

monocyte MicroRNA and mRNA expression; dyslipidemia associates with increased differentiation-related genes but not inflammatory activation[J]. PLoS One, 2015,10(6):421-435.

[22] Theresa A,Simon J,Gian C,et al. Effect of(S)-3,5-DH-PG on MicroRNA expression in mouse brain[J]. Exp Neurol,2012,235(2):497-507.

[23] Li B,Xu F,Ming S,et al. MicroRNA-185 Targets SOCS3 to inhibit beta-cell dysfunction in diabetes[J]. PLoS One, 2015,10(2):67-81.

(收稿日期:2017-03-12 修回日期:2017-05-01)

• 综 述 •

血栓与止血分子标志物检测在血栓性疾病中的研究进展

季洪良,闫本纯,杨正亮,金 红,陈宏娟 综述,闫海润[△]审校
(牡丹江医学院红旗医院检验科,黑龙江牡丹江 157011)

关键词:血栓性疾病; 分子标志物; 血栓形成
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.036 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)17-2434-03

血栓性疾病是指血液中的异常物质沉积在血管壁导致血管闭塞或狭窄而引起的一类疾病^[1]。血栓形成指的是在血液循环过程中,在某些因素作用下,有形成分附着在血管壁上,激活体内凝血以及抗凝系统,最终造成凝血、抗凝两大系统的平衡被破坏,越来越多有形成分附着在暴露的内皮细胞下胶原处,造成血管壁狭窄或完全堵塞,引发血液循环障碍而导致血栓形成^[2]。在血栓形成过程中,血管内皮细胞会释放或合成许多物质,其中血栓调节蛋白、凝血酶-抗凝血酶复合物、纤溶酶-α2 纤溶酶抑制物复合物、组织纤溶酶原激活物/纤溶酶原激活物抑制剂-1 是在血栓形成过程中产生的主要分子标志物,血栓与止血分子标志物的检测有助于血栓性疾病患者的早期诊断。随着科学技术的发展,血栓与止血分子标志物的研究及方法学进展,在血栓性疾病诊断中发挥越来越重要的作用。目前,国内外对血栓性疾病已经开展了许多检测,尤其是新化学发光法的出现,将有更为广阔的临床应用前景。现就对这 4 种分子标志物的生理功能、检测方法以及在血栓性疾病诊治中的研究进展做一综述。

1 血栓与止血分子标志物

1.1 血栓调节蛋白(TM) TM 是血管内皮细胞表达的一种糖蛋白。当内皮细胞受损时, TM 被降解并释放到血液中,血浆 TM 水平可反映内皮细胞损伤的程度。1981 年有研究者发现 TM 作为活化蛋白 C 的辅助因子与凝血酶结合并使蛋白 C 活化速度增加,是具有强大抗凝作用的物质^[3]。TM 主要通过以下几方面发挥抗凝作用:(1)TM 是凝血酶的受体,其与凝血酶结合形成血栓调节蛋白-凝血酶复合物从而抑制凝血酶介导的纤维蛋白原凝固以及血小板的聚集和凝血因子 V,Ⅷ,Ⅸ,Ⅺ 的激活,此外它催化抗凝血酶对凝血酶的抑制;(2)血栓调节蛋白与凝血酶结合促进凝血酶活化蛋白 C(PC),活化的蛋白 C(APC)在蛋白 S(PS)的作用下,可以使凝血因子 V a 和因子Ⅷa 失活而发挥抗凝作用并促进血小板因子 4 与 PC 的结合以加速其活化;(3)TM 能直接抑制凝血酶的凝活能力,此外 TM 能促进抗凝血酶灭活凝血酶;(4)TM 可以激活纤维蛋白溶解抑制剂,还可以加速凝血酶介导的单链尿激酶型纤溶酶原激活物转化为凝血酶裂解的 2-链尿激酶型纤溶酶原激活物,而干扰

纤溶酶的产生^[4]。TM 作为内皮细胞分泌的一种重要抗凝标志物,当内皮细胞受损时其分泌释放增加,由此可见, TM 在抗凝、纤溶等方面对机体起着保护作用。

血栓性疾病发生发展过程中常常伴随着血管内皮细胞的破坏, TM 作为血管内皮细胞上的一个分子标志物与此类疾病的发生发展密切相关^[5]。血栓性疾病在其发展过程中内皮细胞逐渐破坏,血栓调节蛋白分泌释放入血液中,血浆中 TM 水平高低可以反映血管内皮细胞损伤程度,因此,检测血浆 TM 水平有助于血栓性疾病患者的预防、诊疗以及预后评估。

1.2 凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT) 凝血酶是由凝血酶原激活物在钙离子参与下激活凝血酶原而生成的,生理情况下体内仅有少量凝血酶生成,之后很快又与抗凝血酶结合生成 TAT 而灭活,TAT 生成过程:首先肝素先结合于抗凝血酶的赖氨酰基从而使抗凝血酶的分子构象发生改变,然后抗凝血酶-肝素复合物与凝血酶结合形成凝血酶-肝素-抗凝血酶三联复合物,之后肝素解离形成凝血酶-抗凝血酶复合物^[6]。TAT 是衡量凝血酶生成和活性增高的分子标志物。

在血栓性疾病中均有血栓形成病理过程,凝血酶参与的凝血级联反应过度激活是血栓形成因素之一,检测凝血酶即可以反映体内凝血系统的情况,但是由于体内凝血酶产生后迅速与血液中其他物质作用而消失,因此,很难检测血液中凝血酶水平^[7]。TAT 是凝血酶与抗凝血酶结合形成的复合物,TAT 是能够反映凝血酶生成量和凝血酶活性的分子标志物,因此,临床上通过检测血液中 TAT 可间接测得凝血酶水平。

1.3 纤溶酶-α2 纤溶酶抑制物复合物(PAP) 当机体发生血栓时,纤溶系统被激活发挥血栓溶解作用。纤维蛋白在纤溶酶的作用下被降解为纤维蛋白降解产物和 D-二聚体。纤溶酶是纤溶酶原在纤溶酶原激活物作用下产生,纤溶酶可与纤维蛋白结合使纤维蛋白降解,若纤溶酶不与纤维蛋白或其他细胞外物质结合,它就会在数微秒内与特异性的 α2-纤溶酶抑制物以共价键结合形成 PAP^[8]。

血液内纤溶酶水平可反映体内纤溶系统激活情况,由于纤溶酶在体内的半衰期只有大约 10 min,在血栓形成过程中不易检测纤溶酶水平。PAP 是体内纤维蛋白溶解实际状态的敏感

[△] 通信作者,E-mail:yanhairun581022@sina.com。

标志物。在血栓性疾病中为了全面了解机体在凝血系统、纤溶系统方面的状态,纤溶系统激活的分子标志物检测将有助于研究者更好地对血栓性疾病进行预防、诊断、治疗以及预后评价^[9]。

1.4 组织纤溶酶原激活物(t-PA)/纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1) 纤溶酶原是纤溶系统主要成分,是一种无活性的酶原在纤溶酶原激活物作用下转变为有活性的纤溶酶,参与纤维蛋白及各种细胞外基质的降解。t-PA 是体内最重要也是最早发现存在于血液中的纤溶酶原激活物,可以诱导纤维蛋白凝块降解^[10]。t-PA 主要由血管内皮细胞分泌释放入血液循环,强体力活动、血栓栓塞或作用于血管的药物如儿茶酚胺类药物等刺激血管内皮细胞均可使血管内皮细胞分泌 t-PA。这些刺激物会使 t-PA 在数分钟内迅速增高。肝脏是 t-PA 的主要清除器官,由于其在肝脏清除率很快并且与 PAI-1 形成复合物,因此其半衰期很短,为 4~5 min^[11]。t-PA 在血液与其他止血酶相比较,不能以无活性的酶原形式释放,而是以有活性的蛋白酶形式释放入血液循环中;t-PA 对循环血浆中游离的纤溶酶原亲和力很低,不能使其活化,只有纤溶酶足够时才能被活化;t-PA 的合成不是恒定和一致的,而是有着昼夜节律的,一般 t-PA 活性在下午和晚上较低,清晨活性最高^[12]。

PAI-1 是一种丝氨酸蛋白酶抑制物和最重要的纤溶酶原活化物抑制物,主要由血管内皮细胞合成并分泌,PAI-1 主要作用是抑制 t-PA,从而使 t-PA 不能激活纤溶酶原变为纤溶酶,使纤溶酶不能降解纤维蛋白,从而使纤维蛋白大量沉积于血管壁和刺激平滑肌细胞增生等作用,PAI-1 在调节凝血和纤溶两大系统平衡方面具有重要作用^[13]。PAI-1 以活性形式存在于血浆中,生理情况下并没有游离的纤溶活性预先产生。但是由于 PAI-1 缓慢抑制组织型纤溶酶原激活物,血浆中仍有极少部分活性被检出。

t-PA 的释放主要受 PAI-1 调节,t-PA 通过与 PAI-1 形成一不可逆复合物使纤溶系统处于动态平衡状态。t-PA 和 PAI-1 是纤溶系统中最重要调节因子,能够估计纤溶系统的潜能,当机体存在血栓形成倾向时,一般纤溶系统也会发生异常,测定血浆 t-PA 和 PAI-1 可反映体内纤溶系统情况^[14]。

2 血栓与止血分子标志物的检测方法

2.1 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA 方法的基本原理用纯化的抗体与加入的抗原分子结合用与酶标记的抗体特异性结合,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,经过洗涤后加底物,底物在过氧化物酶的作用下发生氧化还原反应出现颜色改变。因此,可根据底物颜色的变化来判断是否发生相应的免疫反应,颜色变化的深浅与标本中相应抗体或抗原的量呈正相关。ELISA 方法是一种定性、半定量检测方法,有其局限性,重复性不好;受自身抗体、可溶性抗原等干扰,易出现假阳性或假阴性结果;不论仪器和手工操作,干扰因素均较多。

2.2 化学发光酶免疫测定法 超敏化学发光免疫分析仪的问世给医疗领域带来很大便利。化学发光酶免疫测定法是定量测定标本中微量蛋白或激素等,使样本和试剂混合发生免疫反应,再与酶结合发生酶反应,通过计数酶反应中发出的光子,检测微量蛋白或激素水平。超敏化学发光相较于 ELISA 法,有其独特优势,检测速度快,只需 17 min,具有高敏感度、结果可靠以及误差小等特点。目前,在血栓与止血分子标志物检测中大多数还应用 ELISA 方法,超敏化学发光法在血栓与止血分

子标志物中的应用价值,将成为一个热门的研究方向。

3 血栓与止血分子标志物与血栓性疾病

3.1 冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病) 冠心病主要是由于内皮细胞在各种因素刺激下导致内皮细胞结构和功能受损,血液内的低密度脂蛋白、胆固醇等脂质沉积于受损动脉内膜,引起平滑肌细胞、纤维结缔组织增生,导致动脉管壁增厚变硬逐渐形成粥样硬化斑块^[15]。粥样硬化斑块破裂后,在血管壁形成溃疡,血液中的血小板、纤维蛋白等有形物质聚集在内皮下胶原,逐渐形成局部血栓。血栓形成过程中通常会有内皮细胞受损以及凝血和纤溶两大系统的失衡情况发生。王彦富等^[16]研究发现 TM 在急性冠状动脉综合征患者表达大量增加,其水平升高程度与冠状动脉内斑块易损性呈明显正相关,提示 TM 水平与急性心血管事件关系密切。熊旭光等^[17]研究发现 TAT 在冠心病早期时显著升高且也与冠心病危险性呈一定相关性,可作为冠心病早期的诊断指标;PAP 在冠心病患者中显著升高提示冠心病患者纤溶酶的激活;冠心病患者血浆 t-PA 明显降低,PAI-1、P/T 比值明显升高^[18];目前血栓与止血分子标志物在冠心病患者中的应用已被广为接受。

3.2 恶性肿瘤性疾病 恶性肿瘤患者普遍存在凝血、抗凝、纤溶系统异常,恶性肿瘤血栓发生概率很高,甚至在某些恶性肿瘤中是以凝血功能异常为首发症状出现。肿瘤细胞能够破坏血管内皮细胞并且肿瘤细胞本身能够释放一些促进机体凝血系统活化的因子,恶性肿瘤细胞破坏机体凝血、抗凝及纤溶系统平衡,导致机体处于高凝状态,肿瘤患者血液的这种高凝状态使得癌细胞更易于浸润和转移。张钧^[19]研究认为胃癌患者的凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)及 TAT 水平均较健康者显著增高,且与胃癌分期呈正相关。文献^[20]报道,非小细胞肺癌患者的血浆 TM 显著升高,认为 TM 具有抗肿瘤作用。高丽华等^[21]研究显示,肺癌患者血浆 PAP 水平明显升高且与癌细胞转移有相关性,可作为判断肺癌转移的辅助指标之一。

恶性肿瘤血栓形成等并发症的及时诊断和治疗能够降低肿瘤患者晚期出血风险以及提高患者生存时间。因此,通过检测血栓与止血分子标志物对肿瘤血栓前状态的及早诊断,对预防肿瘤患者血栓形成及出血等并发症极为关键。

3.3 脑梗死 脑梗死主要是由于各种原因导致血管内皮细胞受损,内皮下胶原暴露,血小板黏附聚集,激活体内凝血纤溶系统,血液呈高凝状态,机体内的纤维蛋白等物质沉积血管壁形成血凝块最终形成血栓,血栓形成后导致脑血管狭窄或闭塞,从而使脑组织缺血缺氧而发病。脑梗死发生发展的主要基础是血液与受损血管壁之间的相互作用,任何原因导致血管内皮下组分的暴露,均可激活血小板及凝血系统。张立中等^[22]研究显示,急性脑梗死患者急性期血浆 TM 和 D-二聚体明显增高且与梗死灶体积呈明显正相关。蔡淑锋^[23]研究发现脑梗死急性期血浆 TAT 水平显著升高。常玉荣等^[24]研究显示急性脑梗死患者血浆 t-PA 减低,PAI-1 增高,说明脑梗死患者纤溶活性降低,血液存在高凝状态,有利于血栓形成和发展。因此,检测血液中血栓与止血分子标志物有助于对脑梗死诊断、判断病情严重程度以及治疗方案的选择等。

4 小结

近年来,血栓性疾病已经成为严重危害人类健康、影响人们生活质量的重大疾病。临床医生所面临重大难题是如何快速而准确地作出诊断,并进一步作出治疗决策,挽救患者生命。

血管内皮损伤、凝血、抗凝以及纤溶系统功能异常在血栓性疾病中起重要作用^[25]。因此,临床上血栓分子标志物检测对血栓性疾病的诊断、抗凝及溶栓治疗的监测具有重要意义。

综上所述,血栓与止血分子标志物水平检测已广泛作为血栓性疾病监测指标,但是,目前,国内研究只是将血栓分子标志物中一项或联合常规项目检测应用于血栓性疾病,并没有将这几种标志物联合应用于血栓性疾病的早期诊断,且所用方法都是 ELISA 方法,而超敏化学发光法相较于 ELISA 方法有很大优势。超敏化学发光法是一种定量检测样本中微量蛋白或激素的一种敏感度强的方法,高敏发光可达 10~21 mol/L。多分子标志物联合检测并且应用超敏化学发光法对血栓性疾病进行早期诊断,能否提高血栓性疾病早期诊断率等方面还需临床研究验证。随着研究的进一步深入,血栓与止血分子标志物检测在血栓性疾病诊治中将有更为广阔的临床应用前景。

参考文献

- [1] 唐亮,胡豫.中国血栓性疾病的研究与诊治现状[J].中华检验医学杂志,2016,39(10):729-732.
- [2] Jovanovic M, Milic D, Djindjic B, et al. Importance of D-dimer testing in ambulatory detection of atypical and "silent" phlebothrombosis[J]. Voj Pregled, 2010, 67(7): 543-547.
- [3] Jr FT, Chang A, Esmon CT, et al. Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of Escherichia coli infusion in the baboon[J]. J Clin Invest, 1987, 79(3): 918-925.
- [4] Ge B, kang Z. Puerarin offsets the anticoagulation effect of Warfarin in rats by inducing rCyps, upregulating vitamin K epoxide reductase and inhibiting thrombomodulin[J]. Biol Drug Dis, 2016, 12(7): 121-122.
- [5] 李宸宇,孙晓红,王丽,等.血栓调节蛋白的研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(4):445-449.
- [6] Negreva M, Georgiev S, Prodanova K, et al. Early changes in the antithrombin and thrombin-antithrombin complex in patients with paroxysmal atrial fibrillation[J]. Card Res, 2016, 7(3): 89-94.
- [7] Sakata M. Thrombin, antithrombin, thrombin-antithrombin complex[J]. Japanese J Clin Med, 2010, 68(1): 688-690.
- [8] Masago K, Fujita S, Mio T, et al. Clinical significance of the ratio between the alpha 2 plasmin inhibitor-plasmin complex and the thrombin-antithrombin complex in advanced non-small cell lung cancer[J]. Med Oncology, 2011, 28(1): 351-356.
- [9] Kanno Y, Kawashita E, Kokado A, et al. Alpha2-antiplasmin regulates the development of dermal fibrosis in mice by prostaglandin F(2 α) synthesis through adipose triglyceride lipase/calcium-independent phospholipase A(2)[J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(2): 492-502.
- [10] Bertelmann T, Stief T, Boelen R, et al. Fibrinolysis in normal vitreous liquid[J]. Blood Coag Fib, 2014, 25(3): 217-220.
- [11] Muchada M, Rodriguez-Luna D, Pagola J, et al. Impact of time to treatment on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2014, 45(9): 2734-2738.
- [12] Whiteley WN, Thompson D, Sandercock P. Response to letter regarding article, "targeting recombinant Tissue-Type plasminogen activator in acute ischemic stroke based on risk of intracranial hemorrhage or poor functional outcome: an analysis of the third international stroke trial"[J]. Stroke, 2014, 45(7): 133.
- [13] Ibrahim AA, Yahata T, Onizuka M, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration[J]. Stem Cells, 2014, 32(4): 946-958.
- [14] Gong LH, Liu M, Zeng T, et al. Crystal structure of the michaelis complex between tissue-type plasminogen activator and plasminogen activators inhibitor-1[J]. J Bio Chem, 2015, 290(43): 25795-25804.
- [15] Lam JT, Latour JG, Lespérance J, et al. Platelet aggregation, coronary artery disease progression and future coronary events[J]. American J Card, 1994, 73(5): 333-338.
- [16] 王彦富,张宗雷,孙亚男,等.可溶性血栓调节蛋白与冠状动脉粥样硬化斑块易损性的相关性研究[J].临床心血管病杂志,2015,32(10):1068-1070.
- [17] 熊旭光,唐其柱,刘文卫.凝血酶-抗凝血酶复合物及 D-二聚体在冠心病早期诊断中的价值[J].实用老年医学, 2015, 20(2): 131-133.
- [18] 杨玲,黄景文,罗韶金,等.冠心病患者纤溶活性功能的变化及其临床意义[J].白求恩医学杂志,2015,22(4):350-352.
- [19] 张钧.胃癌患者血浆 TAFI 及 TAT 的变化及其临床意义[J].实用癌症杂志,2016,31(3):390-392.
- [20] Yc K, Wu LW, Shi CS, et al. Downregulation of thrombomodulin, a novel target of snail, induces tumorigenesis through epithelial-mesenchymal transition[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(20): 4767-4785.
- [21] 高丽华,吕凌云.纤溶酶-抗纤溶酶复合物 76 例肺癌患者检测及临床意义[J].肿瘤学杂志,2012,18(6):475-476.
- [22] 张立中,陈洪山,华俊,等.血浆 D-二聚体、血栓调节蛋白联合检测对脑梗死患者的临床意义[J].国际检验医学杂志,2011,32(2):287-288.
- [23] 蔡淑峰.心绞痛和脑梗死患者血浆 TAT、D-D、ET 水平变化及临床意义[J].中国现代医生,2012,50(23):31-32.
- [24] 常玉荣,薄海美,孙尚帛.急性脑梗死患者血栓前状态实验室检测指标的临床意义[J].现代预防医学,2010,37(20):3948-3949.
- [25] Hosoda J, Ishikawa T, Matsushita KA, et al. Clinical significance of collateral superficial vein across clavicle in patients with cardiovascular implantable electronic device[J]. Circulation J, 2014, 78(8): 1846-1850.