

TF+MP 和 PS 在急性早幼粒细胞白血病血栓形成中的作用

郭菲 孟冬梅 张柠 高庆峰 陆帧

作者单位:150088 哈尔滨市,黑龙江省农垦总局总医院检验科

【摘要】 目的 探讨急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)患者乏血小板血浆中表达组织因子微粒(tissue factor microparticles, TF+MP)的数量、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)及 D-二聚体(D-dimer, D-D)的水平变化,并研究 TF+MP 与 D-D 的相关性。方法 选择 APL 患者 30 例,其中 APL 合并弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)患者 22 例(APL-DIC 组),APL 未合并 DIC 患者 8 例(APL-非 DIC 组)。另外选取 30 例健康体检者作为正常对照组。采用流式细胞术检测 APL 患者外周血 TF+MP 的数量;采用酶联免疫吸附法检测血浆中 PS 的水平;采用全自动凝血分析仪检测 D-D 的水平,并对所有数据进行统计分析。结果 三组间 TF+MP、PS 及 D-D 水平差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。APL-DIC 组 TF+MP 数量、PS 及 D-D 水平均明显高于 APL-非 DIC 组和正常对照组,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。APL-DIC 组治疗前 TF+MP 数量和 PS 水平均高于治疗后,差异均有统计学意义(P 均 <0.05);APL-非 DIC 组治疗前后各指标差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。APL-DIC 组 TF+MP 数量与 D-D 水平呈正相关($r=0.63, P<0.05$)。结论 APL 合并 DIC 患者外周血中 TF+MP 数量和 PS 水平明显升高,其在血栓形成过程中发挥重要作用,可作为判断血栓形成倾向的实验室指标。

【关键词】 急性早幼粒细胞白血病;组织因子微粒;磷脂酰丝氨酸;血栓形成;D-二聚体

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.04.007

Role of TF+MP and PS in thrombogenesis of acute promyelocytic leukemia

GUO Fei, MENG Dong-mei, ZHANG Ning, et al. Department of Clinical Laboratory, Heilongjiang Provincial Hospital of General Bureau of Agriculture, Harbin 150088, China

【Abstract】 Objective To explore the level change of tissue factor microparticles (TF+MP), phosphatidylserine (PS) and D-dimer (D-D) in platelet-free plasma of acute promyelocytic leukemia (APL) patients, and investigated the relationship between TF+MP and D-D in coagulation disorders of APL patients. **Methods** 30 APL patients were selected, including 22 APL patients with DIC (APL-DIC group), 8 APL patients without DIC (APL-nonDIC group), and 30 cases health check-up as a normal control group. Levels of TF+MP were detected by flow cytometry. Levels of PS were measured by ELISA. D-D were detected by automatic blood coagulation analyser. All data were analyzed by statistical software. **Results** There were all had statistical significance in the differences of TF+MP, PS and D-D levels among three groups (P all <0.05). Levels of TF+MP, PS and D-D in APL-DIC group were all higher than in APL-nonDIC group and normal control group, and the differences all had statistical significance (P all <0.05). The differences in levels of TF+MP and PS all had statistical significance in the APL-DIC group after remission and before therapy (P all <0.05). There were no statistical significance in the differences of TF+MP and PS levels in the APL-non DIC group before and after therapy ($P>0.05$). The level of TF+MP in APL-DIC patients was significantly correlated with D-D ($r=0.63, P<0.05$). **Conclusion** The levels of TF+MP and PS are higher in APL patients with DIC, which play important roles in mechanism of APL complicated with DIC. TF+MP and PS are laboratory index for thrombophilia judgement.

【Key words】 Acute promyelocytic leukemia; Tissue factor microparticles; Phosphatidylserine; Thrombogenesis; D-dimer

急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)在急性髓系白血病中发病率较高,

常见于青年人。随着对 APL 病理机制的不断认识和治疗方法的改进,APL 患者的缓解率和治愈率得到

了很大的提高。尽管取得了这些成就,但 APL 患者早期病死率仍然很高。其中出血和弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 并发病的发病机制仍然是 APL 的研究重点。病态的早幼粒细胞大量增生并释放到外周血,同时伴有细胞的凋亡,细胞表面大量脱落的微粒 (microparticles, MP) 与患者血液的高凝状态密切相关。目前已经证实,MP 不仅仅是细胞的脱落物,而是具有多种生物活性的细胞成分。MP 可以作为凝血机制异常的一种新的生物学标志物和调节物质,参与血栓形成过程。APL 并发 DIC 的概率很高,大约 80% 的 APL 患者在发病早期就已经存在凝血功能异常。目前对于 APL 的研究主要集中于其免疫表型、遗传特性和治疗方法,对 APL 患者外周血组织因子微粒 (tissue factor microparticles, TF+MP) 和磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 水平的研究较少。因此研究 APL 患者外周血 TF+MP 数量和 PS 水平的变化特征对探究 APL 凝血功能紊乱的发病机制具有重要的意义。

本文利用流式细胞术、酶联免疫吸附等方法,研究 APL 患者外周血 TF+MP 数量和 PS 的水平变化情况以及 TF+MP 与 D-二聚体 (D-dimer, D-D) 的相关性,旨在阐明 MP 在 APL 患者血栓形成中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2010 年 12 月-2012 年 12 月于哈尔滨医科大学附属第二医院门诊就诊的 APL 患者 30 例 (APL 诊断参照 FAB 标准^[1])。其中合并 DIC 患者 22 例 (APL-DIC 组),男 12 例,女 10 例,平均年龄 (30.3±11.2) 岁;未合并 DIC 患者 8 例 (APL-非 DIC 组),男 3 例,女 5 例,平均年龄 (25.7±9.8) 岁。选择同期没有凝血障碍和血栓危险因素的健康体检者 (血常规、凝血象相关检查示正常) 30 例为正常对照组,其中男性 15 例,女性 15 例,平均年龄 (28.6±6.7) 岁。入选病例采用全反式维甲酸+亚砷酸进行诱导分化治疗,达到完全缓解^[1]后给予亚砷酸联合化疗的序贯疗法,亚砷酸及化疗各 5 次,其中包括一次大剂量阿糖胞苷及至少一次的鞘内注射 (甲氨蝶呤+阿糖胞苷+地塞米松三联化疗),巩固强化结束后不进行维持治疗,每半年复查 PML/RARα 融合基因。30 例 APL 患者缓解率为 100%。

1.2 仪器和试剂 FITC-IgG1 同型抗体及 FITC-CD142 单克隆抗体 (SEROTECH 公司);直径 3.0 μm 和 0.8 μm 标准乳胶微球 (美国 Sigma 公司);人 PS-

ELISA 检测试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司);A-CL-TOP 全自动凝血分析仪及 D-D 配套试剂盒 (美国 Beckman-Coulter 公司);流式细胞分析仪 (美国 BD 公司 FACSsort);Multiskan MK3 型酶标仪 (Thermo Labsystems 公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本制备 取部分血浆直接用于 D-D 的检测。获得外周血循环 MP 采用梯度离心的方式:将试管于室温以离心半径 13.5 cm, 1500 r/min 离心 15 min, 获得富血小板血浆,取上清液于 EP 管,离心 (3000 r/min, 15 min), 获得乏血小板血浆,此时血浆中为循环 MP。获得的循环 MP 为保留其活性状态,储存于 -80 °C 冰箱,备用。分别用于 TF+MP 和 PS 的检测。

1.3.2 流式细胞术检测 TF+MP FITC-CD142 单抗用于标记 TF+MP。室温避光孵育 30 min,检测前加入直径为 0.8 μm 和 3 μm 标准微球各 5 μl。用 0.8 μm 的标准微球设定前向检测区,使用流式细胞仪检测 TF+MP CD142-FITC 的表达。对所设门内 (MP 直径在 0~0.8 μm) 的颗粒进行分析,TF+MP 的界定:直径范围在 0~0.8 μm,表面标记 CD142 阳性。3.0 μm 标准微球用于 MP 的计数,当计数达 10 000 个时停止检测,通过荧光直方图计算位于 0.8 μm 按下式计算微球检测值^[1,2]。

$$\text{TF+MP 的绝对数} = 3.0 \mu\text{m 微球密度} (980/\mu\text{L}) \times \frac{\text{CD142 阳性细胞检测值}}{\text{血浆稀释倍数}} \times 3.0 \mu\text{m 微球检测值}$$

1.3.3 ELISA 法检测 PS 的水平 应用 ELISA 法测定标本中 PS 的水平。用纯化的 PS 抗体包被微孔板,制成固相抗体,向包被单抗的微孔中加入 TF,再与 HRP 标记的 PS 抗体结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 PS 呈正相关。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值),通过标准曲线计算样品中 PS 的水平。操作过程严格按操作说明书进行。

1.3.4 全自动凝血分析仪检测 D-D 利用 ACL-TOP 全自动凝血分析仪对 D-D 进行检测,具体操作过程按仪器操作规程和配套试剂的使用说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用方差分析,两组比较采用 *t* 检验,两样本相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结果

2.1 APL 组与正常对照组外周血 TF+MP 数量、PS 及 D-D 水平比较 三组间 TF+MP 数量、PS 及 D-D 水平差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。APL-DIC 组 TF+MP 数量、PS 及 D-D 水平均明显高于 APL-非 DIC 组和正常对照组,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 1。

2.2 APL 患者治疗前后外周血 TF+MP 数量及 PS 水平比较 30 例 APL 患者中,APL-DIC 患者治疗前 TF+MP 数量及 PS 水平与治疗前相比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。而 APL-非 DIC 组患者治疗前后各指标差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。见表 2。

表 2 APL-DIC 患者治疗前后外周血 TF+MP 数量及 PS 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TF+MP(μL)	PS(ng/mL)
APL-DIC 治疗前组	22	83.26 \pm 19.34	68.56 \pm 6.24
APL-DIC 治疗后组	22	37.63 \pm 6.31	10.32 \pm 2.86
t 值	-	124.65	138.67
P 值	-	0.000	0.000

2.3 APL-DIC 患者 TF+MP 数量与 D-D 水平的相关性分析 经 Pearson 相关性分析得出,APL-DIC 组 TF+MP 数量与 D-D 水平呈正相关($r=0.63, P=0.003$)。

3 讨论

MP 在血栓形成中的作用正逐渐受到人们的重视。MP 表面所携带的生物活性物质在 APL 的凝血功能紊乱中发挥着重要的作用。在疾病进展中,TF+MP 数量的变化可能反映 APL 患者体内不同程度的血栓形成倾向。

当细胞激活或凋亡时,会向外释放 MP,其主要具有促凝、促血管生成、促炎症等作用。在各种细胞源性的 MP 中,TF+MP 具有较高的促凝活性。在凝血过程中,TF 是始动因子,在启动和调节凝血反应中,其

与丝氨酸蛋白酶因子 VII/VIIa 形成双分子复合物,作为体内凝血的启动因子发挥重要的作用。最近,研究者^[3-5]在并发急性深静脉血栓的癌症患者体内检测到 TF+MP 水平明显升高。

APL 患者体内存在大量的 TF+MP,激活体内凝血系统,消耗大量的血小板和凝血物质,使 APL 患者具有出血倾向,从而加重 DIC。本文研究结果显示,未合并 DIC 的 APL 患者治疗前后 TF+MP 数量比较差异无统计学意义,可能提示未合并 DIC 的 APL 患者外周血促凝物质的量未达到启动外源性凝血途径的水平。而合并 DIC 的 APL 患者 TF+MP 的数量显著高于未合并 DIC 的 APL 患者和健康人群,且合并 DIC 的 APL 患者治疗前的 TF+MP 数量显著高于治疗后,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05),说明 TF+MP 启动外源性凝血途径,参与 APL 患者的血栓形成。Pearson 相关分析结果显示,合并 DIC 的 APL 患者 TF+MP 的数量与 D-D 水平呈正相关($P< 0.05$),进一步说明 TF+MP 与 APL 患者血栓形成密切相关。

细胞活化后,向外释放 MP,MP 的共同特征是表面携带 PS。患者外周血中的 PS 来源于不同细胞类型。MP 表面高浓度的 PS 作为各种功能性膜受体,随着 MP 的释放,为参与凝血反应的复合物提供更大的反应环境,增加凝血反应中相关酶复合物结合机会,在血管局部凝血酶、辅助因子和底物的浓度增高,能够促进止血。本文研究利用 ELISA 法检测 APL 患者外周血中的 PS 水平变化情况,结果显示,合并 DIC 的 APL 患者 PS 水平显著高于未合并 DIC 的 APL 患者和健康人群,且合并 DIC 的 APL 患者治疗前后的 PS 水平差异有统计学意义,而未合并 DIC 的 APL 患者治疗前后 PS 水平差异无统计学意义。Jy 等^[6]研究发现,APL 患者外周血中 APL 细胞的促凝活性在全反式维甲酸治疗后出现明显的下降,促凝活性的变化与 APL 细胞上表达的 PS 密切相关。因此提示监测 PS 的水平可能有助于提示患者血栓形成倾向,有助于临床医师选择合适的治疗方

表 1 APL 患者外周血 TF+MP 数量、PS 及 D-D 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TF+MP(μL)	PS(ng/mL)	D-D(ng/mL)
正常对照组	30	26.38 \pm 7.59*	5.82 \pm 0.56*	78.84 \pm 14.82*
APL-DIC 组	22	83.26 \pm 19.34	68.56 \pm 6.24	2324.78 \pm 324.45
APL-非 DIC 组	8	42.73 \pm 9.82*	20.27 \pm 9.85*	353.98 \pm 65.76*
F 值	-	52.876	85.89	67.34
P 值	-	0.000	0.000	0.000

注: *与 APL-DIC 组比较, $P< 0.05$

案,及时纠正患者的凝血功能异常。

综上所述,TF+MP 与 PS 对 APL 凝血机制的研究有重要的临床意义。TF+MP 及 PS 的水平变化预示 APL 患者体内病理生理变化,TF+MP 的数量与 APL 患者血栓形成程度呈正比,而 PS 水平可反映 APL 患者的血栓形成倾向,有助于临床治疗及监测。本文研究为探讨 TF+MP 及 PS 在 APL 患者凝血功能障碍中的作用提供了实验依据,对进一步研究 APL 合并 DIC 的发病机制具有重要的意义。

4 参考文献

- 1 Robert S, Poncelet P, Lacroix R, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics-FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies. *J Thromb Haemost*, 2009, 7: 190-197.
- 2 Sellam J, Proulle V, Jünger A, et al. Increased levels of circulating

microparticles in primary Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11: R156.

- 3 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: 520-527.
- 4 Manly DA, Wang J, Glover SL, et al. Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res*, 2010, 125: 511-512.
- 5 Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, et al. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2009, 7: 1421-1423.
- 6 Jy W, Horstman LL, Jimenez JJ, et al. Measuring circulating cell-derived microparticles. *Thromb Haemost*, 2004, 2: 1842-1851.

(收稿日期:2013-10-08)

(本文编辑:陈淑莲)

(上接第 249 页)

- 6 Kasof GM, Comes BC, et al. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem*, 2001, 276: 3238-3246.
- 7 Shin SJ, Hyjek E, Early E, et al. Intratumoral heterogeneity of Her-2/neu in invasive mammary carcinomas using fluorescence in situ hybridization and tissue microarray. *Int J Surg Pathol*, 2006, 14: 279-284.
- 8 Joensuu H, Bono P, Kataja V, et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 5685-5692.
- 9 《乳腺癌 HER2 检测指南》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2009 版). *中华病理学杂志*, 2009, 38: 836-840.
- 10 Korkaya H, Wicha MS. HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye. *Cancer Res*, 2013, 73: 3489-3493.
- 11 Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, et al. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, 13: 1558-1568.

- 12 Santen R, Cavalieri E, Rogan E, et al. Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155: 132-140.
- 13 唐平,魏兵,杨雯娟,等. 乳腺癌预后/预测因子. *中华病理学杂志*, 2011, 40: 73-76.
- 14 Cuzick J, Sestak I, Bonanni B, et al. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet*, 2013, 381: 1827-1834.
- 15 Elisabeth L, Fabrice A, Frederique S, et al. Ki-67: level of evidence and methodological consideration for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer Res Treat*, 2012, 132: 895-915.
- 16 Kontzoglou K, Palla V, Karaolani G, et al. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis. *Oncology*, 2013, 84: 219-225.
- 17 Pathmanathan N, Balleine RL. Ki67 and proliferation in breast cancer. *J Clin Pathol*, 2013, 66: 512-516.

(收稿日期:2013-09-11)

(本文编辑:张志成)