

三氧化二砷对急性早幼粒细胞白血病细胞微粒数量及促凝活性的影响 *

赵艳秋^{1#} 张迎媚^{2#} 范圣瑾¹ 赵艳红¹ 李晓霞¹ 张卓¹ 孙丽丽¹

(哈尔滨医科大学附属第一医院 1 血液内科 2 中心实验室 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:观察急性早幼粒细胞白血病(APL)细胞来源微粒(APL-MP)的促凝活性、表面组织因子(TF)表达情况、TF在其促凝活性中发挥的作用及分化治疗药物三氧化二砷(ATO)对上述指标有何影响。方法:选取3例初发APL患者,提取骨髓APL细胞,3名缺铁性贫血患者提取骨髓单个核细胞作为对照。分别用不同浓度ATO处理APL细胞24 h、48 h、72 h,收集细胞培养液提取微粒。采用流式细胞术对微粒进行定量分析并进行微粒表面TF表达情况检测;利用凝血实验比较不同组细胞释放微粒的促凝血活性;应用抗TF抗体抑制微粒促凝血活性实验检测TF在APL-MP的促凝血活性中发挥多大作用。结果:1.0 μ M及2.0 μ M ATO能显著促进APL细胞释放微粒。与正常骨髓来源单个核细胞释放的微粒相比,骨髓APL-MP的TF表达及促凝活性均显著增高,0.5 μ M及1.0 μ M ATO处理可以有效降低APL-MP的TF表达及促凝活性,且这一作用呈时间依赖性。各组APL-MP经抗TF抗体孵育后凝血时间显著延长。结论:APL-MP的TF表达和促凝活性均显著增高,并且TF在APL-MP的促凝血活性中发挥着重要作用。ATO能显著促进APL细胞释放微粒,低浓度ATO可以有效降低APL-MP的TF表达及促凝血活性。

关键词 急性早幼粒细胞白血病;微粒;促凝血活性;组织因子;三氧化二砷

中图分类号:R733.71 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)25-4833-04

The Effect of Arsenic Trioxide on Amount and Procoagulant Activity of Microparticles Released by Acute Promyelocytic Leukemia Cells*

ZHAO Yan-qiu^{1#}, ZHANG Ying-mei^{2#}, FAN Sheng-jin¹, ZHAO Yan-hong¹, LI Xiao-xia¹, ZHANG Zhuo¹, SUN Li-li¹

(1 Department of Hematology; 2 Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of arsenic trioxide (ATO) on number, tissue factor (TF) expression and procoagulant activity of microparticles released by acute promyelocytic leukemia (APL) cells, and to identify how much TF plays a role in procoagulant activity of these microparticles. **Methods:** APL cells were isolated from bone marrow of 3 newly diagnosed APL patients. Bone marrow mononuclear cells were collected from 3 patients with iron deficiency anemia and used as control. APL cells were cultured with medium containing different concentration of ATO for 24 h, 48h or 72h. Microparticles were extracted from the cell culture medium. The number and TF expression of microparticles were measured by flow cytometry. The procoagulant activities of microparticles released by different groups of cells were detected by coagulation assays. How much TF plays a role in the procoagulant activity of APL cells-derived microparticles (APL-MPs) was evaluated by coagulation inhibition assays in which anti-TF antibody was used to suppress TF procoagulant activity. **Results:** 1.0 μ M and 2.0 μ M ATO had a promoting effect on the release of microparticles by APL cells. Compared with bone marrow mononuclear cells-derived microparticles, the bone marrow APL-MPs showed a higher TF expression and procoagulant activity. 0.5 μ M and 1.0 μ M ATO had an inhibitory effect on TF expression and procoagulant activity of APL-MPs in a time-dependent manner. After preincubation with anti-TF antibody, in most groups, the APL-MPs indicated a significantly decreased procoagulant activity (prolonged clotting time). **Conclusion:** Both the TF expression and procoagulant activity of APL-MP were obviously increased, and TF played an important role in the procoagulant activity of these microparticles. ATO could promote the release of microparticles by APL cells. Low concentration of ATO could effectively reduce the TF expression and procoagulant activity of APL-MP.

Key words: Acute promyelocytic leukemia; Microparticle; Procoagulant activity; Tissue factor; Arsenic trioxide

Chinese Library Classification: R733.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4833-04

前言

尽管分化治疗药物的临床应用使得急性早幼粒细胞白血

病(APL)的治疗取得了巨大的成功,早期致死性出血仍是一个无法解决的难题而成为APL诱导治疗失败最主要的原因^[1,2]。目前APL凝血紊乱的发生机制仍不十分清楚,已经明确的是

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D201010)

作者简介:赵艳秋(1980-),女,住院医师,主要研究方向:急性早幼粒细胞白血病的诊治,

联系电话:13946085979, E-mail: zhaoyanqiu1111@163.com

两位作者对本文具有同等贡献

(收稿日期:2012-03-04 接受日期:2012-03-30)

APL 细胞含有大量组织因子(TF)和癌性促凝物质,可以直接触发凝血,是凝血紊乱发生的主要原因。

血浆中的微粒是各种血液细胞及血管内皮细胞受刺激活化或凋亡而释放到血液循环中的直径 0.1~1 μ m 的小泡状膜颗粒,是近十年才被发现并展开研究的一种血浆活性成分。正常人血液中即有少量的微粒存在,而在多种疾病中微粒水平明显升高。研究表明细胞微粒在多种生理和病理过程中起着重要作用,尤其是血液凝固反应与血栓形成的重要参与者。在多种伴有血栓形成倾向的疾病,如某些肿瘤性疾病^[3,4]、心血管疾病^[5,6]和免疫系统疾病中^[7,8],血栓事件发生风险增高与携带有 TF 的微粒增多呈显著正相关,这些携带有 TF 的微粒可以来源于血小板、内皮细胞,也可以来源于肿瘤细胞,其表面促凝血活性显著增高。

本研究以缺铁性贫血患者骨髓单个核细胞为对照,用不同浓度分化治疗药物三氧化二砷(ATO)体外处理骨髓 APL 细胞,观察 APL 细胞来源微粒(APL-MP)的促凝血活性、表面 TF 表达情况、TF 在其促凝活性中发挥的作用等指标的变化情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 初发 APL 患者 3 例,其中男 2 例,女 1 例,年龄分别为 19 岁、44 岁、48 岁;入院时均存在显著的凝血指标异常。患者均符合 FAB 制定的诊断分型标准,并且细胞遗传学及分子生物检查证实存在 t(15;17)染色体易位和 PML/RAR α 融合基因。患者骨髓 APL 细胞均占有核细胞的 95%以上。

另选择年龄、性别与 APL 组匹配的缺铁性贫血患者 3 名,作为正常对照组。

1.1.2 试剂 ATO 购自美国 Sigma 公司。Ficoll-Hypaque 液购自美国 Sigma-Aldrich 公司。RPMI1640 和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。多克隆抗人 TF 抗体及 FITC 标记的抗人 TF 抗体购于美国 Diagnostica 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 乏微粒血浆的制备,细胞的培养及药物处理 正常人乏微粒血浆的制备 取 3.8%枸橼酸钠(体积比 1:9)抗凝外周静脉血,以 500 $\times$ g 离心 10 min,上层为富血小板血浆。小心吸取富血小板血浆层的上 2/3,以 1800 $\times$ g 离心 10 min,上清液为乏血小板血浆。小心吸取上清液的上 2/3,以 18000 $\times$ g 室温超速离心 30 min,吸取上层血浆,即得到乏微粒血浆,20 $^{\circ}$ C 保存一个月内使用。

骨髓单个核细胞的提取、培养及药物处理 取 3.8%枸橼酸钠抗凝的骨髓液 5 mL,利用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法获得单个核细胞,将其悬浮于含有 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中(约 5 $\times$ 10⁵/mL),分别加入 ATO 0.5 μ mol/L、1.0 μ mol/L 和 2.0 μ mol/L,置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱中培养,每 24 h 换液一次。

1.2.2 微粒的提取 分别于 24 h、48 h、72 h 收集细胞培养液 3 mL,500 $\times$ g 离心 15 min 去除细胞及细胞碎片,上清液 18000 $\times$ g 室温离心 30 min,吸去 2.5 mL 上清液, PBS 洗两次(离心方法同前),吸去上清液至管底剩余 0.5 mL 液体,重悬管底微粒即

得到微粒悬浮液。

1.2.3 微粒的流式细胞仪定量分析 流式细胞仪检测相关溶液事先用 0.2 μ m 的滤器过滤。

Annexin V-FITC 标记微粒:取 100 μ L 微粒悬浮液,加入 400 μ L Annexin V-Binding Buffer,加入 25 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀,室温避光反应 30 min,加入 500 μ L Annexin V-Binding Buffer 稀释,加入直径为 1 μ m 的标准微球,流式细胞仪(BD FACSCalibur)检测分析。

流式细胞仪定量微粒的方法^[9]:前向散射光(FSC)和侧向散射光(SSC)设为对数放大模式。样本采集时间为 3 min,样品流速为 60 μ L/min。微粒的直径为 0.1~1 μ m,参照标准微球确定微粒在 FSC/SSC 散点图中的获取位置。只有直径 $\leq$ 1 μ m 且 Annexin V 标记阳性的粒子被认为是微粒。

1.2.4 微粒表面 TF 表达的流式细胞仪定量分析 取 100 μ L 微粒悬浮液,加入 1 mL 含 1% BSA 的 PBS,室温封闭 1 h。离心并吸弃 1 mL 上清液,余 100 μ L 液体。重悬微粒,加入 20 μ L FITC 标记的抗人 TF 抗体,室温避光孵育 30 min, PBS 洗 1 次,对洗涤后的 100 μ L 微粒悬浮液中的微粒进行 Annexin V-FITC 标记(标记方法同前),流式细胞仪(BD FACSAria)检测。

1.2.5 微粒促凝活性检测 根据计数结果,在血凝仪测试杯中,将 200 $\times$ 10³ 个微粒悬浮于 100 μ L PBS 中,加入 100 μ L 正常人乏微粒血浆,37 $^{\circ}$ C 孵育 180 s 后,加入 37 $^{\circ}$ C 预热的 25 mmol/L 的 CaCl₂ 100 μ L,在血凝仪(TS 4000)上记录血凝时间。

1.2.6 抗 TF 抗体抑制微粒促凝活性实验 100 μ L 微粒悬浮液与 100 μ L 多克隆抗人 TF 抗体混合,25 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟, PBS 洗 1 次,然后重复上述微粒促凝活性检测步骤。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。结果用均数 $\pm$ 标准差表示,单纯两组间均数比较采用 Student-t 检验;多组间均数比较采用 ANOVA 方差分析,各药物处理组与未用药组间均数的多重比较采用 Dunnett-t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 ATO 对 APL-MP 数量的影响的流式细胞仪检测

结果可见未予药物处理的 APL 细胞在 0-24 h、24-48 h、48-72 h 时间段内释放的微粒数与正常骨髓来源单个核细胞释放的微粒数量相当(Student-t 检验)。不同浓度 ATO 对 APL 细胞释放的微粒数量有影响(ANOVA 方差分析,各时间段的 4 个 APL 细胞组均有 P<0.05)。1.0 μ M 及 2.0 μ M ATO 能显著促进 APL 细胞释放微粒,并且这一作用呈剂量及时间依赖性,0.5 μ M ATO 对 APL 细胞释放微粒的促进作用则不明显(Dunnett-t 检验,* P<0.05,** P<0.01,图 1)。

2.2 不同浓度 ATO 对 APL-MP 表面 TF 表达情况影响的流式细胞仪检测

正常骨髓单个核细胞释放的微粒 TF 阳性率较低,在各时间段均不超过 15%(图 2A 示 48-72h 时间段内为 8%),而骨髓 APL-MP 的 TF 阳性率则显著增高(Student-t 检验,与各对应时间段相比,均有 P<0.01)。不同浓度 ATO 对 APL 细胞释放的微粒 TF 阳性率有影响(ANOVA 方差分析,各时间段的 4 个 APL 细胞组均有 P<0.05)。各药物处理组与单纯 APL 细胞培养

组相比较, 0.5 μM ATO 处理 24-48h、48-72h(图 2B 示此组微粒 TF 阳性率约为 40%) 时间段及 1.0 μM ATO 处理 48-72h 时间段内释放的微粒 TF 阳性率显著减少 (Dunnett-t 检验, * $P<0.05$, ** $P<0.01$) 而 2.0 μM ATO 处理对 APL-MP 的 TF 阳性率无显著影响(图 2C 示 2.0 μM ATO 处理 48-72h APL-MP 的 TF 阳性率仍近 80%)。

2.3 不同浓度 ATO 对 APL-MP 的促凝活性影响的检测

结果显示骨髓 APL 细胞培养后与正常骨髓来源单个核细胞相比, 各时间段释放的微粒的促凝活性均显著增高(表现为凝血时间缩短, Student-t 检验, $P<0.05$)。不同浓度 ATO 处理对骨髓 APL-MP 的促凝活性有影响(ANOVA 方差分析, 各时间段的 4 个 APL 细胞组均有 $P<0.05$) 其中 0.5 μM ATO 处理 48h、72h 组及 1.0 μM ATO 处理 48h、72h 组与单纯 APL 细胞培养组相应时间段相比, 细胞释放的微粒的促凝活性显著降低(表现为凝血时间延长, Dunnett-t 检验, * $P<0.05$) 而 2.0 μM ATO 处理对 APL-MP 的促凝活性无显著影响(图 3)。

2.4 抗 TF 抗体抑制微粒促凝活性实验

结果显示 (图 4), 除了 0.5 μM 及 1.0 μM ATO 处理 72h 组, 其他各组 APL-MP 经抗 TF 抗体孵育后凝血时间显著延长

(Student-t 检验, * $P<0.05$), 表明在这些实验组中 TF 在 APL-MP 的促凝血活性中发挥着重要作用。

3 讨论

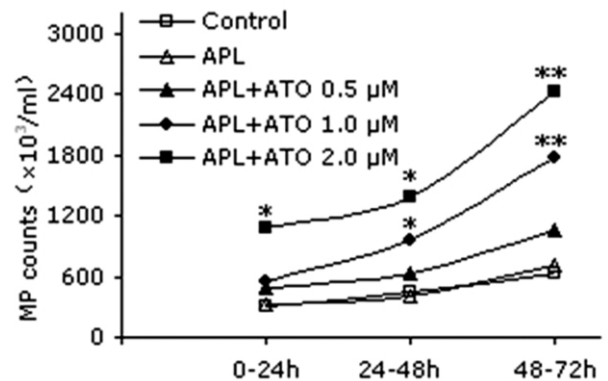


图 1 原代急性早幼粒细胞白血病细胞经不同浓度亚砷酸处理一定时间后释放微粒的数量的流式细胞仪检测结果(n=3)

Fig. 1 APL cells were treated with different concentration of ATO for indicated periods and the number of APL cells-derived microparticles were measured by flow cytometry (n=3)

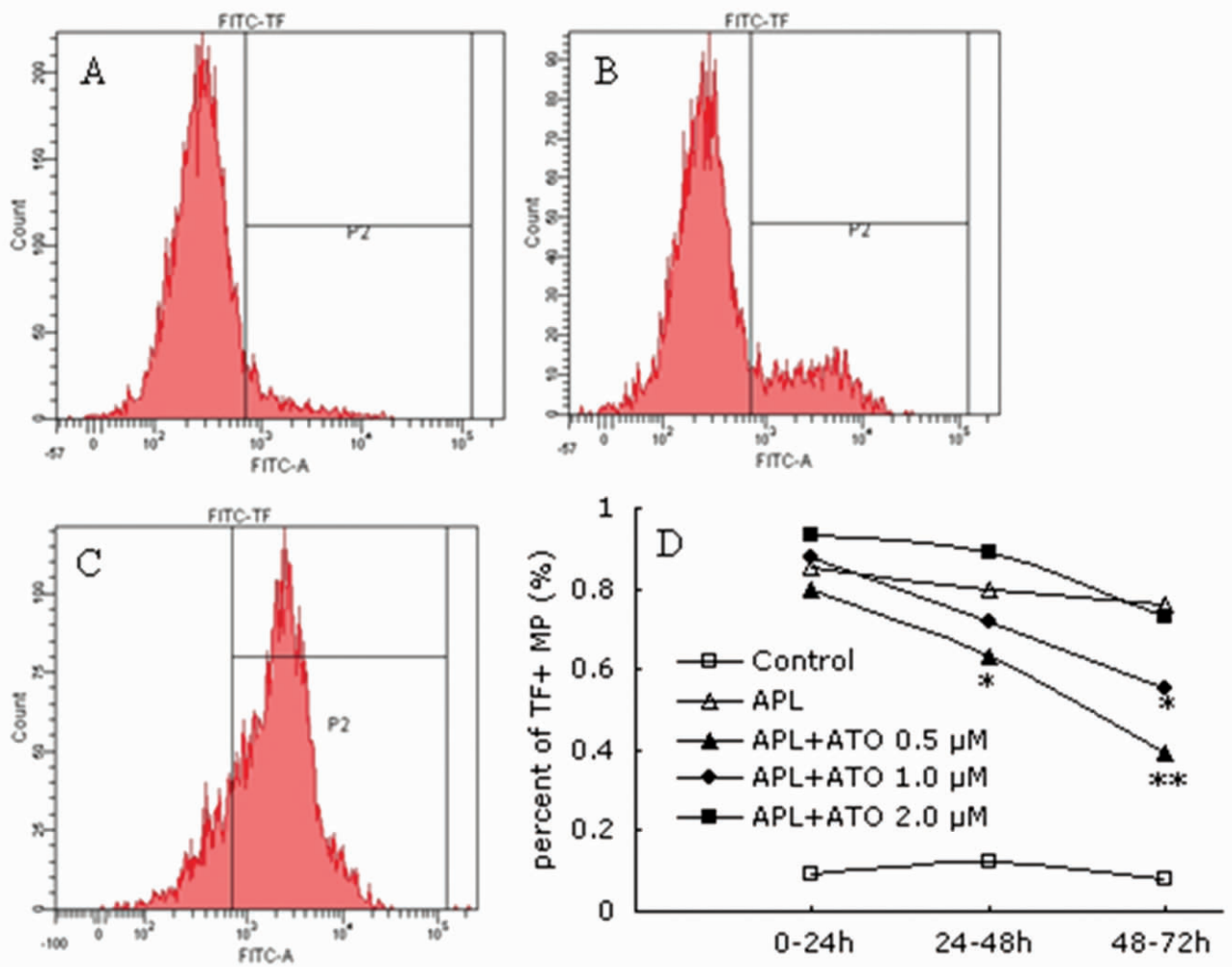


图 2 原代急性早幼粒细胞白血病细胞经不同浓度亚砷酸处理一定时间后释放微粒表面组织因子表达情况的流式细胞仪检测结果(n=3)

Fig. 2 APL cells were treated with different concentration of ATO for indicated periods and the TF expression of APL cells-derived microparticles were measured by flow cytometry (n=3)

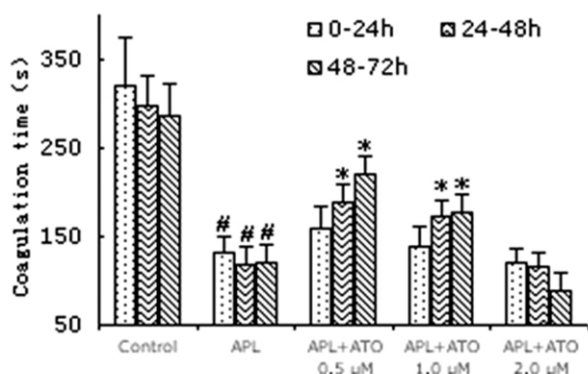


图3 原代急性早幼粒细胞白血病细胞经不同浓度亚砷酸处理一定时间后释放的微粒促凝活性检测结果(n=3)

Fig. 3 APL cells were treated with different concentration of ATO for indicated periods and the procoagulant activities of APL cells-derived microparticles were detected by coagulation assays (n=3)

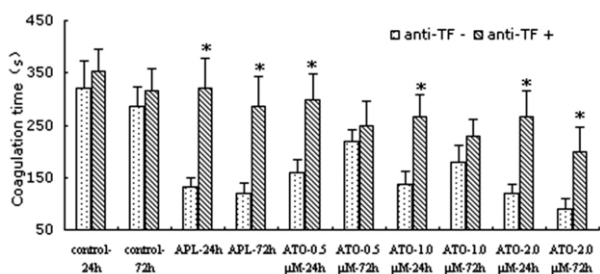


图4 原代急性早幼粒细胞白血病细胞经不同浓度亚砷酸处理一定时间后抗组织因子抗体抑制微粒促凝活性实验检测结果(n=3)

Fig. 4 APL cells were treated with different concentration of ATO for indicated periods and how much TF plays a role in the procoagulant activities of APL cells-derived microparticles were evaluated by coagulation inhibition assays in which anti-TF antibody was used to suppress TF procoagulant activity (n=3)

正常情况下在特定酶的作用下细胞膜中磷脂的分布呈不对称性,磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)主要位于细胞膜内层。当细胞受到促凝、促炎症刺激或发生凋亡时,这些酶的活性发生改变,使细胞膜磷脂重新分布,PS移位到胞膜外层。这一移位引起胞膜外层张力增加,并高于内层张力,使细胞膜以出芽方式形成小泡状结构并最终发生脱落,即形成所谓的微粒。微粒的这一形成过程造成PS在微粒表面大量外露^[10]。

研究发现微粒都携带有其来源细胞的一些基本物质,如一些特殊蛋白等,因此微粒不只是简单的细胞脱落物,而是携带有多种重要的生物学活性分子的“载体”^[11,12]。血液中微粒表现出多种生物学活性,如促进凝血反应和血栓形成^[5,13]、促进炎症反应^[14,15]、调节血管张力^[16,17]和促进血管生成等^[18,9]。

尽管微粒在许多凝血功能障碍性疾病中的促凝作用已得到较为广泛的研究,其在APL凝血紊乱中的作用还鲜有报道。APL细胞含有大量TF,是造成APL凝血紊乱发生的主要原因,那么,APL-MP的促凝活性、表面TF表达情况、TF在其促凝活性中发挥的作用及分化治疗药物ATO对上述指标的影响又是怎样的呢?

本研究首先采用流式细胞术对微粒进行相关指标的检测。由于微粒是亚微米级颗粒,直径只有0.1~1μm,本研究采取了

多重措施以增加微粒检测的特异性。①相关溶液事先用0.2μm的滤器过滤以减少噪音信号的干扰。②利用PS在微粒表面大量外露的特点,流式细胞仪检测前微粒用PS特异结合蛋白Annexin V-FITC进行标记以区分电子噪音和微粒。③加入直径1μm的标准微球协助确定微粒在FSC/SSC散点图中的获取位置。

本研究首先通过流式细胞术对微粒进行定量分析,发现ATO能显著促进APL细胞释放微粒,并且这一作用呈剂量及时间依赖性。这可能与ATO促进APL细胞凋亡的作用具剂量及时间依赖性有关^[20]——凋亡是微粒形成的主要诱发因素之一。

本研究进一步利用流式细胞术和凝血实验对APL-MP的TF表达情况和促凝活性进行了检测,发现与正常骨髓来源单个核细胞释放的微粒相比,APL-MP的TF表达和促凝血活性均显著增高,低浓度(0.5μM-1.0μM)ATO可以有效降低APL-MP的TF表达及促凝血活性,并且这一作用呈时间依赖性,而高浓度(2.0μM)ATO此作用不明显。

尽管ATO治疗可能会导致APL-MP数量增加,但是一方面ATO可以有效降低APL-MP的TF表达及促凝血活性,另一方面,在人体内存在着强大的微粒清除系统(单核巨噬细胞系统和内皮细胞),可以部分地清除过多的APL-MP,最终的结果是使APL凝血紊乱得以逐渐改善。综合ATO处理对APL-MP数量及促凝活性的影响的实验结果,尤其是ATO降低APL-MP促凝血活性的时间依赖性,可以解释尽管ATO诱导治疗可以有效改善APL凝血异常,但却无法减少早期致死性出血的发生这一现象。

进一步的抗TF抗体抑制微粒促凝血活性实验证实TF在APL-MP的促凝血活性中发挥重要作用。在该实验中一个现象是低浓度ATO处理72h组抗TF抗体并未显著抑制APL-MP的促凝血活性,可能的解释是此时微粒表面TF的表达已明显减少,在微粒的促凝血活性中已不再发挥主要作用,同时也说明尚其他的促凝因素发挥作用使此时的APL-MP的促凝血活性仍高于正常对照组(正常骨髓来源单个核细胞释放的微粒)。

总之,本研究通过体外实验证实APL-MP的TF表达和促凝活性均显著增高,并且TF在APL-MP的促凝血活性中发挥着重要作用。ATO能显著促进APL细胞释放微粒,并且这一作用呈剂量及时间依赖性。低浓度ATO可以有效降低APL-MP的TF表达及促凝活性,此作用同样表现出时间依赖性。

参考文献(References)

- [1] De la Serna J, Montesinos P, Vellenga E, et al. Causes and Prognostic Factors of Remission Induction Failure in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia Treated with All-Trans Retinoic Acid and Idarubicin [J]. Blood, 2008, 111(7): 3395-3402
- [2] Já como RH, Melo RA, Souto FR, et al. Clinical features and outcomes of 134 Brazilians with acute promyelocytic leukemia who received ATRA and anthracyclines [J]. Haematologica, 2007, 92(10): 1431-1432
- [3] Hron G, Kollars M, Weber H, et al. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer [J]. Thromb Haemost, 2007, 97(1): 119-123

(下转第4980页)

- [22] O'Connor T, Sadleir KR, Maus E, et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis [J]. *Neuron*, 2008, 60(6): 988-1009
- [23] O'Carroll D, Mecklenbrauker I, Das PP, et al. A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(16): 1999-2004
- [24] Boissonneault V, Plante I, Rivest S, et al. MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (4): 1971-1981
- [25] Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, et al. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase [J]. *Nat Med*, 2008, 14(7): 723-730
- [26] Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, et al. The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 [J]. *J Neurosci*, 2008, 28 (5): 1213-1223
- [27] Schonrock N, Ke YD, Humphreys D, et al. Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta [J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): 11070
- [28] Schonrock N, Humphreys DT, Preiss T, et al. Target Gene Repression Mediated by miRNAs miR-181c and miR-9 Both of Which Are Down-regulated by Amyloid- β [J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 46 (2): 324-335
- [29] Cogswell JP, Ward J, Taylor IA, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways [J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 14(1): 27-41
- [30] Liu L, Drouet V, Wu JW, et al. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31302

(上接第 4836 页)

- [4] Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, et al. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 5(3): 520-527
- [5] Biró E, Sturk-Maquin KN, Vogel GM, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(12): 2561-2568
- [6] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2000, 101(8): 841-843
- [7] Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state [J]. *Thromb Haemost*, 2006, 95(1): 94-99
- [8] Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, et al. Elevated endothelial microparticles in thrombotic thrombocytopenic purpura: findings from brain and renal microvascular cell culture and patients with active disease [J]. *Br J Haematol*, 2001, 112(1): 81-90
- [9] Lechner D, Kollars M, Gleiss A, et al. Chemotherapy-induced thrombin generation via procoagulant endothelial microparticles is independent of tissue factor activity [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5 (12): 2445-2452
- [10] Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers [J]. *Transfus Med Rev*, 2006, 20(1):1-26
- [11] Banfi C, Brioschi M, Wait R, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles [J]. *Proteomics*, 2005, 5 (17): 4443-4455
- [12] Rubin O, Crettaz D, Tissot JD, et al. Pre-analytical and methodological challenges in red blood cell microparticle proteomics [J]. *Talanta*, 2010, 82(1): 1-8
- [13] Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, et al. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85(4): 639-646
- [14] Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, et al. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP21 and endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2001, 158(2): 277-287
- [15] Distler J HW, Jungel A, Huber LC, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(8): 2892-2897
- [16] Pfister SL. Role of platelet microparticles in the production of thromboxane by rabbit pulmonary artery [J]. *Hypertension*, 2004, 43 (2): 428-433
- [17] Martin S, Tesse A, Hugel B, et al. Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression [J]. *Circulation*, 2004, 109(13): 1653-1659
- [18] Kim HK, Song KS, Chung JH, et al. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro [J]. *Br J Haematol*, 2004, 124(3): 376-384
- [19] Kim HK, Song KS, Park YS, et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor [J]. *Eur J Cancer*, 2003, 39(2): 184-191
- [20] Chen GQ, Shi XG, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells [J]. *Blood*, 1997, 89(9): 3345-3353