外伤导致原发性血小板增多症与血巨核细胞体外扩散的相关性临床分析

何学鹏　杨　凯　陈　鹏　刘　兵　张　媛　王　芳　郭　智　刘晓东　楼金星　陈惠仁　刘更夫

摘　要　目的　探讨外伤导致原发性血小板增多症与血巨核细胞体外扩散的相关性。**方法**　2007 年 9 月 ~2013 年 12 月选择在笔者医院进行急诊的外伤导致原发性血小板增多症患者 36 例作为观察组,同期选择在笔者医院进行健康体检的健康志愿者 36 例作为对照组,两组都抽取静脉血进行血浆 TPO 与 IL－11 的检测。分离脐带血的单个核细胞,然后与两组的血浆进行共孵育培养,进行 $CD41a^+$ 的表达情况、巨核祖细胞计数和巨核细胞 DNA 倍体分析。**结果**　观察组在细胞培养 10 天与 15 天的巨核细胞数量明显多于对照组。经过巨核系祖细胞集落检测,结果显示观察组的 CFU－MK 值明显高于对照组($P<0.05$)。观察组的血浆 TPO 和 IL－11 值明显高于对照组,同时观察组的培养第 10 天与第 15 天的多倍体细胞($n\geqslant4$)的比例明显高于对照组,对比差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　外伤导致原发性血小板增多症伴随有巨核细胞扩散性与生成增加,是由于血浆中 TPO 和 IL－11 过表达增加而导致巨核细胞成熟形成多倍体,使得血小板增多。

关键词　外伤　原发性血小板增多症　巨核细胞　体外扩散

中图分类号　R331.1　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.12.030

Clinical Correlation Analysis Between the Trauma Induced Essential Thrombocythemia and Megakaryocytes Vitro Proliferation. *He Xuepeng, Yang Kai, Chen Peng, et al. Department of Hematology, General Hospital of Beijing Military Region, Beijing 100700, China*

Abstract　Objective　To investigate the clinical correlation between the trauma induced essential thrombocythemia and megakaryocytes vitro proliferation. **Methods**　We selected 36 trauma induced essential thrombocythemia patients from September 2007 to December 2013 in our hospital as the observation group, and selected 36 cases of healthy volunteers as the control group at the same period. All cases were detected venous blood plasma TPO and IL－11. We separated the cord blood mononuclear cells, which were incubated with the two groups′ plasma for detecting $CD41a^+$ expression, megakaryocyte progenitor cell count and megakaryocytic DNA ploidy analysis. **Results**　The number of megakaryocytes in the observation group on the cultured 10 and 15 days were significantly more than the control group. The egakaryocyte progenitor colony assay showed that CFU－MK value of the observation group was significantly higher than the control ($P<0.05$). The plasma TPO and IL－11 levels in the observation group were significantly higher, while the proportion of polyploid cells ($n\geqslant4$) in the observation group on the cultured 10 and 15 days were significantly higher, compared to significant differences ($P<0.05$). **Conclusion**　Trauma induced essential thrombocythemia is more accompanied by megakaryocytes vitro proliferation. It is due to increase TPO and IL－11 overexpression in plasma and increase cell maturation resulting in the formation of polyploid megakaryocytes to thrombocytosis.

Key words　Trauma; Essential thrombocythemia; Megakaryocytes; Vitro proliferation

原发性血小板增多症是常见的骨髓增殖性肿瘤类型,其临床上主要表现为出血倾向及血栓形成,实验室可检测到外周血血小板持续明显增多,骨髓巨核细胞过度增殖[1]。在其发生原因中,外伤所导致的出血可导致血小板增加,患者多为成人[2]。不过其具体的病因和机制十分复杂,迄今尚未完全阐明。在机体内,形成血小板与血小板前体以及巨核细胞的成熟程度有关[3]。巨核细胞受外在原因的影响可以分化成熟,多倍体化胞核、增加胞质量是其主要表现形式,血小板内容物和特异性颗粒会因此形成。同时在生成血小板的过程中,巨核细胞发生了类似于凋亡的形态改变[4,5]。通过超微结构发现,巨核细胞如果衰老,就会有凋亡发生,血小板被巨核细胞释放完全后,巨噬细胞就会吞噬血小板。同时外伤导致原发性血小板增多症的临床特点之一表现为巨核细胞数量正

基金项目:黄石医药卫生科研基金资助项目(黄科技发农[2014]3 号)

作者单位:100700　中国人民解放军北京军区总医院血液科(何学鹏、杨凯、陈鹏、刘兵、张媛、王芳、郭智、刘晓东、楼金星、陈惠仁);435000　黄石市中心医院(刘更夫)

常或增多,并且伴有成熟障碍[6]。巨核细胞是血小板的前体生成细胞,其细胞表面也表达与血小板相同的血小板膜糖蛋白。同时现代研究认为巨核细胞系祖细胞是通过多能造血干细胞的分化构成的,巨核细胞是通过巨核细胞系祖细胞的增值以及分化形成,然后使得血小板产生[7,8]。同时多能造血干细胞不断地自我复制更新,通过分裂造血干细胞不断增殖,最终形成巨核细胞,巨核细胞没有增殖能力[9]。本研究通过临床具体探讨了外伤导致原发性血小板增多症与血巨核细胞体外扩散的相关性,现报道如下。

资料与方法

1. 研究对象:选择在笔者医院 2007 年 9 月 ~2013 年 12 月间,接受外伤导致原发性血小板增多症患者 36 例作为观察组,纳入标准:符合外伤导致原发性血小板增多症的诊断标准(1994 年第 5 届全国血栓与止血会议修订标准);采集标本前 1 个月内未服用任何药物;患者年龄 20 ~80 岁;所有入选者均知情同意。其中男性 21 例,女性 15 例;患者年龄 24 ~78 岁,平均年龄 49.23 ±5.19 岁;血小板计数为(100 ~300) $\times 10^9$/L,平均血小板计数为(182.45 ±19.73) $\times 10^9$/L。同期选择在笔者医院进行健康体检的健康志愿者 36 例作为对照组,其中男性 20 例,女性 16 例;患者年龄 24 ~78 岁,平均年龄 49.44 ±5.66 岁;血小板计数为(100 ~200) $\times 10^9$/L,平均血小板计数为(145.92 ±8.23) $\times 10^9$/L。两组入选者收集血浆前尚未接受任何治疗,均签署知情同意书。

2. 样本采集:抽取两组入选者的 10ml 静脉血,选取的 EDTA 抗凝的浓度为 5%,将其于 -4℃下离心处理 30min,离心率是 3000r/min,将血小板清除,将上层血浆进行吸收,在 -20℃的环境下保存,以备使用。采集脐血时,采取袋中含柠檬酸磷酸盐抗凝剂 20ml,采集足月妊娠的脐血,采集标本脐血量为 80 ~100ml,确保采集过程中的无菌性。

3. TPO 与 IL -11 的检测:血小板生成素(TPO)和白细胞介素 -11(IL -11)的 ELISA 检测试剂盒来自晶美生物有限公司,对于浓度值以及指标的 A 值的测量选择全自动 ELISA 酶标分析仪和配套软件系统,严格按照操作说明书进行操作。

4. 巨核细胞体外扩增的检测:重组人血小板生成素(rhTPO)购自沈阳三生制药有限公司,在晶美生物有限公司购买重组人白细胞介素 3(rhIL -3),在成都地奥制药集团有限公司购买人干细胞因子(SCF)。按照常规方法分离与筛选得到脐血单个核细胞,将分离所得的脐血单个核细胞用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基(美国 Gibco 公司)重悬后,按照 5×10^5 个/毫升种于 24 孔板中。加入 SCF(50ng/ml)、TPO(20ng/ml)、IL -3(10ng/ml)、IL -6(10ng/ml)及左旋谷氨酰胺(2mg)。每孔添加两组入选者的 100μl 去除血小板的血浆,确保终体积为 1ml。培养条件为 37℃、5% CO_2,每 3 天半量换液,弃去 0.5 的培养基,并添加全量血浆与相应的细胞因子,培养 10 ~15 天,进行瑞氏染色光镜观察。然后进行流式细胞仪检测 CD41a 的表达,美国 BD 公司购买的 CD41a 单克隆抗体,美国 BD 公司购买的流式细胞仪 FACS Calibur,晶美生物有限公司购买的 Annexin Ⅴ/PI 凋亡检测试剂盒。流式细胞仪分析使用 CellQuest 软件分析,10000 个细胞构成 1 个标本,对 $CD41a^+$ 细胞的比例进行检验,通过染色光镜进行观察。使用加拿大 SCT 公司购买的 MegaCultTM -C 试剂盒来培养巨核系祖细胞集落(CFU -MK)。碱性磷酸酶检测系统(APAAP)以及抗 GPⅡb/Ⅲa(CD41)抗体来检测巨核细胞集落,复染细胞核通过 Evan's Blue,巨核细胞在 3 个以上,就是 1 个阳性克隆,并进行染色光镜观察。巨核细胞 DNA 倍体分析:常规体外培养巨核细胞,分析巨核细胞的 DNA 倍体的分布采用 LysysII 软件,计算、检验多倍体细胞($n \geq 4$)的比例。

5. 统计学方法:选择 SPSS 19.0 软件进行数据分析,结果中的计量数据选择均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,组间对比采用 *t* 检验或者 *Mann -Whitney U* 非参数检验进行分析,而计数数据组间对比采用卡方分析,相关性分析采用 *Pearson* 相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. $CD41a^+$ 的检测:经过详细观察得出,巨核细胞得到了瑞氏染色的证明,它的细胞形态是正常的。经过检测,观察组在细胞培养 10 天与 15 天的巨核细胞数量明显多于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$,表 1)。

表 1　两组的 $CD41a^+$ 细胞数检测对比($\times 10^5$/L,$\bar{x} \pm s$)

组别	*n*	培养第 10 天	培养第 15 天
观察组	36	1.76 ±0.41	5.18 ±0.34
对照组	36	1.56 ±0.32	2.99 ±0.45
t		7.388	17.445
P		<0.05	<0.05

2. 巨核祖细胞计数对比:经过巨核系祖细胞集落检测,结果显示,在 CFU -MK 值方面,观察组比对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

表 2　两组的巨核祖细胞计数对比($\bar{x} \pm s$)

组别	*n*	CFU -MK
观察组	36	16.98 ±4.92
对照组	36	12.48 ±5.31
t		5.684
P		>0.05

3. 血浆 TPO 和 IL -11 对比:经过检测,观察组的血浆 TPO 和 IL -11 值比对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

表3 两组血浆 TPO 和 IL-11 对比（pg/ml, $\bar{x} \pm s$）

组别	n	TPO	IL-11
观察组	36	71.38±11.93	126.39±25.00
对照组	36	56.93±12.09	43.88±10.23
t		8.299	28.992
P		<0.05	<0.05

4. DNA倍体对比：经过检测，观察组的培养第10天与第15天的多倍体细胞（N≥4）的比例明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$，表4）。*Pearson* 相关性分析也显示 CD41a$^+$含量与巨核祖细胞计数、血浆 TPO 和 IL-11 含量与 DNA 倍体呈正相关（$r=0.495$、0.552、0.329、0.401，$P<0.05$）。

表4 两组的 CD41a$^+$细胞 DNA 倍体对比（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	培养第10天	培养第15天
观察组	36	28.87±7.23	42.93±5.02
对照组	36	12.34±5.93	16.77±6.02
t		8.398	12.767
P		<0.05	<0.05

讨 论

在正常健康人体中血小板的正常计数是（100～200）×10^9/L，当一些患者在外伤导致的出血中，会使得血常规检查发生异常[10]。在生物学功能中，血小板能促进止血和加速凝血，维护毛细血管壁完整性的功能，同时其还具有营养和支持毛细血管内皮细胞的作用，使毛细血管的脆性减少[11]。但是如果血小板增多可导致感染性增加，多见于外伤后，其中原发性血小板增多症有自发性巨核细胞集落形成。流行病学调查显示，外伤导致原发性血小板增多症多发生于成年人，男、女性发生率大致相近，总体发生率比较低。其临床特征为血小板持续增多，有自发出血倾向，血栓形成，半伴随有脾脏大[12]。本研究观察组的血小板计数为（1000～3000）×10^9/L，平均血小板计数为（1823.45±198.73）×10^9/L；而对照组的血小板计数为（100～200）×10^9/L，平均血小板计数为（145.92±8.23）×10^9/L。在临床表现上，其症状表现多不一致，多表现疲劳、乏力、头晕外，伴随有出血或血栓形成。

现代研究认为原发性血小板增多症与慢性粒细胞白血病、真性红细胞增多症及骨髓纤维化关系密切，也为称为骨髓增殖性疾病，可互相转化形成恶性循环[13]。原发性血小板增多症可表现为有核细胞尤其是巨核细胞显著增生，原及幼巨核细胞增多[14]。研究显示 CD41a$^+$细胞因为来源不同，分为外周血、儿童骨髓、成人骨髓、脐带血4种，将其在条件相同的情况下进行体外扩增，巨核细胞具有不同能力，扩增性最强的是来源是脐带血的 CD41a$^+$细胞，会分裂最多巨核细胞[15]。所以，来自脐血的 CD41a$^+$细胞是笔者的选择，与两组入选者血浆共同孵育，在多种细胞因子的刺激作用下，培养10～15天。本研究瑞氏染色证实所培养的细胞为巨核细胞，具有正常的细胞形态。经过检测，观察组在细胞培养10天与15天的血浆孵育下的巨核细胞数量明显多于对照组（$P<0.05$），差异有统计学意义（$P<0.05$）。通过以上现象发现，原发性血小板增多症患者会出现较快的巨核细胞增殖，巨核细胞会因此较快成熟和血小板前体的形成。有关原发性血小板增多症患者血浆/血清是否影响巨核细胞集落形成的报道较少，本研究结果可以看出，巨核细胞集落如果因为原发性血小板增多症血浆而形成不同于受正常血浆作用的集落，说明快速的巨核祖细胞的增殖会增加巨核细胞数量[16,17]。

在哺乳动物体细胞中，唯一能在核内复制同时有多倍体的细胞形成的就是巨核细胞。其成熟的特征为胞质体积增大，界膜系统广泛形成，可产生血小板。同时巨核祖细胞和早期未成熟的巨核细胞不是多倍体，而是二倍体细胞。不过随着体内复制的增强，多倍体的巨核细胞会有血小板的形成，判断巨核细胞成熟程度就是依据多倍体巨核细胞的形成[18]。还有研究指出，细胞器的成熟、胞质界膜系统的发育以及胞核的多倍体化都属于巨核细胞的成熟。目前尚不清楚巨核细胞出现核内复制及多倍体细胞的形成原因，因为它的重要特点就是巨核细胞有丝分裂暂停后复制 DNA 仍可以进行，最后多倍体就会形成[19]。本研究观察组的培养第10天与第15天的多倍体细胞（$n \geq 4$）的比例明显高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。IL-11 以及 TPO 是调节血小板、巨核细胞发育因子，巨核细胞集落会受其刺激而生长，巨核细胞也会加快成熟，进而形成功能性血小板。在血浆 TPO 和 IL-11 值上，本研究观察组比对照组高，差异有统计学意义（$P<0.05$），说明巨核细胞数量增加中伴随有血浆 TPO 和 IL-11 的高表达。

总之，外伤导致原发性血小板增多症伴随有巨核细胞扩散性与生成增加，是由于血浆中 TPO 和 IL-11 过表达增加而导致巨核细胞成熟形成多倍体，使得血小板计数增加。

（下转第116页）

J Clin,2013, 63(1):11 -30
2 Marinela R, Nikola K, Ivan M, *et al*. Epidemiology of laryngeal cancer in Osijek - Baranja County(Eastern Croatia) [J]. Coil Antropol, 2012, 36(Suppl 2): 107 - 110
3 Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection [J]. J Biomed Sci,2011, 18: 30
4 郝文慧,赵文文,陈修平.丹参酮类抗肿瘤作用与机制研究进展[J].中国药理学通报, 2014, 30(8):1041 -1044
5 张伟伟,陆茵.丹参抗肿瘤活性成分研究新进展[J].中国中药杂志, 2015,35(3):389 -392
6 Gao S, Liu Z, Li H, *et al*. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone ⅡA [J]. Atherosclerosis, 2012, 220(1):3 -10
7 赵娜,郭治昕,赵雪,等.丹参的化学成分与药理作用[J].国外医药:植物药分册, 2007, 22 (4):155
8 Han JY, Fan JY, Horie Y, *et al*. Ameliorating effects of compounds derived from Salviamil tiorrhiza root extract onmicrocirculatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion[J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(2):280
9 孔玉莲.丹酚酸乙抑制乳腺癌一细胞生长凋亡的机制研究[J].河北医学, 2014, 20(4): 599 - 601
10 Liu J, Shen HM, Ong CN. Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apotosis in human hepatoma Hep G2 cells[J]. Cancer Letter, 2000,153(12):85 -93
11 沈云婕,王松梅,朱摇珺.丹参多酚酸盐体外抗肿瘤作用研究[J].中国药房, 2008, 19 (30): 2332 -2335
12 刘建梅,朱明磊,郭鄂平.丹酚酸B的研究概况[J].医学理论与实践, 2014,27(2):163 -166
13 黄秀兰,崔国辉. PI_3K - Akt信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J].癌症, 2008, 27(3):331 -336
14 孙晓杰,黄常志. PI_3K—Akt信号通路与肿瘤[J].世界华人消化杂志, 2006, 14(3):307 -311
15 Chang R. Involvement of PI_3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy[J]. Leukemia, 2003,17(3): 590 -603
16 贾涛,雷文斌, 苏振忠,等. AKT/mTOR信号通路在喉癌组织中的表达及意义[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2009, 30(1):35 -42
17 梁国祥,刘丽,蔡海燕.喉癌病因分析[J].临床医学, 2011, 31(6):98 -101

(收稿日期:2015 -04 -16)
(修回日期:2015 -05 -01)

(上接第111页)

参考文献

1 Isilak Z, Tezcan M, Atalay M, *et al*. Acute myocardial infarction and sub - acute stent thrombosis associated with occult essential thrombocythemia[J]. Chin Med J Engl,2014, 127(19):3512 -3513
2 Vianello F, Vettore S, Tezza F, *et al*. Serum thrombopoietin and cMpl expression in thrombocytopenia of different etiologies[J]. Hematol Rep, 2014, 6(1):4996
3 Vannucchi AM, Rotunno G, Bartalucci N, *et al*. Calreticulin mutation - specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value[J]. Leukemia, 2014, 28 (9): 1811 -1818
4 许蕾,庞丽萍,温娟娟,等.原发性血小板增多症的临床特点(附60例分析)[J].右江医学, 2014, 42(3):288 -291
5 Deng J, Hu Q, Liu M, *et al*. Essential thrombocythemia occurred in mother and daughter[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2014, 35 (9):872 -874
6 Fu R, Xuan M, Zhang L, *et al*. Clinical characteristics and risk factors for major thrombosis in 604 Chinese patients with low - risk essential thrombocythemia[J]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2014, 35 (9):785 -790
7 Vainchenker W, Besancenot R, Favale F. Megakaryopoiesis: regulation of platelet production by thrombopoietin[J]. Bull Acad Natl Med, 2013, 197(2):395 -406
8 徐修才,伍权,郑南,等.常见JAK2基因突变的筛检及在BCR - ABL阴性骨髓增殖病中的临床意义[J].中国实验诊断学, 2014, 4(12):557 -560
9 Lekovic D, Gotic M, Milic N, *et al*. The importance of cardiovascular risk factors for thrombosis prediction in patients with essential thrombocythemia[J]. Med Oncol, 2014, 31(10):231
10 Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, *et al*. Changing concepts of diagnostic criteria of myeloproliferative disorders and the molecular etiology and classification of myeloproliferative neoplasms: from dameshek 1950 to vainchenker 2005 and beyond[J]. Acta Haematol, 2014, 133(1):36 -51
11 Zhou A, Oh ST. Prognostication in MF: from CBC to cytogenetics to molecular markers[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2014, 27(2): 155 -164
12 肖志坚.骨髓增殖性肿瘤和骨髓增生异常综合征/骨髓增殖性肿瘤:开启分子诊断新时代[J].中华血液学杂志, 2014, 35(5): 385 -386
13 Passamonti F, Caramazza D, Mora B, *et al*. It is time to change thrombosis risk assessment for PV and ET? [J]. Best Pract Res Clin Haematol,2014, 27(2):121 -127
14 Besancenot R, Roos - Weil D, Tonetti C, *et al*. JAK2 and MPL protein levels determine TPO - induced megakaryocyte proliferation vs differentiation[J]. Blood,2014,124(13):2104 -2015
15 Geyer H, Mesa RA. Assessing disease burden in patients with classic MPNs[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2014, 27(2):107 -119
16 Ziadinov E, Al - Sabti H, Al - Toubi M, *et al*. Pretreatment with hydroxyurea of the patient with essential thrombocythemia followed by coronary artery bypass surgery[J]. Oman Med J, 2014, 29(4):294 -295
17 Vytrva N, Stacher E, Regitnig P, *et al*. Megakaryocytic morphology and clinical parameters in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and primary myelofibrosis with and without JAK2 V617F[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(9):1203 -1209
18 黄婧,罗小华,朱艳,等.多发性骨髓瘤伴原发性血小板增多症一例报告并文献复习[J].中华血液学杂志, 2014, 35(8):757 -759
19 Bhat T, Ahmed M, Baydoun H, *et al*. Acute ST - segment elevation myocardial infarction in a young patient with essential thrombocythemia: a case with long - term follow - up report[J]. J Blood Med, 2014, 23(5):123 -127

(收稿日期:2015 -04 -11)
(修回日期:2015 -05 -25)