技术方法

文章编号:1000-5404(2008)08-0766-02

D-二聚体检测在尿激酶溶解血凝块体外实验中的应用

任光阳,代 垠 (遵义医学院附属医院神经外科,贵州 遵义 563003)

摘 要:目的 通过D-二聚体定量分析,探讨尿激酶溶解体外血凝块的最佳浓度和最佳作用时间。**方法** 采用6×6拉丁方设计,通过测定D-二聚体浓度,分析不同浓度尿激酶、不同作用时间对不同时间血凝块溶解效果的影响。**结果** 尿激酶浓度和作用时间对血凝块溶解效果有显著影响($F=113.776, P<0.01$;$F=14.612, P<0.01$),而血凝块形成时间对血凝块溶解的影响无统计学意义($F=0.733, P=0.607$);50 000 IU/ml和100 000 IU/ml尿激酶浓度以及6、12 h和24 h作用时间的血凝块溶解效果明显高于其他组别($P<0.05$)。**结论** 50 000 IU/ml为尿激酶溶解血凝块的最佳浓度,6 h为最佳作用时间。

近年来,在治疗高血压性脑内血肿中,经引流管注入尿激酶(urokinase,UK)促进血凝块溶解和排除已得到了广泛的应用。但对于UK应用的最佳浓度、作用时间等问题,仍不十分清楚。本研究采用6×6拉丁方设计,通过对D-二聚体的定量测定,分析了UK浓度、作用时间和血凝块形成时间对体外血凝块溶解效果的影响。

1 材料与方法

1.1 血凝块制备

抽取我院神经外科36例高血压性脑内血肿患者的静脉血各1 ml于一次性使用负压储血管普通管(5 ml)中,置于37 ℃恒温箱中,数分钟后即形成血凝块。采用随机数字表法分配到6×6拉丁方表中。

1.2 尿激酶溶液的配制

本实验所用UK为安徽丰原药业股份有限公司马鞍山药厂产品,规格为10 000 IU和250 000 IU。使用前用0.9%生理盐水配成500、2 500、10 000、50 000、100 000 IU/ml溶液。500、2 500 IU/ml和10 000 IU/ml溶液用10 000 IU规格UK配制,50 000 IU/ml和100 000 IU/ml溶液用250 000 IU规格UK配制。

1.3 实验分组

用随机数字表随机化后得出6×6拉丁方标准型设计,如表1字母所示,A为生理盐水(NS)空白对照,B、C、D、E、F分别为500、2 500、10 000、50 000、100 000 IU/ml的尿激酶溶液。

1.4 ELASA法测定D-二聚体含量

标本分别以3 000 r/min离心10 min,保存于-30 ℃冰箱内,使用上海太阳生物技术公司的D-二聚体测定试剂盒,依照其说明书进行操作。用ELISA法检测标本中D-二聚体的含量,如表1所示。

1.5 统计学分析

数据经对数转换后采用SPSS 13.0软件按照拉丁方设计资料分析方法,作D-二聚体浓度关于尿激酶浓度、作用时间和血凝块形成时间的方差分析。用SNK(Students-Newman-Keuls)法进行两两比较。

2 结果

实验数据经对数变换后行Shapiro-Wilk法正态性检验和Levene法方差齐性检验符合正态性分布,并且方差齐。方差分析结果显示尿激酶浓度和作用时间均对D-二聚体浓度的差别有统计学意义($F=113.776, P<0.01$;$F=14.612, P<0.01$),而血凝块形成时间对D-二聚体浓度的差别无统计学意义($F=0.733, P=0.607$)。尿激酶浓度和作用时间对血凝块溶解效果(D-二聚体浓度)有显著影响,而血凝块形成时间对血凝块溶解效果无明显影响。

对UK浓度和作用时间的各个处理水平进一步用SNK(Students-Newman-Keuls)法进行两两比较,结果表明,生理盐水

表1 ELASA法检测在不同浓度尿激酶作用下D-二聚体浓度的变化(mg/L)

血凝块形成时间	尿激酶作用时间					
	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h
3 h	E 296.803	D 98.808	A 2.064	C 144.431	B 77.029	F 3 574.735
6 h	C 31.458	A 2.967	E 1 671.827	D 306.170	F 2 310.607	B 118.135
12 h	A 7.161	F 687.322	C 78.806	B 70.948	D 363.134	E 2 123.092
24 h	D 56.910	B 38.041	F 907.161	A 9.651	E 1 839.172	C 116.833
48 h	B 26.728	E 432.869	D 185.275	F 1 270.876	C 128.829	A 12.261
72 h	F 181.453	C 39.161	B 50.481	E 1 303.845	A 19.215	D 245.964

A:空白对照;B、C、D、E、F:分别为500、2 500、10 000、50 000、100 000 IU/ml的尿激酶溶液

作者简介:任光阳,男,贵州省遵义市人,硕士,主任医师,主要从事脑血管疾病方面的研究。电话:(0852)8609166, E-mail: mrrgy@sohu.com

收稿日期:2007-11-23;修回日期:2008-01-29

组的血凝块溶解作用最差,其次为 500 IU/ml 和 2 500 IU/ml 尿激酶组,10 000 IU/ml 尿激酶组血凝块溶解作用较好,溶解作用最好的是 50 000 IU/ml 和 100 000 IU/ml 尿激酶组。尿激酶作用时间从 1 ~ 6 h 对血凝块溶解作用逐渐递增,而 6、12 h 和 24 h 之间无统计学差异。由此可见,在本实验所选择的尿激酶浓度水平和作用时间中,50 000 IU/ml 尿激酶作用 6 h 即可获得最佳血凝块溶解效果。

3　讨论

UK 是一种纤溶酶原直接激活剂,能直接作用于凝血块表面的纤溶酶原,使纤溶酶原分子中的精氨酸-缬氨酸肽键断裂,形成纤溶酶,纤溶酶作用于纤维蛋白的精氨酸和赖氨酸肽链而使之降解,从而发挥纤溶作用。但是 UK 作用于血凝块的最佳浓度(200、400、2 000、20 000 IU/ml)和最佳作用时间(如 2、3、12 h 等)却有较大差异,这些实验在观察指标的选择上,多选用肉眼观察血凝块变化或测量残余血凝块体积、质量等来评价血凝块溶解效果[1]。我们认为造成这一现象的主要原因之一是这些观测指标误差较大,从而出现了 UK 作用最佳浓度、最佳作用时间等不一致的报道。D-二聚体(D-dimer)是交联纤维蛋白经纤溶酶降解生成的一种特异性终末产物,在降解过程中,即可释放 X′Y′E′D′碎片,这些碎片进一步降解为最小片段即为 D-二聚体,它是证实体内存在继发性纤溶的特异指标[2,3]。因此,D-聚体的含量是随着纤维蛋白降解产物增加而增加的,本实验选用 D-二聚体作为观测指标,能较好地对血凝块溶解程度进行客观定量测定,这与以往的评价标准有着较大的区别。

UK 符合酶促反应动力学特点,当底物浓度不变时,酶促反应的速度随酶浓度的增高而加快,直到酶浓度达到于底物饱和的浓度。本实验结果显示,UK 浓度为 50 000 IU/ml 时为最佳浓度。这说明 50 000 IU/ml 尿激酶可能已经将底物完全饱和,再增加浓度并不能加快酶促反应。纤溶酶原在血液中循环是以无活性的前体存在的,当血凝块形成后就存在于血凝块的纤维蛋白基质中,只要有足量的纤溶酶原激活物激活将其转变为有活性的纤溶酶,就可使血块溶解。纤溶酶原可被组织型纤溶酶原激活物(t-PA)或尿激酶型纤维蛋白激活剂(u-PA)激活,前者也是存在于血凝块中,这导致血凝块能缓慢自溶,并持续释放出纤溶酶原和纤溶酶。本实验得出血凝块形成时间对血凝块溶解效果无统计学意义的结论,与上述理论密切吻合。临床资料也进一步证实,尿激酶对形成较长时间的血凝块仍有显著作用[4,5]。在我们选用的 6 个 UK 作用时间水平中,6 h 为最佳作用时间,这个时间与 UK 的血浆半衰期(8 ~ 10 min)并不一致,可能原因是局部应用 UK 的缘故,其活性未被血浆中 α-巨球蛋白所抑制[6],所以延长了半衰期。本品说明书告知已配制的注射液在室温下(25 ℃)8 h 内使用,这也说明如尿激酶活性未受血浆 α-巨球蛋白抑制,则其半衰期相应延长。由此可见,与血循环中的纤溶作用相比,局部应用 UK 更具优势。

本研究结果对临床局部运用 UK 溶解血凝块有一定的指导意义,但由于实验过程中 UK 的作用浓度和时间均只选用了 6 个水平,因此也存在一定的局限性,有待更进一步的研究。

关键词:尿激酶;血凝块溶解;D-二聚体

中图法分类号:R969　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] 王永和, 王成东, 武丽丽, 等. 尿激酶体外溶凝量效与时效的实验观察[J]. 潍坊医学院学报, 2004, 26(5): 342 - 343.

[2] Palareti G, Cosmi B, Legnani C. D-dimer testing to determine the duration of anticoagulant therapy[J]. Curr Opin Pulm Med, 2007, 13(5): 393 - 397.

[3] 张贵斌, 赵文洲, 白丽君, 等. 急性脑梗死患者脑脊液及血浆 D-二聚体含量的测定和意义[J]. 卒中与神经疾病, 2002, 9(1): 24 - 25.

[4] Macdonald R L. Thrombolysis for intraventricular hemorrhage[J]. Neurosurgery Quarterly, 2005, 15(4): 211 - 222.

[5] 任光阳, 王玉玉, 刘同华, 等. 尿激酶治疗高血压性脑室内出血的疗效[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 1619 - 1620.

(编辑　龙　亮)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》,本刊实行三位分节法(即从小数点算起,向左向右每 3 位分 1 节,节间留出一定空隙),废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字,凡属计数数值,一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部