

血小板微粒促进动脉粥样硬化发生的研究进展

郭方君, 杨人强*

(南昌大学第二附属医院 心血管内科, 江西 南昌 330000)

摘要:血小板微粒(PMPs)是由血小板释放的直径极小的囊泡,其结构组成复杂,含有蛋白质、mRNAs、miRNAs等生物活性物质,参与机体多种病理生理过程。PMPs通过参与血管内皮细胞损伤、炎症反应、脂蛋白沉积、巨噬细胞吞噬及斑块不稳定过程,促进动脉粥样硬化(AS)的发生发展,抗血小板药物可降低PMPs的血浆水平。因此,PMPs为心血管疾病的发病机制及治疗提供了新视角。

关键词:血小板微粒;动脉粥样硬化;内皮细胞;炎症反应

中图分类号:R541.4 文献标志码:A

Research progress on the role of platelet-derived microparticles in the development of atherosclerosis

GUO Fang-jun, YANG Ren-qiang*

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000, China)

Abstract: Platelet-derived microparticles (PMPs) are extremely small vesicles with complex structure and composition released by platelets, which contain proteins, mRNAs, miRNAs and other bioactive substances and participate in various pathophysiological processes. PMPs promote the development of atherosclerosis (AS) by participating in the processes of vascular endothelial cell injury, inflammatory reaction, lipoprotein deposition, macrophage phagocytosis and plaque instability. Anti-platelet drugs can lower down the plasma level of PMPs. Therefore, PMPs provide a new perspective for the explanation of the pathogenesis and treatment of cardiovascular diseases.

Key words: platelet-derived microparticles; atherosclerosis; endothelial cells; inflammatory reaction

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心血管疾病中很重要的一种病变,如急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是一类突发性疾病,然而究其原因,这类疾病是由AS造成的。AS是一种血管内皮上的斑块结构,由脂质和免疫细胞在血管壁中累积而成,随着病变进展,斑块破裂出血形成血栓,

阻塞血管,导致心肌梗死、卒中等急性心血管事件的发生。经皮冠状动脉介入治疗能迅速打开阻塞的血管,然而血管重建后斑块形成、支架再狭窄^[1]、抗血小板药物治疗抵抗的患者发生心血管事件的风险增加,因此临床上需要对新的诊断生物标志物进行研究,寻找有效的治疗措施来减少心血管疾病的发病

率。血小板微粒 (platelet-derived microparticles, PMPs) 在 AS 内皮细胞损伤、炎性反应、脂蛋白沉积等过程中均有一定的促进作用, 其与心血管疾病的发生发展密切相关。因此, 本文就 PMPs 促进 AS 的发生发展作一综述。

1 血小板微粒概述

微粒是由细胞分泌的大小在 $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ 的囊泡, 其表面可携带一定量的磷脂酰丝氨酸、脂质、膜蛋白等物质。微粒可由血液中的多种细胞如血小板、白细胞、红细胞、内皮细胞等释放入血循环, 其中 PMPs 是血液中最丰富的微粒。

1.1 血小板微粒的来源和结构

静息、活化、凋亡的血小板均可以产生 PMPs。在体内主要是化学激动剂激活血小板后产生。常见的化学激动剂有胶原、花生四烯酸、二磷酸腺苷、脂多糖、凝血酶等, 其中凝血酶是血小板强有效的激动剂, 此外, 物理激动剂剪切应力也可激活血小板。激动剂激活时间与 PMPs 释放量成正比, 时间越长, 量越多。激动剂与血小板膜上的受体结合, 引起胞内第二信使发生变化导致血小板激活释放微粒, 如脂多糖与血小板表面 toll 样受体 4^[2] 结合、凝血酶通过凝血酶受体激活肽^[3] 激活血小板, 激活的血小板可通过囊泡相关膜蛋白释放血小板胞浆微粒。

PMPs 的大体结构由一层薄膜围成的单囊泡或多个单囊泡包围的大囊泡, 血小板质膜和细胞质里的各种成分构成囊泡的内容物。电镜下静息血小板的平均直径在 $2 \sim 4 \mu\text{m}$, 可以看到 α -颗粒、致密颗粒、溶酶体、过氧化物酶体、线粒体和糖原颗粒、呈空泡状和回旋通道开放的小管系统 (open canalicular system, OCS)。激动剂引起血小板质膜形成深的内陷和皱褶, OCS 管腔扩大, 包含各种包涵体的细胞内空泡, 如 α 颗粒、致密颗粒、膜成分和疏松包裹体, 形成阿米巴样血小板, 进一步将血小板体分解成碎片, 即 PMPs。PMPs 直径 $0.05 \sim 2 \mu\text{m}$ 不等, 绝大多数在 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$, 大小、形状各异。根据电镜结构将 PMPs 分 3 型: 单囊型、多囊型、含有各种细胞器 (线粒体、 α -颗粒、糖原颗粒等) 的电子致密微粒^[4]。基于 PMPs 的结构组成, 含有生物活性物质的 PMPs 被释放出血循环仍可行使一定的生物学功能。

1.2 血小板微粒的生物学功能

PMPs 作为细胞间信息交流的载体, 向靶细胞传递生物活性蛋白、mRNAs 以及 miRNAs, 参与止血和血栓形成、炎性反应、免疫、血管生成^[5] 等病理生理过程。

1.3 血小板微粒的检测

流式细胞测量术是检测血液中微粒的常用技术手段, 该方法根据细胞膜表面的特异性抗原可以判断微粒的细胞属性, 如 CD41 和 CD62E 分别是血小板和内皮细胞表面抗原^[6]; 根据不同大小的磁珠可以计数微粒的数量。但此方法的一个缺点是无法检测直径小于 $0.3 \mu\text{m}$ 的微粒, 而这些未能检测出的微粒占很大的 PMPs 比重。所以流式细胞测量术在确定 PMPs 的标准值范围上面临很大的挑战, 近年来, 科研工作者开发纳米级流式细胞测量术^[7]、纳米粒子跟踪分析^[8]、动态光散射^[9] 等方法致力于建立检测和计数 PMPs 的统一标准。

2 血小板微粒在动脉粥样硬化中的作用

ACS 患者血浆 PMPs 水平高于稳定性心绞痛患者, 稳定性心绞痛患者 PMPs 水平高于健康人^[10], 说明 PMPs 的血浆水平与 AS 的发生发展密切相关。

2.1 血小板微粒与内皮细胞损伤

血管内皮细胞在维持心血管稳态方面起重要作用, 内皮细胞损伤是 AS 发生发展过程中的重要早期事件。糖尿病性 AS 大鼠血浆 PMPs 水平升高, 主动脉摄取血浆中高水平的 PMPs, PMPs 通过激活雷帕霉素靶蛋白复合物通路破坏主动脉内皮细胞连接蛋白, 降低内皮细胞一氧化氮水平至 50%, 增加两倍的活性氧生成量, 从而增加内皮通透性^[11], 为脂质及单核细胞进入内皮细胞提供了良好的前提基础。暴露于 PM2.5 的血小板释放的 PMPs 与内皮细胞共孵育后, PMPs 进入内皮细胞, 细胞间黏附分子 (ICAM-1)、炎症因子 (IL-6、TNF- α) 以及内皮细胞的活性氧水平明显升高, PMPs 通过线粒体凋亡机制诱导血管内皮细胞损伤^[12]。

2.2 血小板微粒与炎性反应

炎性反应是 AS 的标志, 由各种炎性细胞及炎症因子参与其中。PMPs 主要通过两种机制参与动脉粥样硬化炎性反应。1) PMPs 含有血小板炎症分子 P 选择素 (P-selectin)、趋化因子等, 这些具有生

物活性的分子牵引白细胞黏附于血管内皮细胞,参与血管的炎性反应。首先 PMPs 通过整合素黏附于内皮细胞上,然后通过 P-selectin/PSGL1 捕获白细胞,最后通过 CXCL4 趋化因子将白细胞稳定黏附于内皮细胞,增加内皮损伤后的炎性反应^[13]。2) PMPs 进入血管内皮细胞或平滑肌细胞,诱导细胞分泌炎性因子。PMPs 通过内皮细胞表面 Gas6 进入内皮细胞,诱导内皮细胞表达 ICAM-1,促进内皮细胞分泌细胞因子^[17]。AS 病变内 PMPs 将平滑肌细胞由梭形转变为菱形,失去收缩表型的特征,PMPs 的趋化因子 CXCL4 诱导平滑肌细胞迁移,PMPs 的 P 选择素、CD40L 促进单核细胞黏附于平滑肌细胞,触发平滑肌细胞产生和释放炎性介质 IL-6^[14],表明 PMPs 在 AS 病变中诱导平滑肌细胞发生炎性表型的改变。

2.3 血小板微粒与脂蛋白的沉积

脂质代谢异常与 AS 的发生密切相关。低密度脂蛋白经氧化形成氧化低密度脂蛋白后(oxidized low-density lipoprotein; Ox-LDL),被血管中的巨噬细胞和平滑肌细胞吞噬形成泡沫细胞。首先,血小板可以摄取血液中的脂质。研究发现,冠心病患者的血小板中氧化磷脂、胆固醇酯、鞘磷脂等脂质水平升高。ACS 患者血小板通过 CXCL12/CXCR7 促进其摄取 LDL,摄取的 LDL 促进血小板活性氧及线粒体超氧化物的生成,使 LDL 氧化成 Ox-LDL^[15]。随后 Ox-LDL 随 PMPs 进入血循环。PMPs 中的主要脂质是溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine; LPC),PMPs 是 LPC 的良好载体,使得 LPC 不易被血清溶血磷脂酶降解。LPC 是 Ox-LDL 中的生物活性分子之一,因血小板表面表达 LPC 的受体,故 LPC 又可诱导血小板活化、聚集、黏附、扩散和迁移以及形成血小板-单核细胞连接。在小鼠 AS 模型中发现,血浆 PMPs 中 LPC 水平增加;并且在小鼠和人类不稳定 AS 斑块中,LPC 含量丰富^[16],说明循环 PMPs 中的 LPC 可以沉积在斑块内,作为斑块不稳定的标志。

2.4 血小板微粒与巨噬细胞的吞噬

在内皮功能受损情况下,单核细胞进入血管后转变成巨噬细胞,巨噬细胞吞噬脂蛋白形成了 AS 中的泡沫细胞。衰老的血小板通过凋亡途径产生的 PMPs,对单核细胞具有趋化作用,并与单核细胞结

合黏附于内皮细胞。而且,PMPs 促进单核细胞分化,而抑制其增殖,使单核细胞极化成 M2 亚型,增强单核细胞对 Ox-LDL 的吞噬作用^[17]。凝血酶激活的血小板产生的 PMPs 被巨噬细胞吞噬,PMPs 又增强巨噬细胞吞噬 Ox-LDL;此外,PMPs 增加巨噬细胞分泌炎性因子 IL-1 β , IL-6, TNF- α ,这些都与 AS 的炎性反应相关^[18]。PMPs 中的 miRNA 也可调控巨噬细胞的吞噬作用。荧光标记的 PMPs 与巨噬细胞共孵育后,共聚焦显微镜观察到巨噬细胞能够摄取 70%~90% 的 PMPs;且 qPCR 检测巨噬细胞中 miR-126-3p 升高约 4.5 倍,miR-126-3P 在 mRNA 和蛋白质水平上调调控巨噬细胞的吞噬功能;在 AS 斑块内,用荧光标记的乳胶微珠评估其吞噬能力,共聚焦显微镜发现巨噬细胞吞噬乳胶微珠的数量明显增加,这些发现表明 PMPs 可以递送 miRNA 至巨噬细胞,并重新编程使其具有吞噬功能^[19]。

2.5 血小板微粒与斑块的不稳定

ACS 患者中,其血浆肌钙蛋白水平以及 C 反应蛋白水平高于稳定心绞痛患者,同时血浆 PMPs 水平也相应升高,说明 PMPs 血浆水平也可作为斑块不稳定的血液学标志^[10]。载脂蛋白 E 敲除小鼠高脂喂养造成 AS 模型,注射不同剂量的 PMPs 后,高剂量 PMPs 使 AS 小鼠血浆炎性因子(CRP、IL-1 β 和 TNF- α)水平升高,主动脉的粥样斑块区域增大,斑块脂质核心、巨噬细胞数量明显增加,斑块内胶原蛋白含量和平滑肌细胞数量降低,说明 PMPs 促进 AS 小鼠主动脉斑块的形成,促进斑块内巨噬细胞的浸润和炎性反应,降低胶原蛋白的含量和平滑肌细胞的数量,从而降低斑块的稳定性^[20]。

3 药物对血小板微粒的影响

抗血小板药物不仅可以抗血栓,还可降低血浆 PMPs 水平。体外分离的血小板实验,阿司匹林能抑制 PMPs 含量 6.3 倍^[21]。在糖尿病大鼠模型中,阿司匹林可以抑制血循环中 PMPs 水平,减少内皮细胞活性氧的生成,从而缓解血管内皮损伤,预防糖尿病早期 AS 的进展^[11]。阿司匹林联合氯吡格雷或替格瑞洛比单纯运用阿司匹林可以进一步减少心肌梗死大鼠 PMPs 的血浆水平及大鼠心肌梗死面积^[22]。但急性心肌梗死伴慢性肾脏病的患者,尽管进行了双重抗血小板治疗,其血浆 PMPs 水平较心

肌梗死肾功能正常者仍然更高^[6]。

4 问题与展望

综上,PMPs 促进 AS 发生发展。但由于 PMPs 直径极小、结构组成复杂、表面标志物多,现在常用的检测工具还无法确定其在临床的参考值范围。目前血小板释放 PMPs 的具体机制也尚不清楚,基础实验表明抗血小板药物可以抑制释放 PMPs,但临床上出现一部分患者对抗血小板药物抵抗或治疗后

出血风险增加的情况。尽管还存在上述问题,但越来越多的研究表明 PMPs 有望成为疾病的生物标志物,PMPs 不仅对卒中患者下一次心血管事件的发生有预测价值^[23],还可作为判断类风湿关节炎^[24]、抗中性粒细胞胞质抗体相关血管炎^[25]活动性的潜在生物标志物。继续深入挖掘 PMPs 的结构与生物活性物质,及潜在的生物学功能,提高检测工具的特异度与灵敏度,PMPs 有望成为心血管疾病的标志物和治疗靶点。

参考文献:

- [1] Uveges A, Jenei C, Kiss T, *et al.* Three-dimensional evaluation of the spatial morphology of stented coronary artery segments in relation to restenosis[J]. *Int J Cardiovasc Imaging*, 2019, 35: 1755-1763.
- [2] Alarcon M. Generation of platelet-derived microparticles through the activation of the toll-like receptor 4[J]. *Heliyon*, 2019, 5: e01486. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01486.
- [3] De Paoli SH, Tegegn TZ, Elhelu OK, *et al.* Dissecting the biochemical architecture and morphological release pathways of the human platelet extracellular vesiculome [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 3781-3801.
- [4] Ponomareva AA, Nevzorova TA, Mordakhanova ER, *et al.* Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles [J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15: 1655-1667.
- [5] Anene C, Graham AM, Boyne J, *et al.* Platelet microparticle delivered microRNA-Let-7a promotes the angiogenic switch[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 2633-2643.
- [6] Mortberg J, Lundwall K, Mobarrez F, *et al.* Increased concentrations of platelet-and endothelial-derived microparticles in patients with myocardial infarction and reduced renal function-a descriptive study [J]. *BMC Nephrol*, 2019, 20: 71. doi: 10.1186/s12882-019-1261-x.
- [7] Gomes J, Lucien F, Cooper TT, *et al.* Analytical considerations in nanoscale flow cytometry of extracellular vesicles to achieve data linearity [J]. *Thromb Haemost*, 2018, 118: 1612-1624.
- [8] Nielsen T, Kristensen SR, Gregersen H, *et al.* Extracellular vesicle-associated procoagulant phospholipid and tissue factor activity in multiple myeloma [J]. *PLoS One*, 2019, 14: e0210835. doi: 10.1371/journal.pone.0210835.
- [9] Onodi Z, Pelyhe C, Terezia Nagy C, *et al.* Isolation of high-purity extracellular vesicles by the combination of iodixanol density gradient ultracentrifugation and bind-elute chromatography from blood plasma [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1479. doi: 10.3389/fphys.2018.01479.
- [10] Zacharia E, Antonopoulos AS, Oikonomou E, *et al.* Plasma signature of apoptotic microvesicles is associated with endothelial dysfunction and plaque rupture in acute coronary syndromes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 138: 110-114.
- [11] Wang GH, Ma KL, Zhang Y, *et al.* Platelet microparticles contribute to aortic vascular endothelial injury in diabetes via the mTORC1 pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 468-476.
- [12] Kong L, Li K, Gao L, *et al.* Mediating effects of platelet-derived extracellular vesicles on PM2.5-induced vascular endothelial injury [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 198: 110652. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110652.
- [13] Kuravi SJ, Harrison P, Rainger GE, *et al.* Ability of platelet-derived extracellular vesicles to promote neutrophil-endothelial cell interactions[J]. *Inflammation*, 2019, 42: 290-305.
- [14] Vajen T, Benedikter BJ, Heinzmann ACA, *et al.* Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype[J]. *J Extracell Vesicles*, 2017, 6: 1322454. doi: 10.1080/20013078.2017.1322454.
- [15] Chatterjee M, Rath D, Schlotterbeck J, *et al.* Regulation

- of oxidized platelet lipidome; implications for coronary artery disease[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38: 1993-2005.
- [16] Diehl P, Nienaber F, Zaldivia MTK, *et al.* Lysophosphatidylcholine is a major component of platelet microvesicles promoting platelet activation and reporting atherosclerotic plaque instability[J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119: 1295-1310.
- [17] Vasina EM, Cauwenberghs S, Feijge MA, *et al.* Microparticles from apoptotic platelets promote resident macrophage differentiation[J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e211. doi: 10.1038/cddis.2011.94.
- [18] Feng C, Chen Q, Fan M, *et al.* Platelet-derived microparticles promote phagocytosis of oxidized low-density lipoprotein by macrophages, potentially enhancing foam cell formation[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7: 477. doi: 10.21037/atm.2019.08.06.
- [19] Laffont B, Corduan A, Rousseau M, *et al.* Platelet microparticles reprogram macrophage gene expression and function[J]. *Thromb Haemost*, 2016, 115: 311-323.
- [20] 汪泽扬, 潘丽娜, 陈丽媛, 等. 血小板微粒对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块形成及稳定性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41: 514-520.
- [21] Recabarren-Leiva D, Alarcon M. Standardization of a fast and effective method for the generation and detection of platelet-derived microparticles by a flow cytometer[J]. *Immunol Lett*, 2018, 194: 79-84.
- [22] Geng XY, Xiao N, Han Y, *et al.* Platelet microparticles: A tool to predict infarction area in rats[J]. *J Invest Surg*, 2019, 1-6. doi: 10.1080/08941939.2019.1606369.
- [23] Rosinska J, Ambrosius W, Maciejewska J, *et al.* Association of platelet-derived microvesicles and their phenotypes with carotid atherosclerosis and recurrent vascular events in patients after ischemic stroke[J]. *Thromb Res*, 2019, 176: 18-26.
- [24] Xue LJ, Cui BB, Li X, *et al.* Association of elevated platelet microparticles with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. *J Sichuan University (Medical Science Edition)*, 2017, 48: 405-409.
- [25] Miao D, Ma TT, Chen M, *et al.* Platelets release proinflammatory microparticles in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2019, doi: 10.1093/rheumatology/kez044.

新闻点击

2019 冠状病毒病 (COVID-19) 与年轻成年人的大血管卒中有关

据 *Medscape* 医学新闻报道, 纽约市的医生在报告的 2019 冠状病毒病 (COVID-19) 病例中仍然领先于全美, 据报道, 感染 SARS-CoV-2 的年轻成年人的急性大血管卒中明显增多。

这项研究在线发表在《新英格兰医学杂志》(*The New England Journal of Medicine*, *NEJM*) 上的快速通讯中, 由西奈山卫生系统神经外科医学博士, 医学博士 Thomas Oxley 带领的研究人员报告了 2 周内发生 5 例大血管卒中的病例在 50 岁以下的 COVID-19 患者中。这代表了正常预期的 7 倍增长。这 5 例均无或轻微的 COVID-19 症状。

奥克斯利对 *Medscape Medical News* 说: “得知这种病毒似乎是通过血液凝结而引起疾病的, 这真令人惊讶。”他说, 向神经科医生和其他医师传达的信息是“我们正在了解, 从卒中的表现来看, 与小血管相比, 大血管对血管的影响更大。”

奥克斯利补充说, 血管壁的炎症反应可能会导致血栓形成。该报告与其他针对这种新兴现象的研究相一致。

刘晓荻 译

王欣 编