妊娠驯化的血小板通过迁移促进孕妇高凝状态

刘家惠[1] 朱士鹏[2] 沈敏[3]
[1]武汉大学人民医院东院麻醉科,湖北武汉 430060;[2] 武汉大学人民医院肿瘤中心,湖北武汉 430060;[3] 武汉大学中南医院血液内科,湖北武汉 430071

摘要 目的:探究妊娠驯化下的血小板对血液高凝状态的影响及作用机制。方法:回顾性分析 59 例育龄妇女和 56 例孕妇的临床数据,比较 2 组临床血栓弹力图(TEG)和凝血相关数据。并对妊娠和非妊娠状态下的小鼠血小板进行迁移运动和转录组测序实验。结果:临床回顾性分析结果以及孕鼠血小板功能实验均提示妊娠期的血小板处于高凝状态,且妊娠驯化下的血小板能够迅速地粘附形成血凝块。妊娠状态会导致血小板迁移距离更长[(30.36±5.91) μm *vs.* (13.06±0.97) μm]、迁移速度更快[(1.033±0.164) μm/min *vs.* (0.348±0.027)μm/min],并且血凝块形成也更多[(37.18±2.90)% *vs.* (33.16±2.43)%]。此外,孕鼠转录组测序结果提示妊娠驯化下的血小板高度表达迁移相关基因,主要体现在血小板活化聚集、细胞粘附和细胞骨架相关基因的上调表达。结论:妊娠期的血液处于高凝状态,而在妊娠驯化下的血小板迁移速度更快、迁移距离更长,形成血块也更多。妊娠驯化血小板功能变化与血液高凝状态的关联,有助于早期识别血栓形成的高风险人群,优化治疗时机从而降低妊娠后血栓相关并发症风险。

关键词 妊娠;高凝状态;血小板激活;血小板迁移;血栓弹力图
中图分类号 R558^{+}.9 **文献标识码** A DOI 10.11768/nkjwzzzz20260208

Pregnancy-acclimated platelets promote hypercoagulable state in pregnant women through migration *LIU Jia-hui*[1], *ZHU Shi-peng*[2], *SHEN Min*[3]. [1]*Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430060, China*; [2]*Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430060, China*; [3]*Department of Hematology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei Wuhan 430071, China*
Corresponding author: SHEN Min, E-mail: melinda107@163.com

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of pregnancy-acclimated platelets on the hypercoagulable state of blood during pregnancy. Methods: A retrospective analysis was conducted on clinical data from 59 women of reproductive age and 56 pregnant individuals. Thromboelastography (TEG) and coagulation data between the two cohorts, mouse platelet migration and transcriptome data were analyzed and compared between two groups. Results: Blood in pregnant women exhibited hypercoagulable state and characterized by extended migration distance [(30.36±5.91)μm *vs.* (13.06±0.97)μm]. Pregnancy markedly accelerated mouse platelet migration [(1.033±0.164) μm/min *vs.* (0.348±0.027) μm/min] and increased clot formation capacity [(37.18±2.90)% *vs.* (33.16±2.43)%]. Transcriptomic profiling revealed gestational adaptation primed platelets with a promigratory genetic signature, evidenced by the activation/aggregation of platelet and the upregulation of integrin-mediated cell adhesion and cytoskeletal remodeling pathway. Conclusion: The hypercoagulable state in pregnancy is mechanistically linked to gestational adaptation of platelet dynamics, characterized by extended migration distance, accelerated migratory velocity and enhanced thrombogenic potential. This study reveals the link between gestational platelet adaptation and hypercoagulable states, facilitating the early identification of populations at elevated risk for thrombogenesis, thereby optimizing the antithrombotic prophylaxis timing to reduce pregnancy-related thrombotic events.

Key words Pregnancy; Hypercoagulable state; Platelet activation; Platelet migration; Thromboelastography

妊娠期人体凝血状态向高凝状态转变[1]。在正常的第三孕期,可以观察到血小板减少现象。这是由妊娠期间多种生理变化引起的,包括母体血浆体积扩张导致的血小板稀释,以及胎盘循环中血小板的加速隔离和消耗[2]。血小板功能障碍相关的 Bernard-Soulier 综合征患者有 73% 的孕妇发生原发或继发性出血,而 Glanzmann 病的产妇中有 50% 在分娩时发生出血[3]。母体血小板可能是最早进入

通信作者:沈敏,E-mail:melinda107@163.com,湖北省武汉市武昌区东湖路 169 号

绒毛间隙的母体血细胞[4~6]。血小板激活后导致血小板的紧密粘附、聚集,并形成止血性血小板栓[7]。异常的血小板聚集会导致多种妊娠并发症,包括反复流产、宫内生长迟缓以及高血压等[8~11]。

血栓弹力图(thromboelastography,TEG)和血小板聚集实验能很好地反映血小板功能和机体的凝血功能[12,13]。细胞迁移爬行是一个在时空上受到调控的系统。Gaertner 等[14]建立了一个复杂且全面的血小板运动系统,详细地揭示了血小板迁移的动态过程。本实验发现孕期血小板能够更快、更长距离地迁移,并迅速形成血凝块。血小板虽然自身无法进行转录,但可通过其细胞膜吞噬外周血中的核酸和蛋白,进而赋予自身新的特性。这一点在肿瘤和妊娠过程中尤为明显,也因此称之为肿瘤或者妊娠驯化的血小板。本研究中血小板转录组分析显示,血小板激活、凝血、细胞骨架和迁移运动等相关基因和通路在妊娠驯化下被富集,在一定程度上为揭示孕妇高凝状态提供了重要的依据,为后续靶向防治妊娠高凝所致的并发症提供了潜在的理论依据。

资料与方法

1. 研究对象:收集 2019 年 12 月至 2021 年 12 月武汉大学人民医院 59 例育龄妇女以及 56 例孕妇的 TEG 临床资料和血小板聚集相关资料。排除标准:使用抗凝或抗血小板药物及其他干扰患者凝血功能的药物、妊娠高血压、妊娠糖尿病、急慢性脏器功能障碍、各种血液系统疾病、恶性肿瘤以及自身免疫性疾病等。本研究经医院医学伦理委员会批准(WDRY2022-K037),所有研究对象签署知情同意书。

2. 方法

(1)鼠源洗涤血小板分离、迁移和轨迹分析:取正常未孕和妊娠 10 周 C57BL/6 小鼠外周血。血小板分离和迁移实验按照 Florian 的实验方案和本研究团队既往已发表实验方案进行[11,12]。小鼠心脏穿刺取血(0.5 ~ 1 mL/只)后加入等体积的 Tyrode 缓冲液,常温下 200 转/min 离心 20 min 后取上清。加入 3 mL Tyrode 缓冲液后 1 200 g,常温离心10 min 即可得到洗涤血小板。将 10×10^3/μL 小鼠血小板与 30μg/mL 酪蛋白、38μg/mL 人纤维蛋白原、200μM 氯化钙($CaCl_2$)、2μM U46619 (Enzo life science) 和 4μM 腺苷二磷酸(ADP,Sigma) 在培养皿中使用 Tyrode 缓冲液重悬为总体积 240μL 实验体系。血小板运动轨迹分析采用 Fiji 软件进行,血小板爬行速率 = 爬行距离/爬行时间。

(2)转录组测序及分析:按照RNA试剂盒(Qiagen RNeasy Micro Kit,Cat. no. 74004)的方案提取血小板衍生的 mRNA,用 Illumina HiSeq 进行测序。数据分析流程:①原始数据质控:使用 FastQC 软件评估原始读段(reads)质量,剔除低质量序列;②比对与定量:使用参考基因组小鼠基因组(GRCm39/mm39),比对并计算基因表达量;③差异表达分析:基 DESeq2 进行组间差异基因筛选(阈值:|log2FC| ≥1,FDR < 0.05);④功能富集分析:使用 ClusterProfiler 软件包对差异基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集,重点关注血小板活化、迁移和凝血等相关通路。上述所有数据分析方案均参考本课题组既往研究方法[15]。

3. 统计学分析:采用 GraphPad Prism 9.0 统计学软件进行分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示。采用非参数 t 检验分析血小板凝血功能参数之间的差异,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 孕妇血液处于高凝状态:临床数据显示孕妇 TEG 的 α 角较未孕者更大[(69.86 ± 0.61) *vs.* (67.05 ± 1.04),$P=0.0198$],见图 1A,其余无明显统计学差异(图 B ~ F)。血小板聚集试验结果显示,孕妇和未孕者二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)激活的平均血小板聚集率(average aggregation rate,AvrAR)分别为(67.49% ± 3.50%)和(55.28% ± 3.50%),$P=0.016$,见图 1G;最大血小板聚集率(maximum aggregation rate,MaxAR)分别为(71.35% ± 3.22%)和(60.47% ± 3.41%),$P=0.0091$,见图 1H;最大聚集时间(maximum aggregation time,MaxAT)虽无统计学差异但仍有上升趋势,见图 1I;花生四烯酸(arachidonic acid,AA)激活的情况下平均血小板聚集率、最大聚集率和最大血小板聚集时间 2 组间虽然无统计学差异,但妊娠状态下也呈现出升高的趋势,见图 1J-L。

2. 小鼠血小板迁移促进血凝块/血栓形成:在本血小板爬行体系中使用血栓素 A2(thromboxan A2,TXA2)以及 ADP 和钙离子对血小板进行激活处理。激活后的血小板可以通过在覆盖有纤维蛋白原的器皿底部进行贴壁、伪足形成、伸展到爬行的全部过程。本研究发现,妊娠小鼠的血小板在爬行早期即可形成血凝块。经过妊娠驯化后,血小板迁移的速度更快,怀孕组和未孕组分别为[(1.033 ±

0.164）μm/min *vs.*（0.348 ± 0.027）μm/min］，并且可以爬行更长的距离，妊娠组和对照组分别为［（30.36 ± 5.91）μm *vs.*（13.06 ± 0.97）μm］，见图 2A ~ B。此外，孕鼠血小板比对照组血小板可形成更多的血凝块［（37.18 ± 2.90）% *vs.*（33.16 ± 2.43）%］，见图 2C ~ D。故认为妊娠驯化下的血小板血栓形成能力会更强，并能吸引更多血小板聚集成较大的血栓。

3. 小鼠血小板 bulk mRNA-seq 分析：对正常和妊娠驯化下的血小板进行 mRNA 测序后，其中差异基因表达热图展示出怀孕组和未孕组中上调以及下调的基因，见图 3A。对差异基因进行 GO 富集分析提示这些差异基因主要参与妊娠血小板在血液凝固、血小板活化、细胞-基质粘附、整合素介导信号通路以及细胞迁移等生物学活动，见图 3B。富集分析 cnet 图显示妊娠血小板高表达调控血小板聚集粘附基因（Thbs1，vWF，Itga2b，Mmrn1 等）、细胞迁移相关基因以及细胞骨架基因（Actg1，Pecam1，Flna，Fermt3，Cnn2，Tln1 等），见图 3C。因此，认为妊娠驯化下的血小板能被活化，并可通过激活血液凝固、细胞迁移粘附及整合素信号通路等促进高凝状态。

讨　论

正常妊娠期间出于自我保护的需要，避免分娩时胎盘剥离和产后引起的出血，妊娠期间血液常表现为高凝状态[1]。一般来说，α 角增大和 K 值减小提示高凝血栓风险，本文收集的临床 TEG 数据表明，孕妇 TEG 的 α 角更大，K 值有减小趋势但无显著统计学差异，可能是入组患者的数量偏少所致，后续研究可能进一步扩大临床样本量。而血小板聚集试验显示，妊娠驯化下 ADP 激活后 AvrAR 和 MaxAR 均有增加。

本研究初步揭示了血小板在妊娠驯化后的凝血功能及转录组学的改变，提示妊娠后血小板更容易被激活，迁移速度更快，并且在受到刺激时更容易形成血栓，且大量血小板团块可以融合形成更大的团块，并且依然可以继续迁移。这一发现与已知的体内脉管血栓迁移的现象相吻合[16,17]，也从侧面证明本血小板爬行模型具有一定的临床参考价值。

小鼠血小板爬行试验表明，血小板激活后整合

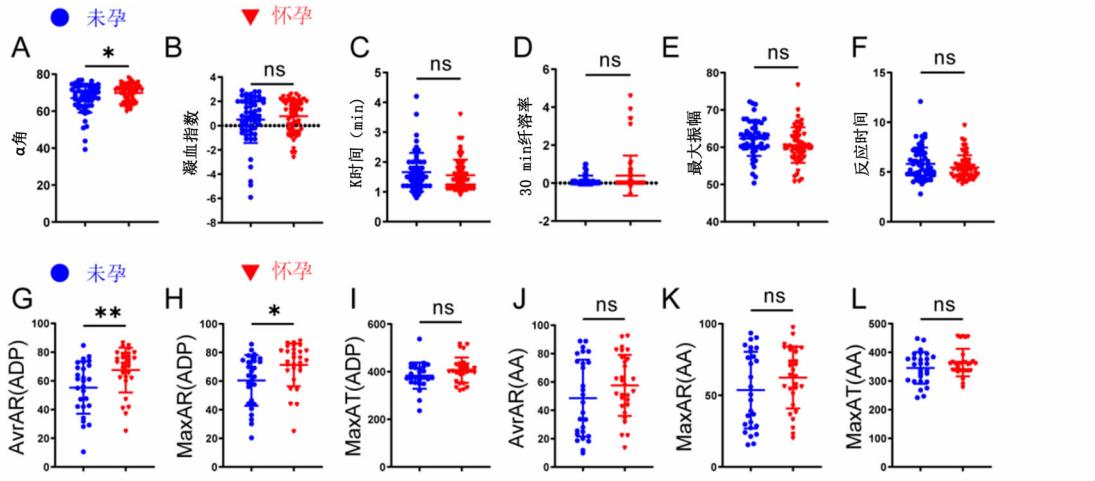


图 1　孕妇及未孕妇女血栓弹力图及血小板凝集试验（A ~ F：血栓弹力图数据统计；G ~ L：血小板聚集试验结果，$^{*}P<0.05$；$^{**}P<0.01$）

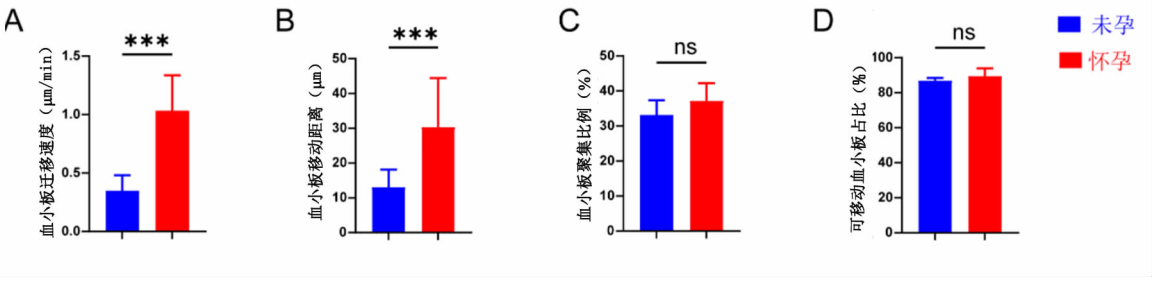


图 2　小鼠血小板运动实验（A：血小板爬行速度；B：血小板爬行距离；C ~ D：聚集血小板占比；$^{***}P<0.001$）

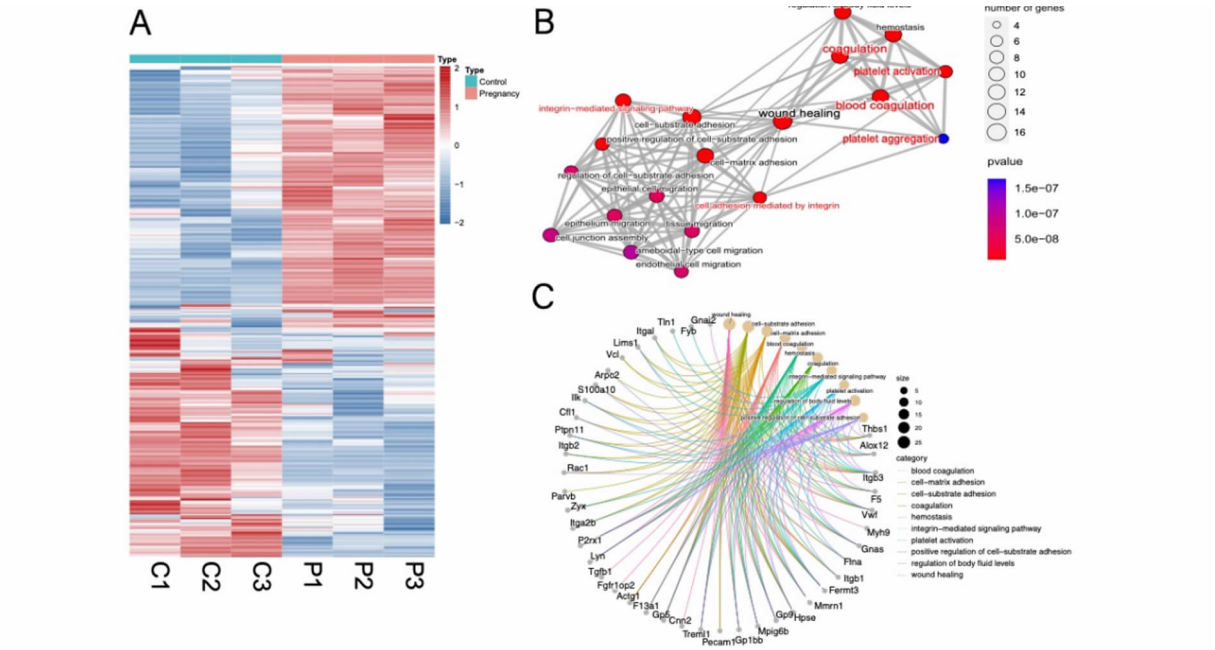


图 3 未孕和妊娠小鼠血小板全转录组测序[A:差异基因热图提示上调和下调的基因(红色代表上调,蓝色代表下调);B: GO 富集分析 net 图;C:基因富集分析 cnet 图]

素连接了外部基质和内部细胞骨架,从而诱发了细胞机械力的产生并最终驱动爬行,从机理上分析 ADP 可诱导血小板形状改变、储存颗粒分泌、Ca^{2+} 流入和细胞内动员,以及抑制刺激的腺苷酸环化酶活性[18]。Ca^{2+} 内流也在这一过程有着重要作用,Gaertner 等[14]发现 Ca^{2+} 浓度在增加 100 倍的情况下依然可以持续刺激血小板的爬行运动。但只有这些刺激因素仍然不足以使血小板在覆盖了胶原蛋白的底壁上爬行,TXA2 作用主要在于二次凝集反应中。TXA2 和 ADP 均能与“G 蛋白偶联受体”结合,并通过募集额外的血小板来促进血栓形成介导损伤部位修复[19~21]。本研究证实妊娠期的血液处于高凝状态;通过孕鼠血小板体外试验观察到并非所有的血小板都能迁移,但妊娠驯化后的小鼠血小板迁移距离和速度高于未孕小鼠,这提示妊娠可能作为影响血液凝固的因素。

妊娠状态下机体所产生的多种凝血因子刺激了血小板激活,并且诱导更多的血小板发生聚集,这种级联放大效应最终导致了血小板的异常激活[22]。本研究对小鼠的血小板进行了 RNA-seq 数据分析,结果发现妊娠驯化后血小板的变化主要发生在凝血相关信号通路的异常激活。此外,通路富集分析发现妊娠驯化的血小板主要改变发生在血液凝集(P2rx1, Thbs1, Alox12, Itgb3, F5, vWF, Gnas, Lyn, Gp1bb, Gp5, Mpig6b, Gp9, Hpse, Mmrn1, Fermt3, Gnas)、血小板激活(Alox12, Itgb3, vWF, Gnas, Fermt3, Mmrn1, Mpig6b, Gp9, Gp1bb, Treml1, Gp5, Lyn)、整合素介导的粘附作用(Flna, Fyb, Tln1, Itgal, Lims1, S100a10, Ptpn11, Itgb2, Zyx, Itga2b, P2rx1, Lyn, Gp5, Itgb3, Gnas, Itgb1, Fermt3, Mmrn1, Hpse, Gp9, Mpig6b, Gp1bb, Treml1, Gp5, Lyn P2rx1)以及细胞-基质粘附(Itgal, Lims1, Vcl, Arpc2, S100a10, Cfl1, Ptpn11, Itgb2, Rac1, Parvb, Zyx, Itga2b, Actg1, Gp5, Pecam1, Hpse, Fermt3, Itgb1, Flna, Vwf, Itgb3, Thbs1)等通路。由此可见,妊娠驯化重塑了血小板的激活与黏附网络,使其处于一种“预激活”状态。转录组结果显示,血液凝集、血小板激活及整合素介导粘附通路显著增强,涉及 P2rx1、GPIb 复合体、Lyn 以及 Itga2b/Itgb3-Fermt3 轴等关键节点,提示血小板的激活阈值下降并伴随信号放大能力增强。同时,F5、Thbs1 和 vWF 等凝血相关因子上调,表明血小板在血栓形成与稳定中的参与度增加。功能实验进一步证实妊娠驯化后血小板爬行与粘附能力增强,与整合素激活程序上调相一致。总体而言,妊娠驯化并非单一因子改变,而是多层级凝血-粘附网络的协同重构,这种网络级增强可能构成妊娠期生理性高凝状态的重要细胞学基础。另外,本研究未使用孕妇血小板进行功能和转录组实验,其主要原因是人外周血小板的数量要远少于小鼠血小板。并且孕妇血小板更容易凝集,取材难度较大。

妊娠期血液高凝是许多围产期并发症的根源，也是临床上亟待解决的问题。正常妊娠 TEG 以及血小板凝集试验均证明了孕妇血液处于高凝状态。本研究通过临床 TEG 检测数据并结合小鼠血小板爬行系统和 RNA-seq 测序，发现妊娠小鼠外周血血小板高表达血小板聚集以及迁移粘附等相关基因，揭示了妊娠期血小板更易形成血栓的潜在机制，为防治孕妇高凝状态提供了潜在的理论依据。

尽管本研究从临床 TEG 数据、体外血小板功能实验及转录组学层面系统揭示了妊娠驯化后血小板功能与分子网络的重塑，但仍存在若干局限性。首先，临床样本量相对有限，部分 TEG 指标虽呈趋势性变化但未达到统计学差异，未来需扩大样本规模以提高统计效能；其次，本研究主要基于体外功能实验与转录组分析推断机制，尚缺乏体内血栓形成模型的直接验证，因此血小板迁移增强是否在体内真实参与血栓形成仍需进一步证实；再次，RNA-seq 数据反映的是转录水平变化，而血小板为无核细胞，其蛋白表达及翻译后修饰调控同样重要，未来需结合蛋白质组学及磷酸化组学分析以完善分子机制；最后，妊娠相关高凝状态是凝血、抗凝及纤溶系统综合失衡的结果，本研究主要聚焦于血小板层面，尚未系统评估抗凝与纤溶通路的协同变化。上述问题提示，本研究揭示的机制仍需在更完整的生理系统框架中进一步验证。

参 考 文 献

1 张启迪，魏玉梅，刘兴会，等. 凝血功能随孕周及年龄的变化及其参考值[J]. 中华妇产科杂志，2022，57(10)：740-745.

2 Reese JA，Peck JD，Yu Z，et al. Platelet sequestration and consumption in the placental intervillous space contribute to lower platelet counts during pregnancy[J]. Am J Hematol，2019，94(1)：E8-E11.

3 Civaschi E，Klersy C，Melazzini F，et al. Analysis of 65 pregnancies in 34 women with five different forms of inherited platelet function disorders[J]. Br J Haematol，2015，170(4)：559-563.

4 Forstner D，Maninger S，Nonn O，et al. Platelet-derived factors impair placental chorionic gonadotropin beta-subunit synthesis[J]. J Mol Med (Berl)，2020，98(2)：193-207.

5 Guettler J，Forstner D，Cvirn G，et al. Maternal platelets pass interstices of trophoblast columns and are not activated by HLA-G in early human pregnancy[J]. J Reprod Immunol，2021，144：103280.

6 Guettler J，Forstner D，Gauster M. Maternal platelets at the first trimester maternal-placental interface-small players with great impact on placenta development[J]. Placenta，2022，125：61-67.

7 Burnouf T，Strunk D，Koh MB，et al. Human platelet lysate：Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?[J]. Biomaterials，2016，76：371-387.

8 Blomqvist LRF，Strandell AM，Jeppsson A，et al. Arachidonic acid-induced platelet aggregation and acetylsalicylic acid treatment during pregnancy in women with recurrent miscarriage，a post hoc study[J]. Platelets，2022，33(2)：278-284.

9 Flood K，Peace A，Kent E，et al. Platelet reactivity and pregnancy loss[J]. Am J Obstet Gynecol，2010，203(3)：281. e1-e5.

10 Terai P，Tongsong T，Jatavan P. Platelet function in newborns and the women affected by pregnancy-induced hypertension[J]. J Matern Fetal Neonatal Med，2022，35(26)：10466-10471.

11 Shi Y，Xu D. Platelet distribution width and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss：a meta-analysis[J]. J Assist Reprod Genet，2023，40(7)：1523-1531.

12 Amgalan A，Allen T，Othman M，et al. Systematic review of viscoelastic testing (TEG/ROTEM) in obstetrics and recommendations from the women's SSC of the ISTH[J]. J Thromb Haemost，2020，18(8)：1813-1838.

13 Xie X，Wang M，Lu Y，et al. Thromboelastography (TEG) in normal pregnancy and its diagnostic efficacy in patients with gestational hypertension，gestational diabetes mellitus，or preeclampsia[J]. J Clin Lab Anal，2021，35(2)：e23623.

14 Gaertner F，Ahmad Z，Rosenberger G，et al. Migrating platelets are mechano-scavengers that collect and bundle bacteria[J]. Cell，2017，171(6)：1368-1382.

15 Liu Z，Wang J，Liao F，et al. Tumor-educated platelets facilitate thrombus formation through migration[J]. Front Oncol，2022，12：857865.

16 Christoph R，Eberhard S，Justus FK，et al. Thrombus migration in ischemic stroke due to large vessel occlusion：a question of time[J]. Neurointerv Surg，2023，15(e2)：e216-e222.

17 Tomoyuki O，Bijoy KM，Fahad SA，et al. Thrombus migration and fragmentation after intravenous alteplase treatment：the INTERRSeCT study[J]. Stroke，2021，52(1)：203-212.

18 Liu J，Lu F，Ithychanda SS，et al. A mechanism of platelet integrin αIIbβ3 outside-in signaling through a novel integrin αIIb subunit-filamin-actin linkage[J]. Blood，2023，141(21)：2629-2641.

19 Stefan O. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors[J]. Circ Res，2006，99(12)：1293-1304.

20 Zou J，Swieringa F，de Laat B，et al. Reversible platelet Integrin αIIbβ3 activation and thrombus instability[J]. Int J Mol Sci，2022，23(20)：12512.

21 Jeanne A，Sarazin T，Charlé M，et al. Towards the therapeutic use of thrombospondin 1/CD47 targeting TAX2 peptide as an antithrombotic agent[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2021，41(1)：e1-e17.

22 Bálint A，Árpád FK，Attila M，et al. Platelet-derived extracellular vesicles may contribute to the hypercoagulable state in preeclampsia[J]. J Reprod Immunol，2021，148：103380.

(2024-12-20 收稿　2026-03-12 修回)