

骨髓间充质干细胞与万古霉素藻酸钙微珠复合,期望其解决开放性骨折复位后的骨缺损和感染问题,该复合思路同样可应用于结核术后的植骨材料。在构建具有“RFP 缓释”和“rADSCs 成骨”的复合体之前,必须首先研究不同浓度的 RFP 对 rADSCs 的影响。本实验分别从细胞凋亡、增殖、成骨及黏附支架等方面探讨 RFP 对细胞的毒性作用。结果表明高浓度的 RFP(30 μ g/ml)可促进细胞凋亡,尤其促进早期凋亡。细胞生长曲线也证实经高浓度 RFP 干预后,rADSCs 在后期的增殖能力明显下降。ALP 检测发现高浓度 RFP 对 rADSCs 成骨的影响不及增殖的影响大,其原因可能为成骨诱导液中加入的地塞米松本身即可抑制细胞增殖有关。黏附率计算及扫描电镜观察结果提示 rADSCs 与同种异体脱钙骨支架具有良好的相容性,但高浓度的 RFP 也可影响 rADSCs 与支架的复合。因此,最终确定的不影响 rADSCs 增殖、成骨及黏附能力的临界浓度约为 20 μ g/ml,而 RFP 最低抑菌浓度(MIC)为 0.005 ~ 0.5 μ g/ml,最低杀菌浓度(MBC)为 MIC 的 10 倍^[2]。由此可见本实验得出的临界浓度高于 MBC,可有效杀灭结核杆菌。这一结论可为构建具有 RFP 缓释和 rADSCs 成骨双重作用的抗结核性骨组织工程复合体提供实验基础。

参考文献

- 1 Soares do Brito J, Batista N, Tirado A, *et al.* Surgical treatment of spinal tuberculosis: an orthopedic service experience[J]. Acta Med

- Port, 2013, 26(4): 349 - 356
 - 2 戈朝晖,王自立,魏敏吉. 利福平在脊柱结核患者不同组织分布的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2004, 14(12): 741 - 744
 - 3 刘江涛,王永清,夏侃,等. 异烟肼聚乳酸缓释体的制备及体内外释药特性[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(4): 290 - 293
 - 4 Patel BK, Parikh RH, Aboti PS. Development of oral sustained release rifampicin loaded chitosan nanoparticles by design of experiment [J]. J Drug Deliv, 2013, 37(4): 938 - 941
 - 5 叶向阳,孙湘,贾会文,等. 利福平/聚乳酸-聚羟基乙酸缓释微球的制备及特性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15: 9608 - 9612
 - 6 鲍玉成,张文龙,王勇. 缓释双药物载体制备与性能[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(29): 5345 - 5350
 - 7 Liu G, Zhang Y, Liu B, *et al.* Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold [J]. Biomaterials, 2013, 34(11): 2655 - 2664
 - 8 Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, *et al.* Same or not the same? Comparison of adipose tissue - derived versus bone marrow - derived mesenchymal stem and stromal cells[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21: 2724 - 2752
 - 9 刘正文,呼西旦,付明花,等. 兔脊柱结核模型的构建[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29: 758 - 761
 - 10 Hou T, Xu J, Li Q, *et al.* In Vitro Evaluation of a Fibrin Gel Antibiotic Delivery System Containing Mesenchymal Stem Cells and Vancomycin Alginate Beads for Treating Bone Infections and Facilitating Bone Formation[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14: 1173 - 1182
- (收稿日期:2013-10-18)
(修回日期:2013-10-21)

系统性红斑狼疮合并自身免疫性血小板减少血清学研究

任传永 徐 亮 陆进明 李 志 宣 丹 盛 君 毛桐俊

摘 要 **目的** 探讨与免疫性血小板减少有关的特异性自身抗体:抗 CD40 配体(CD40L)抗体、抗血小板生成素(TPO)抗体、抗血小板膜糖蛋白(GPⅡb/Ⅲa)抗体、抗血小板生成素受体(C-mpl)抗体在系统性红斑狼疮(SLE)合并血小板减少患者血清中分布及其作用。**方法** 收集 SLE 合并自身免疫性血小板减少、SLE 血小板正常各 60 例,酶联免疫吸附法(ELISA)测定该 4 种抗体,比较各组之间各抗体水平及抗体的阳性率是否存在统计学差异,SLE 合并血小板减少患者骨髓细胞学涂片检查常规进行。**结果** 4 种抗体的浓度与血小板数目存在不同程度负相关,血小板减少组抗体的阳性率高于血小板正常组 SLE 合并血小板减少患者中至少能够检测出其中一种抗体阳性的占 73%,同时检测出该 4 种抗体约为 13%。4 种抗体同时阳性或阴性的血小板减少患者临床表现及实验室指标比较存在统计学差异。**结论** 抗 CD40L 抗体、抗 C-mpl 抗体、抗血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 抗体、TPO 抗体介导的自身免疫性血小板减少可能是 SLE 合并血小板减少的发病机制之一,尚有其他因素参与了 SLE 合并血小板减少的发病过程。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571740)

作者单位:314500 浙江省桐乡市第一人民医院(任传永);241001 皖南医学院附属弋矶山医院(徐亮、陆进明、李志、宣丹、盛君、毛桐俊)

通讯作者:徐亮,电子信箱:xuliang_57@sohu.com

关键词 自身抗体 CD40L C - mpl 系统性红斑狼疮 血小板减少

[中图分类号] R593 [文献标识码] A

Serology Study of Immue Thrombocytopenia in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Ren Chuanyong, Xu Liang, Lu Jinming et al. The First People's Hospital of Tongxiang, Zhejiang 314500, China

Abstract Objective To determine whether antibodies to four platelet - specific antigens (CD40L, thrombopoietin glycoprotein II b/III a (GP II b/III a) and thrombopoietin receptor (C - mpl) contribute to thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Methods** The antibodies (anti - GP II b/III a, anti - TPOr, anti - CD40L and anti - TPO antibodies) were measured with an enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) in 60 cases of each group of SLE patients with thrombocytopenia or not. The mean concentrations and the outcome of the rate of positive of every kind of antibodies of each group were compared each other. The megakaryocyte density in bone - marrow smears from all patients with thrombocytopenia was evaluated. **Results** The percentage of one or more kind of antibodies which were mentioned above in SLE patients with thrombocytopenia were detected was 73%, and each serum of 13% of SLE patients with thrombocytopenia could be found all the four kind of antibodies. Negative correlations were tested between the amount of platelet and the concentrations of each antibodies of SLE patients with thrombocytopenia. In addition there were many clinical and laboratory difference between two sides of SLE patients with thrombocytopenia who had all the four antibodies or had none of them. **Conclusion** The four kinds of antibodies (CD40L - Ab, C - mpl - Ab, GP II b/III a - Ab, TPO - Ab) may all contributing to thrombocytopenia of SLE in some degree, but can not explain its pathogenesis thoroughly. In addition there are still other factors existed which we have not known now have involved in the pathogenesis of thrombocytopenia of SLE also.

Key words Antibody; CD40L; C - mpl; Thrombocytopenia; Systemic lupus erythematosus

血小板减少是系统性红斑狼疮 (SLE) 常见合并症之一, 其发生率约为 30%, 与免疫系统密切相关^[1]。SLE 合并严重血小板减少 ($PLT \leq 40 \times 10^9/L$) 可因颅内或胃肠道出血而危及生命, 是预后不良的独立危险因素之一^[2]。这里所说的血小板减少是指 SLE 以血小板减少为主而其他临床表现相对不明显的临床病症。传统认为抗血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 抗体与血小板膜靶抗原结合, 活化补体或通过单核 - 吞噬系统破坏血小板, 是 SLE 合并血小板减少发病的重要原因。Kuwana^[3] 研究发现, 部分 SLE 患者血清中可检测出抗血小板生成素 (TPO) 抗体, 该抗体阳性患者血清 TPO 水平降低, 部分患者伴有血小板减少, 进一步研究发现在部分 SLE 血小板减少患者血清中检测出抗血小板生成素受体 (C - mpl) 抗体。Nakamura^[4] 研究发现, 部分 SLE 患者血清中可检测出抗 CD40L 抗体, 抗体阳性患者血小板减少发生率显著高于阴性患者。SLE 是自身免疫病的原型, 血清中存在多种自身抗体, 并与临床密切相关, 为深入探讨评价上述 4 种抗体在 SLE 血小板减少中的意义, 并与临床资料进行相关性分析进行本次研究。

对象与方法

1. 对象: 收集 2008 年 3 月 ~ 2011 年 6 月笔者医院 SLE 合并血小板减少患者 60 例, 男性 8 例, 女性 52 例, 患者年龄 19 ~ 56 岁, 平均年龄 35 ± 3 岁, 血小板计数 ($13 \sim 55$) $\times 10^9/L$, 平均血小板计数 (45.3 ± 6.2) $\times 10^9/L$, 中位病程 36 个月。随机

选取同期 SLE 血小板正常患者 60 例为病例对照, 其中男性 6 例, 女性 54 例, 平均年龄 31 ± 5 岁, 中位病程 27 个月, 两组间平均年龄、性别、中位病程等指标比较无统计学差异。所有患者诊断均符合美国风湿病学院 1997 年修订的 SLE 分类标准^[5]。所有 SLE 合并血小板减少患者均排除抗磷脂综合征、药物性血小板减少可能。

2. 方法: 二步法获取、分离所有患者血清, $-80^\circ C$ 分装冻存。收集所有患者临床资料, 间接免疫荧光法检测抗核抗体 (IFANA)、ELISA 检测抗心磷脂抗体 (ACL)、抗 β_2 - GpI 抗体、放射免疫竞争法 (Farr) 检测抗 ds - DNA 抗体。免疫印迹法 (IBT) 检测盐水可提取核抗原 (ENA) 抗体。骨髓细胞学检查常规进行。30 例 SLE 合并血小板减少患者临床资料: SLE 合并血小板减少患者血小板计数 ($13 \sim 55$) $\times 10^9/L$, 平均血小板计数 (45.3 ± 6.2) $\times 10^9/L$, 7 例有出血倾向其中皮肤黏膜紫癜 3 例, 牙龈出血 4 例, 均为轻度出血, 平均 SLEDAI 积分 10.6 分, 骨髓细胞学检查表明, 平均巨核细胞数 56 个/片, 其中巨核细胞增多 2 例、21 例正常、7 例减少。所有患者开始均单用糖皮质激素 [泼尼松 $1mg/(kg \cdot d)$] 治疗, 22 例治疗有效, 8 例疗效不明显。抗 CD40L 抗体、抗 C - mpl 抗体、抗膜糖蛋白 GP II b/III a、抗 TPO 抗体检测, ELISA 测定上述 4 种自身抗体, 试剂盒购置于美国 ADL 公司。操作步骤按照说明书指示进行。所有标本均做复孔, 并做空白对照, 反应结束后 30min 内使用自动酶标仪 (美国 BD 公司) 在 450nm 波长处读取吸光度值 (OD_{450}), 绘制标准曲线, 根据标准曲线得出每例标本自身抗体浓度值。

3. 统计学方法: 所有数据统计采用 SPSS 16.0 统计软件分析结果。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并进行正态

性检验,两组之间均数比较采用 *t* 检验,率的比较采用卡方检验,依不同条件使用连续性校正或 *Fisher* 精确概率法计算统计量。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. SLE - PLT 减少患者血小板数目与每种抗体水平相关性分析:根据 4 种抗体 Elisa 法检测结果将 60 例 SLE 合并血小板减少患者的血小板数目与各种抗体浓度水平进行相关分析,结果见表 1。

表 1 系统性红斑狼疮合并血小板减少 4 种抗体与血小板相关性

统计量	CD40L - Ab	C - MPL - Ab	TPO - Ab	GP II b/III a - Ab
<i>r</i>	-0.506	-0.523	-0.756	-0.540
<i>P</i>	0.006	0.004	0.040	0.002

相关性分析结果显示,CD40L 抗体、抗血小板生成素受体抗体、抗血小板生成素抗体、抗血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 抗体均与血小板数目呈负相关。

2. 各组抗体阳性率及其比较:将 60 例 SLE 合并血小板减少、60 例 SLE 血小板正常进行 Elisa 法测定上述 4 种抗体,4 种抗体阳性率分别为 20% : 0、23% : 0、33% : 16%、53% : 13%,相应 *P* 值分别为 $P = 0.030$ 、 $P = 0.020$ 、 $P = 0.140$ 、 $P = 0.001$,SLE 合并血小板减少患者中至少能够检测出其中一种抗体阳性的约 73%,两种以上抗体阳性的约 40%,4 种抗体同时阳性的约 13%。两组之间阳性率的比较结果见表 2。

表 2 SLE 合并血小板减少组与血小板正常组抗体阳性率的比较

项目	CD40L - Ab	C - Mpl - Ab	TPO - Ab	GPⅡbⅢa - Ab
PLT 减少 (%)	20	23	33	53
PLT 正常 (%)	0	0	16	13
χ^2	4.63	5.82	2.22	10.8
<i>P</i>	0.03	0.02	0.14	0.001

两组之间 4 种抗体阳性率分别进行卡方检验,结果可见,血小板减少组 CD40L - Ab、C - Mpl - Ab、GP II b/III a - Ab 阳性率均高于血小板正常组

3. SLE 合并血小板减少 4 种抗体阳性与 4 种抗体阴性患者之间临床特点比较:根据结果将血小板减少组上述 4 种抗体同时呈阳性、呈阴性分为两组,比较两者之间在平均血小板计数、ds - DNA 效价、C3 水平、蝶形红斑、盘状红斑、光过敏、口腔溃疡、关节炎、浆膜炎、肾脏病变、神经系统、血液系统病变、血小板

计数、免疫学检查、补体水平、抗磷脂抗体、SLEDAI 积分及出血倾向等上述指标的比较结果(率比较使用 *Fisher* 确切概率检验法双侧检验,均数比较使用 *t* 检验),详见表 3。

表 3 4 种抗体全部阳性与阴性患者临床特征的比较

指标	全阳性 (<i>n</i> = 8)	全阴性 (<i>n</i> = 16)	<i>P</i>
女性 (%)	100	88	N
平均年龄 (岁)	33.6 ± 4.3	36.9 ± 4.4	N
蝶形红斑 (%)	100	25	0.001
盘状红斑 (%)	25	13	N
光过敏 (%)	100	13	0.000
口腔溃疡 (%)	100	13	0.000
关节炎 (%)	100	25	0.001
多浆膜炎 (%)	50	13	N
肾脏病变 (%)	75	25	0.032
神经病变 (%)	25	0	N
溶血性贫血 (%)	25	0	N
白细胞计数减少 (%)	75	50	N
血小板计数 (× 10 ⁹ / L)	24	45	0.042
抗 Sm 抗体 (%)	75	13	0.000
抗 ds - DNA (%)	100	63	N
抗心磷脂抗体 (%)	25	50	N
补体低下 (%)	100	13	0.000
使用免疫抑制剂 (%)	100	50	0.022
皮质激素抵抗 (%)	100	25	0.000
SLEDAI 评分	14.2 ± 2.8	8.7 ± 3.7	0.060
平均巨核细胞 (个 / 片)	7	37	0.040
出血倾向 (%)	75	25	0.032

N 表示 $P > 0.05$,结果显示两组之间在蝶形红斑、光过敏、口腔溃疡、关节炎、肾脏病变、抗 Sm 抗体、低补体、糖皮质激素治疗反应性、骨髓巨核细胞数、出血倾向、血小板数等指标之间均存在统计学差异

讨 论

血小板减少是 SLE 常见的血液系统损害之一,自身抗体介导的血小板破坏被认为是其发病机制之一。研究指出 C - Mpl 抗体可引起 TPO 的信号转导异常,导致巨核细胞成熟障碍。Michel 等^[6]研究认为:抗血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 抗体与血小板膜表面糖蛋白结合形成免疫复合物增加血小板黏附性直接引起血小板破坏。TPO 抗体可与 TPO 结合抑制 SLE 巨核细胞克隆单位形成,而 SLE 患者体内可溶性 CD40L 水平异常增高,可激活内皮细胞引起炎症反应并作为自身抗原产生抗体,而且 CD40L 表面的赖氨酸 - 精氨酸 - 谷氨酸序列易与血小板表面膜糖蛋白 GP II b/III a 结合增加黏附性^[7-9]。本研究显示抗体效价与血小板计数存在程度不同的负相关,血小板减少组抗体阳性率高于血小板正常组,存在统计学差

异,可能与上述因素有关。抗体形成及其致病性可能是 SLE 血小板减少的重要发病机制之一。

本研究中 4 种抗体全部阳性的患者临床表现似乎更加严重,活动性也更显著,提示抗体的致病机制不局限于血小板破坏作用,巨核细胞数量明显减少,血小板生成素受体抗体引起巨核细胞再生不良是其原因之一。SLE 合并血小板减少患者糖皮质激素抵抗现象较多。有研究发现系统性红斑狼疮合并狼疮性肾炎患者糖皮质激素受体表达存在异常,而对系统性红斑狼疮合并狼疮肾炎、类风湿关节炎等自身免疫性疾病的研究发现,糖皮质激素抵抗者其糖皮质激素受体表达存在异常,糖皮质激素受体在免疫性疾病的治疗中有重要地位,因而推测 SLE 合并血小板减少激素抵抗可能与此有关,需进一步研究证实^[10-13]。另外 P-糖蛋白(P-gp)过度表达也可以加速 SLE 患者淋巴细胞内糖皮质激素的排除引起糖皮质激素抵抗,因此糖皮质激素抵抗的原因众多,需进一步探索,治疗选择也存在一定差异。

综上所述,本研究表明 SLE 合并血小板减少患者血清中存在上述 4 种抗体,抗体的种类及效价与 SLE 患者血小板数存在一定负相关,该 4 种抗体可以部分解释 SLE 患者血小板减少的发病机制并对 SLE 血小板减少糖皮质激素的治疗有一定的临床指导意义。但本研究仅检测了 4 种抗体在 SLE 合并血小板减少患者中的分布情况,初步探讨了血小板减少的原因,没有进一步研究抗体对于血小板减少的作用机制,有待于进一步探索。

参考文献

- Kumar S, Benseler SM, Kirby - Allen M, *et al.* B - cell depletion for autoimmune thrombocytopenia and autoimmune hemolytic anemia in pediatric systemic lupus erythematosus [J]. *Pediatrics*, 2009, 123 (1): e159 - e163
- Fernandez M. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort, LUMINA (XLIX): preliminary evaluation of the impact of statins on disease activity [J]. *J Clin Rheumatol*, 2008, 14 (3): 178 - 180
- Kuwana M. Two types of autoantibody - mediated thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatology*: Oxford, 2006, 45 (7): 851 - 854
- Nakamura M. Autoantibody to CD40 ligand in systemic lupus erythematosus: association with thrombocytopenia but not thromboembolism [J]. *Rheumatology*: Oxford, 2006, 45 (2): 150 - 156
- Feletar M. The impact of the 1997 update of the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus: what has been changed? [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 60 (7): 2067 - 2069
- Michel M. Platelet autoantibodies and lupus - associated thrombocytopenia [J]. *Br J Haematol*, 2002, 119 (2): 354 - 358
- Ziakas PD. Suspects in the tale of lupus - associated thrombocytopenia [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 145 (1): 71 - 80
- Urquiza - Padilla M, Balada E, Cortés F, *et al.* Serum levels of soluble CD40 ligand at flare and at remission in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Rheumatol*, 2009, 36 (5): 953 - 960
- Robles - Carrillo L, Meyer T, Hatfield M, *et al.* Anti - CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice [J]. *J Immunol*, 2010, 185 (3): 1577 - 1583
- Li X, Zhang FS, Zhang JH, *et al.* Negative relationship between expression of glucocorticoid receptor alpha and disease activity: glucocorticoid treatment of patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatol*, 2010, 37 (2): 316 - 321
- Derijk RH, Schaaf MJ, Turner G, *et al.* A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta - isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis [J]. *J Rheumatol*, 2001, 28 (11): 2383 - 2388
- 王永福, 庞春艳, 马秀芬, 等. 糖皮质激素受体在系统性红斑狼疮发病中的作用 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2012, 44 (2): 229 - 232
- 牛吉瑞, 王旭东. 糖皮质激素在严重感染及感染性休克中的应用 [J]. *中国医刊*, 2013, 48 (9): 8 (收稿日期: 2013 - 10 - 12) (修回日期: 2013 - 10 - 23)
- (上接第 168 页)
- Borsig L, Wong R, Hynes RO, *et al.* Synergistic effects L - and P - selectin in facilitating tumor metastasis can involve non - mucin ligands and implicate leukocyte as enhancers of metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (4): 2193 - 2198
- 郑杰. 肿瘤的细胞和分子生物学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011
- 聂金桃, 肖大树, 李俊, 等. E - Cad MMP - 7 与胃癌生物学行为的关系 [J]. *安徽医学*, 2011, 32 (1): 25 - 27
- Shih HC, Shiozawa T, Miyamoto T, *et al.* An inverse correlation between E - cad protein and beta - catenin expression in the normal and malignant human endometrium [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24: 3843 - 3850
- 李德艳, 刘爱东, 高峰. COX - 2 和 E - cad 在胃癌的表达及意义 [J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 10 (13): 3063 - 3064
- 刘庆滨, 陈艳昕, 黄江梅, 等. 胃癌组织中 Ets - 1 和 E - cad 的表达水平及生物学意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32 (14): 2950 - 2951
- 周国强, 汪良. ICAM - 1、MMP - 2 及 iNOS 表达与胃癌侵袭转移的关系 [J]. *苏州大学学报: 医学版*, 2008, 28 (6): 970 - 973
- 邵建富, 王敬瑄, 郑宝军, 等. CD105 和细胞间粘附分子 - 1 在胃癌中的表达及意义 [J]. *河北医药*, 2012, 34 (18): 2725 - 2727 (收稿日期: 2013 - 10 - 11) (修回日期: 2013 - 11 - 04)