

论著·临床研究

2 种方法测定急性脑梗死患者蛋白 C 抗凝活性比较分析*

李 蕾, 马 静, 杨 旭, 王晓琳, 洪 萍, 王培昌[△]

(首都医科大学宣武医院检验科, 北京 100053)

摘 要:目的 采用不同方法检测急性脑梗死患者血浆中蛋白 C 抗凝活性, 并评价 2 种方法的相关性、一致性及临床可替代性。方法 收集 294 例临床血浆样本, 用发色底物法和凝固法同时测定血浆中蛋白 C 抗凝活性, 比较 2 组数据的相关性和一致性。结果 2 种方法检测急性脑梗死患者蛋白 C 抗凝活性结果差异无统计学意义($P>0.05$), 具有良好的相关性, 但二者一致性检验较差。结论 实验室在比较不同方法检测一致性时应采取多种方法从不同角度进行联合评价, 以避免某一方法评价中局限性的影响, 使评价结论更合理、客观。

关键词:蛋白 C; 发色底物法; 凝固法; 急性脑梗死

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.008

中图分类号:R743;R446.1

文章编号:1673-4130(2019)22-2721-04

文献标识码:A

Comparison of anticoagulant activity of protein C in patients with acute cerebral infarction by two methods*

LI Lei, MA Jing, YANG Xu, WANG Xiaolin, HONG Ping, WANG Peichang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China)

Abstract:Objective To detect the anticoagulant activity of plasma protein C by two methods in patients with acute cerebral infarction, the correlation and consistency of the two methods were evaluated. **Methods** Totally 294 clinical plasma samples were collected and the anticoagulant activity of protein C in plasma was measured simultaneously by chromogenic substrate method and coagulation method, and the correlation and consistency between the two groups of data were compared. **Results** There was no significant difference in test results between the two methods in patients with acute cerebral infarction ($P>0.05$), and two methods had good correlation, but poor consistency. **Conclusion** In order to avoid the influence of limitation in a certain method evaluation and make the evaluation conclusion more reasonable and objective, the laboratory should adopt many methods to evaluate the consistency of different methods from different angles.

Key words: protein C; chromogenic substrate method; coagulation method; acute cerebral infarction

蛋白 C 是体内一种重要的抗凝血因子, 其抗凝活性占全血的 20%~30%。蛋白 C 缺乏在健康人群中的检出率为 0.2%~0.4%, 在血栓症患者中的发病率为 5%~15%, 在静脉血栓栓塞症患者的检出率为 2.3%~3.3%^[1]。而我国蛋白 C 缺乏检出率为 2.26%^[2]。由于大部分患者临床表现轻微甚至无明显临床表现, 2% 的蛋白 C 缺乏症有明显而严重的临床症状, 如深静脉血栓形成、弥散内血管内凝血等血栓性疾病^[3], 因此, 对体内蛋白 C 的检测具有重要的临床意义。蛋白 C 抗凝活性检测主要是发色底物法

和凝固法, 目前不同实验室和仪器对蛋白 C 抗凝活性的检测方法尚不统一^[4-6], 并且国内用 2 种检测方法针对某一疾病进行蛋白 C 抗凝活性分析的研究较少。本研究针对本院健康人群和急性脑梗死患者, 分别采用发色底物法和凝固法检测蛋白 C 抗凝活性并进行方法学比较, 以确定 2 种方法在临床应用中的可交换性和替代性, 为临床应用分析提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 7—12 月首都医科大学宣武医院神经内科住院的急性脑梗死患者 160 例

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81501841)。

作者简介: 李蕾, 女, 主管技师, 主要从事血栓与止血检验研究。 [△] 通信作者, E-mail: mo_cjin@163.com。

本文引用格式: 李蕾, 马静, 杨旭, 等. 2 种方法测定急性脑梗死患者蛋白 C 抗凝活性比较分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2721-

为疾病组,其中男 82 例,女 78 例,年龄 46~86 岁,平均(67.34±19.09)岁。纳入标准:(1)首次发作;(2)发病时间≤48 h;(3)符合 1995 年中华医学会第 4 届全国脑血管病学术会议制订的各类脑血管疾病诊断要点;(4)所有患者均经头颅 CT 或 MRI 检查确诊。排除标准:(1)接受早期再灌注治疗;(2)头部 CT 或 MRI 证实有脑出血;(3)肿瘤、免疫性疾病、严重感染、急性心肌梗死、肝肾疾病;(4)入院前 1 周内曾使用抗血小板或抗凝药物。以同期本院体检中心体检健康者 134 例为对照组,男 54 例,女 46 例,年龄 48~85 岁,平均(65.84±20.61)岁,所有患者无血液系统疾病、免疫性疾病、感染性疾病、恶性肿瘤、颅脑损伤、脑肿瘤、蛛网膜下腔出血及严重心、肺、肾等脏器功能障碍等病史。2 组年龄、性别比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 仪器与试剂 STAGO-R 全自动凝血分析仪;STAGO 配套的原装试剂,蛋白 C 发色底物法试剂盒(批号:250183),蛋白 C 凝固法试剂盒(实验方法),STAGO 系统质控品(批号:115020),STAGO 校准品(批号:252572)。

1.3 方法 收集研究对象抗凝血标本,枸橼酸钠抗凝剂与全血比例为 1:9,标本无溶血、脂血、黄疸,3 000 r/min 离心 10 min 后吸取血浆,保存于-80℃冰箱内。检测前待测标本置于 37℃水浴箱内复融,在 STAGO-R 全自动凝血分析仪上用 2 种检测方法进行测定,严格按照厂家的操作说明书操作。目前对于蛋白 C 的筛查比较推荐的方法是发色底物法^[7],选择发色底物法作为比较方法(x);而凝固法作为实验方法(y)。实验前均对检测系统进行校准和质控,确保在控时进行实验,以此保证数据的准确性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计学软件进行数据分析,计数资料以频数(n)或率(%)表示,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,偏态分布的计量资料以中位数(M)及第 25、75 百分位数(P_{25}, P_{75})表示。应用配对 t 检验分析发色底物法与凝固法之间的差异性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。应用 Pearson 相关性分析和线性回归分析评价发色底物法与凝固法之间的相关性, $r>0.75$ 为高度相关。应用 MedCalc 软件绘制 Bland-Altman 图形检验发色底物法与凝固法之间的一致性。

2 结 果

2.1 2 种方法差异性分析 应用配对 t 检验对所有入组人群、对照组和疾病组采用发色底物法与凝固法测得的蛋白 C 抗凝活性数据进行差异性分析,结果显示以上 3 组发色底物法与凝固法之间差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组相比,疾病组蛋白 C 抗凝活性

显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 2 种方法测定蛋白 C 抗凝活性的比较分析($\bar{x}\pm s$)				
组别	n	均值	t	P
所有入组人群				
发色底物法	294	90.75±22.83	0.324	0.748
凝固法	294	90.44. ±27.03 *		
对照组				
发色底物法	134	93.00±17.91	0.345	0.731
凝固法	134	92.63±20.65 *		
疾病组				
发色底物法	160	88.20±19.51 #	0.303	0.762
凝固法	160	88.19±23.09 * #		

注:与发色底物法相比,* $P>0.05$;与对照组相比,# $P<0.05$

2.2 2 种方法相关性分析 以发色底物法为比较方法 x ,凝固法为实验方法 y ,应用 Pearson 相关性分析进行比较,结果显示所有入组人群用 2 种方法测定蛋白 C 抗凝活性相关系数分别为 $r=0.870\ 5$ ($P<0.001$), $r=0.857\ 0$ ($P<0.001$), $r=0.882\ 4$ ($P<0.001$);决定系数分别为 $R^2=0.757\ 8$, $R^2=0.734\ 5$, $R^2=0.778\ 7$;直线回归方程分别为 $y=0.975\ 3x+1.934\ 5$, $y=0.922\ 6x+6.823\ 3$, $y=1.031\ 5x-2.790\ 8$ 。Pearson 相关性分析提示发色底物法与凝固法之间的相关性显著,呈高度线性相关。见图 1~3。

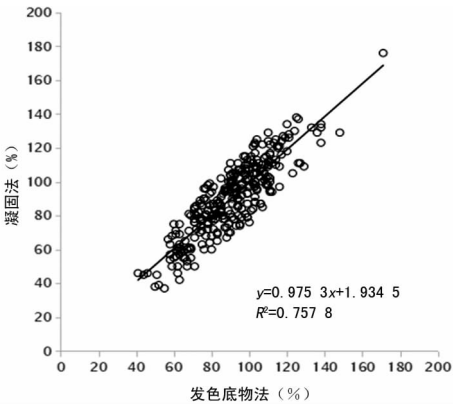


图 1 所有入组人群发色底物法与凝固法相关性分析

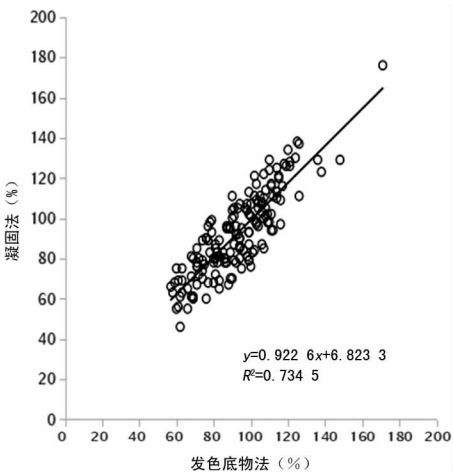


图 2 对照组发色底物法与凝固法相关性分析

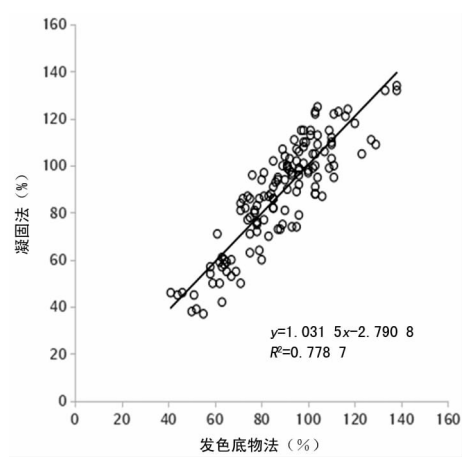


图 3 疾病组发色底物法与凝固法相关性分析

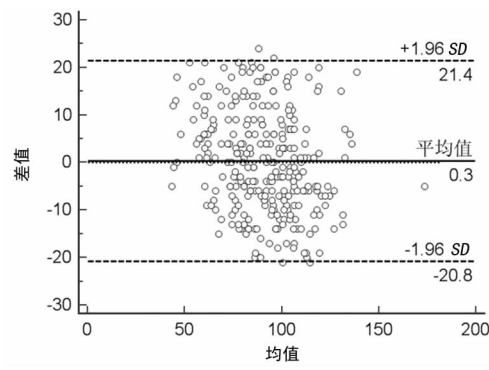


图 4 所有入组发色底物法与凝固法一致性检验

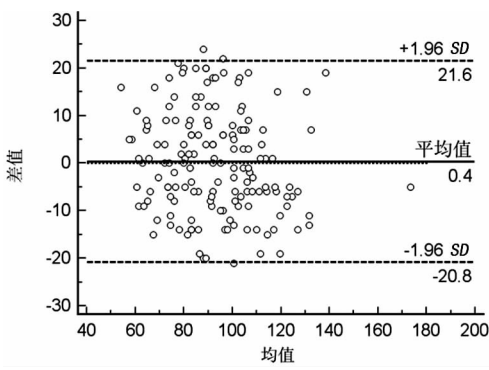


图 5 对照组发色底物法与凝固法一致性检验

2.3 2 种方法一致性检验 以发色底物法与凝固法 2 种检测方法测定结果的均值为 x 轴, 2 种检测方法测定结果的差值为 y 轴, 绘制 Bland-Altman 散点图。结果显示所有入组人群 2 种检测方法差值的平均偏倚为 0.3%, 95% 一致性界限范围为 -20.8% ~ 21.4%, 其中 1.36% (4/294) 的点在 95% 一致性界限外。在一致性界限范围内, 最大偏倚相当于均值的 23.18%。对照组 2 种检测方法差值的平均偏倚为 0.4%, 95% 一致性界限范围为 -20.8% ~ 21.6%, 其中 2.50% (4/160) 的点在 95% 一致性界限外。在一致性界限范围内, 最大偏倚相当于均值的 22.63%。疾病组 2 种检测方法差值的平均偏倚为 0, 95% 一致性界限范围为 -20.9% ~ 20.9%, 其中 2.99% (4/

134) 的点在 95% 一致性界限外。在一致性界限范围内, 最大偏倚相当于均值的 22.68%。以上 3 组数据这种相差幅度在临床上不能接受。见图 4~6。

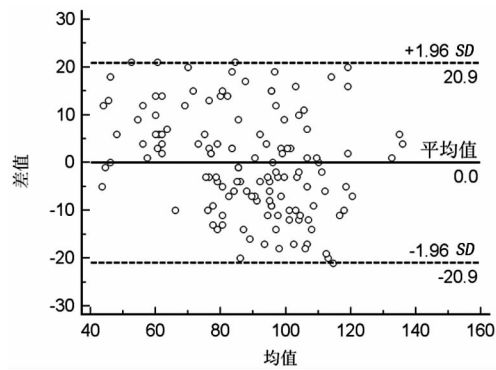


图 6 疾病组发色底物法与凝固法一致性检验

3 讨论

蛋白 C 是一种由肝脏产生的维生素 K 依赖性血浆蛋白, 在凝血酶或凝血酶-血栓调节蛋白复合物的作用下转变为活化蛋白 C^[8], 活化蛋白 C 与其辅因子蛋白 S 形成复合物, 灭活活化 FV (FVa) 和活化 FVIII (FVIIIa) 并增强纤溶活性, 因此具有抗凝作用。当蛋白 C 缺乏时, FVa 和 FVIIIa 灭活减少、血循环纤溶能力降低, 致使纤维蛋白形成过多而发生血栓^[9]。

蛋白 C 活性的检测大多通过商品试剂 Protac[®]。Protac[®] 是单链的蛋白酶, 由铜斑蛇毒纯化提取的产物。Protac[®] 能够极快速地激活蛋白 C 使之成为活化蛋白 C, 可以有效地排除蛋白 C 抑制剂对试验的影响。发色底物法通过测定产色底物的吸光度变化来推测所测物质的含量和活性, 而凝固法的测定目标为蛋白 C 的抗凝活性, 即对凝血因子 FVa、FVIIIa 的灭活能力^[10]。但目前对 2 种方法学的比较及干扰因素的研究较少。

由于神经科学为我院国家级重点学科, 本室蛋白 C 抗凝活性检测人群主要来源于神经内、外科, 其次是血管外科、妇产科等。病种大部分为急、慢性缺血性脑血管病, 本研究疾病组选取病种为急性脑梗死患者。通过发色底物法和凝固法 2 种方法检测对照组和疾病组血浆中蛋白 C 抗凝活性, 并进行统计学分析, 结果显示在健康和特定疾病人群中不同方法测得蛋白 C 抗凝活性差异无统计学意义, 仅凝固法测定结果略低于发色底物法。与对照组相比, 急性脑梗死患者采用 2 种方法测定蛋白 C 抗凝活性均显著降低, 与以往研究结果一致^[11-12]。本研究组为急性脑梗死患者可能由于血栓事件急性期蛋白 C 消耗, 出现抗凝蛋白水平的短暂下降^[13], 建议蛋白 C 降低患者 1 个月复查, 以排除易栓症可能性。

Pearson 相关分析结果表明, 采用不同方法检测蛋白 C 活性具有显著的相关性和线性回归, 而 Bland-

Altman 一致性检验显示在对照组和疾病组 2 种检测方法的测量结果相差幅度均较大,不能被临床接受,因此,不能作为发色底物法的替代方法。可能由于凝固法干扰因素多,如血浆 FⅧ水平升高、高脂血症、狼疮性抗凝物均可影响凝固法测得的血浆蛋白 C 活性^[14]。目前认为肝素含量低于 1~2 U/mL,不会影响凝固法的检测;但是当含有阿加曲班、水蛭素、比伐卢定等凝血酶抑制剂时,会使检测结果假性升高^[15]。而发色底物法当肝素含量不超过 2 U/mL 时不会影响检测结果,而且凝血酶抑制剂亦不会影响试验。发色底物法常见的干扰酶类有凝血酶、活化的 FXa、激肽释放酶和组织纤维酶原激活剂等^[10]。KHOR 等^[15]建议来自弥散性血管内凝血患者、含有组织纤溶酶原激活剂的样本或者采血缓慢的幼儿可应用空白对照。这样可排除干扰物质的作用,缩短报告时间,同时节省试剂成本。由于发色底物法干扰因素较少,比凝固法准确,目前对于检测蛋白 C 缺乏的筛查比较推荐的方法是发色底物法^[7]。此外,本研究纳入数据均是单次测量,没有采取多次测量求平均值的方法,不能消除测量随机误差的影响。检测蛋白 C 抗凝活性的 2 种方法均受分析前因素和实验室各种因素的影响,要尽量排除分析前因素影响,定期校准仪器。本次研究仅针对相对健康人和急性脑梗死患者,对于其他血栓性疾病的比对分析尚需进一步研究,以使易栓症筛查的方法学标准化、数据精准化,更好地指导临床诊疗工作。

4 结 论

实验室在比较不同方法检测一致性时应采取多种方法从不同角度进行联合评价,以避免某一方法评价中局限性的影响,使评价结论更为合理、客观。

参考文献

[1] MIDDELDROP S, LEVI M. Thrombophilia: an update [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33(6): 563-572.

[2] 闫振宇, 华宝来, 马西虎, 等. 672 例静脉血栓栓塞症相关

(上接第 2720 页)

胞百日咳-白喉-破伤风联合疫苗的安全性及免疫原性研究[J]. *中国疫苗和免疫*, 2013, 19(4): 308-311.

[12] 邹光荣, 兰红, 项美娟, 等. 吸附无细胞百白破联合疫苗的免疫原性及免疫持久性[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(12): 1805-1808.

[13] 胡家全, 李贵凡, 胡月梅, 等. 吸附无细胞百白破联合疫苗的安全性和免疫原性研究[J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(1): 9-11.

[14] 李艳萍, 张庶民, 叶强, 等. 白喉-破伤风-无细胞百日咳-b

危险因素分析[J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(9): 579-582.

[3] GOLDENBERG N A, JOHNSON M. Protein C deficiency [J]. *Haemophilia*, 2008, 14(60): 1214-1221.

[4] 王增智, 赵秀清, 李杰, 等. 无诱因肺血栓栓塞症患者天然抗凝蛋白活性缺陷发生率的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(6): 518-521.

[5] 倪亚莉, 邓伟. 易栓症与反复胚胎种植失败的相关性研究[J]. *生殖医学杂志*, 2018, 27(1): 60-63.

[6] 邓昊昱, 陈家伦, 谢辉, 等. 凝血因子和抗凝蛋白检测诊断急性静脉血栓栓塞症[J]. *中华普通外科杂志*, 2013, 28(3): 222-225.

[7] BAGLIN T, GRAY E, GREAVES M, et al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia [J]. *Br J Haematol*, 2010, 149(2): 209-220.

[8] KOTTKE-MARCHANT K, COMP E. Laboratory issues in diagnosing abnormalities of protein C, thrombomodulin, and endothelial cell protein C receptor [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2002, 126(11): 1337-1348.

[9] DING Q, SHEN W, YE X, et al. Clinical and genetic features of protein C deficiency in 23 unrelated Chinese patients [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 50(1): 53-58.

[10] 陆松松, 吴迪, 贾玫. 蛋白 C 的检测方法及研究进展[J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(4): 297-305.

[11] 刘宇明, 许治强, 周伯荣, 等. 蛋白 C、抗凝血酶Ⅲ在缺血性脑血管病发病机制中的作用[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2011, 18(5): 379-380.

[12] 欧东仁, 房淑欣. 急性脑梗死患者血中抗凝蛋白活性的改变[J]. *中国脑血管病杂志*, 2007, 4(6): 275-276.

[13] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 易栓症诊断中国专家共识(2012 年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2012, 33(11): 982.

[14] 包承鑫. 遗传性易栓症的诊断[J]. *诊断学理论与实践*, 2006, 5(5): 452-454.

[15] KHOR B, VAN COTT E M. Laboratory tests for protein C deficiency [J]. *Am J Hematol*, 2010, 85(6): 440-442.

(收稿日期: 2019-04-11 修回日期: 2019-07-12)

型流行性感嗜血杆菌联合疫苗对中国婴儿安全性和免疫原性的研究[J]. *中国疫苗和免疫*, 2010, 16(2): 97-104.

[15] 卫辰, 晁哲, 王丽婵, 等. 第 1 代百日咳毒素国家参考品的标定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(8): 853-857.

[16] 徐颖华, 卫辰, 王丽婵, 等. 第 1 代国家人源抗百日咳血清参考品的制备[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(10): 1211-1213.

(收稿日期: 2019-03-04 修回日期: 2019-05-16)