维普资讯 http://www.cqvip.com

15~18 锯鳞蝰蛇毒显色多肽基质法测定血浆异常凝血酶原

第二医院内科 梅浙川 徐葆元 R735.704

提 要 本研究采用锯鳞蝰蛇毒显色多肽基质法(Ecarin法)测定原发性肝癌(PHC)、其它肿瘤、慢性肝病及正常对照共114例血浆异常凝血酶原(DCP)，结果显示:Ecarin法测定血浆DCP的批内变异为3.8%、批间变异为4.9%、平均回吸收率为90.4%，DCP诊断PHC的敏感性为72.3%、特异性为97%、准确性为86.8%。

关键词 锯鳞蝰蛇毒显色多肽基质法; 异常凝血酶原; 原发性肝癌 肝肿瘤
中图分类号 R446.1 R735.7

维生素K缺乏或运用双香豆素类维生素K拮抗剂-Ⅱ时DCP的形成及其不被生理性激活剂激活、不与Ca^{++}及鳞脂结合、不被枸橼酸钡等吸附剂吸附等特性已被不少学者证实[1,2]。1984年Liebman等[3]用特异性DCP多克隆抗体RIA法，首先证实DCP亦是一种特异性PHC标志物。此后Soulier等[4]用对凝血酶高度专一性的显色多肽基质CBS—34.47及葡萄球菌凝固酶(SC)为DCP激活剂，建立了葡萄球菌凝固酶显色多肽基质法(SC法)，测定DCP潜在的凝血酶活性含量，结果与Liebman报道一致。本研究根据Bergström的Ecarin法[5]及Soulier的SC法[4]加以综合改进，检测PHC、其它肿瘤、慢性肝病及正常对照共114例血浆DCP，对果与Soulier报道一致。本文就其方法学作一初步评价。

材料和方法

材料

1. **观察对象** PHC47例、转移性肝癌(MLC)及肝血管瘤(LH)各3例，其它胃肠道恶性肿瘤(GIC)6例，胆囊癌(GBC)1例，慢性肝炎(CH)16例、失代偿性肝硬化(LCD)22例及正常对照(NC)16例。全部观察对象在近2周内均未用双香豆素类维生素K拮抗剂。

2. **锯鳞蝰蛇毒(Ecarin)** 为美国Sigma公司产品，作为生理性凝血酶原及DCP激活剂。

3. **显色多肽基质** H-D-Phe-pip-Arg-PNA·2HCl(S-2238)由瑞典KABI Diagnostica公司惠赠。分子量为625.6，水中溶解度＞10mmol/L，1mmol/L在2—8℃下可保存6个月。

4. **仪器** 采用日本岛津UV—240型自动紫外分光光度计，恒温系统采用重庆试验设备厂产CS—501型超级恒温器，温度波动＜±0.1℃。

方法

1. **Ecarin法测定DCP的原理** 血浆经皂土吸附去纤维蛋白原及枸橼酸钡吸附去生理性凝血酶原后只含DCP。DCP经Ecarin水解产生α—凝血酶，一单位活性DCP激活后只产生一单位活性的凝血酶。凝血酶催化与其专一性极强的显色多肽基质水解释放出对硝基苯(PNA)，经比色后测得其活性。

2. **标本的采集及处理** 空腹静脉血，3.8%枸橼酸钠抗凝(9份血，1份抗凝剂)，2h内以3000r/min离心15min分离血浆，并立即分装，—30℃保存备用，1年内DCP含量不变。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3. **具体方法** (1)血浆去纤维蛋白原：1g皂土加入0.15M pH7.3NaCl 10ml制成悬液，0.5ml血浆加皂土悬液0.05ml，37℃水浴吸附5min，3000r/min离心15min，吸取上清液。可去除几乎全部纤维蛋白原。(2)血浆去生理性凝血酶原：去纤维蛋白原血浆0.5ml加枸橼酸钠及氯化钡立即混匀，可见乳白色枸橼酸钡形成，37℃水浴吸附20min，3000r/min离心15min，取上清液重复吸附一次即可去除约99.8%的生理性凝血酶原。(3)Ecarin法测定DCP(见表1)：全部试剂及待测标本37℃预热10min后按表1步骤操作。S—2238加入后立即混匀并以405nM、37℃恒温比色，自动连续汇录光密度至少3min。

表1 Ecarin法测定DCP步骤

试 剂	测定管	对照管
待测血浆(ml)	0.1	0.1
Ecarin(ml)	0.1	0.1
摇匀，37℃恒温，准确计时2min		
Tris—咪唑缓冲液(ml)	2.7	2.8
S—2238(ml)	0.1	—

4. **结果计算** DCP单位定义：血浆DCP即凝血酶每分钟能催化S—2238产生1μmol PNA为一个单位。本文以每毫升血浆含DCP毫单位数即mU/ml记录。

$$DCP(mU/ml)=\frac{\Delta OD\times 3}{10.44\times 10^{-3}\times 0.1}$$

其中ΔOD为每分钟OD变化、3为反应总体积、0.1为实际加样量。PNA在本实验条件下的摩尔消光系数为10440/mol·cm。

结 果

1. **Ecarin法测定血浆DCP最适条件的选择(见图1)**

(1)底物S—2238浓度对反应的影响：从图1实心圆点曲线可见，随底物浓度增加，同一样本测定结果亦渐增大，至浓度为2mmol/ml后达最大值，亦稳定在同一水平。本文选择1mmol/ml为实验浓度。

(2)Ecarin浓度对反应的影响：从图1空心圆圈曲线可见，同一样本随Ecarin浓度增加测定结果亦渐增大，至终浓度为1.5—2mg/L时达最大值，之后，随着浓度升高测定结果有所下降，可能系Ecarin浓度太高抑制了凝血酶活性或抑制了DCP的激活。本文选择Ecarin终浓度1.5mg/L为实验浓度。

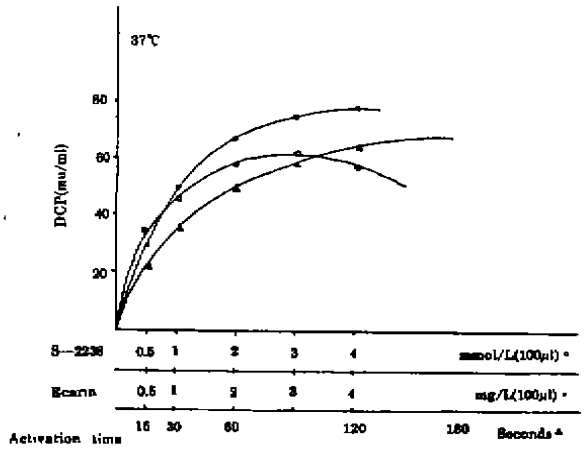


图1 Ecarin法最适条件的选择

(3)激活时间的选择：从图1空心三角曲线可见激活时间在2分钟后达最大结果，亦几乎稳定在同一水平。本文选择激活时间为2min。

2. **批内及批间变异** 同一样本平行测定10管，每管重复2次，结果SD＝1.45、批内变异CV＝3.8%。同样，同一样本测定6批，SD＝1.86、批间变异CV＝4.9%。

3. **回吸收率** 本研究测得DCP含量高(51.4mU/ml)、中(27.2mU/ml)、低(8.5mU/ml)样本吸收率分别为92.6%、91.5%及87.0%，其平均回吸收率为90.4%。

4. **样本稀释实验** 由图2可见在本实验条件下，DCP＜120mU/ml时样本稀释倍数与测定结果之间线性关系良好($r=0.99, P<0.1$)。

5. **114例血浆DCP测定结果** 从表2中见PHC组血浆DCP显著高于其它各病组及正常对照组($P<0.01$)，其它各病组与正常对照组间均无显著差异($P>0.05$)。以血浆DCP≥10mU/ml为阳性标准，则47例PHC中34例阳性，阳性率为72.3%，而其余各组中仅

维普资讯 http://www.cqvip.com

1例慢活肝及1例胆囊癌升高。

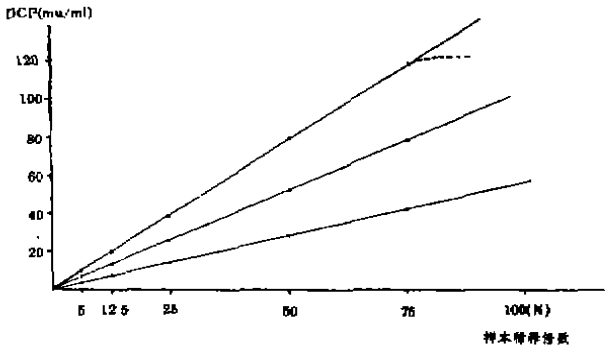


图2 Ecarin法样本衡释曲线

激活形成α—凝血酶，因此生理性凝血酶原的去除是测定血浆DCP的关键。本文采用枸橼酸钡作吸附剂，37℃吸附20分钟、2次可去除生理性凝血酶原约99.8%，而DCP则不被吸附。

Ecarin法测定血浆DCP受底物S—2238浓度、Ecarin浓度及激活时间的影响。本研究证实在本实验条件下S—2238 1mmol/L、Ecarin终浓度1.5mg/L及激活时间2min可获得

$$\text{敏感性:}\frac{TP}{TP+FN}=72.3\%$$

$$\text{特异性:}\frac{TN}{TN+FP}=97\%$$

表2 各组血浆DCP测定结果

病组	例数	DCP(mU/ml) $X\pm SD$	DCP≥10mU/ml 例数		阳性率(%)	DCP<10mU/ml 例数		阴性数(%)
PHC	47	19.98±20.19*	34	[TP]	72.30	13	[FN]	27.70
MLC	3	8.53±1.67	0		0.00	3		100.00
LH	3	6.80±0.70	0		0.00	3		100.00
GBC	1	19.60	1		100.00	0		0.00
LCD	22	4.19±1.66	0	[FP]	0.00	22	[TN]	100.00
CH	16	3.68±2.57	1		6.30	15		93.70
NC	16	5.12±1.30	0		0.00	16		100.00

* $P<0.01$

$$\text{准确度:}\frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}=86.8\%$$

讨　论

由于纤维蛋白凝块形成影响比色，更重要的是纤维蛋白可大量吸附凝血酶，从而严重影响测定结果。因此预先去除血浆中纤维蛋白原至为重要。去纤维蛋白原的方法颇多：加热法，但加热可影响生理性凝血酶原及DCP活性。蛇毒类凝血酶Arvin法，但蛇毒本身有类似凝血酶活性可影响测定结果。本研究采用皂土吸附法，皂土可吸附凝血因子Ⅰ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅹ，而不吸附生理性凝血酶原及DCP，10%皂土悬液与血浆1：9混合、37℃吸附5min，可去除几乎全部纤维蛋白原。

生理性凝血酶原及DCP均可被Ecarin较佳结果，与文献报道类似[5]。样本稀释实验证实，在本实验条件下血浆DCP<120mU/ml时，样本稀释比例与DCP测定结果间线性关系良好，提示在该范围内测定结果准确可靠。

本研究Ecarin法测定血浆DCP批内变异为3.8%、批间变异为4.9%、平均回吸收率为90.4%，足以说明本方法重复性良好、准确性也较高。Ecqrin含蝰蛇前凝血质，能特异地催化生理性凝血酶原及DCP肽链水解产生α—凝血酶，加之显色多肽基质S—22238、CBS—34.47等与凝血酶间的高度专一性，因此更提示Ecarin法测定生理性凝血酶原及DCP具有高度特异性。

本研究共测定血浆DCP 114例，47例PHC中34例为阳性(72.3%)，而其它各组中仅1例慢活肝及1例胆囊癌阳性，说明血浆DCP测定对PHC的诊断及鉴别诊断具有重要价值，与文献报道一致[3,4,6—8]。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Soulier[4]及HO[6]等采用SC法测定PHC患者血浆DCP阳性率分别为74%及80%，本研究采用Ecarin法得阳性率为72.3%。而RIA法、单克隆抗体ELISA及(E—1023)EIA法测PHC患者血浆DCP阳性率多在48—67%之间[5,7,8]。可见显色多肽基质法测定血浆DCP的敏感性似较免疫学方法为高。差别原因可能在于DCP肽链氨基端10个γ位谷氨酸残基羧化不全的程度不同[1]，导致其分子结构上的微小差异，特异性的DCP抗体尤其单克隆抗体对谷氨酸残基羧化更为不全的DCP尤为敏感，而显色多肽基质法测定的是不被枸橼酸钡等吸附剂所吸附的DCP，而其谷氨酸残基羧化不全的程度无关。

参 考 文 献

1. Esnouf MP, et al. Biochim Biophys Acta 1977;490：471
2. Stenflo J, et al. J Bio Chem 1972; 247：8160
3. Liebman HA, et al. N Eng J Med 1984;310：1427
4. Soulier JP, et al. Gastroenterol 1986;91：1256
5. Bergstrom K, et al. Thromb Res 1978;12：531
6. Ho CH, et al. Scand J Gastroenterol 1989;24：47
7. Okuda H, et al. J Hepatol 1987;4：357
8. Matsrshima A, et al. Rinsho Byori 1989; 37：683

(收稿日期 1993-06-11)

PLASMA DES-r-CARBOXYPROTHROMBIN DETERMINATION BY MEANS OF A CHROMOGENIC PEPTIDE SUBSTRATE AND ECARIN

Mei Zhechuan, et al

Dept. of Internal Medicine, The Second Hospital

Plasma des-r-carboxyprothrombin(DCP) was determined by ECARIN method using a chromogenic peptide substrate(S-2238) and ECARIN as a activator of DCP in a total of 114 cases, including primary hepatic carcinoma(PHC) 47 cases, other tumors and chronic liver diseases 51 cases and normal control 16 cases. As a result, a sensitivity of 72.3%, specificity of 97% and accuracy of 86.8% were obtained in the diagnosis of PHC. The coefficient variation in the same batch was 3.8% and that of 4.9% among each batch with an average recovery rate 90.4% for the detection of plasma DCP by ECARIN method. Sample dilution test showed that there was a good linear relationship($r=0.99$, $P<0.01$) between DCP level and sample dilution ratio when DCP level was lower than 120mU/ml. It may be concluded that ECARIN method is either a sensitive, specific, accurate or simple one on the determination of plasma DCP.

KEY WORDS ECARIN method; Des-r-carboxyprothrombin(DCP); Primary Hepatic Carcinoma(PHC)