

免疫性血小板减少症中血小板生成与清除研究进展*

王 瑶, 左 斌, 阮长耿, 何 杨 (江苏血液研究所 苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006)

摘要:免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是机体对血小板抗原免疫耐受,从而导致血小板生成受抑和破坏过度的一种获得性自身免疫性疾病,主要临床特征是血小板计数降低。血小板数量的维持与血小板生成和清除两方面机制有关。ITP中抗血小板自身抗体、CD8⁺ T细胞等多种免疫因素抑制血小板生成或介导血小板破坏,最终导致血小板数量减少。该文将对血小板生成与清除机制及其在ITP中的作用进行综述。

关键词:免疫性血小板减少症;血小板生成;血小板清除;进展

中图分类号:R558.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2019)03-161-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.03.042

Recent Advances of Platelet Clearance and Thrombocytopoiesis in ITP

WANG Yao, ZUO Bin, RUAN Chang-geng, HE Yang (Jiangsu Institute of Hematology, the First Affiliated of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215006, China)

Abstract: Immune thrombocytopenia (ITP) is an acquired autoimmune disease with the feature of impaired immune tolerance to platelet antigen, thereby leading to inhibition of platelet generation and excessive damage of platelets. Low platelet count is the main clinical manifestation of ITP. The mechanisms involved in platelet generation and clearance are considered as the main contributors in the maintenance of platelet count. Platelet autoantibodies as well as multiple immune factors could either inhibit platelet generation or increase platelet destruction, ultimately resulting in a decrease in platelet count in ITP patients. The present paper will summary the mechanism involved in platelet generation and clearance and described its role in immune thrombocytopenia.

Keywords: immune thrombocytopenia (ITP); thrombocytopoiesis; platelet clearance; progress

免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)是排除其他可能导致血小板减少因素(感染、药物、恶性肿瘤以及其他的自身免疫性疾病等),以血小板计数降低、伴或不伴有皮肤黏膜出血为临床特征的一种获得性自身免疫性疾病^[1]。ITP发病机制复杂,免疫因素介导的血小板生成受抑或血小板破坏增加是导致ITP血小板减少的主要原因。血小板数量的维持依赖于血小板产生和清除两方面作用。生理情况下,机体通过多种细胞因子以及造血微环境调节血小板的生成,并且通过多种途径清除血小板来维持血小板数量的相对稳定。血小板生成或者清除调控异常,均可导致机体血小板数量的变化。本文将从血小板生成和清除方面对ITP发病机制进行综述,主要目的旨在启发新的临床治疗以及促进实验诊断的研究。

1 血小板生成与清除 血小板是由造血干细胞来源的巨核细胞分化成熟并释放生成的,这一过程主要发生在骨髓中。早期的研究发现骨髓中血小板的生成主要受到巨核细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)等多种细胞因子

以及造血微环境中多种细胞的调控。LEFRANCAIS等^[2]最近发现肺是骨髓外血小板生成器官,他们利用肺微循环成像证实肺内存在大量巨核细胞并且每小时产生1 000万个血小板,约占血小板生成总量的50%。肺内的部分巨核细胞和祖细胞来源于肺外部位,在血小板减少和骨髓干细胞相对缺乏的情况下,这些细胞可以迁出肺并且重新填充骨髓,完全恢复血小板数量。

生理情况下血小板的清除主要发生在肝脾的网状内皮系统。血小板发生凋亡或活化后,血小板细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻暴露,从而被网状内皮系统的乳糖凝集素和清道夫受体识别,导致血小板被吞噬清除。此外,衰老或低温储存的血小板发生去唾液酸化,可通过去唾液酸糖蛋白受体(ashwell-morell receptor, AMR)途径被肝脏细胞和Kupffer细胞识别清除^[3]。

血小板生成与清除过程处于动态平衡之中,两者协调维持血小板数量的稳定。一方面,衰老或损伤的血小板发生去唾液酸化后被肝脏细胞AMR识别清除,并且激活JAK2-STAT3通路促进肝细

* 基金项目:国家自然科学基金(81773356);江苏省自然科学基金(BK20171204)。

作者简介:王 瑶(1995—),女,学士,在读硕士研究生,专业:血栓与止血,E-mail:20184232033@stu.suda.edu.cn。

通讯作者:何 杨,E-mail:heyang1963@163.com, Tel:0512-67781379。

胞 TPO 的生成,后者再通过血液循环进入骨髓促进巨核细胞发育成熟和血小板生成^[4],促进血小板数量恢复。另一方面,血小板数量对维持血液 TPO 浓度至关重要。血小板表面和巨核细胞一样表达 TPO 受体 Mpl,当血小板数量增加时,血小板结合更多的 TPO,导致循环 TPO 减少,从而抑制巨核细胞发育及血小板生成^[5]。

2 ITP 中血小板生成减少 巨核细胞成熟障碍是临床 ITP 患者骨髓常见特征,主要表现为产血小板的成熟巨核细胞数量减少,其机制包括自身抗体等免疫因素导致巨核细胞分化受阻和巨核细胞凋亡异常,从而导致血小板生成减少。

2.1 自身抗体抑制巨核细胞成熟 MCMILLAN 等^[6]通过体外研究发现,慢性 ITP 患者血清的 IgG 抗体可抑制巨核细胞集落形成,导致 4, 8 及 16 倍体的巨核细胞数量减少。进一步的研究发现,ITP 患者自身抗体可抑制体外培养的巨核细胞释放血小板,并且这一作用可在血小板生成素受体激动剂罗米司亭(romiplostim)和艾曲波帕(eltrombopag)治疗后逆转^[7]。以上的研究提示 ITP 患者自身抗体可通过抑制巨核细胞增殖和成熟从而抑制血小板的生成。

2.2 巨核细胞凋亡缺陷 巨核细胞的正常凋亡是血小板生成的关键过程。体外研究发现,ITP 患者来源的 CD8⁺ T 细胞可以抑制巨核细胞的凋亡从而使得巨核细胞生成血小板受阻,这一现象可以被地塞米松纠正。另有研究发现,经过 ITP 患者血清处理的巨核细胞中 Bcl-xL 水平升高,同时还发现巨核细胞肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL), Caspase-3 和 Caspase-8 以及有丝分裂和多倍体形成相关的重要细胞因子 Cyclin B1 和 Cyclin D3 的表达均降低^[8],提示 ITP 患者巨核细胞成熟障碍与其细胞凋亡缺陷有关。

2.3 血小板生成微环境的调节异常 TPO 可与巨核细胞表面 cMpl 配体结合,TPO-cMpl 信号通路在巨核细胞发育成熟过程中发挥重要调节作用。研究发现,血小板生成缺陷可能与存在 TPO 自身抗体有关。2001 年,有报道在 3 例血小板减少患者体内检测出针对 TPO 的 IgG 抗体。体外实验证实该抗体可以和外源性的 TPO 发生交叉反应并中和 TPO 的活性。最近研究发现,在 ITP 及一些血小板减少性疾病的患者体内存在抗 TPO 受体(cMpl)和抗 TPO/cMpl 复合体的抗体^[9],这些抗体在 ITP 中的作用还有待阐明。

血小板生成过程中巨核细胞需要迁移到骨髓血管窦释放血小板前体,巨核细胞迁移能力缺陷将

导致血小板的生成障碍。整合素 $\alpha v \beta 3$ 是巨核细胞迁移黏附的关键分子。近期研究发现,ITP 患者体内存在抗整合素 $\alpha v \beta 3$ 抗体,体外实验证实抗整合素 $\alpha v \beta 3$ 抗体可通过抑制巨核细胞的迁移黏附从而抑制血小板生成^[10]。此外,缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是调节造血干细胞分化的重要因子。在 ITP 患者骨髓样本中发现 HIF-1 α 表达下调,巨核细胞和血小板的数量减少。体外研究显示,HIF-1 α 激动剂处理后巨核细胞及其多倍体数量增加和体积增大^[11]。这一结果表明,HIF-1 α 表达异常可能是 ITP 疾病巨核细胞成熟障碍的机制之一。

3 ITP 中血小板清除增加 血小板破坏增加是 ITP 血小板减少的主要原因,其中涉及多种血小板清除机制,包括抗体介导的血小板清除、CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, CTL)介导血小板清除以及血小板凋亡等。

3.1 自身抗体介导的血小板清除 1951 年, Harrington 发现给自己注射 ITP 患者血清后出现了一过性的血小板减少,这证明患者体内存在一种可以破坏血小板的物质。后期研究证明,抗血小板表面糖蛋白的自身抗体介导了这一破坏作用。研究发现,70%~80% 的 ITP 患者体内可检测到抗血小板自身抗体,主要包括抗血小板糖蛋白 Ib(glycoprotein Ib, GP1b)、GPIIb 及 GPIIIa 抗体。血小板自身抗体的产生与 T 辅助细胞 1(T help cell, Th1), CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ 调节性 T 细胞(regulation T cell, Treg)以及细胞因子 IL-10 和 IL-2 等失调有关,最终导致 B 细胞过度活化产生抗血小板自身抗体。ITP 患者中血小板自身抗体介导的血小板清除机制目前发现的有以下两种:Fc 依赖途径和 Fc 非依赖途径。

3.1.1 Fc 依赖途径的血小板清除:该过程的血小板清除机制是最经典清除途径。ITP 患者体内自身反应性血小板抗体的 Fc 段与肝脾网状内皮系统中的巨噬细胞或 Kuffer 细胞的 Fc 受体(Fc receptor, FcR),随后启动血小板的吞噬清除过程。

3.1.2 Fc 非依赖途径的血小板清除:有研究发现,大多数难治性 ITP 患者体内存在 GP1b 抗体,可通过 Fc 非依赖途径介导血小板清除。抗 GP1b 抗体结合血小板后导致血小板活化,细胞膜发生转位使得唾液酸苷酶 1(neuraminidase-1, NEU1)暴露并后者介导 GP1b 复合物去唾液酸化,继而暴露 β 半乳糖。 β 半乳糖可被肝脏细胞和巨噬细胞上的 AMR 受体识别从而导致血小板的清除。最近 QUACH 等^[12]发现,某些难治性 ITP 患者体内的抗 GP1b α 抗体可通过诱导血小板机械传感机制介

导血小板清除。研究发现,抗 GP1b α 抗体与血小板上机械门控复合物 GP1b-IX 的 GP1b α 结合,导致血小板发生交联,GP1b-IX 复合体受到牵拉,从而触发机械敏感结构域(mechanosensory domain, MSD)介导 Fc 非依赖性的血小板清除。

3.2 T 细胞介导的血小板清除 OLSSON 等^[13]发现在部分 ITP 患者的血小板清除不依赖于抗体,而与 CD3⁺ T 细胞有关。进一步研究发现,这些 CD3⁺ 细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, CTL)可介导血小板的直接破坏。最近另外的一项研究发现,ITP 患者体内 Fas 功能的缺失可能是 CD8⁺ CTL 持续攻击自身血小板的原因^[14]。另外 QIU 等^[15-16]研究提出在血小板特异性 CD8⁺ CTL 阳性的 ITP 患者中 NEU1 与血小板表面 GPIb-IX 复合物去唾液酸化呈现正相关。体内外的研究均证明 CD8⁺ CTL 促进 NEU1 向血小板表面转移并活化导致血小板去唾液酸化,随后血小板通过去唾液酸化-AMR 途径被肝脏细胞识别清除。

3.3 血小板过度凋亡 多项研究发现,ITP 患者中血小板凋亡增加。DENG 等^[17]发现慢性成人 ITP 患者血小板中凋亡蛋白 Bax 和 Bak 表达升高、抗凋亡蛋白 Bcl-xL 表达降低并且血小板的线粒体内膜电位发生去极化。GOETTE 等^[18]发现难治性 ITP 患者血小板凋亡增加与抗 GP1b 抗体有关,抗 GP1b 抗体结合导致血小板 Caspase 3 表达升高、线粒体膜电位发生去极化以及 PS 外露。另一研究发现,自身抗体导致的血小板凋亡与抗 GPIIb/IIIa 抗体有关^[19]。ZHAO 等^[20]发现血小板凋亡受 Akt-PKA 信号途径调控。血小板 Akt 蛋白通过磷酸化激活磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE3A),后者进一步降解 cAMP 导致其浓度下降从而抑制 PKA(protein kinase A, PKA)活性,导致血小板发生凋亡。CHEN 等^[21]进一步研究发现,ITP 患者血小板减少与 Akt 介导的血小板凋亡有关。ITP 患者抗 GP1b 抗体结合导致血小板 Akt 活性升高,PKA 活性下降,从而发生血小板凋亡。通过 Akt 抑制剂或 Akt 基因敲除均可抑制抗 GP1b 抗体介导的血小板凋亡。

4 结语 ITP 是一个异质性的疾病,其发病机制复杂,目前研究尚不够深入。对血小板生成和清除机制的研究,有助于拓展 ITP 疾病的病理机制,也为 ITP 的治疗提供了新的思路。血小板生成方面,目前已有罗米司亭、艾曲波帕等血小板生成素受体激动剂成功用于 ITP 临床治疗;血小板清除方面,神经氨酸酶抑制剂(NCT03520049)用于 ITP 治疗已开展临床试验,同时血小板凋亡的最新进展有望成为 ITP 治疗新的突破口。相信随着研究的

不断深入,将有更多的新理念新思路出现。另一方面,ITP 疾病呈现个体化特征,未来将其与多样性的发病机制相结合并实施针对性的治疗,将有助于建立 ITP 个体化治疗,提升 ITP 的临床诊治水平。

参考文献:

- [1] PROVAN D, STASI R, NEWLAND A C, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2010, 115(2): 168-186.
- [2] LEFRANCAIS E, ORTIZ-MUNOZ G, CAUDRILLIER A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors [J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 105-109.
- [3] QUACH M E, CHEN Wenchun, LI Renhao. Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage [J]. *Blood*, 2018, 131(14): 1512-1521.
- [4] GROZOVSKY R, BEGONJA A J, LIU Kaifeng, et al. The ashwell-morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling [J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(1): 47-54.
- [5] XU Miao, LI June, NEVES M A, et al. GPIb alpha is required for platelet-mediated hepatic thrombopoietin generation [J]. *Blood*, 2018, 132(6): 622-634.
- [6] MCMILLAN R, WANG Lei, TOMER A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by anti-platelet autoantibodies from adult chronic ITP patients [J]. *Blood*, 2004, 103(4): 1364-1369.
- [7] IRAQI M, PERDOMO J, YAN Feng, et al. Immune thrombocytopenia: antiplatelet autoantibodies inhibit proplatelet formation by megakaryocytes and impair platelet production in vitro [J]. *Haematologica*, 2015, 100(5): 623-632.
- [8] YANG Lei, WANG Lin, ZHAO Chunhong, et al. Contributions of TRAIL-mediated megakaryocyte apoptosis to impaired megakaryocyte and platelet production in immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2010, 116(20): 4307-4316.
- [9] NAZY I, KELTON J G, MOORE J C, et al. Autoantibodies to thrombopoietin and the thrombopoietin receptor in patients with immune thrombocytopenia [J]. *British Journal of Haematology*, 2018, 181(2): 234-241.
- [10] ZENG Dongfeng, CHEN Fang, WANG Song, et al. Autoantibody against integrin ($\alpha v \beta 3$) contributes to thrombocytopenia by blocking the migration and adhesion of megakaryocytes [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2018, 16(9): 1843-1856.
- [11] QI Jiaqian, YOU Tao, PAN Tingting, et al. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha contributes to impaired megakaryopoiesis in immune thrombocytopenia [J]. *Thrombosis and Haemosta-*

- sis, 2017, 117(10):1875-1886.
- [12] QUACH M E, DRAGOVICH M A, CHEN Wen-chun, et al. Fc-independent immune thrombocytopenia via mechanomolecular signaling in platelets[J]. Blood, 2018, 131(7):787-796.
- [13] OLSSON B, ANDERSSON P O, JERNAS M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Nature Medicine, 2003, 9(9):1123-1124.
- [14] BOGGIO E, GIGLIOTTI C L, ROSSI D, et al. Decreased function of fas and variations of the perforin gene in adult patients with primary immune thrombocytopenia[J]. British Journal of Haematology, 2017, 176(2):258-267.
- [15] QIU Jihua, SHAO Linlin, ZHOU Hai, et al. Platelet desialylation is closely associated with cytotoxic T lymphocyte-mediated platelet destruction in immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2014, 124(21):463.
- [16] QIU Jihua, LIU Xuena, LI Xiaoqing, et al. CD8(+) T cells induce platelet clearance in the liver via platelet desialylation in immune thrombocytopenia[J]. Sci Rep, 2016, 6:27445.
- [17] DENG Gang, YU Shifang, LI Qiming, et al. Investigation of platelet apoptosis in adult patients with chronic immune thrombocytopenia[J]. Hematology, 2017, 22(3):155-161.
- [18] GOETTE N P, GLEMBOTSKY A C, LEV P R, et al. Platelet apoptosis in adult immune thrombocytopenia: insights into the mechanism of damage triggered by auto-antibodies[J]. PLoS One, 2016, 11(8):14.
- [19] LEYTIN V, MYKHAYLOV S, STARKEY A F, et al. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-glycoprotein IIb-induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia[J]. British Journal of Haematology, 2006, 133(1):78-82.
- [20] ZHAO Liang, LIU Jun, HE Chunyan, et al. Protein kinase A determines platelet life span and survival by regulating apoptosis[J]. Journal of Clinical Investigation, 2017, 127(12):4338-4351.
- [21] CHEN Mengxing, YAN Rong, ZHOU Kangxi, et al. Akt-mediated platelet apoptosis and its therapeutic implications in immune thrombocytopenia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(45):E10682-E10691.