· 论著 ·

Syk 对 CD36 抗体介导血小板减少的调控作用分析

任慧[1] 陈大伟[1] 罗亚林[1] 夏文杰[1] 叶欣[1] 何坚森[1] 许耀日[1] 徐秀章[1] 付涌水[1,2]

(1. 广州血液中心 广州医科大学输血与血液病研究所 广州市血液安全重点实验室,广东 广州 510095;
2. 广州市第一人民医院 广东省精准输血工程技术研究中心,广东 广州 510180)

摘要:目的 探讨脾酪氨酸激酶(Syk)在 CD36 抗体诱导吞噬中的作用。**方法** 将不同浓度的 2 种 CD36 单克隆抗体 GZ1(IgG2a 型)、GZ4(IgG1 型)与 CD36 阳性献血者的血小板共孵育,用流式细胞术检测抗体与血小板的亲和力;利用 Red-SE 荧光染料标记 CD36 阳性献血者的血小板,将 GZ1、GZ4 2 种抗体与染料标记后的血小板共同加入到献血者外周血中进行吞噬实验,并通过免疫印迹(WB)法检测相关蛋白脾酪氨酸激酶(Syk),P-Syk,P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38 MAPK)以及 P-P38 的表达情况;体外吞噬抑制实验预先将 Fcγ 受体(FcγR)抗体或 Syk 抑制剂(R406)与单核细胞共孵育,随后进行吞噬实验。动物体内实验采用雌性 C57BL/6J 小鼠,先经腹腔注射 R406,再通过尾静脉输注 GZ1 或 GZ4;同时设置先输注抗体、后给予 R406 的处理,用血常规分析仪检测小鼠体内血小板计数,流式细胞术检测 CD36 抗体与血小板的结合率。**结果** GZ1 与 CD36 阳性血小板的亲和力高于 GZ4。GZ1 引起的单核细胞吞噬作用显著高于 GZ4 [(42.12±2.25)% *vs* (16.25±6.45)%, $P<0.001$],并且 GZ1 介导的血小板吞噬主要依赖单核细胞 FcγRⅠ而 GZ4 主要依赖单核细胞 FcγRⅡ。WB 结果显示,GZ1 可显著上调单核细胞 Syk 及 P-Syk 的表达,并且可引起下游 P38 MAPK 信号通路的磷酸化。加入 R406 预处理单核细胞后可抑制单核细胞对抗体致敏血小板的吞噬作用。GZ1 或 GZ4 通过尾静脉注入 C57BL/6 雌性小鼠体内后,GZ1 与小鼠血小板结合率较强并引起较显著的血小板计数降低;预先将 R406 注入小鼠体内后血小板计数降低有所缓解,抗体与血小板的结合率明显降低;若于抗体输注后使用 R406 进行治疗,则无法阻止小鼠血小板计数降低。**结论** Syk 在单核细胞吞噬 CD36 抗体致敏的血小板中发挥重要作用,并与 P38 MAPK 信号通路的激活密切相关。

关键词:CD36;血小板减少症;抗体依赖性细胞吞噬作用 (ADCP);Fc 依赖性吞噬作用;脾酪氨酸激酶 (Syk)

中图分类号:R457.1 R331.1+43 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2026)6-0711-07

DOI:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2026.06.002

Analysis of the regulatory effect of Syk on CD36 antibody-mediated thrombocytopenia

REN Hui[1], *CHEN Dawei*[1], *LUO Yalin*[1], *XIA Wenjie*[1], *YE Xin*[1], *HE Jiansen*[1], *XU Yaori*[1], *XU Xiuzhang*[1], *FU Yongshui*[1,2].

1. *Guangzhou Blood Center, Institute of Blood Transfusion and Hematology-Guangzhou Medical University, The Key Medical Laboratory of Guangzhou, Guangzhou* 510095, *China*; 2. *Guangzhou First People's Hospital, Guangdong Provincial Precision Blood Transfusion Engineering Technology Research Center, Guangzhou* 510180, *China*.

Corresponding author: FU Yongshui, Email: fuyongshui@sina.com

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of Syk in phagocytosis induced by CD36 antibodies. **Methods** In vitro, two CD36 monoclonal antibodies, GZ1 (IgG2a) and GZ4 (IgG1), at different concentrations were co-incubated with platelets from CD36-positive blood donors, and the affinity of the antibodies for platelets was assessed using flow cytometry. CD36 positive platelets from donors were labeled with Red-SE. The GZ1 and GZ4 antibodies were added together with dye-labeled platelets to peripheral blood from blood donors for phagocytosis experiments. The expression of the Spleen Tyrosine Kinase (Syk), P-Syk, P38 MAPK and P-P38 were detected using Western blot(WB). In the in vitro phagocytosis inhibition assay, Fcγ receptor (FcγR) antibodies or Syk inhibitor (R406) were pre-incubated with monocytes prior to performing the phagocytosis experiment. In vivo experiments were performed using female C57BL/6J mice. R406 was administered via intraperitoneal injection, followed by tail vein infusion of GZ1 or GZ4 antibodies. Additionally, a treatment group was set up in which the antibodies were infused first, followed by administration of R406. Changes in platelet counts were analyzed using a blood routine analyzer, and antibody binding to platelets was detected by flow cytometry. **Re-**

基金项目:国家自然科学基金项目(82270237、82470231);广州市科技计划项目(20241A011068、2024A03J0079);广州市市校(院)企联合资助专题(2025A03J3367、2025A03J3369);广州市医学重点学科(2025-2027);广东省基础与应用基础研究基金项目(2025A1515010465)

第一作者简介:任慧(1995-),女,输血技师,Email:renhui1995@126.com;**通信作者:**付涌水,Email:fuyongshui@sina.com

sults GZ1 had higher affinity for CD36positive platelets than GZ4. The phagocytosis rate induced by GZ1 was significantly higher than that of GZ4 [(42.12±2.25)% *vs* (16.25±6.45)%, $P<0.001$]. Moreover, GZ1-mediated platelet phagocytosis mainly depends on FcγR Ⅰ of monocytes, while GZ4-mediated platelet phagocytosis mainly relies on FcγR Ⅱ of monocytes. WB results showed that the GZ1 group significantly upregulated the expression of Syk and phosphorylated Syk (P-Syk), and induced phosphorylation of the downstream P38 MAPK signaling pathway. Pretreatment of monocytes with R406 inhibited the phagocytosis of antibodyopsonized platelets by monocytes. After injecting GZ1 or GZ4 antibodies into C57BL/6 female mice through the tail vein, GZ1 mAbs had a stronger binding rate to the platelets compared with GZ4 mAbs, leading to a significant decrease in platelet count. After pre-injecting R406 into mice, the platelet count reduction in both the GZ1 and GZ4 groups was alleviated, and the binding rate of antibodies to platelets was also significantly reduced. However, administration of R406 after antibody injection failed to prevent the decrease in platelet counts in mice. **Conclusion** This study indicates that Syk plays an important role in the phagocytosis of anti-CD36 opsonized platelets by monocytes/macrophages and is closely associated with the activation of the P38 MAPK signaling pathway.

Key words: CD36; thrombocytopenia; antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP); Fc dependent phagocytosis; spleen tyrosine kinase (Syk)

CD36 是 1 种广泛存在于人血小板、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和上皮细胞的膜糖蛋白[1]。在我国,CD36 缺失的频率在汉族和少数民族之间有很大的差异,广西壮族自治区的壮族人群(3.69%)和贵州省的布依族人群(3.05%)CD36 缺失频率较高[2]。依据血小板与单核细胞表面 CD36 的表达状态,CD36 抗原缺失可分为Ⅰ型与Ⅱ型:Ⅰ型缺失表现为血小板和单核细胞均不表达 CD36,Ⅱ型缺失仅血小板缺失 CD36 表达,单核细胞 CD36 表达正常[3]。目前发现,仅Ⅰ型缺失的人群可通过输血、移植和妊娠等产生 CD36 抗体。而 CD36 抗体与血小板输注无效(platelet transfusion refractoriness, PTR)和胎儿/新生儿同种免疫性血小板减少症(fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia, FNAIT)的发生密切相关,但其发生机制尚不完全清楚[4-5]。脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)作为 Src 家族非受体型酪氨酸激酶,是细胞内重要的信号传导枢纽。Syk 可通过调控下游 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38 MAPK)以及细胞外信号调节激酶(ERK)等丝裂原活化蛋白激酶家族分子,介导胞内信号级联反应,在细胞炎症活化、免疫应答及生物学功能调控中发挥关键介导作用[6]。Syk 在多种生物学功能中起关键作用,包括血小板功能、炎症反应、细胞粘附、先天病原体识别、组织损伤识别、骨代谢和血管发育等[7]。抑制 Syk 激酶活性已成为治疗原发免疫性血小板减少症(immune thrombocytopenia, ITP)的有效方法[8-9]。但 Syk 在 CD36 抗体诱导血小板吞噬中的作用及其机制尚不清楚,迫切需要开展相关研究,明确其相应的功能效应。

1　材料与方法

1.1　试剂与仪器

CD36 阳性人的外周血来自广州血液中心无偿献血者(男性 20 名、女性 20 名);C57BL/6J 小鼠(江苏集萃药康生物科技有限公司,动物号:N000013,约 20 g/只);鼠源 CD36 单克隆抗体(GZ1 和 GZ4)由广州市血液安全重点实验室提供;Red-SE(批号:P36600)、Albumin from human serum (HSA)(批号:A9511)、ECL 发光液(批号:34577)、FITC 标记羊抗鼠 IgG(批号:F-2761),均为 Thermo Fisher Scientific 公司产品;β-actin(批号:4970)、Syk(批号:13198)、P-Syk(批号:2710)、P38(批号:8690)、P-P38 单克隆抗体(批号:4511),均为 Cell Signaling Technology 公司产品;抗-FcγR Ⅰ(批号:sc-1184)、抗-FcγR Ⅱ(批号:sc-13527)、抗-FcγR Ⅲ(批号:sc-20052),均为 Santa Cruz 公司产品;同型对照鼠源 IgG(BioXCell 公司,批号:825211O1);EasySep™ Human Monocyte isolation kit 人单核细胞分选试剂盒(STEMCELL 公司,批号:19359);R406(Selleck 生物公司,批号:S1533);APC 标记鼠抗人 CD14 单克隆抗体(BD 公司,批号:561708)。平衡盐溶液(HBSS)(批号:C14175500BT)、1640 培养基(批号:SS10824091202),均为 GIBCO 公司产品;胎牛血清(FBS)(广州速业生物科技有限公司,批号:UBS298-04);RIPA 裂解液(批号:P0013B)、乙二胺四乙酸(EDTA)(批号:NEP046)、蛋白酶抑制剂(批号:WB-0181),均为鼎国生物技术有限公司产品;磷酸酶抑制剂混合物 A(50×,批号:P1082)、

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5×,批号:P0015L)、红细胞裂解液(批号:C3702)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:P0398S)、TBST(批号:ST677),均为碧云天生物技术有限公司产品;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号:ISEQ00010)、Prostaglandin E_1(PGE1)(批号:538903),均为 Merck 公司产品;HRP 标记羊抗兔 IgG (H+L)(Immunoway 公司,批号:RS0002)。FACS CantoⅡ流式细胞仪(BD 公司);BC-5000Vet 兽用全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);5200 凝胶成像仪 (Tanon 公司)。

1.2 方法

所有体外细胞试验每项设置 3 个生物学重复,所有体内动物试验每项设置 5 个生物学重复。

1.2.1 CD36 阳性血小板制备

采集 CD36 阳性人外周血 10 mL,100×g 离心 10 min 获得富含血小板血浆,再 800×g 离心 10 min 提取血小板,将分离得到的血小板采用 PEP 缓冲液(PBS/EDTA 溶液添加 100 ng/mL PGE1)洗涤后备用。

1.2.2 单核细胞制备

采集 CD36 阳性的人外周血 10 mL,Ficoll 密度梯度离心法分离提取单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。将 PBMCs 重悬于含 2% FBS 和 1 mol/L EDTA 的 PBS 缓冲液中。采用人单核细胞分选试剂盒从 PBMCs 中分离出单核细胞,将细胞重悬于含有 10% FBS 的 1640 培养基中,按照 1×10^6/孔的细胞浓度均匀铺于 48 孔板中,于 37℃ 5% CO_2 条件下培养,待细胞完全贴壁后弃掉培养板内培养基,每孔加入 100 μL 含有 1% HSA 的 HBSS 溶液进行吞噬试验。

1.2.3 CD36 抗体与血小板亲和力检测

在 CD36 阳性血小板中按照 25、50、100、200、300 ng/mL 的梯度浓度分别加入 CD36 抗体 GZ1 和 GZ4,室温孵育 30 min,加入 FITC 标记羊抗鼠 IgG 避光室温孵育 30 min 后,用流式细胞仪检测 FITC 的荧光强度。

1.2.4 CD36 抗体致敏血小板制备

将 CD36 阳性血小板浓度调整为 7.5×10^8/mL,加入 2 μg/mL Red-SE 染色,室温避光孵育 45 min,随后 800×g 离心 10 min 获得纯净的血小板,加入 PEP 缓冲液重悬,使其浓度为 1×10^8/mL。吸取 450 μL 染色后的血小板并分别加入 GZ1 和 GZ4(300 ng/mL)室温孵育 30 min(同型对照鼠源 IgG 作为阴性对照),800×g 离心 10 min 后用 HBSS 缓冲液重悬,使 CD36 抗体致敏血小板的终浓度为 2×10^8/mL。

1.2.5 单核细胞吞噬试验

取 CD36 抗体致敏血小板 100 μL,加入单核细胞中,于 37℃、5% CO_2 孵育 1 h。孵育完成后,添加 APC 标记鼠抗人 CD14 单克隆抗体,避光孵育 30 min;随后加入红细胞裂解液,避光孵育 15 min。用流式细胞仪检测 APC 与 PE 双阳性细胞荧光强度。

1.2.6 Fcγ 受体(FcγR)吞噬抑制试验

将 40 μg/mL 的抗-FcγR Ⅰ、抗-FcγR Ⅱ、抗-FcγR Ⅲ分别加入单核细胞中,在 37℃ 5% CO_2 细胞培养箱中孵育 2 h 以抑制单核细胞 FcγR Ⅰ,FcγR Ⅱ和 FcγR Ⅲ。取 100 μL CD36 抗体致敏血小板加入单核细胞中,37℃ 5% CO_2孵育 1 h。用流式细胞仪检测 APC 与 PE 双阳性细胞荧光强度。

1.2.7 R406 吞噬抑制试验

在单核细胞中加入 2、4、8 μmol/L 3 种浓度的 Syk 抑制剂 R406,37℃ 5% CO_2 条件下孵育 24 h 后,取 100 μL CD36 抗体致敏血小板加入单核细胞中,37℃ 5% CO_2孵育 1 h。用流式细胞仪检测 APC 与 PE 双阳性细胞荧光强度。

1.2.8 蛋白印迹(Western Blot,WB)检测相关蛋白的表达水平

将单核细胞吞噬试验体系的细胞(后称样品)收集至 1.5 mL 离心管,100×g 离心 5 min 后去除上清。细胞沉淀以 4 ℃预冷 PBS 洗涤 2 次,每管添加 100 μL RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂与磷酸酶抑制剂),冰浴裂解 30 min。取少量样品采用 BCA 试剂盒定量蛋白,剩余样品加入 1×上样缓冲液,沸水变性 10 min。随后将样品经 10% SDS-PAGE 分离并转膜至 PVDF 膜。室温封闭 2 h 后,膜与 1∶1 000 稀释的一抗(Syk、P-Syk、P38、P-P38、β-actin)室温条件孵育 2 h,室温条件下 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将膜与 1∶10 000 稀释的二抗[HRP 标记羊抗兔 IgG (H+L)]孵育 1 h,室温条件下 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将 PVDF 膜置于凝胶成像仪中,加入 ECL 发光液进行化学发光反应,用凝胶成像仪自动曝光成像。

1.2.9 R406 预防血小板减少的动物体内试验

C57BL/6J 雌性小鼠,连续 3 d 通过腹腔注射将 Syk 抑制剂(R406)按照 10 mg/kg 的剂量注入小鼠体内,d4 通过尾静脉按照 0.8 mg/kg 的剂量分别注入一抗(CD36 抗体 GZ1 和 GZ4),并于注射后不

同时间点(0 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h)检测小鼠血小板计数(Plt)。小鼠尾静脉采血 10 μL 后置于 EDTA/PBS 中,100×g 离心 6 min 后吸取上清,再将上清经 350×g 离心 15 min,即可分离获得纯化血小板。在纯化血小板中加入二抗(FITC 标记羊抗鼠 IgG)避光室温孵育 30 min。用流式细胞仪检测 FITC 的荧光强度。

1.2.10 R406 治疗血小板减少的动物体内试验

C57BL/6J 雌性小鼠通过尾静脉按照 0.8 mg/kg 的剂量分别注射 CD36 抗体 GZ1 和 GZ4,抗体注射 15 min 后,每只小鼠体内通过尾静脉注射 R406(10 mg/kg),并于注射后不同时间点(0 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h)检测小鼠 Plt。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件做数据统计,计量资料符合正态性且方差齐,以均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD36 抗体与血小板亲和力检测

CD36 抗体浓度为 300 ng/mL 时,抗体与 CD36 阳性血小板的亲和力最高,因此选则该浓度作为后续试验的抗体工作浓度。在该浓度条件下,GZ1 与 CD36 阳性血小板的结合亲和力高于 GZ4,见图 1。

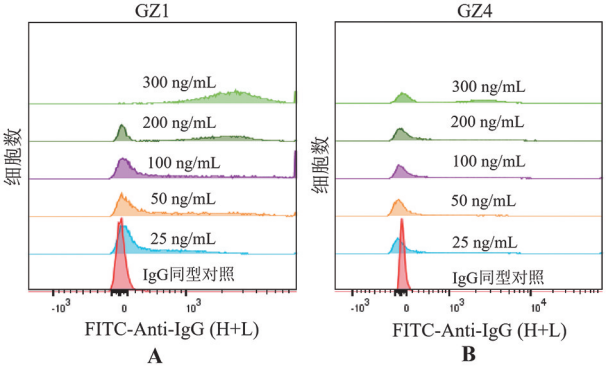


图 1　CD36 抗体 GZ1 和 GZ4 与血小板亲和力比较

Figure 1　Detection of the binding affinity between different subclasses of CD36 antibodies and platelets

2.2 单核细胞 Fcγ 受体(FcγR)参与 CD36 抗体致敏血小板的吞噬作用

与 IgG 同型对照相比,GZ1 处理可显著诱导单核细胞对血小板的吞噬作用($P<0.001$)。在 GZ1 致敏体系中,加入抗-FcγR Ⅰ后,吞噬率显著下降($P<0.001$);而抗-FcγR Ⅱ或抗-FcγR Ⅲ干预时,吞噬率未现明显抑制,表明 GZ1 介导的血小板吞噬主要依赖单核细胞 FcγR Ⅰ;GZ4 处理可轻微诱导单核细胞对血小板的吞噬作用($P<0.001$)。在 GZ4 致敏体系中,加入抗-FcγR Ⅱ后,吞噬率显著降低($P<0.001$);而抗-FcγR Ⅰ或抗-FcγR Ⅲ未明显抑制吞噬效应,提示 GZ4 介导的血小板吞噬主要依赖单核细胞 FcγR Ⅱ,见表 1。

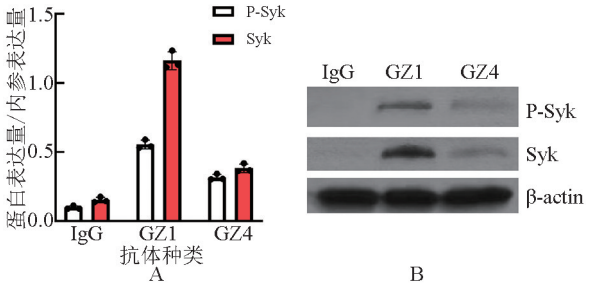
表 1　CD36 抗体介导的单核细胞对致敏血小板的吞噬作用

Table 1　Phagocytosis of sensitized platelets by monocytes mediated by CD36 antibody

	Fcγ 受体抗体	吞噬率(%)
IgG		3.58±1.35
GZ1		56.83±9.05
	抗-FcγR Ⅰ	12.15±3.39
	抗-FcγR Ⅱ	51.05±11.95
	抗-FcγR Ⅲ	50.98±10.02
GZ4		30.43±1.74
	抗-FcγR Ⅰ	26.00±2.27
	抗-FcγR Ⅱ	6.30±1.33
	抗-FcγR Ⅲ	25.98±2.90

2.3 WB 检测 Fcγ 受体下游信号蛋白 Syk 的表达情况

与 IgG 同型对照相比,CD36 抗体 GZ1 和 GZ4 均能上调 Syk 和 P-Syk 的表达,GZ1 处理后蛋白表达量显著升高(均为 $P<0.001$),见图 2。



注:A 单核细胞吞噬 CD36 抗体致敏血小板后 Syk 和 P-Syk 的蛋白表达量(以 β-actin 为内参);B P-Syk、Syk、β-actin 的代表性 WB 条带。

图 2　WB 检测 Syk 与 P-Syk 的蛋白表达情况

Figure 2　Detection of Syk and P-Syk expression by Western blot

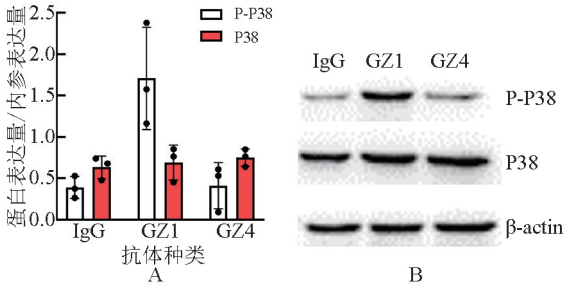
2.4 WB 检测下游 P38 MAPK 信号通路的表达情况

与 IgG 同型对照相比,GZ1 介导单核细胞吞噬致敏血小板的过程中,P-P38 蛋白表达水平显著升高($P<0.001$),而 P38 蛋白表达在 3 者间无明显差异;相较于 IgG 同型对照,GZ4 未引起 P-P38 蛋白表达的明显改变($P>0.05$),提示 GZ1 可有效激活 P38 信号通路,见图 3。

2.5 R406 对 CD36 抗体诱导吞噬的抑制效应

随 R406 处理浓度梯度升高,GZ1、GZ4 诱导的单核细胞吞噬率均呈剂量依赖性下降;其中 R406 对 GZ1 介导吞噬作用的抑制效应更为突出,见

表 2。



注:A 单核细胞吞噬 CD36 致敏血小板后 P38 和 P-P38 的蛋白表达量(以 β-actin 为内参);B P-P38、P38、β-actin 的代表性 Western blot 条带。

图 3 WB 检测 P38 和 P-P38 的表达情况

Figure 3 Detection of P38 and P-P38 expression by Western blot

2.6 R406 对 CD36 抗体诱导的血小板减少的抑制作用(动物体内试验)

R406 预处理能显著改善 CD36 抗体诱导的血小板减少。注射 R406 的小鼠在注射 GZ1 15 min 后 Plt 明显回升[(305.40±62.27)×10^9/L vs (600.00±173.64)×10^9/L,P<0.001],并于注射 GZ1 30 min 后恢复至未注射之前的水平,见表 3。抗体结合率在注射 15 min 后显著降低(55.04% vs 30.58%,P<0.001),见表 4。GZ4 注射后结果与 GZ1 类似,注射 GZ4 15 min 后 Plt 明显回升[(701.60±85.77)×10^9/L vs (1 037.80±95.43)×10^9/L,P<0.001],并于注射 GZ4 30 min 后恢复至正常水平,见表 3。同样抗体结合率在 15 min 后显著降低(25.05% vs 13.52%,P<0.001),见表 4。

表 2 R406 对 CD36 抗体介导单核细胞吞噬的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of R406 on CD36 antibody-mediated phagocytosis

	R406(μmol/L)	吞噬率(%)
IgG	0	4.1±8.05
GZ1	0	56.17±3.81
	2	31.67±4.13*
	4	18.13±1.69*
	8	10.43±0.29*
GZ4	0	24.9±1.87
	2	7.53±2.43**
	4	5±0.73**
	8	5.47±0.259**

*与同抗体 0 μm/L 比较,均为 P<0.001;**与同抗体 0 μm/L 比较,均为 P<0.001。

表 3 CD36 抗体注射和 R406 预处理对小鼠 Plt 的影响

Table 3 Changes in platelet counts induced by the mouse CD36 monoclonal antibodies (GZ1 or GZ4) in mice

	小鼠 Plt(×10^9/L)					
	0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h
GZ1	1 197.00±69.97	305.40±62.27*	427.80±59.21	655.00±92.52	947.40±206.24	1 027.40±243.67
GZ1+R406	1 051.20±39.56	600.00±173.64	848.20±22.86	918.60±48.76	993.80±77.93	930.00±432.00
GZ4	1 125.80±38.26	701.60±85.77*	886.60±49.07	885.40±137.76	990.20±75.89	983.40±83.09
GZ4+R406	1 280.40±88.49	1 037.80±95.43	1 062.80±101.60	1 152.60±115.85	1 139.20±125.30	1 111.60±115.87
IgG	970.60±110.73	983.20±35.42	911.40±124.40	988.60±135.43	1 011.60±148.09	966.80±138.04
IgG+R406	1 204.60±110.17	1 195.80±68.83	1 212.00±81.40	1 257.20±36.13	1 107.60±75.27	1 126.40±91.54

*与 0 min 比较,均为 P<0.001。

表 4 CD36 抗体注射和 R406 预处理对小鼠血小板结合率的影响

Table 4 Detection of binding rates of mouse CD36 monoclonal antibodies(GZ1 or GZ4) to mouse platelets

	小鼠血小板结合率(%)					
	0 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h
GZ1	4.20	55.04*	41.82	33.62	17.60	7.14
GZ1+R406	4.72	30.58	29.98	21.00	19.66	11.56
GZ4	4.36	25.05*	20.36	16.41	13.03	6.24
GZ4+R406	4.04	13.52	12.64	9.18	8.96	4.12
IgG	2.85	2.53	2.71	2.79	2.88	2.10
IgG+R406	3.70	4.18	3.86	4.30	3.20	2.74

*与 0 min 比较,均为 P<0.001。

2.7 R406 对 CD36 抗体介导血小板减少的治疗效果(动物体内试验)

在 GZ1、GZ4 诱导的小鼠血小板减少模型中,R406 干预 15 min 内无法逆转 Plt 的降低[GZ1:(252.60±77.93)×10^9/L、GZ4:(329.60±31.59)×10^9/L],见图 4。

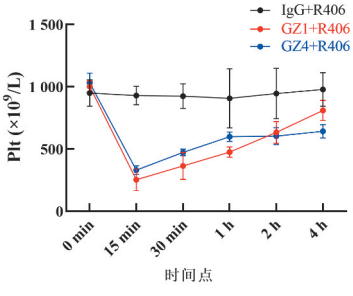


图 4 R406 对 CD36 抗体介导血小板减少的治疗效果(动物体内试验)

Figure 4 In vivo evaluation of the therapeutic effect of R406 on CD36 antibody-induced thrombocytopenia

3 讨论

血小板清除的经典机制主要依赖于血小板抗体介导的血小板致敏,这些致敏血小板通过 Fcγ 受

体(如 FcγRⅡa)依赖途径被巨噬细胞识别,并最终被吞噬清除。ITP 是典型的抗体介导型自身免疫性血小板减少疾病,患者体内可产生靶向血小板表面糖蛋白 GPⅡb-Ⅲa 与 GPⅠb-Ⅸ的自身抗体;通过脾脏、肝脏中表达 FcγR 的巨噬细胞加速清除循环中抗体包被的血小板,最终引发不同程度的 Plt 减低[10-11]。不同 IgG 亚型的抗体因其与 FcγR 结合的亲和力及补体激活能力存在差异,可介导截然不同的生物学效应[12]。已有研究证实,不同亚型的 IgG 抗体的致病能力具有显著异质性,其核心机制与抗体亚型和吞噬型 FcγR 的相互作用特性密切相关:对于高亲和力受体 FcγRⅠ,不同 IgG 亚型的结合亲和力依次为 IgG2a > IgG2b > IgG3 ≈ IgG1;而对于低亲和力受体 FcγRⅢ,与 IgG2a、IgG1 和 IgG2b 的亲和力相近,而与 IgG3 的结合能力显著偏弱。其中,IgG2a 型抗体主要优先结合高亲和力 FcγRⅠ,这也使得 IgG2a 型抗体的致病活性远高于 IgG1 型抗体,其致病强度可达 IgG1 型抗体的 20~100 倍[13]。本研究发现,在单核细胞通过 FcγR 吞噬清除 CD36 抗体致敏血小板的分子机制中,IgG2a 亚型 CD36 单克隆抗体 GZ1 可通过细胞表面的 FcγRⅠ显著增强对致敏血小板的吞噬,而 IgG1 亚型 GZ4 则主要通过 FcγRⅡ诱导微弱的吞噬反应。本研究体外细胞学实验选用原代单核细胞作为研究载体,细胞仅经常规贴壁培养,未进行诱导分化,因此本体系存在一定局限性。在体内环境下,单核细胞可迁移至组织并分化为巨噬细胞,而巨噬细胞是参与血小板清除的主要效应细胞,其吞噬活性更贴近真实的生理病理过程。本研究以未分化的单核细胞为研究对象,与体内巨噬细胞介导的吞噬过程存在一定差异。后续可进一步诱导单核细胞分化为巨噬细胞开展验证试验,以完善相关机制研究,使体外试验结果更贴合体内真实情况。

Syk 既是适应性免疫中 FcγR 介导吞噬过程的核心调控分子,同时也在固有免疫的补体依赖性吞噬反应中发挥重要作用[14]。单核/巨噬细胞 FcγR 胞内段的免疫受体酪氨酸激活基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAMs)可被 Src 家族激酶磷酸化,进而招募并活化 Syk;激活的 Syk 进一步磷酸化 PLCγ、PI3K/AKT、P38 MAPK 等下游信号分子,组装形成信号复合物,启动巨噬细胞 Src 家族激酶/ITAMs/Syk 信号级联通路,最终介导 FcγR 依赖的吞噬反应[15-16]。在该调控网络中,Syk 可通过活化 PLCγ 抑制 NOX2,同时选择性激活钙通道及 P38 MAPK 信号通路,进而正向调控巨噬细胞的吞噬作用[17]。已有研究证实,Syk 基因缺陷可造成巨噬细胞 Fcγ 受体信号传导紊乱,继而引发细胞吞噬功能障碍[18-19]。本研究结果显示,体外吞噬试验中 CD36 抗体诱导的吞噬作用可显著激活 Syk 信号通路,即上调 Syk 及 P-Syk 的表达水平,采用 Syk 抑制剂 R406 可显著抑制单核细胞对 CD36 抗体致敏血小板的吞噬作用;同时体内动物试验进一步证实,小鼠预先给予 R406 处理,可以有效预防由 CD36 抗体介导的 Plt 下降。Syk 同样在补体介导的吞噬效应中发挥重要调控作用。抗原-抗体复合物可启动补体激活通路,诱导 C3 转化酶生成,促使 C3 裂解为 C3b 并进一步转化为 C3bi。补体介导的吞噬效应依赖吞噬细胞表面补体受体对补体组分的识别与结合,生成的 C3bi 与吞噬细胞表面 CR1、CR3(CD11b/CD18,整合素 αMβ2)及 CR4(CD11c/CD18,整合素 αXβ2)3 种补体受体发生特异性结合。其中,C3bi 与表面受体 CR3 结合并形成 C3bi-CR3 复合物;该复合物在 Rho 家族 GTP 酶的调控下,可诱导新生吞噬体周边发生肌动蛋白聚合[14]。Syk 是介导 PLCγ 活化的关键酪氨酸激酶,可通过启动 PLCγ 上游聚集态肌动蛋白的解聚进程,进而促进吞噬体成熟与形成。已有研究证实,C3bi-CR3 复合物启动吞噬效应后,PLCγ2 可迅速与 Syk 结合并相互作用,进而推进吞噬作用[20]。该调控机制本课题组将在后续研究中进一步验证。综上,Syk 可通过调控肌动蛋白动态重塑,在补体依赖性吞噬反应中亦发挥关键且不可替代的作用。

鉴于 Syk 在 Fcγ 受体介导单核-巨噬细胞吞噬过程中扮演重要的角色,且近年来小分子蛋白激酶抑制剂已在自身免疫性疾病领域得到广泛研发与应用,Syk 有望成为该类疾病潜在的核心治疗靶点。本研究旨在探究 Syk 在 CD36 抗体致敏血小板被单核细胞吞噬过程中的调控作用,并阐明其潜在的分子机制。本研究结果为靶向 Syk 通路防治 CD36 抗体介导的血小板清除提供了理论依据,并提示体外血小板吞噬功能模型在评估血小板减少症发病程度方面具有良好参考价值,可为临床病情预判与干预提供试验支撑。鉴于该体外模型仅能模拟部分关键免疫反应,无法完全反映体内真实微环境,后续研究需纳入更大规模的临床样本,以进一步验证和拓展本研究的结论。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Donor/Patient Consent

本研究已分别通过广州血液中心伦理委员会审批(批准号:广州血液中心伦 2023 第 062 号)和广州华腾生物医药科技有限公司实验委员会审批(批准号:IACUC-HTSW211123);本研究纳入的所有献血者均已签署知情同意书。

作者贡献/Authors' Contribution

任慧:试验设计和实施、论文撰写;陈大伟:数据收集和分析;罗亚林:试验实施、数据收集;夏文杰、叶欣:论文校对;何坚森、许耀日:试验实施;徐秀章:研究协助;付涌水:论文审核。

[参考文献]

[1] MCGILVRAY I D,SERGHIDES L,KAPUS A,et al. Non-opsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance[J]. Blood,2000,96(9):3231-3240.

[2] LIU J,SHAO Y,DING H,et al. Distribution of CD36 deficiency in different Chinese ethnic groups[J]. Hum Immunol,2020,81(7):366-371.

[3] XIA W, YE X, XU X, et al. Two cases of platelet transfusion refractoriness and one case of possible FNAIT caused by antibodies against CD36 in China[J]. Transfus Med, 2014,24(4):254-256.

[4] XU X,YE X,XIA W,et al. Studies on CD36 deficiency in South China: Two cases demonstrating the clinical impact of anti-CD36 antibodies[J]. Thromb Haemost, 2013,110(6):1199-1206.

[5] XU X,CHEN D,YE X,et al. Successful prenatal therapy for anti-CD36-mediated severe FNAIT by deglycosylated antibodies in a novel murine model[J]. Blood, 2021, 138(18):1757-1767.

[6] RYAN J,MA F Y,KANELLIS J,et al. Spleen tyrosine kinase promotes acute neutrophil-mediated glomerular injury via activation of JNK and p38 MAPK in rat nephrotoxic serum nephritis[J]. Lab Invest, 2011, 91(12): 1727-1738.

[7] YI Y S,SON Y J,RYOU C,et al. Functional roles of Syk in macrophage-mediated inflammatory responses[J]. Mediators Inflamm,2014,2014:270302.

[8] ULLAH I,BARRIE U,KERNEN R M,et al. Src- and Abl-family kinases activate spleen tyrosine kinase to maximize phagocytosis and Leishmania infection[J]. J Cell Sci,2023,136(14):260809.

[9] BUSSEL J,ARNOLD D M,GROSSBARD E,et al. Fostamatinib for the treatment of adult persistent and chronic immune thrombocytopenia: Results of two phase 3, randomized, placebo-controlled trials[J]. Am J Hematol, 2018,93(7):921-930.

[10] ZHENG S S,AHMADI Z,LEUNG H H L,et al. Anti-platelet antibody predicts platelet desialylation and apoptosis in immune thrombocytopenia[J]. Haematologica, 2022,107(9):2195-2205.

[11] WOJCIK I,SCHMIDT D E,DE NEEF L A,et al. A functional spleen contributes to afucosylated IgG in humans[J]. Sci Rep,2021,11(1):24045.

[12] VIDARSSON G,DEKKERS G,RISPENS T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions[J]. Front Immunol,2014,5:520-537.

[13] FOSSATI-JIMACK L,IOAN-FACSINAY A,REININGER L,et al. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcgamma receptor Ⅲ[J]. J Exp Med,2000,191(8):1293-1302.

[14] TOHYAMA Y,YAMAMURA H. Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk[J]. IUBMB Life,2006,58(5-6):304-308.

[15] KURNIAWAN D W, STORM G, PRAKASH J, et al. Role of spleen tyrosine kinase in liver diseases[J]. World J Gastroenterol,2020,26(10):1005-1019.

[16] RYAN J,MA F Y,KANELLIS J,et al. Spleen tyrosine kinase promotes acute neutrophil-mediated glomerular injury via activation of JNK and p38 MAPK in rat nephrotoxic serum nephritis[J]. Lab Invest, 2011, 91(12): 1727-1738.

[17] ZHU Y,FAN S,WANG N,et al. NADPH oxidase 2 inhibitor diphenyleneiodonium enhances ROS-independent bacterial phagocytosis in murine macrophages via activation of the calcium-mediated p38 MAPK signaling pathway[J]. Am J Transl Res,2017,9(7):3422-3432.

[18] STRZELECKA-KILISZEK A,KWIATKOWSKA K,SOBOTA A. Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc gamma R[J]. J Immunol, 2002,169(12):6787-6794.

[19] NEWLAND A,MCDONALD V. Fostamatinib: a review of its clinical efficacy and safety in the management of chronic adult immune thrombocytopenia[J]. Immunotherapy,2020,12(18):1325-1340.

[20] SHI Y,TOHYAMA Y,KADONO T,et al. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis[J]. Blood, 2006, 107(11):4554-4562.

(2026-05-20 收稿,06-07 修回,06-15 接收)

本文编辑:闻欣