

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.26.013

微粒和血细胞在脓毒症高凝状态中的作用

闫佳佳¹ 李倩¹ 金英玉¹ 于雪源² 辛晓敏^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院检验科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学附属第二医院检验科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:探讨血小板和红细胞磷脂酰丝氨酸(PS)暴露和循环微粒(MPs)在脓毒症高凝状态中的作用。**方法:**集 10 例诊断为脓毒症的患者及 10 例健康体检者的新鲜血;离心分离出红细胞、富血小板血浆及 MPs;应用 Alexa-Fluro 488- 乳粘素 /CD 41a/CD 14、Alexa-Fluro 647-CD 235a/CD 31/CD 45 标定红细胞、血小板、内皮细胞、白细胞及单核细胞来源的 MPs;流式细胞仪测定红细胞和血小板的 PS 外翻、MPs 的数量;血凝仪测定相应凝血时间。**结果:**相对于健康人,脓毒症患者 PS 外翻红细胞 (3.53% vs 0.53%, $P<0.05$)和血小板 (3.00% vs 0.45%, $P<0.05$)、MPs 总数 ($4830/\mu\text{L}$ vs $2861/\mu\text{L}$, $P<0.05$)及各亚型 MPs 均明显升高;红细胞 (238.4s vs 346.8s, $P<0.05$)、血小板 (209.1s vs 335.9s, $P<0.05$)及 MPs (207.1s vs 318.2s, $P<0.05$)的凝血时间缩短。MP 数、PS+ 红细胞/血小板比例分别与各自凝血时间成负相关 (MP: $r=-0.592$, $P=0.006$;红细胞: $r=-0.565$, $P=0.009$;血小板: $r=-0.641$, $P=0.002$)。**结论:**红细胞、血小板的 PS 暴露及循环 MPs 和脓毒症高凝状态的发生相关,可能对患者凝血功能检测和抗凝治疗有一定的意义。

关键词:磷脂酰丝氨酸;微粒;脓毒症;凝血

中图分类号:R446,R631 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)26-5049-05

Role of the Microparticle (MP) and PS Exposure of Erythrocytes and Platelets in the Procoagulant State of Sepsis

LV Jia-jia¹, LI Qian¹, JIN Ying-yu¹, YU Xue-yuan², XIN Xiao-min^{1△}

(1 Department of Clinical Laboratory, The First hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Clinical Laboratory, The Second hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of microparticle (MP) and phosphatidylserine (PS) exposure of erythrocytes and platelets in the procoagulant state in sepsis. **Methods:** Peripheral blood samples were collected from 10 patients with newly diagnosed sepsis and 10 matched healthy subjects. Erythrocytes, platelets, and MPs were obtained by centrifugation. Alexa-Fluro 488-lactadherin/CD 41a/CD 14 and Alexa-Fluro 647-CD 235a/CD 31/CD 45 were used to label MPs derived from platelets, monocytes, erythrocytes, endothelial cells, and leukocytes. PS exposure of platelets and erythrocytes was detected with Alexa-Fluro 488-lactadherin. Analysis of MP release and PS exposure on erythrocytes and platelets were performed with a flow cytometer. Procoagulant activity (PCA) was determined by clotting time. **Results:** Compared with healthy subjects, patients with sepsis had markedly increased MP release ($4830/\mu\text{L}$ vs $2861/\mu\text{L}$, $P<0.05$) and PS exposure on erythrocytes (3.53% vs 0.53%, $P<0.05$) and platelets (3.00% vs 0.45%, $P<0.05$). Relevant PCA was significantly increased as determined by shortened clotting time (erythrocytes: 238.4s vs 346.8s, $P<0.05$; platelets: 209.1s vs 335.9s, $P<0.05$; MPs: 207.1s vs 318.2s, $P<0.05$). The level of circulating MPs, PS+ erythrocytes %, and PS+ platelets% was negatively correlated with its own relevant clotting time (MP: $r=-0.592$, $P=0.006$; erythrocytes: $r=-0.565$, $P=0.009$; platelets: $r=-0.641$, $P=0.002$). **Conclusions:** Increased MPs and PS+ erythrocytes/platelets are associated with the procoagulant state in patients with sepsis, and may have clinical significance in evaluating and predicting the effect of anticoagulant therapy.

Key words: Phosphatidylserine; Microparticle; Sepsis; Coagulation

Chinese Library Classification(CLC): R446,R631 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)26-5049-05

前言

脓毒症时凝血系统激活,抗凝系统受抑,极易导致弥散性血管内凝血^[1]。多种炎症因子,补体复合物及凝血产物均可导致

血细胞和内皮的损伤、微血栓形成。细胞膜表面磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)的外翻反映了细胞的激活、损伤或凋亡的动态变化^[2]。细胞膜微粒(microparticles, MPs)的释放与 PS 的外翻同时发生^[3]。循环 MPs 因携带大量的 PS 参与血栓形成和炎症相关的多种疾病的发生。脓毒症休克患者循环中 MP 增多,然而其凝血活性并不是很清楚。膜表面的 PS 因能促进 Xase 和凝血酶原酶的形成而高度促凝。目前有关循环 MPs 增多和血细胞 PS 暴露,进而导致脓毒症高凝状态的研究,国内外报道较少。本研究通过血浆 MPs、红细胞和血小板 PS 外翻的检

作者简介:闫佳佳(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:血栓与止血的实验研究, E-mail:19880316j@163.com

△通讯作者:辛晓敏,电话:0451-8555415,

E-mail: xinxiaomin0451@aliyun.com

(收稿日期:2014-03-02 接受日期:2014-03-30)

测,及其凝血活性的测定,进一步探讨 MP 释放和血细胞 PS 外翻与脓毒症高凝状态发生的机制。

1 对象与方法

1.1 对象

10 例来自哈尔滨医科大学附属第一医院 ICU 的患者,男 6 例,女 4 例,年龄 41~72 岁,平均 58.3 岁;诊断为脓毒症。依据如下:(1)血培养阳性,其中 G⁻ 菌 7 例,G⁺ 杆菌 2 例,G⁺ 球菌 1 例;(2)符合系统性炎症反应综合征(SIRS)。健康对照组 10 例,男 6 例,女 4 例,年龄 32~58 岁,平均 43.8 岁。排除标准包括:恶性肿瘤或风湿免疫性疾病;怀孕;铁、叶酸和维生素 B12 缺乏;近 6 个月有输血史;服用能影响凝血的药物的患者。

1.2 仪器和材料

FACS CantoII 流式细胞仪为美国 BD 公司产品;直径 0.5 μm 、0.9 μm 和 3.0 μm 标准乳胶微球为法国马赛 BioCytex 公司产品;TruCount 计数管(Cat. No. 340334)为美国 BD 公司产品。细胞特异性单抗 CD235a (clone GA-R20),CD31 (clone L133.1),CD41a (clone HIP8),CD45 (clone H130),CD14 (clone M5E2)以及老鼠 IgG1/IgG2a (clone X40/X39)为美国 San Jose 公司产品。Alexa Fluro 488 标记的乳粘素或单抗由我们自己的实验室准备。1mM Hepes 的 Tyrode's 缓冲液经 0.22 μm 一次性针孔滤膜(英国 Millipore 公司)滤过。显色底物 S-2765 和 S-2238 为美国 DiaPharma 公司产品。

1.3 蛋白纯化和标记

牛乳粘素的纯化如前所述,根据试剂盒指示标记 Alexa Fluro 488。荧光素与乳粘素的比例是 1.2/1 或者 1.1/1^[4]。

1.4 实验方法和步骤

1.4.1 红细胞、血小板和微粒的制备 抽取清晨空腹静脉血于 5 mL3.2%枸橼酸钠抗凝的采血管中。室温下 200× g,30 分钟离心后获取富血小板血浆(PRP)和红细胞。乏血小板血浆(PFP)准备:血样 1500× g,20 分钟离心后取上清,再经 13000× g,2 分钟离心去除残余血小板。PFP 置于 -80℃ 冰箱中备用。MP 的制备:250 μL PFP 解冻 60 分钟后 20 000× g,30 分钟离心后去除 225 μL 上清,加入 225 μL Tyrode's 缓冲液(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.9 mM NaHCO₃, 0.42 mM NaH₂PO₄, 1 mM Mg-Cl₂, 2mM CaCl₂, 5.5mM 葡萄糖, 5 mM HEPES 和 0.35% BSA, pH 7.4)。再次 20 000× g,30 分钟离心后去除 225 μL 上清,加入 75 μL Tyrode's 缓冲液,涡旋 10 秒后即富 MPs 悬液。

1.4.2 MPs 流式分析 5 μL 富 MPs 悬液加入到 35 μL Tyrode's buffer 中,避光,4℃ 下与以下试剂孵育:Alexa Fluro 488-乳粘素(5 μL);Alexa Fluro 647-235a (5 μL);Alexa Fluro 647-31(5 μL)/Alexa Fluro 488-41a (5 μL);Alexa Fluro 647-45 (5 μL)/Alexa Fluro 488-14 (5 μL)。5 μL 富 MPs 悬液、Alexa Fluro 647/488-IgG2a/IgG1 同型对照抗体(5 μL)以及 150 μL 标准微球混合液置于一个 Trucount 管中以供对照和计数。所有管孵育 30 分钟后加 Tyrode's 缓冲液至 200 μL ,立即流式分析。建立前向角光散射对侧向角光散射双对数散点图(FSC LOG-SSC LOG),根据标准微球试剂盒说明书调整检测阈值,并在同一条条件下测定所有的 MPs;同一条件下测定 1 管仅含 Tyrode's 缓冲液的空白对照以此验证仪器噪音信号的干扰程度。首先规定在

FSC-SSC 散点图上 MPs 的初始大小不大于 0.9 μL ;接着确认乳粘素阳性的为 MPs。

MPs 浓度计算公式如下: $n=(C \times \text{加入的 beads 数})/(\text{获取的 Beads 数} \times \text{MPs 加入量})$,其中 C 代表乳粘素阳性 MPs 数。BD FACSDiva 软件获取 10000 个细胞并分析。

1.4.3 红细胞和血小板 PS 外翻的流式分析 红细胞/血小板浓度调整到 $0.5-1 \times 10^6/\text{ml}$,200 μL 此浓度的细胞悬液与 5 μL Alexa Fluro 488-乳粘素在室温下避光孵育 10 分钟。BD FACS-Diva 软件获取 10000 个细胞后分析其 PS 外翻细胞比例。

1.4.4 红细胞/血小板/MPs 的促凝活性 利用 KC4A-血凝仪,以一步复钙时间试验测定三者的血浆凝血时间。100 μL 红细胞(1×10^8),血小板(1×10^7)或者富 MPs 悬液与 100 μL 乏 MPs 血浆 37℃ 孵育 3 分钟后,加入 100 μL 预热的 CaCl₂(25 mM)启动反应并记录结果。所有试验重复 3 遍,取平均值。

1.5 统计学分析

统计学处理:采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验,及两变量的相关和回归分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者实验室检查结果

如表 1 所示,患者白细胞升高,其中中性粒细胞数增高,表明细菌感染的发生。感染类型以格兰阴性杆菌为主。患者红细胞和血小板数均降低。PT 和 APTT 均延长,纤维蛋白原及 D-二聚体均升高。血浆白蛋白降低,血尿素氮则升高,表明可能有内皮功能障碍以及肾功能异常。

表 1 脓毒症患者实验室检查结果

Table 1 Results of laboratory studies of patients with sepsis

	Healthy subjects	Septic patients
Sex ratio	6/3	6/4
(male/female)	41.7± 9.38	56.3± 9.93
Age (years)	49.28± 10.34	31.36± 8.12*
Albumin (g/l)	60.56± 10.48	103.1± 86
Creatinine (μM)	5.15± 0.846	12.52± 9.26*
BUN (mM)	4.80± 0.65	3.89± 0.89*
Erythrocyte ($\times 10^{12}/\text{L}$)	5.31± 0.82	16.25± 7.37*
Leukocyte ($\times 10^9/\text{L}$)	62.41± 4.95	86.18± 6.65*
Neutrophil (%)	5.36± 1.51	4.48± 3.10
Monocyte (%)	156± 11.57	121.5± 32.98*
Hemoglobin (g/L)	235.7± 72.17	154.9± 62.13*
Platelet ($\times 10^9/\text{L}$)	11.16± 0.72	14.61± 5.11
PT (s)	25.3± 3.9	38.9± 13*
APTT (s)	2.58± 0.39	4.15± 1.44*
Fibrinogen (g/L)	0.162± 0.067	3.116± 1.35*
D-dimer ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		

注:*与对照组比较,P<0.05;BUN,血尿素氮;PT,凝血酶原时间;APTT,活化部分凝血活酶时间。

Note: *Compared with healthy subjects, P<0.05; BUN, blood urea nitrogen; PT, prothrombin time; APTT, activated partial thromboplastin time.

2.2 脓毒症患者循环 MPs 数升高

患者的循环 MPs 总数及各亚型 MPs 数均增高。组间 MPs 亚型未见差别,均为血小板、红细胞、白细胞及内皮细胞 MPs。患者 MPs 总数($4830/\mu\text{L}$)约为健康对照者($2861/\mu\text{L}$)的 1.69 倍($P<0.05$),以血小板 MPs($2273/\mu\text{L}$)为主,这一比例相对于健康对照组血小板 MPs($1528/\mu\text{L}$)增长了 1.49 倍($P<0.05$)。患者白

细胞 MPs($983/\mu\text{L}$)相对于健康对照组($613/\mu\text{L}$)增长了 1.6 倍($P<0.05$)。单核细胞 MPs($530/\mu\text{L}$ vs $266/\mu\text{L}$, $P<0.05$)以及红细胞 MPs ($255/\mu\text{L}$ vs $87/\mu\text{L}$, $P<0.05$)均有所增长。内皮 MPs ($336/\mu\text{L}$)相对于健康组($219/\mu\text{L}$)也有所增加,差异无统计学意义($P>0.05$)(图 1)。

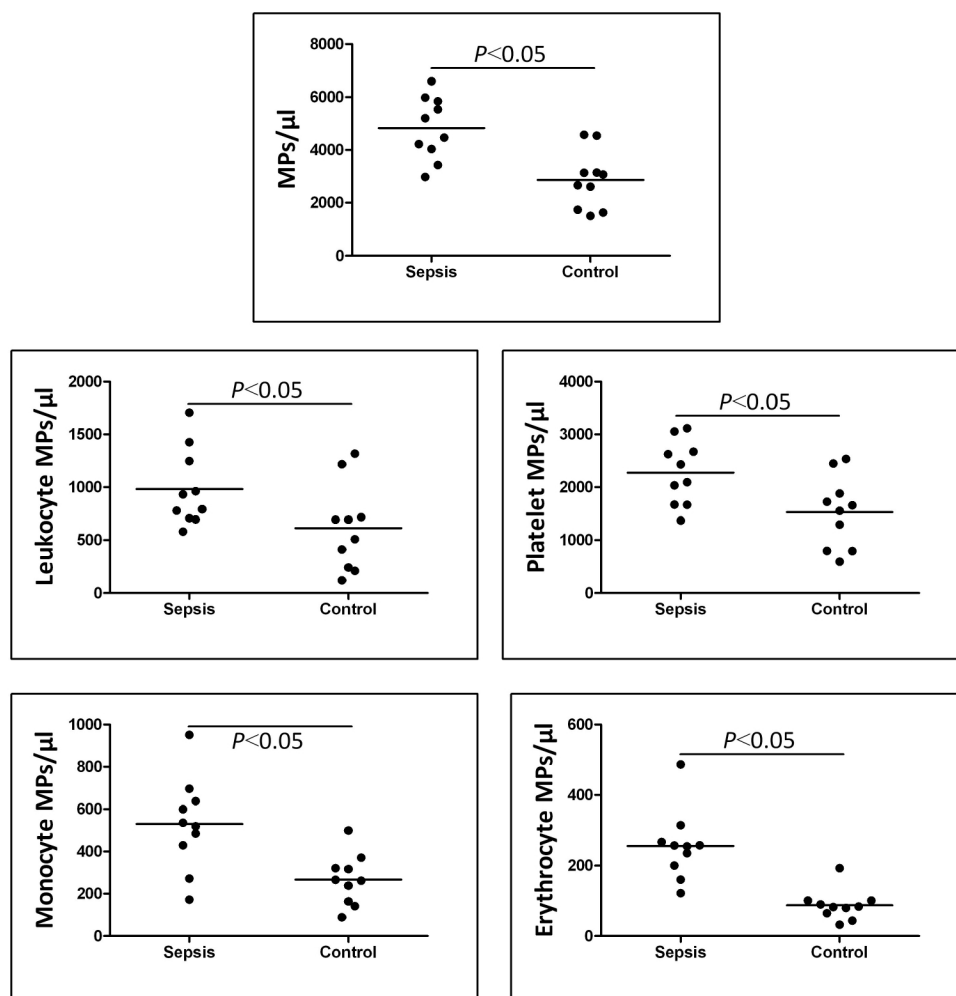


图 1 脓毒症患者和正常人循环 MPs 分析

Fig. 1 Analysis of circulating MPs in septic patients and healthy subjects

注: $P<0.05$ 有统计学意义; MPs, 微粒。

Note: $P<0.05$ represents statistically significant; MPs, microparticles.

2.3 PS⁺ 红细胞和 PS⁺ 血小板

患者 PS 外翻红细胞 (3.53% vs 0.53% , $P<0.05$) 和血小板

(3.00% vs 0.45% , $P<0.05$) 比例高于正常人(图 2)。

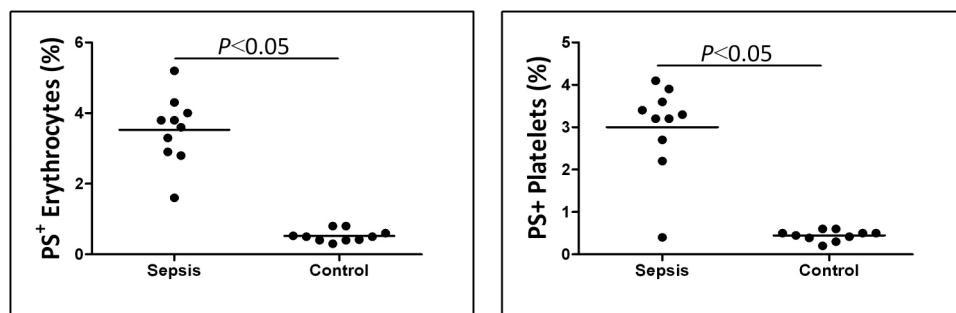


图 2 脓毒症患者和正常人红细胞和血小板 PS 外翻分析

Fig. 2 Analysis of PS exposure in Erythrocytes and platelets in septic patients and healthy subjects

注: $P<0.05$ 有统计学意义; MPs, 微粒; PS, 磷脂酰丝氨酸。

Note: $P<0.05$ represents statistical significance; MPs, microparticles; PS, phosphatidylserine.

2.4 凝血时间

脓毒症患者红细胞 (238.2s vs 346.9s, $P<0.05$)、血小板 (209.1s vs 335.9s, $P<0.05$) 及 MPs (207.1s vs 318.2s, $P<0.05$) 的

凝血时间均缩短, 差异有统计学意义。乏 MPs 血浆复钙后并未凝(图 3)。

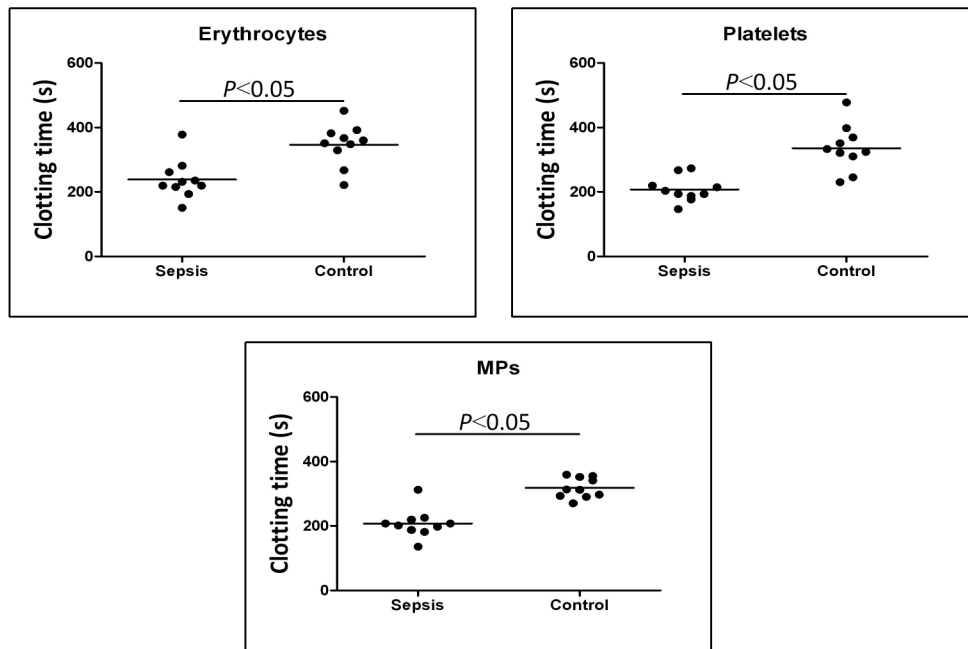


图 3 脓毒症患者和正常人 MP、红细胞和血小板凝血时间

Fig. 3 Clotting time of MPs, Erythrocytes, and platelets in septic patients with sepsis

注: $P<0.05$ 有统计学意义; MPs, 微粒。

Note: $P<0.05$ represents statistical significance; MPs, microparticles.

2.5 相关性分析

循环 MP 数、PS+ 红细胞比例、PS+ 血小板比例与各自凝

血时间成负相关 (MPs: $r=-0.592$, $P=0.006$; 红细胞: $r=-0.565$, $P=0.009$; 血小板: $r=-0.641$, $P=0.002$) (图 4)。

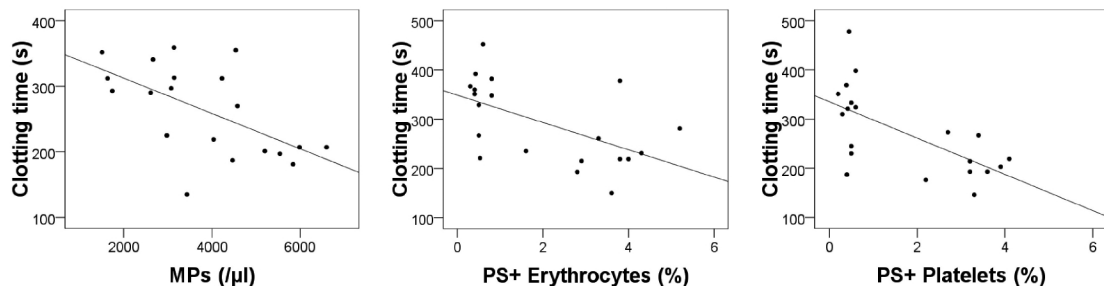


图 4 凝血时间和 MPs/PS+ RBCs/PS+ platelets 相关性分析

Fig. 4 Analysis of correlations between clotting time and circulating MPs, PS+ RBCs, PS+ platelets

注: $P<0.05$ 有统计学意义; MPs, 微粒。

Note: $P<0.05$ represents statistical significance; MPs, microparticles.

3 讨论

PS 是生理性止血和血栓形成的始动因素^[5]。血细胞 PS 外翻时释放高度促凝的 MPs。因此,测定循环 MPs 及 PS+ 血细胞可以对血管内 PS 有一个更精细的评估,对脓毒症抗凝治疗有重要意义。MPs 是细胞激活、损伤或凋亡的产物,直接反应母细胞的功能状态,是评价血小板、白细胞及内皮细胞功能状态的指标^[6]。MPs 直径一般在 $0.1\sim1\mu\text{L}$, $<0.1\mu\text{L}$ 为外核体, $>1\mu\text{L}$ 为凋亡小体。本研究采用 $0.5\mu\text{L}$ 、 $0.9\mu\text{L}$ 和 $3\mu\text{L}$ 的标准微球设门并利用乳粘素确定 PS 外翻,可有效排除血小板及凋亡小体的

干扰,保证 MPs 的准确定量。

循环 MPs 增多会促进血栓的发生,增加脓毒症死亡率。血小板和白细胞 MP 显著升高,表明血小板和白细胞的激活。我们还发现患者有较高的红细胞 MP,这与患者贫血、外周血管低氧状态以及红细胞变形性降低导致的阻止缺氧状态一致。内皮功能障碍是脓毒症另一高凝机制^[7],然而内皮细胞 MPs 相对于正常人虽有所增长,差异却不具统计学意义。可能的原因:(1)细菌入血诱发的炎症反应未严重伤及内皮;(2)内皮的修复机制足以抵消炎症对内皮的损伤,不足以引发 MP 释放;(3)内皮 MP 被吞噬性清除。MP 的凝血活性较大程度上依赖其表面的

PS。Sinauridze^[8]等报道,MP 的促凝活性是同等面积活化血小板的 50~100 倍,这归因于 Xase 以及凝血酶原酶的形成。我们发现循环 MP 数与凝血时间显著相关。因这些 MPs 富含 PS,说明凝血活性与血管内 PS 量直接相关。TF+MP 被认为是脓毒症高凝血活性的另一诱导因子,但由于(1)PS 通过解密 TF 而使其活化^[9], (2)抑制 PS 后,TF 依赖的 Xa 和凝血酶生成均减少^[4], (3)细胞表面活化的 TF 存在于与 PS 重叠的区域^[10]。基于这些结果,我们认为 MP 的 TF 凝血活性依赖于膜 PS。

血细胞 PS 外翻导致的出凝血紊乱已在一些疾病中报道,如 Scott 综合征患者因^[11] PS 外翻障碍而有出血倾向。过多的 PS 能促进 Xase 和凝血酶原酶的形成,可能会导致脓毒症的高凝状态。Sun^[12]等报道脓毒症血浆能诱导血小板激活,表现为 PS 暴露、MP 释放以及凝血酶原酶活性增高。炎症通过动员骨髓中性粒细胞的释放,诱导其成熟和激活^[13]。活化的中性粒细胞会释放抗菌酶和 MP 以清除细菌^[14,15],也会激活血小板和内皮细胞,导致更多的 PS 外翻和 MP 释放。动物实验表明^[16],抑制体内 PS 会显著减少血栓的形成。我们发现脓毒症患者的血小板及红细胞的凝血时间明显缩短,其 PS 外翻比例与凝血时间呈负相关。

这些结果首次表明循环高凝血活性与血细胞 PS 外翻和 MP 释放密切相关。Zafrani^[1]等报道,脓毒症小鼠的微血管血栓与循环 MP 直接相关,但 PS 的作用未知,体内试验应集中于此。另外,注射膜联蛋白 V 抑制 MP 的 PS 时也抑制了血细胞的 PS,减少了血浆所能接触的 PS 量,为脓毒症高凝提出新的机制。进一步的研究应集中于血细胞 PS 是否与爆发性凝血酶生成相关,这与体内高凝状态直接相关^[4,10,17-19]。虽然已有研究报道中性粒细胞外陷阱(NET)^[15]和多聚磷酸盐(polyP)^[20]是促进脓毒症高凝,但这些物质的分布有限,且其凝血机制未完全清楚。与这些物质相比,PS 分布广泛,且其直接涉及凝血瀑布的关键环节。而且,Fuchs^[21]等报道,NET 形成时伴随着 PS 的暴露,但 PS 是否参与 NET 的形成决定了中性粒细胞是否释放高凝 NET。polyP 的高凝活性来源于其激活血小板,而血小板的凝血活性得益于 PS 外翻。因此,PS 参与脓毒症高凝状态的机制值得深入研究。

综上,本实验首次鉴定出脓症患者血细胞 PS 外翻和 MP 释放增多,且这种变化与脓毒症高凝状态直接相关,对评估脓毒症高凝有积极意义。降低 PS 暴露的红细胞和血小板,抑制微粒的释放或降低其水平可望为高凝治疗提供新策略^[22]。

参考文献(References)

- [1] Zafrani L, Gerotziakas G, Byrnes C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(7): 744-755
- [2] Leventis PA, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes[J]. *Annu Rev Biophys*, 2010, 39: 407-427
- [3] Fairn GD, Hermansson M, Somerhaju P, et al. Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(12): 1424-1430
- [4] Gao Chun-yan, Xie Rui, Yu Chen-yuan, et al. Procoagulant activity of erythrocytes and platelets through phosphatidylserine exposure and microparticles release in patients with nephritic syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(4): 1-9
- [5] Yang Huang-he, Kim A, David T, et al. TMEM16F forms a Ca^{2+} -activated cation channel required for lipids scrambling in platelets during blood coagulation[J]. *Cell*, 2012, 151(1): 111-122
- [6] Delabranche X, Boisrame-Helms J, Asfar P, et al. Microparticles are new biomarkers of septic shock-induced disseminated intravascular coagulopathy[J]. *Intensive Care Med*, 2013, 39(10): 1695-1703
- [7] Shapiro NI, Schuetz P, Yano K, et al. The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis [J]. *Crit Care*, 2010, 14(5): 13-13
- [8] Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, et al. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(3): 425-34
- [9] Kothari H, Pendurthi UR, Rao LV. Analysis of tissue factor expression in various cell model systems: cryptic vs. active[J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(7): 1353-1363
- [10] Zhou Jin, Shi Jia-lan, Hou Jin-xiao, et al. Phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in acute promyelocytic leukemia [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(4): 773-782
- [11] Yang H, Kim A, David T. TMEM16F forms a Ca^{2+} -activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation[J]. *Cell*, 2012, 151(1): 111-122
- [12] Sun Da-wei, Popescu NI, Raisley B, et al. Bacillus anthracis peptidoglycan activates human platelets through $\text{Fc}\gamma$ RII and complement[J]. *Blood*, 2013, 122(4): 571-579
- [13] Brown KA, Brain SD, Pearson JD, et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis[J]. *Lancet*, 2006, 368(9530): 157-69
- [14] Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes [J]. *Blood*, 2013, 121(3): 510-518
- [15] Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases [J]. *Nat Med*, 2010, 16(8): 887-896
- [16] Shi Jia-lan, Pipe SW, Rasmussen JT, et al. Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure[J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(7): 1167-1174
- [17] Bonomini M, Sirolli V, Merciaro G, et al. Red blood cells may contribute to hypercoagulability in uraemia via enhanced surface exposure of phosphatidylserine[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(2): 361-366
- [18] Rund D, Rachmilewitz E. Beta-thalassemia [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(11): 1135-1146
- [19] Fujita H, Sakuma R, Tomiyama J, et al. Increased phosphatidylserine exposure on the erythrocyte membrane in patients with polycythaemia vera[J]. *Br J Haematol*, 2011, 152(2): 238-240
- [20] Muller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphate are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo [J]. *Cell*, 2009, 139(6): 1143-1156
- [21] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps[J]. *J Cell Biol*, 2007, 176(2): 231-241
- [22] Morel O, Jesel L, Abbas M, et al. Prothrombotic changes in diabetes mellitus[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2013, 39(5): 477-488