

• 临床检验研究论著 •

应用凝血酶生成试验评估肝硬化患者血栓形成风险的研究

王 卓, 杨飞兰, 李三清, 王志荣, 邹 莉, 孙婉贞, 李 莹
(中国人民解放军第四五七医院检验科, 湖北武汉 430012)

摘 要:目的 研究抗凝血因子和促凝血因子对凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶生成试验(TGA)结果的影响,探讨 TGA 用于评估肝硬化患者血栓形成风险的价值。方法 收集 93 名肝硬化患者和 50 名健康人群的血液标本,分别进行凝血象、凝血活酶、抗凝因子和抗凝血酶的测定。TGA 利用荧光读数仪测定,通过软件监测绘制样本的凝血酶生成曲线。结果 PT 受凝血因子(F)Ⅱ、FⅤ、FⅧ、FⅨ和蛋白 C 浓度的影响,而 APTT 结果主要由 FⅡ、FⅨ和 FⅩ决定。在 5 pmol/L 组织因子(TF)的 TGA 反应体系中,凝血酶生成潜力(ETP)比值受 FⅡ、抗凝血酶和蛋白 C 水平的影响,并且肝硬化组与对照组之间没有明显差异;而在 1 pmol/L TF 反应体系中 ETP 比值主要由 FⅨ和蛋白 C 决定,肝硬化组与对照组的 ETP 比值差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 PT 和 TGA 受凝血和抗凝因子的调控,并且 TGA 实验对于蛋白 C 浓度变化较为敏感;TGA 能够在 PT 延长的情况下,提示肝硬化患者存在血栓形成的风险,TGA 可作为临床评估肝硬化患者血液高凝状态的敏感指标。

关键词:凝血酶原时间; 部分促凝血酶原时间; 凝血酶生成试验; 血栓形成; 肝硬化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0559-03

The studies for thrombosis risk assessment in patients with liver cirrhosis using thrombin generation assay

Wang Zhuo, Yang Feilan, Li Sanqing, Wang Zhirong, Zou Li, Sun Wanzhen, Li Ying

(Department of Clinical Laboratory, the 457th Hospital of PLA, Wuhan, Hubei 430012, China)

Abstract: Objective To study the influence of pro- and anticoagulation factors on the tests of prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), and thrombin generation assay (TGA); we also investigated whether cirrhosis patients exhibit thrombosis risk using thrombomodulin (TM) induced TGA. **Methods** Venous blood samples were collected from 93 cirrhosis patients and 50 normal controls, and routine coagulation tests, coagulation factor procoagulant activity, anticoagulant factors and antithrombin measurements were executed. The TGA was performed on a calibrated automated thrombogram, given lag time, peak time and endogenous thrombin potential (ETP) in all cirrhosis patients and controls. **Results** PT was significantly affected by factor (F) Ⅱ, FⅤ, FⅧ, FⅨ and protein C levels; and APTT was significantly dependent on FⅡ, FⅨ and FⅩ levels. The ETP was dependent on FⅡ, antithrombin and protein C with 5 pmol/L tissue factor (TF) stimulation, and FⅨ as well as protein C with 1 pmol/L TF. However the ETP ratio with 5 pmol/L TF did not increase in cirrhosis, whereas that with 1 pmol/L TF increased significantly in cirrhosis. **Conclusion** PT and TGA are affected by pro- and anticoagulation factors; even with prolonged PT, TGA can detect hypercoagulability in cirrhosis; the newly TGA system is a useful method to assess hypercoagulability in cirrhosis.

Key words: prothrombin time; partial thromboplastin time; thrombin generation assay; thrombosis; liver cirrhosis

肝脏是多种凝血因子合成的重要器官,肝硬化导致凝血因子合成减少,血浆凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)均有不同程度的延长^[1-4]。有研究表明肝硬化是一种血栓形成性疾病,因为大部分的抗凝和纤溶物质也由肝细胞合成^[5-6]。因此,促凝和抗凝系统均受损时,PT 和 APTT 与出血、凝血之间的相关性较差,不能有效预测血液凝固状态^[7]。人体内的促凝与抗凝之间保持动态平衡,凝血酶是血液凝固的核心,有研究表明凝血酶生成试验(TGA)能够更加准确的评估肝硬化患者的出血或血栓形成风险^[8-9]。本研究旨在探讨肝硬化患者促凝和抗凝因子水平对 PT、APTT 和 TGA 结果的影响,以及通过比较 2 种不同浓度的组织因子(TF)对 TGA 结果的影响,评估肝硬化患者是否有出血或血栓形成的风险。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2012 年 7 月至 2013 年 4 月收治的 93 例第一诊断为肝硬化的患者,排除血液性疾病、近期服用华法林或肝素、体质量小于 30 kg 的患者作为肝硬化组。肝硬化进展程度依据终末期肝脏疾病模式(MELD)进行评分,结果取

整数。选取 50 例同期健康体检者作为对照组。

1.2 标本采集 抽取受检者空腹静脉血 1.8 mL,枸橼酸钠抗凝,3 000 r/min 离心 15 min,取上部 2/3 血浆作为乏血小板血浆;另采集 2 mL 静脉血,EDTA-K2 抗凝,均匀混合进行全血细胞计数分析。

1.3 方法

1.3.1 TGA 利用荧光读数仪(芬兰 Thermo LabSystems OY 公司)和自动校正凝血酶曲线法(CAT)软件(荷兰 Thrombinoscope BV 公司)检测凝血酶生成量。96 孔检测板的各孔分别加入含 5 pmol/L 或 1 pmol/L TF 的 PPP-Reagent 20 μ L 及待测血浆 80 μ L;同时,保持实验条件一致,在待检血浆中加入血栓调节蛋白(TM)至终浓度为 5 pmol/L 或 1 pmol/L;各板均设立质控血浆(法国 POLL NORM 公司)。上机后仪器自动向各孔内加入 20 μ L 荧光底物液,通过 CAT 软件动态监测凝血酶生成量,并对样本荧光强度分析绘制凝血酶生成曲线,包括延迟时间、峰值和凝血酶生成潜力(ETP)。本研究 ETP 比值的计算公式:ETP 比值 = $\frac{\text{ETP}_{\text{TM干扰}}}{\text{ETP}_{\text{无TM干扰}}} \times$

100%，高 ETP 比值表示抗凝因子 TM 的干扰小，可直观表示血浆的高凝程度。

1.3.2 常规项目检测 (1)PT、APTT 和纤维蛋白原(FIB)采用雷杜 RAC-100 全自动凝血仪进行分析，试剂盒和质控物均购自上海长岛生物技术有限公司；(2)凝血因子促凝活性 FⅡ：C、FⅤ：C、FⅦ：C、FⅧ：C、FⅨ：C 均用一期凝固法检测，试剂及质控物购自上海太阳生物技术公司；(3)蛋白 C 和蛋白 S 测定均采用 ELISA 法，试剂盒购自上海生物制品研究所；(4)抗凝血酶测定采用底物显色法，仪器及试剂购自法国 Stago 公司；(5)全血细胞计数采用 Sysmex XT-1800 血液分析仪及配套试剂和质控品。

1.4 统计学处理 采用 SAS 软件进行数据分析。计量资料呈非正态分布，采用 $M(P_{25} \sim P_{75})$ 表示。连续变量的比较采用秩和检验，绝对变量之间的比较采用 χ^2 检验，变量之间的相关性分析采用 Pearson 相关系数检验；凝血和抗凝因子与凝血酶生成、PT、APTT 之间的关系采用多重线性回归进行分析，用标准回归系数表示每个独立变量对每种凝血时间变化的影响。若 $P < 0.05$ ，差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般流行病学和凝血试验 肝硬化患者和对照组的一般流行病学及实验室检测结果比较见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。两组研究对象的年龄、性别等比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。肝硬化组的 PT、APTT 较对照组明显延长，而抗凝因子(包括抗凝血酶、蛋白 C 和蛋白 S)明显低于对照组。

2.2 肝硬化凝血实验决定因素的多元回归分析 采用多重线性回归分析不同变量对肝硬化组患者整体凝血时间的影响，见表 2。FⅦ对 PT 的负调控作用最显著，而蛋白 C 则为主要的正调控因子。同时，FⅡ、FⅨ和 FⅩ 的浓度变化对 APTT 的结果具有明显的影响。在 TGA 中，FIB、蛋白 C 和蛋白 S 在延迟时间阶段为正调控因子；在峰值阶段，FⅨ和蛋白 C 分别为最显著的正相关和负相关因子；在 ETP 阶段，5 pmol/L 的反应体系中 FⅡ为最显著的正相关因子，负相关因子为抗凝血酶和蛋白 C，而在 1 pmol/L 反应体系中显著的正相关和负相关因子则分别是 FⅨ和蛋白 C。

表 2 肝硬化凝血实验决定因素的多元回归分析($n=93$)

项目	标准差	标准回归系数							
		PT	APTT	延迟时间		峰值		ETP	
				5 pmol/L	1 pmol/L	5 pmol/L	1 pmol/L	5 pmol/L	1 pmol/L
R ²	—	0.783	0.612	0.489	0.393	0.501	0.338	0.466	0.256
FIB	113.4	0.089	−0.006	0.635	0.617	0.034	−0.208	−0.046	−0.199
FⅡ	32.7	−0.439	−0.677	−0.298	−0.444	0.465	0.005	1.343	0.422
FⅤ	23.6	−0.143	0.026	0.165	0.100	0.133	0.013	0.001	−0.078
FⅦ	37.9	−0.288	0.092	−0.234	−0.004	0.049	0.126	−0.230	0.089
FⅧ	59.6	0.035	−0.176	0.026	0.100	−0.041	−0.081	0.121	−0.094
FⅨ	34.5	−0.195	−0.721	−0.141	−0.280	0.599	0.989	0.181	0.711
FⅩ	33.4	−0.149	0.496	−0.199	−0.210	0.074	0.266	0.231	0.119
抗凝血酶	52.7	0.039	−0.085	0.020	0.023	0.001	−0.051	−0.219	−0.149
蛋白 C	42.4	0.299	−0.019	0.362	0.434	−0.649	−0.833	−0.777	−1.090
蛋白 S	23.3	0.016	−0.039	0.280	0.253	0.017	−0.120	−0.089	−0.027

—：无数据。

2.3 ETP 比值反映肝硬化患者血液高凝状态 在 1 pmol/L TF 的反应体系中，肝硬化组的 ETP 比值高于对照组，且差异有统计学意义($P < 0.05$)，提示肝硬化组患者血栓形成风险高于对照组；在 5 pmol/L TF 反应体系中，两组间的差异无统计学意义。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

在以上结果的基础上，对 1 pmol/L TF 反应体系中的 MELD 不同分组之间以及各组与对照组之间的差异进行比较分析。可知 MELD < 20 和 MELD $20 \sim 25$ 两组与对照组比较 ETP 比值均明显增高(图 2A)；峰值阶段的比值类似 ETP 比值(图 2B)；在延时阶段，肝硬化各组比值均低于对照组(图 2C)。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

PT 和 APTT 延长预示促凝因子缺乏，但不能反映体内抗凝物质的缺乏以及抗凝和促凝之间的平衡，单纯依靠 PT 和

APTT 并不能有效监测肝硬化患者的出、凝血情况^[10-11]。Youngwon 等^[12]的研究结果表明，与 PT 延长提示出血风险恰恰相反，肝硬化患者常伴随血栓形成风险，因此准确评估肝硬化患者血液凝固状态具有重要的临床意义。凝血酶是促凝与抗凝的枢纽，其生成量反映了体内促凝与抗凝之间的关系，是一种较为综合和全面反映血浆凝血状态的检测方法。

本研究结果表明，血液中 FⅡ、FⅤ、FⅦ和 FⅨ等凝血因子的变化能够显著改变 PT，因此肝硬化患者常伴有 PT 延长。目前，体外研究证明蛋白 C 通过抑制 FⅤ和 FⅦ的活性可使 PT 延长，说明了虽然肝硬化患者存在 PT 延长倾向，但抗凝因子在降低到一定水平时可能还会表现为 PT 的缩短^[13]。在本实验中，蛋白 C 的水平与 PT 呈显著地正相关，这与体外研究结果一致，提示了蛋白 C 在体内抗凝血作用的可能机制。由于 PT 是临床划分肝硬化进程的指标之一，因此临床医生还应重视蛋白 C 等抗凝因子对 PT 的影响。APTT 的临床意义是

监测内源性凝血,主要受 FⅡ、FⅨ和 FⅩ等因子水平的影响,但在本实验结果显示 APTT 与上述因子变化的关系与预期不符,说明 APTT 不能完全反映肝硬化患者内源性凝血的状态,这也与 Kitchens 等^[14]研究结果相一致。

在凝血酶生成试验中,延迟时间阶段应与蛋白 C 和蛋白 S 水平呈正相关,与 FIB 呈负相关^[10-15]。但本研究结果显示了 FIB 与延迟时间是呈正相关性的,这是因为 FIB 作为急性期蛋白在肝细胞炎症病变时期合成是增加的,但此时还伴随凝血因子合成分泌下降,增加的 FIB 浓度不足以补偿凝血因子降低对 TGA 延迟时间的调控作用,因此 FIB 对该阶段的“正调控”是由凝血因子合成降低导致的。TGA 各阶段均明显依赖蛋白 C,证明 TGA 对于肝硬化和获得性生成障碍等体内蛋白 C 水平较低的患者,更能准确反映其凝血状态。

蛋白 C 是体内主要的抗凝物质,作用是激活 TM,分别在 TM 存在和不存在的条件下进行凝血酶生成试验,所获得的 ETP 比值表示血液凝固系统抵抗 TM 抗凝固作用的能力。Tridopi 等^[8]报道了 1 pmol/L TF 刺激下,ETP 比值能够提示肝硬化患者血液是否处于高凝状态。在本研究引入了 1 pmol/L 和 5 pmol/L 两种不同浓度 TF 的反应体系进行分析比较。在 1 pmol/L 体系中肝硬化组的 ETP 比值要明显高于对照组;而 5 pmol/L 体系中两组研究对象没有明显差异。这是由于 1 pmol/L TF 对 FⅢ、FⅨ和 FⅩI 的浓度变化较为敏感,肝硬化患者血液的高凝状态常是由 FⅢ增加和蛋白 C 下降导致的,实验结果也从侧面说明了 Brummel-Ziedins 等^[16]在早期的研究中采用的 5 pmol/L TF 反应体系并不适合评估肝硬化患者血液的凝固状态。另外,在本实验 1 pmol/L TF 反应体系中,当 MELD<25 分时,ETP 比值随着分数的增加而增加;当 MELD>25 分时,大部分 ETP 比值低于上述结果,说明 MELD<25 分时患者存在血栓形成风险的比例较高,同时提示需要进一步增加 MELD>25 分的研究对象,以确定血液的高凝状态是否主要出现在 MELD 低分人群。

综上所述,PT、TGA 受凝血和抗凝因子浓度的影响,TGA 可较为灵敏地反映蛋白 C 水平的变化;在 1 pmol/L TF TGA 反应体系中,ETP 比值能够较为确切地反映肝硬化患者是否处于高凝状态,避免了 PT、APTT 结果延长所提示的“出血倾向”的假象,提示利用 TGA 评估肝硬化患者血栓形成风险具有临床意义。

参考文献

- [1] 熊斌,姜红星. 120 例肝病患者凝血功能检测分析[J]. 检验医学与临床,2011,8(2):198-199.
- [2] 林壮琼,张展青. 肝硬化患者凝血功能和血小板检测分析[J]. 检
- [6] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11):1271-1277.
- [7] 费允云,张奉春. 系统性红斑狼疮患者死亡原因分析[J]. 中华风湿病学杂志,2008,12(6):187-191.
- [8] 刘旭. 组织型纤溶酶原激活物及纤溶酶原激活物抑制剂对系统性红斑狼疮的检测价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(12):1446-1447.
- [9] 黄萃,武蓉珍,吴日荷,等. 正常成年人网织血小板相关参数的检

验医学与临床,2012,10(8):986-987.

- [3] 易有峰,王晓娟,陈有元. 肝硬化患者凝血指标检测的临床意义[J]. 中国肝脏病杂志:电子版,2010,2(3):28-29.
- [4] Ahmad H, Samina N, A. Saeed S, et al. An assessment of coagulation parameters in liver cirrhosis[J]. Biomedica, 2006, 22(1):74-77.
- [5] Biresi M, Hull R, Coffin CS. Venous thromboembolism in cirrhosis: a review of the literature[J]. Can Gastroenterol, 2012, 26(12):905-908.
- [6] Tripodi A, Primignani M, Lemma L, et al. Detection of the imbalance of procoagulant versus anticoagulant factors in cirrhosis by a simple laboratory method[J]. Hepatology, 2010, 52(1):249-255.
- [7] Tripodi A, Primignani M, Chantarangkul V, et al. An imbalance of pro- versus anti-coagulation factors in plasma from patients with cirrhosis[J]. Gastroenterology, 2009, 137(6):2105-2111.
- [8] Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite abnormal conventional coagulation tests[J]. Hepatology, 2005, 41(3):553-558.
- [9] Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, et al. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability[J]. Haematologica, 2003, 88(5):547-554.
- [10] Anstee QM, Thursz MR. The role of hypercoagulability in liver fibrogenesis[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011, 35(8/9):526-533.
- [11] Gatt A, Riddell A, Calvaruso V, et al. Enhanced thrombin generation in patients with cirrhosis-induced coagulopathy[J]. Thromb Haemost, 2010, 8(9):1994-2000.
- [12] Youngwon N, Kim JE, Lim HS, et al. Coagulation proteins influencing global coagulation assays in cirrhosis: hypercoagulability in cirrhosis assessed by thrombomodulin-induced thrombin generation assay[J]. Biomed Res Int, 2013, 13(1):856754.
- [13] Regnault V, Beguin S, Wahl D, et al. Thrombinography shows acquired resistance to activated protein C in patients with lupus anticoagulants[J]. Thromb Haemost, 2003, 89(2):208-212.
- [14] Kitchens CS. To bleed or not to bleed: Is that the question for the PTT[J]. Thromb Haemost, 2005, 3(12):2607-2611.
- [15] Dielis AW, Castoldi E, Spronk HMH, et al. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population[J]. Thromb Haemost, 2008, 6(1):125-131.
- [16] Brummel-Ziedins KE, Pouliot RL, Mann KG. Thrombin generation: phenotypic quantitation[J]. Thromb Haemost, 2004, 2(2):281-288.

(收稿日期:2013-11-01)

(上接第 558 页)

- [6] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum, 1982, 25(11):1271-1277.
- [7] 费允云,张奉春. 系统性红斑狼疮患者死亡原因分析[J]. 中华风湿病学杂志,2008,12(6):187-191.
- [8] 刘旭. 组织型纤溶酶原激活物及纤溶酶原激活物抑制剂对系统性红斑狼疮的检测价值[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(12):1446-1447.
- [9] 黄萃,武蓉珍,吴日荷,等. 正常成年人网织血小板相关参数的检

测评价[J]. 中国医师杂志,2010,12(4):536-538.

- [10] Monteagudo M, Amengual MJ, Mufioz L, et al. Reticulated platelets as a screening test to identify thrombocytopenia aetiology[J]. QJM, 2008, 101(7):549-555.
- [11] 杨林花,李智婷,刘秀娥,等. 系统性红斑狼疮患者网织血小板和血小板生成素检测及其临床意义[J]. 中国药物与临床,2004,4(6):432-435.

(收稿日期:2013-12-14)