

血液病患者出血程度与 PMP、vWF、FN 的关系及临床意义

戴霁菲¹, 朱立新², 蔡学林², 夏瑞祥¹

摘要 目的 观察血小板微颗粒(PMP)、血管性血友病因子(vWF)、纤维连接蛋白(FN)在血小板减少的血液病患者中与出血程度的关系,探讨 PMP、vWF、FN 对出血程度预测的临床意义。方法 根据 WHO 关于出血的分级标准,将患者分为 0 分组、1 分组、2 分组、3 分组、4 分组及对照组。应用流式细胞术检测患者外周血中 PMP 含量变化,应用 ELISA 法检测患者外周血中 vWF、FN 含量变化。结果 ① 各组 PMP、vWF、FN 的含量差异均有统计学意义($P < 0.001$);② 不同出血程度组之间出血程度越重, PMP 含量越低[除 1 分组与 2 分组;3 分组、4 分组和对照组差异无统计学意义,其余差异有统计学意义($P < 0.001$)], vWF 含量越高[除 1 分组与 2 分组外,其余各组之间差异有统计学意义($P < 0.001$)], FN 含量越高[除 0 分组与 1 分组外,其余各组均差异有统计学意义($P < 0.001$)]。结论 PMP、vWF、FN 的含量对血小板减少的血液病患者出血程度的预测具有临床意义。

关键词 出血程度;血小板微颗粒;血管性血友病因子;纤维连接蛋白

中图分类号 R 558.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1050-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.024

出血是各类血液系统疾病中常见的症状,也是血液病致死的主要原因之一,其中血小板减少起着重要的作用,通常临床上将 $20 \times 10^9/L$ 作为血小板输注指征^[1],临床工作中显示并非所有血小板减少的患者都伴有出血的发生,血小板数量高低也非出血严重程度的唯一影响因素,有关出血程度的预测指标目前尚缺乏系统的研究,血小板微颗粒(platelet microparticle, PMP)是血小板活化后以出芽方式向细胞外释放的一种微小颗粒,包含了完整的细胞膜和血小板浆的成分,体积小于正常血小板,参与血液循环,有着促进血液凝固的作用,血管性血友病因子

(von Willebrand Factor, vWF)是由巨核细胞和血管内皮细胞合成和分泌的一种凝血蛋白,在内皮细胞受损时释放入血,因此 vWF 可作为血液高凝状态的分子标志物,也可作为反应内皮细胞功能状态和损伤程度的指标,纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是一种广泛存在于血液、体液及各种组织中的高分子多功能糖蛋白,参与血小板的黏附与聚集,并参与血栓形成,该研究通过观察 90 例血小板减少患者的出血情况,分析 PMP、vWF、FN 与出血程度之间的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2016 年 1 月~6 月安徽医科大学第一附属医院血液内科血小板计数 $< 20 \times 10^9/L$ 的 90 例患者作为实验组,其中男 54 例,女 36 例;年龄 24~62(46.42±9.18)岁,特发性血小板减少性紫癜患者 19 例,再生障碍性贫血患者 5 例,初治急性白血病患者 16 例,恶性肿瘤化疗结束后患者 50 例(包括除急性早幼粒细胞白血病外的急性髓系白血病 28 例,急性淋巴细胞白血病 11 例,骨髓增生异常综合征 5 例,多发性骨髓瘤 4 例,淋巴瘤 2 例),所有疾病的诊断符合张之南主编的《血液病诊断及疗效标准》中的诊断标准^[2],以同时期本院体检中心体检的 50 例为对照组,其中男 29 例,女 21 例;年龄 26~65(47.56±10.24)岁,实验组与对照组在年龄、性别方面差异均无统计学意义,所有实验组及对照组中无心脑血管疾病,实验前 2 周内未服用抗凝及抗血小板药物,未进行输血治疗。

1.2 出血评价 参照 WHO 关于出血的分级标准^[3],0 分为无出血,记为 0 分组;1 分为皮肤黏膜出血,排泄物或分泌物隐血试验阳性提示体内隐性出血,记为 1 分组;2 分为有轻微显性出血,如鼻出血、血尿等,但不需要进行红细胞输注,记为 2 分组;3 分为有出血表现,需要输注 1 个单位红细胞以上,记为 3 分组;4 分为发生血流动力学改变或重要脏器的出血,如颅内出血,记为 4 分组。

1.3 仪器及试剂 荧光素藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE)标记的鼠抗人 CD61 单克隆抗体(CD61-

2017-03-20 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085MH157)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹血液内科、²中心实验室,合肥 230022

作者简介:戴霁菲,女,硕士研究生;

夏瑞祥,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

PE)及 NAVIOS 流式细胞仪均购自美国 Beckman Coulter 公司;异硫氰荧光素标记的膜联蛋白 (AnnexinV-FITC) 及含有钙离子的缓冲液、vWF 和 FN 的 ELISA 试剂盒均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 检测方法

1.4.1 标本制备 于清晨空腹采静脉血 5 ml 于 EDTA-K₂ 抗凝管中,标本分两部分处理,其中 2 ml 于 2 h 内置于离心机 800 r/min 离心 3 min,制备富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP),另外 3 ml 置于离心机 2 000 r/min 离心 5 min,分离血浆,置于 EP 管中,保存于 -80 °C 的冰箱中,备用于 vWF 和 FN 的 ELISA 检测。

1.4.2 PMP 的检测 由于细胞微粒体积结构很小,目前微粒的检测主要依靠流式细胞术的检测方法^[4]。细胞微粒含有母细胞表面与胞质成分,并且对磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 高表达,膜联蛋白 AnnexinV 探针可以与 PS 特异性结合,采用血小板特异性标志 CD61 单克隆抗体和 AnnexinV 联合识别 PMP 的办法进行检验。

取流式细胞仪专用试管,于试管底部加入 5 μ l AnnexinV 及 5 μ l CD61-PE,再加入含有钙离子的 Annexin V 结合缓冲液 500 μ l,充分混合后将事先制备好的 PRP 5 μ l 加入试管底部,再次充分混合,室温下避光染色 15 min 后用于流式细胞仪检测,在 FSC(log)-SSC(log) 散点图上找到血小板群,以 AnnexinV-FITC(log)-CD61-PE(log) 建立散点图,其中 AnnexinV 阳性且 CD61 强阳性为表面暴露 PS 的血小板,即受损的或(和)活化的血小板(A2)区,AnnexinV 阳性且 CD61 弱阳性为 PMP(A4)区,计算

A4 所占百分比(图 1)。

1.4.3 vWF 和 FN 的检测 从 -80 °C 冰箱中将事先保存的血浆标本至室温解冻,采用 ELISA 法检测,操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,每份样品均测定 3 孔,用酶标仪测定每个测试孔的光密度值,并计算出平均值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PMP 水平 所有组别(包括实验组、对照组)PMP 的含量差异有统计学意义($F = 151.392, P < 0.001$),认为各组 PMP 含量有差别,进一步了解各组别均值两两比较情况,SNK 检验提示 0 分组与其余各组之间差异有统计学意义($P < 0.001$),图 1 中可看出 0 分组 PMP 的比例明显高于对照组。1 分组和 2 分组、3 分组、4 分组和对照组之间差异无统计学意义,但在不同出血程度组之间,出血程度重的组别 PMP 比例略低于出血程度轻的组别(表 1)。

2.2 vWF 水平 所有组别(包括实验组、对照组)vWF 含量差异有统计学意义($F = 642.257, P < 0.001$),不同出血程度组之间,出血程度越重,vWF 含量越高,除 1 分组和 2 分组外,其余各组两两之间均差异有统计学意义($P < 0.001$),见表 1。

2.3 FN 水平 所有组别(包括实验组、对照组)FN 水平差异有统计学意义($F = 75.194, P < 0.001$),进一步两两比较:其中 1 分组与 0 分组差异无统计学意义,其余各组间差异有统计学意义($P < 0.001$),

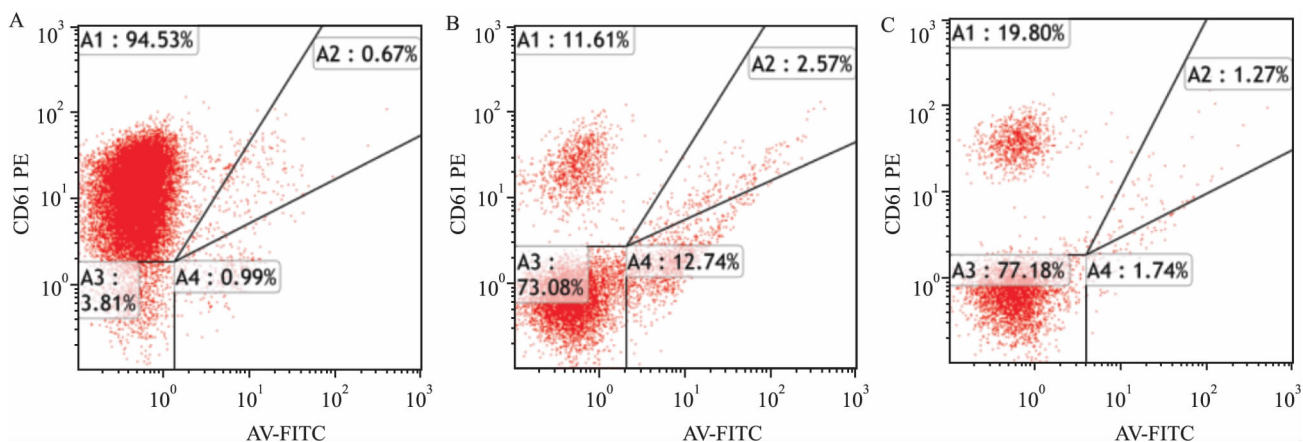


图 1 Annexin V-FITC(109)-CD61-PE(109) 流式细胞仪分析散点图

A: 对照组; B: 0 分组; C: 4 分组; A1: 正常血小板; A2: 受损或活化的血小板; A3: 红细胞、白细胞及颗粒性杂质; A4: PMP

不同出血程度组之间,出血程度越重, FN 含量越高(表 1)。

表 1 各出血程度 PMP、vWF、FN 水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PMP (%)	vWF(μg/L)	FN(μg/L)
0分	22	11.56±3.08	181.43±16.37	377.46±32.19
1分	37	4.72±2.11	198.74±10.03	381.20±29.25
2分	19	3.58±1.85	216.99±12.60	408.30±22.29
3分	7	2.77±1.16	236.41±19.22	443.77±30.08
4分	5	1.88±0.80	251.15±29.18	478.42±41.56
对照	50	0.90±0.48	55.49±12.37	314.35±29.44

3 讨论

PMP 是一类体积小于正常血小板但具有完整膜结构的微粒^[5],在血小板活化或损伤时释放, PMP 可表达血小板特异性膜糖蛋白并且富含凝血因子膜受体,为血小板进一步活化以及凝血酶原反应提供催化表面,当患者内皮细胞受到损伤或发生血管破裂时导致血小板活化,血小板活化的同时释放血小板微粒, PMP 通过表达 P-选择素等活性分子诱导自身的活化,并促进进一步的黏附和血栓形成。同时 PMP 直接参与激活各种凝血因子启动凝血途径,导致微血管血栓形成。本实验结果表明,尽管所有患者血小板计数均十分低下,图 1 中 0 分组较出血组具有更高的 PMP 含量,出血程度高的组别其 PMP 含量越低,证明 PMP 具有止血保护的功能,其促凝作用弥补了血小板数量的减少^[6]。

vWF 是一种多聚体糖蛋白,在内皮细胞受到损伤时释放入血,成为血小板黏附在内皮下的桥梁, vWF 作为血小板表面糖蛋白 Ib 受体,与血小板黏附、聚集密切相关,因此 vWF 可以作为反应内皮细胞损伤程度和反应体内高凝状态的指标,评估病情严重程度^[7-8],本实验中,随着出血程度的加重, vWF 的含量逐渐增加,可能与内皮细胞损伤严重,导致大量 vWF 释放,同时激活体内凝血系统并相互作用,导致出血几率增加^[9]。

血小板黏附到受损血管内皮下进行止血的过程需要多种蛋白,如 VWF、FN、凝血酶致敏蛋白、各种胶原等。FN 是血小板 α 颗粒成分之一, FN 和纤维蛋白原(fibrinogen, Fbg)、vWF 同为血小板膜表面整合素受 β3 亚家族 α II β3 (GP II b/ III a) 的配体。目前 Fbg、vWF 是公认介导血小板黏附与聚集的两种主要蛋白分子,有研究^[10]推测, FN 也能诱导血小板的黏附与聚集,在流液中, FN 通过与血小板膜表面

的 VLA-5 及 GP II b/ III a 这两种受体结合,从而黏附血小板,加速止血。本实验中,出血组较对照组 FN 含量高,出血程度高的组别较出血程度低的组别 FN 含量高,可能是因为 FN 是细胞与间质之间的连接分子,可促使细胞移动,促进组织修复,参与止血和血栓形成, FN 的分泌可能与机体的反馈机制有关,出血越严重,机体刺激分泌更多的 FN,从而保护机体。

综上所述, PMP、vWF、FN 在血小板减少、内皮细胞受损时,参与到体内止血凝血机制中,其含量的测定对出血程度的预测有一定临床意义,可为临床上评估疾病状况、出血程度,防治并发症,有效输注血小板提供一定依据。

参考文献

- [1] Naidech A M, Liebling S M, Rosenberg N F, et al. Early platelet transfusion improves platelet activity and may improve outcomes after intracerebral hemorrhage [J]. Neurocrit Care, 2012, 16(1): 82-7.
- [2] 张之南, 沈 悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 1999: 103-21.
- [3] Stanworth S J, Estcourt L J, Power G, et al. A no-prophylaxis platelet-transfusion strategy for hematologic cancers [J]. N Engl J Med, 2013, 368(19): 1771-80.
- [4] Kim S, Carrillo M, Radhakrishnan U P, et al. Role of zebrafish thrombocyte and non-thrombocyte microparticles in hemostasis [J]. Blood Cells Mol Dis, 2012, 48(3): 188-96.
- [5] Duchez A C, Boudreau L H, Naika G S, et al. Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-II A [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(27): E3564-73.
- [6] 周延美, 周延英, 唐延辉, 等. 血小板减少及血液中微粒粒检验的研究进展 [J]. 中国医药科学, 2013, 3(2): 42-3.
- [7] Haberichter S L, Jacobi P, Montgomery R R. Critical independent regions in the VWF propeptide and mature VWF that enable normal VWF storage [J]. Blood, 2003, 101(4): 1384-91.
- [8] Soylemezoglu O, Sultan N, Gursel T, et al. Circulating adhesion molecules ICAM-1, E-selectin, and von Willebrand factor in Henoch-Schönlein purpura [J]. Arch Dis Child, 1996, 75(6): 507-11.
- [9] 杨 杰, 邓东红, 程 鹏, 等. 急性白血病患者凝血酶-抗凝血酶复合物、血管性血友病因子、D 二聚体的检测及其临床意义 [J]. 血栓与止血学, 2011, 17(2): 61-5.
- [10] Lucena S, Arocha Piñango C L, Guerrero B. Fibrinectin. Structure and functions associated to hemostasis. Review [J]. Invest Clin, 2007, 48(2): 249-62.

网络出版时间: 2017-5-22 17:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170522.1745.025.html>

HLA-DQA1 基因拷贝数变异 与乙型肝炎病毒感染后不同转归的易感性

李卫¹, 郝玉峰², 饶建国³, 李旭²

摘要 目的 探讨人类白细胞抗原(HLA)DQA1 基因拷贝数变异(CNV)与中国汉族人群乙型肝炎病毒(HBV)感染后不同转归和疾病进展的关系。方法 采用 AccuCopy CNV 检测技术检测 825 例慢性 HBV 感染患者和 287 例急性自限性 HBV 感染者的 HLA-DQA1 基因 CNV, 采用 χ^2 检验等分析 HLA-DQA1 CNV 与 HBV 感染后慢性化和疾病进展的发病风险。结果 在 HBV 感染后急慢性转归方面, 急性自限性 HBV 感染组 HLA-DQA1 拷贝数 > 2 的比例显著高于慢性 HBV 感染组 (15.3% vs 6.9%, $\chi^2 = 25.22$, $P < 0.001$)。在慢

性 HBV 感染后疾病进展方面, 随疾病进展, HLA-DQA1 基因拷贝数 < 2 的比例在慢性乙型肝炎(CHB)组、肝硬化(LC)组和肝癌(HCC)组 3 组间逐渐增加, 分别为 10.1%、15.3% 和 27.9%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.66$, $P < 0.001$)。根据 E 抗原分组分析显示, E 抗原阳性患者组和 E 抗原阴性患者组 HLA-DQA1 CNV 的比例无显著性差异。结论 HLA-DQA1 基因 CNV 是 HBV 感染慢性化的遗传易感因素, HLA-DQA1 基因拷贝数减少可能是 HBV 感染慢性化和疾病进展的危险因素。

关键词 乙型肝炎病毒; 人类白细胞相关抗原 DQA1; 拷贝数变异; 基因易感性

中图分类号 R 512.6+2; R 394.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-1053-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.025

2017-02-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81273142)

作者单位: ¹安徽医科大学阜阳传染病临床学院(阜阳市第二人民医院)肝病科, 阜阳 236000

²安徽医科大学第二附属医院肝病科, 合肥 230601

³六安市人民医院感染病科, 六安 237000

作者简介: 李卫, 男, 本科, 副主任医师;

李旭, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aaylixu@qq.com

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染后的转归与病毒、宿主免疫和宿主遗传因素密切相关。病毒本身的毒力并不能完全阐释其机制, 除病毒因

Relationship between bleeding degree and PMP, vWF and FN in patients with hematological diseases and its clinical significance

Dai Jifei¹, Zhu Lixin², Cai Xuelin², et al

(¹Dept of Haematology, ²Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To measure the relationship between the degree of bleeding and platelet microparticles (PMP), von Willebrand factor (vWF), fibronectin (FN) in hematologic patients with low platelet count, analyze the clinical significance of PMP, vWF, FN and predict the degree of bleeding. **Methods** According to WHO grading standards of the degree of bleeding, the patients were divided into 0 group, 1 group, 2 group, 3 group, 4 group and health group. Flow cytometry was used to detect PMP in the peripheral blood in the patients. The enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the vWF and FN in the peripheral blood in the patients. **Results** ① The level of PMP, vWF and FN had significance difference in each group ($P < 0.001$). ② In the different degree of bleeding, severity bleeding with much lower PMP [1 group and 2 group; 3 group, 4 group and the control group had no significance difference, others had significance difference ($P < 0.001$)], much high vWF [each group had significance difference ($P < 0.001$), except 1 group and 2 group], much higher FN [each group had significance difference ($P < 0.001$), except 0 group and 1 group]. **Conclusion** The level of PMP, vWF, FN is helpful to predict the degree of bleeding in hematologic patients with low platelet count.

Key words the degree of bleeding; platelet microparticles; von Willebrand factor; fibronectin