

20例地中海贫血患者脾切除前后外周血组织因子及组织因子途径抑制物水平变化

邓东红 孙娜 龙媛 程鹏 赖永榕

Changes of plasma TF and TFPI in 20 cases thalassemia patients before and after splenectomy Deng Donghong, Sun Na, Long Yuan, Cheng Peng, Lai Yongrong

Corresponding author: Cheng Peng, Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China. Email: gxchengpeng@163.com

地中海贫血(地贫)是最常见的单基因遗传性疾病,部分地贫患者需行脾切除术^[1]。然而,国外研究显示地贫患者切脾后栓塞事件(thromboembolic events, TEE)的发生率较未切脾患者显著增高^[2-3],提示地贫患者切脾后体内存在明显的血液高凝状态。多项研究表明其高凝状态机制与内皮活化损伤及凝血功能改变相关^[4-5]。血管性血友病因子(VWF)是内皮活化损伤的特异性标志物,凝血酶抗凝血酶复合物(TAT)及凝血酶原片段1+2(F1+2)是反映凝血酶生成和活性增高的分子标志物,其增高有助于高凝状态的诊断。组织因子(TF)是目前最有效的内外源性凝血途径的天然启动因子,而组织因子途径抑制物(TFPI)是TF目前唯一的生理性拮抗物,循环血液中TF和TFPI水平保持平衡才能维持正常的血凝状态。目前,国内外关于地贫患者切脾前后血浆中TF、TFPI水平变化的研究报道极少,因此本研究我们从内皮及凝血机能方面着手,通过检测地贫患者切脾前后血浆中VWF、TAT、F1+2、TF、TFPI水平以及血小板计数分析地贫患者切脾后高凝状态机制,现报道如下。

病例与方法

1. 病例资料:以2015年3月至2016年3月我院20例行脾切除术的地贫患者为研究对象,男14例,女6例,中位年龄12(8~32)岁。患者切脾前4周内及切脾后6个月内未服用任何抗凝/抗血小板药物且无严重的心脑血管疾病,肝肾等器官原发性疾病,遗传性的血栓形成倾向及近期发生的外伤、手术等事件。以20名健康志愿者为正常对照组,男13名,女7名,中位年龄12.5(10~29)岁。

2. 主要仪器和试剂:高速低温离心机5810R为德国

Eppendorf公司产品;标准规格酶标仪Thermo Multiskan MK3为美国Thermo Fisher公司产品;自动血液学分析仪Coulter LH 750型为美国Beckman Coulter公司产品;人VWF、TAT、F1+2、TF及TFPI酶联免疫试剂盒均由武汉CUSABIO公司提供。

3. 标本采集和处理:地贫患者脾切除术前及术后1、3、6个月采集空腹静脉血8 ml。取2 ml EDTA抗凝,用于检测血常规;取2 ml 枸橼酸钠抗凝,用于检测凝血四项;另取4 ml EDTA抗凝,1 000×g离心30 min,分离血浆,分装于1.5 ml EP管内,-80℃冰箱冻存待测。

4. 检测方法:血常规、凝血四项采用全自动血液分析仪完成;血浆中VWF、TAT、F1+2、TF及TFPI水平均采用ELISA法,严格按照试剂盒说明书进行操作。

5. 统计学处理:用SPSS 20.0软件进行统计学分析,所有数据均以均数±标准差描述(符合正态分布)。病例组与对照组间差异性比较用 t 检验,病例组不同时点差异性比较采用重复测量的方差分析(两两比较用Bonferroni法)。计量资料间的相关性分析采用Pearson相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般临床指标比较:切脾前后地贫患者一般临床指标与对照组比较结果见表1。与对照组相比,切脾前地贫患者RBC、HGB、PLT、纤维蛋白原(FBG)显著降低,APTT、PT显著升高。地贫患者切脾后1、3、6个月HGB、FBG显著降低,PLT、APTT、PT显著升高。重复测量方差分析结果显示,与切脾前相比,切脾后1、3个月患者RBC、HGB、PLT均显著升高,切脾后6个月RBC、PLT、FBG均显著升高。切脾后1、3、6个月之间相互比较,所有临床指标差异均无统计学意义。

2. 血浆中VWF、TAT、F1+2、TF、TFPI水平检测结果:与对照组相比,地贫患者切脾后6个月血浆中VWF、TAT、F1+2、TF、TFPI水平及TF/TFPI明显增高。将病例组不同时间点各参数进行重复测量的方差分析,结果显示:与切脾前相比,切脾后1个月血浆中VWF、TAT、F1+2和TFPI水平明显增高,切脾后3、6个月血浆中VWF、TAT、F1+2、TF及TFPI水平显著增高,差异有统计学意义;与切脾后1个月相比,切脾后6个月血浆中VWF与TF水平显著增高;与切脾后3个月相比,切脾后6个月血浆中TF/TFPI增高(表2)。

3. 病例组切脾前后不同时点TF、TFPI与其他参数之间的相关性分析:Pearson相关分析结果显示,病例组切脾前及

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.04.015

基金项目:基金项目:广西壮族自治区教育厅高校科研项目(2D2014037);广西自然科学基金(2015GXNSFAA139229)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院血液内科

通信作者:程鹏,Email:gxchengpeng@163.com

切脾后不同时点血浆中TF与TFPI水平均呈正相关;TF和TFPI水平分别与VWF、TAT和F1+2水平均呈正相关,与PLT均无显著相关性(表3、表4)。

讨 论

地贫主要是由于珠蛋白基因缺失或突变导致α和β珠蛋白肽链缺如或合成不足而引起的遗传性溶血性贫血病^[6]。无效红细胞生成、慢性贫血/溶血及铁过载为地贫发生发展的主要机制,正是这些机制联合作用,导致地贫并发症较多,其中所引发的TEE逐步受到重视,尤其切脾的地贫患者TEE

发生率显著增高^[7]。血栓栓塞性疾病的发生或反复出现提示了地贫患者特别是切脾后的地贫患者体内长期处于慢性血液高凝状态。国外很多研究也证实其高凝状态机制与多种因素的存在相关,其中血小板因素、内皮的活化及凝血因素的改变也起着重要的作用。

因脾大或脾亢引起的血小板减少,往往是由于血小板在脾内滞留和破坏所致。当脾切除后破坏场所消失,血小板会在短时间急剧增多,绝大部分会在术后1~2各月内恢复正常,但本组患者切脾后1、3甚至6个月PLT均高于正常对照组及切脾前水平,提示切脾后地贫患者PLT持久性升高。

表1 脾切除前后地中海贫血患者与对照组一般临床指标的比较(̄x±s)

组别	例数	RBC (×10 ¹² /L)	HGB (g/L)	PLT (×10 ⁹ /L)	APTT (s)	PT (s)	FBG (g/L)
正常对照组	20	4.51±0.33	129.77±7.60	245.44±51.43	33.53±2.05	10.86±0.51	4.02±0.73
病例组	20						
切脾前		3.30±1.06 ^a	76.87±21.56 ^a	172.91±72.11 ^a	37.10±5.63 ^a	12.36±0.78 ^a	2.87±0.87 ^a
切脾后1个月		4.24±0.81 ^b	96.88±14.62 ^{ab}	698.10±241.07 ^{ab}	37.15±4.74 ^a	12.18±0.81 ^a	3.37±0.84 ^a
切脾后3个月		4.39±1.03 ^b	94.06±13.45 ^{ab}	688.97±252.9 ^{ab}	35.19±2.76 ^a	12.62±1.12 ^a	3.32±0.81 ^a
切脾后6个月		4.33±1.07 ^b	92.99±14.76 ^a	734.48±229.32 ^{ab}	35.87±3.35 ^a	12.73±1.42 ^a	3.58±0.97 ^{ab}

注:^a与正常对照组比较,P<0.05;^b与切脾前比较,P<0.05

表2 脾切除前后地中海贫血患者与对照组内皮活化与凝血参数水平的比较(̄x±s)

组别	例数	VWF (μg/L)	TAT (ng/L)	F1+2 (μmol/L)	TF (ng/L)	TFPI (μg/L)	TF/TFPI
正常对照组	20	108.11±30.65	1012.59±221.00	0.53±0.12	51.52±12.33	13.54±3.29	3.81±0.02
病例组	20						
切脾前		88.39±37.12	905.02±351.31	0.48±0.17	49.50±26.96	12.08±4.09	3.99±1.32
切脾后1个月		104.25±39.71 ^b	1086.06±381.34 ^b	0.56±0.19 ^b	52.53±16.82	14.14±4.89 ^b	3.81±0.49
切脾后3个月		116.54±38.24 ^b	1171.10±362.74 ^b	0.60±0.19 ^b	58.40±18.90 ^b	15.56±5.34 ^b	3.78±0.33
切脾后6个月		133.30±41.93 ^{abc}	1303.75±406.37 ^{ab}	0.68±0.22 ^{ab}	67.11±22.85 ^{abc}	17.10±6.70 ^{ab}	4.02±0.43 ^{ad}

注:VWF:血管性血友病因子;TAT:凝血酶抗凝血酶复合物;F1+2:凝血酶原片段1+2;TF:组织因子;TFPI:组织因子途径抑制物。^a与对照组比较,P<0.05;^b与切脾前比较,P<0.05;^c与切脾后1个月比较,P<0.05;^d与切脾后3个月比较,P<0.05

表3 20例地中海贫血患者切脾前后不同时点TF与各参数的相关性分析

不同时点TF	PLT		VWF		TAT		F1+2		TFPI	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
切脾前	0.014	0.952	0.832	<0.001	0.703	<0.001	0.836	<0.001	0.732	<0.001
切脾后1个月	0.204	0.952	0.972	<0.001	0.917	<0.001	0.983	<0.001	0.928	<0.001
切脾后3个月	-0.207	0.382	0.921	<0.001	0.935	<0.001	0.954	<0.001	0.982	<0.001
切脾后6个月	-0.110	0.612	0.951	<0.001	0.925	<0.001	0.949	<0.001	0.981	<0.001

注:TF:组织因子;VWF:血管性血友病因子;TAT:凝血酶抗凝血酶复合物;F1+2:凝血酶原片段1+2;TFPI:组织因子途径抑制物

表4 20例地中海贫血患者切脾前后不同时点TFPI与各参数的相关性分析

不同时点TFPI	PLT		VWF		TAT		F1+2	
	r值	P值	r值	P值	r值	P值	r值	P值
切脾前	0.342	0.140	0.928	<0.001	0.884	<0.001	0.910	<0.001
切脾后1个月	0.113	0.636	0.935	<0.001	0.978	<0.001	0.967	<0.001
切脾后3个月	0.267	0.256	0.936	<0.001	0.926	<0.001	0.941	<0.001
切脾后6个月	-0.130	0.584	0.939	<0.001	0.925	<0.001	0.912	<0.001

注:TFPI:组织因子途径抑制物;VWF:血管性血友病因子;TAT:凝血酶抗凝血酶复合物;F1+2:凝血酶原片段1+2;

Cappellini等^[8]研究表明地贫患者切脾后血小板增多是血栓形成的重要危险因素,并认为切脾后血小板聚集活化增加也易导致血栓栓塞。

血栓形成前即处于高凝状态时,一些早期能够敏感反映凝血异常的分子标志物可作为地贫患者血栓栓塞的危险标志。其中TAT及F1+2是两种具有代表性的反映凝血酶生成和活性增高的分子标志物。Atichartakarn等^[9]及Angchaisuksiri等^[10]报道地贫患者切脾后血浆TAT及F1+2水平较正常组及未切脾地贫组明显增高。本研究中我们发现地贫患者切脾后TAT及F1+2水平增高,与文献^[9-10]报道一致。

地贫患者内皮细胞有明显的改变,主要表达和分泌黏附分子、与红细胞的黏附增加等,在高凝状态的机制中起重要作用^[11]。作为血管内皮受损的标志物VWF在人体止血过程发挥着重要作用。若因组织损伤导致血管重度受损,VWF过度表达时,血液处于高凝状态,极易导致血栓形成。国外有研究证实地贫患者内皮细胞及血浆VWF水平较正常对照组明显升高,切脾后升高尤为显著^[12]。Bensons等^[13]的研究中也提到切脾后 β 地贫患者VWF水平明显高于未切脾患者,这可能是因为受损的内皮细胞持续分泌大量VWF并黏附到血小板表面,从而易于被脾脏清除。本研究中我们也发现切脾后不同时间点血浆VWF水平均较正常对照组及切脾前明显升高,提示切脾后内皮活化损伤明显。

TF又称凝血因子Ⅲ,为目前最有效的内外源性凝血途径的天然启动因子。正常情况下,血管内皮细胞和外周血细胞中无法检测到TF,而组织损伤时由于细胞表面作为血浆丝氨酸蛋白酶辅因子的TF暴露,血液内的凝血系统在局部被激活而引起凝血,当TF与凝血因子Ⅶ(FⅦ)结合后,便可变构激活FⅦ,形成TF-FⅦa复合物,通过激活FX和FXI,活化FXa,将凝血酶原激活成凝血酶,最终形成交联纤维蛋白,导致血栓形成^[14]。然而,作为TF目前唯一的生理性拮抗物TFPI,是血液中存在的天然抗凝物质,主要作用于依赖TF的外源性凝血途径,对体内凝血系统有重要的调节作用^[15]。同TF相似,TFPI亦不存在血浆中,且在血管内皮细胞活化损伤时释放增加。本研究中我们发现地贫患者切脾后6个月血浆TF、TFPI水平较对照组明显升高,切脾后3、6个月血浆TF、TFPI水平均较切脾前明显升高,提示地贫患者切脾后血管内皮细胞可能广泛受损。人体中,TF/TFPI在一定程度上反映机体凝血与抗凝作用是否平衡,本研究中我们发现地贫患者切脾后6个月时,TF/TFPI较对照组明显升高,说明虽然血浆中TF、TFPI均升高,但TF升高幅度较TFPI大,导致TF/TFPI增大,提示可能不仅有失衡的现象,且往促凝倾向发展,TEE发生的风险极高。本研究结果还显示TF不仅与TFPI相关,还与其他凝血标志物之间均呈正相关,说明TFPI的高表达可能无法抗衡由TF介导触发的凝血反应。

因此,在临床上除了检测常规指标,动态监测血浆中TF及TFPI水平可为地贫患者切脾后行抗凝治疗防治血栓形成提供新的思路。

参考文献

- [1] Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia [J]. Blood, 2011, 118(13):3479-3488. DOI: 10.1182/blood-2010-08-300335.
- [2] Taher A, Isma'eel H, Mehio G, et al. Prevalence of thromboembolic events among 8,860 patients with thalassaemia major and intermedia in the Mediterranean area and Iran [J]. Thromb Haemost, 2006, 96(4):488-491.
- [3] Cappellini MD, Robbiolo L, Bottasso BM, et al. Venous thromboembolism and hypercoagulability in splenectomized patients with thalassaemia intermedia [J]. Br J Haematol, 2000, 111(2):467-473.
- [4] Taher AT, Otrrock ZK, Uthman I, et al. Thalassemia and hypercoagulability [J]. Blood Rev, 2008, 22(5):283-292. DOI: 10.1016/j.blre.2008.04.001.
- [5] Cappellini MD, Motta I, Musallam KM, et al. Redefining thalassemia as a hypercoagulable state [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1202:231-236. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05548.x.
- [6] Sirachainan N. Thalassemia and the hypercoagulable state [J]. Thromb Res, 2013, 132(6):637-641. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.09.029.
- [7] Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited [J]. Blood Cells Mol Dis, 2006, 37(1):12-20. DOI: 10.1016/j.bcmd.2006.04.005.
- [8] Cappellini MD, Grespi E, Cassinerio E, et al. Coagulation and splenectomy: an overview [J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1054:317-324. DOI: 10.1196/annals.1345.039.
- [9] Atichartakarn V, Angchaisuksiri P, Aryurachai K, et al. Relationship between hypercoagulable state and erythrocyte phosphatidylserine exposure in splenectomized haemoglobin E/beta-thalassaemic patients [J]. Br J Haematol, 2002, 118(3):893-898.
- [10] Angchaisuksiri P, Atichartakarn V, Aryurachai K, et al. Hemostatic and thrombotic markers in patients with hemoglobin E/beta-thalassemia disease [J]. Am J Hematol, 2007, 82(11):1001-1004. DOI: 10.1002/ajh.20945.
- [11] Atichartakarn V, Chuncharunee S, Archararit N, et al. Intravascular hemolysis, vascular endothelial cell activation and thrombophilia in splenectomized patients with hemoglobin E/ β -thalassaemia disease [J]. Acta Haematol, 2014, 132(1):100-107. DOI: 10.1159/000355719.
- [12] Butthep P, Nuchprayoon I, Futrakul N. Endothelial injury and altered hemodynamics in thalassemia [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2004, 31(4):287-293.
- [13] Benson PJ, Peterson LC, Hasegawa DK, et al. Abnormality of von Willebrand factor in patients with hemoglobin E-beta (0) thalassemia [J]. Am J Clin Pathol, 1990, 93(3):395-399.
- [14] Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 300(3):729-735.
- [15] Wood JP, Ellery PE, Maroney SA, et al. Biology of tissue factor pathway inhibitor [J]. Blood, 2014, 123(19):2934-2943. DOI: 10.1182/blood-2013-11-512764.

(收稿日期:2016-08-04)

(本文编辑:刘爽)