

肝外合成凝血相关蛋白在肝衰竭和肝硬化中的变化特点

陈 静¹, 丛玉隆² (1. 北京航空总医院 100012; 2. 解放军总医院, 北京 100853)

【摘要】 目的 研究北京航空总医院肝外组织合成的凝血相关蛋白在肝病发展趋势中的变化及其与出凝血的关系, 寻找肝病早期敏感指标。**方法** 凝血因子Ⅷ(FⅧ)活性测定采用凝固法; 组织因子途径抑制物(TFPI)、血栓调节蛋白(TM)、血管性血友病因子(vWF)及组织因子(TF)水平测定采用酶联免疫吸附试验。**结果** (1)TFPI: Ag 检测值慢性乙型肝炎组 239.3 ± 206.4 , 肝硬化组 315.0 ± 258.6 , 肝衰竭组 319.5 ± 298.1 , 均高于健康对照组的 104.0 ± 87.1 , 差异有统计学意义($F=5.453, P<0.05$); (2)vWF: Ag 检测值慢性乙型肝炎组 70.3 ± 29.5 , 肝硬化组 105.5 ± 57.9 , 肝衰竭组 179.3 ± 61.7 , 均高于健康对照组的 21.9 ± 7.2 , 差异有统计学意义($F=20.104, P<0.05$); (3)TF 检测值慢性乙型肝炎组 86.0 ± 85.7 , 肝硬化组 234.2 ± 202.9 , 肝衰竭组 344.7 ± 214.6 , 均高于健康对照组的 12.9 ± 8.1 , 差异有统计学意义($F=8.619, P<0.05$); (4)FⅧ:C 检测值慢性乙型肝炎组 157.2 ± 53.4 , 肝硬化组 206.9 ± 86.9 , 肝衰竭组 335.7 ± 117.7 , 均高于健康对照组的 105.5 ± 46.2 , 差异有统计学意义($F=13.418, P<0.05$)。**结论** 肝外合成的凝血相关蛋白均与病情的发展呈负相关, 即随着病情的加重而升高, 提示血管壁的损伤与病情严重程度一致; 5 种蛋白可作为监测血管损伤的较为敏感指标。

【关键词】 凝血因子; 肝外合成凝血相关蛋白; 血管损伤标记物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.023 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)03-0345-03

Changes of extra-hepatic tissues synthetical protein in liver failure and cirrhosis CHEN Jing¹, CONG Yu-long² (1. *Bijing Aviation General Hospital, Beijing 100012, China*; 2. *General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China*)

【Abstract】 Objective To study the changes of anti-coagulation proteins synthesized from Beijing Aviation General Hospital by extra-hepatic tissues in the developing trends of liver diseases and the relation between these proteins and bleeding-clotting, and to explore early sensitive indicator of liver diseases. **Methods** Coagulation Ⅷ(FⅧ) activity was measured by one clotting stage way; tissue factor pathway inhibitor (TFPI), blood clots regulatory proteins (TM), von willebrand factor (vWF) and tissue factor (TF) concentration were measured by ELISA method. **Results** (1)TFPI: Ag detected values CHB patients 239.3 ± 206.4 , liver cirrhosis patients 315.0 ± 258.6 , liver failure patients 319.5 ± 298.1 , all higher than normal control 104.0 ± 87.1 ($F=5.453, P<0.05$); (2)vWF: Ag detected values CHB patients 70.3 ± 29.5 , liver cirrhosis patients 105.5 ± 57.9 , liver failure patients 179.3 ± 61.7 , all higher than normal control 21.9 ± 7.2 ($F=20.104, P<0.05$); (3)TF detected values CHB patients 86.0 ± 85.7 , liver cirrhosis patients 234.2 ± 202.9 , liver failure patients 344.7 ± 214.6 , all higher than normal control 12.9 ± 8.1 ($F=8.619, P<0.05$); (4)FⅧ:C detected values CHB patients 157.2 ± 53.4 , liver cirrhosis patients 206.9 ± 86.9 , liver failure patients 335.7 ± 117.7 , all higher than normal control 105.5 ± 46.2 ($F=13.418, P<0.05$). **Conclusion** Extra-hepatic synthesis of coagulation proteins and disease development are negatively correlated, that is, these proteins rise with the aggravation of the disease, suggesting that vessel wall damage is consistent with the severity of the disease and can be used as a comparatively sensitive indicator of monitoring vascular injury; five detector increased in blood perhaps have relate to coagulation disorder in end-stage liver disease patients.

【Key words】 blood coagulation factors; extra-hepatic tissues synthetical protein; markers of vascular injury

由肝实质细胞合成的凝血因子Ⅷ(FⅧ)、血管性血友病因子(vWF)、组织因子途径抑制物(TFPI)、组织因子(TF)及血栓调节蛋白(TM), 生理条件下血浆水平极少, 但在某些病理情况下血浆水平常有升高表现。肝脏疾病致由肝细胞合成的促凝血因子活性降低, 但 FⅧ活性升高; TFPI、TM、vWF 及 TF 作为肝外合成的与凝血相关的蛋白虽然有相关的报道, 但在不同类型肝病中的发展变化及其相互关系目前报道较少。为了比较系统地观察上述物质在肝病中的变化, 本研究选择了慢性乙型肝炎(下称慢乙肝)、肝硬化、肝衰竭 3 种不同类型的

肝病患者作为研究对象, 从各疾病不同发展时期之间、各疾病之间和健康对照一起两两比较, 观察分析其变化规律。

1 资料与方法

1.1 一般资料 165 例入组肝病患者均为住院患者, 其中男 106 例, 女 59 例, 年龄 20~66 岁, 平均 43 岁。165 例患者中肝衰竭 50 例(慢加急性肝衰竭 22 例, 慢性重型肝炎肝衰竭 28 例); 肝硬化 70 例(肝硬化代偿期 41 例, 肝硬化失代偿期 29 例); 慢乙肝 45 例(慢乙肝中度 25 例, 慢乙肝重度 20 例)。病因学诊断: 乙型肝炎 160 例, 重叠感染乙、戊型 5 例。165 例患

者均经过临床、实验室和超声诊断确诊。肝硬化诊断标准根据 2000 年《病毒性肝炎防治方案》^[1]；乙型肝炎慢性肝衰竭诊断标准参照《肝衰竭诊疗指南》^[2]。另收集 20 例健康人相应资料作为健康对照组。

1.2 选择病例排除标准 排除已知使用干扰血凝药物的患者或细菌感染、肝细胞肝癌、肝外恶性肿瘤患者或已知有凝血障碍的患者。

1.3 实验室分析样本的留取 凌晨 05:00 用真空管抽取患者肘静脉血 2.7 mL,真空管内含 109 mmol/L 的枸橼酸钠抗凝剂,其与血液的比例为 1:9。取血后 1 h 内 3 000 g 离心 15 min,分装冻存于-70℃,待用。

1.4 检测方法 肝外合成凝血相关蛋白:TFPI、TF、TM、vWF 水平测定采用酶联免疫吸附试验,试剂购自上海太阳生物公司,检测吸光度(A)值所用的仪器为芬兰 Thermo electron corporation 公司产品;FⅧ活性检测采用一期凝固法,试剂购自德国 Siemens 公司,检测仪器为美国 ACL advance 公司产品。

1.5 统计学处理 所有数据采用 CHISS 统计软件进行处理分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据均进行正态性及方差齐性检验。不同程度的肝脏疾病之间采用方差分析,并进行组间多重比较及非参数秩和检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 项指标在慢性乙肝中、重度组检测结果 见表 1。慢乙肝重度与健康对照组比较,vWF、TFPI 和 TF 3 项指标差异均

有统计学意义;慢乙肝中度与健康对照组比较,仅 vWF 差异有统计学意义;慢乙肝中度与慢乙肝重度比较,TFPI 和 TF 差异有统计学意义。

2.2 5 项指标在肝硬化代偿期和失代偿期检测结果 见表 2。肝硬化失代偿期与健康对照组比较,5 项指标差异均有统计学意义;肝硬化代偿期与健康对照组比较,vWF 和 TM 差异有统计学意义;肝硬化代偿期与失代偿期相比较,FⅧ和 TFPI 差异有统计学意义。

2.3 5 项指标在慢性重型肝衰竭和慢加急性肝衰竭中检测结果 见表 3。除 TFPI 外,其余 4 项指标在慢性重型肝衰竭和慢加急性肝衰竭与健康对照组比较差异均有统计学意义;但在慢性重型肝衰竭和慢加急性肝衰竭中比较差异无统计学意义。

2.4 5 项指标在 3 种不同类型肝病中的检测结果 见表 4。肝衰竭与健康对照组比较,除 TFPI 差异无统计学意义外,其他 4 项指标差异均有统计学意义;肝硬化与健康对照组比较,除 TFPI 差异无统计学意义外,其他 4 项指标差异均有统计学意义;慢乙肝与健康对照组比较,vWF 和 TM 差异有统计学意义,其他 3 项指标差异无统计学意义;肝硬化与肝衰竭比较,FⅧ和 vWF 差异有统计学意义,其他 3 项指标差异无统计学意义;慢乙肝与肝衰竭比较,FⅧ、vWF 和 TF 差异有统计学意义,TFPI 和 TM 差异无统计学意义;慢乙肝与肝硬化比较,仅 TF 差异有统计学意义,其他 4 项指标差异均无统计学意义。

表 1 5 项指标在慢性乙肝中、重度组检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FⅧ:C	vWF:Ag	TFPI:Ag	TF:Ag	TM:Ag
慢乙肝重度组	20	163.16±65.00	7 566±3 388*	326.94±173.57*	106.02±96.50*	1 199.56±428.27
慢乙肝中度组	25	131.00±22.50	5 680±1 130*	119.15±42.51▲	15.80±8.30▲	1 048.50±318.20
健康对照组	20	105.50±36.20	2 196±1 167	103.96±87.07	12.85±8.07	750.00±298.24
<i>F</i>		0.531	12.526	6.252	4.965	2.128
<i>P</i>		0.425 0	0.000 0	0.002 1	0.025 2	0.160 8

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$;与慢乙肝重度组比较,▲ $P<0.05$ 。

表 2 5 项指标在肝硬化代偿期和失代偿期检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FⅧ:C	vWF:Ag	TFPI:Ag	TF:Ag	TM:Ag
肝硬化失代偿期	29	210.60±75.80*	12 400±6 900*	288.50±299.50*	225.50±177.40*	1 488.60±934.10*
肝硬化代偿期	41	171.10±63.90▲	9 150±7 290*	83.10±121.60▲	203.30±265.00	1 033.50±122.50*
健康对照组	20	105.50±36.20	2 196±1 167	103.96±87.07	12.85±8.07	750.0±298.24
<i>F</i>		10.605	4.564	1.812	2.404	2.308
<i>P</i>		0.000 4	0.025 9	0.193 5	0.120 4	0.161 0

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$;与肝硬化失代偿期比较,▲ $P<0.05$ 。

表 3 5 项指标在慢性重型肝衰竭和慢加急性肝衰竭中的检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FⅧ:C	vWF:Ag	TFPI:Ag	TF:Ag	TM:Ag
慢性重型肝衰竭	28	305.46±74.68*	20 636±4 962*	344.20±460.30	438.60±234.90*	1 792.70±1 131.30*
慢加急性肝衰竭	22	320.75±143.65*	17 556±6 519*	179.90±324.70	387.80±227.30*	1 321.50±636.30*
健康对照组	20	105.50±36.20	2 196±1 167	103.96±87.07	12.85±8.07	750.0±298.24
<i>F</i>		9.506	5.652	1.921	8.916	4.553
<i>P</i>		0.000 4	0.029 4	0.195 3	0.000 6	0.003 2

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$ 。

表 4 5 项指标在 3 种不同类型肝病中的检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	FⅧ:C	vWF:Ag	TFPI:Ag	TF:Ag	TM:Ag
肝衰竭	50	335.70±117.67*△	179.3±61.7*△	319.50±298.14	344.7±214.6*	1 387.20±553.10*
肝硬化	70	206.90±86.89*☆	105.5±57.9*☆	315.00±258.58	234.16±202.91*	1 242.00±734.70*
慢乙肝	45	157.20±53.41☆	70.3±29.5*☆	239.34±206.39	85.96±85.72▲☆	1 124.00±380.24*
健康对照组	20	105.50±36.20	2 196.0±1 167.0	103.96±87.07	27.80±10.90	750.00±298.24
<i>F</i>		13.418	20.104	5.453	8.619	0.639
<i>P</i>		0.000 0	0.000 0	0.002 6	0.000 7	0.532 5

注:与健康对照组比较,**P*<0.05;与肝硬化比较,△▲*P*<0.05;与肝衰竭比较,☆*P*<0.05。

3 讨 论

FⅧ、TF、TFPI、TM、vWF 5 项指标均为肝外合成与凝血相关的蛋白,由血管内皮细胞合成。肝脏疾病往往伴有血管内皮损伤致 5 种蛋白释放入血增加,血浆浓度升高。与其他由肝细胞合成的促凝血因子不同,在肝脏疾病中,FⅧ的血浆水平是升高的。FⅧ的基因表达主要在肝窦内皮细胞,此结果可以解释肝脏疾病时由肝细胞合成的凝血因子与肝窦内皮细胞合成的 FⅧ在血浆水平上的不同^[3]。其次,FⅧ活性升高也可能与蛋白 C 的活性显著降低有关。FⅧ活性在慢乙肝中度和重度阶段有轻微升高,提示在肝病轻度阶段即有血管内皮损伤。vWF 为调节 FⅧ血浆浓度的重要因子,同样也由血管内皮细胞合成^[4]。vWF 结合 FⅧ并保护 FⅧ免受蛋白水解酶和成熟前的剪切。在肝病组织中,vWF 伴发 FⅧ共表达有助于调节 FⅧ血浆水平^[5-6]。

TFPI 为外源性凝血途径产生的天然抑制剂,参与多种血管过程,通过 FⅩa 依赖的方式与因子Ⅷa、Ⅹa 和 TF 形成四元复合物,抑制外源性凝血途径达到抗凝作用。有研究结果显示,在肝硬化中 TFPI 水平是降低的,晚期肝细胞疾病中 TFPI 血浆抗原水平正常,此报道与本研究结果不一致^[7]。但本研究结果显示,在 3 种不同的肝病中两两比较其升高程度无明显不同,考虑可能原因:(1)TFPI 对血管内皮的损伤较敏感,在慢乙肝阶段即开始升高,随着病情的加重其血浆水平升高明显。至疾病终末期随着血管内皮损伤进一步加重,TFPI 与 TF 结合耗竭,致 TFPI 血浆水平显著降低。但此结果存在研究缺陷,即本研究所有数据均为平均值,不能很好地反映个例的真实情况。个例之间 TFPI 水平有明显差异,用均值代表一个病种进行研究可掩盖个例的真实变化情况。(2)可能与标本的选择有关,TFPI 平均值后面的标准差过高,造成样本间离散程度太大导致结果的不可比性。作为外源性凝血途径主要启动子的 TF,最近有研究表明肝损伤诱导 TF 激活凝血^[7-8]。从数据上分析,TF 在肝硬化与肝衰竭、慢乙肝与肝硬化、慢乙肝与健康对照组比较,差异均无统计学意义,由此提示肝硬化阶段组织及血管受损严重致 TF 大量释放入血。TF 释放入血的量在肝硬化代偿期达到一个峰值,肝衰竭阶段趋于平缓,造成肝硬化代偿期与失代偿期、肝硬化与肝衰竭之间的比较无明显不同。

TM 的抗凝功能通过与凝血酶和蛋白 C 相互作用而介导。由于大量 TM 存在于微血管系统,外周产生的绝大多数凝血酶被释放入血的 TM 抑制,或许可以解释为什么在慢乙肝即可出现凝血酶的明显变化,而不是以往报道的 FⅤa 和 FⅧa。TM 在 3 种不同类型肝病中两两比较差异无统计学意义,但 3 种不同类型的肝病与健康对照组比较,差异有统计学意义,由

此说明 TM 在慢乙肝即发生变化,但并不随疾病的加重而显著增高,具有浓度相对稳定的特点。

本次研究的 5 项指标为较为敏感的肝外合成蛋白,且在肝病的轻度阶段(慢乙肝)即开始升高,可反映肝脏疾病时血管内皮损伤的情况。5 项指标都与凝血相关,FⅧ、TF 虽为促凝血因子,但分别被 vWF、TFPI 结合使其促凝血活性受到了一定的抑制。TM 释放入血,通过结合凝血酶而抑制其活性,又可通过 TM-凝血酶复合物激活蛋白 C,进而灭活 FⅤa、FⅧa,进一步加重抗凝作用。另外,TFPI 和 TM 在慢乙肝阶段即释放入血,分别抑制 FⅧa、FⅩa 和 FⅡa,给出了为何肝病轻度阶段即有 FⅡa 和 FⅩa 的降低,以及终末期肝病 FⅧa 降低程度远远高于其他凝血因子的理论依据。

参考文献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.

[2] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学分会重型肝病与人工肝学组.肝衰竭诊疗指南[J].中华肝脏病杂志,2006,14(8):643-646.

[3] Hollestelle MJ,Thinnes T,Crain K,et al. Tissue distribution of factor Ⅷ gene expression in vivo-a closer look[J].Thromb Haemost,2001,86(3):855-861.

[4] Kubier A,O'Brien M. Endogenous anticoagulants[J]. Top Companion Anim Med,2012,27(2):81-87.

[5] Hollesteue MJ,Geertzen HG,Straatsburg IH,et al. Factor Ⅷ expression in liver disease[J]. Thromb Haemost,2004,91(2):267-275.

[6] Randi AM,Laffan MA,Starke RD. Von willebrand factor,angiodyplasia and angiogenesis [J]. Mediterr J Hematol Infect Dis,2013,5(1):e2013060.

[7] Dusse LM,Carvalho M,Cooper AJ,et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor: a potential role in pregnancy and obstetric vascular complications[J]. Clin Chim Acta,2006,372(1/2):43-46.

[8] Kopec AK,Luyendyk JP. Coagulation in liver toxicity and disease:role of hepatocyte tissue factor[J]. Thromb Res,2014,133(Suppl 1):S57-S59.