

原发性免疫性血小板减少症患者出血风险与血小板活化的相关性分析

吕明恩 李洋 吕翠翠 刘文洁 关悦 王诗轩 杨仁池

【摘要】 目的 研究原发性免疫性血小板减少症(ITP)患者血小板活化状态和出血程度的相关性。方法 采用ITP特异性出血评价工具(ITP-BAT)对43例ITP患者进行出血评分及出血程度分级,应用流式细胞术检测二磷酸腺苷(ADP)激活前后血小板膜糖蛋白(GP) I b、II b/III a和P选择素表达。分析GP I b、GP II b/III a、P选择素表达与血小板计数、未成熟血小板比例的相关性;分析GP I b、GP II b/III a、P选择素表达与ITP患者出血程度的相关性,以及对中度以上出血患者风险评估的应用价值。结果 ITP患者激活前血小板GP II b/III a、P选择素表达均高于正常对照组(65.69 ± 10.73 对 7.16 ± 0.99 , $t=4.130$, $P<0.001$; 15.43 ± 1.41 对 12.55 ± 1.03 , $t=2.070$, $P=0.043$), GP I b表达低于正常对照组(240.11 ± 24.93 对 295.11 ± 22.15 , $t=2.417$, $P=0.020$)。ITP患者ADP激活后血小板GP II b/III a表达高于正常对照组(133.96 ± 12.17 对 39.67 ± 4.99 , $t=5.256$, $P<0.001$), 而P选择素、GP I b表达低于正常对照组(37.09 ± 3.94 对 109.77 ± 23.66 , $t=3.901$, $P<0.001$; 149.06 ± 19.14 对 205.73 ± 21.00 , $t=2.070$, $P=0.043$)。ADP激活后GP I b表达、ADP激活前后P选择素表达及ADP激活前后GP I b、P选择素表达比值与血小板计数相关($P<0.05$)。ADP激活后P选择素表达、ADP激活前后P选择素表达比值与未成熟血小板比例相关($P<0.05$)。ITP患者ADP激活后GP I b表达、ADP激活前后P选择素表达及ADP激活前后P选择素、GP II b/III a、GP I b表达比值在不同出血程度之间差异有统计学意义($P<0.05$)。ADP激活前后GP I b表达比值是ITP患者中度以上出血的正性影响因素($OR=3.05$, $P=0.011$), ADP激活前后P选择素、GP II b/III a表达比值是ITP患者中度以上出血的负性影响因素($OR=0.32$, $P=0.023$; $OR=0.04$, $P=0.006$)。结论 血小板活化指标能较准确地评估ITP患者出血程度, 可以作为治疗参考指标和疗效观察指标。

【关键词】 血小板减少; 出血; 血小板活化; 血小板膜糖蛋白类; P选择素

基金项目:国家自然科学基金(81270581、81470286);天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目(14JCZDJC35100);协和青年基金;中央高校基本科研业务费专项基金(3332015035)

Relative analysis of platelet activation with bleeding risk in patients with primary immune thrombocytopenia Lyu Mingen, Li Yang, Lyu Cuicui, Liu Wenjie, Guan Yue, Wang Shixuan, Yang Renchi. Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China
Corresponding author: Yang Renchi, Email: rcyang65@163.com

【Abstract】 Objective To study the relationship between platelet activation and the degree of bleeding in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** 43 patients with ITP were assessed based on ITP-BAT bleeding grading system. Platelet membrane glycoproteins (GP) I b, GP II b/III a and P-selectin expression were detected by flow cytometry analysis with and without adenosine diphosphate (ADP) stimulation. Association of platelet activation with platelet count, immature platelet fraction (IPF), bleeding severity were evaluated. **Results** GP II b/III a and P-selection expressions on unstimulated platelet in ITP patients were higher than those in healthy controls (65.69 ± 10.73 vs 7.16 ± 0.99 , $t=4.130$, $P<0.001$; 15.43 ± 1.41 vs 12.55 ± 1.03 , $t=2.070$, $P=0.043$, respectively), and GP I b expression was lower than that in healthy controls (240.11 ± 24.93 vs 295.11 ± 22.15 , $t=2.417$, $P=0.020$). Comparatively to healthy individuals, following ADP stimulation, GP II b/III a expression in ITP patients increased (133.96 ± 12.17 vs 39.67 ± 4.99 , $t=5.256$, $P<0.001$), whereas GP I b and P-selection expressions decreased (37.09 ± 3.94 vs 109.77 ± 23.66 , $t=3.901$, $P<0.001$; 149.06 ± 19.14 vs 205.73 ± 21.00 , $t=2.070$, $P=0.043$, respectively).

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.007

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院[吕明恩(现在南京医科大学附属苏州市立医院血液科,215002)、李洋、吕翠翠、刘文洁、关悦、王诗轩、杨仁池]

通信作者:杨仁池,Email:rcyang65@163.com

ADP-stimulated GP I b, ADP-stimulated and unstimulated P-selection, proportion of GP I b, P-selection levels with/without ADP stimulation were significantly associated with platelet counts ($P<0.05$). ADP-stimulated P-selection and proportion of P-selection levels with/without ADP stimulation were significantly associated with IPF ($P<0.05$). There were significant differences in the expressions of unstimulated P-selection, ADP-stimulated P-selection, ADP-stimulated GP I b stratified by bleeding grades ($P<0.05$). The ratios of P-selection, GP II b/III a and GP I b with/without ADP stimulation in ITP patients were significantly different among various bleeding grades ($P<0.05$). Higher proportion of GP I b with/without ADP stimulation was associated with higher risk of bleeding ($OR=3.05, P=0.011$). Lower proportion of GP II b/III a and P-selection with/without ADP was associated with higher risk of bleeding ($OR=0.32, P=0.023; OR=0.04, P=0.006$, respectively). **Conclusion** Platelet activation index could accurately assess the degree of bleeding in patients with ITP, and also be used as the observation index and reference index for treatment.

【Key words】 Thrombocytopenia; Hemorrhage; Platelet activation; Platelet membrane glycoprotein; P-selectin

Found Program: National Natural Science Foundation of China (81270581, 81470286); Tianjin Key Project of Applied and Advanced Technology Research Program (14JCZDJC35100); Union Youth Fund; Special Fund for Basic Scientific Research of Central University (3332015035)

原发免疫性血小板减少症(ITP)是最为常见的良性出血性疾病。ITP患者血小板数量减少与出血严重程度并不完全相关。虽然血小板计数低于 $20 \times 10^9/L$ 时患者更可能出现严重出血,但有些血小板计数高于 $20 \times 10^9/L$ 的患者仍有出血表现,而有些血小板计数极低的患者却无出血表现。因此,ITP患者出血程度不能单独用血小板计数解释。我们前期研究结果显示血小板聚集功能与ITP患者出血程度相关^[1],我们推测血小板活化状态与ITP患者的出血程度相关。本研究中,我们采用流式细胞术检测ITP患者血小板膜糖蛋白(GP) I b、GP II b/III a和P选择素表达,探讨血小板活化和出血程度之间的关系。

病例与方法

1. 研究对象:2014年12月至2015年3月于中国医学科学院血液病医院门诊或住院治疗的ITP患者43例纳入研究。男21例,女22例;中位年龄44(18~68)岁,中位PLT $15(2\sim99) \times 10^9/L$ 。参照文献^[2]标准进行诊断。以20名健康志愿者作为正常对照组,男8名、女12名,中位年龄41(22~65)岁,中位PLT $183(118\sim238) \times 10^9/L$ 。本研究经医院伦理委员会批准,患者均知情同意。

2. 出血评分方法:运用2013年ITP国际工作组(IWG)制定的ITP特异性出血评价工具(ITP-BAT) 1.0版^[3]对患者进行出血评分,出血症状包括皮肤(S)、黏膜(M)、器官(O)三项指标,得出SMO评分值,用SMO评分值界定不同程度的临床出血情况,严重出血(影响生命体征): $O \geq 3$;大量出血: $M \geq 3$;中度出血: $S=3, M=2, O=2$;轻度出血: $S<3, M=1, O=$

1;无症状: $S=0, M=0, O=0$ 。由2名血液科医师完成所有ITP患者的出血评分。

3. 标本采集:抽取ITP患者肘静脉血2~4 ml,取2 ml全血加入EDTA抗凝管,用于未成熟血小板比例(IPF)测定;取全血1 ml加入枸橼酸钠抗凝管,用于流式细胞术测定GP I b、GP II b/III a、P选择素。正常对照组同法采集外周静脉血标本。

4. 流式细胞术检测血小板GP I b、GP II b/III a、P选择素表达水平:取1 ml枸橼酸钠抗凝血,轻轻混匀后静置,离心10 min($150 \times g$)取富含血小板血浆,Falcon管内血小板计数用PBS调整至 $1 \times 10^7/ml$,加入 $20.0 \mu mol/L$ 二磷酸腺苷(ADP),立即旋涡1 s混匀,室温 $24 \text{ }^\circ\text{C}$,激活时间5 min^[4]。CD61-PerCP(美国Biolegend公司产品)和侧向散射角双参数确定血小板群,实验管加入CD42b-APC(美国Biolegend公司产品)、CD62p-PE(美国Biolegend公司产品)、PAC-1-FITC(美国BD Biosciences公司产品),对照管加入同型对照IgG1抗体(美国Biolegend公司产品)和GP II b/III a受体拮抗剂(RGDS)(美国BD Biosciences公司产品), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光孵育45 min,PBS洗涤2次,最后加300 μl PBS重悬,上流式细胞仪检测。GP I b、GP II b/III a、P选择素的表达分别以CD42b、PAC-1、CD62p的平均荧光强度表示。

5. IPF测定:收集EDTA抗凝静脉血2 ml,在6 h内采用Sysmex XE-5000血液分析仪检测IPF(自动进行模式)。网织血小板中的RNA在网织红细胞通道内被核酸荧光染料染色,再用XE-pro IPF master软件根据荧光强度和前向角散射光强度在网织红细胞散点图上较高荧光强度的区域圈出网织血小

板,通过分析得到IPF。

6. 统计学处理:采用SPSS19.0进行数据分析。符合正态分布计量资料的组间比较采用 t 检验及配对 t 检验。各指标与出血分级之间的关系采用多元有序回归分析。采用二元回归法分析各指标与中度以上出血风险的相关性,计量资料间相关性采用Pearson线性相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ITP患者血小板活化指标:ITP患者激活前血小板GP I b表达低于正常对照组($t=2.417, P=0.020$),GP II b/III a、P选择素表达高于正常对照组($t=4.130, P<0.001; t=2.070, P=0.043$);ITP患者和正常对照组ADP激活后血小板P选择素、GP II b/III a表达均高于激活前($P<0.05$),GP I b表达均低于激活前($P<0.05$);ADP激活后ITP患者血小板GP II b/III a表达高于正常对照组($t=5.256, P<0.001$),而P选择素和GP I b表达低于正常对照组($t=3.901, P<0.001; t=2.070, P=0.043$)。ADP激活前后血小板GP II b/III a和P选择素表达比值在ITP患者和正常对照组间差异有统计学意义[(2.58±1.21)%对(7.75±3.57)%, $t=7.297, P<0.001$;(2.97±2.19)%对(10.12±9.37)%, $t=4.084, P<0.001$];两组间GP I b表达比值差异无统计学意义[(0.79±0.59)%对(0.78±

0.39)%, $t=0.005, P=0.995$]。ITP患者ADP激活前后血小板GP II b/III a、P选择素、GP I b表达比值和激活前表达呈负相关($P=0.001, r=-0.540; P=0.002, r=-0.524; P=0.010, r=-0.434$)。详见表1。

2. ITP患者血小板活化指标与血小板计数、IPF的相关性:ITP患者中位IPF为21.1%(4.4%~44.7%),中位PLT为15(2~99)×10⁹/L,血小板计数与IPF呈负相关($r=-0.475, P=0.011$)。ADP激活后GP I b表达、ADP激活前P选择素表达、ADP激活后P选择素表达、ADP激活前后GP I b表达比值、P选择素表达比值与血小板计数显著相关($P<0.05$),ADP激活后P选择素表达、ADP激活前后P选择素表达比值与IPF显著相关($P<0.05$)。详见表2。

3. ITP患者血小板活化指标与出血程度的相关性:43例患者根据ITP-BAT评分结果进行出血分级:无症状12例,轻度出血16例,中度出血9例,大量及严重出血6例。血小板计数、IPF在不同出血程度之间差异均有统计学意义($P=0.001, P=0.020$)。

ADP激活前血小板P选择素表达在不同出血程度患者之间差异有统计学意义($P=0.040$)(表3)。中度以上出血患者血小板P选择素表达高于轻度出血和无症状患者(20.20±8.54对13.16±6.57, $t=2.526, P=0.017$)。ADP激活后血小板P选择素、GP I b表达在不同出血程度患者之间差异有统计学意义($P=0.006, P=0.001$)(表3)。中度以上出血患者ADP激

表1 ITP患者ADP激活前后血小板活化指标GP I b、GP II b/III a和P选择素表达(平均荧光强度, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	GP I b			GP II b/III a			P选择素		
		ADP激活前	ADP激活后	P 值	ADP激活前	ADP激活后	P 值	ADP激活前	ADP激活后	P 值
ITP	43	240.11±24.93	149.06±19.14	0.022	65.69±10.73	133.96±12.17	<0.001	15.43±1.41	37.09±3.94	<0.001
正常对照	20	295.11±22.15 ^a	205.73±21.00 ^b	0.044	7.16±0.99 ^c	39.67±4.99 ^d	<0.001	12.55±1.03 ^e	109.77±23.66 ^f	<0.001

注:ITP:原发免疫性血小板减少症;ADP:二磷酸腺苷;GP:血小板膜糖蛋白。与ITP组比较,^a $t=2.417, ^bP=0.020, ^c t=2.070, ^d P=0.043, ^e t=4.130, ^f P<0.001, ^g t=5.256, ^h P<0.001, ^i t=2.070, ^j P=0.043, ^k t=3.901, ^l P<0.001$

表2 ITP患者血小板GP I b、GP II b/III a、P选择素与血小板计数、未成熟血小板比例的相关性分析

血小板活化指标	血小板计数		未成熟血小板比例	
	P 值	相关系数	P 值	相关系数
ADP激活前GP I b表达	0.761	0.057	0.354	-0.182
ADP激活后GP I b表达	0.024	-0.404	0.468	0.143
ADP激活前后GP I b表达比值	0.017	-0.424	0.065	0.354
ADP激活前GP II b/III a表达	0.174	-0.255	0.207	0.151
ADP激活后GP II b/III a表达	0.863	-0.032	0.547	0.119
ADP激活前后GP II b/III a表达比值	0.324	0.018	0.172	-0.165
ADP激活前P选择素表达	0.045	-0.378	0.846	0.038
ADP激活后P选择素表达	0.002	0.536	0.011	-0.472
ADP激活前后P选择素表达比值	<0.001	0.639	0.037	-0.396

注:ITP:原发免疫性血小板减少症;ADP:二磷酸腺苷;GP:血小板膜糖蛋白

表3 ADP激活前后ITP患者血小板GP I b、GP II b/III a、P选择素表达与出血程度的相关性(平均荧光强度, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GP I b		GP II b/III a		P选择素	
		ADP激活前	ADP激活后	ADP激活前	ADP激活后	ADP激活前	ADP激活后
无症状	12	129.36±24.94	41.97±6.83	46.00±7.08	129.36±24.94	12.94±2.54	54.52±9.27
轻度出血	16	116.39±20.46	49.35±7.45	45.83±5.72	116.39±20.46	13.33±1.73	33.59±5.02
中度出血	9	126.38±28.26	127.10±18.94	121.55±39.43	126.38±28.26	19.71±3.85	25.43±3.54
大量及严重出血	6	92.03±35.04	120.86±46.00	109.20±54.80	90.03±35.04	21.33±2.18	26.66±6.36
P值		0.611	0.001	0.082	0.109	0.040	0.006

注:ITP:原发免疫性血小板减少症;ADP:二磷酸腺苷;GP:血小板膜糖蛋白

活后血小板P选择素表达低于轻度出血和无症状患者(25.6±9.27对42.56±24.27, $t=2.802$, $P=0.009$),而中度以上出血患者GP I b表达高于轻度出血和无症状患者(121.73±61.25对46.19±23.42, $t=3.771$, $P=0.003$)。

4. ITP患者ADP激活前后血小板活化指标比值与出血程度的相关性:ADP激活前后ITP患者血小板P选择素、GP II b/III a、GP I b表达比值在不同出血程度患者之间差异有统计学意义($P=0.003$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.003$)(表4)。中度以上出血患者ADP激活前后P选择素、GP II b/III a表达比值低于轻度出血和无症状患者[(1.51±1.01)%对(3.66±2.27)% , $t=3.634$, $P=0.003$; (1.36±0.62)%对(3.16±0.97)% , $t=5.332$, $P<0.001$]。中度以上出血患者ADP激活前后GP I b表达比值高于轻度出血和无症状患者[(1.34±0.68)%对(0.53±0.29)% , $t=3.568$, $P=0.006$]。

表4 ADP激活前后ITP患者血小板GP I b、II b/III a及P选择素表达(平均荧光强度)比值与出血程度的相关性(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	GP I b	GP II b/III a	P选择素
无症状	12	0.44±0.24	3.40±1.04	4.74±2.43
轻度出血	16	0.59±0.32	2.98±0.92	2.84±1.85
中度出血	9	1.37±0.73	1.27±0.60	1.62±1.19
大量及严重出血	6	1.25±0.70	1.56±0.72	1.22±0.37
P值		0.003	0.001	0.003

注:ITP:原发免疫性血小板减少症;ADP:二磷酸腺苷;GP:血小板膜糖蛋白

5. ITP患者血小板活化指标与中度以上出血风险的相关性:与出血程度相关的因素包括:ADP激活后GP I b表达,ADP激活前P选择素表达,ADP激活后P选择素表达,ADP激活前后GP I b、P选择素、GP II b/III a表达比值。评估这些指标与中度以上出血风险的相关性,结果显示:ADP激活前后GP I b表达比值是ITP患者中度以上出血的正性影

响因素[$OR=3.05$ (95 % CI 1.29~7.24), $P=0.011$]; ADP激活前后P选择素、GP II b/III a表达比值是ITP患者中度以上出血的负性影响因素[$OR=0.32$ (95 % CI 0.12~0.85), $P=0.023$; $OR=0.04$ (95 % CI 0~0.39), $P=0.006$]。

讨 论

ITP患者出血的严重程度与血小板计数减少并非呈正相关,有的患者血小板计数尽管很低但不出血或出血并不严重。我们最近的临床研究发现ITP患者外周血IPF和血小板聚集功能与患者出血程度相关,提示血小板功能在ITP患者出血过程中发挥一定的作用^[1]。本研究进一步证实了血小板活化状态与ITP患者出血情况存在相关性。

血小板的黏附、聚集和活化功能在血小板止血过程中起重要作用,其功能发挥均依赖其表面膜糖蛋白功能而实现。血小板表面GP I b-IX、GP II b/III a、P选择素均参与了血小板的聚集、活化和黏附功能,反映了体内血小板的功能及活化状态。PAC-1(血小板糖蛋白II b/III a受体)是血小板活化时GP II b/III a暴露的纤维蛋白原结合位点。P选择素在血小板活化时随着颗粒内容物的释放而与质膜融合,能持久地存在于活化血小板表面。GP I b在血小板活化后由膜表面进入开放管道系统或裂解,使其表达水平降低^[5]。本研究结果显示ITP患者外周血中血小板膜表面P选择素和GP II b/III a表达增高、GP I b表达减低,提示ITP患者血小板内在活性增高,其促凝功能增强。Olsson等^[6]研究显示,ITP患者自身抗体可以通过Fc依赖的形式与血小板上FcγR II受体结合而诱导血小板活化信号或通过Fc非依赖形式促进血小板活化。另外,ITP出血患者血管内皮损伤后胶原暴露也可导致血小板活化^[7]。我们进一步研究发现ITP患者和正常对照ADP激活后血小板P选择素和GP II b/III a表达增高、GP I b表达减低,但是ADP激活前后ITP患者血小板GP II b/III a和P选择

素表达比值低于正常对照组;ITP患者ADP激活前后P选择素、GP II b/III a、GP I b表达比值均与激活前表达水平呈负相关,以上结果提示ITP患者血小板经体外ADP诱导后的活化反应明显减弱,激活前血小板P选择素、GP II b/III a表达越高或GP I b表达越低,经ADP诱导后的活化反应越弱,推测原因:①ITP患者血小板表面P选择素、GP II b/III a、GP I b表达异常,说明ITP患者体内血小板已经处于活化状态,且接近活化阈值,对于体外ADP刺激活化的反应减弱^[4]。②P选择素、GP II b/III a、GP I b表达异常的血小板其表面ADP受体和ADP下游凝血酶信号途径抑制,导致ADP激活反应减弱^[8]。

本研究结果显示ITP患者激活前血小板P选择素表达与血小板计数呈负相关,与Panzer等^[9]研究结果一致,提示血小板胞质内的颗粒膜糖蛋白P选择素暴露在膜表面作为一种代偿机制,以减少因血小板数目少而发生出血的风险。Psaila等^[10]研究认为血小板对ADP的反应不受血小板计数的影响,但我们研究发现ADP激活后GP I b、P选择素表达与血小板计数相关,具体原因有待进一步研究。

ITP患者IPF增高,反映了ITP患者血小板生成能力代偿性增加,未成熟血小板在外周血中发挥止血作用^[1]。血小板完全活化后会发生构象变化,导致膜表面出现GP I b-IX、GP II b/III a变化,我们研究发现IPF与GP II b/III a、GP I b表达无相关性,而与P选择素表达相关,说明成熟血小板较未成熟血小板活化后更容易发生构象改变,可能因为未成熟血小板代偿性通过增加膜表面P选择素来增强血小板功能,导致构象改变能力减弱^[8]。

本研究中ITP患者激活前血小板P选择素表达和出血程度相关,而GP II b/III a、GP I b表达与出血程度无相关,与van Bladel等^[11]研究结果一致。分析原因:①严重出血患者通过增加血小板聚集、活化和黏附功能发挥止血作用。完全活化的血小板膜表面表达P选择素和GP II b/III a,通常分布于血管壁周围以保持血管完整性,外周血循环较少。②血小板完全活化后发生的构象变化不是持续的,很快就恢复静息状态,而血小板可以继续吸附血浆中脱落的P选择素^[8]。中度以上出血患者与轻度出血和无症状患者比较,ADP激活后血小板表面GP I b、P选择素表达及ADP激活前后P选择素、GP II b/III a、GP I b表达比值的差异均有统计学意义,提示出血较重患者体外ADP诱导的血小板活化反应减弱,可能的原因:①出血较重患者因出血量大和血小板严

重减少导致体内血小板代偿性的过度活化,体外对激活剂反应减弱。②出血较重患者体内高滴度抗体和炎症因子干扰了血小板的功能^[12]。我们通过回归分析发现ADP激活前后P选择素、GP I b、GP II b/III a表达比值与中度以上出血风险相关,P选择素、GP II b/III a表达比值越大严重出血风险减少,GP I b表达比值越大严重出血风险增加,进一步证实ITP患者血小板体外活化功能缺陷、血小板黏附和聚集代偿性增强能力的减弱与出血程度相关。

本研究结果初步表明,血小板活化指标能比较准确地反映ITP患者出血程度,可以作为干预和疗效观察指标。本研究病例数较少,血小板活化指标对于ITP患者出血风险的预测价值尚需进一步临床研究加以验证。

参考文献

- [1] 吕明恩,李洋,薛峰,等.应用未成熟血小板比例、未成熟血小板绝对值和血栓弹力图评估原发免疫性血小板减少症患者的出血风险[J].中华血液学杂志,2015,36(9):759-764. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.09.008.
- [2] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组.成人原发免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2012年版)[J].中华血液学杂志,2012,33(11):975-977. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.11.021.
- [3] Rodeghiero F, Michel M, Gernsheimer T, et al. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group [J]. Blood, 2013, 121(14):2596-2606. DOI: 10.1182/blood-2012-07-442392.
- [4] Bhoria P, Sharma S, Varma N, et al. Effect of steroids on the activation status of platelets in patients with Immune thrombocytopenia (ITP) [J]. Platelets, 2015, 26(2):119-126. DOI: 10.3109/09537104.2014.888546.
- [5] 顾健,王磊,顾翔,等.经皮冠状动脉内支架植入术对急性心肌梗死患者血小板活化的影响[J].中华血液学杂志,2010,31(3):186-188. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2010.03.012.
- [6] Olsson A, Andersson PO, Tengborn L, et al. Serum from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura frequently affect the platelet function [J]. Thromb Res, 2002, 107(3-4):135-139. DOI: 10.1016/S0049-3848(02)00260-8.
- [7] Panzer S, Höcker L, Vormittag R, et al. Flow cytometric evaluation of platelet activation in chronic autoimmune thrombocytopenia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2006, 47(5 Suppl):694-696. DOI: 10.1002/pbc.21000.
- [8] Panzer S, Höcker L, Vormittag R, et al. Flow cytometric evaluation of platelet activation in chronic autoimmune thrombocytopenia [J]. Pediatr Blood Cancer, 2006, 47(5 Suppl):694-696. DOI: 10.1002/pbc.21000.
- [9] Panzer S, Höcker L, Rieger M, et al. Agonist-inducible platelet activation in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia [J]. Eur J Haematol, 2007, 79(3):198-204. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00900.x.
- [10] Psaila B, Bussel JB, Linden MD, et al. In vivo effects of

eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation [J]. Blood, 2012, 119 (17): 4066-4072. DOI: 10.1182/blood-2011-11-393900.

[11] van Bladel ER, Laarhoven AG, van der Heijden LB, et al. Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts [J]. Blood, 2014, 123 (10):1556- 1563. DOI: 10.1182/blood-2013-08-519686.

[12] Psaila B, Bussel JB, Frelinger AL, et al. Differences in platelet function in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia compared to equally thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenia[J]. J Thromb Haemost, 2011, 9 (11):2302-2310. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2011.04506.x.

(收稿日期:2016-07-12)

(本文编辑:徐茂强)

· 病例报告 ·

JAK2V617F 阳性转 CALR 基因突变阳性 血小板增多症一例

王素云 张丽军 刘晔璇 刘贵敏 付建珠 王凤云 谢旭磊 成志勇

JAK2 V617F positive mutation transformed to calreticulin mutation in one patient with essential thrombocythemia
Wang Suyu, Zhang Lijun, Liu Yexuan, Liu Guimin, Fu Jianzhu, Wang Fengyun, Xie Xulei, Cheng Zhiyong
Corresponding author: Cheng Zhiyong, Department of Hematology, The First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China. Email: suyunwcn@163.com

患者,男,63岁。主因“间断头晕2个月”于2009年5月6日首次入院。既往史:糖尿病20余年,应用中效胰岛素治疗;高血压病10余年,口服硝苯地平缓释片治疗,血压控制良好;多发性脑梗死2年,无后遗症。患者于入院前2个月前无明显诱因出现间断头晕、四肢麻木、乏力、记忆力下降、言语表达欠流利,就诊于保定市第一医院。查体:血压150/90 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),神清,周身浅表淋巴结未触及肿大,双肺呼吸音清,未闻及干湿啰音,心率82次/分,律齐,脾脏肋缘下2 cm,肝肋缘下未触及,双下肢无水肿。血常规:WBC 8.17×10⁹/L,HGB 148 g/L,PLT 1 205×10⁹/L。红细胞沉降率20 mm/h,空腹血糖10.2 mmol/L;肝肾功能正常;抗核抗体谱正常;肿瘤标志物正常。头颅MRI:两侧丘脑、基底节、放射冠、脑干多发腔隙性脑梗死,部分软化灶形成,部分病灶新出现。骨髓象:增生活跃,粒系占0.600,红系占0.215,粒:红=2.79:1;粒系中性分叶核粒细胞比例增高,形态大致正常,余各阶段比例及形态未见明显异常;红系各阶段比例及形态未见明显异常;成熟红细胞形态未见明显异常;淋巴细胞占0.185,形态大致正常;全片巨核细胞107个(分类50个,其中产板巨核细胞26个、颗粒巨核细胞14个、裸核10个),血小板明显增多。骨髓活检:增生活跃,粒红比例增高,粒系以中幼及以下阶段细胞为主,嗜酸细胞易见,红系以

中晚幼红细胞为主,巨核细胞多见;网状纤维染色0级;BCR-ABL P210 阴性,JAK2V617F 基因阳性,突变型/野生型=0.40,MPL W515K/L 阴性。诊断:原发性血小板增多症、脑梗死、糖尿病2型。给予肠溶阿司匹林100 mg/d,羟基豚3.0 g/d,别嘌吟片0.3 g/d,碳酸氢钠片3.0 g/d,干扰素300万单位每周3次皮下注射及胰岛素控制血糖。治疗2周后血常规:WBC 4.66×10⁹/L,RBC 4.25×10¹²/L,HGB 119 g/L,PLT 248×10⁹/L。出院后患者间断服用羟基豚,第1年规律应用干扰素(此后每年应用4~6个月),PLT维持(150~400)×10⁹/L。自2014年3月停用干扰素后出现间断头晕、乏力,PLT(350~600)×10⁹/L,于2015年3月6日再次入院。血常规:WBC 5.23×10⁹/L,HGB 130 g/L,PLT 565×10⁹/L,骨髓象:增生活跃,粒系占0.645,红系占0.200,粒系、红系及淋巴系比例及形态未见异常,巨核细胞不少,血小板增多。骨髓病理:增生活跃,粒系增多,以中幼及以下阶段细胞为主,红系以中晚幼红细胞为主,巨核细胞多见,网状纤维染色0级。BCR-ABL P210 阴性,JAK2V617F 基因突变阴性,MPLW515K/L 基因突变阴性,CALR 基因突变阳性(CALR 基因9号外显子p.K385fsX47),2009年4月23日骨髓标本CALR基因突变阴性。给予肠溶阿司匹林100 mg/d,羟基豚2.0 g/d,别嘌吟片0.3 g/d,碳酸氢钠片3.0 g/d,干扰素300万单位每周3次皮下注射。治疗2周血常规:WBC 5.01×10⁹/L,HGB 128 g/L,PLT 336×10⁹/L。病情好转出院。随访3个月血小板计数稳定在正常水平。

讨论:本病例提示:①JAK2V617F、CALR 基因突变可先后表达于同一患者。②干扰素对JAK2V617F 突变原发性血小板增多症具有良好疗效,甚至能够达到分子生物学缓解。③原发性血小板增多症患者发生CALR 基因突变后再次应用干扰素仍有疗效。④JAK2V617F 突变阳性骨髓增殖性肿瘤患者治疗多年后如病情出现反复,应检测是否出现其他基因突变。

(收稿日期:2016-06-14)

(本文编辑:徐茂强)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.01.008

作者单位:050000 石家庄,河北省人民医院血液内科(王素云);承德医学院(张丽军、刘晔璇、刘贵敏);保定市第一医院血液内科(付建珠、王凤云、谢旭磊、成志勇)

通信作者:成志勇:Email: dzczy@163.com