

抗凝血酶Ⅲ测定的临床应用

洪文德 吴玉山 安业浩 庞国元

叶惠膺 李惠群 宋光辉*

(第一附属医院内科)

抗凝血酶Ⅲ (Antithrombin Ⅲ, AT-Ⅲ) 是多个抗凝血酶当中最主要的一个。通过抑制凝血酶的形成而调节血液的凝固。是血液凝固过程中一个重要的反馈系统^[1]。为了观察AT-Ⅲ在一些疾病的病理生理过程中的变化,我们测定了内科和神经科127例病人的AT-Ⅲ的含量和活性,并探讨其临床意义。

材料与方 法

一、材 料

1. AT-Ⅲ测定用试剂盒 由卫生部上海生物制品研究所提供。内含兔抗人AT-Ⅲ血清干粉,参考标准血浆干粉、凝血酶干粉、人纤维蛋白原干粉和肝素溶液。

2. 盐酸—巴比妥缓冲液(pH 8.2~10.05)。

3. 2%琼脂糖溶液 琼脂糖粉(上海东海制药厂)2克加蒸馏水至100毫升,置水浴中煮沸15~20分钟,过滤,4℃保存备用。

4. 1.6%琼脂糖溶液和0.6%琼脂糖溶液 琼脂糖分别为1.6克、0.6克加蒸馏水至100毫升,置水浴中煮沸15~20分钟,使琼脂溶化,棉花过滤,4℃保存备用。

5. 1%磷钨酸溶液 磷钨酸1克加蒸馏水至100毫升。

6. 氨基黑染色液 氨基黑(10B)0.5克,甲醇50毫升,冰醋酸10毫升,水40毫升。

7. 脱色液 含5%冰醋酸的45%乙醇溶液。

二、检测方法

1. AT-Ⅲ的蛋白含量测定——火箭电泳法

将溶解后的兔抗人AT-Ⅲ血清加入盐酸—巴比妥缓冲液至30毫升。将2%琼脂糖

溶液于水浴中煮沸移入55℃水浴中,与等量兔抗人AT-Ⅲ溶液在56℃中混匀后,注入夹有70×75×1.5mm“口”形模框的两块玻璃板中,待凝胶凝固后,于板的一侧打一排加样孔,孔径2mm,孔距3mm。将参考血浆用生理盐水作倍比稀释(1/2, 1/4, 1/8, 1/16),检品亦用生理盐水1/5稀释,以微量加样器分别定量加入加样孔,每孔5μL,稳压100V,电泳6小时。按直线回归($y = bx + a$)运算,将峰高代入式中x,可求出AT-Ⅲ含量y。

2. AT-Ⅲ的功能活性测定——凝血酶凝胶空斑法

将2毫升肝素溶液与2毫升凝血酶溶液混合后再与已煮沸溶化的1.6%琼脂糖溶液在45℃水浴中等量混合均匀,立即注入夹有70×75×1.5mm“口”形模框的两块玻璃板中,静置1~2分钟后,置于4℃15分钟。取出打加样孔,内径3mm,于板上打5排加样孔,每排5孔。参考标准血浆用生理盐水作倍比稀释(包括原倍,1/2, 1/4及1/8),检品作1/2稀释,用微量加样器分别定量加入加样孔,每孔8μL,然后将此琼脂板放入有盖盘中,37℃孵放扩散4小时。取出后在凝胶板上放置70×75×2mm“口”形模框,盖上玻璃板。然后将已溶化的0.6%琼脂糖2毫升与纤维蛋白原溶液于45℃等量混合均匀后注入凝胶板上,凝固后放37℃放置15分钟。用生理盐水漂洗过夜,用染色液染色5分钟,脱色后即可。

AT-Ⅲ活性以百分数表示,即1:1稀释为100%,1:2为50%,1:4为25%,1:8为12.5%,圆斑直径换算得圆面积为(x),

* 神经科

代入公式 $\log y = bx + a$ 中可求得 AT-III 活性 (y) 值。

AT-III 含量和活性的正常值来自 24 例献血员, 所测定的结果如下:

AT-III 含量 $31.92 \pm 9.24 (\bar{X} \pm 2SD)$
范围 22.48~41.36

AT-III 活性 $69.22 \pm 24.40 (\bar{X} \pm 2SD)$
范围 44.82~93.62

结 果

127 例病人均来自我院内科和神经科, 测得 AT-III 结果见附表 1、2。

表 1 127 例 AT-III 测定结果

诊 断	例数	含量减低	活性减低	活性增高	含量增高
		例数	例数	例数	例数
门脉性肝硬化	5	5	1	0	0
慢性肾炎	19	9	1	1	0
多囊肾、氮质血症	1	1	0	0	0
脑梗塞	13	3	0	0	0
脑出血	13	5	0	1	0
蜘蛛膜下腔出血并肝硬化	1	1	0	0	0
急性心肌梗塞	49	16	7	1	0
心力衰竭	1	1	0	0	0
心律失常	1	1	0	0	0
高血压	3	0	0	0	0
慢性粒细胞白血病急性变	1	1	0	0	0
慢性粒细胞白血病	4	0	0	0	0
急性白血病	4	0	0	0	0
急性早幼粒细胞白血病	2	0	0	0	0
原发性巨球蛋白血症	1	0	0	0	0
血管性紫癜	4	0	0	0	0
ITP	2	0	0	0	0
多发性骨髓瘤	1	0	0	0	0
阴道出血原因待查	2	0	0	0	0

讨 论

抗凝血酶 III (AT-III) 是一种丝氨酸凝血蛋白酶抑制剂。它能抑制 70~90% 以上丝氨酸凝血蛋白酶, 特别是凝血酶和活化的 X 因子。AT-III 和凝血酶作用形成无活性的不可逆复合物。当有肝素存在时, 此反应极大地加速。血液凝固过程有许多凝血因子参加, 其调节机制非常复杂, 抗凝血系统的调节机制也极其精细而复杂。抗凝血酶 III 是其中最重要的一个组成部分^[1-3]。

测定 AT-III 有多种方法。如火箭电泳法、二步凝固法、显色法、AT-III 去活化 Xa 法。我们采用卫生部上海生物制品研究所提供的试剂合。该试剂合提供的方法满足了既要测定 AT-III 蛋白含量, 又测定 AT-III 功能活性的要求。可以测定 AT-III 含量和质的改变^[4-5]。

本组测定门脉性肝硬化 5 例, AT-III 蛋白含量全部明显减低 ($P < 0.001$), 活性值改变无统计学意义。另一患者是蜘蛛膜下腔出血并肝硬化 AT-III 含量亦低于正常。AT-III 总活性包括三种蛋白活性, α_2 -巨球蛋白 (α_2 -macro

表 2

AT-Ⅲ 测 定 结 果

	方 法	例数	平均值	范 围	标准差	T	P
正常对照组	活 性	24	69.22	44.82~93.62	12.20		
	蛋白含量	24	31.92	22.48~41.36	4.72		
肝硬化	活 性	4	53.12		20.96	1.88	>0.05
	蛋白含量	5	15.06		4.02	7.46	<0.001
慢性肾炎 肾变性型	活 性	6	54.82		17.26	2.37	<0.05
	蛋白含量	6	24.69		11.55	2.43	<0.05
慢性肾炎 尿毒症	活 性	12	66.77		17.76	0.48	>0.05
	蛋白含量	12	24.46		10.34	2.99	<0.01
其他肾脏疾病	活 性	2	55.69		6.08		
	蛋白含量	2	19.37		0.82		
脑出血	活 性	13	68.15		27.84	0.14	>0.05
	蛋白含量	12	25.37		8.65	2.96	<0.01
脑梗塞	活 性	13	81.69		12.07	3.01	<0.01
	蛋白含量	13	28.43		6.97	1.81	>0.05
蜘蛛膜下腔出血并肝硬化	活 性	1	69.00				
	蛋白含量	1	14.96				
急性心肌梗塞	活 性	49	64.26		16.64	1.32	>0.05
	蛋白含量	49	26.93		7.28	3.10	<0.01

globulin), α_2 -球蛋白 (α_2 -globulin), α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin) [2]。Bick 报道肿瘤侵及肝脏则 AT-Ⅲ 量减少。若肿瘤未侵及肝脏不影响 α_2 -球蛋白合成, AT-Ⅲ 量并不下降 [1]。

本组共测定慢性肾脏病患者 AT-Ⅲ 共 20 例, 其中慢性肾炎肾变性型 AT-Ⅲ 蛋白含量及活性均较正常人降低 ($P<0.05$)。慢性肾炎尿毒症 AT-Ⅲ 蛋白含量较正常人降低 ($P<0.05$), 而活性正常 ($P>0.05$)。其他肾脏疾病中, 1 例多囊肾氮质血症, 另一例 IgA 肾病, 2 例均有尿蛋白阳性, AT-Ⅲ 蛋白含量均降低, 而活性正常。

所有 20 例肾脏病患者均有尿蛋白阳性及 BuN 升高, 部分患者曾作尿纤维蛋白原降解物 (FDP) 测定为 1.6~12.8ng/ml, 高于正常值。文献报道 [6,7] 肾病患者多有 AT-Ⅲ 水平降低, 这是由于 AT-Ⅲ 分子量与白蛋白相近, 从尿排出耗损所致。肾病患者 AT-Ⅲ 减

低与尿排出蛋白量相关, 也和肾清除 AT-Ⅲ 有关。本组慢性肾脏病 AT-Ⅲ 值改变与文献报道相符。

文献报道肾病综合征一个重要合并症是血栓形成和血管栓塞, 可发生在静脉或动脉, 30% 可见深静脉血栓形成, 其部位多在肾静脉和下腔静脉处。如果该处血栓形成, 则使肾病迅速恶化。肾病综合征高凝状态有多种因素 [8], AT-Ⅲ 值减低可能是其中的一种。

本组共测定急性心肌梗塞患者 AT-Ⅲ 值 49 例, 均在发病 1~2 天内取血测定, 其蛋白含量较正常人减低 ($P<0.05$), 而活性正常。

测定脑出血 13 例, AT-Ⅲ 活性改变无统计学意义, 蛋白含量较正常人减低 ($P<0.05$)。测定脑梗塞 13 例, 蛋白含量正常而 AT-Ⅲ 活性反而增高 ($P<0.01$), 这种改变推测可能是机体一种代偿反应现象。脑血管意外诊断均经 CT 证实。Woolf 认为动脉硬化与血栓形成有关、动脉硬化斑上证明有血小板聚集及血栓

形成^[9]。文献报道冠心病患者可有AT-Ⅲ水平减低^[4]。DIC时常有AT-Ⅲ量下降^[1,2,8]。口服避孕药有AT-Ⅲ值减低,可引起静脉血栓形成。并可引起心肌梗塞和脑血管意外^[8]。

本组病例中AT-Ⅲ含量减低者,AT-Ⅲ的活性个别病例亦降低,但大部分病例二者并不平衡地减低,这可能是由于AT-Ⅲ活性测定反映了AT-Ⅲ多方面功能。如 α_2 巨球蛋白是通过抑制Xa活性而抑制凝血酶功能,因此,AT-Ⅲ活性和含量改变可以不一致。

在临床上已有用AT-Ⅲ治疗DIC。DIC患者AT-Ⅲ明显减低时用肝素疗效不好,且肝素将会使AT-Ⅲ含量进一步下降而加重病情。测定AT-Ⅲ不仅具有学术上意义,它对血栓栓塞现象的评价具有实用价值。测定AT-Ⅲ可了解疾病的发病原理、也可用以观察病情变化,且对指导治疗有一定意义^[1,10]。

参 考 文 献

[1] Bick R L, et al. A new two-stage functional assay for AT-Ⅲ: Clinical and Laboratory evaluation. Thomb Res 1976; 8: 745.

[2] Barroweliffe TW. Antithrombin Ⅲ and heparin Br Med Bull 1978; 34(2):143.
[3] Bick RL, et al. Antithrombin Ⅲ (AT-Ⅲ) as a diagnostic aid in DIC. Thromb Res 1977; 10:721.
[4] Rose M. A Comprisene of antithrombic Ⅲ Procedure Clin Lab Haemat 1983; 5 (2):185.
[5] 刘嵩如,等。一种简易的抗凝血酶 Ⅲ 测定法。中华血液学杂志 1983; 4(4):244。
[6] Thaler E and Ledchner K. Antithrombin Ⅲ deficiency and thrombosis. Clinics in Haemat 1981; 10(2):369.
[7] Kamffman RH, et al. Acguied antithrombin Ⅲ defficeincy and thrombsis in nephrontic syndrone. Am J Med 1978; 65:607.
[8] 徐学原 程颖。肾病综合征红细胞凝集现象。天津医药 1984; 12(9):574。
[9] Woolf N. Thrombosis and atherosclerosis. Br Med Bull 1978; 34(2):137.
[10] Rothschild BM. The role of AT-Ⅲ in clinicol managment of pulmonary embolization. Am J Med 1983; 74(4):529.

Determination of Antithrombin III (AT-Ⅲ) and its Usage in Clinic

Hong Wende Wu Yushan An Yehao Pang Guoyuan
Ye Waiying Li huiqum Song Guanghui
(Department of Medicine First Affiliated Hospital)

Abstract

Determination of AT-Ⅲ immunological amount and coagulate activities was made in 127 patients, 24 donor serum as control.

The result shows there is a decrease in AT-Ⅲ immunological ammount in patients with cirrhosis ($P<0.001$), chronic glomer-ulonephritis uremia ($P<0.01$), nephrontic syndrone ($P<0.05$), acute myocadial infaction ($P<0.01$), and intracerebral hemorrhage ($P<0.01$).

There is a decrease in AT-Ⅲ coagulat activitis in patients with nephrontic syndrone($P<0.05$), but in patients with cerebral infaction AT-Ⅲ coagulat activitis is increase.

These result suggest that the detemination of AT-Ⅲ is useful to the determination of hypercoagulation state and thrombosis disorders.