分类号_____ 论文编号_____

_____ 密　　级_____

第二军医大学

硕士学位论文

LRP1 在免疫性血小板减少症患者中的表达及机制初探

Expression of LRP1 in Patients of Primary Immune Thrombocytopenia and Its Primary Mechanism

研究生姓名：司　宇　　学　号：20141262

指导教师：邓安梅　教授　第二军医大学附属长海医院

学科、专业：临床检验诊断学

学位类型：临床医学专业学位

答辩日期：2017年5月

二〇一七年五月

中国知网 https://www.cnki.net

中国知网 https://www.cnki.net

第二军医大学

硕士学位论文

LRP1 在免疫性血小板减少症患者中的表达及机制初探

Expression of LRP1 in Patients of Primary Immune Thrombocytopenia and Its Primary Mechanism

研　究　生：　司　宇

指 导 教 师：　邓安梅　　教授

专 业 名 称：　临床检验诊断学

培 养 单 位：　第二军医大学附属长海医院

二〇一七年五月

中国知网　https://www.cnki.net

目　录

摘要……...1

Abstract ……..…….3

缩略词表……...5

前言 ……..……6

第一部分　LRP1 蛋白在 ITP 患者外周血 PBMC 中的表达情况...…….9

一、材料与方法……...……9

二、研究结果……...……....16

三、讨论……..……22

四、结论……..……24

第二部分　LRP1对ITP患者Th17/Treg细胞免疫功能的调控机制初探….25

一、材料与方法……...……..25

二、研究结果……..……29

三、讨论……..……33

四、结论……..……35

第三部分　随访分析激素治疗对LRP1的影响研究……..……..36

一、材料与方法……...……..36

二、研究结果……..……37

三、讨论…… ……...38

四、结论…… ……...39

参考文献……..……...40

中国知网　https://www.cnki.net

文献综述.....46
硕士期间论文发表.....66
致谢.....67

中国知网 https://www.cnki.net

摘 要

研究目的：明确 LRP1（Low-density lipoprotein receptor-related protein-1, LRP1）在原发性免疫性血小板减少症（Primary immune thrombocytopenia，ITP）中的表达情况。初步探索 LRP1 在 ITP 中的作用机制，并观察地塞米松（dexamethasone, DXM）对 ITP 患者 LRP1 表达情况的影响。

研究方法：采集 105 例 ITP 患者及 30 例健康成人外周枸橼酸钠抗凝 6ml，利用密度梯度离心的方法获得 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)，经过总 RNA 提取后反转录制备 cDNA，以 GAPDH 作为管家基因，采用实时荧光定量 PCR（Taqman 探针法）检测 LRP1 mRNA 的相对表达水平。比较正常对照组及 ITP 患者外周血 PBMC 中 LRP1 mRNA 相对表达水平的差异性，探索 LRP1 与 ITP 发生发展的可能相关性。利用生物信息学（Immusort 数据库）分析外周血细胞中 LRP1 的表达情况，采用流式细胞术检测外周血 PBMC 中单核细胞、淋巴细胞以及中性粒细胞膜上和膜内 LRP1 蛋白的表达情况。分析外周血细胞中 LRP1 的表达情况。接下来，利用流式细胞检测外周血 Th17 及 Treg 细胞比例，同时使用实时荧光定量 PCR（SYBR Green 法）检测 ITP 患者和正常对照组外周血 Th17 和 Treg 细胞分泌的相关细胞因子 mRNA 的相对表达情况。在体外将 ITP 患者 PBMC 与 siLRP1 共孵育 12h、24h 后，采用实时荧光定量 PCR（SYBR Green 法）检测 Th17 和 Treg 细胞分泌的相关细胞因子 mRNA 表达水平。采集 ITP 患者新鲜外周血，磁珠法分离单核细胞，体外加入 siLRP1 孵育 24h 后，利用荧光定量 PCR 检测 IKK-NF-κB 通路相关分子 mRNA 的相对表达水平，并应用流式细胞术检测单核细胞 NF-κB 的磷酸化水平。分析 LRP1 对 Th17/Treg 细胞功能的影响，探索 LRP1 在 ITP 发病机制中的可能调控作用。最后，对 20 例接受 DXM 治疗的新诊断和慢性 ITP 患者进行随访研究 3-6 个月，观察其疗效及 LRP1mRNA 表达情况的变化，分离 14 例病情缓解患者的治疗前外周血 PBMC，使用不同浓度激素处理 24h 后，利用荧光定量 PCR 检测 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达的情况，观察激素对 LRP1 表达水平的影响。

结果：与正常对照组相比，ITP 患者 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达量显著降低，两组差异具有统计学意义。LRP1 蛋白主要表达于单核细胞上，并且膜内与膜上均有表达，与正常对照组相比，ITP 患者单核细胞膜上和膜内的 LRP1 表达均显著下降。ITP 患者外周血 Th17 细胞比例增高，且 Th17 细胞相关细胞因子的表达也显著增高，而 Treg 细胞比例下降，且 Treg 细胞相关细胞因子的表达也显著降低。siLRP1 处理 ITP 患者 PBMC 后，与培养基刺激组相比，Th17 细胞相关细胞因子表达上升，而 Treg

中国知网 https://www.cnki.net

细胞相关细胞因子表达下降。siLRP1 刺激 ITP 患者单核细胞后，与正常对照组相比，IKK、NF-κB mRNA 的相对表达水平上升，且 NF-κB 的磷酸化水平升高。经 DXM 治疗病情缓解的 14 例患者 LRP1 mRNA 表达水平较治疗前上升，差异具有统计学意义。体外激素刺激 ITP 缓解患者的治疗前 PBMC，随着刺激激素浓度的增加，LRP1 mRNA 的表达水平升高，呈现剂量依赖性。

结论：ITP 患者中 LRP1 mRNA 表达水平明显下降，LRP1 参与了 ITP 的发病机制。LRP1 主要表达于单核细胞，可能通过负向调控单核细胞的 IKK-NF-κB 信号通路，进而对 Th17/Treg 细胞功能产生影响，参与了 ITP 的发展。DXM 治疗可以正调控 LRP1 的表达，且这种作用呈现剂量依赖性。

关键词：原发性免疫性血小板减少症，LRP1，单核细胞，Th17/Treg 细胞

中国知网 https://www.cnki.net

Abstract

Objective: To investigate the expression of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) in primary immune thrombocytopenia (ITP). To explore the regulatory role of LRP1 in ITP, and to observe the effect of dexamethasone on the expression of LRP1 in ITP patients.

Methods: Collecting 6ml peripheral sodium citrate anticoagulant blood of 105 ITP patients and 30 healthy adults, then using density gradient centrifugation method to get PBMC. After total RNA extraction then reverse recording RNA to get cDNA. Using GAPDH as housekeeping gene to detect the relative expression level of LRP1 mRNA by real-time fluorescent quantitative PCR (Taqman probe). By comparing the difference of the relative expression of LRP1 mRNA in PBMC of the peripheral blood of normal controls and ITP patients, to explore the possible correlation between LRP1 and the occurrence and development of ITP. The expression of LRP1 in peripheral blood cells was analyzed by Bioinformatics (Immusort database), flow cytometry was used to detect the expression of LRP1 protein in monocytes, lymphocytes and neutrophils in peripheral blood PBMC. To analyze the expression of LRP1 in peripheral blood cells from ITP patients. Then, the ratio of Th17 and Treg cells in peripheral blood was detected by flow cytometry. At the same time, the relative expression of cytokines Th17 and Treg cells secreted in peripheral blood of ITP patients and normal controls were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (SYBR Green). Collecting peripheral blood of ITP patients , then using magnetic bead method to isolate mononuclear cells, adding siLRP1 cultured for 24h in vitro, using fluorescence quantitative PCR to detect relative expression levels of IKK-NF-κB pathway related molecules to test phosphorylation level of monocyte NF-κB by flow cytometry. To analyze the effect of LRP1 on the function of Th17/Treg cell，and explore the regulatory role in the pathogenesis of ITP. 20 patients with newly diagnosed ITP or chronic ITP using DXM treatment were followed up for 3-6 months, observing the curative effect and the change of LRP1 mRNA expression. The peripheral blood of ITP patients, which were collected before therapy, who were treated with hormone therapy then receive remission were prepared PBMC. The PMBC was treated with different concentrations of hormone for 24h, then the expression of LRP1 mRNA in PBMC were detected by fluorescence quantitative PCR, and the effect of hormone on the expression of LRP1 was observed.

Results: Compared with the normal control group, the expression of LRP1 mRNA in

中国知网 https://www.cnki.net

PBMC of patients with ITP was significantly decreased, the difference between the two groups was statistically significant. LRP1 protein was mainly expressed on monocytes, and the expression of LRP1 was in intracellular membrane and cell membrane. Compared with the control group, the expression of LRP1 in monocytes cell membrane and intracellular membrane of ITP patients was significantly decreased. The proportion of Th17 cells in peripheral blood of patients with ITP was increased, and the expression of Th17 cell related cytokines was also significantly increased. While the proportion of Treg cells in peripheral blood of patients with ITP was decreased, and the expression of Treg cell related cytokines was also significantly reduced. Compared with medium stimulation group, after treatment of PBMC in ITP patients by siLRP1, the expression of Th17 cell related cytokines increased, while the expression of Treg cell related cytokines decreased. SiLRP1 stimulated monocytes in ITP patients compared with normal controls, the relative expression level of IKK, NF-κB mRNA increased, and the phosphorylation level of NF-κB increased. The expression level of LRP1 mRNA in 14 patients with remission after DXM treatment was higher than that before treatment, the difference was statistically significant. In vitro hormone stimulation of PBMC, with the stimulation of hormone concentration increased, LRP1 mRNA expression levels increased in a dose-dependent manner.

Conclusion: The expression of LRP1 mRNA in ITP patients was significantly decreased, LRP1 was involved in the pathogenesis of ITP. LRP1 is mainly expressed in monocytes, which may regulate monocytes by negatively regulating IKK-NF-B signaling pathway, affecting the function of Th17/Treg cells and promote the development of ITP. DXM treatment can positively regulate the expression of LRP1, and this effect is dose-dependent.

KEY WORDS: Primary immune thrombocytopenia，LRP1，monocyte，Th17/Treg cells

中国知网 https://www.cnki.net

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
LRP1	low-density lipoprotein receptorerelated-protein-1	低密度脂蛋白受体相关蛋白-1
ITP	primary immune thrombocytopenia	原发性免疫性血小板减少症
DXM	dexamethasone	地塞米松
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
RT-PCR	real time-PCR	实时荧光定量 PCR
STAT	signal transducers and activators of transcription	信号转导及转录激活因子
NF-κB	nuclear factor κB	核因子κB
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	实验性自身免疫性脑脊髓膜炎
IVIg	intravenous gamma globulin	静脉注射免疫球蛋白
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	phosphate buffer saline	焦磷酸缓冲盐溶液
TNF-α	tumor nercrosis factor-α	肿瘤坏死因子 α
CD	cluster of differentiation	白细胞分化抗原
Treg	regulatory T cell	调节性 T 细胞
APC	antigen presenting cell	抗原提呈细胞
IRF3	interferon regulatory factor 3	干扰素调节因子 3
MFI	mean fluorescence intensity	荧光强度
MES	marker evaluation score	marker 评估评分

中国知网 https://www.cnki.net

前 言

原发性免疫性血小板减少症（ITP）通常被认为是一种获得性自身免疫性疾病，在缺乏其他可能导致血小板减少的原因或疾病下，以单独的血小板减少（外周血血小板计数<100×10^9/L）为特征[1]。根据人群调查研究显示，该病年发病率为 3.2-12.1/10万[2-4]，并且最近流行病学数据显示，除育龄期妇女外，男女发病率几乎相等[2]。ITP的临床表现各异，有的没有明显症状，有的表现为局部皮肤或黏膜出血，严重者则表现为颅内出血[5]。若发生颅内出血，严重危及患者的生命，且 ITP 尚无法彻底治愈，因此需要对 ITP 的发病机制深入研究，为治疗 ITP 提供新的靶点。

与大部分自身免疫性疾病相同，ITP 是一种免疫细胞类型异常的器官特异性疾病，例如抗原提呈细胞（APC）、T 细胞和 B 细胞均已发现在疾病的开始或发展中扮演着一定角色[6]。其中经典的发病机制为免疫球蛋白 G（IgG）自身抗体识别血小板自身抗原，引起脾脏网状内皮系统内巨噬细胞通过升高的 Fc 受体（FcR）介导的吞噬作用，对血小板造成破坏[7,8]。目前研究表明，人体内外这些自身抗体也能够抑制和破坏巨核细胞，减少血小板的产生[9-11]。此外，T 细胞也能够介导外周血血小板破坏和抑制/破坏骨髓中巨核细胞导致血小板减少[12-15]。

其中 T 细胞活性和细胞因子的异常是导致 ITP 的重要因素[16,17]。Th1/Th2 细胞因子对于自身免疫活性至关重要。例如，ITP 患者 Th1/Th2 比例失衡导致自身反应性 B 细胞分化，经过糖皮质激素治疗后，保护性 Th2 数量恢复。并且多种细胞因子、趋化因子等参与 Th1/Th2 平衡[18,19]。过去十年新发现了一种分泌 IL-17 的 Th 细胞能够使机体免受真菌和细胞外细菌的的感染，同时又与 RA、实验性自身免疫性脑脊髓膜炎（EAE）和多发性硬化等自身免疫性疾病的发病相关[20-22]，这十年间越来越多的研究表明 Th17 细胞水平的变化以及 Th17 相关细胞因子参与了 ITP 的发病机制[23]。相关的研究表明，Th17 细胞因子促进 Th1 免疫应答，导致 Th1/Th2 比例失衡[24]，Th17 特异性转录因子 RORγt 的过度表达与血小板自身抗体的产生以及 IL-6 的升高有关[25]。Treg 细胞能够抑制细胞免疫和抗体免疫活性，Cao 等[16]人在对原发性 ITP 患者进行流式细胞检测时发现，ITP 患者 Th17 水平升高而 Treg 细胞水平降低，Treg 细胞的紊乱导致细胞免疫及抗体免疫活性紊乱使 ITP 进展，故 Th17/Treg 细胞的比例和功能失衡参与了 ITP 的发病机制。

早期研究显示骨髓前体细胞形成单核细胞，单核细胞在血液中循环几天后，进入组织中形成不同类型巨噬细胞[26]。 该类细胞共同称为单核巨噬细胞或单核细胞/巨噬细胞。它们在维持体内平衡，免疫防御和组织损伤中发挥不同功能[27]。最近越来越

中国知网 https://www.cnki.net

多的研究表明，人单核细胞能够触发并使 Th 细胞极化，并且在感染和自身免疫性疾病中刺激和抑制 T 细胞应答[28,29]。Hui Zhong 等[30]人研究发现 ITP CD16+单核细胞促进 Th1 细胞发展，同时通过 Th1 细胞极化产生的细胞因子进而抑制 Treg 细胞和 CD4+IL-17+的发展。同时对经典型单核细胞的研究表明，ITP 患者体内循环的 CD16-单核细胞分泌较多的 Th17 相关细胞因子，例如 IL-1β 和 IL-6，并且能够促进分泌 IL-17 细胞的发展[31]。故单核/巨噬细胞系统参与 ITP 的发病机制。

我们前期基因芯片检测结果显示新诊断 ITP、慢性 ITP 和正常对照组共有 82 个 mRNA 共表达，在进一步的分析差异性 miRNA 与 mRNA 共表达网络谱结果显示，慢性 ITP 与新诊断 ITP、正常对照组相比，LRP1 的表达是降低的。

低密度脂蛋白（LDL）受体相关蛋白 1（LRP1/CD91）是一种 1 型跨膜蛋白，在高尔基体反面膜囊中经 furin 样内切蛋白酶加工形成成熟的双链结构[32,33]。515-kDaα 链完全在胞外，与跨膜的 85kDaβ 链通过强有力的非共价键力结合在细胞表面。LRP1α 链含有 4 串补体型重复域，从 N 端开始计数，分别为 CCR1、CCR2、CCR3、CCR4[34,35]。CCR2 和 CCR4 分别包含 8 号和 11 号补体型重复域，承担着 LRP1 大部分的配体结合活性[35]。LRP1β 链包含作为主要内吞信号的 YxxL 和双亮氨酸序列[36]，以及两个 NPxY 基序，该基序作为第二内吞信号发挥作用，并且作为信号衔接蛋白的结合位点[37,38]。条件性基因敲除研究已经认定 LRP1 是一种重要的炎症调节因子。在对动脉粥样硬化的研究中表明，巨噬细胞中的 LRP1 能够抑制动脉粥样硬化，几个相关机制已经阐明，包括影响炎症介质的表达，调节基质金属蛋白酶的活动，影响转化生长因子 β 的活性，以及调节胞外基质的沉积[39-42]。在脂多糖和其他炎症介质暴露的情况下，LRP1 通过蛋白水解释放胞内结构域，进而转移到细胞核。LRP1 胞内结构域与转录因子干扰素调节因子-3（IRF-3）相互作用，促进 IRF-3 的核输出并抑制炎性脂多糖靶基因的表达[43]。由于脂多糖和其他炎性介质能够促进 LRP1 的脱落，因此 LRP1 胞内结构域的这种活动构成了一条重要的反馈抑制通路，抑制发炎组织的炎症反应继续扩大。有研究表明，在类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮患者血浆中观察到的脱落 LRP1 水平升高。在对这些巨噬细胞 LRP1 基因敲除的相关研究表明，在单核细胞和巨噬细胞中，LRP1 的表达受到高度调控[44]。动脉粥样硬化斑块中出现的炎症介质可以联合起来降低 LRP1 的表达。同样的炎症介质也可以促进 LRP1 的脱落[44]。这些活动对重要介质的表达，例如 CCL2，可能是有辅助作用的。单核细胞和巨噬细胞细胞膜表面 LRP1 的减少可能通过 NF-kB 信号的活化增加 CCL2 的表达，而 LRP1 的脱落通过直接影响细胞进一步诱导 CCL2 的表达[44,45]。抑制炎症反应的治疗药物能够稳定 LRP1 在巨噬细胞表面的表达并抑制 LRP1 的脱落，从而阻碍动脉粥样硬化的进展。同样已经清晰的认识到巨噬细胞 LRP1 在肿瘤进展过程中的角色。通过 Cre-LoxP 重组实验敲除单

中国知网 https://www.cnki.net

核细胞中的 LRP1 后，小鼠体内迁移到 PanO2 胰腺癌细胞原位和转移部位的单核细胞数量增多[43]。缺乏 LRP1 的巨噬细胞导致肿瘤渗透的升高有趣地与动脉粥样硬化斑块类似，缺乏 LRP1 的巨噬细胞使动脉粥样硬化斑块的浸润更具有侵袭性[45]。LRP1 对单核/巨噬细胞起重要调节作用，但 LRP1 能否通过调控单核/巨噬细胞从而参与 ITP 的发病，为 ITP 的诊断与治疗提供新的方向，需要我们进一步研究。

目前 ITP 的常规治疗包括糖皮质激素，静脉注射免疫球蛋白（IVIg），脾切除术等[46]。初诊 ITP 患者中有 70%-80%对糖皮质激素的治疗是有反应的，其中，10%-30%的患者可达持久缓解。从 1950 年开始使用糖皮质激素治疗 ITP，到目前为止，糖皮质激素仍是常规的 ITP 一线治疗药物[47,48]，具有不可替代的地位。糖皮质激素的治疗包括，大剂量地塞米松以及泼尼松。

目前，大剂量地塞米松作为成人 ITP 患者的一线治疗方案，其具体作用机制尚不清楚。Li 等[49]对 20 名新诊断 ITP 患者以及 10 名新诊断并接受大剂量治疗的 ITP 患者进行研究，10 接受治疗的患者是由于临床上有明显出血症状或血小板数量极低。该研究通过对各亚型 T 细胞进行检测，结果显示大剂量地塞米松能够升高 Th2 细胞水平，而 Th1 细胞水平未见明显变化，最终降低了 Th1/Th2 的比值；并且能够下调 Th17 细胞，其治疗组与健康对照组 Th17 细胞无明显差别；也能够上调 Treg 细胞。虽然以上研究提示了地塞米松治疗 ITP 患者可能是通过调控 Th 细胞亚群发挥作用，但其具体作用机制仍需进一步研究。

中国知网 https://www.cnki.net

第一部分 LRP1 蛋白在 ITP 患者外周血 PBMC 中的表达情况

原发性免疫性血小板减少症（ITP）作为获得性自身免疫性疾病中的一种，其经典的发病机制为抗血小板特异性自身抗体识别并结合 GPIIb/IIIa 或 GPIb/IX/V 等血小板自身抗原后，巨噬细胞通过 Fc 受体与自身抗体的 Fc 段相结合，对血小板进行吞噬，引起血小板的破坏过多。目前研究表明，ITP 的发病机制较为复杂，多种免疫细胞相互作用共同参与了疾病发生发展。这些免疫细胞包括 T 细胞、B 细胞、单核/巨噬细胞以及树突状细胞。前期研究表明慢性 ITP 患者中 LRP1 水平降低，低密度脂蛋白受体蛋白 1（LRP1）是一种内吞型受体，其对单核/巨噬细胞起重要调节作用，但其在 ITP 患者中是否具有调控作用仍不明确。

本部分以健康人和 ITP 患者为研究对象，采用实时荧光定量 PCR 技术检测 LRP1 mRNA 在外周血 PBMC 中的表达水平，首先比较其在健康人及 ITP 患者外周血 PBMC 中相对表达水平的差异性，然后比较在不同分期 ITP 患者外周血 PBMC 中的相对表达差异，探索 LRP1 与 ITP 发生发展的可能相关性。通过 immusort 数据库分析外周血中不同免疫细胞中 LRP1 的表达，了解 LRP1 在外周血中不同免疫细胞的表达情况，然后对 ITP 患者及健康人外周血 PBMC 进行流式细胞检测，观察 LRP1 蛋白在单核细胞、粒细胞和淋巴细胞的表达情况，并且通过与健康对照组对比，找出 LRP1 主要表达作用的细胞。进一步了解 LRP1 在 ITP 中的作用机制。

一、材料和方法

（一）研究对象

1. ITP 组：收集 2013 年-2015 年就诊于上海长海医院及解放军第 100 医院的 105 例 ITP 患者，依据诊断标准确诊，且在确诊 ITP 前均未接受相关治疗。其中新诊断 30 例，持续性 25 例，慢性 30 例，难治性 20 例。男性 50 例，女性 55 例， 年龄 16～73 岁，平均 44 岁；所有患者均签署了知情同意书。

2.正常对照组：在同期来长海医院体检的健康成人中随机选取 30 例作为对照组，其中男性 14 例，女性 16 例，年龄 18-78 岁，平均 47 岁;对照组所有人均签署了知情同意书。

（二）诊断标准

ITP 目前为止还是排除性诊断，依据 2012 年国内 ITP 共识修订诊断标准：

中国知网 https://www.cnki.net

（1）在血细胞形态无异常的情况下，有 2 次以上血常规提示血小板数量减少；

（2）患者脾脏大小一般正常；

（3）骨髓涂片细胞学检验提示巨核细胞有成熟障碍，但数量一般正常或增多；

（4）存在其他继发性血小板减少症不归于此类。

（三）分期标准

（1）新诊断 ITP:指诊断后 3 个月以内的血小板减少的所有患者；

（2）持续性 ITP:确诊后 3-12 个月血小板持续减少的 ITP 患者，包括没有自发缓解和停止治疗后不能维持完全缓解的患者；

（3）慢性 ITP：指血小板减少持续超过 12 个月的所有患者；

（4）难治性 ITP：指满足以下所有三个条件的患者：①脾切除后无效或复发；②需要（包括小剂量肾上腺皮质激素及其他治疗）治疗以降低出血的风险；③除外了其他引起血小板减少症的原因，确诊为 ITP。

（四）主要仪器、试剂和耗材

1、仪器

名称	厂家
PT-PCR 分析仪	美国 ABI-7500
离心机	中国 湘仪 L-550
微量离心机	美国 Sorvall Legend Micro17
程序降温盒	美国 Nalgene 5100-0001C
RNA 浓度测定仪	中国 天根 TGEM Plus
全套移液器	德国 Eppendorf
超低温冰箱	美国 Thermo Scientific Revco
旋涡震荡仪	中国 Thmorgan-VM100
普通 PCR 热循环仪	美国 Veriti 96-Well Fast Thermal
恒温水浴锅	中国 百典 HWC-5A
流式细胞术检测仪	美国 BD FACSCalibur

中国知网 https://www.cnki.net

2、试剂

名称	厂家
PBS	上海威奥 SH30256.01B
DEPC 水	上海威奥 WF0225
Ficoll 分离液	Sigma F9378-500G
RNA 抽提试剂盒	TIANGEN DP430
反转录试剂盒	Takara RR036A
TaqMan PCR 反应试剂盒	Takara RR390A
RPMI-1640 培养基	Sigma R8758
PE-Cy7-anti-$CD45^+$	Biolegend 304015
FITC-anti-LRP1	BD 550496
PerCP-anti-$CD14^+$	Biolegend 301847
APC-anti-$CD16^+$	Biolegend 302011
PerCP-Cy5.5-$CD4^+$	Biolegend 300529
PE-anti-IL-17A	Biolegend 512305
PE-anti-FoxP3	Biolegend 320207
APC-anti-$CD25^+$	Biolegend 302706
BD IntraSure 试剂盒	BD641776
RIPA 裂解液	上海威奥 WB0101
蛋白酶抑制剂	上海威奥 WF0225
CD14 分选磁珠	德国 Miltenyi Biotec，130-050-201
FITC 标记的抗 CD14 抗体	德国 Miltenyi Biotec，130-098-063
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	Biolegend 421403
RFect 小核酸转染试剂	常州百代生物

中国知网 https://www.cnki.net

3、耗材

名称	厂家
各种规格离心管	American Axygen
各种规格 EP 管	American Axygen
细胞冻存管	American Cornig
各种容量枪头	American Axygen
一次性塑料吸头	American Axygen
血球计数板	QIUJING
各种规格细胞培养板	美国 Corning
各种规格细胞培养瓶	美国 Corning

（五）实验方法

1、标本采集

采集上述 30 例健康成年人和 105 例 ITP 患者治疗前外周枸橼酸钠抗凝血 6 ml，利用密度梯度离心的方法获取对照组及 ITP 患者外周血单个核细胞(PBMC) ，另抽取外周血 2ml,离心后收集上层淡黄色透明血清，PBMC 及血清均置于-80℃保存。

2、分离 PBMC

（1）将 6ml 枸橼酸钠抗凝血转移到 50ml 离心管中，使用等体积 PBS 溶液稀释后，吸管反复轻柔吹打混匀；

（2）取一支新的 50ml 离心管，加入 5ml Ficoll 溶液。将 PBS 稀释后全血加入到 Ficoll 溶液上层，为避免两溶液混合，需微微倾斜离心管，动作缓慢沿管壁加入全血；

（3）于 2000rpm，20min 离心，离心机降速设置为 no break；

（4）离心后溶液分层，中间白色层为 PBMC，使用吸管将该层细胞吸取在另一干净的 15ml 离心管中；

（5）加入 PBS 溶液 10ml 清洗 PBMC，使用吸管将两溶液经吹打混匀，于 1500rpm，10min 离心后去掉上清。以同样方法清洗 PBMC 约 2-3 次，吸净上清液；

（6）使用事先准备好的细胞冻存液重悬 PBMC 后，转移至做好标记的冻存管中，放入冻存盒，置于-80℃冰箱保存。

3、总 RNA 提取

（1）将上一步骤分离到的 PBMC 离心并计数，每 5-10×10^6 个细胞加入 1ml Trizol，

中国知网 https://www.cnki.net

用移液枪反复抽吸溶解细胞，将标本于 15-25℃静置 5min；

（2）向上述 EP 管中加入 400ul 氯仿后，用力上下震荡 EP 管，至溶液乳化；

（3）于室温静置 5min，在 4℃，以 12000rpm 离心 15min，期间准备新的 1.5mlEP 管；

（4）离心后混合液分为三层，RNA 存在上清液水相中，将其吸取至准备好的 EP 管中；

（5）再向 EP 管加入等体积的异丙醇，混匀后室温下静置 20min 后，于 4℃，12000rpm，离心 15min；

（6)弃上清，向 EP 管加入 75%的酒精 1ml，将管底沉淀物吹浮；于 4℃，6500rpm，离心 5min；以同样方法重复清洗一次；

（7）小心将 EP 管中酒精吸净，注意不要吸到管底的 RNA；将 EP 管置于室温下干燥，至酒精全部挥发；

（8）将提取出的 RNA 溶于高压灭菌后的 DEPC 处理水 10-20ul 中（视 RNA 量定）；

（9）上机测定 RNA 浓度及纯度，纯度以 OD260/OD280 的吸光度反映。

4、反转录，制备 cDNA

（1）使用 0.2ml 微量反应管，配制 RT 反应液（操作在冰上进行）

试剂	使用量
5×PrimeScript RT Master Mix（Perfect Real Time）	2ul
Total RNA	500ng/RNA 浓度
RNase Free dH_2O	up to 10ul

（2）混匀反应液，将反应管放入普通 PCR 热循环仪进行反转录，反应条件：

37℃ 15min

85℃ 5 sec

4℃ ∞

反应产物 cDNA 放于-20℃冰箱备用。

5、实时荧光定量 PCR

以 GAPDH 作为管家基因，采用 Taqman 探针技术检测靶基因的相对表达量，所有样本重复测量三次，靶基因相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。 Δ Δ CT=[Δ CT(患

中国知网 https://www.cnki.net

者)]-[Δ CT(对照)]，Δ CT=[CT（靶基因）]-[CT（管家基因）]。

（1）配制 PCR 反应液（操作在冰上进行）

试剂	使用量
Premix Ex Taq（Probe qPCR）	10ul
PCR Forward Primer	0.4ul
PCR Reverse Primer	0.4ul
TaqMan Probe	0.8ul
ROX Reference Dey II	0.2ul
DNA 模板	2ul
dH_2O	6.2ul
Total	20ul

（2）将 96 孔板放入 RT-PCR 仪进行 Real Time PCR 反应，反应条件：

Stage	循环数	温度	时间
1	1	50℃	2min
2	1	95℃	10min
3	45	95℃	15s
3	45	60℃	1min

（3）引物序列，见表 1

表 1　LRP1 及 GAPDH 基因上游、下游引物列表

基因名	双向引物序列	退火温度（℃）	产物长度（bp）
GAPDH(HUMAN)	F:5’GGGAAACTGTGGCGTGAT3’ R:5’GAGTGGGTGTCGCTGTTGA3’	60	299
LRP1	F:5’ GGCTCCTGTACCATGAACAGC3’ R:5’ CGCCGCTTATACCAGAATACC 3’	60	188

6、生物信息学分析外周血不同细胞中 LRP1 的表达

（1）免疫细胞基因表达及电子分选数据库 Immusort 网址：

中国知网　https://www.cnki.net

http://immusort.bjmu.edu.cn；

（2）Select Species 选项选择 Human；Select Platform 选项选择 Human Genome U133 Plus 2.0 Array；Select Cell Type 选项选择 B cell；Input：Probeset 填入 200785__s__at；

（3）结果出来后，依次添加入 T cell、NK cell、Monocyte、neutrophil；

（4）分析结果。

7、流式细胞检测细胞表面 LRP1 蛋白表达

（1）设置好水浴箱 37℃；在-80℃冰箱中取出冻存标本外周血单核细胞的冻存管，快速放入准备好的水浴箱中，不断来回摆动，使融化时间尽可能控制在 1min 内；

（2）待完全融化后，250g 离心 5min，弃去上清，加入 RPMI-1640 培养基，轻轻吹打使之混匀；按上述步骤再离心一次，弃去上清，加入 RPMI-1640 培养基，吹打混匀后转移至干净的 15ml 离心管中；

（3）利用改良牛鲍计数板计数：使用酒精将计数板擦拭干净，盖好盖破片，在计数板和盖玻片的交界处用微量吸管吸取待计数样本进行充池，充池不能过多或过少，也不能有气泡产生，充池后切忌移动盖破片，显微镜下计数，对于压线细胞遵循“计上不计下，计左不计右”的原则，计数完成后根据样本稀释的倍数，换算为原液中的细胞浓度；

（4）根据计数结果，使用 RPMI1640 培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml；

（5）每个标本 2 支流式检测管，分别标记同型对照、待测标本，分别加入中 10^6 个/100ul 待测细胞；

（6）向标有同型对照管中加入荧光素标记同型抗体作为阴性对照，待测管加入 20ul PE-Cy7-anti-$CD45^+$、FITC-anti-LRP1、PerCP-anti-$CD14^+$以及 APC-anti-$CD16^+$，混匀；

（7）放置在避光处 30min 后，加入细胞洗液，1200r/min 10min 离心，同样方法洗涤 2 次；

（8）去上清液，控干，加入固定液 0.5ml，混匀；

（9）上机检测。先测同型对照，调节电压至阴性区，再测实验管。

8、流式细胞检测细胞膜内 LRP1 蛋白表达

（1）前部分步骤按上一实验（1）-（5）步骤进行；

（2）于同型对照管中加入荧光素标记同型抗体作为阴性对照，待测管加入 20ul PE-Cy7-anti-$CD45^+$、PerCP-anti-$CD14^+$以及 APC-anti-$CD16^+$，混匀；

中国知网 https://www.cnki.net

（3）放置在避光处 30min 后，加入细胞洗液，1200r/min 10min 离心，同样方法洗涤 2 次；

（4）细胞内染色，透膜与固定。加入 BD IntraSure 试剂盒中的试剂 A 液 100ul，剧烈震荡后，暗室室温孵育 5min，加入 2ml 裂解液，剧烈震荡，避光下放置 10min 后，800g 离心 5min，弃去上清液；再加入 50ul 试剂 B 液以及 20ulFITC-anti-LRP1，剧烈震荡，避光放置 15min 后，加入 3ml 盐离子缓冲液，再剧烈震荡，800g 离心 5min 后弃去上清液，控干，加入固定液 0.5ml，混匀；

（5）上机检测，先测同型对照，调节电压至阴性区，再测实验管。

9、统计学分析

统计学分析：用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。呈偏态分布的数据用中位数与四分位数[M(P25～P75)]表示，2 组间比较采用 Mann—Whitney U 检验。呈正态分布的资料以均值±标准差表示，多组间比较采用方差分析，组间比较用 Tukey's post hoc tests；两组间比较采用独立样本 t 检验，相关性分析采用 Spearman 相关分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

（一）实时荧光定量 PCR 的建立

利用软件（Primer Premierv 5.0）进行引物和探针设计。

对 GAPDH 和 LRP1 的 PCR 产物回收纯化后作为标准品，对其进行等梯度稀释后进行 PCR，以 Ct 值为 y 轴、相对拷贝数的对数为 x 轴，获得标准曲线（图 1、图 2）。结果表明，Ct 值与拷贝数呈现良好的线性关系。GAPDH 的 Ct 值与模板浓度的回归方程为 Y=-3.442Lg（x）+27.249，其决定系数 R^2=1，扩增效率 E=95.23%。LRP1 的 Ct 值与模板浓度的回归方程为 Y=-3.413Lg（x）+27.63，其决定系数 R^2=0.999，扩增效率为 E=96.346%。相关系数均大于 0.98，结果可信度高；且扩增效率都在 0.9-1.2 之间，结果理想。

中国知网 https://www.cnki.net

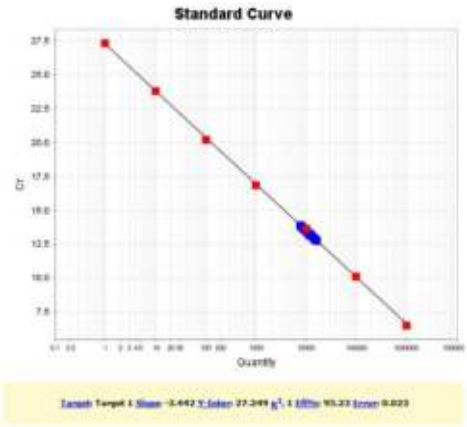


图 1　GAPDH 标准曲线

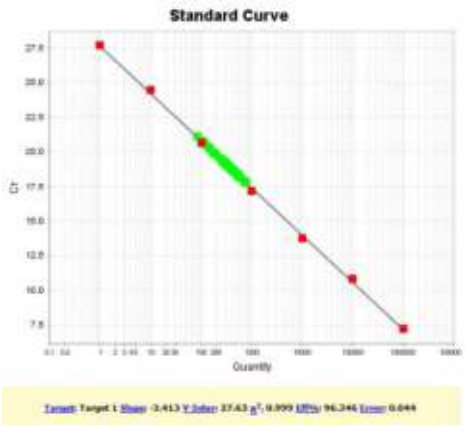


图 2　LRP1 标准曲线

（二）基因产物的溶解曲线、扩增曲线

管家基因 GAPDH、目的基因 LRP1 扩增产物溶解曲线见图 3、图 4，在 GAPDH 89.02℃、LRP1 88.07℃，呈现单峰，无其他杂峰，且主峰无异常增宽，说明扩增产物具有高度特异性，定量相对准确。

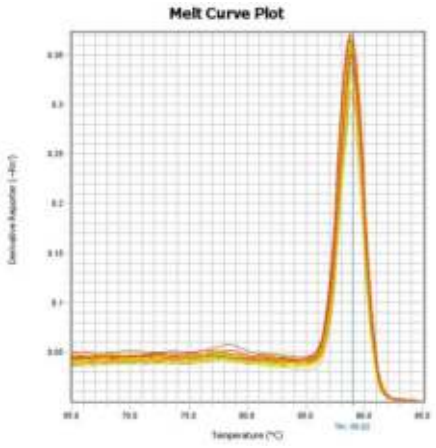


图 3 GAPDH 的溶解曲线

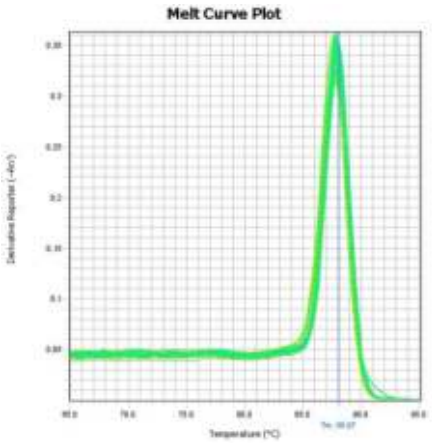


图 4　LRP1 的溶解曲线

管家基因 GAPDH、目的基因 LRP1 扩增曲线光滑，存在平台期、线性增长期、指数增长期及基线，设定荧光阈值为 ΔRn=0.015，图 5、图 6：

中国知网　https://www.cnki.net

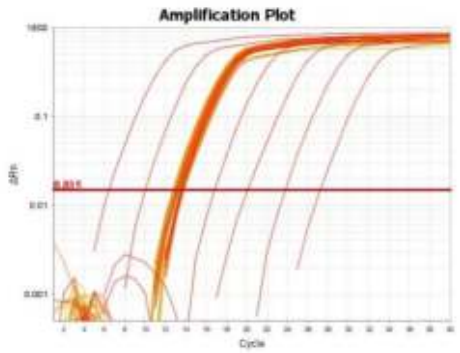


图 5 GAPDH 的扩增曲线

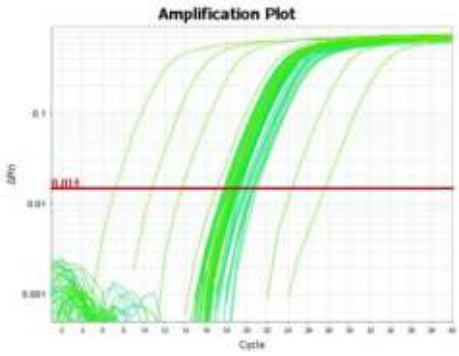


图 6 LRP1 的扩增曲线

（三）正常对照组与 ITP 组 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达水平的比较

以 GAPDH 作为内参，正常对照组和 ITP 组 PBMC 中 LRP1 mRNA 的表达水平用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值来计算表示，正常对照组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 1.020±0.246，ITP 组 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值为 0.694±0.258， ITP 组 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达量是正常对照的 0.69 倍。与正常对照组相比，ITP 患者 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达量显著降低，两组差异具有统计学意义(t=6.158，P<0.001，图 7)

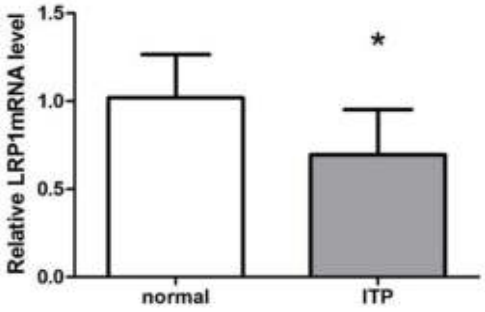


图 7 两组 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达量比较
（* ITP vs normal P＜0.001）

（四）不同分期 ITP 患者 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达水平的比较

进一步分析在不同疾病分期，LRP1 mRNA 的相对表达量。如图 8 所示，不同分期的 ITP 患者 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达差异显著，其相对表达量分别为新诊断 0.84±0.30 ；持续性 0.76±0.18；慢性 0.68±0.17；难治性 0.41±0.14。与新诊断 ITP 相

中国知网 https://www.cnki.net

比，慢性 ITP 和难治性 ITP 患者 LRP1 基因表达均降低(新诊断 ITP vs 慢性 ITP，q=4.100，P<0.05 ；新诊断 ITP vs 难治性 ITP，q=9.601，P<0.001)；与持续性 ITP 和慢性 ITP 相比，难治性 ITP 表达均降低（持续性 ITP vs 难治性 ITP，q=7.585，P<0.001；慢性 ITP vs 难治性 ITP，q=5.934，P<0.001)，其表达差异具有统计学意义。

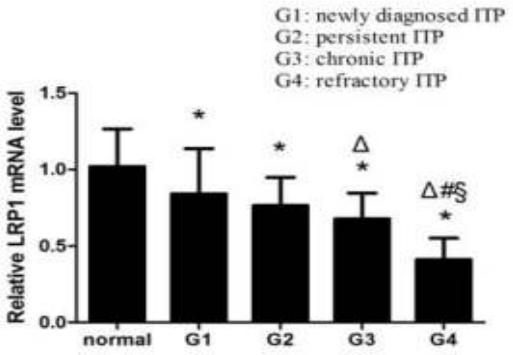


图 8　不同分期 ITP 患者 PBMC 中 LRP1 mRNA 表达量比较（*与正常对照组相比，P＜0.001； Δ 与新诊断 ITP 组相比，P＜0.05；#与持续性 ITP 组相比，P＜0.01； § 与慢性 ITP 组相比，P＜0.001）

（五）生物信息学分析外周血中不同免疫细胞中 LRP1 的表达

采用 immusort 数据库分析外周血中性粒细胞、单核细胞、T 细胞、B 细胞以及 NK 细胞中 LRP1 的表达；在 RBE 曲线中，峰越往右，说明倾向于高表达，越往左，说明倾向于低表达。如图 9 所示，单核细胞出现单峰，且峰值偏右，说明单核细胞中 LRP1 高表达。根据 RBE 曲线，可获得每种类型细胞中 LRP1 表达相对应的 MES 以及 Mean 值，绘制成图 10。其中 MES 反映不同类型细胞之间 LRP1 的表达差异，MES 的绝对值越大，表示与其他类型的细胞之间差异就越大，其为正值提示适合作为阳性 marker，即该基因较为稳定。图 10 所示单核细胞中 LRP1 MES 值最大，且为正值，说明单核细胞中 LRP1 的表达与其他细胞有明显差异，适合作为阳性 marker，意味着单核细胞中该基因较为稳定。

中国知网 https://www.cnki.net

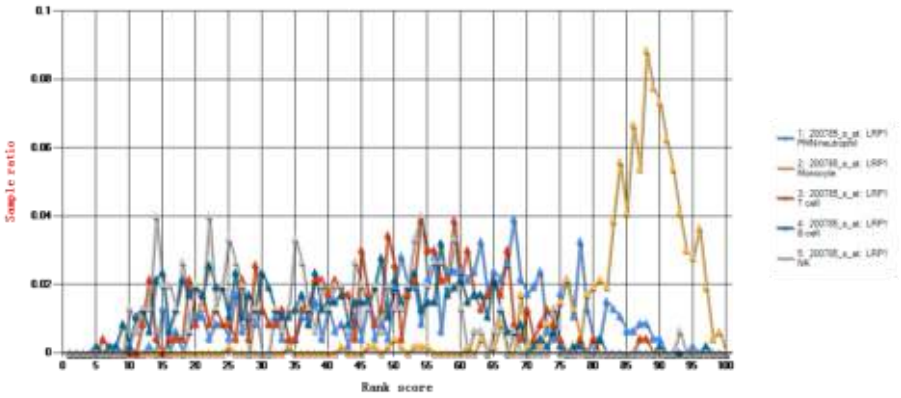


图 9　LRP1 的 RBE 曲线

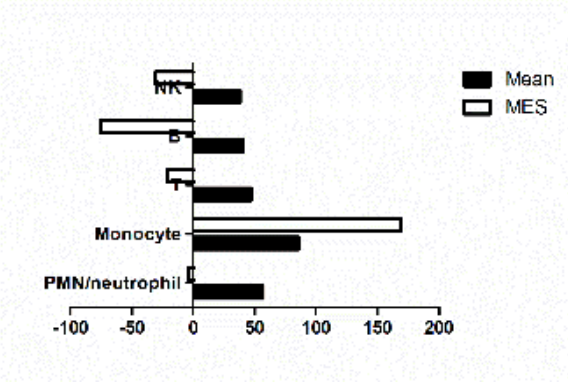


图 10 生物信息学分析外周血中不同免疫细胞中 LRP1 的表达

（六）流式细胞检测 LRP1 蛋白表达

采用流式细胞术方法，分别在外周血中膜上和膜内检测了 LRP1 的表达。通过 SSC 和 CD45 设门，分选出单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞（图 11-A）；流式细胞术分析显示 LRP1 主要表达于单核细胞上，中性粒细胞较少，淋巴细胞极少（图 11-B）；尤其是在破膜处理后，单核细胞表达的 LRP1 变化明显，MFI 值从 280（膜上表达）左右上升到 1800 左右（膜内）（图 11-C）。与正常对照相比，ITP 患者单核细胞膜上和膜内的 LRP1 表达均显著下降（图 9-D、E）。

中国知网　https://www.cnki.net

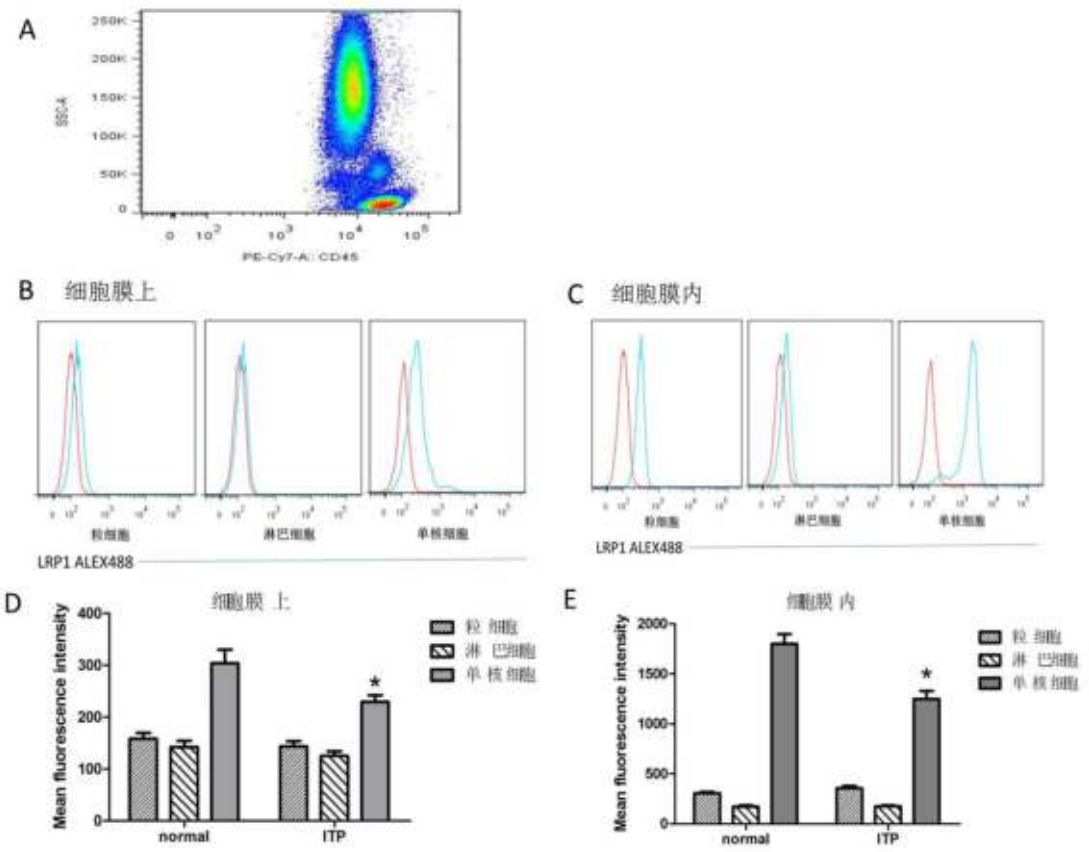


图 11　两组 PBMC 中不同细胞 LRP1 表达量比较.A：SCC 对 CD45+图形分选出粒细胞、淋巴细胞和单核细胞。B、C：流式细胞术分析显示 LRP1 在粒细胞、淋巴细胞和单核细胞中的表达。蓝色表示 LRP1 表达水平，红色表示同型对照。D、E：正常对照组与 ITP 患者不同细胞 LRP1 平均荧光强度对比柱状图（* ITP vs normal P＜0.05）。

（七）不同单核细胞亚型中 LRP1 表达分析

应用流式细胞仪，进一步在不同单核细胞亚型中进行分析，发现 LRP1 在正常和 ITP 患者中经典单核细胞（CD14++CD16-）表达均高于非经典单核细胞（CD14+CD16++）和中间单核细胞（CD14++CD16+）（图 12-A、B）。

中国知网　https://www.cnki.net

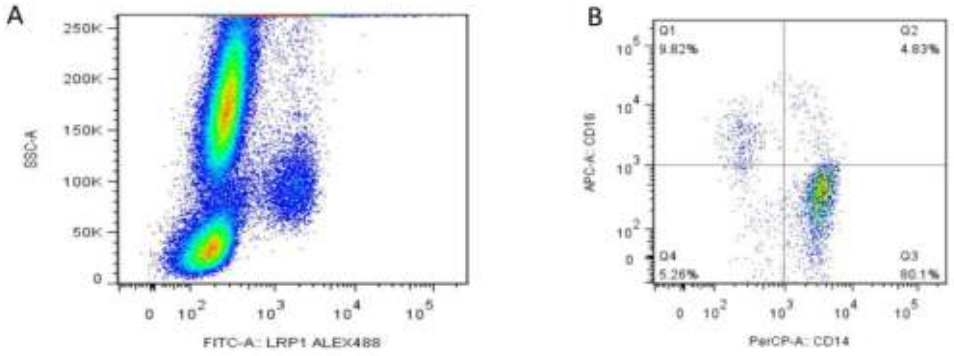


图 12 流式细胞分析外周血单核细胞各亚群膜上和膜内 LRP1 的表达情况.A：SSC 对 LRP1 图形，分选出 LRP1+单核细胞，以及 LRP1 表达阴性的粒细胞和淋巴细胞。B：CD14+对 CD16+图形，各部分细胞百分比已标识，CD14++CD16⁻：80.1%、CD14++CD16+：4.83%、CD14+CD16++：9.82%。

三、讨论

ITP 是一种以血小板减少为特征的自身免疫性疾病，主要发病机制涉及血小板破坏以及血小板生成受到抑制[1]。研究表明，血小板破坏增加主要是由于自身抗体与血小板自身抗原结合，引起巨噬细胞对血小板的清除；同时细胞毒性 T 细胞对自体血小板溶解[13,50,51]，其他免疫细胞例如 Th1/Th2 细胞比例失衡以及 Th17 细胞的功能紊乱也可以通过分泌细胞因子或其他作用机制参与血小板的破坏[5]。而血小板生成减少，其主要作用机制包括自身抗体抑制巨核细胞的产生和成熟[10,12]，细胞毒性 T 细胞抑制巨核细胞的分化[52]以及 TPO 的相对缺乏[53]。

LRP1 是一种与多种结构和功能各异的蛋白质相关的内吞型受体[54]。在许多细胞中，LRP1 介导的胞吞与细胞信号的激活是密不可分的。同时，LRP1 能够调节细胞膜的组成，间接地调节其他信号受体的活动[55]。对动脉粥样硬化的研究表明，单核/巨噬细胞中的 LRP1 能够抑制动脉粥样硬化[40]。LRP1 能够通过抑制 NF-κB 信号通路等机制，限制单核细胞募集到动脉粥样斑块中，并且减少巨噬细胞形成炎性介质，降低对动脉管壁的不利影响[56]。在 LDL 受体缺乏，并且单核细胞和巨噬细胞缺乏 LRP1 的小鼠中，粥样斑块部位单核细胞趋化因子蛋白-1/趋化因子配体（CCL）2 水平升高，并且 CCL2 的升高与巨噬细胞的密度升高有关[40]。同样，在对单核/巨噬细胞在肿瘤进展过程中的角色进行研究中发现，通过 Cre-Loxp 重组实验敲除单核细胞中的 LRP1 后，癌症部位浸润的单核细胞数量增多，趋化因子 CCL2 在巨噬细胞中表达升高等，导致肿瘤浸润增加，同时巨噬细胞分泌的炎症蛋白升高，释放促进肿瘤血管生成的相关蛋白，使癌症进一步恶化[43,57]。虽然在动脉粥样硬化及肿瘤中的病理状态不同，但

中国知网 https://www.cnki.net

都由于单核细胞缺乏 LRP1，导致病变部位单核细胞的数量增多，进入组织的单核细胞分化为巨噬细胞后，巨噬细胞分泌的炎性介质增多，使病变加重。

通过我们的研究发现，与健康对照组相比，ITP 患者外周血 PBMC 中 LRP1 mRNA 的表达量显著减低，提示了 ITP 患者由于 LRP1 基因表达的缺乏，导致了疾病的发生发展。另外，在对不同分期 ITP 患者外周血 PBMC 中的 LRP1 mRNA 的表达量的分析中，与新诊断 ITP 患者相比，慢性 ITP 和难治性 ITP 患者 LRP1 基因表达均降低，与持续性 ITP 患者和慢性 ITP 患者相比，难治性 ITP 患者 LRP1 基因表达也是降低的，提示了 LRP1 基因的表达量与疾病的进展有关，则进一步说明了，LRP1 与 ITP 的进展存在相关性，可能参与了疾病的发展。但 LRP1 是通过何种作用机制参与了 ITP 的发生发展，需要我们进一步的研究。

早期研究显示骨髓前体细胞形成单核细胞，单核细胞在血液中循环几天后，进入组织中形成不同类型巨噬细胞[26]。该类细胞共同称为单核巨噬细胞或单核细胞/巨噬细胞。它们在维持体内平衡，免疫防御和组织损伤中发挥不同功能[27]。人外周血单核细胞可以细分为 3 个亚型，包括经典型（CD14+CD16-单核细胞），中间型（CD14++CD16+单核细胞）和非经典型（CD14+CD16++单核细胞）[58]。目前已有研究表明，CD16+单核细胞能够通过促进 Th1 细胞极化、抑制 Treg 细胞发展和 IL-17 的分泌，参与了 ITP 的发病机制[59]。同时对经典型单核细胞的研究表明，ITP 患者体内循环的 CD16-单核细胞分泌较多的 Th17 相关细胞因子，例如 IL-1β 和 IL-6，并且能够促进分泌 IL-17 细胞的发展[31]。故单核/巨噬细胞系统参与 ITP 的发病机制。

我们已经证实了 LRP1 与 ITP 的发病相关，为进一步探索 LRP1 的作用机制，应用 immusort 数据库分析外周血细胞中 LRP1 的表达，以及流式细胞术检测外周血单核细胞、粒细胞和淋巴细胞膜上和膜内 LRP1 的表达。其结果显示，LRP1 主要表达于单核细胞上；与正常对照相比，ITP 患者单核细胞 LRP1 的表达无论是破膜前还是破膜后都是显著下降的。由此，我们的研究表明单核细胞中 LRP1 的表达差异可能参与疾病的发展。但对于不同分期患者中 LRP1 在单核细胞上的表达差异有待进一步分析。

LRP1 属于一种 1 型跨膜蛋白，具有成熟的双链结构，其中 515-kDaα 链完全在胞外，与跨膜的 85kDaβ 链通过强有力的非共价键力结合在细胞表面。LRP1 不仅能够参与膜蛋白与外源性抗原的胞内转运，例如热休克蛋白（HSPs）能够结合到 LRP1 上[60]，通过 LRP1 内吞转运到主要组织相容复合体 I，然后提呈给抗原提呈细胞[61]；也能够协同细胞信号传导过程中的内吞作用，例如 LRP1 能够与磷脂酰肌醇聚糖-3 一起介导刺猬蛋白的内化，从而参与刺猬蛋白信号通路[62]。在流式细胞术检测外周血单核细胞 LRP1 表达水平的实验结果显示，破膜处理后 LRP1 的表达水平明显升高，

中国知网 https://www.cnki.net

说明了单核细胞膜上及膜内均有 LRP1 的表达，因此我们推测 LRP1 在 ITP 的发病机制中可能是作为受体接收细胞外信号，并将信号转入到细胞内，从而对单核/巨噬细胞进行调控发挥作用的。

我们还通过流式细胞检测法，对不同单核细胞亚型进行 LRP1 蛋白表达分析，其结果显示 LRP1 蛋白在正常对照组和 ITP 患者中经典型单核细胞中的表达高于非经典型和中间型单核细胞。说明 LRP1 主要表达于经典型单核细胞，既往对经典型单核细胞的研究表明，能够影响 Th17 细胞 [63]。但 LRP1 是否通过对单核细胞进行调控，从而影响 Th17 细胞参与 ITP 的发病机制，需要我们进一步的研究。

四、结论

本部分研究证实了 LRP1 mRNA 在 ITP 患者外周血 PBMC 中表达降低，且与患者疾病的进展存在相关性，提示了 LRP1 与 ITP 的发生机制相关。同时 LRP1 在 ITP 患者外周血中主要表达于 CD14+CD16-单核细胞上，其膜上和膜内均有表达，且与正常对照组相比，表达水平均下降。提示了 LRP1 可能是作为信号受体对单核细胞进行调控，参与了 ITP 的发生发展。

中国知网 https://www.cnki.net

第二部分　LRP1 对 ITP 患者 Th17/Treg 细胞免疫功能的调控机制初探

T 细胞活性失调以及细胞因子的异常，是自身免疫性疾病 ITP 的促进因素。研究发现，ITP 患者血小板自身反应性 T 细胞扩增，造成细胞因子不平衡，导致 Treg 细胞功能异常，其抑制细胞免疫和抗体免疫活性降低，导致体内免疫反应的进一步紊乱。Th17 细胞相关细胞因子促进 Th1 细胞免疫调节，参与 Th1/Th2 失衡，导致 ITP。ITP 患者体内 Th17/Treg 比例异常，与 ITP 发病相关。目前已有研究表明，ITP 患者单核细胞的异常，能够影响 Th17/Treg，而 LRP1 能否通过调控单核细胞，进而影响 Th17/Treg 细胞比例，我们尚不清楚。

此部分将利用流式细胞检测外周血 Th17 及 Treg 细胞比例，同时使用实时荧光定量 PCR（SYBR Green 法）检测 ITP 患者和正常对照组外周血 Th17 和 Treg 细胞分泌的相关细胞因子 mRNA 的相对表达情况。在体外将 ITP 患者 PBMC 与 siLRP1 共孵育 12h、24h 后，采用实时荧光定量 PCR（SYBR Green 法）检测 Th17 和 Treg 细胞分泌的相关细胞因子 mRNA 表达水平。采集 ITP 新鲜外周血，磁珠法分离出单核细胞，体外加入 siLRP1 培养 24h 后，利用荧光定量 PCR 检测 IKK-NF-κB 通路相关分子 mRNA 的相对表达水平，并应用流式细胞术检测单核细胞 NF-κB 的磷酸化水平。分析 LRP1 对 Th17/Treg 细胞平衡的影响，探索 LRP1 对单核细胞可能调控机制。

一、材料和方法

（一）研究对象

与第一部分相同。

（二）主要仪器、试剂和耗材

与第一部分相同

（三）实验方法

1、流式细胞检测外周血 Th17 以及 Treg 细胞比例

（1）具体实验步骤同第一部分实验方法 7（1）-（4）；

（2）每个标本 2 支流式检测管，分别标记同型对照、待测标本；

（3）每支试管中均加入适量的 PerCP-Cy5.5-anti-$CD4^+$、PE-anti-IL-17A、

中国知网　https://www.cnki.net

APC-anti-CD25^{+}，混匀，室温避光孵育 20 分钟；

（4）用 2ml cell staining buffer，250g 离心 5min，去上清；

（5）准备 1×的固定破膜缓冲液；

（6）用 1ml 1×FOXP3 Fix/Perm buffer 重悬细胞，混匀，室温避光孵育 20min，250g 离心 5min，去上清；

（7）加入 2ml cell staining buffer，250g 离心 5min，去上清；

（8）加入 1ml 1×FOXP3 Perm buffer，混匀，250g 离心 5min，去上清；

（9）用 1ml 1×FOXP3 Perm buffer 重新细胞，室温避光孵育 15min，离心去上清，再将细胞重新在 1ml 1×FOXP3 Perm buffer 中；

（10）实验管中加入 PE-anti-FoxP3，同型对照管中加入同型对照抗体，室温避光孵育 30min；

（11）加入 2ml cell staining buffer，1200rpm 离心 5min，去上清；

（12）加入 500ul cell staining buffer，待流式检测。

2、siLRP1 刺激 ITP 患者 PBMC 细胞因子分泌

（1）同第一部分实验方法 7 复苏 ITP 患者 PBMC；

（2）RPMI-1640 培养基重悬 PBMC，调整浓度为 1×10^{6} 每个孔；

（3）每个样本设置四个实验孔，分别为培养 12h 组、培养 24h 组以及空白对照组；

（4）6pmol siLRP1 用 50ul 无血清培养基稀释；2ul RFect 用 50ul 无血清培养基稀释，轻轻混匀，室温孵育 5min；将 siLRP1 稀释液与 RFect 稀释液混合，轻轻混匀，室温孵育 20min；

（5）前两组加入 100ul 混合物，第三、四组加入等量培养基，轻轻晃动培养板，混匀；

（6）全部放入 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中，第一、三组在 12h 后收集细胞和上清液，第二、四组在 24h 后收集，用于下一步骤。

3、RT-PCR 检测 Th17 相关细胞因子及 Treg 相关细胞因子的表达量

（1）同第一部分实验方法 3、4；

（2）RT-PCR 采用 SYBR Green 法检测 IL-17A、IL-17F、IL-23P19、IL-12P40、RORC、TGF-β、IL-10 以及 FOXP3 mRNA 的相对表达量；配制 PCR 反应液如下：

中国知网 https://www.cnki.net

试剂	使用量
SYBR Premix Ex Taq	10ul
PCR Forward Primer	0.4ul
PCR Reverse Primer	0.4ul
ROX Reference Dey II	0.4ul
DNA 模板	2ul
dH_2O	6.8ul
Total	20ul

基因名	双向引物序列	产物长度（bp）
IL-17A	F: 5’AGATTACTACAACCGATCCACCT3’ R: 5’GGGGACAGAGTTCATATAATA3’	151
IL-17F	F: 5’GCTATCGATATTGGGGCTTG3’ R: 5’GGAAACGCGCTGGTTTCAT3’	160
IL-23P19	F: 5’CAGCTTCATGCCTCCCTACTG3’ R: 5’AGGCTTGGAATCTGCTGAGTCT3’	83
IL-12P40	F: 5’TFCCGTTCACAAGCTCAAGT3’ R: 5’CCTCCACCTGCCGAGAATT3’	122
RORC	F: 5’GTGGGGACAAGTCATCTGG3’ R: 5’AGTGCTGGCATCGGTTTGG3’	156
TGF-β	F: 5’GGGACTATCCACCTGCAAGA3’ R: 5’CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG3’	239
IL-10	F: 5’GTFATGCCCCAAGCTGAGA3’ R: 5’CACGGCCTTGCTCTTGTTTT3’	138
FOXP3	F: 5’ACACGCATGTTTGCCTTCTTCA3’ R: 5’CCTGTTCGTCCATCCTCCTTTCC3’	230

（3） 反应条件：95℃ 30s、95℃ 5s、60℃ 20s、72℃ 30s；

（4）引物序列如下：

（5）目的基因的相对表达量计算同第一部分相同。

中国知网 https://www.cnki.net

4、RT-PCR 检测 siLRP1 刺激单核细胞后 IKK-NF-KB 通路相关分子的相对表达水平

（1）使用 ITP 患者新鲜外周血，根据第一部分试验方法 2 分离 PBMC，不同之处在于操作在无菌状态下，PBS 改为 DMEM 培养基；最后得到 DMEM 重悬的 PBMC；

（2）采用磁珠分离法从 PBMC 中分离单核细胞，选用 CD14 磁珠分离试剂盒，具体步骤参照说明书；

（3）通过 DMEM 将 PBMC 悬液浓度调整为 10^7 个/80ul，加入 20ul CD14 磁珠，混匀后在 2-8℃环境下静置 15min；

（4）PBMC 与洗涤缓冲液按照 1×10^7 个：1-2ml 的比例混匀，300g 10min 离心后去上清，加入缓冲液 500ml 混匀；

（5）准备好 MS 分离柱，放置在磁性分离架上，首先洗涤缓冲液润柱，然后将配制好的 PBMC 悬液加入到分离柱，使其匀速缓慢通过分离柱，结束后用缓冲液洗涤 3 次；

（6）取下分离柱，准备好干净的收集管，使用 1ml 洗涤缓冲液将单核细胞从分离柱中吹打下来；

（7）采用流式细胞术检测单核细胞纯度，具体步骤参照第二部分实验方法 2，荧光抗体为 FITC- CD14，纯度大于 90%可进行下一步；

（8）单核细胞培养，每孔加入 1×10^4 个/ml 细胞悬液 1ml，加入含有 1.5ml 10%FBS 的 DMEM 培养基，每组实验设置实验组、健康对照组以及空白对照组，实验组与健康对照组参照本部分实验 2 转染 siLRP1，空白对照组加入等量培养基，放入细胞培养箱中培养 24h 后，收集上清液和细胞；

（9）参照上述实验步骤，抽提 RNA 进行反转录后，RT-PCR 法检测相关分子的表达水平，PCR 反应液及反应条件同上，相关引物序列如下：

基因名	双向引物序列
TNFR1	F: GCTGGAGATGCAGAACGGGC R: ACGAGGGGGCGGGATTTCTC
IKKβ	F: AGCTCTGGAACCTCCTGAAGA R: AGCTCCAGTCTAGGGTCGTGA
IKBα	F: TCCTGTTGAAGTGTGGGGCTGATG R: CCTCCAAACACACAGTCATCAT
NF-κB	F: AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC R: TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG

中国知网 https://www.cnki.net

5、流式细胞术检测 NF-κB 磷酸化水平

（1）上述实验步骤（8）处理后的细胞，加入事先冷处理的 4-苯基丁酸，洗涤细胞后除去上清；

（2）向细胞中加入小鼠抗人磷酸化-NF-κB，置于 4℃环境下 90min 后，离心除去上清；

（3）再向细胞中加入 FITC-山羊抗小鼠 IgG1 单抗，避光环境下 1h；

（4）使用 PBS 溶液洗涤细胞 2 次，除去上清后，PBS 重悬细胞；

（5）上机检测，检测评价荧光强度（Mean Fluorescence Intesity，MFI）。

6、统计学分析

同第一部分统计学分析。

二、结果

（一）ITP 患者 Th17/Treg 细胞的测定

采用流式细胞术方法，对 ITP 患者及正常对照组外周血 Th17/Treg 细胞进行检测，通过 CD4+与 IL-17A、FoxP3 与 CD25 设门，分选出 Th17 与 Treg 细胞。与正常对照组相比，ITP 患者外周血中 Th17 细胞比例增高，细胞比例由 1.3%上升至 2.8%；Treg 细胞比例下降，细胞比例由 6.5%下降至 3. 5%；Th17/Treg 细胞比例上升（图 13-A、B、C）。

中国知网 https://www.cnki.net

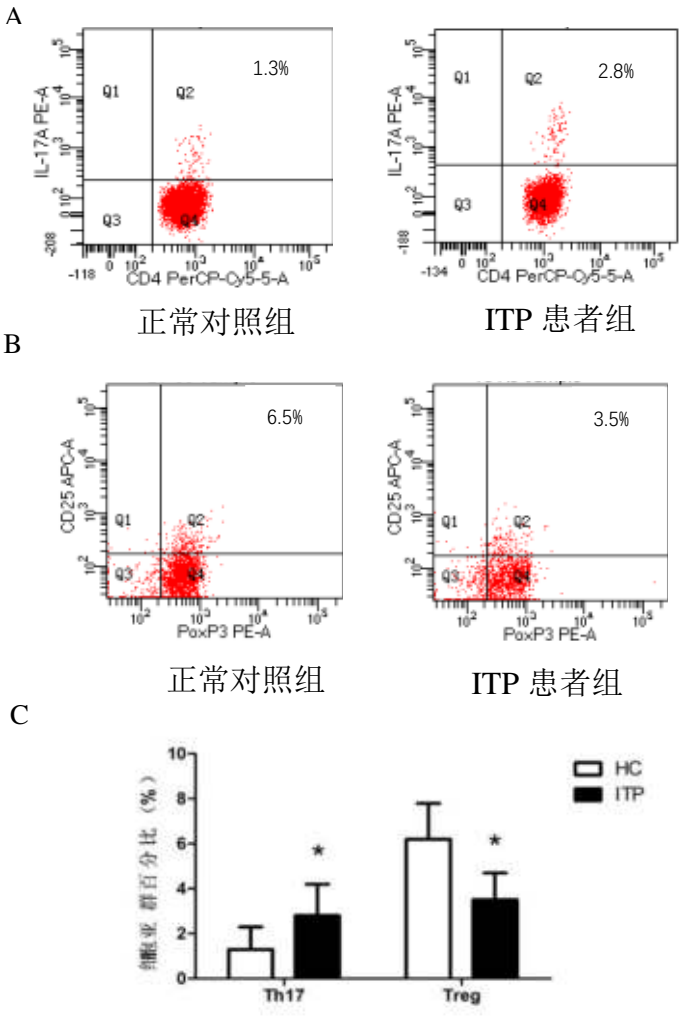


图 13 流式细胞术检测 Th17、Treg 细胞比例（A、B）及 Th17 和 Treg 细胞亚群百分比（C）
（* HC vs ITP P＜0.05）

（二）ITP 患者 Th17 和 Treg 细胞分泌的相关细胞因子 mRNA 表达情况

通过 RT-PCR 分别检测正常对照组及 ITP 患者的外周血 PBMC 进行相关细胞因子 mRNA 相对表达情况；其中 IL-17A、IL-17F 以及 IL-23 与 Th17 细胞相关，并且 Th17 表达转录因子 RORC；TGF-β、IL-10 以及转录因子 FoxP3 与 Treg 细胞相关。与正常对照组相比，ITP 患者 IL-17A、IL-17F、IL-23 mRNA 表达量显著增高，且特异性转录因子 RORC 的表达也增高（图 14）；ITP 患者 TGF-β、IL-10 mRNA 表达量显著降低，且 Treg 特异性转录因子 FoxP3 的表达也显著降低（图 15）。

中国知网 https://www.cnki.net

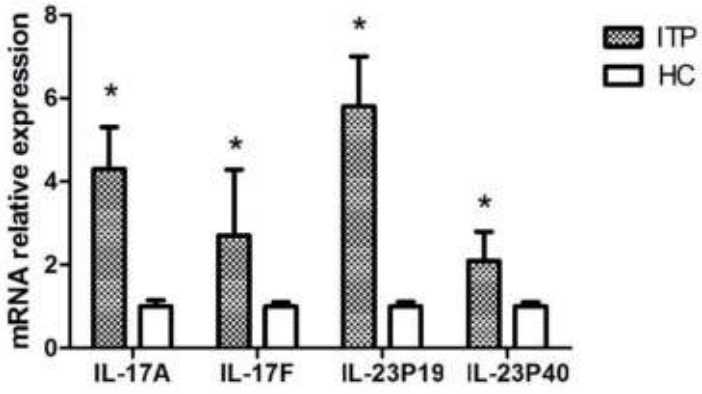


图 14　Th17 细胞相关细胞因子 mRNA 相对表达水平的比较（* ITP vs HC P<0.05）

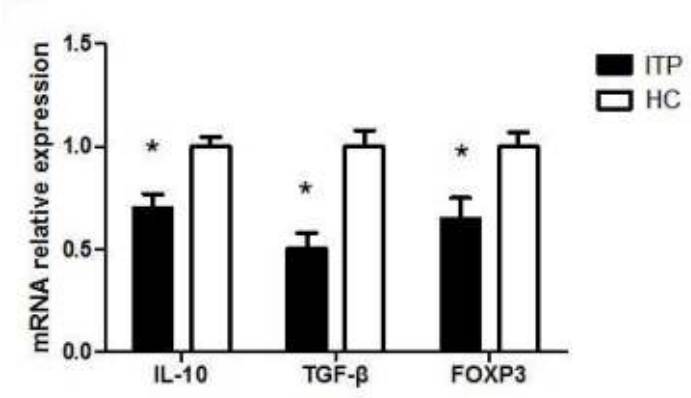


图 15　Treg 细胞相关细胞因子 mRNA 相对表达水平的比较（* ITP vs HC P<0.05）

（三）LRP1 对 Th17/Treg 细胞平衡的影响

为了研究 ITP 中 LRP1 对 Th17/Treg 细胞平衡的影响，在体外将 ITP 患者 PBMC 与 siLRP1 共孵育，12、24h 小时后分别收集上清，采用 RT-PCR 法检测 Th17 细胞相关细胞因子（IL-17、IL-23）及 Treg 细胞相关细胞因子（IL-10、TGF-β）mRNA 的相对表达量，进而观察 Th17/Treg 细胞相关细胞因子及转录因子的变化。结果显示在 siLRP1 加入后，与对照组相比，IL-17A、IL-17F、IL-23p19 mRNA 表达上升；TGF-β、IL-10 mRNA 表达下降（图 16、图 17）。

中国知网　https://www.cnki.net

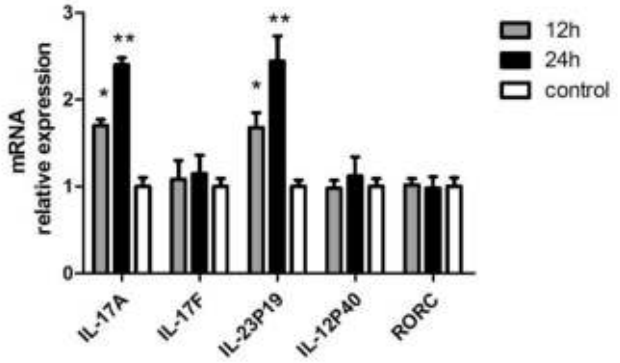


图 16　siLRP1 刺激 12、24h 后 Th17 细胞相关细胞因子表达（*与培养基刺激组相比，P＜0.05；**与孵育 12h 组相比，P＜0.05）

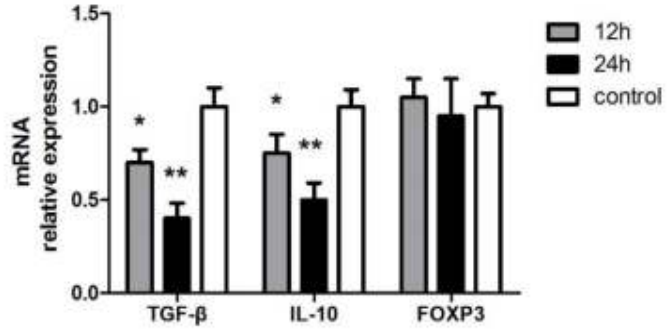


图 17　siLRP1 刺激 12、24h 后 Treg 细胞相关细胞因子表达量比较（*与培养基刺激组相比，P＜0.05；**与孵育 12h 组相比，P＜0.05）

（四）LRP1 对单核细胞 IKK-NF-κB 通路的影响

为研究 LRP1 对单核细胞 IKK-NF-κB 通路的影响，通过磁珠法分离出 ITP 患者的单核细胞，体外培养并加入 siLRP1，培养 24 小时后提取 RNA，检测 IKK-NF-κB 通路相关分子的相对表达水平。结果显示，加入 siLRP1 后，与空白对照组相比，IKK、NF-κB mRNA 的相对表达水平上升，抑制因子 I κ B 基因表达水平下降（图 18）。

中国知网　https://www.cnki.net

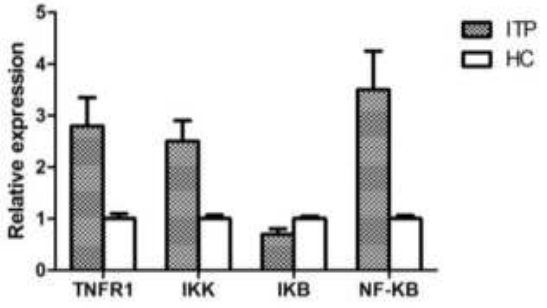


图 18　ITP 患者单核细胞中 IKK-NF-κB 信号通路分子的相对表达水平

应用流式细胞术检测 NF-κB 的磷酸化水平，结果显示加入 siLRP1 后，实验组荧光强度明显高于对照组，说明 NF-κB 的磷酸化水平升高（图 19）。

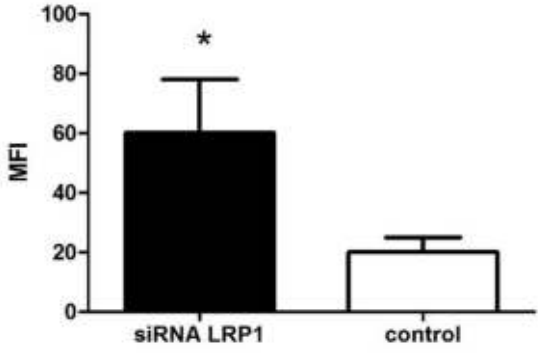


图 19　ITP 患者单核细胞沉默 LRP1 后 NF-κB 磷酸化水平检测
（* siRNA LRP1 vs control P<0.05）

三、讨论

本部分实验结果 ITP 患者外周血中 Th17 细胞比例增高，Treg 细胞比例下降，Th17/Treg 细胞比例上升；同时对 Th17 和 Treg 细胞分泌的相关细胞因子 mRNA 相对表达量进行测定的结果显示 Th17 细胞相关细胞因子 IL-17A、IL-17F、IL-23 mRNA 表达量显著增高，且 Th17 特异性转录因子 RORC 的表达也增高；Treg 细胞相关细胞因子 IL-10、TGF-β mRNA 表达显著降低，同时 Treg 特异性转录因子 FoxP3 的表达也是显著降低的。

30 多年前的研究就已经表明，T 细胞数量的异常与 ITP 相关[64,65]。此后在 1991

中国知网　https://www.cnki.net

年，Semple 等人新发现 CD14+Th 细胞与原发性慢性 ITP 相关，他们的研究表明 Th 细胞的功能异常能够引起自身反应性 B 细胞的分化，从而分泌更多的自身抗体[66]。越来越多的研究发现一种分泌 IL-17 的 Th 细胞能够使机体免受真菌和细胞外细菌的的感染，同时又与 RA、实验性自身免疫性脑脊髓膜炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）和多发性硬化等自身免疫性疾病的发病相关[20,21,67]。近几年对 ITP 的研究发现，Th17 细胞以及 Th17 相关细胞因子的改变参与了 ITP 的发病机制[23,68]，Th17 相关细胞因子促进 Th1 免疫应答，使 Th1/Th2 比例失衡，同时使小鼠 Th17 特异性转录因子的 RORC 过度表达的研究发现，该转录因子与血小板自身抗体的产生以及 IL-6 水平升高相关[25]。Treg 细胞具有免疫调节作用，能够抑制 CD4+和 CD8+细胞应答，研究表明 IL-10、TGF-β 或 IL-35 能够调节 Treg 细胞的这种抑制功能[69,70]。Cao 等人[16]在对原发性 ITP 患者进行流式细胞检测时发现，ITP 患者 Th17 水平升高而 Treg 细胞水平降低，Th17/Treg 比例失衡在 ITP 中扮演重要角色。该部分我们的研究结果与这些结论相符，都表明 Th17/Treg 细胞的比例与功能失调参与了 ITP 的发病机制。但我们的研究重点放在 LRP1 的调控机制，而 LRP1 与 Th17/Treg 细胞比例与功能失衡之间是否具有相关性，我们做了更深一步的研究。

在研究 LRP1 与 Th17/Treg 细胞之间的关系时，我们通过将 ITP 患者 PBMC 与 siLRP1 共孵育，使 PBMC 中的 LRP1 表达水平降低，其结果显示 Th17 细胞相关细胞因子 IL-17A、IL-17F、IL-23p mRNA 表达水平升高，而 Treg 细胞相关细胞因子 TGF-β、IL-10 mRNA 表达水平降低。提示了 LRP1 可能通过影响 Th17/Treg 细胞的分化发育，参与了 ITP 的发病。我们在第二部分的研究结果表明，LRP1 主要表达于单核细胞，而在淋巴细胞上表达极少，故由此我们猜测 LRP1 并不是直接作用于 Th17/Treg 细胞，而是通过某种作用通路调控间接影响了 Th17/Treg 细胞的功能。

最近越来越多的研究表明，人单核细胞能够触发并使 Th 细胞极化，并且在感染和自身免疫性疾病中刺激和抑制 T 细胞应答[28,29]。Hui Zhong 等人[30]研究发现 ITP CD16+单核细胞促进 Th1 细胞发展，同时通过 Th1 细胞极化产生的细胞因子进而抑制 Treg 细胞和 CD4+IL-17+的发展。同时有对经典型单核细胞的研究表明，ITP 患者体内循环的 CD16-单核细胞分泌较多的 Th17 相关细胞因子，例如 IL-1β 和 IL-6，并且能够促进分泌 IL-17 细胞的发展[31]。结合以上研究，我们推测 LRP1 是通过调控单核细胞间接地影响了 Th17/Treg 细胞的功能，进而参与了 ITP 的发病机制，而单核细胞是通过分泌细胞因子从而对 Th17/Treg 细胞产生影响的，但 LRP1 调控单核细胞的具体作用机制我们尚不清楚。

NF-κB 信号通路能够调控多种细胞因子诱导的基因，从而参与免疫反应、炎症反应等，NF-κB 活化能够增加补体蛋白酶、纤维蛋白溶解酶原和炎症介质如 IL-6 的表

中国知网 https://www.cnki.net

达。研究显示巨噬细胞的 LRP1 能够降低细胞表面肿瘤坏死因子受体的表达及抑制 NF-κB 信号通路[71]。在对动脉粥样硬化患者的研究表明，单核/巨噬细胞缺乏 LRP1，会导致粥样斑块的部位表现出单核细胞趋化因子蛋白-1/趋化因子配体（CCL）2 水平升高[45]，从而使病变处单核细胞增多，巨噬细胞产生炎性介质对动脉管壁造成破坏。而 CCL2 的表达是由于巨噬细胞缺乏 LRP1，而对 NF-κB 的抑制作用减弱，信号通路活化导致 CCL2 水平升高。我们的研究显示，ITP 患者外周血单核细胞 LRP1 表达水平较空白对照组低，LRP1 是否也是通过对 NF-κB 通路的调控，参与了 ITP 的进展，我们进行了下一步研究。

在体外培养 ITP 患者单核细胞，并加入 siRNA LRP1 沉默 LRP1 的表达，培养后提取总 RNA，采用 RT-PCR 的方法检测 IKK-NF-κB 信号通路相关分子的变化。结果显示 siLRP1 处理后，IKK、NF-κB mRNA 表达水平上升，抑制因子 I κ B 基因表达下降。说明 LRP1 沉默后，NF-κB 信号通路激活，则提示了 ITP 中的 LRP1 与在动脉粥样硬化中相似，可能通过负调控 IKK-NF-κB 通路发挥作用。同时我们采用流式细胞术检测了 NF-κB 的磷酸化水平，其结果显示 siLRP1 处理后，NF-κB 的磷酸化水平升高，则进一步说明了 LRP1 对 IKK-NF-κB 的负向调控机制。综上所述，我们认为 ITP 患者中可能由于 LRP1 的缺乏，使单核细胞 IKK-NF-κB 信号通路的激活，从而对 Th17/Treg 细胞产生影响，参与了 ITP 的发病机制。

四、结论

本部分研究证实了 LRP1 能够影响 Th17/Treg 细胞的功能，同时 LRP1 能够对 IKK-NF-κB 信号通路进行负向调控。提示了 LRP1 可能通过 IKK-NF-κB 信号通路调控单核细胞，从而对 Th17/Treg 细胞产生影响，参与了 ITP 的发病机制。

中国知网 https://www.cnki.net

第三部分　随访分析激素治疗对 LRP1 的影响研究

目前 ITP 的常规治疗包括糖皮质激素，静脉注射免疫球蛋白（IVIg），脾切除术等。到目前为止，糖皮质激素仍是常规的 ITP 一线治疗药物，具有不可替代的地位，其主要治疗药物包括，大剂量地塞米松以及泼尼松，但其具体作用机制尚不清楚。

在前三部分的基础上，我们对 20 例接受 DXM 治疗的初诊断病人和慢性 ITP 患者，进行随访研究 3-6 个月，观察其治疗疗效及 LRP1 表达情况。利用 PCR 检测 14 例完全缓解病人的 LRP1 mRNA 的表达水平，同时用不同浓度地塞米松刺激这 20 例病人接受治疗前的外周血单核细胞，PCR 检测激素刺激后 PBMC LRP1 mRNA 的表达水平。初步探索激素治疗可能对 LRP1 的影响。

一、材料和方法

（一）研究对象

在所有 ITP 患者中，对 20 例接受 DXM 治疗的初诊和慢性 ITP 患者分别进行随访研究 3-6 个月。

（二）主要仪器、试剂和耗材

与第一部分相同。

（三）实验方法

1、标本采集

同第一部分实验方法 1

2、分离 PBMC、总 RNA 提取、反转录制备 cDNA

同第一部分实验方法 2、3、4

3、RT-PCR 检测外周血 PBMC 中 LRP1mRNA 的相对表达水平

同第一部分实验方法 5

4、RT-PCR 检测不同浓度激素处理后 PBMC 中 LRP1 mRNA 的相

中国知网　https://www.cnki.net

对表达水平

（1）同第二部分实验方法 2，不同在于每个样本设置 5 个实验孔，分别加入 0、0.5、1、2、4uM 的 DXM 刺激 PBMC，细胞培养箱中孵育 24 小时后，收集细胞和上清液

（2）RT-PCR 检测 LRP1 mRNA 的相对表达水平

5、统计学分析

同第一部分统计学分析

二、结果

（一）DXM 治疗疗效及 LRP1 表达情况

对 20 例接受 DXM 治疗的初诊断病人和慢性 ITP 患者，进行随访研究 3-6 个月，观察其治疗疗效及 LRP1 表达情况。经过治疗后，有 14 例病人病情达到完全缓解，6 例病人未达到完全缓解。且达到完全缓解 14 例病人的 LRP1 mRNA 表达水平比治疗前有所升高，差异具有统计学意义（P<0.01）（图 18）。

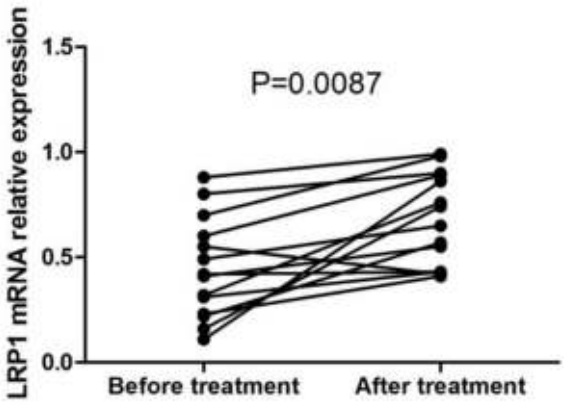


图 18　完全缓解 ITP 患者治疗前后外周血 PBMC LRP1mRNA 表达差异（N=14）

（二）应用激素处理 ITP 患者 PBMC 后，LRP1 mRNA 表达的变化

应用不同浓度的激素处理 20 例 ITP 患者接受治疗前 PBMC，分别为 0、0.5、1、2、4uM DXM，处理 24 小时后，检测外周血 PBMC LRP1 mRNA 的相对表达水平。

中国知网 https://www.cnki.net

结果显示，体外激素刺激 PBMC，随着激素浓度的增加，LRP1 mRNA 的表达水平升高（图 19）。

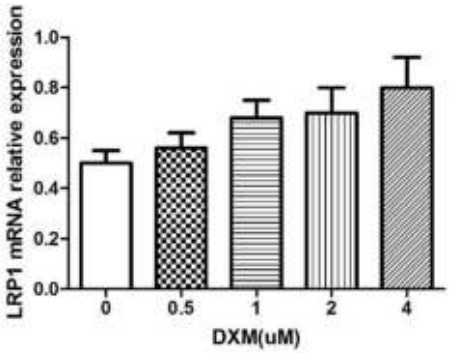


图 19　ITP 患者治疗前 PBMC 经激素处理后
LRP1 mRNA 表达水平变化

三、讨论

目前 ITP 的常规治疗包括糖皮质激素，静脉注射免疫球蛋白（IVIg），脾切除术等[46]。初诊 ITP 患者中有 70%-80%对糖皮质激素的治疗是有反应的，其中，10%-30%的患者可达持久缓解。从 1950 年开始使用糖皮质激素治疗 ITP，到目前为止，糖皮质激素仍是常规的 ITP 一线治疗药物[47,48]，具有不可替代的地位。目前糖皮质激素的治疗包括，大剂量地塞米松以及泼尼松。

目前，大剂量地塞米松作为成人 ITP 患者的一线治疗方案，其具体作用机制尚不清楚。Li 等人[49]对 20 名新诊断 ITP 患者以及 10 名新诊断并接受大剂量治疗的 ITP 患者进行研究，10 接受治疗的患者是由于临床上有明显出血症状或血小板数量极低。该研究通过对各亚型 T 细胞进行检测，结果显示大剂量地塞米松能够升高 Th2 细胞水平，而 Th1 细胞水平未见明显变化，最终仍降低了 Th1/Th2 的比值；并且能够下调 Th17 细胞，治疗组与健康对照组 Th17 细胞无明显差别；也能够上调 Treg 细胞。虽然以上研究提示了地塞米松治疗 ITP 患者可能是通过调控 Th 细胞亚群发挥作用，但其具体作用机制仍需进一步研究。

我们前三部分的研究表明 LRP1 能够通过调控单核/巨噬细胞，影响 Th17/Treg 平衡，使 Th17 水平升高而 Treg 水平降低。介于以上研究我们推测，大剂量地塞米松治疗过程中，是否也有 LRP1 的参与。

因此，在这部分研究中我们对 20 例接受 DXM 治疗的初诊断病人和慢性 ITP 患者，进行随访研究 3-6 个月，观察其治疗疗效及 LRP1 表达情况。利用 PCR 检测 14

中国知网　https://www.cnki.net

例完全缓解病人的 LRP1 mRNA 的表达水平，其结果显示，地塞米松治疗缓解后 ITP 患者外周血 LRP1 mRNA 的表达水平比治疗前有升高，差异具有统计学意义。同时用不同浓度地塞米松刺激接受治疗前患者外周血单核细胞，其 PCR 检测结果显示，体外激素刺激 PBMC，随着激素浓度的增加，LRP1 mRNA 的表达水平升高，且这种作用呈现剂量依赖性。以上研究提示了，LRP1 可能参与大剂量地塞米松治疗 ITP 的作用过程，是否通过对 Th 细胞的作用仍需进一步实验验证。因此，我们认为 LRP1 可作为地塞米松治疗预后的辅助诊断指标之一。

四、结论

LRP1 可能参与大剂量地塞米松治疗 ITP 的作用过程，是否通过对 Th 细胞的作用仍需进一步实验验证。因此，我们认为 LRP1 可作为地塞米松治疗预后的辅助诊断指标之一。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group[J]. Blood, 2009, 113(11):2386.

[2] Segal J B, Powe N R. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data[J]. Journal of Thrombosis & Haemostasis Jth, 2006, 4(11):2377-2383.

[3] Terrell D R, Beebe L A, Vesely S K, et al. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports[J]. American Journal of Hematology, 2010, 85(3):174.

[4] Terrell D R, Beebe L A, Neas B R, et al. Prevalence of primary immune thrombocytopenia in Oklahoma[J]. American Journal of Hematology, 2012, 87(9):848–852.

[5] Liu X, Hou Y, Peng J. Advances in immunopathogenesis of adult immune thrombocytopenia[J]. Frontiers of Medicine, 2013, 7(4):418.

[6] Mckenzie C G, Guo L, Freedman J, et al. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP)[J]. British Journal of Haematology, 2013, 163(1):10-23.

[7] Harrington W J, Minnich V, Hollingsworth J W, et al. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. 1951[J]. Journal of Laboratory & Clinical Medicine, 1990, 115(5):636.

[8] Shulman N R, Weinrach R S, Libre E P, et al. The role of the reticuloendothelial system in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Transactions of the Association of American Physicians, 1965, 78(1):374.

[9] Chang D Y, Ouyang J, Zhou R F, et al. [Profiles of different subsets of CD(4)(+) T cells in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura][J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2010, 49(3):213-216.

[10] Mcmillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP[J]. Blood, 2004, 103(4):1364.

[11] Chow L, Aslam R, Speck E R, et al. A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8+ T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy.[J]. Blood, 2010, 115(6):1247-1253.

[12] Chang M, Nakagawa P A, Williams S A, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro[J]. Blood, 2003, 102(3):887.

中国知网 https://www.cnki.net

[13] Olsson B, Andersson P O, Jernås M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Nature Medicine, 2003, 9(9):1123-1124.

[14] Cines D B, Bussel J B, Liebman H A, et al. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity[J]. Blood, 2009, 113(26):6511-6521.

[15] Chow L, Aslam R, Speck E R, et al. A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8+ T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy[J]. Blood, 2010, 115(6):1247-1253.

[16] Cao J, Chen C, Li L, et al. Effects of high-dose dexamethasone on regulating interleukin-22 production and correcting Th1 and Th22 polarization in immune thrombocytopenia.[J]. Journal of Clinical Immunology, 2012, 32(3):523-529.

[17] Hu Y, Li H, Zhang L, et al. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia[J]. Human Immunology, 2012, 73(6):629-635.

[18] Semple J W, Jr I J, Freedman J. Platelets and the immune continuum[J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(4):264-74.

[19] Feng X, Scheinberg P, Samsel L, et al. Decreased plasma cytokines are associated with low platelet counts in aplastic anemia and immune thrombocytopenic purpura[J]. Journal of Thrombosis & Haemostasis, 2012, 10(8):1616.

[20] Immunology N. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.[J]. Nature Immunology, 2005, 6(11):1123-1132.

[21] Afzali B, Lombardi G R, Lord G. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease[J]. Clinical & Experimental Immunology, 2007, 148(1):32.

[22] Huber M, Heink S, Grothe H, et al. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity[J]. European Journal of Immunology, 2009, 39(7):1716-1725.

[23] Semple J W, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage[J]. Current Opinion in Hematology, 2012, 19(5):357-362.

[24] Daoxin Ma, Xiaojuan Zhu, Ping Zhao,等. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF-β, IL-6) and Th1 cytokine (IFN-γ) in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. Annals of Hematology, 2008, 87(11):899.

[25] Yoh K, Morito N, Ojima M, et al. Overexpression of RORγt under control of the CD2 promoter induces polyclonal plasmacytosis and autoantibody production in transgenic mice[J]. European Journal of Immunology, 1999, 42(8):1999–2009.

[26] Van F R, Cohn Z A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes[J]. Annals of the New

中国知网 https://www.cnki.net

York Academy of Sciences, 1968, 278(1):161-175.

[27] Wells C A, Chalk A M, Forrest A, et al. Alternate transcription of the Toll-like receptor signaling cascade[J]. Genome Biology, 2006, 7(2):1-17.

[28] Evans H G, Gullick N J, Kelly S, et al. In vivo Activated Monocytes from the Site of Inflammation in Humans Specifically Promote Th17 Responses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(15):6232.

[29] Movahedi K, Guilliams M, Van d B J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity[J]. Blood, 2008, 111(8):4233.

[30] Zhong H, Bao W, Li X, et al. CD16+ monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia.[J]. Blood, 2012, 120(16):3326.

[31] Bradshaw E M, Raddassi K, Elyaman W, et al. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells.[J]. Journal of Immunology, 2009, 183(7):4432.

[32] Herz J, Hamann U, Rogne S, et al. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor.[J]. Embo Journal, 1988, 7(13):4119-27.

[33] Herz J, Kowal R C, Goldstein J L, et al. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment.[J]. Embo Journal, 1990, 9(6):1769-76.

[34] Strickland D K, Gonias S L, Argraves W S. Diverse roles for the LDL receptor family[J]. Trends in Endocrinology & Metabolism Tem, 2002, 13(2):66.

[35] Neels J G, Bm V D B, Lookene A, et al. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 144(44):31305.

[36] Li Y, Marzolo M P, Kerkhof P V, et al. The YXXL Motif, but Not the Two NPXY Motifs, Serves as the Dominant Endocytosis Signal for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(22):17187.

[37] Trommsdorff M, Borg J P, Margolis B, et al. Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein[J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(50):33556-33560.

[38] Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence

中国知网 https://www.cnki.net

for integrated co-receptor function betwenn LRP and the PDGF.[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(18):15499.

[39] Hu L, Boesten L P, Herz J, et al. Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2007, 26(12):2710-2715.

[40] Overton C D, Yancey P G, Major A S, et al. Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse[J]. Circulation Research, 2007, 100(5):670-677.

[41] Yancey P G, Ding Y, Fan D, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent.[J]. Circulation, 2011, 124(4):454-464.

[42] Hussaini I M, Srikumar K, Quesenberry P J, et al. Colony-stimulating factor-1 modulates alpha 2-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages.[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(32):19441-6.

[43] Staudt N D, Jo M, Hu J, et al. Myeloid Cell Receptor LRP1/CD91 Regulates Monocyte Recruitment and Angiogenesis in Tumors[J]. Cancer Research, 2013, 73(13):3902-12.

[44] Gorovoy M, Gaultier ACampana W M, Firestein G S, et al. Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages.[J]. J Leukoc Biol, 2010, 88(4):769-778.

[45] Overton C D, Yancey P G, Major A S, et al. Deletion of Macrophage LDL Receptor–Related Protein Increases Atherogenesis in the Mouse[J]. Circulation Research, 2007, 100(5):670-677.

[46] Listed N. International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. International Rhinitis Management Working Group[J]. Allergy, 1994, 49(19 Suppl):1-34.

[47] Zheng D, Huang C S, Huang S B, et al. Laparoscopic splenectomy for primary immune thrombocytopenia: Current status and challenges[J]. World J Gastrointest Endosc, 2016, 8(17):610.

[48] Bethell F H, Meyers M C, Miller S, et al. Effects of ACTH and cortisone on idiopathic thrombocytopenic purpura.[J]. Transactions of the Association of American Physicians, 1951, 64:199-203.

[49] Li J, Wang Z, Hu S, et al. Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Immunology Letters, 2013, 154(1–2):42-48.

[50]Wang L, Zhang F, Zhu Y Y, et al. Mechanism of cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura.[J]. European Journal of Haematology, 2005, 76(5):427-31.

中国知网 https://www.cnki.net

[51]Zhao C, Li X, Zhang F, et al. Increased cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity predominant in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura without platelet autoantibodies[J]. Haematologica, 2008, 93(9):1428-1429.

[52] Benedetti F, De S D, Perona G. T suppressor activated lymphocytes (CD8+/DR+) inhibit megakaryocyte progenitor cell differentiation in a case of acquired amegakaryocytic thrombocytopenic purpura[J]. Stem Cells, 1994, 12(2):205-213.

[53] Gu J, Lu L, Xu R, et al. Plasma thrombopoietin levels in patients with aplastic anemia and idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Journal of Nantong Medical, 2002, 115(7):983-986.

[54]Herz J, Kowal R C, Ho Y K, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver[J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(34):21355-62.

[55] Gaultier A, Simon G, Niessen S, et al. LDL Receptor-Related Protein 1 Regulates the Abundance of Diverse Cell-Signaling Proteins in the Plasma Membrane Proteome[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(12):6689-95.

[56] Yancey P G, Blakemore J, Ding L, et al. Macrophage LRP-1 Controls Plaque Cellularity by Regulating Efferocytosis and Akt Activation[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2010, 30(4):787.

[57] Qian B Z, Pollard J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis.[J]. Cell, 2010, 141(1):39-51.

[58] Zieglerheitbrock L, Ancuta P, Crowe S, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood.[J]. Blood, 2010, 116(16):e74-80.

[59] Zhong H, Bao W, Li X, et al. CD16+ monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2012, 120(16):3326.

[60] Basu S, Binder R J, Ramalingam T, et al. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin[J]. Immunity, 2001, 14(3):303-313.

[61] Binder R J, Srivastava P K. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(16):6128-6133.

[62] Capurro M I, Shi W, Filmus J. LRP1 mediates Hedgehog-induced endocytosis of the GPC3-Hedgehog complex[J]. Journal of Cell Science, 2012, 125(14):3380-9.

[63] Ziegler-Heitbrock HW. 2000. Definition of human blood monocytes. J. Leukoc. Biol. 67:603–6.

[64] Linares M, Cerveró A, Colomina P, et al. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in the elderly[J]. Acta Haematologica, 1995, 93(2-4):80-82.

[65]Jansen P H P, Renier W O, Vaan G D, et al. Effect of thymectomy on myasthenia gravis and

中国知网 https://www.cnki.net

autoimmune thrombocytopenic purpura in a 13-year-old girl[J]. 1987, 146(6):587-589.

[66] Semple J W, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia[J]. Blood, 1991, 78(10):2619-25.

[67]Hu Y, Ma D X, Shan N N, et al. Increased number of Tc17 and correlation with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia[J]. Plos One, 2011, 6(10):e26522.

[68] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells[J]. Nature, 2006, 441(7090):235-238.

[69]Vignali D A, Collison L W, Workman C J. How regulatory T cells work[J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(7):523-532.

[70]Collison L W, Workman C J, Kuo T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function[J]. Nature, 2007, 450(7169):566-9.

[71]Gaultier A, Arandjelovic S, Niessen S, et al. Regulation of tumor necrosis factor receptor-1 and the IKK-NF-kappaB pathway by LDL receptor-related protein explains the antiinflammatory activity of this receptor[J]. Blood, 2008, 111(11):5316-25.

中国知网 https://www.cnki.net

综述：LDL 受体-相关蛋白 1：动脉粥样硬化、肿瘤和神经系统损害中的炎症调节因子

摘 要：低密度脂蛋白受体蛋白（LRP1）是一种与多种结构和功能各异的蛋白质相关的内吞型受体。在许多细胞中，LRP1 介导的胞吞与细胞信号的激活是密不可分的。同时，LRP1 能够调节细胞膜的组成，因此，能够间接地调节其他信号受体的活动。鉴于LRP1配体的范围以及它的多重作用，许多生物活性是基于该受体而存在的。LRP1 基因敲除在小鼠中是胚胎致死性的。但是，通过使用 Cre-LoxP 基因重组技术的精细研究已经阐明了 LRP1 在成熟正常的和病理状态下组织中的功能。其中该研究的一个重要主题是 LRP1 在炎症中的调节作用。在本篇综述中，我们将描述在动脉粥样硬化、肿瘤和神经系统损伤中，LRP1 在炎症过程中的调节作用。

关键词：LRP1，动脉粥样硬化，肿瘤，单核细胞

低密度脂蛋白（LDL）受体相关蛋白 1（LRP1/CD91）是一种 1 型跨膜蛋白，在高尔基体反面膜囊中经 furin 样内切蛋白酶加工形成成熟的双链结构[1][2]。515-kDaα 链完全在胞外，与跨膜的 85kDaβ 链通过强有力的非共价键力结合在细胞表面。尽管 LRP1 停留在脂质筏中的时间过短，但它能够迅速从细胞膜迁移到网格蛋白小窝中，在此完成基本的内吞作用，并以此循环[3-5]。在大多数细胞中，包括巨噬细胞，肝细胞和神经元，LRP1 相关的配体在酸性的核内体中游离并转移到溶酶体中[3][4][6]。在血管内皮细胞中，LRP1 配体能够参与转胞吞作用[7][8]。

LRP1 作为 LDL 受体基因家族的成员，该家族包含的受体有黑色素/LRP2,载脂蛋白 E 受体 2/ LRP8,以及 VLDL 受体。这些受体在结构域组成上表现出相似性，并且在许多情况下，部分功能也是重叠的[9]。LRP1α 链包括 4 串补体型重复域，从 N 端开始计数[9][10]。CCR2 和 CCR4 分别包含 8 号和 11 号补体型重复域，承担着 LRP1 大部分的配体结合活性[10]。LRP1β 链包括作为主要内吞信号的 YxxL 和双亮氨酸序列[11]，以及两个 NPxY 基序，该基序作为第二内吞信号发挥作用，并且作为信号衔接蛋白的结合位点[11-13]。

第一个被认定的 LRP1 的配体是载脂蛋白 E-包含 β-VLDL[14]。后来依次被认定有活化的 α2 巨球蛋白（αM）[15]，进而带来了大量对此进一步的研究报道。图 1B 显示 α_2M 的 18kDa LRP1 结合结构域模型（称为受体结合结构域或 RBD）与 LRP1 的 CCR2 上的串联补体型重复域结合[16][17]。RBD 结构上的赖氨酸残基，位于同一 α 螺旋平行方向上，与补体型重复域中带负电荷的氨基酸相互作用，是 LRP1 配体间典型的相互作用。疏水残基暴露于 RBD 表面也可能参与其中[16]。钙离子与补体型重复域的整体

中国知网 https://www.cnki.net

关联性对维持结构完整性和功能是必要的[1][17]。

目前认定的 LRP1 配体包括蛋白酶，蛋白酶抑制剂复合体，胞外基质蛋白，生长因子，毒素，以及病毒蛋白[9]。存在于髓鞘中的 LRP1 配体包括髓鞘碱性蛋白和髓鞘相关糖蛋白（MAG）[18][19]。解释了在损伤的中枢神经系统中，LRP1 能够参与髓鞘碎片的吞噬的原因。通过结合钙网蛋白，LRP1 与胶原凝集素家族成员（包括 C1q 和甘露糖结合凝集素）相联系，并且参与凋亡细胞的吞噬作用[20][21]。LRP1 同时也作为坏死细胞释放的胞内蛋白质的内吞型受体[22]。 这些 LRP1 活性很重要，因为如果无法有效地清除胞内蛋白，凋亡细胞和细胞碎片，可能会引发自身免疫性疾病[23]。

膜蛋白和外源性抗原的胞内转运

LRP1 与细胞膜中的其他蛋白质的丰度相关并对其进行调节[24][25]。某些细胞膜蛋白，比如 Plxdc1/TEM-7,参与血管生成，能够与 LRP1 产生免疫共沉淀作用，是一种直接相互作用[25]。但是质膜蛋白通常通过双官能团配体或者胞内衔接蛋白桥接到 LRP1, 比如 Fe65 和突触后致密蛋白 95（PSD95）[26-28]。Fe65 衔接 LRP1 到 β 淀粉样前体蛋白（APP）促进 APP 的内吞，并且调节 APP 加工形成 β 淀粉样蛋白[26][27]。PSD-95 连接 LRP1 到 N-甲基-D 天冬氨酸受体，并且调节两受体之间的双向交叉作用[28]。二价配体--尿激酶型纤溶酶原激活物（uPA）-尿激酶型纤溶酶原激活物抑制剂 1 复合体，将 LRP1 衔接到尿激酶受体（uPAR），促进 uPAR 内吞并调节 uPAR 触发的细胞信号[29]。LRP1 在另一通路中通过类似机制清除细胞表面的组织因子[30]。

LRP1 通过促进内吞而调节质膜上其他蛋白质丰度过程中有一个特点，是能够与配体结合拮抗剂-受体相关蛋白（RAP）相结合从而抑制该过程[31]。当 RAP 加入到培养了 3-5 天的细胞中后，LRP1 调节的质膜蛋白质的丰度持续上升直到形成新的平衡。RAP 处理后的细胞表面丰度增加的受体包括 uPAR[29], APP[26] 和脑信号蛋白 4D[25]。

LRP1 参与抗原提呈和 CD8+T 细胞的刺激。不同的热休克蛋白（HSPs），作为抗原肽的分子伴侣，当 HSPs 从细胞中释放出来时，结合到 LRP1 上[32]。热休克蛋白-肽复合物通过 LRP1 内吞转运到主要组织相容复合体 I，然后提呈给抗原提呈细胞[33]。胞外多肽也能够通过结合 α_2M，被 LRP1 介导内吞然后提呈给 T 细胞[34]。这些通路，特别是这些与 HSP 有关的通路，可能在广泛细胞死亡的病理状态中发挥重要作用，细胞死亡能促进 HSPs 从胞内池中释放出来。

细胞信号传导过程中 LRP1 协同内吞作用

能够与 LRP1 受体结合的配体范围之广，使之成为细胞微环境的感受器。LRP1 通过多重机制调节细胞信号通路，最终，通过改变细胞生理和基因表达对众多的细胞

中国知网 https://www.cnki.net

外蛋白做出应答。LRP1 调节细胞信号通路涉及的一个简单机制是，通过竞争性地结合能够活化其他信号受体的蛋白质，从而使该蛋白在细胞微环境中的浓度下降。与磷脂酰肌醇聚糖-3 一起，LRP1 介导刺猬蛋白的内化，使能够结合主要信号受体-碎片蛋白的刺猬蛋白浓度降低[35]。LRP1 调节细胞信号，还可以通过转运预成型的受体-配体复合物到核内体中，例如已经观察到的与 Bmper 以及它的细胞受体有关联的骨变形蛋白 4[36]。当细胞用血小板源性生生长因子 PDGF 处理后，可以观察到 LRP1 与血小板源性生长因子（PDGF）受体在核内体中调节磷酸化活动的关系[37-39]。

如前所述，LRP1 可以简单地通过控制细胞膜上这些受体的丰度进而调节其他信号受体的活性[24]。在许多细胞中，包括神经元，突触形成细胞系，施万细胞和间质成纤维细胞，直接通过配体结合 LRP1 来激活细胞信号[19][40-47]。并不是所有表达 LRP1 的细胞和组织都能够通过配体结合而激活细胞信号通路。而是，通过配体结合激活细胞信号通路的关键在于该类细胞是否表达必要的 LRP1 共受体。在神经元和突触形成细胞系中，N-甲基-D-天冬氨酸作为 LRP1 共受体，通过 PSD-95 与 LRP1 进行物理连接，活化胞外信号因子，如胞外信号-调节激酶 1/2（ERK1/2）[28][37][44][46]。TrK 受体也被认为是 LRP1 的共受体，对活化 α2M 和组织型纤维蛋白溶酶原激活物做出应答的肌氨酸，ERK1/2 和丝氨酸的活化至关重要[47]。P75 神经营养因子受体通过 MAG 招募与 LRP1 形成复合体[19]。这些活动随着下游信号因子如 RhoA 的活化而发生，与被 LRP1 其他配体活化的细胞信号不同[19]。依赖 MAG 的 LRP1 的细胞通路产生了如下假说：LRP1 细胞信号活化是具有配体特异性的。

认为仍有新的 LRP1 共受体需要被识别是合乎情理。这些受体可能单独与 LRP1 一起发挥功能，更有可能的是作为多蛋白受体系统中的一员，与某一细胞中的固定的或不同的成员一起发挥作用。在复杂的细胞微环境中，LRP1 通过与细胞外配体结合成为一个重要的信号受体，同时通过之前所描述的其他机制发挥作用。LRP1 还可以通过参与调节跨膜蛋白水解（RIP）调控细胞信号[48]。从 RIP 第一步中释放出来的游离 LRP1 和从 RIP 第二步中胞内释放出来的胞质尾共同参与细胞信号传导[48-51]。

LRP1 基因敲除在小鼠中是胚胎致死性的[52]。然而，不同范围的 LRP1 配体和这种受体在细胞信号传导过程中的多功能特性，拓宽了过去受体生物学领域所赋予的特异性的传统定义。LRP1 不仅仅是对单一的甚至一个小家族的配体做出应答。相反，我们观察到了许多相互作用以及不同领域的重要的生理学细胞应答。LRP1 的复杂性通常应用像西门子（雷德伍德城，加拿大）发明的交叉作用通路分析 IPA 这种程序来进行分析。图 1 展现了 LRP1 的 IPA 地图。IPA 报道的各种形式的相互作用，包括直接结合，细胞膜内的相互作用，蛋白质磷酸化，以及细胞内定位，但作用形式不仅仅只有这些。数据受到限制，以至于展现出来的相互作用只包括那些与神经炎症所相关

中国知网 https://www.cnki.net

的。如果不把应用作用局限于这些数据范畴内，那么 LRP1 的 IPA 地图将会十分密集。图 2 展示出根据 LRP1 相互作用基因产物的不同位置而分出的层次，包括那些细胞外的、细胞膜上的或者细胞内部的

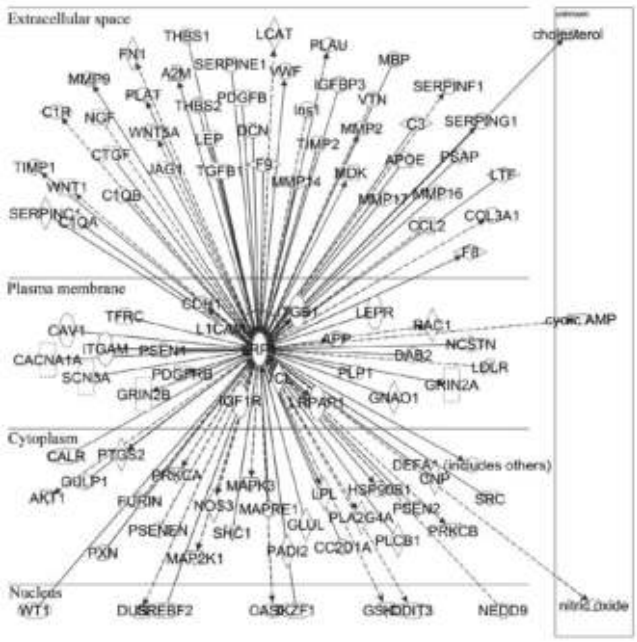


图 1 LRP1 西门子 IPA 系统产生的 LRP1 作用地图。该地图局限于神经系统炎症疾病和炎症反应中的相互作用。相互作用根据 LRP1 相互作用基因表达产物在细胞中的位置而分层。相互作用基因产物包括细胞因子（正方形），生长因子（虚线正方形），蛋白酶（水平菱形），其他酶类（垂直菱形），转运中涉及的蛋白（梯形），跨膜受体（垂直方向椭圆形），离子通道亚基（虚线垂直方向长方形），转录调节因子（水平方向椭圆形）和磷酸酶（三角形）。其他类型基因产物用圆形标出。直接相互作用用实线标出，间接相互作用用虚线标出。没有箭头的实线提示结合作用。右箭头的虚线提示一个基因产物作用于另一基因产物。垂直性小结提示抑制性相互作用

由于 LRP1 复杂性和它的多种相互作用，我们要弄清楚特定环境和疾病进程中的 LRP1 的功能单靠分析某种特定的分子相互作用是不够的。通过体外研究和老鼠模型系统实验相结合分析能够获得更多的信息。条件性基因敲除研究已经认定 LRP1 是一种重要的炎症调节因子。在本篇综述的最后部分，将讨论在动脉粥样硬化，肿瘤和神经系统损伤的背景下 LRP1 在炎症中的作用。尽管他们的病理状态不同，但是 LRP1 表现出来的活性是相同的，这一点可以通过我们在分子水平上对这一受体的理解来解释。

动脉粥样硬化中的 LRP1

动脉粥样硬化是一种复杂的慢性病，它的疾病进程由炎症细胞进入到动脉管壁以及平滑肌细胞 VSMCs 从动脉中层进入到新生内膜层的速度调控的[53-55]。尽管早期研究显示在细胞培养中，配体直接结合到 LRP1 上能够促进 VSMC 的增殖[56]。但条件性敲除小鼠 VSMCs 中的 LRP1 则表现出在体外 VSMC 中的 LRP1 能够抗动脉粥样硬化，其主要机制是抑制 PDGF 受体 β 信号的活性[37]。在巨噬细胞中，LRP1 也能够抑制动脉粥样硬化，而且几个相关机制已经阐明，包括影响炎症介质的表达，调节基质金属蛋白酶的活动，影响转化生长因子 β 的活性，以及调节胞外基质的沉积[57-60]。

LRP1 在巨噬细胞信号传导中的活性为它在抗动脉粥样硬化的活动提供很好的解

中国知网 https://www.cnki.net

释。在脂多糖和其他炎症介质暴露的情况下，LRP1 通过蛋白水解释放胞内结构域，进而转移到细胞核。LRP1 胞内结构与转录因子干扰素调节因子-3（IRF-3）相互作用，促进 IRF-3 的核输出并抑制炎性脂多糖靶基因的表达[49]。由于脂多糖和其他炎性介质能够促进 LRP1 的脱落，因此 LRP1 胞内结构域的这种活动构成了一条重要的反馈抑制通路，抑制发炎组织的炎症反应继续扩大。有研究表明，在类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮患者血浆中观察到的脱落 LRP1 水平升高。

下面描述 LRP1 抑制炎症反应的可能第二个途径。在某些细胞中，包括巨噬细胞，LRP1 降低细胞表面肿瘤坏死因子受体 1 的表达以及抑制 NF-κB 信号通路[61]。NF-κB 活化能够增加补体蛋白酶、纤维蛋白溶酶原和炎症介质如诱导型一氧化氮合酶和 IL-6 的表达。在 LDL 受体缺乏，同时单核细胞和巨噬细胞缺乏 LRP1 的小鼠中，粥样斑块的部位表现出单核细胞趋化因子蛋白-1/趋化因子配体（CCL）2 水平升高[58]。CCL2 的升高与斑块中巨噬细胞的密度升高有关。LRP1 缺乏的骨髓发育来源的巨噬细胞的 CCL2 的表达因为 NF-κB 信号活化而升高[61]。因此，我们不难假设，LRP1 是通过抑制 NF-κB 信号，进而限制单核细胞募集到动脉粥样硬化斑块中，并且减少巨噬细胞形成介质对动脉管壁的不利影响。巨噬细胞中 AKT 的 LRP1 信号也可能是通过防止斑块中的巨噬细胞凋亡实现抗动脉粥样硬化作用[62]。

通过对多种不同小鼠模型系统研究表明巨噬细胞 LRP1 抑制动脉粥样硬化，动物模型系统包括 LDL 受体缺乏或者载脂蛋白 E/LDL 受体双缺失背景下敲除骨髓细胞中 Cre-介导的 LRP1 基因以及将巨噬细胞中 LRP1 缺乏的小鼠来源的骨髓移植到 LDL 受体缺乏的小鼠中[57-60]。在所有的这些研究中，LRP1 被证明是具有抗动脉粥样硬化作用的。在对这些巨噬细胞 LRP1 基因敲除的相关研究中能够发现，大量研究表明，在单核细胞和巨噬细胞中，LRP1 的表达受到高度调控[51][63-67]。动脉粥样硬化斑块中出现的炎症介质可以联合起来降低 LRP1 的表达。同样的炎症介质也可以促进 LRP1 的脱落[51]。这些活动对重要介质的表达，例如 CCL2，可能是有辅助作用的。单核细胞和巨噬细胞细胞膜表面 LRP1 的减少可能通过 NFkB 信号的活化增加 CCL2 的表达，而 LRP1 的脱落通过直接影响细胞进一步诱导 CCL2 的表达[51][58][61] 抑制炎症反应的治疗药物能够稳定 LRP1 在巨噬细胞表面的表达并抑制 LRP1 的脱落，从而阻碍动脉粥样硬化的进展。

尽管我们主要关注 VSMC 和巨噬细胞中的 LRP1 调节动脉粥样硬化的机制，但肝脏也富含大量的 LRP1。早期研究显示肝脏 LRP1 的失活能够提高循环乳糜微粒残余产物水平[68]。最近，有报道称肝脏 LRP1 的减少与鼠类动物模型动脉粥样硬化水平的升高有关联，因为血浆中致动脉粥样硬化前状态的介质大量沉积[69]。

中国知网 https://www.cnki.net

癌症中的 LRP1

早期关注肿瘤细胞系的研究表明，肿瘤的恶性变化可能与 LRP1 表达缺失有关[70-72]。另一方面，我们知道在缺氧环境下以及体内恶性肿瘤中，LRP1 的表达都是大幅度升高的[73]。因此在周围含氧丰富的环境下肿瘤细胞的培养不能准确地说明肿瘤中 LRP1 的表达和活性。肿瘤细胞中 LRP1 的表达对恶性肿瘤进展的影响仍不清楚。在前列腺癌中，通常在格里森分级高的肿瘤中观察到 LRP1 的表达，这是侵袭能力最强的肿瘤，而在肝细胞性肝癌中，LRP1 表达的缺失可能与肿瘤的发展有关[71][72][74][75]。

从机械论的立场来说，在体外和潜伏期的老鼠模型系统中，LRP1 对癌细胞的生理的调节表现出许多活性。一些已发表的 LRP1 活性可能实际上在肿瘤进程中起对抗的作用。因此，了解 LRP1 在癌症中所起的作用需要以一个完整的形式报告 LRP1 的多种活性的模型系统。在纤维肉瘤细胞和胶质瘤细胞中，LRP1 通过调控预侵袭性 uPA-uPAR 系统来影响细胞的迁移和侵袭[29][76][77]。LRP1 与 uPA 和 uPAR 的相互作用比较复杂，LRP1 能够减弱 uPA 激活胞外蛋白酶进而促进细胞渗透组织周边的活性[29]。同时，LRP1 也能够调控 uPAR 信号传导给 ERK1/2 等因子，而这些因子能够促进肿瘤生存，分化，迁移和侵袭。LRP1 抑制还是促进 uPA 信号可能取决于血浆酶原激活物抑制物-1 是否可发挥作用以及细胞膜上 uPA 的丰度。

蛋白酶连接蛋白 1，Hsp90 以及肝素结合细胞因子等这些配体直接结合 LRP1，能够直接地激活肿瘤细胞中的细胞信号，这些已经在非转化性细胞如神经元和间质成纤维细胞中观察到[78-80]。当 LRP1 激活下游的 ERK1/2 后,基质金属蛋白酶（MMP）MMP9,MMP2 的表达水平升高[41][78][81]。由于这些 MMPs 参与癌细胞的侵袭和转移，LRP1 对下游 ERK1/2 的活化作用可能促进癌症的发展。LRP1 的另一配体，载脂蛋白 E，抑制肿瘤细胞的侵袭和转移的通路也需要 LRP1 的参与[82]。我们观察发现 CL16 肿瘤细胞中 LRP1 基因沉默对异种移植物的形成，小鼠中肿瘤的生长以及肿瘤细胞转移到肺部的能力不造成影响；但是，当 LRP1 沉默后，CL16 形成的肺部转移灶无法生长[73]。LRP1 是如何能够在转移灶中选择性促进肿瘤细胞的生长或存活，而在原发灶没有这种作用的现象，是未来研究的方向。

我们已经清晰的认识到巨噬细胞 LRP1 在肿瘤进展过程中的角色。单核细胞和巨噬细胞浸润到肿瘤组织中，通过产生生长因子和蛋白酶，被恶性细胞充分利用后，进而促进肿瘤的进展和转移[83]。巨噬细胞同时与肿瘤的血管生成有关。我们发现通过 Cre-LoxP 重组实验敲除单核细胞中的 LRP1 后，小鼠体内迁移到 PanO2 胰腺癌细胞原位和转移部位的单核细胞数量增多[84]。缺乏 LRP1 的巨噬细胞导致肿瘤渗透的升高有趣地与动脉粥样硬化斑块类似，缺乏 LRP1 的巨噬细胞使动脉粥样硬化斑块的浸润更具有侵袭性[58]。另外，CCL2 是我们发现的新的与炎症细胞的招募有关的趋化因子，

中国知网 https://www.cnki.net

而该类趋化因子在 LRP1 缺失的巨噬细胞中表达升高[84]。更有意义的是，我们还观察到巨噬细胞炎症蛋白-1α/CCL3 和巨噬炎症蛋白-1β/CCL4 的表达也升高。这些信号因子能够促进炎症反应。缺乏 LRP1 的巨噬细胞使肿瘤浸润增加，同时伴随着肿瘤血管生成的增加[84]，也许说明巨噬细胞释放血管内皮生长因子和其他促进血管生成的蛋白质[83]。

神经系统损伤中的 LRP1

在健康中枢神经系统和未受损伤的周围神经系统（PNS），多类神经元表达 LRP1[85][86]。图 2A 显示：对老鼠大脑皮层椎体神经元进行免疫组化的分析中显示出胞体 LRP1 有强烈的免疫反应性。尽管健康大脑的胶质细胞表现出局限的 LRP1 的表达，但对损伤或疾病的应答的反应性胶质细胞的 LRP1 的免疫性呈强阳性[87]。同样地 ，在未受损周围神经系统中形成髓鞘并为轴突提供营养的施万细胞，对神经损伤的反应是表现出 LRP1 表达的大幅升高[86]。图 2B 的 IHC 分析显示，在小鼠坐骨神经粉碎性损伤 3 天后，活化的施万细胞的 LRP1 免疫反应呈强阳性。同时，巨噬细胞开始浸润受损的神经。这些细胞都成 LRP1 阳性。

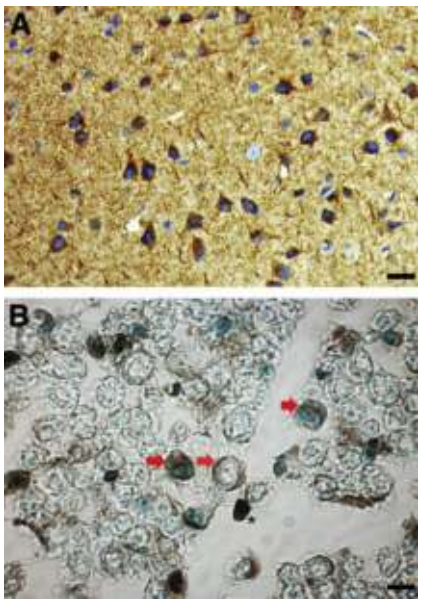


图 2 神经系统中检测 LRP1 的 IHC 分析.A：小鼠大脑皮层 LRP1 免疫染色。LRP1 通过一种主要的多克隆抗体检测其β链（Sigma-Aldrich，St. Louis,MO）而被检测到。染色通过塔纳系统（Tucson,AZ）分析。B:小鼠坐骨神经远端挤压伤部位的一个截面，该损伤为受损后恢复 3 天后。LRP1 通过多克隆抗体 R2629 检测。截面使用亚甲基绿复染。经典 LRP1 免疫阳性施万细胞用箭头标记。星号标记巨噬细胞。比例尺：35um（A）；12um（B）。

中国知网 https://www.cnki.net

综述的较前部分，我们讨论了身免疫性疾病的发生与细胞碎片的异常吞噬之间的可能联系。在多发性硬化症中（MS）,退化髓磷脂不能有效清除可能是引发免疫应答的重要原因[88]。因此，作为凋亡细胞、细胞碎片和变性髓磷脂吞噬受体，LRP1 的这一功能可能对 MS 的病理生理特性十分重要。与这种模式一致，LRP1 的表达在人类慢性活动期 MS 病灶的边缘是上调的[89]。

LRP1 和其他基因家族成员，包括载脂蛋白 E 受体 2 和 VLDL 受体，与阿兹海默综合症有关[90]。动物模型和体外实验揭示了 LRP1 调节阿兹海默症的发病和进展的多种机制。在这些机制中，LRP1 是载脂蛋白 E 的内吞作用和信号传导受体，并作为 Aβ 肽的受体发挥作用。神经炎症可能促进阿兹海默综合症的发病和发展[91]。研究显示，在 LRP1 缺失的小胶质细胞中，载脂蛋白 E 的抗炎效果丢失，导致阿兹海默症发病风险升高。淀粉样 β 是疏水性肽，有跨膜蛋白淀粉样前体蛋白（APP）通过特定的蛋白水解过程衍生而来。淀粉样 β 聚集成纤维以及形成斑块沉积是阿兹海默症病理进程中的重要过程[92]。淀粉样 β 不断流入血脑屏障与血清中炎性因子水平升高直接相关，同时有研究表明 LRP1 能够促进淀粉样 β 从血脑屏障中流出，而在阿兹海默症中流出减少似乎是由于 LRP1 表达减少造成[93]。

周围神经系统 PNS 与中枢神经系统不同的是，受损后有强大的再生能力[94]，并且最近有研究表明 LRP1 在这个过程中的主要作用。施万细胞作为急性 PNS 损伤的第一应答细胞发挥功能。活化后的施万细胞去分化，增殖，迁移，参与髓磷脂和细胞碎片的吞噬，建立供终末轴突再生的支架[95]。成功的神经再生需要从血液中募集单核细胞。这些细胞进一步促进碎片的清除；同样地在其他形式的损伤中，损伤神经的巨噬细胞渗透和炎症的程度在时间上和幅度上收到高度调控。

在体内受损的外周神经中，施万细胞中的 LRP1 迅速上调，在该类细胞中作为强有力的信号受体，激活能够使施万细胞在严峻的条件中存活的信号通路[86][96][97]。LRP1 激活的细胞信号还可以通过影响 ERK 活化和 Rho GTP 酶的活性来调节施万细胞的迁移[45][98]。因此，LRP1 在 PNS 损伤中被当作是施万细胞生理特性中重要活动的调节者。我们用活化的 α2M 处理培养中施万细胞，作为 PNS 损伤中 LRP1 对施万细胞炎性介质表达影响研究的第一步。这种 LRP1 配体在未受伤的外周神经中表达水平低但是在损伤神经组织中表达水平高[99]。通过表达阵列途径然后验证实验，我们发现，当施万细胞经过活化的 α2M 处理后 CCL2 的表达水平升高。LRP1 介导的免疫反应使施万细胞有别于巨噬细胞，表明施万细胞 LRP1 可能与神经损伤后巨噬细胞募集的早期信号传导有关。有意义的是，在这个体外实验研究中，经过活化 α2M 刺激的后肿瘤坏死因子 α 和 CCL3 的表达量减少，意味着施万细胞 LRP1 的活性更准确地是以调节受损神经的炎症反应为特征，而不仅仅是简单的促进炎症。

中国知网 https://www.cnki.net

当在髓磷脂 P0 启动子的控制下诱导 Cre 重组酶切除 LoxP 位点的 LRP1 基因，使施万细胞中 LRP1 敲除后，施万细胞中 LRP1 作为炎症、组织损伤和受损周围神经修复的强有力调控活性出现[97]。形成髓鞘以及不形成髓鞘的施万细胞都表达 PO。在神经受损后，施万细胞缺乏 LRP1 的小鼠迅速表现出神经大幅度退化，广泛神经水肿，髓磷脂的丢失和炎性细胞浸润增加。神经损伤恶化的组织学表现伴随着功能损伤。施万细胞缺乏 LRP1 的小鼠持续表现为运动和感觉神经功能的丧失。在对照组小鼠中触觉痛在等级上增加，到达一定标准而稳定。神经损伤的早期阶段发生在这一过程中可能的危害是相关的永久性后遗症。施万细胞缺乏 LRP1 的小鼠在组织损伤 20 天后神经修复将大幅减弱[97]。

将施万细胞中 LRP1 基因删除突显了这些细胞在防止慢性神经痛发展和持续中的重要作用。敲除神经中施万细胞的 LRP1，导致其调节损伤修复完全崩溃的作用机制仍然没有完全弄清楚。我们已经知道在应激环境下 LRP1 缺失的施万细胞存活下来的数量不断减少[86][96][97] ，但是其他过程好像仍在进行。在野生型的神经中，创伤可能使 LRP1 配体 MMP9 的表达升高，高达 100 倍，这个过程很重要，因为它是 PNS 损伤中巨噬细胞的趋化因子。[100] 因此有理由假设 LRP1 的作用是通过清除来自外周神经的 MMP9 从而减弱炎症。LRP1 配体，组织型纤维蛋白溶解酶原激活物，在坐骨神经创伤中起保护性作用[101]。最后，尽管不清楚损伤的周围神经的 LRP1 脱落的范围，当脱落的 LRP1 与施万细胞互相作用时，能抵消掉肿瘤坏死因子 α 和 IL-1β 在局部和脊髓灰质后角的作用，在神经受损后提供一种潜在的强烈的调控神经炎和创伤后慢性神经痛的作用机制[50]。

神经性疼痛是一种复杂的慢性疾病，影响成千上外的患者，而且缺乏有效的治疗方法[102]。我们所列举的多种施万细胞 LRP1 的活性提供了这样一个模式：通过干预受损周围神经中施万细胞的细胞生理能够预防和治疗慢性疼痛。PNS 创伤中 LRP1 信号活化的范围尚不清楚。靶向 LRP1 配体来激活细胞信号来对损伤的神经进行修复[43][45]。这种细胞因子是否促进神经炎症的再生和良性循环，并能预防慢性神经痛目前还处于研究阶段。

总结

LRP1 在细胞信号的帮助下参与胞吞作用和吞噬作用，为细胞提供一种对微环境的独特应对方式。LRP1 功能的的特异性作用因细胞类型，共受体的表达，细胞微环境，甚至受体的种类的不同，而具有特定的规律。在多种病理形式中，LRP1 作为损伤和炎症反应的调节物。不同的组织和病理形式中有着不同的机制。这些机制包括 LRP1 的活动促进自身抗原性损伤损伤产物的清除，以及调节控制细胞因子、趋化因

中国知网 https://www.cnki.net

子和其他炎症介质的表达。在动脉粥样硬化，肿瘤和神经系统损伤中，LRP1 调节炎症细胞的募集，以及很有可能调节炎症细胞的存活和耐受。利用 LRP1 的活性来研发治疗方法是存在很大机会的。但是，在疾病状态下从分子层面去了解该受体和这个基因家族中的其他受体的作用机制仍然存在很多挑战。

中国知网 https://www.cnki.net

参考文献

[1] Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H, Stanley KK: Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO J 1988, 7: 4119-4127

[2] Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS: Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. EMBO J 1990, 9:1769-1776

[3] Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H: Primary amines inhibit recycling of alpha 2M receptors in fibroblasts. Cell 1980, 20: 37-43

[4] Herz J, Kowal RC, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL: Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytosis of monoclonal antibodies in cultured cells and rabbit liver. J Biol Chem 1990, 265:21355-21362

[5] Wu L, Gonias SL: The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. J Cell Biochem 2005, 96: 1021-1033

[6] Willingham MC, Pastan I: The receptosome: an intermediate organelle of receptor mediated endocytosis in cultured fibroblasts. Cell 1980, 21:67-77

[7] Pan W, Kastin AJ, Zankel TC, van Kerkhof P, Terasaki T, Bu G: Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. J Cell Sci 2004, 117:5071-5078

[8] Benchenane K, Berezowski V, Fernandez-Monreal M, Brillault J, Valable S, Dehouck MP, Cecchelli R, Vivien D, Touzani O, Ali C: Oxygen glucose deprivation switches the transport of tPA across the blood-brain barrier from an LRP-dependent to an increased LRPindependent process. Stroke 2005, 36:1065e1070

[9] Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS: Diverse roles for the LDL receptor family. Trends Endocrinol Metab 2002, 13:66-74

[10] Neels JG, van Den Berg BM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H, van Zonneveld AJ: The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptorrelated protein share ligand-binding properties. J Biol Chem 1999, 274:31305-31311

[11] Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G: The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. J Biol Chem 2000, 275:17187-17194

[12] Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B, Herz J: Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. J Biol Chem 1998,

中国知网 https://www.cnki.net

273:33556-33560

[13] Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK: Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP): evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. J Biol Chem 2002, 277:15499-15506

[14] Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS: Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A 1989, 86:5810-5814

[15] Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS: Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J Biol Chem 1990, 265:17401-17404

[16] Arandjelovic S, Hall BD, Gonias SL: Mutation of lysine 1370 in fulllength human alpha2-macroglobulin blocks binding to the low density lipoprotein receptor-related protein-1. Arch Biochem Biophys 2005, 438:29-35

[17] Gettins PG, Dolmer K: A proximal pair of positive charges provides the dominant ligand-binding contribution to complement-like domains from the LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein). Biochem J 2012, 443:65-73

[18] Gaultier A, Wu X, Le Moan N, Takimoto S, Mukandala G, Akassoglou K, Campana WM, Gonias SL: Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. J Cell Sci 2009, 122:1155-1162

[19] Stiles TL, Dickendesher TL, Gaultier A, Fernandez-Castaneda A, Mantuano E, Giger RJ, Gonias SL: LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAG and CNS myelin. J Cell Sci 2013, 126:209-220

[20] Ogden C, deCathelineau A, Hoffmann P, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok V, Henson P: C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. J Exp Med 2001, 194:781-795

[21] Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE, Henson PM: By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. Cell 2003, 115:13-23

中国知网 https://www.cnki.net

[22] Fernandez-Castaneda A, Arandjelovic S, Stiles TL, Schlobach RK, Mowen KA, Gonias SL, Gaultier A: Identification of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 interactome in central nervous system myelin suggests a role in the clearance of necrotic cell debris. J Biol Chem 2013, 288:4538-4548

[23] Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S: Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. Mol Cell 2004, 14: 277-287

[24] Gonias SL, Wu L, Salicioni AM: Low density lipoprotein receptorrelated protein: regulation of the plasma membrane proteome. Thromb Haemost 2004, 91:1056-1064

[25] Gaultier A, Simon G, Niessen S, Dix M, Takimoto S, Cravatt B 3rd, Gonias S: LDL receptor-related protein 1 regulates the abundance of diverse cell-signaling proteins in the plasma membrane proteome. J Proteome Res 2010, 9:6689-6695

[26] Ulery P, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi R, Rebeck G, Hyman B, Strickland D: Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP): evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. J Biol Chem 2000, 275:7410-7415

[27] Pietrzik CU, Yoon IS, Jaeger S, Busse T, Weggen S, Koo E: FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. J Neurosci 2004, 24:4259-4265

[28] May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, Noebels JL, Beffert U, Sweatt JD, Weeber EJ, Herz J: Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. Mol Cell Biol 2004, 24:8872-8883

[29] Gonias SL, Gaultier A, Jo M: Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1). Curr Pharm Des 2011, 17:1962-1969

[30] Warshawsky I, Broze GJ Jr., Schwartz AL: The low density lipoprotein receptor-related protein mediates the cellular degradation of tissue factor pathway inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91: 6664-6668

[31] Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS: 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. J Biol Chem 1991, 266:21232-21238

[32] Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK: CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. Immunity 2001, 14:303-313

[33] Binder RJ, Srivastava PK: Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides.

中国知网 https://www.cnki.net

Proc Natl Acad Sci U S A 2004, 101:6128-6133

[34] Chu CT, Pizzo SV: Receptor-mediated antigen delivery into macrophages: complexing antigen to alpha 2-macroglobulin enhances presentation to T cells. J Immunol 1993, 150:48-58

[35] Capurro MI, Shi W, Filmus J: LRP1 mediates Hedgehog-induced endocytosis of the GPC3-Hedgehog complex. J Cell Sci 2012, 125: 3380-3389

[36] Pi X, Schmitt CE, Xie L, Portbury AL, Wu Y, Lockyer P, Dyer LA, Moser M, Bu G, Flynn EJ 3rd, Jin SW, Patterson C: LRP1-dependent endocytic mechanism governs the signaling output of the bmp system in endothelial cells and in angiogenesis. Circ Res 2012, 111:564-574

[37] Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J: LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. Science 2003, 300:329-332

[38] Newton CS, Loukinova E, Mikhailenko I, Ranganathan S, Gao Y, Haudenschild C, Strickland DK: Platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) activation promotes its association with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP): evidence for co-receptor function. J Biol Chem 2005, 280:27872-27878

[39] Muratoglu SC, Mikhailenko I, Newton C, Migliorini M, Strickland DK: Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway. J Biol Chem 2010, 285:14308-14317

[40] Qiu Z, Hyman BT, Rebeck GW: Apolipoprotein E receptors mediate neurite outgrowth through activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in primary neurons. J Biol Chem 2004, 279: 34948-34956

[41] Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y: Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. J Biol Chem 2006, 281:2120-2127

[42] Hayashi H, Campenot R, Vance D, Vance J: Apolipoprotein E-containing lipoproteins protect neurons from apoptosis via a signaling pathway involving low-density lipoprotein receptor-related protein-1. J Neurosci 2007, 27: 1933-1941

[43] Mantuano E, Mukandala G, Li X, Campana WM, Gonias SL: Molecular dissection of the human alpha2-macroglobulin subunit reveals domains with antagonistic activities in cell signaling. J Biol Chem 2008, 283: 19904 -19911

[44] Martin AM, Kuhlmann C, Trossbach S, Jaeger S, Waldron E, Roebroek A, Luhmann HJ, Laatsch A, Weggen S, Lessmann V, Pietrzik CU: The functional role of the second NPXY motif of the

中国知网 https://www.cnki.net

LRP1 beta-chain in tissue-type plasminogen activator-mediated activation of N-methyl-D-aspartate receptors. J Biol Chem 2008, 283: 12004-12013

[45] Mantuano E, Inoue G, Li X, Takahashi K, Gaultier A, Gonias SL, Campana WM: The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. J Neurosci 2008, 28:11571-11582

[46] Bacskai B, Xia M, Strickland D, Rebeck G, Hyman B: The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via Nmethyl- D-aspartate receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 2000, 97: 11551- 11556

[47] Shi Y, Mantuano E, Inoue G, Campana W, Gonias S: Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinasedependent pathway. Sci Signal 2009, 2: ra18

[48] May P, Reddy YK, Herz J: Proteolytic processing of low density lipoprotein receptor-related protein mediates regulated release of its intracellular domain. J Biol Chem 2002, 277:18736-18743

[49] Zurhove K, Nakajima C, Herz J, Bock HH, May P: Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. Sci Signal 2008, 1: ra15

[50] Gaultier A, Arandjelovic S, Li X, Janes J, Dragojlovic N, Zhou GP, Dolkas J, Myers RR, Gonias SL, Campana WM: A shed form of LDL receptor-related protein-1 regulates peripheral nerve injury and neuropathic pain in rodents. J Clin Invest 2008, 118:161-172

[51] Gorovoy M, Gaultier A, Campana WM, Firestein GS, Gonias SL: Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages. J Leukoc Biol 2010, 88:769-778

[52] Herz J, Couthier DE, Hammer RE: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. Cell 1992, 71:411-421

[53] Hajjar DP, Pomerantz KB: Signal transduction in atherosclerosis: integration of cytokines and the eicosanoid network. FASEB J 1992, 6:2933-2941

[54] Croce K, Libby P: Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. Curr Opin Hematol 2007, 14:55-61

[55] Tuttolomondo A, Di Raimondo D, Pecoraro R, Arnao V, Pinto A, Licata G: Atherosclerosis as an inflammatory disease. Curr Pharm Des 2012, 18:4266-4288

[56] Stouffer GA, LaMarre J, Gonias SL, Owens GK: Activated alpha 2- macroglobulin and transforming growth factor-beta 1 induce a synergistic smooth muscle cell proliferative response. J Biol Chem 1993, 268:18340-18344

中国知网 https://www.cnki.net

[57] Hu L, Boesten LS, May P, Herz J, Bovenschen N, Huisman MV, Berbee JF, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Tamsma JT: Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006, 26:2710-2715

[58] Overton C, Yancey P, Major A, Linton M, Fazio S: Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. Circ Res 2007, 100:670-677

[59] Yancey PG, Ding Y, Fan D, Blakemore JL, Zhang Y, Ding L, Zhang J, Linton MF, Fazio S: Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. Circulation 2011, 124:454-464

[60] Muratoglu SC, Belgrave S, Lillis AP, Migliorini M, Robinson S, Smith E, Zhang L, Strickland DK: Macrophage LRP1 suppresses neo-intima formation during vascular remodeling by modulating the TGF-beta signaling pathway. PLoS One 2011, 6: e28846

[61] Gaultier A, Arandjelovic S, Niessen S, Overton CD, Linton MF, Fazio S, Campana WM, Cravatt BF 3rd, Gonias SL: Regulation of tumor necrosis factor receptor-1 and the IKK-NF-kappaB pathway by LDL receptor-related protein explains the antiinflammatory activity of this receptor. Blood 2008, 111:5316-5325

[62] Yancey PG, Blakemore J, Ding L, Fan D, Overton CD, Zhang Y, Linton MF, Fazio S: Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010, 30:787-795

[63] Hussaini IM, Srikumar K, Quesenberry PJ, Gonias SL: Colonystimulating factor-1 modulates alpha 2-macroglobulin receptor expression in murine bone marrow macrophages. J Biol Chem 1990, 265:19441-19446

[64] LaMarre J, Wolf BB, Kittler EL, Quesenberry PJ, Gonias SL: Regulation of macrophage alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein by lipopolysaccharide and interferon-gamma. J Clin Invest 1993, 91:1219-1224

[65] Ceschin DG, Sanchez MC, Chiabrando GA: Insulin induces the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) degradation by the proteasomal system in J774 macrophage-derived cells. J Cell Biochem 2009, 106:372-380

[66] Nilsson A, Vesterlund L, Oldenborg PA: Macrophage expression of LRP1, a receptor for apoptotic cells and unopsonized erythrocytes, can be regulated by glucocorticoids. Biochem Biophys Res Commun 2012, 417:1304-1309

中国知网 https://www.cnki.net

[67] Costales P, Castellano J, Revuelta-Lopez E, Cal R, Aledo R, Llampayas O, Nasarre L, Juarez C, Badimon L, Llorente-Cortes V: Lipopolysaccharide downregulates CD91/low-density lipoprotein receptor-related protein 1 expression through SREBP-1 overexpression in human macrophages. Atherosclerosis 2013, 227:79-88

[68] Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J: Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. Science 1994, 264:1471-1474

[69] Espirito Santo SM, Pires NM, Boesten LS, Gerritsen G, Bovenschen N, van Dijk KW, Jukema JW, Princen HM, Bensadoun A, Li WP, Herz J, Havekes LM, van Vlijmen BJ: Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. Blood 2004, 103:3777-3782

[70] Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H: Demonstration of an alpha2-macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumorderived cell lines. J Biol Chem 1979, 254:5155-5160

[71] Gonias SL, LaMarre J, Crookston KP, Webb DJ, Wolf BB, Lopes MB, Moses HL, Hayes MA: Alpha 2-macroglobulin and the alpha 2-macroglobulin receptor/LRP: a growth regulatory axis. Ann N Y Acad Sci 1994, 737:273-290

[72] Li Y, Wood N, Parsons PG, Yellowlees D, Donnelly PK: Expression of alpha2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptorrelated protein on surfaces of tumour cells: a study using flow cytometry. Cancer Lett 1997, 111:199-205

[73] Montel V, Gaultier A, Lester RD, Campana WM, Gonias SL: The lowdensity lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. Cancer Res 2007, 67:9817-9824

[74] McGarvey T, Hussain MM, Stearns ME: In situ hybridization studies of alpha 2-macroglobulin receptor and receptor-associated protein in human prostate carcinoma. Prostate 1996, 28:311-317

[75] Huang XY, Shi GM, Devbhandari RP, Ke AW, Wang Y, Wang XY, Wang Z, Shi YH, Xiao YS, Ding ZB, Dai Z, Xu Y, Jia WP, Tang ZY, Fan J, Zhou J: Low level of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 predicts an unfavorable prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. PLoS One 2012, 7: e32775

[76] Webb D, Nguyen D, Gonias S: Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. J Cell Sci 2000, 113:123-134

[77] Amos S, Mut M, diPierro CG, Carpenter JE, Xiao A, Kohutek ZA, Redpath GT, Zhao Y, Wang J, Shaffrey ME, Hussaini IM: Protein kinase C-alpha-mediated regulation of low-density lipoprotein

中国知网 https://www.cnki.net

receptor related protein and urokinase increases astrocytoma invasion. Cancer Res 2007, 67:10241-10251

[78] Fayard B, Bianchi F, Dey J, Moreno E, Djaffer S, Hynes NE, Monard D: The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. Cancer Res 2009, 69:5690-5698

[79] Gopal U, Bohonowych JE, Lema-Tome C, Liu A, Garrett-Mayer E, Wang B, Isaacs JS: A novel extracellular Hsp90 mediated co-receptor function for LRP1 regulates EphA2 dependent glioblastoma cell invasion. PLoS One 2011, 6: e17649

[80] Chen S, Bu G, Takei Y, Sakamoto K, Ikematsu S, Muramatsu T, Kadomatsu K: Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. J Cell Sci 2007, 120:4009-4015

[81] Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G: Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. Cancer Res 2009, 69:879-886

[82] Pencheva N, Tran H, Buss C, Huh D, Drobnjak M, Busam K, Tavazoie SF: Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. Cell 2012, 151:1068-1082

[83] Qian BZ, Pollard JW: Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell 2010, 141:39e51

[84] Staudt ND, Jo M, Hu J, Bristow JM, Pizzo DP, Gaultier A, Vandenberg SR, Gonias SL: Myeloid cell receptor LRP1/CD91 regulates monocyte recruitment and angiogenesis in tumors. Cancer Res 2013, 73:3902-3912

[85] Wolf BB, Lopes MB, VandenBerg SR, Gonias SL: Characterization and immunohistochemical localization of alpha 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. Am J Pathol 1992, 141:37-42

[86] Campana WM, Li X, Dragojlovic N, Janes J, Gaultier A, Gonias SL: The low-density lipoprotein receptor-related protein is a pro-survival receptor in Schwann cells: possible implications in peripheral nerve injury. J Neurosci 2006, 26:11197-11207

[87] Lopes MB, Bogaev CA, Gonias SL, VandenBerg SR: Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptorrelated protein is increased in reactive and neoplastic glial cells. FEBS Lett 1994, 338:301-305

[88] Barnett MH, Prineas JW: Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly

中国知网 https://www.cnki.net

forming lesion. Ann Neurol 2004, 55: 458-468

[89] Hendrickx DA, Koning N, Schuurman KG, van Strien ME, van Eden CG, Hamann J, Huitinga I: Selective upregulation of scavenger receptors in and around demyelinating areas in multiple sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 2013, 72:106-118

[90] Holtzman DM, Herz J, Bu G: Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. Cold Spring Harb Perspect Med 2012, 2: a006312

[91] Kim J, Basak JM, Holtzman DM: The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. Neuron 2009, 63:287-303

[92] Seki DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature 1999,399: A23-A31

[93] Jeager LB, Dohgu S, Sultana R, et al. Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. Brain Behav Immun 2009; 23: 507-517

[94] Benfey M, Aguayo AJ: Extensive elongation of axons from rat brain into peripheral nerve grafts. Nature 1982, 296:150-152

[95] Chen Z, Yu W, Strickland S: Peripheral regeneration. Annu Rev Neurosci 2007, 30:209-233

[96] Mantuano E, Henry K, Yamauchi T, Hiramatsu N, Yamauchi K, Orita S, Takahashi K, Lin JH, Gonias SL, Campana WM: The unfolded protein response is a major mechanism by which LRP1 regulates Schwann cell survival after injury. J Neurosci 2011, 31:13376-13385

[97] Orita S, Henry K, Mantuano E, Yamauchi K, De Corato A, Ishikawa T, Feltri ML, Wrabetz L, Gaultier A, Pollack M, Ellisman M, Takahashi K, Gonias SL, Campana WM: Schwann cell LRP1 regulates remak bundle ultrastructure and axonal interactions to prevent neuropathic pain. J Neurosci 2013, 33:5590-5602

[98] Mantuano E, Jo M, Gonias S, Campana W: Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) regulates Rac1 and RhoA reciprocally to control Schwann cell adhesion and migration. J Biol Chem 2010, 285:14259-14266

[99] Shi Y, Yamauchi T, Gaultier A, Takimoto S, Campana WM, Gonias SL: Regulation of cytokine expression by Schwann cells in response to alpha2-macroglobulin binding to LRP1. J Neurosci Res 2011, 89:544-551

[100] Shubayev VI, Angert M, Dolkas J, Campana WM, Palenscar K, Myers RR: TNFalpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. Mol Cell Neurosci 2006, 31:407-415

中国知网 https://www.cnki.net

[101] Akassoglou K, Kombrinck K, Degen J, Strickland S: Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury. J Cell Biol 2000, 149:1157-1166

[102] Toth C, Lander J, Wiebe S: The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. Pain Med 2009, 10:918-929

中国知网 https://www.cnki.net

攻读学位期间发表论文

1.钱琤，司宇（共同第一作者），徐桂霞等，原发性免疫性血小板减少症患者外周血 IL-23p19 基因表达及意义，中国实验诊断学，2016,20（7），1068-1071.

2.司宇，孙懿，邓安梅，临床检验诊断学专业学位研究生质量评价体系的构建研究，检验医学与临床，2016,13（增刊 II），346-347.

3.李腾达，司宇（共同第一作者），刘鹏等，Gas6 在原发性血小板减少性紫癜患者表达增高及临床意义，现代检验医学杂志（已录用）

中国知网 https://www.cnki.net

致　谢

时光冉冉，岁月如梭，转眼间三年的硕士研究生生活已经接近了尾声。仿佛是昨日才刚刚步入长海医院，对硕士研究生生涯才刚刚开始期待，现如今已面临毕业，不禁心生许多感慨。回想这三年学习工作时光，我的每一份进步，每一滴汗水都离不开老师、同学、朋友和家人给予我的关心和帮助。

首先，要衷心感谢我的恩师邓安梅教授。我是如此幸运，能够在求学之路上遇到这么好的导师。毕业课题顺利完成的每一个环节都离不开恩师的悉心指导和关心。在学习过程中，我对科研的见解和想法都非常稚嫩，是恩师国际化的学术视野，精湛的学术造诣，对科研事业始终保持着热烈而执着的精神，使我产生了很大的触动，让我在科研探索以及解决问题等方面有了质的改变。在我懈怠、气馁时，及时对我进行批评指正，虽然很严厉，但都是在为我着急为我考虑，从来不抛弃不放弃！在生活当中，恩师积极向上的生活态度，平易近人的生活作风，深深的感染着我，让我逐渐学会如何乐观面对生活，克服生活中的种种困难，让自己成长了很多。同时，恩师对于我未来的进一步发展，给予了极大的帮助，借此机会向导师表示我最诚挚的的谢意！

还要感谢钱琤老师，在我做毕业设计的每个阶段，从选题到查阅资料，论文提纲的确定，论文的书写和修改等各个环节中给予我的悉心指导，时刻帮我掌握课题的大方向，让我少走了很多弯路，经常牺牲个人时间来帮助我，使得毕业课题顺利完成。

同时还要感谢长海医院检验科秦琴老师、孙懿老师、陈园园老师等，在我课题设计和实施中对我的帮助。感谢张蕾师姐、刘鹏师姐、刘挺挺、李腾达、黄韦华、杨静文、胡红丽等伙伴们的陪伴和相互鼓励、相互支持。感谢轮转科室的各位带教老师，让我能够在临床工作中从容面对病人，熟悉疾病的诊治过程，缓解我课题压力，并且给予理解和帮助！

感谢我的父母把我抚养成人，给予我的无条件支持和理解，让我能够安心学业和工作。希望父母身体健康，平安快乐！特别要感谢我的老公，在一起走过的这六年里，在我受到挫折时，给予我的包容与鼓励，对我的默默付出，让我不畏惧困难和坎坷，愿意与你牵手走向美好的未来！

中国知网　https://www.cnki.net