

组织因子及组织因子微粒在急性髓系白血病中的检测及临床意义*

白斯君¹ 杨林花¹ 董春霞¹ 郭志萍¹ 葛晓燕¹ 康建民¹
张建华¹ 任方刚¹ 张耀芳¹ 侯彦飞¹ 杨晨¹

【摘要】 目的:通过检测急性髓系白血病(AML)患者血浆中组织因子(TF)及组织因子微粒(MP-TF)的表达,探讨其在 AML 凝血异常中的临床意义。**方法:**选择 AML 住院患者 64 例(AML 组),其中急性早幼粒细胞白血病(APL)22 例,非 APL 42 例;并发弥散性血管内凝血(DIC)22 例,未并发 DIC 42 例。非 APL 中 13 例治疗后骨髓完全缓解(CR),APL 中 15 例治疗后骨髓达 CR,包含 12 例 APL 并发 DIC 患者。对照组 34 例均为健康献血员。采用流式细胞术检测 MP-TF,ELISA 法检测血浆中 TF。**结果:**治疗前 AML 组 MP-TF 及 TF 水平明显高于对照组[(60.90±14.90)%:(45.80±12.03)%, $P<0.01$;(129.11±37.32)pg/ml:(95.96±19.56)pg/ml, $P<0.05$]。AML 组内,15 例治疗后骨髓达 CR 的 APL 患者治疗前后 MP-TF 水平差异有统计学意义[(60.13±8.95)%:(51.65±8.11)%, $P<0.05$],其中 12 例 APL 并发 DIC 患者治疗前 MP-TF 及 TF 水平均高于治疗后[(60.00±9.45)%:(56.70±17.10)%;(155.67±31.14)pg/ml:(122.03±18.41)pg/ml,均 $P<0.05$];13 例治疗后骨髓达 CR 的非 APL 患者治疗前 TF 明显高于治疗后[(147.61±27.43)pg/ml:(118.73±20.23)pg/ml, $P<0.01$]。AML 组内,凝血酶原时间(PT)延长>3 s 的患者(10 例)MP-TF 水平明显高于 PT 延长<3 s 及 PT 正常的患者(54 例)[(64.10±9.38)%:(59.40±19.73)%, $P<0.05$];纤维蛋白降解产物(FDP)异常的患者(24 例)TF 水平明显高于 FDP 正常患者(40 例)[(152.26±37.89)pg/ml:(112.81±35.47)pg/ml, $P<0.05$]。**结论:**MP-TF 及 TF 是参与凝血异常的重要指标,MP-TF 较血浆 TF 能更好地反映 TF 活性水平,且 MP-TF 与 AML 尤其是 APL 及其凝血异常有密切关系,可作为监测 APL 疾病病情缓解的有效指标之一。

【关键词】 急性髓系白血病;组织因子微粒;急性早幼粒细胞白血病;弥散性血管内凝血
【中图分类号】 R733.71 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2013)07-0465-04

Detection and clinical significance of tissue factor and microparticle-associated tissue factor in acute myeloid leukemia

BAI Sijun YANG Linhua DONG Chunxia GUO Zhiping GE Xiaoyan
KANG Jianmin ZHANG Jianhua REN Fanggang
ZHANG Yaofang HOU Yanfei YANG Chen

(Department of Hematology, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China)

Corresponding author: YANG Linhua, E-mail: yanglh5282@163.com

Abstract Objective: To detect and explore the clinical significance of tissue factor (TF) and microparticle-associated tissue factor (MP-TF) in acute myeloid leukemia (AML) patients. **Method:** The peripheral blood in 64 cases of AML with newly diagnosed was collected, including 22 cases of APL, 42 cases of non-APL, and 22 cases of AML with DIC and 42 cases of AML without DIC. Thirteen cases of non-APL with bone marrow complete remission (CR), 15 cases of APL with bone marrow CR including 12 cases of APL with DIC. Thirty-four cases of normal controls were healthy blood donors. MP-TF was detected by FCM and TF was detected by ELISA. **Result:** MP-TF and TF in AML patients were both higher than those in the normal controls ($P<0.01$, $P<0.05$). MP-TF in the 15 cases of APL with bone marrow CR was higher before chemotherapy than that after chemotherapy ($P<0.05$). The levels of MP-TF and TF in 12 cases of APL with DIC were higher before chemotherapy than those after chemotherapy ($P<0.05$). TF in the 13 cases of non-APL with bone marrow CR was higher before chemotherapy than that after chemotherapy ($P<0.01$). The MP-TF in the patients with PT>3 s was higher than that with normal PT value ($P<0.05$). TF in the patients with abnormal FDP value was increased than that with normal FDP ($P<0.05$). **Conclusion:** MP-TF and TF are important indicators involved in coagulopathy, and MP-TF could

* 基金项目:卫生公益性行业科研专项(No:201202017)

¹ 山西医科大学第二医院血液科(太原,030001)

通信作者:杨林花, E-mail: yanglh5282@163.com

better reflect the activity of TF. MP-TF is associated with haemostatic dysfunction in the AML, and it could be used as a factor to monitor disease remission.

Key words acute myeloid leukemia; microparticle-associated tissue factor; acute promyelocytic leukemia; disseminated intravascular coagulation

急性髓系白血病(AML)尤其是急性早幼粒细胞白血病(APL)患者常存在着如弥散性血管内凝血(DIC)等复杂的凝血异常,这些凝血异常与组织因子(TF)的高表达相关。TF 是血栓形成过程中的一种跨膜单链糖蛋白,是目前已知的一种肿瘤相关促凝物质,在血液凝固级联反应中具有重要的启动因子作用。微粒(MP)是一种直径为 0.1~1.0 μm 的脂蛋白,是血小板、内皮细胞、单核细胞及肿瘤细胞等在激活或者凋亡过程中脱落下来的片段。MP 在其脂质双层的外层中表达带有负电荷的磷脂酰丝氨酸(PS),可为凝血过程提供所必需的负离子磷脂表面,也可加速细胞-细胞间的信息交流。MP 表面 TF 以 MP 为载体共同构成组织因子微粒(MP-TF)。由于 MP 体积小,数量少,临床研究开展较少。本研究通过 Annexin-V 标记 MP 外露的 PS,同时联合 TF 抗体采用流式细胞术检测 AML 患者血浆中 MP-TF 的水平,探讨其与 AML 凝血的相关性和临床意义。

1 资料与方法

1.1 资料

64 例初发 AML 患者均为 2012-04—2012-12 在我科住院的初诊患者(AML 组),男 37 例,女 27 例;年龄 6~77 岁,中位年龄 46 岁;AML-M₀ 1 例,AML-M₁ 1 例,AML-M₂ 10 例,APL 22 例(其中并发 DIC 12 例),AML-M₄ 10 例,AML-M₅ 11 例,AML-M₆ 3 例,AML-M₇ 1 例,AML 未能分型 5 例。AML 并发 DIC 22 例,未并发 DIC 42 例。所有患者的诊断均参照《血液病诊断及疗效标准》^[1]。34 例对照者为健康献血员(对照组),均除外高血压、血脂异常、糖尿病及血栓病史,男 24 例,女 10 例,年龄 18~58 岁,中位年龄 35 岁。

1.2 试剂和仪器

PE 标记的抗人凝血因子Ⅲ即 TF 单克隆抗体(TF-PE)购自 RD 公司,FITC 标记的 Annexin-V 购自凯基公司,直径为 1.0 μm 的荧光微球购自 Bangs 公司。抗人 TF ELISA 试剂盒购自上海西塘公司。流式细胞仪采用 Cytomic FC500(Beckman-coulter 公司)。

1.3 标本收集

采集空腹静脉血 2 ml,枸橼酸钠抗凝。室温条件下,1 900×g 离心 15 min,2 次,得到乏血小板血浆,分离血清,-70℃冻存,4 h 内完成标本的处理。

1.4 免疫荧光标记

冻存的血浆标本在 37℃迅速解冻,取 100 μl

标本与 4 μl FITC 标记的 Annexin-V 和 4 μl PE 标记的 TF 抗体充分混合,室温下孵育 30 min 后加入 Annexin-V-FITC 抗体结合缓冲液,流式细胞仪检测。对照管选用 4 μl 鼠抗人 IgG-PE 做阴性对照。

1.5 流式细胞仪检测 MP-TF

用 1.0 μm 的荧光微球设定前向检测区,使用流式细胞仪对所设门内(MP 直径 0.1~1.0 μm)的颗粒进行分析。MP-TF 的界定:直径 0.1~1.0 μm,Annexin-V-FITC 和 TF-PE 抗体双标阳性^[2]。

1.6 ELISA 检测血浆中 TF 含量

冻存的血浆标本 37℃迅速解冻,按照人 TF ELISA 试剂盒说明书检测 AML 患者血浆中 TF 的含量。

1.7 统计学处理

所有数据使用 SPSS13.0 软件统计。先做正态 W 检验,如符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;若不符合正态分布,以中位数±四分位数表示,采用秩和检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AML 组和对照组治疗前 TF、MP-TF 检测结果

AML 组和对照组治疗前 TF、MP-TF 检测结果见表 1 和图 1a~b。

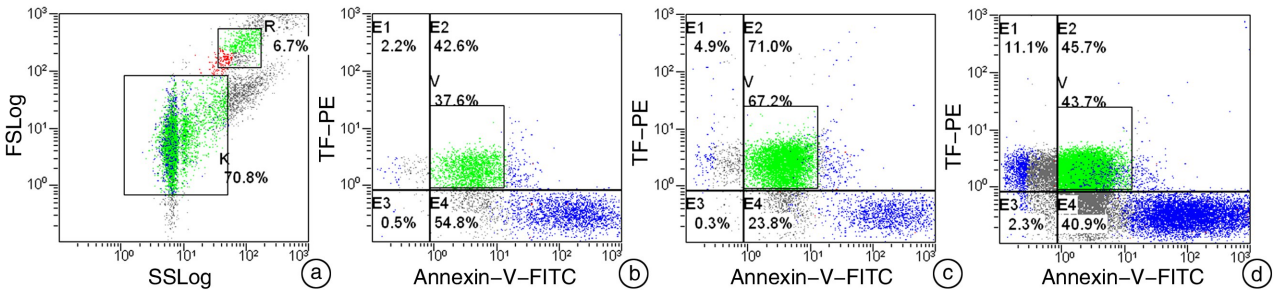
表 1 AML 组和对照组治疗前 TF、MP-TF 检测结果

组别	$\bar{x} \pm s$	
	MP-TF/%	TF/(pg·ml ⁻¹)
对照组(34 例)	45.80±12.03	95.96±19.56
AML 组(64 例)	60.90±14.90 ²⁾	129.11±37.32 ¹⁾
并发 DIC(22 例)	61.10±7.13	—
未并发 DIC(42 例)	58.20±22.30	—
非 APL(42 例)	60.90±21.35	117.45±43.59
APL(22 例)	60.80±11.13	130.25±41.31
并发 DIC(12 例)	62.57±8.12	135.19±32.42
未并发 DIC(10 例)	60.06±10.18	117.45±43.59

与对照组比较,¹⁾*P*<0.05,²⁾*P*<0.01。

2.2 AML 组内治疗后骨髓达完全缓解患者 TF、MP-TF 检测结果

AML 组内,非 APL 中 13 例治疗后骨髓达完全缓解(CR),APL 中 15 例治疗后骨髓达 CR,包含 12 例 APL 并发 DIC 患者。AML 组内治疗后骨髓达 CR 患者 TF、MP-TF 水平检测结果见表 2 和图 1c~d。



a:FSC/SSC 散点图(R 为 1.0 μm 微球);b:对照组;c:AML 组治疗前;d:AML 组治疗后。
图 1 流式细胞术检测对照组和 AML 组治疗前后 MP-TF 水平

表 2 AML 组内治疗后骨髓达 CR 患者 TF、MP-TF 水平检测结果 $\bar{x} \pm s$

组别	治疗前		治疗后	
	MP-TF/%	TF/(pg · ml ⁻¹)	MP-TF/%	TF/(pg · ml ⁻¹)
非 APL(13 例)	58.00±11.46	147.61±27.43	58.68±5.93	118.73±20.23 ²⁾
APL(15 例)	60.13±8.95	—	51.65±8.11 ¹⁾	—
APL 并发 DIC(12 例)	60.00±9.45	155.67±31.14	56.70±17.10 ¹⁾	122.03±18.41 ¹⁾

与本组内治疗前比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

2.3 AML 组内不同凝血酶原时间及纤维蛋白降解产物间 TF、MP-TF 检测结果

AML 组内不同凝血酶原时间(PT)及纤维蛋白降解产物(FDP)间 TF、MP-TF 水平检测结果见表 3。

表 3 AML 组内不同 PT 及 FDP 间 TF、MP-TF 水平检测结果 $\bar{x} \pm s$

组别	MP-TF/%	TF/(pg · ml ⁻¹)
PT 延长<3 s 及 PT 正常(54 例)	59.40±19.73	114.85±32.01
PT 延长>3 s(10 例)	64.10±9.38 ¹⁾	217.03±60.35
FDP < 5 $\mu\text{g/ml}$ (40 例)	58.20±23.20	112.81±35.47
FDP > 5 $\mu\text{g/ml}$ (24 例)	61.10±7.58	152.26±37.89 ²⁾

与 PT 延长<3 s 及 PT 正常比较,¹⁾ $P<0.05$;与 FDP <5 $\mu\text{g/ml}$ 比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

2.4 MP-TF 水平与 PT 水平的相关性分析

Pearson 相关分析表明,MP-TF 水平与 PT 水平呈正相关($r=0.385,P<0.05$)。

3 讨论

DIC 是 AML 尤其是 APL 常见的并发症。DIC 是在某些致病因子的作用下,体内凝血系统被激活,血液凝血活性增高,在微循环内发生血小板聚集及纤维蛋白沉积,形成播散性微血栓。目前认为 APL 患者并发 DIC 的主要原因是早幼粒细胞释放促凝物质导致凝血酶生成过多,如 TF。TF 即凝

血因子Ⅲ,其作为凝血途径的启动因素,可同时激活内外源性的凝血酶联放大反应^[3]。TF 是目前已知的肿瘤相关促凝物质,它与凝血因子Ⅶa 形成复合物,启动外源性凝血途径,具有促凝血、促血栓的作用,在出凝血途径中发挥重要作用。

本研究采用 ELISA 法检测 AML 患者血浆 TF 水平,初发的 AML 患者 TF 水平明显高于对照组,非 APL 及 APL 并发 DIC 患者治疗后 TF 明显下降。提示 TF 水平与疾病病情缓解相关。凝血指标中 FDP 与 D 二聚体的升高对于提示急性白血病患者早期 DIC 形成有一定的意义。本研究中,APL 并发 DIC 与未并发 DIC 患者的 TF 水平差异无统计学意义,而 FDP 异常的患者 TF 水平明显高于 FDP 正常者,PT 延长 3 s 以上者与 PT 延长小于 3 s 及 PT 正常者间 TF 水平差异无统计学意义,可见 TF 异常增高不能提示 DIC 的形成,但不排除患者正处于 DIC 形成的前期。正常患者生理情况下 TF 是被加密的,只有在特定条件下被解密,才能表达促凝活性^[4]。因此,TF 抗原水平不能完全代表 TF 活性水平。有研究报道,MP 表面表达的 TF 活性水平高,且在肿瘤细胞释放的 TF 中占主导地位^[5]。MP 炎症或易栓状态下各种不同细胞激活或凋亡过程中细胞膜上的 PS 外翻,使细胞膜起泡脱落释放入血浆中的质膜片段^[2]。长期以来 MP 被认为是无效的片段,目前越来越多的证据证明 MP 与邻近或者远处的细胞有相互作用,并参与细胞间的信号传导^[6]。TF 以 MP 为载体构成了 MP-TF。MP-TF 是近年来许多疾病研究的热点。Falati 等(2003)证实在损伤修复中大量 MP-TF 聚集在血小板表面形成血栓,并且该过程依赖于 P-选

择素与 P-选择素糖蛋白配体 1(PSGL-1)的相互作用。一直以来,MP-TF 在肿瘤血栓中的相关报道主要以结肠癌、胰腺癌、乳腺癌等为多^[7-9]。最新研究发现,MP-TF 在恶性血液病中的作用也不容忽视。Auwerda 等^[10]报道 MP-TF 在 122 例多发性骨髓瘤(MM)患者中的表达发现,其活性明显高于正常人,且并发静脉血栓栓塞症(VTE)的患者升高更加明显,治疗后 MP-TF 下降,但 MM 并发 VTE 的患者血浆中 MP-TF 活性水平下降不明显。唐云龙等^[11]发现淋巴瘤并发血栓患者血小板 MP 及 TF 促凝活性均明显增高,发生血栓前血小板 MP 密度明显高于健康人。由此看出,MP-TF 与恶性血液病凝血相关,对血栓及微血栓形成有一定的作用。

本研究通过标记特异性荧光抗体应用流式细胞术检测 MP-TF 在 AML 患者中的表达,结果显示 MP-TF 在 AML 患者中较正常人明显升高,与血浆 TF 水平相一致,表明 MP-TF 在 AML 的发病中有一定的作用。非 APL 患者化疗缓解前后 MP-TF 水平差异无统计学意义,但缓解后 MP-TF 水平有所升高,考虑与化疗药物的作用有关。有报道指出,化疗药物在有效抑制肿瘤细胞的同时会使血浆中 D 二聚体水平增加,促进血栓形成,可能是导致 MP-TF 水平增高的原因之一^[12-13]。APL 细胞有较强的促凝活性,可释放 TF,治疗后 APL 及 APL 并发 DIC 患者 MP-TF 水平均明显下降,考虑与 APL 细胞的促凝血活性在经过诱导化疗后降低有关,这种促凝血活性与暴露在 APL 细胞上的 PS 有一定关系^[14]。缓解后 MP-TF 水平仍明显高于正常,可能与微小残留的白血病细胞参与促进 TF 释放有关。PT 常用于外源性凝血因子的筛查,而 TF 启动外源性凝血途径与 PT 有密切的关系。本实验中凝血异常尤其是 PT 延长大于 3 s 的患者 MP-TF 高表达,并且 MP-TF 水平随着 PT 值的延长而增加,但在 TF 中差异无统计学意义,可见 MP-TF 能更好地代表 TF 活性水平,从而反映 AML 的凝血活性。另外,本文也对 MP-TF 在活化部分凝血活酶时间、D 二聚体、高白细胞等不同水平下进行了研究,未发现明显差异,不排除与样本量少、实验过程中离心、冻存及解冻等影响因素有关。

总之,MP-TF 及 TF 是参与凝血异常的重要指标,用流式细胞术检测 MP-TF 简单易行,可直接用外周血测定,给临床检测提供了便利。MP-TF 较血浆 TF 能更好地反映 TF 活性水平,且 MP-TF 与 AML 尤其是 APL 及其凝血异常有密切关系,MP-TF 可以作为提示疾病状态的指标,对病情监测有一定意义。但 MP-TF 的升高是引起凝血异常的原

因还是导致凝血异常的一个指标,尚需进一步研究探讨。

参考文献

- [1] 张之南,沈悦. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:106-213.
- [2] LEROYER A S, TEDGUI A, BOULANGER C M. Role of microparticles in atherothrombosis[J]. J Intern Med, 2008, 263: 528-537.
- [3] ZWICKER J I, TRENOR C C, FURIE B C, et al. Tissue factor bearing-microparticles and thrombus formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31: 728-733.
- [4] FURIE B. Pathogenesis of thrombosis[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: 255-258.
- [5] 方怡,蔡佳翌,钟济华,等. 异常剪接组织因子在急性髓系白血病细胞株中的表达研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(2): 288-292.
- [6] PICCIN A, MURPHY W G, SMITH O P. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications[J]. Blood Rev, 2007, 21: 157-171.
- [7] 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: 119-123.
- [8] KHORANA A A, FRANCIS C W, MENZIES K E, et al. Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer[J]. J Thromb Haemost, 2008, 6: 1983-1985.
- [9] ZWICKER J I, LIEBMAN H A, NEUBERG D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 6830-6840.
- [10] AUWERDA J J, YUANA Y, OSANTO S, et al. Microparticle-associated tissue factor activity and venous thrombosis in multiple myeloma[J]. Thromb and Haemost, 2011, 105: 14-20.
- [11] 唐云龙,周燕,王纯斌,等. 组织因子相关血小板微粒对恶性淋巴瘤患者血栓发生的提示作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(2): 325-328.
- [12] ALKINDI S, DENNISON D, PATHARE A. Arterial and venous thrombotic complications with thalidomide in multiple myeloma[J]. Arch Med Res, 2008, 39: 257-258.
- [13] 汪蕾,胡钧培,叶为德. 沙利度胺对血液肿瘤患者致栓作用的初步探究[J]. 血栓与止血学, 2010, 16(3): 124-126.
- [14] ZHOU J, SHI J, HOU J, et al. Phosphatidylserine exposure and procoagulant activity in acute promyelocytic leukemia[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8: 773-782.