维普资讯 http://www.cqvip.com

显色多肽基质法测定血浆异常凝血酶原及其对原发性肝癌的诊断价值

第二医院 梅浙川 综述 徐葆元 审校

中图分类号 R554.2

异常凝血酶原(DCP)的生成是由于维生素K缺乏或摄入双香豆素类维生素K拮抗剂-Ⅱ，抑制了肝细胞微粒体内维生素K依赖性羧化酶的活性，致使凝血酶原前体肽链氨基端的10个r位谷氨酸残基羧化障碍或羧化不全所致[1]。由于上述差异，DCP不被生理性激活剂所激活，不为钡盐类吸附剂所吸收，不与Ca^{++}及磷脂结合，因此缺乏凝血酶原的生理活性[2]。DCP测定是估计维生素K缺乏最敏感的方法，也是监测使用维生素K拮抗剂的有效指标[3]。近年来又发现在原发性肝癌（PHC）患者血浆DCP升高，对PHC的诊断具有特异性高和鉴别诊断的价值[4-7]。DCP测定的方法可分为两类：①根据抗原抗体反应测定其抗原活性，如放射免疫法[1]、单克隆抗体ELISA及EIA法[3,8]等；②运用生化方法测定其潜在的功能活性，如显色多肽基质法(本文简称为显

参 考 文 献

[1] Fogarty TJ, et al. Surg Gynecol Obstet 1963; 116:241

[2] Krause RJ, et al. Surgery 1966; 59:81

[3] Provan JL, et al. Br J Surg 1970; 57:59

[4] Fogarty TJ, et al. Am J Surg 1971; 122:231

[5] Davie JC, et al. J Neurosurg 1967; 27:171

[6] Faraglia V, et al. Surg Italy 1980; 10:45

[7] Zelch JV, et al. Arch Surg 1975; 110:329

[8] 左焕琮, 等. 中华外科杂志 1987; 25:544

[9] Heimbecker RO. Can Med Assoc J 1964; 91:1024

[10] Schweitzer DL, et al. Vasc Surg 1976; 10:144

[11] Foster JH, et al. Ann Surg 1970; 171:971

[12] Cranley JJ, et al. J Cardiovasc Surg 1969; 10:407

[13] Cranley JJ, et al. J Cardiovasc Surg 1970; 11:44

[14] Bowles CR, et al. J Vasc Surg 1988; 7:487

[15] Lord RSA, et al. Med J Australia 1968; 2:70

[16] Dainko EA. Arch Surg 1972; 105:79

[17] Stoney RJ, et al. Am J Surg 1968; 115:830

[18] Oehlert WH. Am Heart J 1972; 84:484

(收稿日期1990—10—15)

维普资讯 http://www.cqvip.com

色法)。

显色法采用特异性凝血酶原及DCP激活剂和专一性极强的合成显色多肽，根据酶学原理测定其潜在的凝血酶活性[4,9]。由于该方法检测快速、敏感、特异性强，且无需特殊设备，有利于临床推广使用，故具有较大的实用价值。本文旨在对其方法学及DCP对PHC的诊断意义作一文献综述。

一、显色法概述

Svendsen 等首先人工合成显色性三肽"Bz-Phe-Val-Arg-PNA" (S-2160)，它对凝血酶及凝血酶类似物具有特异性，故可用于专一性凝血酶活性测定[10]。这为运用显色多肽基质 (CPS) 代替天然大分子蛋白质底物测定蛋白水解酶活性开创了广阔的领域。合成特异性的CPS是建立显色法的基本要求。在随后的几年中，先后合成了60余种显色的或产生荧光的多肽基质，用于专一性测定凝血酶(原)、活化的凝血因子X (FXa)、纤溶酶 (原)、激肽释放酶及内毒素等。这使显色法在凝血、纤溶及激肽系统等领域，利用酶学原理的定量研究和临床检测都取得了重大进展。国内上海生化所已合成近10种类似CPS，并建立了相应的药盒。

二、显色法测定凝血酶原及DCP的原理

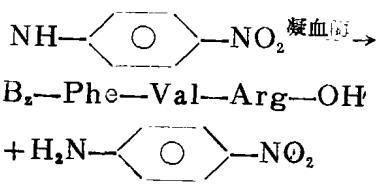
显色法测定凝血酶原及DCP，实际上是测定其潜在的凝血酶活性。因此，首先应激活凝血酶原及DCP使其产生凝血酶。Frania等证实在激活剂作用下一单位活性的凝血酶原及DCP能产生一单位活性的凝血酶[11]。这样测得的血浆凝血酶活性即为凝血酶原和/或DCP活性。

选择与凝血酶高度专一性的CPS，常用CPS见表1。CPS均为三个氨基酸残基组成的短肽，在其末端羧基上接上显色基团对硝基苯胺(PNA)。在凝血酶作用下多肽水解释放出PNA，后者在405～410nM处有强烈的光吸收，当CPS足量时，形成的PNA与凝血酶活性成正比。因此通过比色即可算出凝血酶活性[4,10,12,13]。

表1 常用于凝血酶测定的CPS

名称	化学结构
S—2160	Bz—Phe—Val—Arg—PNA
S—2238	H—D—Phe—Pip—Arg—PNA
CBS—34、47	H—D—Chg—But—Arg—PNA
Chromozym THr	Tos/Cbz—Gly—Pro—Arg—PNA

如：B_z—Phe—Val—Arg—



凝血酶原能被钡盐或$Al(OH)_3$等吸附剂所吸附，再经皂土吸附去掉纤维蛋白原后，测得的吸附血浆凝血酶活性即为DCP活性[4]。

三、激活剂的选择

显色法的建立需要寻找一种满意的凝血酶原及DCP激活剂。激活剂对凝血酶原及DCP的特异性、激活的快慢、稳定性及重复性好坏，都可影响测定结果，同时还要求

维普资讯 http://www.cqvip.com

激活剂不得直接水解CPS[9,12]。DCP由于缺乏Ca^{++}及磷脂结合的结构基础，因而无凝血酶原的生理活性，不被生理性激活剂所激活[2]，而可被胰蛋白酶、一些凝血酶原特异性毒素、葡萄球菌凝固酶(SC)等非生理性激活剂所激活[14]。几种生理及非生理性激活剂比较见表2。目前常用的两种激活剂为SC和锯鳞蝰蛇毒(Ecarin)，其激活机理分述如下。

SC是由一些致病性金黄色葡萄球菌株产生并分泌到胞外的一种蛋白酶，对凝血酶原及DCP有很强的特异性，激活时无需其它凝血因子及激活剂存在，同时形成的凝血酶对抗凝血酶-Ⅲ、肝素及水蛭素等抑制剂不敏感。作用机理为：一分子凝血酶原或DCP与一分子SC1:1结合形成一分子凝血酶样物，可能系通过改变了凝血酶原及DCP的三级空间构象，而形成类似凝血酶的活性中心[15]。

Ecarin是由一种锯鳞蝰蛇产生的毒素，含有蝰蛇前凝血质，后者能催化凝血酶原及DCP肽链氨基端水解一小片肽段，进一步反应产生由双硫键联接的双链多肽即中间产物Ecarin，后者迅速自身催化在小链上再水解一部分肽段而形成α-凝血酶。同样蝰蛇前凝血质激活时不需要Ca^{++}及其它凝血因子的存在，但受氟磷酸二异丙脂、苯甲酰脒、水蛭素及抗凝血酶-Ⅲ等抑制[11]。

表2 几种激活剂对正常及异常凝血酶原的激活比较

激活剂	凝血酶原标本	
	正常 (u/mg·Ag)	异常(u/mg·Ag)
FXa	430	30
二期法分析	2200	78
胰蛋白酶	145	170
胰蛋白酶激活二期法分析	330	340
南非树蛇毒	780	760
锯鳞蝰蛇毒	970	800

四、方法学评价

自S-2160、S-2238等CPS相继合成，显色法已广泛用于凝血酶、凝血酶原及抗凝血酶-Ⅲ等的测定，方法也日趋成熟和稳定。

Axelsson等用S-2160、凝血活酶作激活剂测定血浆凝血酶原并与F Ⅱ-Ⅶ-Ⅹ法比较，两者相关系数达0.95[12]。Bertina等用S-2238以XAPC法（FXa、FV、磷脂及Ca^{++}作激活剂）及一期法测定肝病患者及正常对照血浆凝血酶原，两者相关性极佳。同时从Ecarin法(Ecarin作激活剂)及免疫电泳法（两者对凝血酶原及DCP均敏感）测定比较仍获近似结果和较好的线性相关。可见在DCP不存在时上述四种方法测定血浆凝血酶原结果一致。经抗凝剂苯丙羟基双香豆素治疗的患者，则XAPC法和一期法结果相似，Ecarin法和免疫电泳法一致，而在XAPC法测定值降低的同时Ecarin法结果则增高，两者差异显著，此乃抗凝剂使凝血酶原减少而DCP增加所致[9]。Shah等在动物实验中采用Ecarin法测定维生素K充足、缺乏及经华法灵处理的鼠血浆凝血酶原和/或DCP，结果非生理及生理性激活、钡盐吸附前测定值均高；非生理性激活、钡盐吸附后维生素K缺乏及华法灵处理组仍获较高结果；而生理性激活、吸附后各组结果均很低[16]。从而在客观上证实了维生素K缺乏及华法灵处理鼠血浆中DCP的存在并能通过Ecarin法定量测定。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 双香豆素处理后$Al(OH)_3$吸附前（Ⅰ）及吸附后（Ⅱ）不同凝血酶原测定方法比较

	显色法及激活剂				其它(%)
	SC法	Ecarin法	泰潘蛇毒法	Fxa	一期法
Ⅰ	54.0	56.5	53.0	20.0	19.5
Ⅱ	30.0	32.0	30.5	2.0	2.0

结果与Kirchhof等报道的类似(见表3)[17]。以上结果均说明显色法测定凝血酶原与常规各种测定方法一致，并能定量测定DCP。

Soulier等采用CBS-34.47及SC作激活剂，测定PHC患者经皂土及$Al(OH)_3$吸附血浆DCP，结果较凝固法敏感、重复性更佳[4]，而与放免法、单克隆抗体ElISA及EIA法所测PHC患者血浆DCP结果相似，且敏感性似乎更高[8]。

显色法测定凝血酶原及DCP除敏感性高、特异性强、重复性好外，还具备以下优点：不依赖于其它凝血因子；运用标准仪器可在短时间内自动测定多个标本；还可同时获得酶学动力学资料。因此，在临床及实验研究中具有较大实用价值。

五、DCP测定对PHC的诊断价值

Liebman等首先报道DCP对PHC具有特异性的诊断及鉴别诊断价值[18]。Fujiyama等采用DCP单克隆抗体ELISA法测定63例PHC血浆DCP，其中51例升高，阳性率为65%[19]。Okuda等采用类似方法测定52例PHC，阳性率为58%，而50例正常对照组、13例孕妇、10例急性肝炎均阴性，55例慢性肝炎、肝硬化仅3例升高[5]。Fujiyama等报道用特异性更强的DCP单克隆抗体E-1023 EIA法，测定120例PHC血浆DCP，阳性率为63.3%，而胆管癌、转移性肝癌、慢活肝及肝硬化患者阳性率分别为12.5%、15.4%、3%及4.4%[8]。结果与其它学者报道一致[7]。Soulier等用显色法测定52例PHC血浆DCP，74.3%含量在20—420mU/ml之间，而15例转移性肝癌及95例肝硬化全部低于20mU/ml[4]。以上结果均证实DCP对PHC的诊断具有较高的敏感性，并对良性肝病及其它肿瘤具有重要的鉴别诊断价值。

值得注意的是DCP与PHC大小无明显关系，在一些小肝癌血浆DCP含量仍相当高。Fujiyama等报道13例PHC (AFP<400ng/ml、直径为2—5cm) 中血浆DCP 8例升高，阳性率为61.5%，但<2cm的4例全部阴性[8]。殷正丰等报道8例PHC (AFP<400ng/ml、直径为3.4—5cm)中5例DCP阳性；手术证实它对小肝癌的诊断符合率达63%[20]。但是，Tanabe等最近报道18例PHC<5cm中仅3例血浆DCP升高，其中8例<3cm全部阴性[21]。从上述结果可以看出，血浆DCP测定对3～5cmPHC仍有较大的诊断价值；而对<2—3cmPHC似乎意义不大，但因报道尚少，故对<2—3cmPHC的早期诊断价值，尚有待进一步研究。

不少学者证实PHC的血浆DCP含量与AFP之间无明显关系，DCP诊断PHC的敏感性较AFP为高[4-7,18,19]。Fujiyama等报道120例PHC DCP阳性率为63.3%，AFP>400ng/ml占53.3%，而56例AFP<400ng/ml PHC DCP阳性率仍为37.5%[8]。殷正丰等报道AFP低滴度(31—399ng/ml)PHC DCP阳性率为68.8%，而AFP阴性者仍高达65.5%[20]。结果与其它学者报道一致[7]。因而，可以认为DCP

维普资讯 http://www.cqvip.com

和AFP在肝癌细胞中的产生和分泌互不相关，可分别作为两种PHC标志物相互补充，尤其DCP对AFP低滴度及阴性PHC的诊断更具有重要价值，两者联合检测对PHC检出率可达70.5～92%[4,6,7]。

六、PHC血浆DCP与维生素K缺乏的关系

藤山重俊等测定5例DCP阳性的PHC患者血浆中维生素K_1及K_2代谢产物，结果5例均无维生素K缺乏迹象，说明DCP与血浆维生素K_1、K_2值之间无相关性[22]。Lefrère等对DCP阳性的PHC6例及非PHC10例，测定预给维生素K20mg前后血浆DCP的变化，发现10例非PHC患者15天内DCP全部转阴，并持续阴性；而6例PHC患者DCP虽有所下降但10天后又恢复至原来的高水平[23]。其它学者也有类似的报道[5,6]。从而提示非PHC血浆DCP升高是由于潜在的维生素K缺乏，而PHC血浆DCP升高则并非由于维生素K缺乏。为此有必要在检测DCP前2周预给维生素K，以排除其潜在的维生素K缺乏，以便提高DCP检测对PHC诊断的特异性，并降低其假阳性。Shah等研究证明在PHC DCP的升高可能由于PHC细胞凝血酶原的基因表达正常，而维生素K依赖性羧化酶的基因表达有障碍，致大量凝血酶原前体羧化不全或羧化障碍而形成DCP，而并非由于维生素K缺乏所致[24]。

参考文献

[1] Liebman HA, et al. Hepatology 1982; 19:488

[2] Stenflo J, et al. J Bio Chem 1972; 247:8160

[3] Motohara K, et al. Pediatric Res 1985; 19:354

[4] Soulier JP, et al. Gastroenterolgy 1986; 91:1258

[5] Okuda H, et al. J Hepatology 1987; 4:357

[6] Fujiyama S, et al. Cancer 1988; 61: 1621

[7] Ho CH, et al. Scan J Gastroenterol 1989; 24:47

[8] Narak T, et al. Clin Immunol 1986; 18:479

[9] Bertina RM, et al. Thromb Haemostas 1979; 42:1296

[10] Svendsen L, et al. Thromb Res 1972; 1:267

[11] Franza BR, et al. J Bio Chem 1975; 250:7057

[12] Axelsson F, et al. Thromb Haemostas 1976; 36:517

[13] Bergström K, et al. Thromb Res 1974; 4:719

[14] Nelsetune GL, et al. J Bio Chem 1972; 247:8176

[15] Hemker HC, et al. Biochim Biophys Acta 1975; 379:180

[16] Shah DV, et al. Thromb Res 1984; 35:451

[17] Kirchhof BRJ, et al. Thromb Res 1978; 13:219

[18] Liebman HA, et al. N Engl J Med 1984; 310:1427

[19] Fujiyama S, et al. Hepato-Gastroenterol 1986; 33:201

[20] 殷正丰，等. 第二军医大学学报 1988; 9: 203

[21] Tanabe Y, el al. Am J Gastroenterol 1988; 83:1386

[22] 藤山重俊. 日消誌 1986; 83:1229

[23] Lefrère JJ, et al. J Hepatol 1987; 5:27

[24] Shah DV, et al. Blood 1987; 69:850

(收稿日期1990—10—26)