

尿毒症中蛋白质 Z 检测的意义

潘学谊, 蔡小燕, 桓文穆, 郭煜, 尹金柱, 关则兵, 张柔玲

(广东药学院第一附属医院血液内科, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究蛋白质 Z (Protein Z, PZ) 在尿毒症患者中的变化, 探讨其临床意义及与凝血因子 X (factor X coagulant, FX) 的关系。【方法】PZ 及凝血因子 X 抗原 (factor X coagulant antigen, FX:Ag) 用 ELISA 法检测, 血浆凝血因子 X 活性 (factor X coagulant activity, FX:C) 采用一期法测定。对 50 例尿毒症患者血液透析前、后, 80 例健康者的 PZ、FX:C、FX:Ag 进行测定, 作相关性比较。【结果】尿毒症患者血液透析前、后 PZ 均明显下降, 分别为 $1\ 195\ \text{ng/mL} \pm 442\ \text{ng/mL}$ 与 $1\ 822\ \text{ng/mL} \pm 577\ \text{ng/mL}$, (对照组为 $2\ 301\ \text{ng/mL} \pm 472\ \text{ng/mL}$), P 均 < 0.01 , 尿毒症血液透析前组的 FX:C、FX:Ag 明显升高, 分别为 $119\% \pm 27\%$ 、 $99\% \pm 24\%$, 尿毒症血液透析后组 FX:C、FX:Ag 仍是明显升高, 分别为 $96\% \pm 12\%$ 、 $87\% \pm 19\%$, (对照组分别为 $85\% \pm 26\%$ 和 $78\% \pm 23\%$), P 均 < 0.01 。尿毒症血液透析前组和血液透析后组及对照组 PZ 与 FX:C、FX:Ag 之间存在明显负相关 (P 均 < 0.01)。尿毒症血液透析前、后组比较 PZ、FX:C、FX:Ag 有明显差异 ($P < 0.01$), 显示 PZ 水平的下降程度反映了疾病的病理过程。【结论】PZ 水平在尿毒症患者中明显减低, 而 FX:C、FX:Ag 明显升高, PZ 与 FX:C、FX:Ag 存在明显负相关, FX 升高的机制可能部分与 PZ 下降有关。提示 PZ 缺乏可能是尿毒症患者易患血栓性疾病的一个危险因素。

关键词: 尿毒症; 蛋白质 Z; 血浆凝血因子 X 活性, 凝血因子 X 抗原

中图分类号: R692.5; Q51

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)02-0200-04

Alteration of Protein Z in Patients with Uremia and Its Significance

PAN Xue-yi, CAI Xiao-yan, HUAN Wen-mu, GUO Yu, YIN Jin-zhu, GUAN Ze-bing, ZHANG Rou-ling

(Department of Hematology, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical

College, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the alteration of protein Z (PZ) in the patients with uremia, and explore its clinical significance and relationship between PZ level and FX. 【Methods】PZ and factor X:Ag were measured by ELISA. Plasma FX:C was tested by first stage method. PZ, FX:C, and FX:Ag in 50 patients with uremia (before and after hemodialysis), and 80 healthy adults (control group) were measured and the correlation test was made. 【Results】In patients with uremia, PZ levels descends obviously both before hemodialysis and after hemodialysis, which were $1\ 195\ \text{ng/mL} \pm 442\ \text{ng/mL}$ and $1\ 822\ \text{ng/mL} \pm 577\ \text{ng/mL}$, respectively, while in the contrast group, it was recorded $2\ 302\ \text{ng/mL} \pm 472\ \text{ng/mL}$, $P < 0.01$. In the pre-hemodialysis group, FX:C and FX:Ag raised significantly with measurements of $119\% \pm 27\%$ and $99\% \pm 24\%$, respectively. In the post-hemodialysis group, FX:C and FX:Ag raised obviously as well, with measurements of $96\% \pm 12\%$ and $87\% \pm 19\%$, respectively, comparing with $85\% \pm 26\%$ and $78\% \pm 23\%$ in the control group with $P < 0.01$. In the comparative research among the pre-hemodialysis group, the post-hemodialysis group and the control group, PZ level was negatively correlated with the level of FX:C and FX:Ag ($P < 0.001$). Meanwhile, PZ level, FX:C and FX:Ag in the pre-hemodialysis group and the post-hemodialysis group exhibited obvious difference ($P < 0.001$), which showed that the descending of PZ level reflects the pathological progress of the disease. 【Conclusion】PZ level obviously descends in patients with uremia, while their levels of FX:C and FX:Ag increase significantly, which shows that PZ level has negative correlation with FX:C and FX:Ag. The mechanism leading to FX increase may have been partially caused by the

收稿日期: 2004-08-09

基金项目: 广州铁路集团科研基金资助项目(2003K3039)

作者简介: 潘学谊(1963-), 女, 湖南岳阳人, 副主任医师. E-mail: zhengon@sina.com

descending of PZ. This indicates that the lack of PZ might be a risk factor making patients with uremia vulnerable to thrombotic disease.

Key words: uremia; protein Z; FX:C; FX:Ag

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci),2005,26(2):200-203]

蛋白质 Z (protein Z, PZ) 是近年发现的一种新的抗凝因子, 为蛋白 Z 依赖性蛋白酶抑制剂抑制凝血因子 Xa 的辅因子, 它的临床的意义正在评估中。新近的文献报道表明蛋白质 Z 缺乏与急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 和急性冠脉综合征 (acute coronary syndromes, ACS) 的危险性明显增加相关。同时发现, 终末期肾衰血透病人 PZ 水平高于正常人^[1], 但其确切的机制尚不清楚。为此, 我们对 50 例尿毒症患者分别检测了血液透析前、后 PZ, 及其相关因子 FX:C、FX:Ag 含量的变化, 以探讨尿毒症中 PZ 变化的特点, 以及 PZ 水平变化与因子 FX:C、FX:Ag 的相互关系, 为进一步阐明尿毒症患者发生血栓性疾病的发病机制提供资料。

1 对象和方法

1.1 对象

广东药学院第一附属医院 2003 年 2 月-2004 年 3 月住院病人 50 例, 男 24 例, 女 26 例, 年龄 28~83 岁, 平均 53 岁, 根据临床表现、实验室检查确诊为慢性肾功能衰竭、尿毒症。纳入标准: 尿素氮 (BUN) > 28.8 mmol/L, 肌酐 (Cr) > 701 μ mol/L, 肌酐清除率 (GFR) < 10 mL/min, 排除活动性肝病及肝炎相关抗原阳性者、血液病患者。采血前两周无感染并停用抗血小板及抗凝药物。对照组 80 例, 男 46 例, 女 34 例, 年龄 28~71 岁, 平均 54 岁, 均为广东药学院第一附属医院门诊正常体检者, 且证实其身体健康, 未患高血压、高脂血症、冠心病、短暂性脑缺血、糖尿病、尿毒症、周围血管疾病, 也未服药物。

1.2 样本采集与保存

尿毒症患者于血透前、血透后完成采血, 对照组均未接受任何止血、抗纤溶药物治疗, 空腹条件下于前肘静脉采血 5 mL。血液与 0.13 mol/L 枸橼酸钠 9:1 于试管内混合、抗凝, 室温下放置不超过 1 h, 离心收集血浆置于 -40℃ 冰箱, 在 3 个月内完成上述指标的测定。

1.3 透析

机型 Gambro AK90/100 (Sweden) 或 Monitritl-SC (France)。抗凝选择: 体外肝素 (肝素/鱼精蛋白, 1:1)。

1.4 主要试剂

乏 FX、兔脑凝血活酶、凝血酶原试剂 (PT)、正常人血浆 (标准血浆) 由美国 BioMerieux 公司提供, PZ 试剂及 FX:Ag 由法国 Stago 公司提供。

1.5 检测方法与结果表示

血浆 FX:C 采用一期法在 ACL2000 全自动凝血仪上进行测定。PZ 及 FX:Ag 用 ELISA 法检测。所有血浆标本都在实验前取出, 37℃ 水浴, 10 min 内融化, 如发现凝块或絮状沉淀则弃用此标本。依实验说明操作。PZ 检测严格按照试剂盒说明书进行, 加待测稀释血浆 (1:20)、标准品 (浓度分别为 0、10、25、50、100、200 ng/mL)、200 μ L 于已包被 Anti-Protein Z 抗体的微孔板, 室温孵育 2 h 洗板 5 次, 每孔加 200 μ L 酶结合物, 室温孵育 2 h 洗板 5 次, 再每孔加 200 μ L 底物 (OPD), 室温孵育 5 min, 50 μ L 3 mol/L 硫酸终止反应, 波长 A_{492} 测吸光度。标准品及标本均作复孔同时检测。标准品浓度为自变量 X, 不同的吸光度 A 值为因变量 Y, 经 4-parameter logistic 拟合标准曲线, 根据标准曲线可求出其 PZ 浓度。

1.6 统计学处理

用 SPSS V11.0 进行数据处理, 以健康老人作为对照, 各组差异采用方差分析, 若方差不齐则采用 *t'* 检验, 以 $P \leq 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 尿毒症患者 PZ、FX:C、FX:Ag 含量测定

尿毒症透前组及尿毒症透后组与对照组比较, PZ 水平均减低, 而 FX:C、FX:Ag 则均增高。尿毒症透后组与透前组比较 PZ 水平增高, 而 FX:C、FX:Ag 水平变化则与 PZ 相反减低 (详见表 1)。显示 PZ 水平的下降程度反映了疾病的病理过程。

2.2 PZ 与 FX:C、FX:Ag 的相关性

在 SPSS V11.0 软件中用 Spearman 等级相关法

表 1 尿毒症患者 PZ、FX:C、FX:Ag 含量测定
Table 1 The levels of PZ, FX:C and FX:Ag in the patients with uremia

Group	n	PZ(ng/mL)	FX:C(%)	FX:Ag(%)
Control	80	2 302±472	85±26	78±23
Uremia patient(before hemodialysis)	50	1 195±442 ¹⁾	119±27 ¹⁾	99±24 ¹⁾
Uremia patient(after hemodialysis)	50	1 822±577 ^{3),4)}	96±12 ^{3),4)}	87±19 ^{2),4)}

1) compared with control, $P < 0.01$; 2) compared with control, $P < 0.05$; 3) compared with control, $P < 0.01$; 4) compared with uremia patient(before hemodialysis), $P < 0.01$

分析PZ与FX:C、PZ与FX:Ag之间的相关性,发现尿毒症血液透析前组和血液透析后组及对照组PZ与FX:C的相关性分别为-0.485、-0.663、-0.364(P 均 < 0.001),PZ与FX:Ag之间的相关性分别为-0.463、-0.685、-0.371(P 均 < 0.001)。上述结果显示血浆中的PZ水平与FX水平无论在健康人和患者中均存在明显的负相关(P 均 < 0.001),说明血浆中的FX水平可能受PZ变化的影响。

3 讨论

尿毒症患者透析治疗的高凝状态逐渐受到重视。有学者^[2]总结了39例长期血透患者的资料,发现23例死亡中有14例死于心肌梗死、脑卒中等动脉粥样硬化并发症。大量临床资料证实规律血液透析患者因心肌梗死引起的死亡率是普通人群34~54岁年龄组的20倍,是55岁以上年龄组的9倍^[3]。血栓形成是一类多因素疾病,至今提到的危险因子共有300多个。近年有关PZ在凝血及血栓形成的作用引起了人们的兴趣。PZ是由肝脏合成的一种维生素K依赖的血浆蛋白,人蛋白质Z的相对分子质量为62 ku,基因定位13q34,结构上与其他维生素K依赖性FVII、FIX、FX及蛋白质C分子十分相似^[4],但缺乏活化点及催化的组氨酸残基及丝氨酸残基,故无蛋白水解作用。在蛋白质Z依赖性蛋白酶抑制剂(protein Z-dependent protease inhibitor, ZPI)抑制FXa的作用中,PZ作为一种辅助因子使ZPI对FXa的抑制作用增强1000倍以上^[5-8]。

PZ在临床上的意义尚不清楚。近年的研究表明PZ缺乏可能与不明原因的出血倾向有关,但作用机制还不明确^[9]。Kemkes Matthes等^[10]研究显示随着慢性肝病患者病情加重,PZ水平下降。Wuillemin等^[9]研究比较了157例缺血性脑卒中或一过性脑缺血发作患者,以及192例正常人,发

现PZ水平升高者缺血性脑卒中的相对危险性增高,PZ $\geq 160\%$ 者相对危险值是4.3。而Vasse等^[11]报道则相反,发现缺血性脑卒中与PZ缺乏($< 1.0 \mu\text{g/ml}$)有明显相关,PZ缺乏可使缺血性脑卒中的危险性提高4倍^[6,9,11,12]。PZ水平对急性心肌梗死的作用报道更少。我们也报道了170例急性缺血性脑卒中、40例急性心肌梗塞患者PZ含量的变化,发现PZ含量明显低于对照组^[13],这与Vasse等^[11]报道一致。我们的结果支持了国外的这些结论,同时表明,PZ的下降与心脑血管疾病相关的病理现象也存在于我国的该类患者中,PZ与动脉血栓形成也相关。

尿毒症PZ含量变化的报道则更少,Usalan等^[14]比较了10例终末期肾衰血透病人与10例正常人血浆PZ的水平,发现血透患者的PZ水平升高。我们在50例尿毒症患者的研究中,发现患者PZ含量明显低于对照组,且血透后患者PZ含量较血透前明显增高,但血透后患者PZ含量仍低于对照组,这与Usalan等报道不一致。尿毒症中PZ水平减低的机制尚不清楚,血透后患者PZ含量较血透前明显增高是否与尿毒症患者血液高凝状态,有血栓形成的倾向,而血透能不同程度减轻血液高凝状态,有待进一步证实。

最近Gamba等^[14]报道了在体外纯化系统中观察当ZPI抑制FXa活性时PZ水平对FXa影响,结果显示PZ水平与FXa呈负相关。我们的研究发现,尿毒症患者血透前、后均可见在PZ水平下降时FX活性和含量升高;即在PZ下降同时其FX升高,结果显示这二者之间呈现良好的负相关。这表明在患者中所见到的血浆FX活性和含量升高可能与PZ水平的降低有关。目前的研究已证明FX水平升高与血栓性疾病有关,是血栓形成的一个危险因子。为此我们推测,PZ水平下降所致的FX活性和水平的升高可能是PZ下降导致血栓形成的一个机制。在目前的文献中,在观察血栓性疾

病中同时观察 PZ 和 FX 变化的文献尚未见类似报道。

我们通过对 PZ 水平的测定,提示 PZ 缺乏可能是尿毒症患者易患血栓性疾病存在的一个危险因素。因此定期复查 PZ 水平及 FX:C、FX:Ag 对于及早发现高凝倾向,并加以预防和治疗均具有一定参考价值。

参考文献:

- [1] Usalan C, Erdem Y, Altun B, *et al.* Protein Z levels in haemodialysis patient[J]. *Int Urol Nephrol*, 1999, 31(4): 541-5.
- [2] 秦莉,王觉生.尿毒症高凝状态的研究[J]. *华西医学*, 1997, 12(3): 276-80.
- [3] 方峻.尿毒症高凝状态与凝血因子 VII [J]. *国外医学输血及血液学分册*, 1998, 3(22): 157-9.
- [4] Fujimaki K, Yamazaki T, Taniwaki M, *et al.* The gene for human protein Z is localized to chromosome 13 at band q34 and is coded by eight regular exons and one alternative exon [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(19): 6838-46.
- [5] 熊石龙,文志斌.新近发现的一种天然抗凝蛋白:蛋白质 Z 依赖性蛋白酶抑制物[J]. *血栓与止血学*, 2001, 7(4): 173-5.
- [6] Broze GJ Jr. Protein-Z and thrombosis[J]. *Lancet*, 2001, 357(9260): 900-1.
- [7] Han X, Fiehler R, Broze GJ. Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor[J]. *Blood*, 2000, 96(9): 3049-55.
- [8] Han X, Huang ZF, Fiehler R, *et al.* The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(34): 11073-8.
- [9] Willemin WA, Demarmels Biasiutti F, Matle HP, *et al.* Frequency of protein Z deficiency in patients with ischemia stroke[J]. *Lancet*, 2001, 358(9284): 840-1.
- [10] Kemkes Matthes B, Matthes KJ. Protein Z deficiency: a new cause of bleeding tendency[J]. *Thromb Res* 1995, 79(1): 49-55.
- [11] Vasse M, Guegan Massardier E, Bory TY, *et al.* Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemia stroke[J]. *Lancet*, 2001, 357(9260): 933-4.
- [12] Kobelt K, Biasiutti FD, Matle HP, *et al.* Protein Z in ischaemic stroke[J]. *Br J Haematol*, 2001, 114(1): 169-73.
- [13] 潘学谊,丁彩屏.蛋白质 Z 检测在心脑血管疾病中的临床意义[J]. *中华血液学杂志*, 2004, 11(25): 656-9.
- [14] Gamba G, Bertolino G, Montani N, *et al.* Bleeding tendency of unknown origin and protein Z levels [J]. *Thromb Res*, 1998, 90(18): 291-5.

(编辑 黄小廷)



(上接第 199 页 from page 199)

- [6] 王金根,高解春,陈莲. WT₁ 蛋白在肾母细胞瘤与肾发育过程中的表达[J]. *中华小儿外科杂志*, 2000, 21(3): 156-8.
- [7] 聂常富,何蕴韶,高劲松. 荧光定量逆转录聚合酶链反应检测外围血 Wilm's 瘤基因的表达[J]. *中华检验医学杂志*, 2001, 24(5): 309-10.
- [8] 蹇在伏,陈东方,解勤之,等. 急性白血病患者 WT₁ 基因 mRNA 表达研究[J]. *湖南医科大学学报*, 1999, 24(4): 341-2.
- [9] Coppes MJ, Campbell CE, Williams BR. The role of WT₁ in Wilms tumorigenesis[J]. *FASEB J*, 1993, 7(10): 886-95.
- [10] Fraizer GC, Wu YJ, Hewitt SM, *et al.* Transcriptional regulation of the human Wilms' tumor gene (WT₁). Cell type-specific enhancer and promiscuous promoter[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(12): 8892-900.
- [11] Grubb GR, Yun K, Reeve AE, *et al.* Exclusion of the Wilms tumour gene (WT₁) promoter as a site of frequent mutation in Wilms tumour[J]. *Oncogene*, 1995, 10(8): 1677-81.

(编辑 张恩健)