

论著·实验研究

# 血小板及其调控因子在幼兔免疫性血管炎中的动态变化

田鑫, 贺湘玲, 方亦兵, 邹润英

(湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙, 410007)

**[摘要]** **目的** 动态观察血小板、巨核细胞、血小板生成素(TPO)、转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 在幼兔免疫性血管炎模型中的变化及作用机制。**方法** 用牛血清白蛋白复制幼兔免疫性血管炎的川崎病(KD)动物模型, 每隔4 d 分别检测血小板计数、巨核细胞计数及分类、TPO水平、TGF- $\beta_1$  阳性率和积分值, 并于第17, 28天取冠状动脉、肝、脾、肾、脑等组织作病理学分析。**结果** 实验组血小板、巨核细胞总数、产板巨核细胞百分数于第12, 16, 20, 24, 28天, TPO水平于第8, 12, 16, 20, 28天, TGF- $\beta_1$  阳性率和积分值于第16, 20, 24, 28天较正常对照组明显升高( $P < 0.05$ )。实验组幼兔第17天各组织病理检查可见微小动脉明显的炎性损伤改变, 第28天可见中小动脉明显的炎性损伤改变, 而主动脉仅见轻度改变。**结论** 血小板、巨核细胞、TPO、TGF- $\beta_1$  共同参与KD的发病机制, 在KD的病理生理过程中发挥重要作用, 提示其均可作为监测KD病情变化的重要指标。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(10): 850-853]

**[关键词]** 川崎病; 血小板; 巨核细胞; 血小板生成素; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 兔

[中图分类号] R593 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)10-0850-04

## Roles of platelet and its regulating factors in immune vasculitis in young rabbits

TIAN Xin, HE Xiang-Ling, FANG Yi-Bing, ZOU Run-Ying. Department of Pediatrics, Hunan Province People's Hospital, Changsha 410005, China (He X-L, Email: hexiangl@163.com)

**Abstract: Objective** To study the roles of platelet (PLT) and its regulating factors, megakaryocyte, thrombopoietin (TPO) and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), in immune vasculitis in young rabbits. **Methods** An experimental model of Kawasaki disease (KD) of weanling rabbits was reproduced by bovine serum. PLT count, total number and differentiating count of megakaryocyte, and serum TPO and TGF- $\beta_1$  levels were measured 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28 days after KD induction. Pathological analysis of coronary artery, liver, spleen, kidney and brain was performed 17 and 28 days after KD induction. **Results** In the KD group, PLT count, the total number of megakaryocyte, and the middle board megakaryocyte percentage increased 12, 16, 20, 24 and 28 days; serum TPO level increased 8, 12, 16, 20, 24 and 28 days; serum TGF- $\beta_1$  level increased 16, 20, 24 and 28 days after KD induction compared with those in the normal control group ( $P < 0.05$ ). The pathological examinations of coronary artery, liver, spleen, kidney and brain showed severe inflammatory injuries of tiny arteries and small/medium-sized arteries 17 and 28 days after KD induction, respectively in the KD group. The aortas were showed as mild inflammatory injuries. **Conclusions** PLT, megakaryocyte, TPO and TGF- $\beta_1$  participate in the pathogenesis of KD, and they may play an important role in the injuries of immune vasculitis. This suggests that they may serve as markers for the assessment of severity in KD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(10): 850-853]

**Key words:** Kawasaki disease; Platelet; Megakaryocyte; Thrombopoietin; Transforming growth factor  $\beta_1$ ; Rabbits

川崎病(Kawasaki disease, KD)是一种原因不明的儿童常见的免疫相关性血管炎综合征<sup>[1]</sup>。迄今为止, KD的病因学仍然不清楚。大量研究提示免疫系统的高度活化及免疫性血管炎是KD的显著特征<sup>[2]</sup>。血小板作为一种细胞性急性时相反应物, 参与KD全身免疫性血管炎, 众多研究表明血小

板参数在KD的发病中有明显变化, 推测与巨核细胞有关<sup>[3]</sup>, 但由于临床KD患儿一般无需骨髓检查, 故无法通过实验证明, 对巨核细胞在KD中的变化研究甚少。所以建立KD的动物模型, 能更方便、更全面地研究KD的发病机制, 虽然目前没有公认的KD动物模型, 但国内外有许多学者建立了相关的

[收稿日期] 2008-12-20; [修回日期] 2009-02-02

[基金项目] 湖南省教育厅科研基金项目(编号: 07C571); 湖南省科技厅科研基金项目资助(2008SK3061)。

[作者简介] 田鑫, 女, 硕士生。主攻方向: 儿科临床。

[通讯作者] 贺湘玲, 女, 副主任医师, 湖南省人民医院儿科, 邮编: 410005。

KD 免疫性血管炎模型并得到了肯定<sup>[4]</sup>。本实验通过牛血清白蛋白使幼兔产生免疫性血管炎,制作成动物 KD 模型,并研究血小板及其调控因子在 KD 发病机制中的作用。现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

购入 50 只刚断奶的日本大耳幼年家兔(幼兔),周龄 3~4 周,体重 800 g 以下(长沙东创实验动物科技服务部提供),随机分为实验组和正常对照组,各 25 只。

### 1.2 动物模型的制作

参考 Onouchi 等<sup>[5]</sup>的方法,实验组予 10% 牛血清白蛋白 2.5 mL/kg 静脉缓慢推注;对照组予生理盐水 2.5 mL/kg 静脉缓慢推注。2 周后两组重复上述处理。实验组诱发免疫性血管炎,形成 KD 动物模型。

### 1.3 材料

牛血清白蛋白、兔 TPO 定量 ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司产品),ADVIA 2120 型全自动血细胞分析仪(美国 Bayer 公司产品),抗兔 TGF- $\beta_1$  抗体、SP 试剂盒(美国 Zymed 公司产品),普通光学显微镜(上海 Olympus 公司产品),台式离心机(LDZ5-2)(北京医用离心机厂产品)。

### 1.4 检测方法

1.4.1 血小板及血小板生成素测定 设实验开始当天为第 0 天,分别于第 0,4,8,12,16,20,24,28 天,将所有实验对象进行心脏采血,抽取 4 mL,2 mL 注入抗凝管,用 ADVIA 2120 型全自动血细胞分析仪,在采血后 3 h 内完成血小板测定;另外 2 mL 注入预冷试管中,摇匀后立即在 4℃,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,于 -70℃ 冻存,备测(TPO),遵试剂盒说明书要求,用双抗夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测标本 TPO 的浓度。

1.4.2 骨髓巨核细胞计数及 TGF- $\beta_1$  检测 分别于第 0,4,8,12,16,20,24,28 天,将所有实验对象于股骨大转子处行骨髓穿刺,采集骨髓 0.2 mL。进行骨髓涂片,取骨髓小粒丰富、厚薄适宜的骨髓片 2 张,一张常规瑞氏染色,在低倍镜下计数整个涂片的巨核细胞,用油镜观察其特点,做巨核细胞分类。另一张酒精固定 15 min,蒸馏水洗涤 2 次,各 3 min,胃蛋白酶孵育于 37℃ 培养箱 30 min,加抗兔 TGF- $\beta_1$

抗体,37℃ 培养箱 60 min 孵育,加细胞通透液,37℃ 培养箱 30 min 孵育,加二抗,37℃ 培养箱 30 min 孵育,加 DAB 显色剂 15 min,最后苏木素复染、脱水、透明和封片。光学显微镜下观察巨核细胞,以细胞胞浆中显示棕黄色颗粒定为阳性反应,每张涂片计数巨核细胞的阳性细胞百分比;观察阳性反应的巨核细胞的反应强度,计算每个细胞的平均反应强度的积分值。

1.4.3 病理学观察 分别于第 17,28 天取实验动物的冠状动脉、肝、脾、肾、脑等组织置入中性福尔马林中固定,常规苏木精-伊红染色,光镜下观察组织学变化。

### 1.5 统计学处理

实验数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据经统计软件 SPSS 15.0 处理。两组均数比较采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  作为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 血小板、巨核细胞、产板巨核细胞、TPO 及 TGF- $\beta_1$ 检测结果

血小板计数、巨核细胞总数和产板巨核细胞百分数于第 12,16,20,24,28 天在实验组较正常对照组明显升高,差异有显著性( $P < 0.05$ );而原核巨核细胞、颗粒巨核细胞、裸核巨核细胞百分数在实验组和正常对照组,差异无显著性( $P > 0.05$ );TPO 水平于第 8,12,16,20,28 天在实验组比正常对照组明显升高,差异有显著性( $P < 0.05$ );TGF- $\beta_1$  阳性率和积分值于第 16,20,24,28 天实验组比正常对照组明显升高,差异有显著性( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 病理检查

实验组幼兔第 17 天肝、脾、肾、脑、心及冠状动脉组织病理学检查可见微小动脉壁不同程度内皮细胞肿胀、坏死、内皮下组织水肿及中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润,中小动脉出现轻度损害,可见血管外膜及血管周围有中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润;第 28 天可见中小动脉严重炎性损伤改变,表现为全层血管炎,包括内膜、中膜及外膜均受中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润,血管壁水肿、坏死;而主动脉均仅见少许炎性细胞浸润(图 1)。

表1 实验组与对照组血小板数、巨核细胞、产板巨核细胞百分比、TPO水平、TGF-β<sub>1</sub>阳性率及积分值的比较 (x̄ ± s)

例数	PLT (×10 <sup>9</sup> /L)	巨核细胞 总数(个/μL)	产板巨核细胞 百分比(%)	TPO浓度 (pg/mL)	TGF-β <sub>1</sub> 阳性率(%)	TGF-β <sub>1</sub> 积分值(%)	
对照组							
0 d	25	309.5 ± 120.9	29.3 ± 12.9	41.2 ± 7.7	550.7 ± 144.9	81.1 ± 5.8	231.8 ± 20.6
4 d	25	322.3 ± 133.8	29.6 ± 12.5	42.8 ± 6.5	548.3 ± 114.1	81.3 ± 5.4	221.9 ± 18.3
8 d	25	343.1 ± 144.3	30.6 ± 11.6	43.0 ± 6.4	558.1 ± 113.7	81.3 ± 4.7	220.9 ± 19.5
12 d	25	309.7 ± 80.5	30.8 ± 8.8	41.3 ± 9.6	561.2 ± 115.5	82.4 ± 3.2	223.5 ± 21.4
16 d	25	310.4 ± 80.4	31.2 ± 8.8	43.8 ± 4.9	561.3 ± 113.6	82.4 ± 3.2	222.9 ± 23.7
20 d	15	309.8 ± 87.8	30.8 ± 9.3	44.2 ± 4.6	559.9 ± 115.4	83.0 ± 3.3	224.9 ± 22.4
24 d	15	311.6 ± 95.7	30.6 ± 9.4	44.2 ± 3.3	558.4 ± 118.6	83.1 ± 3.1	224.1 ± 21.5
28 d	15	306.7 ± 96.0	30.3 ± 9.7	43.8 ± 4.8	559.4 ± 116.3	83.0 ± 3.3	223.6 ± 22.4
实验组							
0 d	25	312.6 ± 103.3	26.9 ± 14.0	41.9 ± 7.9	573.7 ± 119.0	82.1 ± 5.9	224.0 ± 23.1
4 d	25	395.4 ± 180.9	32.9 ± 16.4	46.9 ± 6.8	660.6 ± 159.2	83.0 ± 6.2	232.0 ± 22.0
8 d	25	418.5 ± 117.4	44.2 ± 15.8	50.2 ± 5.6	765.7 ± 164.9 <sup>a</sup>	86.0 ± 6.7	241.4 ± 28.0
12 d	25	485.9 ± 172.4 <sup>a</sup>	51.0 ± 16.6 <sup>a</sup>	54.4 ± 8.9 <sup>a</sup>	870.7 ± 160.0 <sup>a</sup>	88.6 ± 5.1	248.0 ± 26.6
16 d	25	505.9 ± 172.9 <sup>a</sup>	60.0 ± 19.0 <sup>a</sup>	55.1 ± 12.6 <sup>a</sup>	965.7 ± 163.2 <sup>a</sup>	92.8 ± 1.9 <sup>b</sup>	260.8 ± 23.8 <sup>b</sup>
20 d	15	510.9 ± 166.9 <sup>a</sup>	66.5 ± 23.8 <sup>b</sup>	55.3 ± 11.9 <sup>a</sup>	959.3 ± 156.9 <sup>a</sup>	93.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	272.5 ± 11.4 <sup>b</sup>
24 d	15	512.1 ± 159.7 <sup>a</sup>	73.8 ± 28.0 <sup>b</sup>	55.8 ± 11.4 <sup>b</sup>	862.3 ± 157.5 <sup>a</sup>	93.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	274.7 ± 11.5 <sup>b</sup>
28 d	15	501.9 ± 158.9 <sup>a</sup>	68.0 ± 13.3 <sup>a</sup>	55.4 ± 11.2 <sup>a</sup>	756.1 ± 161.8 <sup>a</sup>	93.9 ± 2.1 <sup>b</sup>	283.7 ± 11.4 <sup>b</sup>

与对照组比较, a: P < 0.05; b: P < 0.01

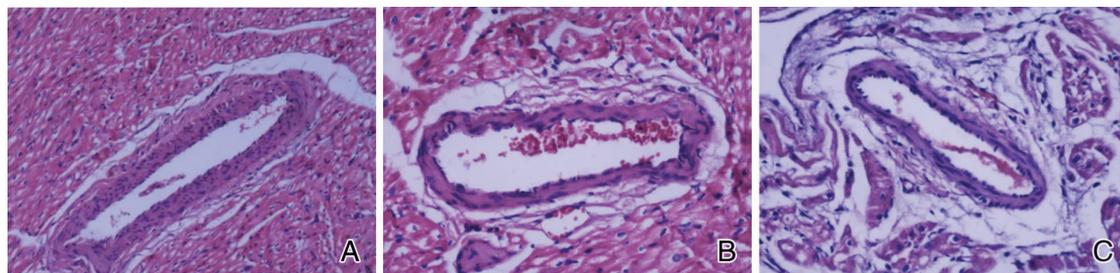


图1 冠状动脉组织病理学检查(苏木精-伊红染色, ×200) A:正常对照组冠状动脉; B:实验后17 d冠状动脉血管外膜及血管周围有中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润; C:实验后28 d出现冠状动脉严重损害,表现为全层血管炎,包括内膜、中膜及外膜均受中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎细胞浸润,血管壁水肿、坏死。

### 3 讨论

KD基本病理改变为全身性非特异性血管炎,主要累及中小动脉,特别是冠状动脉<sup>[6]</sup>。KD的病因及发病机制目前仍不十分清楚,众多学者认为, KD在急性期存在明显的免疫失调,在发病机制上起重要作用。免疫活化细胞激活是KD的基本免疫病理改变,免疫系统的高度活化及免疫损伤性血管炎是KD的显著特征<sup>[7]</sup>。本实验用牛血清白蛋白诱导幼兔免疫性血管炎,同时对冠状动脉、肝、脾、肾、脑等全身重要组织进行病理学检查,发现于实验的第17天可致全身微小血管炎,第28天可致中小血管炎,而大动脉炎性损伤不明显,其病理改变过程与KD血管炎基本相似。

本实验动态地观测了血小板、巨核细胞、TPO、

TGF-β<sub>1</sub>在幼兔免疫性血管炎中的变化,发现血小板于第12天开始明显升高,这与众多研究相似<sup>[8]</sup>,于KD发病病程的第2周开始升高。而血小板主要来源于骨髓成熟的巨核细胞。巨核细胞总数、产板巨核细胞百分数于第12,16,20,24,28天在实验组较正常对照组明显升高,其中巨核细胞总数的升高主要是产板巨核细胞的升高,产板巨核细胞是生成血小板的主要巨核细胞<sup>[9]</sup>,表明血小板数的增高,与巨核细胞尤其是产板巨核细胞的增高有关,提示血小板和产板巨核细胞参与了血管炎的发病过程。

巨核细胞生成血小板的主要正性调控因子是TPO。本实验表明TPO水平于第8,12,16,20,28天在实验组比正常对照组明显升高,先于血小板、巨核细胞的变化,从第20天开始TPO浓度有所下降,但仍然高于对照组,这与Ishiguro等<sup>[10]</sup>和Miura等<sup>[11]</sup>的临床观察研究相似,他们研究发现在KD患儿急

性期 TPO 水平较正常对照组明显增高,且早于血小板的增高。巨核细胞生成主要负性调控因子是 TGF- $\beta_1$ 。Terai 等<sup>[12]</sup>研究发现,KD 患儿急性期血清 TGF- $\beta_1$  水平上升,且可以上调血管内皮生长因子水平,是全身血管炎发生的主要机制之一。但卢巧<sup>[13]</sup>研究发现,KD 患儿急性期血清 TGF- $\beta_1$  水平则显著降低,低水平的 TGF- $\beta_1$  可能起抗炎作用。两者研究结果存在明显差异,其他相关报道较少。本研究为进一步研究 TGF- $\beta_1$  对血小板及巨核细胞的调节作用,监测了 TGF- $\beta_1$  在骨髓巨核细胞中的表达水平,结果表明巨核细胞中 TGF- $\beta_1$  阳性率和积分值于第 16,20,24,28 天实验组比正常对照组明显升高,后于血小板变化,推测机体受到免疫损伤时,激活 TPO 等因子,升高的 TPO 促进巨核细胞成熟及生成血小板,增加的血小板和巨核细胞达到一定程度反馈刺激 TGF- $\beta_1$  增多,同时亦反馈调节 TPO 水平,使其有所下降,从而抑制巨核细胞成熟及血小板的生成,抑制血小板的进一步增加<sup>[14,15]</sup>。此外,众多细胞因子亦不同程度地参与该过程,包括干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素 (IL) 1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 等<sup>[16~17]</sup>,而 TPO、IL-3 和 IL-6 均有刺激巨核细胞集落生长的作用,且 TPO 协同 IL-3 和 IL-6 对巨核细胞集落生长有最大的促进作用<sup>[17]</sup>。单核巨噬细胞在 KD 血管炎中亦起着重要作用,也可产生血小板源生长因子,参与了受损血管壁平滑肌细胞增生和动脉管腔斑痕狭窄形成的病理过程<sup>[18]</sup>。

综上所述,血小板、巨核细胞、TPO、TGF- $\beta_1$  共同参与 KD 的病理发病机制,在 KD 的病理生理过程中发挥重要作用,提示血小板、巨核细胞、TPO、TGF- $\beta_1$  可作为监测 KD 病情变化的重要指标。

### [参 考 文 献]

[1] Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, Gewitz MH, Tani LY, Burns JC, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease; a statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association[J]. Pediatrics, 2004, 114(6):1708-1733.  
[2] Hamada H, Terai M, Honda T, Kohno Y. Marked pleural and

pericardial effusion with elevated vascular endothelial growth factor production; an uncommon complication of Kawasaki disease[J]. Pediatr Int, 2005, 47(1):112-114.  
[3] 赵琳,夏晓玲,李琳霞.川崎病患儿急性期冠脉扩张与血小板参数变化关系的研究[J].昆明医学院学报,2007,27(2):105-107.  
[4] 何云,魏枉书,杨锡强.川崎病的动物模型及其发病机制研究进展[J].国际儿科学杂志,2007,34(1):64-66.  
[5] Onouchi Z, Ikuta K, Nagamatsu K, Tamiya H, Sakakibara Y, Ando M. Coronary artery aneurysms develop in weanling rabbits with serum sickness but not in mature rabbits. An experimental model for Kawasaki disease in humans[J]. Angiology, 1995, 46(8):679-687.  
[6] 胡亚美,江载芳.实用儿科学[M].第6版.北京:人民卫生出版社,2002,655.  
[7] Cummings C, McCarthy P, VanHoff J, Porter G Jr. Kawasaki disease associated with reactive hemophagocytic lymphohistiocytosis [J]. Pediatr Infect Dis J, 2008, 27(12):1116-1118.  
[8] 梁春杰.川崎病患儿血小板参数的变化及意义[J].中国现代医学杂志,2004,14(22):90-94.  
[9] Hitchcock IS, Fox NE, Prévost N, Sear K, Shattil SJ, Kaushansky K. Roles of focal adhesion kinase (FAK) in megakaryopoiesis and platelet function: studies using a megakaryocyte lineage specific FAK knockout[J]. Blood, 2008, 111(2):596-604.  
[10] Ishiguro A, Ishikita T, Shimbo T. Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytosis in Kawasaki disease [J]. Thromb Haemost, 1998, 79(6):1096-1100.  
[11] Miura N, Terai M, Meng YG. Serum thrombopoietin levels in Kawasaki disease[J]. Br J Haematol, 1998, 100(2):387-388.  
[12] Terai M, Yasukawa K, Narumoto S, Tateno S, Oana S, Kohno Y. Vascular endothelial growth factor in acute Kawasaki disease[J]. Am J Cardiol, 1999, 83(11):1592.  
[13] 卢巧.川崎病患儿急性期 TGF- $\beta_1$ 、IL-12 及 IL-1 $\beta$  的研究[J].湖北民族学院学报(医学版),2007,24(4):5-7.  
[14] 白松婷,袁志喜,赵晓明,邹湘,盛光耀. TPO、TSP-1 和 TGF- $\beta_1$  在特发性血小板减少性紫癜患儿骨髓表达的改变及其意义[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2006,11(4):198-200.  
[15] Akiyama T, Matsunaga T, Temi T, Miyanishi K, Tanaka I, Sato T, et al. Involvement of transforming growth factor-beta and thrombopoietin in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis[J]. Leukemia, 2005, 19(9):1558-1566.  
[16] Suganami Y, Kawashima H, Hasegawa D, Sato S, Hoshika A. Clinical application of rapid assay of serum interleukin-6 in Kawasaki disease[J]. Pediatr Int, 2008, 50(2):264-266.  
[17] 史宏,李晓辉,冉丛兰,李丹,徐鸣,周敏,等.川崎病患儿血清 IL-3、IL-6、TPO 水平变化研究[J].血栓与止血学,2008,14(3):121-123.  
[18] Wang H, Wang H, Cheng P. Effects of serum of Kawasaki disease on PDGF expression in monocytes and on endothelial cell apoptosis [J]. J Tongji Med Univ, 1999, 19(2):105-107.

(本文编辑:吉耕中)