

抗血管性血友病因子抗体对特发性血栓性血小板减少性紫癜的影响

覃乃辉¹,裴正玲²,周达利¹,秦立¹,黄慧嫔¹

(1. 广西壮族自治区人民医院检验科, 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区南宁市

第一人民医院检验科 530022)

摘要:目的 探讨抗血管性血友病因子(vWF)抗体在特发性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)发病中的意义。方法 选择广西壮族自治区人民医院 2010 年 1 月至 2013 年 6 月间收治的特发性 TTP 患者 28 例,同时选取同期门诊体检健康者 30 例作为健康对照组,检测两组对象血浆抗血管性血友病因子裂解酶(ADAMTS13)和 vWF 相关指标。结果 (1)28 例特发性 TTP 患者中有 3 例患者 vWF 抗体阳性(vWF 抗体阳性组),其余患者 vWF 抗体阴性(vWF 抗体阴性组)。vWF 抗体阳性组血浆 ADAMTS13 抗体均为阴性。(2) vWF 抗体阳性组血浆 ADAMTS13 含量明显低于 vWF 抗体阴性组和健康对照组,3 组血浆 ADAMTS13 水平比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。vWF 抗体阳性组血浆 vWF 抗体 A 值明显高于 vWF 抗体阴性组和健康对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。(3)28 例特发性 TTP 经过血浆置换(PE)后 ADAMTS13 抗原含量明显升高,vWF 抗体 A 值明显降低($P < 0.05$)。结论 vWF 抗体在特发性 TTP 发病中起到重要的作用,vWF 抗体可能通过影响患者血浆 ADAMTS13,促进 vWF 复合物形成,影响疾病发生。

关键词:紫癜,血小板减少性,特发性;抗血管性血友病因子抗体;抗血管性血友病因子裂解酶;自身抗体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)14-1734-03

The effects of anti von Willebrand factor antibody on idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura

Qin Naihui¹, Pei Zhengling², Zhou Dali¹, Qin Li¹, Huang Hui-pin¹

(1. Laboratory Department, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning,

Guangxi 530021, China; 2. Laboratory Department, the First People's Hospital of Nanning City of Guangxi Province, Nanning, Guangxi 530022, China)

Abstract: Objective To discuss the effect of von willebrand factor(vWF) antibody on idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura(TTP). Methods 28 cases of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura were selected in our hospital from January 2011 to June 2013, and 30 healthy persons as control group, ADAMTS13 and vWF of two groups were detected. Results 3 cases of patients were detected with positive vWF antibody, vWF antibody negative in the remaining patients. 3 patients with positive vWF antibody ADAMTS13 antibodies were negative, ADAMTS13 levels were lower than the normal value. The levels of ADAMTS13 in vWF antibody positive patients was significantly lower than that of vWF antibody negative patients and the control group, ($P < 0.01$). vWF antibody positive patients plasma vWF antibody A was higher than vWF antibody negative and the control group ($P < 0.01$). In idiopathic TTP after PE ADAMTS13 antigen increased significantly, vWF antibody and A levels decreased significantly ($P < 0.05$). Conclusion vWF antibodies in idiopathic thrombotic thrombocytopenic plays an important role in the pathogenesis of purpura, vWF antibody may affect patients ADAMTS13, promote vWF complex formation, effect of disease.

Key words: purpura, thrombocytopenie, idiopathic; anti-von willebrand factor antibodies; anti von willebrand factor-cleaving protease; autoantibodies

血栓性血小板减少性紫癜(TTP)是一种罕见的血栓性疾病,其特点是播散性微血管血栓形成导致的小板减少和微血管性溶血性贫血^[1],并可引起患者多器官功能障碍而严重危及患者的生命。TTP是临床的罕见病,临床上通常根据发病机制分为遗传性、继发性和特发性3种类型,其中,特发性TTP是临床上最常见的类型^[2-3]。有研究发现,TTP患者血浆中存在超大分子量的血管性血友病因子(vWF)多聚体,在发病过程中起到至关重要的作用^[4]。而以往研究表明,大多数特发性TTP患者vWF多聚体的形成是由于患者血浆中存在抗血管性血友病因子裂解酶(ADAMTS13)自身抗体^[5-6]。近年来,有学者发现部分特发性TTP患者存在抗血管性血友病因子

(vWF)抗体,可能在发病中起到重要的作用^[7]。为探讨vWF抗体在特发性TTP发病中的意义,作者进行了相关研究,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择广西壮族自治区人民医院 2010 年 1 月至 2013 年 6 月收治的特发性 TTP 患者 28 例,平均(24.8±7.8)岁;另选同期门诊体检的健康者 30 例作为健康对照组,平均(25.6±7.2)岁,所有参与研究的人员均对研究知情同意,并经医院伦理委员会审批。

1.2 方法 所有受试者采集外周静脉血 5 mL,注入枸橼酸钠抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,置于-70℃低温保

存集中检测。应用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测受试者血浆 ADAMTS13 抗原水平,由广西医科大学肿瘤学重点实验室检测,具体方法:应用抗 ADAMTS13 单克隆抗体 2G3(4 μg/mL)(试剂盒购自丹麦 Dako 公司)包被 96 孔板,4 °C 过夜,采集 50 μL 患者血浆按 1:4,1:8,1:16 稀释,加入待测孔,37 °C 孵育 1 h,滴加 ADAMTS13 单克隆抗体作为一抗,室温孵育 1 h,加入生物学二抗,辣根过氧化酶 GAM-HRP(Sigma 公司生产)标记,室温孵育 1 h,应用邻苯二胺显色,1.5 mol/L 硫酸终止反应,490 nm 酶标仪读取吸光度值。如待检混合血浆中 ADAMTS13 活性较正常血浆的混合血浆 ADAMTS13 活性下降 50% 以上,表示待检血浆中存在抑制物。vWF 抗体检测采用 ELISA 法(试剂盒购自丹麦 Dako 公司),酶标仪读取 490 nm 条件下反应物吸光度 A 值,如检测值高于 $\bar{x} \pm 2s$ 则判定为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TTP 患者 vWF 抗体检测结果 28 例特发性 TTP 患者中有 3 例患者 vWF 抗体阳性(vWF 抗体阳性组),其余患者 vWF 抗体阴性(vWF 抗体阴性组)。vWF 抗体阳性组 ADAMTS13 抗体均为阴性,ADAMTS13 含量均低于正常值,见表 1。

表 1 3 例 vWF 抗体阳性 TTP 患者检测结果

项目	病例 1	病例 2	病例 3
ADAMTS13 相关检验			
ADAMTS13 活性(%)	108	58	92
ADAMTS13 含量(mU/mL)	88.12	48.33	75.17
ADAMTS13 抗体	—	—	—
vWF 相关检验			
vWF Ag(%)	92	114	98
vWF CB(%)	105	110	100
vWF Rcof(%)	109	118	112
vWF 多聚体	存在	存在	存在
vWF 自身抗体滴度	1:800	1:1600	1:800

—:此项无数据。

2.2 3 组 ADAMTS13 抗原和 vWF 抗体检测情况 将所有受试者检测结果分析, vWF 抗体阳性组(3 例,4 份血浆)血浆 ADAMTS13 含量为(73.88 ± 35.52) mU/mL, vWF 抗体阴性组(25 例,32 份血浆)血浆 ADAMTS13 含量为(102.71 ± 38.66) mU/mL,健康对照组(30 例,30 份血浆)血浆 ADAMTS13 含量为(528.78 ± 185.66) mU/mL, vWF 抗体阳性组血浆 ADAMTS13 含量明显低于 vWF 抗体阴性组和健康对照组,3 组血浆 ADAMTS13 含量差异有统计学意义(*P* < 0.01)。vWF 抗体阳性组患者血浆 vWF 抗体 A 值明显高于 vWF 抗体阴性组和健康对照组(*P* < 0.01),见表 2。

2.3 28 例特发性 TTP 血浆置换(PE)前后血浆 ADAMTS13 抗原和 vWF 抗体水平检测 28 例患者中 23 例采取 PE 治疗,其中,17 例经过 2 次 PE 治疗,6 例经过 1 次 PE 治疗,PE 治疗

后血浆 ADAMTS13 抗原明显升高,vWF 抗体 A 值明显降低(*P* < 0.05),见表 3。

表 2 3 组血浆 ADAMTS13 抗原和 vWF 抗体检测情况

组别	n	ADAMTS13 含量(mU/mL)	vWF 抗体 A 值
vWF 抗体阳性组	4	73.88 ± 35.52 ^a	1.14 ± 0.12 ^a
vWF 抗体阴性组	32	102.71 ± 38.66 ^{ab}	0.44 ± 0.15 ^{ab}
健康对照组	30	528.78 ± 185.66	0.27 ± 0.11
<i>F</i>		24.372	15.628
<i>P</i>		<0.01	<0.01

^a:*P* < 0.01,与健康对照组比较;^b:*P* < 0.01,与 vWF 抗体阴性组比较。

表 3 28 例特发性 TTP PE 前后 ACMTS13 抗原和 vWF 抗体水平

采血时间	ADAMTS13 含量(mU/mL)	vWF 抗体 A 值
第 1 次 PE 前	96.77 ± 25.32	0.52 ± 0.17
第 1 次 PE 后	455.37 ± 212.85 ^b	0.37 ± 0.12 ^a
第 2 次 PE 前	75.31 ± 38.62	0.55 ± 0.15
第 2 次 PE 后	201.51 ± 102.33 ^c	0.42 ± 0.15 ^d
第 1 次发病间期	75.26 ± 21.82	0.59 ± 0.17
第 2 次发病间期	28.31 ± 10.12	0.58 ± 0.18

^a:*P* < 0.05,^b:*P* < 0.01,与第 1 次 PE 前比较;^c:*P* < 0.05,^d:*P* < 0.01,与第 2 次 PE 前比较。

3 讨 论

TTP 是一种罕见的血栓性疾病,多年以来,临床上诊断 TTP 主要依赖于“五联征”和溶血、血栓等实验指标,给其诊断和治疗带来了一定的困难^[8]。直到 1998 年,Furlan 等^[9]研究发现 TTP 患者血浆中 ADAMTS13 活性严重缺乏,给 TTP 发病机制的研究带来了新的方向。研究证实,TTP 患者血浆 ADAMTS13 缺乏主要是由于患者 ADAMTS13 基因突变或抗 ADAMTS13 自身抗体引起^[10]。目前,血浆 ADAMTS13 缺乏在 TTP 发病中的作用已经得到广大学者的认同^[11]。有研究表明,特发性 TTP 患者中血浆 ADAMTS13 活性严重缺乏的发生率为 33% ~ 100%,平均为 75%^[12]。然而,仍有 1/4 的 TTP 患者血浆 ADAMTS13 活性正常或仅轻度降低,而 4% ~ 62% 的特发性 TTP 患者也未发现抗 ADAMTS13 自身抗体^[13]。

近年来,有研究发现,TTP 患者血浆中存在超大分子量的 vWF 多聚体,在发病过程中起到至关重要的作用^[14]。而部分特发性 TTP 患者存在 vWF 抗体,可能在发病中起到重要的作用。Bonnefoy 等^[15]认为,TTP 患者 vWF 抗体与 vWF 形成复合物,是诱导患者血小板自发性聚集的原因之一。本研究对 28 例特发性 TTP 患者血浆 ADAMTS13 和 vWF 相关指标进行了检验,结果发现 3 例 TTP 患者 vWF 抗体阳性。这 3 例患者血浆中均存在 vWF 多聚体,但抗 ADAMTS13 为阴性。vWF Ag、vWF CB 和 vWF Rcof 均正常,基本可以排除获得性血管性血友病。进一步分析发现,vWF 抗体阳性组、vWF 抗体阴性组血浆 ADAMTS13 含量均明显低于健康对照组,证实了

TTP 患者血浆 ADAMTS13 活性严重缺乏。而 vWF 抗体阳性组血浆 ADAMTS13 含量明显低于 vWF 抗体阴性组,提示 vWF 抗体可能对抗 ADAMTS13 活性,并参与 vWF 复合物的形成,在特发性 TTP 发病中起到重要的作用。

为进一步证实以上观点,作者对 28 例患者 PE 前后血浆 ADAMTS13 抗原和 vWF 抗体水平进行了比较。从结果来看 28 例特发性 TTP 经过 PE 后 ADAMTS13 抗原明显升高, vWF 抗体 A 值明显降低。目前,PE 仍是 TTP 急性发作的主要治疗方法,该方法可以显著降低患者的病死率,延长患者生存时间。本实验结果提示,通过 PE 治疗后患者 vWF 抗体水平明显降低,而血浆 ADAMTS13 含量得到提高,并可能进一步影响 vWF 复合物的形成,使疾病得到缓解。

参考文献:

[1] Jilma-Stohlawetz P, Gorczyca ME, Jilma B, et al. Inhibition of von willebrand factor by ARC1779 in patients with acute thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(3): 545-552.

[2] 李忠俊, 卢来春, 滕本秀, 等. 血浆置换治疗血栓性血小板减少性紫癜的临床研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(17): 1728-1743.

[3] 王兆钺. 免疫性血小板减少性紫癜的发病机制与临床研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(12): 1141-1144.

[4] Adamski J, Marques MB. Transfusion medicine illustrated. Massive hemolysis due to thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with AIDS[J]. *Transfusion*, 2012, 52(7): 1408-1409.

[5] Pos W, Sorvillo N, Fijnheer R, et al. Residues Arg568 and Phe592 contribute to an antigenic surface for anti-ADAMTS13 antibodies in the spacer domain[J]. *Haematologica*, 2011, 96(11): 1670-1677.

[6] 张敬宇, 刘芳, 马珍妮, 等. 抗血管性血友病因子抗体在特发性血栓性血小板减少性紫癜发病机制中的作用[J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(12): 1118-1124.

[7] Zheng XL, Wu HM, Shang D, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. *Haematologica*, 2010, 95(9): 1555-1562.

[8] 邓明扬, 张广森, 李斌, 等. 血栓性血小板减少性紫癜患者血管内皮细胞标志物和溶血参数的动态分析及其临床意义[J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(3): 38-41.

[9] Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. von willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome[J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(22): 1578-1584.

[10] Cataland SR, Jin M, Lin S, et al. Effect of prophylactic cyclosporine therapy on ADAMTS13 biomarkers in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. *Am J Hematol*, 2008, 83(12): 911-915.

[11] 季杰, 刘霆, 孟文彤, 等. 血管性血友病因子前肽及 ADAMTS13 水平在血栓性血小板减少性紫癜诊断中的价值[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2011, 42(6): 807-810.

[12] 尹亚飞, 罗自勉, 周新伏, 等. 血小板相关抗体在特发性血小板减少性紫癜诊治中的临床意义[J]. *临床医学*, 2012, 32(1): 4-5.

[13] 何飞, 梁昌达, 潘晓芬, 等. 血小板相关抗体与儿童特发性血小板减少性紫癜转归的相关性分析[J]. *中国小儿血液与肿瘤杂志*, 2011, 16(5): 225-227.

[14] 李恒渠, 王登海, 陈海飞, 等. 血栓性血小板减少性紫癜 10 例临床分析[J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(20): 2438-2439, 2441.

[15] Bonnefoy A, Daenens K, Feys HB, et al. Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting(sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13[J]. *Blood*, 2006, 107(3): 955-964.

(收稿日期: 2013-11-06 修回日期: 2014-02-15)

(上接第 1733 页)

性脑心综合征的临床观察[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2012, 10(12): 1444-1445.

[4] 吴生兵, 周关启, 周逸平, 等. 电针不同穴组防治脑心综合征作用机制的研究[J]. *针刺研究*, 2009, 34(5): 315-318, 328.

[5] 靳志峰, 符天晓. 不同病因脑血管疾病合并脑心综合征临床研究[J]. *中国血液流变学杂志*, 2012(4): 615-615.

[6] 刘江华, 邱厚道. 急性脑血管病心电图变化的相关研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(23): 2620-2622.

[7] Frontera JA, Parra A, Shimbo D, et al. Cardiac arrhythmias after subarachnoid hemorrhage: risk factors and impact on outcome[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 26(1): 71-78.

[8] 曹音, 恽文伟, 高萍, 等. 急性脑梗死患者发生脑心综合征的相关因素[J]. *临床神经病学杂志*, 2012, 25(1): 29-31.

[9] 高文勇. 脑心综合征研究进展[J]. *医学临床研究*, 2012, 29(12): 2385-2388.

[10] 郭道骝. 急性脑卒中致脑心综合征的临床分析[J]. *中国医药导刊*, 2011, 13(7): 1151-1152.

[11] 李素梅, 王建良, 陈帅, 等. 缺血性脑卒中合并脑心综合征 69 例临床分析[J]. *内科*, 2011, 6(1): 24-25.

[12] 王静. 急性脑卒中患者并发脑心综合征发生率及其预后[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(7): 844-845.

[13] 屈克学, 杨曙光. 脑钠肽和氨基末端脑钠肽前体在心衰衰竭诊断与治疗中的应用进展[J]. *泰山医学院学报*, 2009, 30(7): 556-558.

[14] 江波, 孟晓落, 舒刚明, 等. 出血性脑卒中后脑心综合征的临床研究[J]. *中国临床神经科学*, 2009, 17(4): 420-422.

(收稿日期: 2013-11-04 修回日期: 2014-02-19)