

· 临床研究 ·

## 多发性骨髓瘤患者部分凝血及纤溶因子活性研究

王 铃<sup>1</sup>, 陆 化<sup>2\*</sup>, 沈文怡<sup>2</sup>, 卢瑞南<sup>2</sup>, 孙幸福<sup>3</sup>, 周 丽<sup>4</sup><sup>1</sup>南通大学第二附属医院,南通市第一人民医院血液科,江苏 南通 226001;<sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院血液科,江苏 南京 210029;<sup>3</sup>南京市高淳人民医院,江苏 南京 211300;<sup>4</sup>常州市武进人民医院血液科,江苏 常州 213002

**[摘要]** 目的:研究多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者血浆纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)、D-二聚体(D-Dimer)、抗凝血酶Ⅲ(antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ)水平的改变,及沙利度胺(thalidomide, THL)联合治疗的影响,并在细胞水平研究MM及THL对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)纤溶系统的影响。方法:对MM初发患者50例(THL联合治疗27例,其他治疗23例)和同期健康体检者30例,测定血浆FIB、D-Dimer、AT-Ⅲ水平,同时体外构建MM细胞和HUVECs共培养体系,在加与不加THL干预后,采用ELISA方法检测不同细胞培养上清中组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)与纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)水平。结果:MM患者血浆D-Dimer、FIB水平均较正常对照组明显升高,ATⅢ水平较正常对照组明显下降。THL联合治疗者血浆D-Dimer、FIB表达较初发患者及其他治疗者显著升高,ATⅢ水平较初发患者及其他治疗者显著下降。体外试验中,共培养体系中的HUVECs tPA表达水平较对照组减低,PAI-1表达水平升高。THL能显著抑制对照组及共培养组HUVECs的tPA分泌( $P=0.021$ 、 $P=0.033$ ),增加PAI-1分泌( $P=0.017$ 、 $P=0.024$ )。结论:MM患者血栓的形成与凝血反应增强、抗凝及纤溶因子活性降低有关,THL治疗可加重MM患者血栓风险。

**[关键词]** 多发性骨髓瘤;深静脉血栓;组织型纤维蛋白溶酶原激活剂;纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂-1

**[中图分类号]** R733.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)11-1602-03

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20191111

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是浆细胞克隆性增生的恶性血液肿瘤,其疾病本身有较高的血栓形成风险,以沙利度胺(thalidomide, THL)为代表的免疫调节剂(immunomodulatory drugs, IMiDs)广泛应用于MM的治疗,进一步增加了MM患者血栓栓塞风险,MM疾病本身及治疗能直接或间接影响凝血、抗凝及纤溶系统活性,这些均是引起血栓的重要因素。纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)为急性期反应蛋白,同时是重要的凝血因子,参与血栓形成;D-二聚体(D-Dimer)为继发性纤溶亢进产物,可表示体内血栓形成反映凝血活性;抗凝血酶Ⅲ(antithrombin-Ⅲ, AT-Ⅲ)是体内抗凝血的关键物质,参与保持机体抗凝活性。此外,MM还可损害血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)功能,

致纤溶和纤溶抑制系统异常,促进血栓形成<sup>[1]</sup>。组织型纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)与纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI-1)是纤溶系统的两大重要调节物质,主要由内皮细胞分泌。为了研究MM疾病本身及THL药物治疗对凝血、抗凝及纤溶系统的影响,本研究主要探讨FIB、D-Dimer、AT-Ⅲ在MM患者中的变化及THL治疗的影响。同时构建MM细胞株和人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)共培养体系,以单独HUVECs培养组为对照组,采用ELISA方法检测共培养组和对照组上清,以及加或不加THL干预后tPA、PAI-1蛋白表达水平的变化,从凝血、抗凝、纤溶等多方面进一步了解MM患者血栓形成的相关机制。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

选择南通市第一人民医院血液科门诊或住院初发MM患者50例,男28例,女22例,年龄41~79岁

**[基金项目]** 江苏省卫计委项目(Z201402);科教强国工程医学青年人才(QNRC2016565);江苏省六大人才高峰(WSN-026);江苏大学医学临床科技发展基金项目资助(JLY20160186)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: luhua1956@aliyun.com

(中位年龄54岁)。使用THL口服药联合治疗者为27例,其他治疗方法23例。本院同期健康体检者30例为对照组,其中男16例,女14例,年龄35~76岁(中位年龄50岁)。本研究经医院伦理委员会批准,所有患者知情同意。

RPMI1640培养液、胎牛血清购自美国Gibco公司,ELISA试剂盒购自美国eBioscience公司,实验用THL购自美国Sigma公司,HUVECs细胞株由南京医科大学基础实验室惠赠,MM细胞株U266购自美国ATCC公司。FIB、D-Dimer、ATⅢ在法国STA全自动凝血分析仪上进行。

### 1.2 方法

所有患者均于治疗1个月时空腹抽血检测D-Dimer、FIB、ATⅢ水平。

体外试验中,将HUVECs、MM细胞株分别接种于含10%小牛血清、100 μg/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的RPMI1640培养基中,37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,2~3 d传代1次,取对数生长期的细胞用于实验,在含1%FBS的RPMI1640培养基中饥饿培养12 h后收获,重悬细胞和调整细胞密度HUVECs为3×10<sup>5</sup>/mL;MM细胞为3×10<sup>6</sup>/mL。

实验分为6组:6孔板中加入HUVECs细胞悬液1 mL、RPMI1640培养基1 mL,为对照组(A组);

6孔板中分别加入MM、HUVECs细胞悬液各1 mL,为共培养组(B组);6孔板中加入HUVECs细胞悬液1 mL、RPMI1640培养基1 mL,不加THL为C组,加入THL 100 μg/mL为D组;6孔板中加入MM、HUVECs细胞悬液各1 mL,不加THL为E组,加THL 100 μg/mL为F组。每组设3个复孔,37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,24 h后收取细胞培养上清,采用ELISA方法严格按照说明书进行操作,测定上清液中tPA和PAI-1的浓度,实验重复3次。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS22.0软件进行统计学分析,实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。共培养组和对照组比较采用t检验,多组间比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

MM患者血浆D-Dimer、FIB水平均较健康对照组明显升高( $P=0.012, P=0.019$ ),ATⅢ水平明显下降( $P=0.015$ )。THL联合治疗患者血浆D-Dimer水平表达较初发患者及其他治疗患者显著升高( $P=0.024, P=0.012$ ),FIB较初发组及其他治疗者明显升高( $P=0.010, P=0.030$ ),血浆ATⅢ水平较初发组及其他治疗者进一步下降( $P=0.014, P=0.026$ )。见表1。

表1 各组患者D-Dimer、FIB、ATⅢ的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	D-Dimer(mg/L)	FIB(g/L)	ATⅢ(%)
健康对照组(n=30)	0.357 ± 0.152	2.951 ± 0.623	116.35 ± 14.56
初发组(n=50)	0.957 ± 0.334	4.022 ± 1.537	76.53 ± 15.78
P值	0.012	0.019	0.015
THL联合治疗(n=27)	2.186 ± 0.654	4.975 ± 1.652	65.37 ± 13.24
其他治疗(n=23)	1.037 ± 0.313	4.122 ± 1.011	73.35 ± 16.25
P值	0.012	0.030	0.026

共培养组与同期对照组相比,ELISA法检测共培养体系中的tPA表达水平降低( $P=0.002$ ),PAI-1表达水平升高( $P=0.019$ )。对于HUVECs单独培养组(C组),加入THL(D组)能显著抑制的tPA分泌( $P=0.021$ ),增加HUVEC的PAI-1分泌( $P=0.017$ )。对于MM和HUVECs共培养组(E组),加入THL(F组)能显著抑制tPA分泌( $P=0.033$ ),增加PAI-1分泌( $P=0.024$ )。见表2。

## 3 讨论

恶性肿瘤患者本身处于高凝状态,血栓事件发

表2 各组细胞上清中tPA蛋白和PAI-1蛋白表达水平 (ng/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	tPA	PAI-1
A组(对照组)	12.51 ± 2.14	25.14 ± 1.07
B组(共培养组)	8.04 ± 1.27	39.12 ± 5.09
P值	0.002	0.019
C组(对照)	13.15 ± 1.06	26.13 ± 3.01
D组(对照+THL)	5.98 ± 1.23	38.11 ± 2.57
P值	0.021	0.017
E组(共培养)	8.14 ± 2.04	39.02 ± 3.09
F组(共培养+THL)	5.19 ± 2.01	45.71 ± 3.76
P值	0.033	0.024

生率较高。MM患者循环单克隆免疫球蛋白增加血液黏滞度、损伤血小板功能及凝血功能,被认为是参与其血栓事件的主要机制。同时研究表明,MM疾病本身及其治疗相关的因素会影响凝血系统,最终增加血栓风险<sup>[2]</sup>。MM恶性克隆诱导炎性环境,使其存在明显的凝血及抗凝系统异常<sup>[3]</sup>,导致高血栓风险。本研究发现,MM患者循环中一些凝血因子存在明显异常,血浆D-Dimer、FIB水平均较正常对照组明显升高,ATⅢ水平明显下降;同时体外研究表明,MM存在纤溶异常:MM细胞能增加HUVECs的PAI-1分泌,减少tPA分泌,而PAI-1、tPA为纤溶系统的两大主要成分,调节体内纤溶活性<sup>[4]</sup>。高血栓风险不仅与MM疾病本身相关,同时也与化学治疗相关,尤其是THL联合大剂量地塞米松等化疗方案。THL为目前广泛应用于MM的免疫调节剂,其二代衍生物为来那度胺,此类药物与高血栓风险相关<sup>[5]</sup>。本研究发现,THL可进一步加重MM的血栓事件,MM患者血浆D-Dimer、FIB水平明显升高、处于高凝状态,THL治疗使其血浆浓度进一步升高;血浆ATⅢ水平下降,抗凝受损,THL可导致ATⅢ水平进一步下降,导致MM的高血栓风险。在本研究的体外试验中MM细胞能明显减少HUVECs的tPA分泌,促进其PAI-1的分泌;THL能够增强MM细胞降低纤溶的作用,进一步降低HUVECs的tPA分泌,促进PAI-1分泌。PAI-1为内皮细胞应激标志物,内皮损伤,其分泌增加,PAI-1的增加,又能抑制纤溶,进一步增加血栓风险<sup>[6]</sup>。研究表明,PAI-1的血清水平与炎症因子白介素6(IL-6)水平呈正相关,高水平的IL-6与MM细胞内皮损害及凝血级联反应相关<sup>[7]</sup>。内皮完整性是保证血液正常流动的基础,内皮损伤导致血栓风险增加,THL使内皮应激物PAI-1增加提示MM可能存在内皮活化导致的高凝状态<sup>[8-9]</sup>。本研究通过对一些凝血、抗凝及纤溶因子活性的测定,推断MM血栓的形成与纤溶及抗凝活性的降低及凝血反应的增强有关,同时THL能进一步通过增

加凝血活性、降低抗凝及纤溶活性加重MM血栓风险。MM患者血栓的形成机制涉及多方面,对其机制的深入研究为血栓栓塞的预防及个体化治疗提供新的指标,以期进一步改善MM患者的生存质量。

#### [参考文献]

- [1] Gao Y, Ma G, Liu S, et al. Thalidomide and multiple myeloma serum synergistically induce a hemostatic imbalance in endothelial cells *in vitro* [J]. *Thromb Res*, 2015, 135:1154-1159
- [2] Wang X, Li Y, Yan X. Efficacy and safety of novel agent-based therapies for multiple myeloma: a meta-analysis [J]. *BioMed Res Int*, 2016, 2016:6848902
- [3] Gogia A, Sikka M, Sharma S, et al. Hemostatic abnormalities in multiple myeloma patients [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(1), 127-130
- [4] Echart CL, Somaini S, Distaso M, et al. Defibrotide blunts the prothrombotic effect of thalidomide on endothelial cells [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2012, 18(1):79-86
- [5] Musallam KM, Dahdaleh FS, Shamseddine AI, et al. Incidence and prophylaxis of venous thromboembolic events in multiple myeloma patients receiving immunomodulatory therapy [J]. *Thromb Res*, 2009, 123(5):679-686
- [6] Rosovsky R, Hong F, Tocco D, et al. Endothelial stress products and coagulation markers in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: an observational study [J]. *Br J Haematol*, 2013, 160(3):351-358
- [7] Vallianou N, Lazarou V, Tzangarakis J, et al. Pulmonary embolism as the first manifestation of multiple myeloma [J]. *Case Rep Med*, 2013, 2013:236913
- [8] Benameur T, Chappard D, Fioleau E, et al. Plasma cells release membrane microparticles in a mouse model of multiple myeloma [J]. *Micron*, 2013, 54-55:75-81
- [9] 周丽, 陆化, 卢瑞南, 等. 多发性骨髓瘤细胞对血管内皮细胞tPA及PAI-1表达的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(5):600-604

[收稿日期] 2019-01-13