

研究进展[J]. 国际输血及血液学杂志, 2006, 29(6): 499-502.

[7] Dzik S. 血小板输注支持无效患者的处理[J]. 国际输血及血液学杂志, 2008, 31(1): 91-93.

[8] Brouk H, Halle L, Bertrand G, et al. Human platelet antigen allele frequencies in different Algerian populations [J]. Tissue Antigens, 2010, 75(6): 673-678.

[9] Slichter SJ, Davis K, Enright H, et al. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients[J]. Blood, 2005, 105(10): 4106-4114.

[10] 林军, 杨欢, 王文伟. 血小板输注无效与抗 HLA 抗体相关性[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(5): 373-375.

[11] Marktel S, Napolitano S, Zino E, et al. Platelet transfusion refractoriness in highly immunized beta thalassemia children undergoing stem cell transplantation [J]. Pediatr Transplant, 2010, 14(3): 393-401.

[12] Killick SB, Win N, Marsh JC, et al. Pilot study of HLA alloimmunization after transfusion with pre-storage leukodepleted blood products in aplastic anaemia [J]. Br J Haematol, 1997, 97(3): 677-684.

[13] Shehata N, Tinnmouth A, Naglie G, et al. ABO-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review[J]. Transfusion, 2009, 49(11): 2442-2453.

[14] 李小彦, 许大巍. 临床血小板输注无效 87 例原因分析 • 综述 •

[J]. 基层医学论坛, 2013, 17(1): 29-31.

[15] 王涓冬, 潘祥林, 尹哲, 等. 血小板糖蛋白特异性抗体在骨髓增生异常综合征患者中的表达及其意义[J]. 中国实验血液学杂志, 2007, 15(1): 95-98.

[16] 桂嵘, 聂新民, 文贤慧, 等. 临床 727 例次单采血小板输注效果分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(2): 381-385.

[17] 王一, 王春彪. 血小板无效输注及治疗策略[J]. 国外医学输血及血液学分册, 2001, 24(4): 339-342.

[18] 徐丽娟, 卓海龙, 刘斌杰, 等. 血小板输注无效的临床分析[J]. 临床输血与检验, 2008, 10(1): 59-60.

[19] Radia R, Pamphilon D. Transfusion strategies in patients undergoing stem-cell transplantation[J]. Expert Rev Hematol, 2011, 4(2): 213-220.

[20] 王李洁, 刘风华, 刘香. 71 例血小板输注疗效临床观察[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(4): 470-471.

[21] 王红梅, 廖艳秋, 朱梅红. 血小板相关抗体检测及血小板交叉配型的临床应用[J]. 临床输血与检验, 2006, 8(3): 195-197.

[22] Bajpai M, Kaura B, Marwaha N, et al. Platelet alloimmunization in multitransfused patients with haemato-oncological disorders[J]. Natl Med J India, 2005, 18(3): 134-136.

(收稿日期: 2016-04-03 修回日期: 2016-06-09)

细胞微粒在颅脑创伤中的功能研究进展

刘慧权

(天津市海河医院神经外科 300052)

关键词: 细胞微粒; 凝血; 颅脑创伤; 凝血功能障碍
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 22. 030 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2016)22-3174-03

细胞微粒是各类细胞受到一系列应激(激活或凋亡)时, 从细胞质膜上脱落而释放的某些膜性小囊泡^[1]。目前为止, 微粒没有明确定义, 一般认为其直径在 0. 1~1. 0 μm, 携带有其原生细胞特异性抗原的磷脂囊泡, 通过出芽方式释放, 来源于多种细胞。现有研究表明, 红细胞、白细胞、血小板、内皮细胞、平滑肌细胞、肿瘤细胞甚至神经细胞均可释放对应的细胞微粒^[2], 研究人员可通过其表面的不同抗原决定簇来分析其来源。一般情况下, 血液中以血小板来源微粒(PDMPs)水平最高, 约占 70%~90%。目前研究已证明, 细胞微粒主要在循环细胞和血管细胞间的相互交流中起重要作用。它们可以促进凝血功能、引发炎症反应、传递细胞信号、激活细胞、参加血管新生过程等^[3], 在多种疾病中起关键作用。近来, 有部分研究提示 MPs 在颅脑创伤中起重要作用, 本研究将阐述微粒的形成、组成, 其在凝血方面的作用和在颅脑创伤中的功能, 用以基础试验和临床的参考。

1 微粒的构成及产生

微粒主要由磷脂、细胞质成分和蛋白质等构成, 各组间比例主要取决于其细胞来源和生成过程。正常情况下, 细胞膜脂质双层成分的不对称性是产生微粒的结构基础。在静息状态下, 带负电荷的磷脂类物质(包括磷脂酰丝氨酸, PS)位于脂

质双层的内层, 外层为磷脂酰胆碱和鞘磷脂, 其受到多种酶的调控维持稳定。以目前研究最多的 PDMPs 为例, 一旦触发细胞激活或者凋亡信号, 细胞骨架发生变化, 内质网释放 Ca²⁺, 使细胞质内 Ca²⁺水平升高, Ca²⁺激活蛋白激酶并抑制磷脂酶, 从而激活钙蛋白酶, 活化的钙蛋白酶降解细胞骨架中的踝蛋白, 从而引起细胞膜的破坏和细胞收缩, 同时出现脂质双层的翻转, 位于内层的 PS 等转至外层, 细胞出现变形, 产生伪足, 而在变形的细胞膜上胞膜以出芽方式形成囊泡脱落或伪足断裂形成微粒, 磷脂成为微粒的包膜。现有研究表明, 不同细胞来源的微粒磷脂成分不同。微粒表面的抗原成分虽与其来源细胞有关, 但也不完全相同, 有研究发现即使同一种激活剂激活一种细胞也会产生不同微粒^[4-7]。因此, 微粒的产生过程极其复杂而精密, 具体机制目前仍不完全清楚。

2 微粒在血液凝固方面的作用

2.1 微粒促进血液凝固 微粒的凝血活性主要源于其表面的 PS 及组织因子(TF), PS 作为一种催化剂, 能提供了高负电荷表面, 通过结合凝血酶原(凝血因子 Xa 和凝血因子 Va), 将血小板活化和凝血酶生成 2 个过程联系起来。PS 不仅促进凝血复合物形成, 还可增加 TF 的促凝活性。PS 可在病理状态时参与凝血酶产生并促进血管内凝血过程, 有研究发现, 正常健

康人群中也有此现象。Berckmans 等^[8]报道健康人群有微粒参与血液循环,并在产生低剂量凝血酶过程中起关键作用。Sinauridze 等^[9]报道 PDMPs 比激活的血小板促凝血活性高 50~100 倍。TF 是启动外源性凝血的重要因子,TF 与 FⅦ结合形成 TF-FⅦa 复合物启动外源性凝血级联瀑布,FⅦa 进一步激活内源性凝血途径中的 FX 和 FⅨ。微粒激活的血小板黏附,相互结合,纤维蛋白之间交联,最后形成凝血块。

部分研究发现,血浆内皮细胞源性微粒(EDMPs)表面表达大量的 TF,水平升高时可缩短血浆凝固时间,但在 FⅦ缺乏的血浆中却未观察到该现象,说明 EDMPs 介导的促凝活性依赖于 TF-FⅦa 复合物。EDMPs 同时还表达大量的血管性血友病因子(vWF),能促进血小板与内皮的黏附和血小板自身的聚集^[10]。

单核细胞来源微粒(MDMPs)的主要作用是在血管损伤局部形成富含血小板和纤维蛋白的血凝块,此过程由其表面 TF 募集细胞形成。MDMPs 表达 P 选择素的受体 PSGL-1 和 TF,活化的血小板通过 P 选择素与之连接,经过融合,其表面的 TF 沉积在血管损伤部位,利于形成血凝块。Conde 等^[11]研究发现,体外试验条件下,表达 TF 的 MDMPs 和活化的血小板融合,TF 从 MDMPs 膜表面转移至血小板膜表面,TF 和凝血因子处于同一区域,有效加快了凝血的始动过程和级联传递过程。

微粒在体内促凝作用的机制目前仍不完全清楚,但大量研究表明循环微粒的数量和血栓发生风险具有相关性。例如,健康人体内微粒数量微乎其微,几乎不可测,但在某些疾病条件下,如急性冠状动脉综合征、癌症、尿毒症、糖尿病、严重创伤后等,其数量会非常高。

2.2 微粒抗凝血作用 微粒抗凝作用研究目前发现有以下途径:(1)组织因子途径抑制物(TFPI)。TFPI 是 TF 活性抑制剂,正常微粒表面表达 TF 和 TFPI,两者的相对平衡可能是保持凝血和抗凝的关键因素。表达 TF 的微粒数量显著超过 TFPI 时,就会启动凝血过程。相反,血浆中 PDMPs 大量表达 TFPI 时,凝血过程受到显著抑制,90% 的 TF 被中和^[12]。(2)蛋白 C 受体途径。内皮细胞激活时,释放含蛋白 C 受体的 EDMPs,活化的蛋白 C 连接该受体,通过减少凝血酶产生和促进纤溶来发挥其抗凝活性。其余研究还发现,肿瘤坏死因子(TNF-α)及白细胞介素等可以调节单核细胞及 MDMPs 表面 TF 的表达来阻止凝血酶的产生^[13]。

3 微粒在颅脑创伤中的功能

颅脑创伤也称为创伤性脑损伤,具有较高的病死率及致残率,是严重威胁人类健康的疾病。颅脑创伤导致的凝血功能障碍在伤后病情恶化中起重要作用。虽然目前已经开展了大量研究,但其机制仍然不明确。对于躯干四肢创伤的患者而言,大量失血(失血性休克)和补液(血液稀释和低温)是凝血功能障碍发生的主要原因。具体机制包括凝血因子和血小板消耗或稀释、血小板和凝血系统的功能障碍、纤维蛋白溶解增加等。然而,在单纯颅脑创伤的患者中,大量失血并不常见;同时,往往受到补液的限制,提示上述因素可能在颅脑创伤相关凝血功能障碍中不起关键作用。目前研究提示,颅脑创伤相关凝血功能障碍有独特机制。脑组织和一般组织比较具有以下 2 个特点:(1)脑实质 TF 的水平远远高于其他组织,在受到颅脑创伤后 TF 可以释放到外周血液循环中。(2)脑组织具有血脑屏障,在正常情况下,血浆蛋白和脑组织之间不能发生相互作用。颅脑创伤后血脑屏障受到破坏,微粒在脑组织和循环血相互交流中起到不可替代的关键作用。

多项研究发现,不同部位创伤^[14-17],包括颅脑创伤发生后^[18-19],外周血液循环中微粒水平会显著升高。Morel 等^[18]研究发现,遭受单纯重型颅脑损伤的患者血浆和脑脊液中 PDMPs 和 EDMPs 水平显著升高,伤后脑脊液中微粒水平持续升高达 10 d 者与预后不良有关,这可能与创伤导致血脑屏障永久性破坏有关。这和其他部位损伤结果显著不同,肢体创伤研究发现^[14-16],伤后循环血中微粒水平升高的患者预后较好。

颅脑创伤的损伤机制多种多样,目前研究发现微粒广泛参与了各种途径。Patz 等^[20]研究发现,人类颅脑创伤后脑脊液中含有微粒,且微粒携带有遗传物质 miRNA、mRNA 和蛋白质,其通过脑脊液运输移动到大脑其他部位,参与神经细胞调节,说明脑脊液中存在跨细胞转运的信号传导及调节系统。该研究表明,颅脑创伤后脑脊液系统跨细胞转运通过微粒来实现。研究提示,颅脑创伤后血中微粒水平升高,可导致脑损伤后低灌注性脑血管扩张,导致进一步神经损伤,与不良预后有关^[21]。其机制是由于创伤后过度表达了组织纤溶酶原激活物(tPA)、内皮素-1(ET-1)和细胞外信号调节激酶-促分裂原活化蛋白激酶(ERK-MAPK)。在研究中发现,创伤后使用聚乙二醇端粒 B(PEG-TB)治疗可降低微粒水平,避免低灌注性脑血管扩张,减少海马神经元损伤。该研究表明,微粒参与创伤后继发脑血管扩张,导致低灌注和神经细胞损伤,PEG-TB 可能具有治疗前景。Andrews 等^[22]采用体外体内 2 种试验方法研究,发现并验证机械性损伤导致脑微血管内皮细胞(BMVEC)释放 EDMPs,EDMPs 水平在体外试验中表现为 48 h 以内呈时间依赖性升高。体内试验发现伤后 24 h 血浆中表达紧密连接蛋白的囊泡水平升高。说明颅脑创伤后,参与血脑屏障构成的内皮细胞系统损伤也由微粒参与,这进一步加深了对血脑屏障损伤的认识。

在颅脑创伤后凝血功能方面,微粒同样有不可替代的作用。Midura 等^[23]研究发现,动物模型脑创伤后外周血微粒数量增多,促凝活性增强。微粒在脑创伤后改变了血小板凝血功能,导致创伤后高凝状态。Tian 等^[2]对来源于神经元和神经胶质细胞的微粒进行了研究,首次提出了脑来源微粒(BDMPs)的概念,并验证了其在脑创伤凝血功能中的作用。该研究发现,小鼠动物模型遭受到颅脑创伤后,外周血中会出现表达神经细胞和胶质细胞表面标记的微粒,该种微粒也表达具有促凝血功能的 PS 和 TF。经检测,其促凝活性甚至高于 PDMPs,并可被乳凝集素蛋白所抑制。其来源于受伤的海马细胞,伤后通过血小板介导的途径进入血液循环。创伤后其大量释放入血,是导致颅脑创伤后凝血功能紊乱原因之一。该研究阐述了创伤后凝血功能紊乱的新机制,极大促进了微粒的研究进展,为未来治疗打下基础。进一步研究发现,微粒在颅脑创伤后其他器官损伤中也起到重要作用。Yasui 等^[24]研究发现,颅脑创伤后肺损伤与高表达 TF 微粒造成的高凝状态有关。通过动物实验研究发现,与对照组比较,颅脑创伤后 5 min 大鼠出现肺水肿和肺血管渗透性增高,伴有肺泡出血等肺损伤,伤后 60 min 肺泡内出现纤维蛋白聚集。经检测肺泡内发现表达 TF 微粒,考虑由脑组织释放经血液循环而来。进一步研究发现,如提前给予凝血酶抑制剂 Refludan,肺损伤会减轻,证明脑创伤后肺损伤由凝血酶参与。该研究进一步说明了外周血中表达 TF 微粒水平升高可能是激活凝血机制、导致肺损伤的启动因子。

4 小 结

大量研究表明,循环微粒在各种疾病中发挥重要作用。在

颅脑创伤及其引发的凝血功能障碍方面,其对损伤机制方面提供了新信息,同时为治疗方面提供了新思路。对其进一步进行标准化测定并观察其动态变化规律,找到适合的干预时机是未来临床医师努力的新方向。

参考文献

- [1] Burnier L, Fontana P, Kwak BR. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 101(3): 439-451.
- [2] Tian Y, Salsbery B, Wang M, et al. Brain-derived microparticles induce systemic coagulation in a murine model of traumatic brain injury[J]. *Blood*, 2015, 125(13): 2151-2159.
- [3] Wang L, Bi Y, Cao M, et al. Microparticles and blood cells induce procoagulant activity via phosphatidylserine exposure in NSTEMI patients following stent implantation[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 223: 121-128.
- [4] Halim AT, Ariffin NA, Azlan M. Review: the multiple roles of monocytic microparticles[J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1277-1284.
- [5] Khaspekova SG, Antonova OA, Shustova ON, et al. Activity of tissue factor in microparticles produced in vitro by endothelial cells, monocytes, granulocytes, and platelets[J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2016, 81(2): 114-121.
- [6] Jung C, Lichtenauer M, Wernly B, et al. Effect of endothelin-1 and endothelin receptor blockade on the release of microparticles[J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(8): 707-713.
- [7] Tziatzios G, Polymeros D, Spathis A, et al. Increased levels of circulating platelet derived microparticles in Crohn's disease patients[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2016, 51(10): 1184-1192.
- [8] Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin Generation[J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85(4): 639-646.
- [9] Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50-to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3): 425-434.
- [10] Berezin A, Zulli A, Kerrigan S, et al. Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(9): 562-568.
- [11] Conde DI, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation[J]. *Blood*, 2005, 106(5): 1604-1611.
- [12] Keuren JF, Magdeleyns EJ, Govers-Riemslog JW, et al. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation[J]. *Br J Haematol*, 2006, 134(3): 307-313.
- [13] Poitevin S, Cochery-Nouvellon E, Dupont A, et al. Monocyte IL-10 produced in response to lipopolysaccharide modulates thrombin generation by inhibiting tissue factor expression and release of active tissue factor-bound microparticles[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(4): 598-607.
- [14] Windelov NA, Johansson PI, Sorensen AM, et al. Low level of procoagulant platelet microparticles is associated with impaired coagulation and transfusion requirements in trauma patients[J]. *J Trauma Acute Care Surgery*, 2014, 77(5): 692-700.
- [15] Matijevic N, Wang YW, Wade CE, et al. PROMMTT study group. cellular microparticle and thrombogram phenotypes in the prospective observational multicenter major trauma transfusion (PROMMTT) study: correlation with coagulopathy[J]. *Thromb Res*, 2014, 134(3): 652-658.
- [16] Curry N, Raja A, Beavis J, et al. Levels of procoagulant microvesicles are elevated after traumatic injury and platelet microvesicles are negatively correlated with mortality[J]. *J Extracell Vesicles*, 2014, 3: 25625.
- [17] Park MS, Xue A, Spears GM, et al. Thrombin Generation and procoagulant microparticle profiles after acute trauma: a prospective cohort study[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2015, 79(5): 726-731.
- [18] Morel N, Morel O, Petit L, et al. Generation of procoagulant microparticles in cerebrospinal fluid and peripheral blood after traumatic brain injury[J]. *J Trauma*, 2008, 64(3): 698-704.
- [19] Nekludov M, Mobarrez F, Gryth D, et al. Formation of microparticles in the injured brain of patients with severe isolated traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2014, 31(23): 1927-1933.
- [20] Patz S, Trattning C, Grünbacher G, et al. More than Cell Dust: Microparticles Isolated from Cerebrospinal Fluid of Brain Injured Patients Are Messengers Carrying mRNAs, miRNAs, and Proteins[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30(14): 1232-1242.
- [21] Bohman LE, Riley J, Milovanova TN, et al. Microparticles impair hypotensive cerebrovasodilation and cause hippocampal neuronal cell injury after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2016, 33(2): 168-174.
- [22] Andrews AM, Lutton EM, Merkel SF, et al. Mechanical injury induces brain Endothelial-Derived microvesicle release: implications for cerebral vascular injury during traumatic brain injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2016, 10(323): 43.
- [23] Midura EF, Jernigan PL, Kueth JW, et al. Microparticles impact coagulation after traumatic brain injury[J]. *J Surg Res*, 2015, 197(1): 25-31.
- [24] Yasui H, Donahue DL, Walsh M, et al. Early coagulation events induce acute lung injury in a rat model of blunt traumatic brain injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(1): L74-86.