

血浆纠正试验差值在血友病 A 患儿抑制物中的诊断价值*

李 刚, 陈振萍[△], 唐 凌, 甄英姿, 吴心怡, 吴润晖(首都医科大学附属北京儿童医院血液肿瘤中心, 北京 100045)

【摘要】 目的 通过受试者工作特征曲线(ROC 曲线)分析, 确定利用即刻法与孵育后活化部分凝血活酶时间(APTT)结果差值预测血友病 A 凝血因子Ⅷ抑制物产生的临界诊断点。**方法** 回顾分析 172 例血友病 A 患儿的 APTT 纠正试验及抑制物定量监测结果, 并应用 ROC 曲线分析血友病 A 凝血因子Ⅷ抑制物阳性的最佳临界点。**结果** ROC 曲线下面积=0.908(95%CI:0.875~0.941, $P<0.05$), Youden 值为 0.679, 所对应的 APTT 差值为 2.6 s, 为有无抑制物的最佳诊断界点。此时敏感度为 80.4%, 诊断特异度为 87.5%。**结论** 2.6 s 的 APTT 纠正试验秒值差可作为儿童血友病 A 凝血因子Ⅷ抑制物产生的早期筛查指标。

【关键词】 血友病; 儿童; 凝血因子Ⅷ; 抑制物; 活化部分凝血活酶时间

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.23.001 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)23-3451-02

Diagnostic value of the difference of plasma correcting test in the prediction of hemophilia A* LI Gang, CHEN Zhen-ping[△], TANG Ling, ZHEN Ying-zi, WU Xin-yi, WU Run-Hui (Blood Cancer Center, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100045, China)

【Abstract】 Objective To predict the critical diagnosis point of FⅧ inhibitor through determining the difference between immediate and incubated APTT results by ROC curve analysis. **Methods** To retrospectively analyze the quantitative results of APTT correction and FⅧ inhibitor experiment in 172 cases of HA children. And to analyze the best of critical positive point of FⅧ inhibitor by ROC curve. **Results** The area under the ROC curve (AUC) was 0.908(95%CI:0.875-0.941, $P<0.05$) and Youden value was 0.679. The corresponding difference of APTT (2.6 s) was the best diagnostic cutoff point for predicting FⅧ inhibitors. The sensitivity was 80.4% and the specificity was 87.5% for predicting FⅧ inhibitors. **Conclusion** The time difference (2.6 s) of APTT correcting test can provide a reference and predictive indicator for early diagnosis of FⅧ inhibitor development in children with HA.

【Key words】 hemophilia; children; FⅧ; inhibitor; APTT

血友病 A 是 X 连锁隐性遗传性出血性疾病。由于凝血因子Ⅷ(FⅧ)缺乏患者终身具有自发性或轻微损伤后出血倾向, 随着替代治疗, 尤其是预防治疗在血友病 A 患儿中的不断普及, FⅧ抑制物发生率也随之提高。国内外既往报道血友病 A 患儿 FⅧ抑制物的发生率为 3.9%~30.0%^[1]。这些针对外源性 FⅧ的同种抗体可灭活输注的 FⅧ而完全阻断其止血作用, 导致替代治疗无效、增加治疗费用、甚至增加出血风险^[2-3]。目前国内仅有少数医疗单位开展了 FⅧ抑制物定量检测, 这大大限制了临床医生早期识别 FⅧ抑制物产生。活化部分凝血活酶时间(APTT)是评估内源性凝血因子活性的的重要筛查试验。作者在工作中发现, 通过计算即刻法与孵育法 APTT 差值可以初步提示 FⅧ抑制物有无, 如能得到证实, 将可以作为预测 FⅧ抑制物的指标之一。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 11 月至 2014 年 7 月于北京儿童医院血液肿瘤中心血友病门诊就诊的 172 例血友病 A 患儿, 筛查期中位月龄 53(1~185)个月; 重型 137 例(79.5%)、中间型 35 例(20.5%)。所有患儿均接受过外源性 FⅧ输注治疗, 且超过 72 h 的洗脱期后进行抑制物检测。所有家长均签

署知情同意书。血友病 A 严重程度依据世界血友病联盟推荐的标准进行分型^[4]。

1.2 仪器与试剂 采用 IL 公司 ACLTOP500 全自动凝血分析仪及配套试剂。基于测定 APTT 的一期凝固法检测 FⅧ:C。

1.3 方法 采用改良 Bethesda 法检测 FⅧ抑制物滴度^[5]。期间所用检验方法参加 WHO-WFH 国际室间质控及卫生部室间质评均达到合格标准。

1.3.1 标本采集 所有受检者均空腹抽取静脉血 2.0 mL, 3.2%枸橼酸钠抗凝, 2 500×g 离心 15 min 分离血浆待测, 标本无黄疸、无乳糜、无溶血。

1.3.2 正常混合血浆(PNP)制备 取 50 瓶定标血浆干粉, 每瓶加入 1 mL 去离子水, 静置 15 min 充分溶解后混合, 加入固体咪唑, 浓度达到 0.1 mol/L, 在 4℃条件下, 缓慢滴入浓度为 0.1 mol/L HCl 至 pH7.4。分装后保存于-80℃冰箱备用。

1.3.3 抑制物筛选 采用 APTT 血浆纠正试验, 包括即刻法 APTT 及孵育法 APTT。即 100 μL PNP 与等量患儿血浆混合, 即刻及 37℃孵育 2 h 后分别测定 APTT。

1.3.4 抑制物滴度 即受检血浆灭活正常血浆中 FⅧ的能力。能使正常血浆 FⅧ:C 减少 50%时, 则定义为 FⅧ抑制物

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81341018);首都卫生发展科研专项资助项目(2014-2-2092);血友病疾病管理系统资助项目(IHECC2014HEM04);北京市医院管理局临床医学发展专项资助项目(ZY201404)。

作者简介:李刚,男,本科,主管技师,主要从事出血实验检验工作。△ 通讯作者, E-mail:chenzhenping@outlook.com。

浓度为 1 个 Bethesda 单位(BU)。抑制物滴度大于 5 BU 为高滴度抑制物, ≤5 BU 为低滴度抑制物^[6]。改良 Bethesda 法检测具体方法:(1)PNP150 μL 与乏 FⅧ:C 血浆 150 μL 混合作为标准血浆,PNP150 μL 与患儿血浆 150 μL 混合作为待测血浆。(2)将标准血浆与待测血浆置于 37 °C 孵育 2 h。(3)以不同稀释度标准血浆作 FⅧ:C 标准曲线,以此检测待测血浆中残留 FⅧ:C。(4)根据待测血浆中残留的 FⅧ:C 与抑制物单位的关系,计算 FⅧ:C 抑制物的量,以抑制物滴度小于 0.6 BU 为阴性;首次筛查时抑制物滴度大于或等于 0.6 BU,且 1 周内复测仍大于或等于 0.6 BU 为阳性。(5)因标准曲线在 FⅧ:C25%~75%线性关系较好,如果患儿抑制物滴度很高,以致所测残留 FⅧ:C 低于 25%时,需用缓冲液稀释患者血浆后,重复检测残留 FⅧ:C,以此残留量换算出的抑制物滴度乘以稀释倍数则是稀释前的抑制物滴度,以 BU/mL 血浆表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计分析。非参数法构建受试者工作特征曲线(ROC 曲线),对即刻法与孵育法 APTT 差值进行切分,确定检验界点。计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况 所有患儿均检测原血浆 APTT、即刻法 APTT 纠正试验、孵育法 APTT 纠正试验及 FⅧ抑制物滴度检测。结果抑制物阴性 87 例,阳性 85 例。阳性中低滴度抑制物 54 例,高滴度抑制物 31 例。抑制物阳性组 APTT 秒值差[7.5(1.0~49.0)s]与阴性组 APTT 秒值差[1.9(0.3~3.1)s]比较,阳性组显著高于阴性组,差异有统计学意义($P < 0.05$);抑制物高滴度组 APTT 秒值差[16.7(25.3~49.0)s]也显著高于低滴度组 APTT 秒值差[3.6(1.0~29.6)s],差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 孵育法与即刻法 APTT 纠正试验的秒值差与 FⅧ抑制物滴度的相关性 见图 1。对患儿孵育法与即刻法 APTT 纠正试验秒值差与 FⅧ抑制物滴度进行相关性分析,结果显示,两种 APTT 纠正试验秒值差与患儿的 FⅧ抑制物滴度高低密切相关($r = 0.938 3, P < 0.000 1$)。

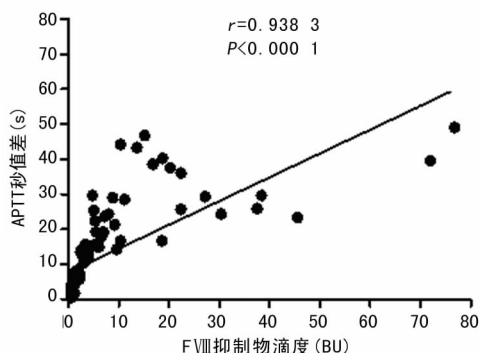


图 1 两种 APTT 纠正试验秒值差与 FⅧ抑制物滴度的相关性

2.3 应用 ROC 曲线评价即刻法与孵育法 APTT 差值预测 FⅧ抑制物阳性的诊断界点 抑制物阳性与阴性临界点分析:以抑制物阳性人群和抑制物阴性人群作为 ROC 曲线分析的切点,对孵育法 APTT 结果进行分析。ROC 曲线下面积(AUC)=0.908(95%CI:0.875~0.941, $P < 0.05$), Youden 值为 0.679,所对应的 APTT 差值为 2.6 s,此即有无抑制物的最佳诊断界点,此时敏感度为 80.4%,诊断特异度为 87.5%,见图 2、表 1。

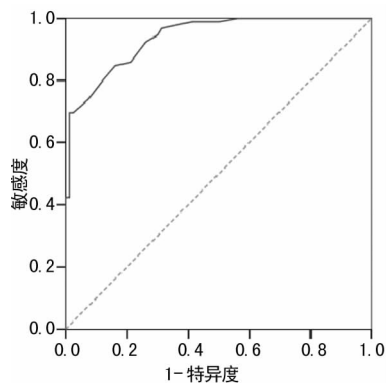


图 2 APTT 差值诊断凝血因子 FⅧ抑制物有/无的 ROC 曲线

表 1 诊断界点为 2.6 s 时两组人群分布情况(n)

组别	孵育法 APTT(s)		合计
	<2.6	≥2.6	
阴性组	68	19	87
阳性组	12	73	85
合计	80	92	172

注: $\chi^2 = 70.8, P < 0.05$ 。

3 讨 论

FⅧ抑制物系体内产生具有灭活或中和 FⅧ促凝活性 Ig 抗体,其对 FⅧ为完全抑制,可灭活 98%以上的 FⅧ,从而引起 FⅧ水平和活性降低。目前常用抑制物定量检测方法包括 Bethesda 方法、Nijmegen 法。虽然定量检测可以明确抑制物滴度,但操作繁琐、试剂昂贵,很难适应急诊检验的需要。国内有条件进行定量检测的临床实验室有限,短时间内很难普及。APTT 纠正试验是凝血因子抑制物的筛选试验,FⅧ:C 检测基于 APTT 一期凝固法,理论上只要存在 30%的凝血因子,APTT 就可以达到正常水平^[7-9]。1:1 混合试验提供了 50%的凝血因子,孵育反应体系中如存在抑制物将对 FⅧ进行消耗,随孵育时间延长 FⅧ:C 逐渐降低,APTT 将不能被纠正。即刻法 APTT 反应环境中温度、pH 值均无明显改变,且没有经历孵育过程,抑制物灭活 FⅧ有限,通常可得到被纠正的 APTT,即两种方法反应体系的差异直接反映 APTT 秒值差的差异。通过 APTT 秒值差提示抑制物滴度有无,差值越高,抑制物滴度越高。本研究结果也显示 FⅧ抑制物阳性组秒值差明显高于抑制物阴性组,且 FⅧ抑制物滴度与 APTT 纠正试验的秒值差呈正相关,此结果与理论值是一致的。

本文采用改良 Bethesda 法确定血浆中 FⅧ抑制物滴度并进行分组,再应用 ROC 曲线分析 APTT 差值预测抑制物阳性临界点结果显示,抑制物阳性 AUC 为 0.908,统计学提示具有较高的预测价值。通过 χ^2 检验验证,以 2.6 s 作为诊断临界值时,可以获得较高的诊断特异度及诊断敏感度。国外也有用正常血浆和患者血浆按照不同比例(1:1、1:4、1:9)混匀进行 APTT 纠正试验作为抑制物的筛查试验,其秒值差的差异定义为 2 s。虽然有一定的差异,但考虑采用的方法并非完全相同,且不同的仪器及试剂对 APTT 的结果影响较大。本实验室通过 ACL TOP500 全自动血凝分析仪检测 APTT 纠正后秒值差,当秒值差长于 2.6 s,提示患儿血浆中可能存在 FⅧ抑制物,此时可进一步通过定量方法确诊得到实际 BU 数值。值得注意的是本研究只是针对已确诊为血友病 A 患儿的一个 FⅧ抑制物初筛试验,在 FⅧ替代治疗过程中,(下转第 3455 页)

过程, 主要与自由基累积、兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙离子超载、炎性反应等多种机制有关。自由基具有很高的化学活性, 可快速攻击其他化合物的分子并产生更多的自由基, 破坏膜结构中蛋白成分、引起膜脂质过氧化, 导致膜损伤、线粒体功能障碍、溶酶体破裂、细胞溶解和组织水肿等一系列损伤作用。大量研究表明, 自由基可以作用于大量的分子目标, 包括细胞外信号调控的蛋白激酶、有丝分裂激活蛋白激酶、核转录因子 NF- κ B 和 Caspase 家族^[6]。

Bcl-2/Bax 相对水平大致反映了细胞发生凋亡的可能性, 研究实时荧光定量 PCR 考察了 Bax/Bcl-2 水平, 发现川芎嗪预处理后, Bax/Bcl-2 可呈剂量依赖性降低, 相关蛋白主要是通过作用于线粒体来实现其促进凋亡或抑制凋亡的生物学活性^[7-8]。线粒体在细胞凋亡过程中起枢纽作用。线粒体跨膜电位降低是细胞凋亡早期的不可逆事件, 线粒体是多种促细胞凋亡信号转导分子的靶点, 同时也是细胞死亡通路的整合元件。本研究观察到过氧化氢模型组, 线粒体膜电位下降, 而川芎嗪可抑制钙超载, 提高线粒体膜电位, 抑制细胞凋亡。Bax 可活化同源半胱氨酸酶 Caspase, 促进细胞凋亡^[9]。活化的 Caspase 可以次序激活其他 Caspase 形成 Caspase 级联反应, 促进细胞凋亡。Caspase3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, Caspase8 和 Caspase9 则分别参与死亡受体介导的外源性途径和线粒体损伤的内源性途径, 是凋亡发生的启动者。本研究结果显示, 过氧化氢主要通过内源性途径诱发细胞凋亡, 川芎嗪可以抑制 Caspase3 和 Caspase9 的活化, 从而缓解凋亡进程。

本研究结果表明, 过量氧自由基可诱导 PC12 细胞凋亡, 在合适浓度川芎嗪干预下, 可呈剂量依赖性抑制细胞凋亡, 其可能途径为通过调节 Bax/Bcl-2 平衡, 进而抑制 Caspase3 和 Caspase9 活化, 提升线粒体膜电位发挥作用。

参考文献

[1] Zaghoul N, Nasim M, Patel H, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice

[J]. FEBS J, 2012, 279(5): 871-881.

[2] Tang Q, Han R, Xiao H, et al. Neuroprotective effects of tanshinone IIA and/or tetramethylpyrazine in cerebral ischemic injury in vivo and in vitro [J]. Brain Res, 2012, 1488(11): 81-91.

[3] Sun Y, Yu P, Zhang G, et al. Therapeutic effects of tetramethylpyrazine nitron in rat ischemic stroke models [J]. J Neurosci Res, 2012, 90(8): 1662-1669.

[4] 张春兵, 丁兴, 詹臻. 盐酸川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 江苏中医药, 2008, 53(4): 77-79.

[5] 李锦吉, 狄留庆, 李俊松, 等. 通塞脉制剂对过氧化氢致 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 56(2): 146-149.

[6] Takabe W, Li R, Ai L, et al. Oxidized low-density lipoprotein-activated c-Jun NH2-terminal kinase regulates manganese superoxide dismutase ubiquitination; implication for mitochondrial redox status and apoptosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(3): 436-441.

[7] Mehmeti I, Lenzen S, Lortz S. Modulation of Bcl-2-related protein expression in pancreatic beta cells by pro-inflammatory cytokines and its dependence on the antioxidative defense status [J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 332(12): 88-96.

[8] El MS, Faletti L, Berg B, et al. A novel mitochondrial MAVS/Caspase-8 platform links RNA virus-induced innate antiviral signaling to Bax/Bak-independent apoptosis [J]. J Immunol, 2014, 192(3): 1171-1183.

[9] Mei JM, Niu CS. Effects of CDFN on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation [J]. Neurol Sci, 2014, 35(8): 1275-1280.

(收稿日期: 2015-03-20 修回日期: 2015-06-18)

(上接第 3452 页)

如相关实验室没有开展抑制物检测项目, 而临床大夫有此怀疑时, 可考虑加做预测抑制物有无。

随着社会对罕见病的关注及医保政策的倾斜, 越来越多的患者得到了因子替代治疗。针对血友病 A 患儿预防治疗的普及, 临床医生已逐步体会到抑制物问题的严峻性。抑制物定性及定量监测, 将有助于医生判断患者临床风险, 影响临床治疗决策。尝试利用 APTT 这一常规出血检测项目对 FVIII 抑制物筛查, 是对现阶段无法开展抑制物定量监测医疗单位的补充, 为血友病 A 患儿早期诊断及制订合理的治疗方案提供依据, 可作为抑制物监测的前期预试验常规开展^[10]。另外, 本研究为回顾性横断面研究, 非动态的长期纵向观察结果, 研究数据仅局限于本实验室, 未经过多中心研究证实。对于血友病 A 患儿 APTT 差值与抑制物滴度关系只能作初步探讨, 具体有待将来进一步深入研究。

参考文献

[1] 魏琪琪, 李刚, 唐凌, 等. 儿童血友病 A 抑制物产生相关因素横断面分析 [J]. 中华儿科杂志, 2014, 52(2): 99-102.

[2] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, et al. Guidelines for the management of hemophilia [J]. Haemophilia, 2013, 19(1): e1-e47.

[3] Chambost H. Assessing risk factors; prevention of inhibi-

tors in haemophilia [J]. Haemophilia, 2010, 16(Suppl 2): 10-15.

[4] 世界血友病联盟. 血友病处理指南 [M]. 蒙特利尔: 世界血友病联盟, 2013: 45-46.

[5] 范连凯, 王志伟, 华宝来, 等. 改进 Bethesda 方法和 Nijmegen 方法检测凝血因子 VIII 抑制物的比较 [J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(11): 551-553.

[6] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组, 中国血友病协作组. 血友病诊断与治疗中国专家共识 (2013 年版) [J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(5): 461-463.

[7] Schwarz J, Aetermark J, Menius ED, et al. F8 haplotype and inhibitor risk; results from the Hemophilia Inhibitor Genetics Study (HIGS) Combined Cohort [J]. Haemophilia, 2013, 19(1): 113-118.

[8] 吴润晖. FVIII 抑制物: 50 年纵览 [J]. 血栓与止血学, 2012, 18(6): 285-288.

[9] 丛玉隆. 国内凝血实验常规检查的热点话题与思考 [J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(1): 18-21.

[10] 王建中. 出血与血栓性疾病的实验诊断应该与临床达成共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(3): 161-165.

(收稿日期: 2015-03-02 修回日期: 2015-06-28)