

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.010

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.010>

原发性免疫性血小板减少症患者 PAI-1 基因的多态性

叶小翠¹, 张学亚²

(福建医科大学附属第二医院 1. 检验科; 2. 血液科, 福建 泉州 362000)

[摘要] 目的: 通过分析原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)患者的纤维蛋白溶解酶活化物抑制剂-1(fibrinolytic enzyme activator inhibitor-1, PAI-1)基因多态性, 探讨其临床意义。方法: 研究46例ITP患者, 以明确继发于系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的血小板减少症患者42例和明确继发于感染的血小板减少症患者33例分别作为对照。采用荧光染色原位杂交测序法检测PAI-1基因多态性。结果: 46例ITP患者中, 33例PAI-1基因表型为4G4G型, 9例为4G5G型, 4例为5G5G型。42例继发于SLE的血小板减少症患者中, 30例为4G4G型, 5例为4G5G型, 7例为5G5G型。继发于感染的血小板减少症患者中, 3例为4G4G型, 23例为4G5G型, 7例为5G5G型。ITP患者PAI-1基因4G4G型与继发于SLE的患者PAI-1基因4G4G型检出率相似, 而与继发于感染患者的PAI-1基因4G4G型之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: ITP和继发于SLE的血小板减少症患者PAI-1基因多呈4G4G型, 而继发于感染的血小板减少症患者多呈非4G4G型。ITP患者检测PAI-1基因多态性将有望评估其血栓风险及向SLE发展的可能性。

[关键词] 血小板减少; 免疫性; 纤维蛋白溶解酶活化物抑制剂-1; 基因多态性

Polymorphism of PAI-1 gene in patients with primary immune thrombocytopenia

YE Xiaocui¹, ZHANG Xueya²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Hematology, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou Fujian 362000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the clinical significance of fibrinolytic enzyme activator inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphism in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP). **Methods:** Forty-six patients with ITP were enrolled to identify 42 patients with thrombocytopenia secondary to systemic lupus erythematosus (SLE) and 33 patients with thrombocytopenia secondary to infection as control. The PAI-1 gene polymorphism was detected by fluorescence staining in situ hybridization sequencing. **Results:** Of the 46 patients with ITP, 33 had a PAI-1 gene phenotype of 4G4G, 9 were 4G5G, and 4 were 5G5G. Of the 42 patients with thrombocytopenia secondary to SLE, 30 were 4G4G, 5 were 4G5G, and 7 were 5G5G. Among the patients with thrombocytopenia secondary to infection, 3 were 4G4G, 23 were 4G5G, and 7 were 5G5G. The PAI-1 gene 4G4G type was similar

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-22

通信作者 (Corresponding author): 张学亚, Email: jakey3456@sina.com

to the PAI-1 gene 4G4G type in patients with ITP, but it was statistically different from the PAI-1 gene 4G4G type secondary to infected patients ($P < 0.05$). **Conclusion:** The PAI-1 gene of ITP and thrombocytopenia secondary to SLE is mostly 4G4G, while the patients with secondary thrombocytopenia are mostly non-4G4G. Detection of the PAI-1 gene polymorphism in patients with ITP is expected to assess the risk of thrombosis and the potential for progression to SLE.

Keywords thrombocytopenia; immunity; fibrinolytic enzyme activator inhibitor-1; gene polymorphism

原发性免疫性血小板减少症(primary immune thrombocytopenia, ITP)是一种自身免疫性疾病,涉及到血小板的破坏增加和血小板的生成不足。当血小板计数大于 $30 \times 10^9/L$ 时,很少发生严重出血,临床上的出血表现通常发生在血小板计数低于 $10 \times 10^9/L$ ^[1]。尽管血小板计数低,但有一部分ITP患者却很少有出血症状,表明机体存在其他机制补偿血小板减少所引起的出血风险。此外,ITP患者存在血栓形成的倾向,其风险增加程度可以达到健康人群的2倍^[2]。血栓并发症可能是由于ITP疾病本身经过药物等治疗后的结果^[3],也可能与潜在的相关联疾病有关,如抗磷脂抗体综合征^[4]。但其原因尚不十分明确。

纤维蛋白溶解酶即纤溶酶,通过调节纤维蛋白而维持机体纤溶系统的动态平衡。纤维蛋白溶解酶活化物抑制剂-1(fibrinolytic enzyme activator inhibitor-1, PAI-1)则通过调节纤溶酶的活性,参与血栓的病理生理过程。目前研究^[1]证实ITP患者PAI-1活性水平增加,调节纤溶酶的生成,而抵消ITP患者血小板减少所带来的出血风险。PAI-1蛋白活性高低与其基因启动子具有密切相关性,PAI-1基因启动子具有5G5G, 4G5G, 4G4G 3种表型,其PAI-1活性水平依次升高^[5]。目前关于PAI-1基因多态性与ITP之间的研究尚未见报道。本研究通过检测原发性免疫性血小板减少症患者的PAI-1基因多态性,以探讨其临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

回顾性研究福建医科大学附属第二医院2017年1月至2018年9月期间福建医科大学附属第二医院收治的血小板减少患者121例,其中男40例,女81例,年龄18~69(中位34)岁。所有患者入院后经血常规分析、外周血涂片、抗核抗体(anti-nuclear antibody, ANA)、抗可提取核抗原抗体(anti-extractable nuclear antibody, ENA)谱、抗磷脂抗体及骨髓细胞学检查等诊断,其中原发性免疫

性血小板减少症患者46例,继发于系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)血小板减少症患者42例,继发于感染的血小板减少症患者33例。本研究经福建医科大学附属第二医院医学伦理审查委员会审核批准,患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂和仪器

测序通用试剂盒购自北京华夏时代基因科技发展有限公司,荧光检测仪购自西安天隆科技有限公司。

1.3 荧光染色原位杂交测序法检测 PAI-1 基因启动子多态性

$1 \times NH_4Cl$ 预处理液的配制:取900 μL 的注射用水,加入100 μL ($10 \times NH_4Cl$)预处理液配制成 $1 \times NH_4Cl$ 预处理液,混合后备用。往EP管中加入1 000 μL ($1 \times NH_4Cl$)预处理液、200 μL 混匀的临床全血,5 min左右反复颠倒数次,3 200 r/min离心5 min。

取出EP管,管底部有一层可见白细胞沉淀,如白细胞团过小,可重新富集1次,吸走上层透明红色液体后,再在室温3 000 r/min离心30 s,使管壁上黏附的液体沉于管底部,将上层透明红色液体吸取干净,注意避免吸走沉淀在管底的白细胞。

加入100 μL 生理盐水(或 $1 \times NH_4Cl$)反复轻轻吹洗白细胞上表面的杂质(注意不要使白细胞重悬),将上层液体吸取干净,注意避免吸走沉淀在管底的白细胞。如若白细胞重悬,需在室温3 000 r/min离心5 min。向富集有白细胞的离心管中加入30 μL 耀金保,反复吹打混匀。根据需要检测的基因位点,取出相应耀金分试剂,向相应的耀金分试剂中加入1.5 μL 处理后的白细胞,盖紧管盖,上机检测。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件进行数据分析。组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板减少症患者的临床资料

所纳入的原发性免疫性血小板减少症和继发于SLE和感染的血小板减少症患者, 经血常规、ANA、ENA谱以及骨髓细胞学等检查, 并结合治疗效果, 明确诊断。3组患者性别和年龄相仿, 均无血栓性疾病病史。ITP组抗磷脂抗体检出3例, SLE组检出6例, 而感染组未检出阳性(表1)。

表1血小板减少症患者的临床信息

Table 1 Clinical features of thrombocytopenia patients

组别	n	年龄(中位)/岁	性别(男/女)	抗磷脂抗体阳性/例
ITP组	46	18~69 (36)	13/33	3
SLE组	42	21~66 (32)	11/31	6
感染组	33	20~59 (35)	16/17	0

2.2 血小板减少症患者的 PAI-1 基因多态性分析

所有研究患者入院时检测PAI-1基因多态性。46例原发性免疫性血小板减少症患者中, 33例(71.7%)PAI-1基因表型为4G4G型, 9例(19.6%)为4G5G型, 4例(8.7%)为5G5G型。42例继发于SLE血小板减少症患者中, 30例(71.4%)为4G4G型, 5例(11.9%)为4G5G型, 7例(16.7%)为5G5G型。继发于感染的血小板减少症患者中, 3例(9.1%)为4G4G型, 23例(69.7%)为4G5G型, 7例(21.2%)为5G5G型。原发性免疫性血小板减少症患者和继发于SLE患者PAI-1基因4G4G型与继发于感染患者的PAI-1基因4G4G型比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。4G5G型ITP组和SLE组与感染组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 而5G5G型ITP组和SLE组与感染组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

PAI-1是体内组织型纤溶酶原激活剂(tPA)主要的抑制剂。血浆PAI-1水平增加使得纤溶能力下降被认为在血栓性疾病的机制中起重要作用^[5]。PAI-1约占纤溶系统抑制物活性的60%, 体内PAI-1大多以潜在活性态形式存在。正常人血浆中活性态PAI-1占3%~5%。体内PAI-1活性水平与PAI-1基因启动子4G/5G多态性密切相关。启动子为

5G/5G, 4G/5G, 4G/4G时, 其活性水平依次增高^[6]。迄今为止, 这种多态性已被广泛研究, 在冠心病、脑膜炎球菌、脓毒性休克、骨坏死、重度子痫前期、2型糖尿病肾病、肺血栓栓塞症和动脉血栓形成遗传性蛋白S缺乏等疾病中PAI-1基因启动子多态性大多数表现为4G4G型^[5-13]。同样, 在内脏血管、深部静脉、脑、视网膜静脉血栓形成的疾病中也显示4G4G型更为多见^[14]。

国外研究^[12]证实血浆PAI-1活性增高是血栓性疾病的主要危险因素, 而血浆PAI-1的水平又受到PAI-1基因启动子区域单核苷酸多态性的调控。PAI-1被认为与动脉粥样硬化的发病有关, 是缺血性心脏病的预警器。早期研究^[13]结果证实: 超重或肥胖和酗酒、吸烟等心血管危险因素与不良的生活方式都可以增加血浆PAI-1的水平, 并有导致缺血性心脏病的风险。

原发性免疫性血小板减少症作为一种易出血更为多见的疾病, 近年来, 已有学者^[1]提出其本身也属于血栓性疾病, 但其具体机制目前尚不明确。可能与如下原因相关^[2-4]: 1)与ITP的药物治疗过程中, 血小板数量短时间升高明显所致的“矫枉过正”; 2)血小板免疫破坏过程中大量的微颗粒释放引发促凝激活; 3)PAI-1蛋白活性水平的升高, 抑制机体纤溶酶的活性; 4)部分ITP患者可能合并有狼疮抗凝物及抗磷脂抗体的阳性。PAI-1活性水平在ITP疾病中的检测有所报道^[1], 但由于PAI-1的活性水平增加受到内皮细胞、淋巴细胞以及血小板数量等多种因素的影响, 难以单独评估PAI-1的活性在ITP血栓形成的风险中的价值。而关于PAI-1基因启动子多态性和ITP血栓风险的相关研究尚未见报道。

本研究结果显示: 46例ITP患者中, 4G4G型33例(71.7%), 显著高于感染所致的血小板减少症患者, 差异有统计学意义; 而与SLE相关的水小板减少症患者4G4G型检出率相似。一方面提示PAI-1基因4G4G型在ITP血栓风险的发病机制具有一定的作用, 另一方面可能预示PAI-1基因4G4G型ITP患者后期发展成SLE的风险高于非4G4G型患者。由于本研究入组的病例数有限, 且均为近期所纳入的病例, 故后期随访对于疾病的发展和血栓风险的评估显得尤为重要。

综上所述, 原发性免疫性血小板减少症和继发于SLE血小板减少症患者PAI-1基因多呈4G4G型, 而继发于感染的血小板减少症患者多呈非4G4G型。由于PAI-1基因多态性的检测不受机体血小板数量、免疫状态及药物治疗等因素的影

响, 今后对ITP患者检测PAI-1基因多态性将有望评估ITP患者的血栓风险及向SLE发展的可能性。

参考文献

1. Álvarez-Román MT, Fernández-Bello I, Jiménez-Yuste V, et al. Procoagulant profile in patients with immune thrombocytopenia[J]. *Br J Haematol*, 2016, 175(5): 925-934.
2. Nørgaard M, Cetin K, Maegbaek ML, et al. Risk of arterial thrombotic and venous thromboembolic events in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Scandinavian population-based cohort study[J]. *Br J Haematol*, 2016, 174(4): 639-642.
3. Lakshmanan S, Cuker A. Contemporary management of primary immune thrombocytopenia in adults[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(10): 1988-1998.
4. Pierrot-Deseilligny Despujol C, Michel M, Khellaf M, et al. Antiphospholipid antibodies in adults with immune thrombocytopenic purpura[J]. *Br J Haematol*, 2008, 142(4): 638-643.
5. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(24): 1792-1801.
6. Westendorp RG, Hottenga JJ, Slagboom PE. Variation in plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and risk of meningococcal septic shock[J]. *Lancet*, 1999, 354(9178): 561-563.
7. Glueck CJ, Fontaine RN, Gruppo R, et al. The plasminogen activator inhibitor-1 gene, hypofibrinolysis and osteonecrosis[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(366): 133-146.
8. Morgan JA, Bombell S, McGuire W. Association of plasminogen activator inhibitor-type 1 (-675 4G/5G) polymorphism with pre-eclampsia: systematic review[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56907.
9. Kamal M, El-Khayat W. Do serum angiopoietin-1, angiopoietin-2, and their receptor Tie-2 and 4G/5G variant of PAI-1 gene have a role in the pathogenesis of preeclampsia?[J]. *J Investig Med*, 2011, 59(7): 1147-1150.
10. Wong TY, Poon P, Szeto CC, et al. Association of plasminogen activator inhibitor-1 4G/4G genotype and type 2 diabetic nephropathy in Chinese patients[J]. *Kidney Int*, 2000, 57(2): 632-638.
11. Zöller B, García de Frutos P, Dahlbäck B. A common 4G allele in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene as a risk factor for pulmonary embolism and arterial thrombosis in hereditary protein S deficiency[J]. *Thromb Haemost*, 1998, 79(4): 802-807.
12. Chen H, Nie S, Lu M. Association between plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2015, 73(4): 292-300.
13. Subrt I, Ulcova-Gallova Z, Cerna M, et al. Recurrent pregnancy loss, plasminogen activator inhibitor-1 (-675) 4G/5G polymorphism and antiphospholipid antibodies in Czech women[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2013, 70(1): 54-58.
14. Balta G, Altay C, Gurgey A. PAI-1 Gene 4G/5G genotype: a risk factor for thrombosis in vessels of internal organs[J]. *Am J Hematol*, 2002, 71(2): 89-93.

本文引用: 叶小翠, 张学亚. 原发性免疫性血小板减少症患者PAI-1基因的多态性[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(12): 2589-2592. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.010

Cite this article as: YE Xiaocui, ZHANG Xueya. Polymorphism of PAI-1 gene in patients with primary immune thrombocytopenia[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(12): 2589-2592. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.010