

阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者血小板膜补体复合物沉积及其异常活化的研究

孟银苹 付蓉 刘惠 王一浩 李丽娟 刘春燕 张田 丁少雪 李丽燕 阮二宝
瞿文 王化泉 王小明 王国锦 刘鸿 吴玉红 宋嘉 邢莉氏 关晶 邵宗鸿

【摘要】 目的 通过检测阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)伴或不伴再生障碍性贫血(AA)患者血小板膜补体复合物(C5b-9)、血小板活化分子(CD62p)表达及血清可溶性C5b-9(sC5b-9)水平探究PNH血栓形成的病理机制。方法 用ELISA方法检测25例PNH/PNH-AA患者血清sC5b-9、补体C3和C4水平,并以30名健康志愿者作为正常对照;采用流式细胞术检测PNH/PNH-AA患者与正常人血小板PNH克隆数(CD59⁻CD61⁺/CD61⁺)、血小板膜C5b-9沉积率(C5b-9⁺CD61⁺/CD61⁺)以及血小板活化标志分子CD62p表达率(CD62p⁺CD61⁺/CD61⁺),并进行相关性分析。结果 ①PNH/PNH-AA组患者血清sC5b-9水平为390.27(265.73~676.87) μ g/L,显著低于正常对照组的540.39(344.20~1 576.78) μ g/L($P<0.01$)。②PNH/PNH-AA组患者血小板PNH克隆数[50.58(23.29~81.60)%]显著高于正常对照组[23.57(15.58~29.02)%]($P<0.01$);PNH/PNH-AA组患者PNH克隆血小板膜C5b-9沉积率[(17.53 \pm 6.27)%]与患者正常血小板[(11.33 \pm 5.03)%]及正常对照组血小板[(10.88 \pm 3.58)%]相比均显著增高($P<0.01$)。③PNH/PNH-AA组患者PNH克隆血小板CD62p表达率[(61.98 \pm 11.71)%]与患者正常血小板[(43.76 \pm 11.30)%]及正常对照组血小板[(38.23 \pm 8.07)%]相比均显著升高($P<0.01$);PNH/PNH-AA组患者正常血小板膜CD62p表达率比正常对照组血小板显著增高($P<0.05$)。④血小板膜C5b-9沉积率与CD62p表达率呈显著正相关($r=0.449, P=0.002$)。结论 PNH/PNH-AA患者血小板锚连蛋白(CD59)缺失导致补体复合物C5b-9沉积于异常血小板膜并使其激活,这一过程可能参与PNH血栓的形成。

【关键词】 血红蛋白尿,阵发性; 补体膜攻击复合物; 血栓形成

Study on C5b-9 deposited on the membrane of platelets and its dysfunction in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria Meng Yinping, Fu Rong, Liu Hui, Wang Yihao, Li Lijuan, Liu Chunyan, Zhang Tian, Ding Shaoxue, Li Liyan, Ruan Erbao, Qu Wen, Wang Huaquan, Wang Xiaoming, Wang Guojin, Liu Hong, Wu Yuhong, Song Jia, Xing Limin, Guan Jing, Shao Zonghong. Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Corresponding author: Fu Rong, Email: florai@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the expression levels of terminal complement complex (C5b-9) and CD62p on platelets and the soluble C5b-9 (sC5b-9) level in serum in patients with PNH or PNH-aplastic anemia (AA). **Methods** Serum levels of sC5b-9, complement C3 and C4 were detected by using ELISA in 25 patients with PNH/PNH-AA. The quantities of C5b-9 and CD62p on the membrane of platelets were detected by flow cytometry. **Results** ①In PNH/PNH-AA group, the serum sC5b-9 level [390.27(265.73~676.87) μ g/L] was lower than that in control group [540.39(344.20~1 576.78) μ g/L] ($P<0.01$). ②The platelet PNH clone (CD59⁻CD61⁺/CD61⁺) size [50.58(23.29~81.60)%] was bigger in the PNH/PNH-AA group than that [23.57(15.58~29.02)%] in control group ($P<0.01$). The percentages of C5b-9 deposition (C5b-9⁺CD61⁺/CD61⁺) were higher on the PNH clone platelets (CD59⁻CD61⁺) in the PNH/PNH-AA group [(17.53 \pm 6.27)%] than those on the normal platelets (CD59⁺CD61⁺) in PNH patients

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.06.015

基金项目:国家自然科学基金(81370607、81400085);天津市自然科学基金重点项目(12JCZDJC21500);天津市卫生行业重点攻关项目(11KG135);卫生公益性行业科研专项(201202017);天津市自然科学基金面上项目(14JCYBJC25400)

作者单位:300052 天津医科大学总医院血液内科

通信作者:付蓉,Email: florai@sina.com

[(11.33±5.03)%] and control [(10.88±3.58)%] group ($P<0.01$). ③The expression of CD62p (CD62p⁺CD61⁺/CD61⁺) on PNH clone platelets in PNH patients [(61.98±11.71)%] was higher than that on the normal platelets in PNH patients [(43.76±11.30)%] and control group [(38.23±18.07)%] ($P<0.01$). In addition, the expression of CD62p on normal platelets was higher in PNH patients than control ($P<0.05$). ④The deposition of C5b-9 positively correlated with the expression of CD62p on the platelets ($r=0.559$, $P=0.002$). **Conclusions** Deficiency of CD59 antigen on platelets in PNH patients may lead to the deposition of C5b-9 on its membrane and its dysfunction, which may contribute to thrombosis events in PNH.

【Key words】 Hemoglobinuria, paroxysmal; Complement membrane attack complex; Thrombosis

阵发性睡眠性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)是一类罕见的获得性造血干细胞PIG-A基因突变引起磷脂酰肌醇(GPI)连接蛋白缺失的造血系统克隆性疾病,以血管内溶血和血栓栓塞为特征。血栓形成是PNH患者最常见的死因之一,占死因明确患者的40%~67%,29%~44%的PNH患者整个病程中至少会发生一次血栓事件^[1]。PNH血栓形成的机制尚不明确,血小板激活、补体介导的血管内溶血、一氧化氮消耗、纤溶系统功能障碍以及炎症介质损伤血管等都可能使PNH患者血栓形成风险增加。而补体介导的血小板过度激活可能是PNH患者血栓高发的原因^[2-4]。近年来,相关研究陆续证实了血小板锚连蛋白CD55、CD59缺失,即血小板PNH克隆(CD59⁻)的存在^[5-6],且与中性粒细胞PNH克隆(CD59⁻)呈显著正相关^[7]。膜蛋白CD59的缺失导致膜攻击复合物(C5b-9)在血小板膜上沉积并使其激活,可能加速血栓形成^[4]。本研究我们通过检测PNH患者血小板补体沉积及其活化状态以进一步探究PNH患者血栓形成的病理机制。

病例和方法

1. 病例资料:2013年10月至2014年10月天津医科大学总医院血液科住院PNH患者25例,男12例,女13例,中位年龄30(14~71)岁,诊断符合文献^[8],典型PNH 11例,PNH伴再生障碍性贫血(PNH-AA)14例。排除血小板输注及应用抗血栓药物治疗的患者,其中1例患者有布加综合征病史、2例患者有脑栓塞病史。以30名健康志愿者为对照组,男14名,女16名,中位年龄35(24~60)岁。研究方案经天津医科大学总医院伦理委员会批准,患者均知情同意。

2. 主要试剂及仪器:藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人CD61单克隆抗体(单抗)、异硫氰酸荧光素

(FITC)标记的CD59单抗、藻蓝蛋白(APC)标记的鼠抗人CD62p单抗及其相应的鼠抗人IgG1同型对照单抗均为美国BD Pharmingen公司产品;鼠抗人C5b-9一抗购自美国Abcam公司;多甲藻黄素叶绿素蛋白(PerCP)标记的兔抗鼠IgG二抗购自美国Santa Cruz公司;人血清可溶性C5b-9(sC5b-9)检测ELISA试剂盒购自美国BD OptEIA™公司;FACS Calibur流式细胞仪购自美国BD公司;Elx800型酶标仪购自美国BioTek公司。

3. ELISA法检测血清sC5b-9、补体C3和C4的水平:促凝剂/分离胶采血管采集患者及对照者外周血标本,400×g离心10 min,收集上清,按人ELISA试剂盒说明书进行操作。30 min内用酶标仪在450 nm波长测各孔吸光度(A)值,并计算sC5b-9、C3和C4的浓度。每组设2个复孔。

4. 流式细胞术检测血小板PNH克隆及其表面分子表达:取新鲜枸橼酸钠抗凝外周血1 ml,110×g离心10 min,得到富含血小板血浆(PRP),取50 μl加入空离心管中,加入2 ml PBS,400×g离心5 min,小心吸弃上清,洗涤3次。试验管加入鼠抗人PE-CD61、FITC-CD59、APC-CD62p单抗各20 μl,鼠抗人C5b-9(1:50稀释)20 μl及兔抗鼠PerCP二抗5 μl,对照管分别加入鼠抗人PE-CD61单抗及相应的IgG1同型对照20 μl,于试验管和对照管分别加入洗涤好的血小板悬液150 μl,室温避光孵育15 min,加入PBS 1 ml洗涤1次,吸弃上清,PBS配制300 μl悬液上流式细胞仪进行检测,每管收集30 000~50 000个细胞。应用CellQuest软件进行分析。每组设2个复管。

5. 统计学处理:采用SPSS 21.0软件分析进行统计学处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组资料均数之间的比较采用独立样本 t 检验(数据符合正态分布)和Wilcoxon秩和检验(数据不符合正态分布或者方差),相关性分析应用Pearson法(二元正态分布资

料)。线条图采用 GraphPad Prism 5 软件绘制。

结 果

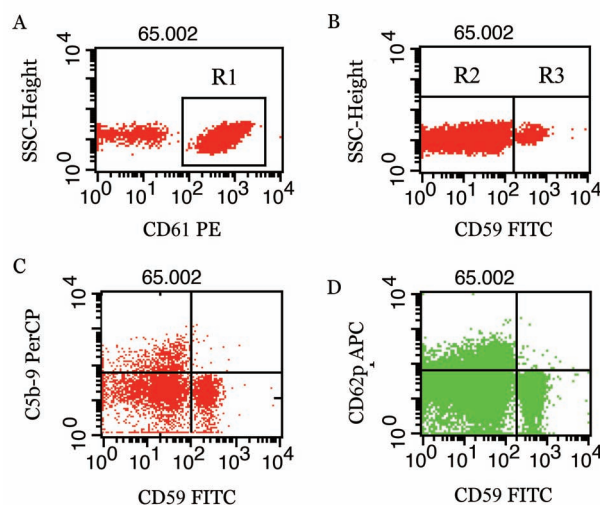
1. PNH 与 PNH-AA 患者临床资料比较:PNH 与 PNH-AA 患者血清补体水平(sC5b-9)、锚连蛋白缺失血小板(PNH 克隆)数、以及血小板膜补体(C5b-9)沉积及其活化程度(CD62p)差异均无统计学意义(表 1),由此可以看出,本实验研究范围内,所选取的 14 例 PNH-AA 患者与 11 例 PNH 患者可以合并为一组与对照组进行统计分析。

2. 血清补体的消耗:PNH/PNH-AA 组患者血清 sC5b-9 水平为 390.27(265.73~676.87) μg/L,显著低于正常对照组的 540.39(344.20~1 576.78) μg/L ($P<0.01$)(表 2),提示 PNH 患者体内持续存在补体激活、消耗的过程;而 PNH/PNH-AA 组患者血清补体成分 C3 和 C4 水平分别为 (936.3 ± 274.0) 及 (199.6 ± 63.6) mg/L,与对照组 $[(928.5 \pm 253.9)$ 及 (183.4 ± 48.3) mg/L] 比较差异均无统计学意义(表 2)。

3. PNH 患者血小板锚连蛋白缺失、补体沉积及其异常活化:PNH/PNH-AA 组患者血小板 PNH 克隆数(CD59⁻CD61⁺/CD61⁺) $[50.58(23.29 \sim 81.60)\%]$ 显著高于正常对照组 $[23.57(15.58 \sim 29.02)\%]$ ($P<0.001$)(表 2)。PNH/PNH-AA 组患者外周血 PNH 克隆血小板膜 C5b-9 表达率(C5b-9⁺CD59⁻CD61⁺/CD59⁻CD61⁺) $[(17.53 \pm 6.27)\%]$ 显著高于患者正常血小板(C5b-9⁺CD59⁺CD61⁺/CD59⁺CD61⁺) $[(11.33 \pm 5.03)\%]$ (图 1) 及对照组血小板(C5b-9⁺CD61⁺/

CD61⁺) $[(10.88 \pm 3.58)\%]$ ($P<0.01$); PNH/PNH-AA 组患者外周血 PNH 克隆血小板膜 CD62p 表达率(CD62p⁺CD59⁻CD61⁺/CD59⁻CD61⁺) $[(61.98 \pm 11.71)\%]$ 显著高于患者正常血小板(CD62p⁺CD59⁺CD61⁺/CD59⁺CD61⁺) $[(43.76 \pm 11.30)\%]$ 及对照组血小板(CD62p⁺CD61⁺/CD61⁺) $[(38.23 \pm 8.07)\%]$ ($P<0.01$)(图 1),并且 PNH 患者正常血小板膜 CD62p 表达率显著高于正常对照组($P<0.05$)。

4. 血小板膜表面 C5b-9 沉积与 CD62p 表达相关性分析结果:血小板膜补体 C5b-9 沉积与其活化(CD62p)呈显著正相关($r=0.559, P=0.002$)(图 2)。



A: 以 CD61 设门, R1 代表血小板; B: 以 CD59 设门, R2 代表血小板 PNH 克隆(CD59⁻), R3 代表正常血小板(CD59⁺); C: 血小板膜 C5b-9 的表达; D: 血小板膜 CD62p 的表达

图 1 流式细胞术检测阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)患者血小板 PNH 克隆及其表面分子

表 1 阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)患者与 PNH-再生障碍性贫血(AA)患者临床资料比较

组别	例数	血清可溶性 C5b-9 水平 [μg/L, M(95% CI)]	血小板 PNH 克隆 [% , M(95% CI)]	CD62p 表达率(% , $\bar{x} \pm s$)		C5b-9 表达率(% , $\bar{x} \pm s$)	
				CD59 ⁻ 血小板	CD59 ⁺ 血小板	CD59 ⁻ 血小板	CD59 ⁺ 血小板
PNH 组	11	397.09(380.85~489.80)	47.70(38.91~83.94)	69.43±12.68	41.92±8.25	16.27±4.32	10.20±4.00
PNH-AA 组	14	388.56(320.72~439.72)	57.76(51.35~75.75)	64.63±12.11	45.29±13.58	17.96±6.80	11.61±5.33
P 值		0.293	0.409	0.414	0.542	0.591	0.580

注: C5b-9: 血小板膜补体复合物; CD62p: 血小板活化分子

表 2 PNH/PNH-AA 患者血清补体水平和血小板 PNH 克隆(CD59⁻CD61⁺/CD61⁺) 数量检测

组别	例数	sC5b-9 [μg/L, M(范围)]	血小板 PNH 克隆 [% , M(范围)]	C3 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)	C4 (mg/L, $\bar{x} \pm s$)
对照组	30	540.39(344.20~1 576.78)	23.57(15.58~29.02)	928.5±253.9	183.4±48.3
PNH/PNH-AA 组	25	390.27(265.73~676.87)	50.58(23.29~81.60)	936.3±274.0	199.6±63.6
P 值		0.001	<0.001	0.900	0.249

注: PNH: 阵发性睡眠性血红蛋白尿症; AA: 再生障碍性贫血; sC5b-9: 可溶性膜体复合物

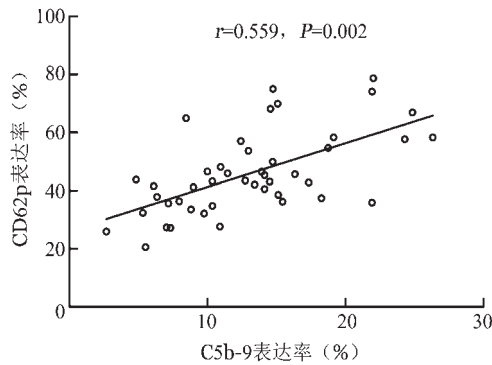


图2 阵发性睡眠性血红蛋白尿症患者血小板膜体复合物(C5b-9)与血小板活化分子(CD62p)相关性分析

讨 论

PNH患者基因突变导致血细胞膜 GPI 锚链蛋白缺失,对补体攻击耐受性减低,与红细胞受补体攻击发生裂解不同,血小板受补体攻击,只有小分裂解死亡,大部分血小板活化,并在PNH血栓并发症中扮演重要角色。PNH血小板锚链蛋白CD59具有抑制补体复合物C5b-9合成,保护细胞免受自身补体介导的免疫损伤的作用。本研究中,PNH/PNH-AA患者异常克隆血小板(CD59⁻)膜上有大量C5b-9沉积,而血清sC5b-9显著减少。C5b-9在异常血小板膜上的沉积可激活血小板^[9],活化的血小板使更多的C5b-9沉积到膜上,如此形成正反馈恶性循环,CD62p在其中发挥重要作用^[10-12]。C5b-9在血小板上形成孔洞后,血小板内 α -颗粒接近孔洞,与血小板膜融合,继而带着C5b-9脱落,形成血小板微粒体,大量存在于PNH患者血液循环,这些血小板微粒体膜上的磷脂酰丝氨酸外翻,作为凝血酶原酶和tenase复合物的结合位点,导致凝血酶大量产生,大大增加了动静脉血栓风险^[4,13-15]。同时,C5b-9的形成使血小板膜凝血因子Va、Xa的结合部位暴露^[16],钙离子内流增加,并使其表面凝血酶原复合物形成增加^[17]。血小板膜C5b-9还可以直接介导促凝血酶活动并伴随血小板的免疫损伤^[13,16]。

由于正常人体内不存在PNH克隆血小板,而本试验对照组测及22.31%~24.64%的PNH克隆血小板与其他研究结果相似^[6-7,18],考虑为血小板锚链蛋白在试验操作过程中可能发生部分脱落及抗体不稳定等相关因素,所以测及PNH/PNH-AA患者PNH克隆血小板数可能比实际水平高。值得深思的是:PNH患者正常克隆血小板膜CD62p表达较正常对

照组显著增高,由此可以推测PNH患者正常血小板功能同样异常。究其原因可能是:PNH患者正常血小板在机体高凝状态下也处于激活状态,但其自身具有正常的负反馈调节作用,而PNH克隆血小板自身调节功能受损,所以PNH患者正常血小板较正常对照处于活化状态,但其活化水平却低于PNH患者锚连蛋白缺失血小板。

本组病例数(25例)有限,而发生血栓的患者更少(3例),我们未按血栓发生与否作相关统计学分析。但没有发生血栓不代表没有血栓倾向,国外多项研究数据证明PNH患者较正常人更易发生血栓,我们通过对PNH患者血小板与补体的研究,推测PNH患者存在血小板膜CD59缺失、补体沉积以及血小板活化,补体依赖的血小板激活可能在PNH易栓过程中发挥重要作用,但其分子机制需进一步探索,抗血小板和补体抑制治疗可以作为临床防治PNH血栓形成的新靶点。

参 考 文 献

- [1] Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Blood, 2013, 121(25):4985-4996.
- [2] Galnack HR, Vail M, McKeown LP, et al. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria [J]. Br J Haematol, 1995, 91(3):697-702.
- [3] Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo [J]. Cell, 2009, 139(6):1143-1156.
- [4] Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, et al. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. Blood, 1993, 82(4):1192-1196.
- [5] Fujioka S, Yamada T. Varying populations of CD59-negative, partly positive, and normally positive blood cells in different cell lineages in peripheral blood of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients [J]. Am J Hematol, 1994, 45(2):122-127.
- [6] Vu T, Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, et al. Aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a study of the GPI-anchored proteins on human platelets [J]. Br J Haematol, 1996, 93(3):586-589.
- [7] Jin JY, Tooze JA, Marsh JC, et al. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked protein deficiency on the platelets of patients with aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: two distinct patterns correlating with expression on neutrophils [J]. Br J Haematol, 1997, 96(3):493-496.
- [8] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007: 51-52.
- [9] Wiedmer T, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase

- [J]. Blood, 1986, 68(4):875-880.
- [10] Del Conde I, Cruz MA, Zhang H, et al. Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system [J]. J Exp Med, 2005, 201(6):871-879.
- [11] Hamad OA, Ekdahl KN, Nilsson PH, et al. Complement activation triggered by chondroitin sulfate released by thrombin receptor-activated platelets [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(8):1413-1421.
- [12] Peerschke EI, Yin W, Grigg SE, et al. Blood platelets activate the classical pathway of human complement [J]. J Thromb Haemost, 2006, 4(9):2035-2042.
- [13] Hugel B, Socié G, Vu T, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia [J]. Blood, 1999, 93(10):3451-3456.
- [14] Rosse WF. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. Curr Opin Hematol, 2001, 8(2):61-67.
- [15] Peerschke EI, Yin W, Alpert DR, et al. Serum complement activation on heterologous platelets is associated with arterial thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibodies [J]. Lupus, 2009, 18(6):530-538.
- [16] Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, et al. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity [J]. J Biol Chem, 1988, 263(34):18205-18212.
- [17] Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis [J]. Mol Immunol, 2010, 47(13):2170-2175.
- [18] Grünewald M, Grünewald A, Schmid A, et al. The platelet function defect of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria [J]. Platelets, 2004, 15(3):145-154.

(收稿日期:2014-12-15)

(本文编辑:刘爽)

·读者·作者·编者·

2015年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

磷酸盐缓冲液 PBS

胎牛血清 FBS

血红蛋白 HGB

白细胞计数 WBC

血小板计数 PLT

核因子-κB NF-κB

聚合酶链反应 PCR

逆转录-聚合酶链反应 RT-PCR

酶联免疫吸附实验 ELISA

动脉血氧分压 PaO₂动脉血二氧化碳分压 PaCO₂

辅助性T淋巴细胞 Th

丙氨酸转氨酶 ALT

天冬氨酸转氨酶 AST

谷氨酰转氨酶 GGT

碱性磷酸酶 ALP

乳酸脱氢酶 LDH

凝血酶原时间 PT

部分激活的凝血活酶时间 APTT

EB病毒 EBV

巨细胞病毒 CMV

乙型肝炎病毒 HBV

丙型肝炎病毒 HCV

人类免疫缺陷病毒 HIV

自然杀伤细胞 NK细胞

白细胞介素 IL

干扰素 IFN

肿瘤坏死因子 TNF

红细胞生成素 EPO

血小板生成素 TPO

干细胞生长因子 SCF

粒细胞集落刺激因子 G-CSF

粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF

巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF

链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶 S-P

粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM

细胞毒性T淋巴细胞 CTL

佛波醇酯 TPA

噻唑蓝实验 MTT实验

弥漫性血管内凝血 DIC

磁共振成像 MRI

正电子发射断层扫描 PET

乙二胺四乙酸 EDTA

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE

二甲基亚砜 DMSO

荧光原位杂交 FISH

美国国家综合癌症网络 NCCN

本刊编辑部