 P1 门内 CD41、CD62P、CD63 阳性百分率

图 1　流式细胞术检测血小板表面 CD62P 和 CD63 表达率



E：做双对数 FSC LOG-SSC LOG 散点图，直径 1 μm 荧光微珠作为定位对照圈门 P1，分析 <1 μm 范围内颗粒 CD41 阳性的颗粒百分率；F：Q2-1 为 CD41 阳性颗粒

图 2　流式细胞术检测 PMPs 结果

1.3.5　统计学处理　　所得数据使用 SPSS 16.0 软件分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单向方差分析。重度表型组不同条件下微粒水平比较采用配对样本 t 检验。

2　结果

2.1　一般病例资料比较

重度表型组（n =21）年龄（23.5 ±5.3）岁，轻度表型组（n =10）年龄（28.9 ±7.1）岁。重度表型组血小板计数（292.5 ±83.7）G/L，轻度表型组血小板计数（256.3 ±60.5）G/L，正常对照组平均血小板计数（239.5 ±50.8）G/L，轻度表型组与正常对照组间 P 值 0.351 9，差别不显著；重度表型组与正常对照组间 P 值 0.369，差别不显著，重型血友病 A 不同表型组间比较 P 值为 0.621 7，差别不显著。正常对照组（n =17）年龄（31.08 ±8.11）岁，各组间年龄差异不显著。重度表型组 FⅧ:C 均值为［（0.96 ±0.35），（n =21）］，轻度表型组为［（1.04 ±0.24），（n =10）］，两组的 FⅧ:C 比较 P =0.304，差别不显著。

2.2　各组血小板 CD62P 和 CD63 表达率的比较

重度表型组、轻度表型组 CD62P 阳性率均值高于正常对照组［（36.20 ±9.27）% *vs*（22.06 ±10.72）%，P =0.001；（49.00 ±11.81）% *vs*（22.06 ±10.72）%，P =0.000］；轻度表型组较重度表型组 CD62P 阳性率均值高［（49.00 ±11.81）% *vs*（36.20 ±9.27）%，P =0.040 8］。

重度出血表型组、轻度出血表型组 CD63 阳性率均值高于正常对照组［（34.82 ±7.13）% *vs*（19.08 ±17.05）%，P =0.04；（51.15 ±14.30）% *vs*（19.08 ±17.05）%，P =0.000］；重型血友病 A 轻度表型组较重度表型组 CD63 阳性率均值高［（51.15 ±14.30）% *vs*（34.82 ±7.13）%，P =0.004 4］（图 3）。

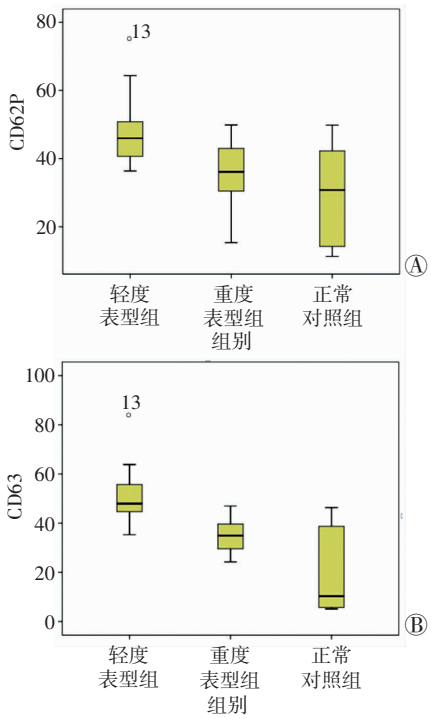


图 3　各组基线状态血小板 CD62P（A）、CD63（B）表达率的比较

2.3　各组基线状态 PMPs 血小板微粒比较

各组基线状态 PMPs 计数：正常组 PMPs 百分率为

(0.95±0.64)%,轻度表型组血小板微粒 PMPs 百分率为(2.06±1.33)%,重度表型组 PMPs 百分率为(1.06±1.20)%;各组间差异 P 值为 0.02,各组间差异显著。见图4。

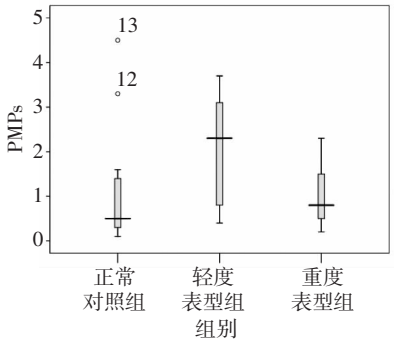


图4 各组基线状态 PMPs 血小板微粒比较

3 讨论

血小板活化是凝血过程中重要的环节,CD62P 和 CD63 的表达是衡量血小板活化程度的良好观测指标,我们的研究首先从血小板活性方面研究重型血友病 A 临床表型异质性,初步发现重型血友病 A 患者血小板数目与正常对照无差异,而成人重型血友病 A 轻度表型患者血小板表面 CD62P 和 CD63 的表达明显高于重度表型者,且两者均高于正常对照。国外 Carcao 等[5]通过比较血友病 A 患者和正常人的血小板活化状态发现,血友病患者基线状态下血小板活化及对刺激剂的应答更高,差异显著,提示血友病患者血小板可能存在预活化,P 选择素表达率越高凝血因子的消耗量越少。我们的结果证实了 Carcao 等的报道并进一步发现重型血友病 A 轻重临床表型组间血小板活化状态亦存在差异,这种血小板活化程度的差异可能是引起重型血友病 A 患者临床表现异质性的原因之一[6-8]。

PMPs 是血小板活化过程中的产物,在炎症、肿瘤等方面研究多见[9],国内对 PMPs 的研究多在特发性血小板减少性紫癜(ITP)、急性冠脉综合征、糖尿病等多种出血和血栓性疾病可见。有学者报道了 ITP 患者血小板少而患者外周血中 PMPs 升高显著、无临床出血症状的患者 PMPs 水平明显高于有出血症状的患者的现象,提示 PMPs 的止血作用在一定程度弥补了血小板数目减少所引起的出血倾向[9]。国内外关于血友病 PMPs 研究几乎是空白。我们的实验发现重型血友病 A 轻度表型的患者 PMPs 水平显著高于重度表型者,而且不同组血小板活化程度与 PMPs 有一致性。关于 PMPs 促凝活性的研究有学者认为可能与微粒表面携带磷脂酰丝氨酸(PS),表达多种活化标志物如 P-选择素和组织因子(TF,CD142)[10-13]促进凝血有关,Celi 等[14]认为 P 选择素的通路对凝血产生了影响。Hrachovinova 等[15-17]在动物模型上发现 P 选择素与 PSGL-1 作用产生的微粒能纠正血友病鼠的出血。在凝血作用的启动和进展过程中,更高的活化血小板水平释放更多的 PMPs,PMPs 上 PS 的暴露为凝血因子提供结合位点,在促进凝血加速止血过程中发挥了一定作用。血小板活化程度及活化后微粒释放量的差异是造成重型血友病患者临床表型异质性的原因。

参考文献:

[1] 李含, 孙竞, 周璇, 等. 中国重型血友病 A 的临床表现异质性及早期预测指标[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(3): 424-427.

[2] Jy W, Horstman L L, Jimenez J J, *et al*. Measuring circulating cell-derived microparticles [J]. J Thromb Haemost, 2004, 2(10): 1842-1851.

[3] Piccin A, Murphy W G, Smith O P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications [J]. Blood Rev, 2007, 21(3): 157-171.

[4] 易正山, 冯茹, 孟凡义, 等. 流式细胞术测定血小板功能活性的初步体会[J]. 微循环学杂志, 2003, 13(3): 69-70.

[5] Carcao M D, van-den-Berg H M, Ljung R, *et al*. Correlation between phenotype and genotype in a large unselected cohort of children with severe hemophilia A[J]. Blood, 2013, 121(19): 3946-3952, S1.

[6] Dovlatova N, Lordkipanidze M, Lowe G C, *et al*. Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders[J]. J Thromb Haemost, 2014, 12(5): 660-665.

[7] Watson S P, Lowe G C, Lordkipanidze M, *et al*. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(Suppl 1): 351-363.

[8] Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, *et al*. Paradoxical hyperfibrinolysis is associated with a more intensely haemorrhagic phenotype in severe congenital haemophilia [J]. Haemophilia, 2002, 8(6): 768-775.

[9] 刘成海, 彭松, 胡厚源, 等. 融合蛋白 TAP-SSL5 对血小板微粒与 THP-1 细胞结合及 Mac-1 活化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(9): 864-867.

[10] Santagostino E, Mancuso M E, Tripodi A, *et al*. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(4): 737-743.

[11] 丁卢胤，重型血友病临床表现异质性与抗凝蛋白及纤溶相关蛋白的关系[D]. 北京：北京协和医学院，2010.
[12] van-Bladel E R, Roest M, de-Groot P G, *et al*. Up-regulation of platelet activation in hemophilia A[J]. Haematologica, 2011, 96(6): 888－895.
[13] van-Dijk K, van-der-Bom J G, Fischer K, *et al*. Phenotype of severe hemophilia A and plasma levels of risk factors for thrombosis[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(5): 1062－1064.
[14] Celi A, Lorenzet R, Furie B C, *et al*. Microparticles and a P-selectin-mediated pathway of blood coagulation[J]. Dis Markers, 2004, 20(6): 347－352.
[15] 何敖林，陈军浩 方莹. 流式细胞术检测特发性血小板减少性紫癜患者血小板微粒[J]. 现代检验医学杂志，2008, 23(1): 74－76.
[16] Morel O, Toti F, Hugel B, *et al*. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors[J]. Curr Opin Hematol, 2004, 11(3): 156－164.
[17] Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, *et al*. Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A[J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1020－1025.

（**收稿**：2015-04-17；**修回**：2015-05-24）
（编辑 王 红）

经验交流

DOI：10.16016/j.1000-5404.201503058

颅内动脉瘤破裂伴脑内血肿形成的急诊手术治疗疗效分析

乔俊东，罗亚辉，李长春，魏文明 （635000 四川 达州，四川省达县人民医院神经外科）

[**关键词**] 动脉瘤；颅内；血肿
[**中图法分类号**] R651.1 [**文献标志码**] B

颅内动脉瘤破裂出血致蛛网膜下腔出血 Hunt-Hess 分级Ⅲ～Ⅴ级的治疗方案目前尚有争议，特别是在手术时机方面[1-2]。我们通过对我院 2007 年 8 月至 2014 年 2 月治疗的动脉瘤破裂伴脑内血肿患者的临床资料进行分析，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

男性 9 例，女性 5 例，年龄 57～72(63.0±7.2)岁，均为单一动脉瘤。后交通动脉 6 例，前交通动脉 5 例，大脑中动脉 3 例。血肿位于额叶 6 例，位于颞叶 7 例，位于侧裂 1 例；血肿量 38～60(42.2±12.3)mL。破裂后主要表现为轻-中度昏迷、瞳孔改变。术前 Hunt-Hess 分级为Ⅲ级 7 例，Ⅳ级 6 例，Ⅴ级 1 例。

1.2 手术方法

手术均采用显微外科技术，采用不同大小经翼点入路清除血肿同时夹闭动脉瘤颈，在血肿清除后大多脑组织塌陷良好，侧裂易于分离，其中 2 例脑压较高予以颞极切除，术中尽可能清除脑池内积血，术毕罂粟碱冲洗。其中 8 例行去骨瓣外减压，Ⅳ级与Ⅴ级病例共 7 例术毕即行气管切开。

2 结果

1 例术后 3 d 死亡，1 例术后 10 d 因肺部感染引发呼吸衰竭死亡外，其余患者术后住院时间 12～31(21.4±8.7)d。根据 GOS 预后评分标准，14 例患者出院时恢复良好者 9 例，轻度残疾 2 例，重度残疾 1 例，死亡 2 例。术前 Hunt-Hess Ⅲ级 6 例恢复良好，1 例轻度残疾；Ⅳ级 6 例，3 例恢复良好，1 例轻度残疾，1 例重度残疾，1 例术后一直深昏迷，后死于呼吸衰竭；Ⅴ级 1 例术后 3 d 死于脑干功能衰竭。无颅内感染病例，所有切口一期愈合，术后肺部感染 8 例，其中 3 例行气管切开，均治愈。

3 讨论

对 Hunt-Hess 临床分级Ⅲ～Ⅳ级颅内动脉瘤患者早期手术治疗的报道逐渐增多，Ⅴ级者不宜手术基本达成共识。本研究表明，Ⅲ级病例恢复良好，Ⅳ级者取得了较好疗效，Ⅴ级病例一般不宜手术。通过对该组病例的分析我们有如下体会。

3.1 手术的必要性

临床分级Ⅲ～Ⅴ级动脉瘤病情危重，特别是伴有颅内血肿的病例。因此必须行开颅血肿清除术，但单纯血肿清除术中操作导致动脉瘤破裂或减压后动脉瘤

（下转 1372 页）

[**通信作者**] 乔俊东，E-mail：1203252642@qq.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150702.0949.001.html(2015-06-29)