

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2020.04.001

• 临床研究 •

基于 iRhom2/ADAM17 信号通路探讨益气活血方治疗出血性血小板病患者的作用机制^{*}

卢芙蓉¹ 秦 铀² 沈 霖^{1△} 帅 波¹
马 陈¹ 徐晓娟¹ 廖 奕¹ 杨艳萍¹

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科,武汉 430022

²华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心,武汉 430022

摘要 **目的** 观察益气活血方治疗出血性血小板病患者的临床疗效,基于 iRhom2/ADAM17 信号通路探讨其作用机制。**方法** 选取 100 例出血性血小板病患者随机分为中药组与西药组,另选 50 例健康者作为正常对照组。中药组 50 例采用益气活血方治疗,西药组 50 例采用肾上腺色腓片治疗。治疗 8 周后,比较 2 组患者治疗后的止血疗效及血小板聚集恢复率;比较 2 组患者治疗前后及正常对照组的血浆非活性的菱形蛋白(iRhom)2、解离素金属酶(ADAM)17 和 pro-ADAM17 蛋白表达水平。**结果** 中药组患者止血疗效为 84.78%,显著高于西药组的 44.68%($P<0.05$)。中药组患者血小板聚集率恢复率为 71.74%,显著高于西药组的 6.38%($P<0.05$)。治疗前,中药组与西药组患者 iRhom2 与 ADAM17 蛋白表达水平明显高于正常对照组($P<0.05$)。治疗 8 周后,中药组 iRhom2 与 ADAM17 蛋白表达水平较治疗前明显下降,且中药组显著低于西药组($P<0.05$)。**结论** 采用益气活血方治疗出血性血小板病患者可显著改善血小板聚集、提升止血效率。iRhom2/ADAM17 信号通路参与了出血性血小板病的病理过程,调控 iRhom2/ADAM17 信号通路可能是益气活血方治疗出血性血小板病的作用靶点之一。

关键词 出血性血小板病;解离素金属酶 17;非活性的菱形蛋白 2;益气活血方

中图分类号 R558 **文献标识码** A

Based on iRhom2/ADAM17 Signal Pathway to Explore the Mechanism of Yiqi Huoxue Formula for Treating Hemorrhagic Thrombopathy

LU Furong¹, QIN You², SHEN Lin¹, SHUAI Bo¹, MA Chen¹, XU Xiaojuan¹, LIAO Yi¹, YANG Yanping¹

¹Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

²Cancer Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

Abstract **Objective** To observe the clinical efficacy of Yiqi Huoxue formula in treating patients with hemorrhagic thrombopathy, and to explore its mechanism based on iRhom2/ADAM17 signaling pathway. **Methods** One hundred patients with hemorrhagic thrombopathy were randomly divided into traditional Chinese medicine group and western medicine group, and 50 healthy people were selected as normal control group. Patients in the traditional Chinese medicine group were treated with Yiqi Huoxue formula, and the western medicine group were treated with carbazochrome tablets. After 8 weeks of treatment, the hemostatic efficacy and platelet aggregation recovery rate were compared in two groups. The levels of plasma inactive rhomboid-like protein(iRhom)2, a disintegrin and

^{*} 国家自然科学基金资助项目(No. 81673761; No. 81573765)

[△]通信作者, Corresponding author, E-mail: shenlinhb@sina.cn

metalloproteinase(ADAM)17 and pro-ADAM17 protein expression were compared in two groups before and after treatment and the normal control group. **Results** The hemostatic efficacy in the traditional Chinese medicine group was 84.78%, which was significantly higher than that in the western medicine group (44.68%) ($P < 0.05$). The platelet aggregation recovery rate in the traditional Chinese medicine group was 71.74%, which was significantly higher than that in the western medicine group (6.38%) ($P < 0.05$). Before treatment, the levels of iRhom2 and ADAM17 protein expression in the traditional Chinese medicine group and the western medicine group were significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.05$). After 8 weeks of treatment, the levels of iRhom2 and ADAM17 protein expression in the traditional Chinese medicine group and the western medicine group decreased significantly, and the traditional Chinese medicine group were significantly lower than those in the western medicine group ($P < 0.05$). **Conclusion** Treating the hemorrhagic thrombopathy patients with Yiqi Huoxue formula could significantly improve platelet aggregation and increase hemostatic efficiency. The iRhom2/ADAM17 signaling pathway was involved in the pathological process of hemorrhagic thrombopathy, and regulating iRhom2/ADAM17 signaling pathway might be one of the targets of Yiqi Huoxue formula in treating patients with hemorrhagic thrombopathy.

Key words hemorrhagic thrombopathy; a disintegrin and metalloproteinase 17; inactive rhomboid-like protein 2; Yiqi Huoxue formula

出血性血小板病是一组血小板聚集异常反复发作性出血性疾病,1984年由本院沈迪等人首次报告。本课题组前期研究^[1]发现,出血性血小板病患者血小板膜上的解离素金属酶(a disintegrin and metalloproteinase, ADAM)17表达水平明显升高。近年来研究^[2-4]表明,非活性的菱形蛋白2(inactive rhomboid-like protein 2, iRhom2)是ADAM17关键的耦合子,iRhom2结合ADAM17,促进ADAM17从内质网中外排并调控其活性。基于此,本研究进一步观察了益气活血方治疗出血性血小板病患者的临床疗效及iRhom2/ADAM17信号通路表达变化,旨在探讨iRhom2是否参与了出血性血小板病的病理过程,以及健脾益气活血方治疗出血性血小板病的作用靶点。现将过程报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2017年10月—2019年3月就诊于本院中西医结合科的出血性血小板病患者100例,按照随机数字表法分为中药组与西药组,各50例。中药组,其中男17例,女33例;年龄(39.64 ± 13.62)岁,年龄范围为25~67岁;病程(5.68 ± 3.32)年,病程范围为2~13年;出血部位,皮肤瘀点瘀斑46例,月经过多(每次月经量估计在150 mL以上)13例,鼻出血12例,牙龈出血8例,眼底出血2例,球结膜出血2例。西药组,其中男18例,女32例;年龄(37.52 ± 14.18)岁,年龄范围为23~68岁;病程(5.38 ± 4.24)年,病

程范围为1~12年;出血部位,皮肤瘀点瘀斑47例,月经过多11例,鼻出血10例,牙龈出血10例,眼底出血2例,球结膜出血1例。2组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 诊断标准

符合《益气活血法治疗出血性疾病》^[5]中出血性血小板病相关的诊断标准:患者有多部位出血临床表现,经内科、耳鼻喉科、妇科、口腔科和眼科等科室诊视,未发现特异诊断性病灶;检测血小板计数、出血时间、活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间、凝血酶时间,未发现明显异常改变;对一项或多项诱聚剂诱导的聚集反应不良或缺如;经瑞斯托菌素(ristocetin)检测血小板排除血小板无力症。

1.3 纳入及排除标准

纳入标准:中药组及西药组患者符合上述诊断标准;正常对照组体检皮肤黏膜无出血症状,血小板聚集检测无异常发现;2周内未服用阿司匹林、潘生丁、肝素以及活血化瘀类中药等影响血小板功能的药物;患者及其家属对本试验知情同意,并得到华中科技大学同济医学院伦理委员会的批准。

排除标准:合并心、肝、肾等重要脏器功能不全或血液系统、免疫系统严重疾病者;妊娠或哺乳期女性;依从性差,不能配合完成治疗者。

1.4 治疗方法

中药组患者予以益气活血方治疗,方药组成为黄芪15 g、党参15 g、白芍15 g、当归10 g、桃仁10 g、甘草6 g;由本院门诊中药房煎制,1剂/d,分2次服用;

治疗期间停用其他影响血小板聚集或止血药物。西药组患者予以肾上腺色腓片(江苏亚邦爱普森药业有限公司,国药准字 H32023285)口服,2.5 mg/片,2 片/次,3 次/d。2 组患者疗程均为 8 周。

1.5 观察指标及疗效判定标准

比较 2 组患者止血疗效,止血疗效判定标准:治疗后出血症状消失,月经量恢复正常为显效;临床出血症状消失,停止治疗 8 周后偶有肢体瘀斑或牙龈出血为有效;未达到上述标准为无效。止血总有效率 = [(显效 + 有效)例数/总例数] × 100%。

比较 2 组患者血小板聚集率。采集患者肘静脉血,枸橼酸钠抗凝,制备富含血小板血浆,以二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)作为诱聚剂,用 Chronolog 430 型血小板聚集仪检测患者血小板聚集最大聚集率。其中最大聚集率在 21%~40%者为反应不良, <20%者为反应缺如。血小板聚集率疗效标准:以血小板聚集率 >40%为有效。

比较 2 组患者治疗前后及正常对照组的血浆 iRhom2、ADAM17、pro-ADAM17 蛋白表达水平,采用蛋白印迹法(Western Blot)进行检测。采集患者肘静脉血,枸橼酸钠抗凝,制备富含血小板血浆,加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,4℃裂解 30 min;以 12 000 rpm 离心 15 min 后,收集上清,使用 Bradford

法测定蛋白浓度,-80℃保存;上样前加入上样缓冲液,95℃煮沸 5 min;每个样本取 30 μg 蛋白上样,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白并转移至 PVDF 膜;5%脱脂奶粉常温封闭 30 min 后,加入 iRhom2、ADAM17 和 pro-ADAM17 一抗,4℃孵育过夜;洗涤后加入辣根过氧化物酶连接的二抗,室温下孵育 45 min;ECL-Plus 显影曝光,用图像分析软件将其扫描并测定灰度值。

1.6 统计学处理

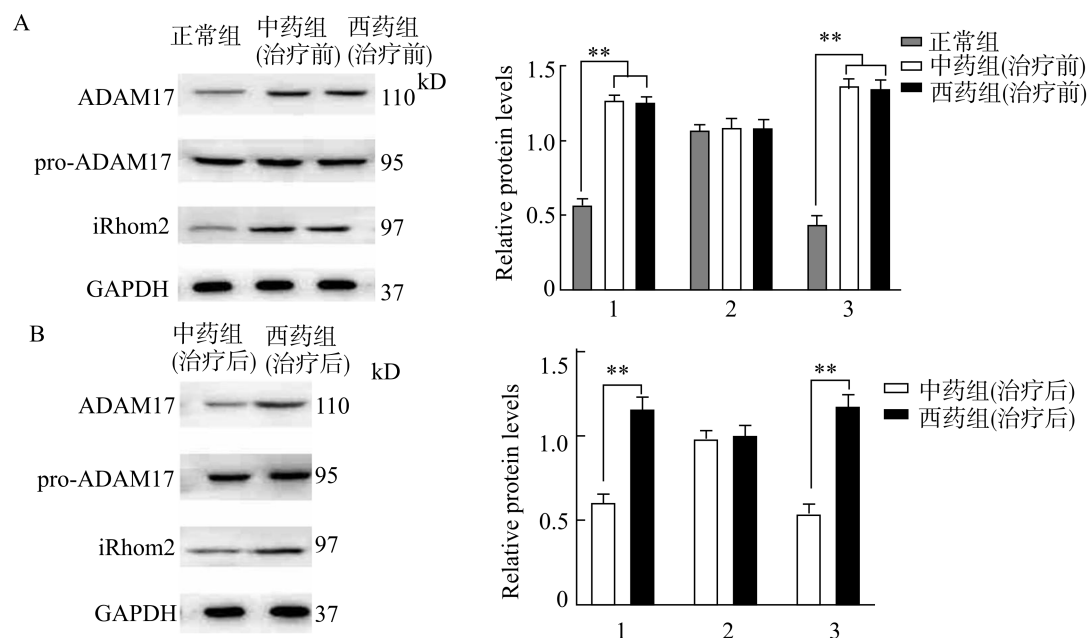
采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用方差分析;计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 iRhom2、ADAM17、pro-ADAM17 蛋白表达水平比较

治疗期间,中药组有 4 例患者未完成观察,其中 2 例治疗期间服用其他止血药,2 例不愿抽血复查;西药组有 3 例自认为疗效欠佳,服药 3~6 d 后退出试验;故实际纳入患者共 93 例。

治疗前,中药组与西药组患者 iRhom2 与 ADAM17 蛋白表达水平明显高于正常对照组(*P* < 0.05)。治疗 8 周后,中药组 iRhom2 与 ADAM17 蛋白表达水平较治疗前明显下降,且中药组显著低于西药组(*P* < 0.05)。见图 1。



A 为治疗前中药组、西药组与正常对照组比较;B 为治疗后中药组与西药组比较;1 为 ADAM17;2 为 pro-ADAM17;3 为 iRhom2; * *P* < 0.05

图 1 各组 iRhom2、ADAM17、pro-ADAM17 蛋白表达水平比较

2.2 止血疗效比较

治疗 8 周后, 中药组患者止血总有效率为 84.78%, 显著高于西药组的 44.68% ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 2 组患者止血疗效比较(例, %)

组别	例数	显效	有效	无效	总有效率
西药组	47	8	13	26	21(44.68)
中药组	46	27	12	7	39(84.78) [△]

与西药组比较, [△] $P<0.05$

2.3 血小板聚集率恢复疗效比较

治疗 8 周后, 中药组患者血小板聚集率恢复正常者 33 例, 血小板聚集率恢复疗效为 71.74% (33/46); 西药组患者血小板聚集率恢复正常者 3 例, 血小板聚集率恢复疗效为 6.38% (3/47); 组间比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

出血性血小板病是一组由血小板聚集功能异常所导致的出血性疾病, 根据临床表现, 可归属于中医学“血证”范畴。本课题组经过多年临床观察^[6-8]发现, 本病患者多存在不同程度的脾虚症状, 辨证属脾不统血证, 病机为脾气虚弱、统摄无权, 血不循经而外溢, 治宜健脾益气、活血消瘀, 可以选用益气活血方或消瘀止血片进行治疗。

本课题组前期研究^[1]发现, 该病患者的血管性血友病因子(vWF)和凝血酶共同受体即血小板膜糖蛋白(GP) Ib/IX/V 及其亚基 GP Ib α 表达水平下调, 其主要原因是 ADAM17 过度水解 GP Ib α 和 GP V 胞外段功能区, 导致血小板聚集不良。中药益气活血方治疗该病疗效显著, 可明显抑制 ADAM17 对 GP Ib α 的过度水解。但是, 出血性血小板病患者血小板为什么会出现 ADAM17 对凝血酶受体 GP Ib/IX/V 及其亚基 GP Ib α 的过度水解, 中药是通过哪些关键作用靶点而达到抑制 ADAM17 对 GP Ib α 的过度水解功效的, 有待进一步探讨。近年来研究^[9-10]发现, ADAM17 的上游分子伴侣 iRhom2 能够特异性地调节 ADAM17 转运、活化及胞外段蛋白水解功能^[2]。iRhom2 首先在内质网与 ADAM17 前体蛋白(pro-ADAM17)直接结合, 一起转运至高尔基体, pro-ADAM17 水解掉一段 N 端结构域, 转化为成熟 ADAM17, 最后定位于细胞膜, 完成蛋白水解^[3-4]。有研究发现, 激活 iRhom2/ADAM17 信号通路, 可加重血友病出血倾向, 血液进入关节, 导致骨质流失和滑膜炎。为此, 本文采用蛋白印迹法观察了 iRhom2/AD-

AM17 信号通路在出血性血小板病中的表达, 同时研究益气活血方对其的调节作用。

本研究结果显示, 出血性血小板病患者的 iRhom2 和 ADAM17 蛋白表达水平明显高于健康者, 表明 iRhom2/ADAM17 信号通路异常表达参与了出血性血小板病的病理过程。本病治疗前出血性血小板病患者的 pro-ADAM17 表达水平与健康者比较, 差异无统计学意义; 进一步提示在出血性血小板病发病过程中, iRhom2 通过与 pro-ADAM17 结合, 激活了 iRhom2/ADAM17 信号通路, 从而促进血小板膜表面的 ADAM17 能够介导 GP Ib α 和 GP V 胞外功能区过度水解, 引起血小板凝血酶受体 GP Ib/IX/V 复合物活性下降, 导致血小板聚集缺陷, 皮肤黏膜出血。中药组治疗 8 周后, iRhom2、ADAM17 蛋白表达水平明显下降, 且显著低于西药组; 提示益气活血方部分抑制出血性血小板病患者 ADAM17 对血小板膜表面蛋白水解功能, 可能是通过调控其上游基因 iRhom2 表达、功能或者活性这一关键靶点而实现。

综上所述, 采用益气活血方治疗出血性血小板病患者, 可显著改善血小板聚集、提升止血效率。iRhom2/ADAM17 信号通路参与了出血性血小板病的病理过程, 调控 iRhom2/ADAM17 信号通路可能是益气活血方治疗出血性血小板病作用靶点之一。

参 考 文 献

[1] 杨胜兰, 沈霖, 张红星, 等. 脾虚型出血性血小板病患者 ADAM17 的表达变化及健脾益气活血方的治疗作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2015, 23(2): 75-78.

[2] Mellwain DR, Lang PA, Maretzky T, et al. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS[J]. Science, 2012, 335(6065): 229-232.

[3] Adrain C, Zettl M, Christova Y, et al. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE[J]. Science, 2012, 335(6065): 225-228.

[4] Cavadas M, Oikonomidi I, Gaspar C J, et al. Phosphorylation of iRhom2 controls stimulated proteolytic shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE[J]. Cell Rep, 2017, 21(3): 745-757.

[5] 沈霖, 张红星, 赵光. 益气活血法治疗出血性疾病[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2015: 36-40.

[6] 沈霖, 陈瑞, 朱闽, 等. 益气活血方及其拆方对出血性血小板病患者 GP Ib/IX/V 复合物及 GP Ib α 表达的影响[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(1): 13-16.

[7] 沈霖, 沈迪, 朱闽, 等. 消瘀止血片对出血性血小板病患者凝血酶受体 GP Ib/IX/V 及 GP Ib α 表达的影响[J]. 中

国中西医结合杂志,2008,28(12):1086-1089.

[8] 沈霖,张红星,杨胜兰,等. 益气活血方治疗出血性血小板病临床疗效观察[J]. 中西医结合研究,2014,6(2):65-67.

[9] Haxaire C, Hakobyan N, Pannellini T, et al. Blood-induced bone loss in murine hemophilic arthropathy is prevented by blocking the iRhom2/ADAM17/TNF- α pathway [J]. Blood, 2018, 132(10):1064-1074.

[10] Issuree PD, Maretzky T, McIlwain DR, et al. iRHOM2 is a critical pathogenic mediator of inflammatory arthritis [J]. J Clin Invest, 2013, 123(2):928-932.

(收稿日期:2020-06-28)

《中西医结合研究》编委会名单

- 名誉主编:陈可冀
- 主 编:黄光英
- 副 主 编:吴伟康 陆付耳 沈 霖
- 编 委(以姓氏笔画为序):
- 文秀英 方建国 王 平 王 伟 王 阶 王文健 王汉祥 王胜利 王硕仁 左新河
- 史载祥 刘 平 刘文励 刘行稳 刘沛霖 刘艳娟 刘鲁明 向 楠 吕志平 吕爱平
- 许先金 许树强 齐清会 余南才 吴 刚 吴伟康 吴根诚 吴献群 宋恩峰 张 英
- 张东友 张玉环 张红星 张京春 张明敏 张莹雯 李大金 李天望 李廷谦 李建武
- 李显筑 杜 建 杨明炜 杨胜兰 杨艳萍 沈 霖 连 方 陆付耳 陈 广 陈 琢
- 陈小野 陈 刚 陈家旭 陈海龙 陈维养 郑翠红 范 恒 金志春 金建年 易 屏
- 施 静 段逸群 胡少明 胡永红 胡思专 胡随瑜 胡家才 赵映前 赵健雄 唐旭东
- 夏仁云 涂胜豪 涂晋文 高 进 高思华 崔乃强 曹洪欣 梁晓春 黄 熙 黄世林
- 黄光英 黄冬梅 董竞成 谢 晶 谢纪文 雷 燕 蔡定芳 蔡贤华 穆大伟 魏军平
- 编 辑:刘 琼 钟志艳