



CN0001878

CNIC-01412

NLNM-0001

中国核科技报告

CHINA NUCLEAR SCIENCE AND TECHNOLOGY REPORT

蛋白 C 系统功能调节及致血栓形成因素的研究

THE FUNCTION REGULATION OF PROTEIN C
SYSTEM AND NOVEL HIGH RISK
OF VENOUS THROMBOSIS

(In Chinese)



中国核情报中心
原子能出版社

China Nuclear Information Centre
Atomic Energy Press



金坚：博士，中国核医学国家重点实验室研究员。

JIN Jian: Ph. D, Research professor of State Key Laboratory of Nuclear Medicine, P. R. China.

CNIC-01412
NLNM-0001

蛋白 C 系统功能调节及致血栓 形成因素的研究

金 坚 陶永辉 张莲芬 张荣军 张满达 王博诚
(核医学国家重点实验室, 无锡)

何 杨 白 霞 阮长耿
(苏州医学院, 苏州)

摘 要

从人血浆和人尿中纯化了蛋白 C 系统各组份及抗凝血酶Ⅲ。免疫家兔产生了抗血清, 氯胺 T 法, Iodogen 法和 Bolton-Hunter 法制备了碘标记化合物。采用平衡法建立了放射免疫分析方法。所有方法的最低可测限均小于 10 $\mu\text{g/L}$, 回收率在 94.30%~105.22%之间, 未见与因子Ⅱ和凝血酶的交叉反应。采用所建的放射免疫分析法和流式细胞技术分析蛋白 C 系统在内皮细胞表面的功能表达和调节。建立了简单、可靠, 适于分析 APC 耐性的 APC-APTT 方法和可明确因子 V 纯合子和杂合子 G1691A 点突变的聚合酶链反应方法。结果表明, 中国和其他地区的黄种人因子 V G1691A 点突变发生率显著低于欧洲白种人, 而 APC 耐性并不低。提示中国等黄种人群有独立于因子 V G1691A 点突变以外的因子 V 或因子Ⅷ突变点存在的可能或存在其他致 APC 耐性因素等。

The Function Regulation of Protein C System and Novel High Risk of Venous Thrombosis

(In Chinese)

JIN Jian TAO Yonghui ZHANG Lianfen ZHANG Rongjun
ZHANG Manda WANG Bocheng
(National Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi)

HE Yang BAI Xia RUAN Changgeng
(Suzhou Medical College, Suzhou)

ABSTRACT

The procedures for isolation and purification of PC, PS, PCI and antithrombin III (ATIII) from human plasma and TM from human urine were developed. Five RIAs were also developed, on the equilibrium method, by raising the antisera in rabbits. ^{125}I -PC, ^{125}I -PS and ^{125}I -ATIII were prepared using the chloramine-T method, ^{125}I -PCI by Iodogen method and ^{125}I -TM by Bolton-Hunter method. All of their sensitivities were below 10 $\mu\text{g/L}$, and the ranges of recovery rates were 94.30% to 105.22%. The cross reactivities of these methods with factor II and thrombin (Th) were negligible. The functional regulation of protein C system with flow cytometry and the five RIAs was investigated. On the basis of the five RIAs. The technique of APC-APTT was developed, which is a simple and reliable method to detect APC-resistance. A PCR was also developed for identification and verification of G1691A transition or point mutation of factor V on homozygotes and heterozygotes. Even though the diagnostic level of APC-APTT were the same as. It is observed that factor V G1691A mutation incidence on Chinese is much lower than on North European. There may be other factors about APC-resistance, such as factor VIII mutation or factor V mutation but not on G1691A in Chinese.

前 言

凝血瀑布反应过程中的每个反应阶段均受相应机制的制约, 如果不加限制, 可导致纤维蛋白原转变成纤维蛋白, 血栓形成。血凝调节的近期研究表明有三种主要途径, 即 (1) Serpins 家族成员抗凝血酶III (Antithrombin III, AT-III) 对凝血瀑布反应中心反应产物凝血酶 (Thrombin, Th) 及其他丝氨酸蛋白酶的抑制或灭活途径; (2) 以灭活因子VIII_a (Factor VIII_a, FVIII_a) 和因子V_a (Factor V_a, FV_a) 为反应主体, 从而影响内外源凝血活化途径交汇处因子X活化和凝血酶原酶形成的蛋白C系统 (Protein C system, PCS) 途径; (3) 阻断FVIII_a-组织因子复合物活性的脂蛋白相关的凝血系统抑制物和外源途径抑制物途径。这三种主要途径联合作用抑制凝血系统的蛋白酶和辅因子活性, 以调节血凝状态与生理条件相适应^[1]。

PCS是由蛋白C(PC)、蛋白S(Protein S, PS)、血栓调节素(Thrombomodulin, TM)和蛋白C抑制物(Protein C inhibitor, PCI)所组成。自1976年Stenflo以纯化的PC证明了Th具有抗凝活性以来, 先后阐明了PS, TM和PCI在系统中的作用, 建立了PCS的抗凝反应体系和途径。随着技术的进步、新的致血栓形成因素地发现及PCS调节和成分功能表达信息的积累, 促使人们又将PCS列入了研究工作热点, 为阐明血栓疾病的发病机制增添了新的内容。从PCS参与反应的成份结构看, 主反应体系, 尤其是PC的激活, PS辅佐灭活FV_a和FVIII_a是膜或磷脂依赖的已得到了肯定。Th是PC激活反应的唯一生理性活化剂, 在体外纯化体系中, 激活过程相当缓慢且受Ca²⁺的抑制。Th是一个由二硫键连接的双链蛋白酶, 活性中心位于β链。α-Th的三维空间结构测定和计算机模拟分析显示其有多个表面“exosites”, 可与许多大分子底物、辅因子、细胞表面受体和血浆中的抑制物相互作用。Th自身与TM的反应部分尚不明确, 但可以肯定的是非Th活性中心, 这已有DFP-Th与TM结合的K_d相同而证明。Th与TM结构中第5, 6个EGF重复区域可逆结合成1:1的复合物(K_d为0.48 nm), 引起Th大分子构象、反应特异性改变, 阻碍了Th自身催化的凝血反应, 特别是对纤维蛋白形成。因子V活化和血小板活化可因复合物形成受到抑制^[2]。这种复合物可与PC结合, 并加速PC重链N端Arg₁₂-Leu₁₃位裂解, 释放12肽残基, 转化成具有丝氨酸蛋白酶活性的活化的PC(Activated protein C, APC)。与Th和TM结合反应不同的是, PC结合成三元复合物是Ca²⁺依赖的^[3]。令人费解的是, PC所含的Ca²⁺结合部位γ-COOH Glu和β-OH Asp对TM介导的PC活化似乎不是必需的, 只是有利于膜表面TM的结合。PC究竟是与Th-TM复合物中的哪个成份结合至今不明。多数倾向于整个复合体, 并受TM的调节, 原因是TM第4~6个EGF区域包含PC, Th的结合部位。

PCS参与辅助激活PC的TM结构研究显示除与Th结合的第5个EGF区域外, TM还含有与PC相互作用的第4个EGF区域, 这似乎提示TM自身可结合PC, 起到局部浓聚PC, 便于由Th主导的PC激活反应。问题是TM自身是否有激活PC的能力, 还是与Th结合后才暴露与PC结合的EGF区域参与辅助激活PC? 除了TM以外, 内皮细胞和血小板表面还存在着另一种Th受体, 该受体的功能研究阐明了一个受体被酶水解并自动激活的崭新机制, 但这种受体与PC激活的关系至今尚未明确^[4]。TM除了有PC激活反应的辅因子活性和抑制Th激活纤维蛋白原的直接抗凝活性外, 尚有AT-III依赖性抗凝活性。

这种结论的实验基础是 Th-TM 复合物保留着与 AT-III 的结合能力,而这种结合是受 TM 结构中的硫酸软骨素的含量所调节的^[2]。需要进一步明确的是 AT-III 是否参与 PC 系统抗凝反应的控制。另外, PCS 的调节因子 PCI 灭活 APC 反应环境和高含量 γ -COOH Glu PC 的膜亲和性与 Th-TM 复合物的关系也需探讨。

已明确的遗传性和获得性血栓形成倾向疾病包括 AT-III, PC, PS 缺乏和抗磷脂综合征, 阵发性夜间血红蛋白尿等。PCS 是凝血调节的关键成分, APC 与它的辅因子 PS 共同抑制 FV_a 和 FVIII_a。遗传性凝血倾向与 PC 和 PS 缺陷均有关, 与 AT-III 一起, 在 8%~12% 的凝血倾向病人中可发现这三个抑制因子的缺陷^[2]。1993 年, Dahlback 等报道, 在一位从 19 岁开始有多次静脉血栓形成发生的 50 岁患者身上, APC 不能延长其白陶土部分凝血活酶时间测定 (APTT)。其数个亲属也有反复发生血栓形成的情况, 加入 APC 也不能延长血浆凝固时间。先证者及其亲戚都有正常水平的 AT-III, PC 和 PS, 也没有抗磷脂抗体和其他明显的危险因素。这种被 Dahlback 称为 APC 耐性的现象可由加入正常血浆消除, 故作者认为其原因可能是缺乏一个 APC 辅助因子^[5]。后来的研究提示这个因子就是因子 V 的一个未被认识的功能, 且该区域应位于远离其活性中心。荷兰 Leiden 血栓研究小组采用分子生物学技术发现, APC 耐性的表型与因子 V 基因的单个点突变的杂合性或纯合性有关^[2]。Dahlback 等认为由 APC 耐性引起的静脉血栓形成可达全部静脉血栓形成的 40%~60%, 说明在普通人群中这种基因突变的频率很高^[5]。建立 APC 耐性的分析方法, 可以预期哪些人可能会由于基因突变而最终导致血栓形成。鉴于 PCS 和 AT-III 系统抗凝血能力在机体总抗凝血能力中所占的比例, 本文在获得两系统高纯度单一成分和建立了定量方法的基础上, 利用流式细胞分析 (FCM) 技术, 进行了人脐内皮细胞表面 PC 激活调控的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

利凡诺 (Rivanol) 去白蛋白人血浆由苏州市中心血站提供。浓缩 200 倍健康人尿由珠海丽珠公司上海分公司提供。新鲜人脐带由吴县红十字医院、苏州医学院第一医院、苏州市妇幼保健院等单位提供。全血标本分别由法国 Robert Debe 医院、安徽省人民医院、苏州医学院第二医院、无锡市第一、第二人民医院和江苏省江原医院提供, 其中前三者标本均经 APC-APTT 鉴定有 APC 耐性患者。

苯甲脒, 东京化成产品。十二烷基硫酸钠 (SDS), Serve 产品。人 Th, Taq DNA 聚合酶、dNTP、Hinf I, HindIII 和 $\Phi\chi$ 174 DNA 标准, Boehringer mannheim 产品。大豆胰蛋白酶抑制剂 (STI), 苯甲烷磺酰氟化物 (PMSF), Triton X-100 和氯胺 T, Merck 产品。异硫氰酸荧光黄 (FITC), 1, 3, 4, 6-四氯-3 α 、6 α -二苯甘脲 (Iodogen), Aldrich 产品。胶原酶, Hepes, 水蛭素, 3-(4-羟苯基) 丙酸-N-琥珀酰亚胺 (HPNS), F II, 牛血清白蛋白第 V 部分 (BSA-V), aprotinin, 明胶, 溴乙锭, RNase, 蛋白酶 K, 福氏完全和不完全佐剂, Sigma 产品。 β -巯基乙醇和考马斯亮兰 R250, Fluka 产品。DE₅₂, Sephadex G-100, QAE-Sephadex A-50, DEAE-Sephadex CL-6B, 蛋白 A-Sephadex CL-6B, 肝素-Sephadex CL-6B, Blue-Sephadex CL-6B, Sephadex CL-6B, Ampholine, TEMED, 过硫酸铵, 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 转移电泳用硝酸纤维素膜和电泳标准

等电点 (pI) 蛋白, Pharmacia 产品。色谱标准分子量蛋白, Bio-Rad 产品。抗 BALB/c 小鼠 IgG 酶标抗体, Immunotech 产品。APC-APTT 试剂盒 (APC™Resistan-SC), COATEST[®], Sweden 产品。抗兔 IgG 酶标抗体, 上海华美生物公司产品。AT-III 活性测定试剂盒和抗 IgG 亚型血清, 卫生部上海生物制品所产品。BSA, S₂₃₆₆ 和电泳标准分子量蛋白, 中科院上海东风试剂厂产品。APTT 试剂盒, 上海通用医用仪器公司产品。小牛血清 (FCS), 杭州四季青生物制品研究所产品。TM 单克隆抗体 (SZ-57), SZ-57IgG₁-SepharoseCL-6B 柱, PC IgG 亲和层析柱, 去 PS 血浆和红细胞生成素 (EPO), 核医学国家重点实验室制备^[6, 7]。自配脐带保存液 (0.14 mol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 11 mmol/L 葡萄糖, 10⁵ u/L 青链霉素, 10 mmol/L PB pH=7.4), MEM 完全培养液 (20% FCS, 15 mmol/L HEPES, 2 mmol/L Gln, 2 mmol/L 丙酮酸钠, 0.1 g/L 链霉素和 10⁵ u/L 青霉素) 和 TEN 缓冲液 (0.15 mol/L NaCl, 0.6 mmol/L EDTANa₂, 20 mmol/L Tris-HCl pH=7.4)。实验血浆均经 3.8% 柠檬酸-Hepes pH=7.5 与全血 1:9 (V/V) 抗凝制成。10×PCR 缓冲液 (0.5 mol/L KCl, 25 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O, 4.5% NP40, 4.5% Tween-20, 0.1 mol/L Tris-HCl pH=8.3) 和 PCR 实验用无菌水为自制 (D 7033, Barnstead)。Na¹²⁵I, 中国原子能科学研究院产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 PC, PS, PCI 和 AT-III 的个别纯化

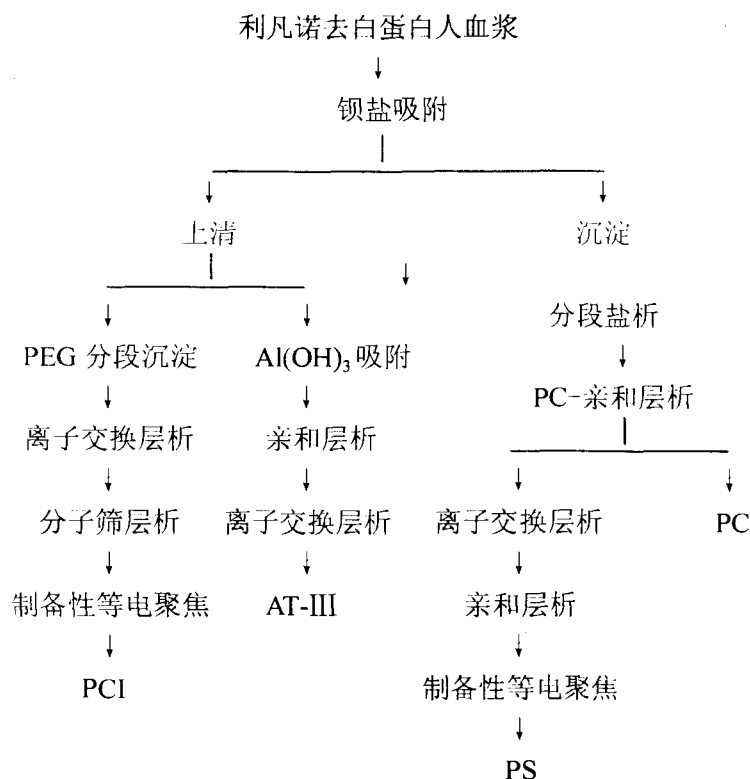


图 1 PC, PS, PCI 和 AT-III 联合纯化工艺设计

利凡诺去白蛋白人血浆添加 STI, PMSF 和苯甲脒等酶蛋白酶抑制剂后, 边搅拌边滴加 BaCl_2 溶液至终浓度为 74 mmol/L。连续角转头离心 2 h, 分别收集上清和沉淀物 (JCFZ, J₂-HS, Backman)。沉淀物进行 25%和 65%饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分段盐析后, 上样于 PC IgG-Sepharose CL-6B 亲和层析柱, 进行 25 mmol/L CaCl_2 溶液洗脱 (Econo, Bio-Rad)。合并经 SDS-PAGE, 等电聚焦 (IEF) 和 APTT 证实含 PC 组分。收集不吸附 PC IgG-Sepharose CL-6B 柱的流过液, 上阴离子交换 Q₂ 柱 (751-0001Bio-ScaleQ₂, Bio-Rad), 进行 0~0.8 mol/L NaCl 线性洗脱 (Bio-Scale, Bio-Rad)。收集 82-84KD 组分, 过 Blue-Sepharose CL-6B 柱, 收集穿过峰。进行制备性液体滚动式 IEF, Ampholine pH 4.0~6.0, 恒功率 12 W 电泳 5 h (Rotofor™, Bio-Rad)。回收 pI 为 5.0~5.5 组分, 即 PS。

BaCl_2 处理过的血浆上清, 经 6%和 12% PEG6000 分段沉淀 (20PR-50D, HITACHI)。沉淀用含 aprotinin 和 PMSF 的 50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5 溶解, 上 DEAE-Sepharose CL-6B 柱, 收集不吸附组分。进行 Sephadex G-100 分子筛层析, 收集 Mw56KD 组分。制备性液体滚动式 IEF, Ampholine pH 6.5~9.0, 收集 pI 为 7.9~8.1 的 PCI 组分。

BaCl_2 处理过的血浆上清, 滴加 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 溶液至终浓度为 0.2 mol/L, 离心 2 h, 收集浅粉红色沉淀胶状物。洗涤后, 上肝素-Sepharose CL-6B 柱。用含 0.155~2.0 mol/L NaCl 的缓冲液线性洗脱。收集 Mw57KD 和 Th 凝胶空斑法证实的含 AT-III 组分, 上 DE₅₂ 柱^[8]。进行 0~0.8 mol/L NaCl 线性洗脱, 收集含 AT-III 组分。

1.3 TM 的纯化

浓缩尿添加苯甲脒、PMSF 和石炭酸等蛋白酶和细菌抑制剂后, 经 QAE-Sephadex A-50 吸附, 用含 1 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱。收集洗脱液, 以截留分子量 20KD 的膜超滤浓缩后 (Pellicon^R, USA), 70 °C 热变性 10 min, 上清上 SZ-57 IgG₁-Sepharose CL-6B 柱, 洗脱液为 0.1 mol/L Gly pH=3.0。收集 PC 辅因子活性抗凝试验测定有活性的 TM 组分^[9]。

1.4 抗血清制备

抗血清由免疫家兔产生。免疫双扩散法测定滴度均大于 1:16。Scatchard 作图法计算亲和常数分别为 PC 4.35×10^9 L/mol, PS 3.20×10^9 L/mol, PCI 1.44×10^{10} L/mol, TM 6.68×10^8 L/mol 和 AT-III 5.15×10^9 L/mol^[10]。抗血清稀释曲线法分析工作浓度均大于 1:2 × 10⁴^[11]。五种抗血清与相应抗原的结构类似物没有明显交叉反应。

1.5 示踪化合物的制备

¹²⁵I-PC, ¹²⁵I-PS 和 ¹²⁵I-AT-III 采用氯胺-T 法制备^[12]。¹²⁵I-PCI 用 Iodogen 法制备^[13]。采用 Bolton-Hunter 法制备 ¹²⁵I-TM^[14]。除 ¹²⁵I-TM 用 Sephadex G-25 分离外, 其他均用 Sephadex G-50 分离。第一洗脱峰各管用给定稀释比例的兔抗相应抗原抗血清测定免疫活性, 选择结合率高, 非特异结合最低的洗脱峰管用于 RIA。¹²⁵I-HPNS 的碘化产率由测定两相放射性强度比例而得, 放化纯用硅胶薄层层析分析, 展开剂为乙酸乙酯: 甲苯 (1:1, V/V)。¹²⁵I 利用率均大于 16.50%, 标记率在 30%~80%之间, 三氯醋酸沉淀法测得放化纯均大于 80%, 比放射性在 1.4~2.7 GBq/mg 之间。

1.6 RIA 方法学

(1) 于 RIA 反应试管中, 依次加入 100 μl 参考标准 (或样品)、100 μl 工作浓度抗血清, 100 μl (约 240 Bq) 示踪化合物, 4 °C 保温 24 h, 再加入 500 μl 1:50 正常兔血清, 100 μl 1:5 羊抗兔第二抗体, 4 °C 保温 24 h。抗体结合的示踪化合物用 γ-计数器测量。B/T

或 $B/B_0\%$ 对参考标准作图 (C5002, Parkard)。

(2) 所建的五种 RIA 适合于测量血浆和细胞培养系统相应成分的含量, 其中 TM RIA 还可用于尿中 TM 的检测。所有的 ^{125}I 标记化合物均经标准曲线和稀释曲线比较鉴定, 免疫反应性基本无损失。 ^{125}I 标记化合物放置 3~4 周后, 最高结合管和非特异结合管无明显改变, 说明这些化合物稳定性好。在所有的方法学考核中, 我们曾把血浆样品经多次稀释后用于方法学测定, 换算后的结果非常接近。用这些系列稀释血浆代替相应的参考标准做标准曲线, 经 Logit 转换成线性, 其斜率与各自的标准曲线斜率基本一致, 表明本文方法有良好的健全性, 血浆基质对方法学没有明显影响。所有方法测量 12 管重复 6 组参考标准点的平均批变异系数均 <6.0 , 批内和批间重复性研究亦证明本文方法学是可靠的。

1.7 内皮细胞培养

参考徐新来方法制备鼠尾胶原^[15]。参考 Jaffe 等人方法并略加改进培养内皮细胞^[16]。取置于脐带保存液中的分娩后人脐带, 用 10 mmol/L PBS pH=7.4 冲洗去除残留血细胞, 注入 5 ml 的上述溶液配制的 0.1% 胶原酶, 37 °C, 15 min。用 40 ml 含 0.2% BSA 的缓冲液将内皮细胞混合液冲出, 2000 g 离心 10 min, 弃上清, 内皮细胞用 MEM 完全培养液悬浮。接种内皮细胞于预涂鼠尾胶原的培养瓶中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱 (B10620M, Lunaire) 培养, 隔天换培养液, 用相差显微镜 (Wilovet^R, Germany) 形态学观察。用 10 mmol/L PBS pH=7.4 洗涤生成成簇的内皮细胞, 解离液为含 10 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA Na₂ 的上述缓冲液。依次用 TEN 和含 2 mmol/L PMSF 的 TEN 缓冲液, 无 FCS 的 MEM 培养液洗涤内皮细胞。

1.8 FITC 标记化合物的制备

参照倪灿荣介绍的方法制备 FITC-PC, -PS, -PCI, -Th, -AT-III 和 -SZ-57 IgG₁ 标记化合物^[17]。HPLC 分子筛分级纯化标记化合物和游离荧光素, 荧光检测分析产物 (5000T, Bio-Rad)。

1.9 FCM

(1) 碘化丙啶(IP)荧光染色法鉴别死活细胞。

(2) 取无 FCS MEM 培养液数次洗涤的内皮细胞, 调整为 4×10^5 个/ml 细胞, 分为三组, 第一组用 500 u/L Th 的无 FCS 的 MEM 培养液刺激内皮细胞, 37 °C, 孵育 15 min; 第二组用 SZ-57 IgG₁ 封闭内皮细胞; 第三组为无 Th 和 SZ-57 IgG₁ 的内皮细胞。分别进行 FITC-PC, -PS, -PCI, -Th, -AT-III 和 -SZ-57 IgG₁ 掺入, 洗涤两次, FCM 分析 (Bryte HS, Bio-Rad)。

1.10 APC 耐性试验

(1) APC 的制备: 0.5 ml 含 0.1 mol/L NaCl, 0.05% BSA-V 的 50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5 中, 依次加入 10 μg PC, 149 μg Th, 240 μg TM, 37 °C, 保持 45 min, 再加入 245 μg AT-III, 37 μg 肝素, 37 °C, 15 min。

(2) 该实验由两组 APTT 组成。一组为 50 μl 血浆样品、50 μl 不含 PC 的上述 APC 制备液和 50 μl APTT 试剂混合后, 37 °C 反应 6 min, 加入 50 μl 33 mmol/L CaCl₂ 触发反应, 计凝血时间 t_1 (Coag-a-metax₂ Durham); 另一组以 APC 取代不含 PC 的 APC 制备液, 计凝血时间 t_2 。

1.11 聚合酶链反应 (PCR)

(1) EDTA 抗凝血去血浆, $\text{NH}_4\text{HCO}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ 裂解红细胞。以 0.32 mol/L 蔗糖, 5 mmol/L MgCl_2 , 1% Triton X-100 的 10 mmol/L Tris-HCl pH=7.5 悬浮核, 5000 g, 10 min, 沉淀复溶于 PCR 缓冲液, 并添加蛋白酶 K, 55 °C 孵育 3 h 后, 99 °C 反应 10 min, -20 °C 保存备用。

(2) 引物设计和合成: 根据 Cripe 和 Kane 等发表的人凝血因子 V 核酸序列设计 PCR 引物^[18]。为了便于产物的检测, 在引物两端加有 Hinf I 和 Hind III 限制性内切酶位点。引物用 DNA 合成仪合成, HPLC 分离 (Oligo100, Beckman)。

上游引物: 5'-TTTCTTTCAGGCAGGAACAACACCAGAATC-3'

下游引物: 5'-AGCTTTACAGGTATTTTGTCTTGAAGTAACC-3'

(3) PCR 反应: PCR 的模板为白细胞 DNA。100 μl 反应体系中含有 40 pmol/L 上游和下游引物各 4 μl , 10 \times PCR 缓冲液 10 μl , 2 mmol/L 四种 dNTP 10 μl , 5 u/ μl Taq DNA 聚合酶 0.2 μl 及无菌水 68.8 μl 。在 Bio-Rad 公司的 P-4 PCR 反应仪上进行 35 个循环, 循环条件为 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min。PCR 产物用 20 u Hinf I 和 40 u Hind III 37 °C 消化过液, 经 6% 连续的 PAGE 分离, 参考标准为 $\Phi\chi 174$ DNA (72-1353bp), BET 染色, 观察结果。

1.12 蛋白纯度鉴定

用毛细管区带电泳法, 毛细管 24 cm \times 25 μm 涂层管 (148-3031 Capillary Cartridge, Bio-Rad)^[19]。PC, PS 和 AT-III 分析电极液为 0.1 mol/L PB pH 2.5, 电泳走向 + \rightarrow -; TM 分析电极液为 0.1 mol/L PB pH 6.0, 电泳走向 - \rightarrow +; PCI 分析电极液为 0.1 mol/L PB pH 4.0, 电泳走向 + \rightarrow -, 稳压 10 kV (Bio-Focus3000, Bio-Rad)。

1.13 分子量测定和等电点测定

分子量测定采用 SDS-PAGE 和分子筛 HPLC 法^[20]。电泳标准蛋白分子量范围为 17.5~96 KD (Mini Protein II, Bio-Rad), 色谱分子量参考范围为 1.35~670 KD (125-0477 Bio-SilSEC-400, Bio-Rad)。pI 测定用薄层 IEF^[21]。标准 pI 蛋白为 2.40~5.65, 3.0~9.5 (Electrophor 2117-II, Pharmacia)。

1.14 氨基酸组分分析

产品于 HCl 中高温消化, 真空干燥后, 定容, 用日立 8350 型氨基酸全自动分析仪分析氨基酸组分^[22]。

2 结果

2.1 PC 系统 RIA 方法学考核

2.1.1 PC 系统各组分和 AT-III 的鉴定

本文是国内外首次研究综合利用利凡诺去白蛋白人血浆实验工艺的工作。制备 VitK 依赖蛋白、PCI 和 AT-III 的最佳材料是新鲜人血浆, 而国内血站较普遍采用利凡诺沉淀法制备白蛋白。利用 VitK 依赖蛋白均含高比例 $\gamma\text{-COOH Glu}$ 可结合二价阳离子的特性, 分别以钡盐吸附物和上清作为 PC, PS, PCI 和 AT-III 制备的前体是可行的。在 PC 纯化中, 采用免疫亲和层析技术, 得率高, 产品纯度高, 简便, 并可进一步避免纯化中 $\beta\text{-PC}$ 的产生^[23]。因基本无 PC 的干扰, 后续的 PS 纯化设计可着重于产率提高。PCI 不含 $\gamma\text{-COOH}$

Glu,大量采用低吸热试剂 PEG 的优点是适于工艺建立,对溶液条件敏感性低;制备性 IEF 可解决 AT-III干扰的难题。AT-III血含量相对高,因缺乏 Cyt,结构中无二硫键,导致结构较伸展,电荷分布较均匀。这些结构上的特殊性要求工艺设计以高产率、高特异、高容量的技术为主体,选用铝盐吸附,亲和层析和离子交换层析三步法技术参数满意(见表1)。

表1 PC, PS, PCI, TM 和 AT-III生化参数分数

种类	分子量(KD)	等电点	高含量氨基酸	制备产率/%
PC	62	4.69	Glu,Asp,Leu	28.3
PS	83	5.20	Asp,Glu,Leu	12.6
PCI	56	8.03	Glu,Leu,Asp	10.5
TM	60	3.70	Glu,Ala,Gly	25.0
AT-III	57	4.82	Glu,Asp,Leu	12.7

血浆和尿中 TM 含亲水的 NH₂ 端区域,保持着与 Th 结合和辅助激活 PC 的活性。采用离子交换技术作为分离 TM 的前道工序已为许多学者所接受。许多工作注重 TM 与 Th 的亲合关系。进一步研究发现, TM 与 β-Th 和 γ-Th 的亲合力均很低,与 α-Th 和 DFP 修饰的α-Th 的结合解离常数分别为 0.48 nM 和 0.56 nM^[2]。结果提示,由后者建立的亲和层析分离 TM 产率均在 20%以内,且产品纯度低。原因可能有两个:(1)商品化 Th 是其同工酶的混合物,α-Th 所占比例是柱容量的限制性因素;(2)Th 的 Try, Arg 和 Tyr 残基是与 TM 可逆性结合必需的,改变这些残基可降低亲和力,甚至不能结合。建立亲和固相化的 CNBr 活化联接过程需含末端 NH₂ 的氨基酸残基参与,导致 Th 中大量 Arg 残基化学修饰而降低与 TM 的亲合力。采用 SZ-57 IgG₁-Sephrose CL-6B 亲和层析系统避免了上述问题,产率高。

2.1.2 RIA 方法学考核

RIA 曲线拟合方程为四参数 Logistic 函数,方法学质量参数见表 2。

表2 方法学质量参数评价

RIA	工作范围/μg · L ⁻¹	灵敏度/μg · L ⁻¹	CV%		回收率/%
			批内	批间	
PC	6.25~1024	3.94	4.40	9.68	104.28
PS	21~700	9.87	4.99	13.14	94.30
PCI	4.8~1024	2.58	2.73	8.62	101.89
TM	8.1~560	6.16	5.10	10.94	105.22
AT-III	4~800	2.03	3.56	8.01	97.5

2.2 FITC 标记化合物的理化和免疫学鉴定

FITC 是酸性染料,可共价结合到蛋白带正电荷的基团上,它有较强的消光系数 (8 × 10⁴) 和量子产额 (0.5),适于氩离子激光器的 488 nm 激发^[2]。由于发射明亮的绿色荧光 (525 nm) 与 pH 有关,为获得其最大发光选择 pH ≥ 8.5 时测量荧光(见表 3)。

表 3 FITC 标记化合物的理化 and 免疫学评价

被标记物	标记方法	F/P 比值	荧光效价
PC	Marshall	3.6	1:10 ⁵ 抗体
PS	Marshall	4.8	1.3×10 ⁵ 抗体
PCI	Chadwick	2.9	1:1.2×10 ⁶ 抗体
SZ-53	Chadwick	1.7	62.5pmol/L SZ-571gG
兔白蛋白	Chadwick	1.6	
AT-III	Chadwick	4.6	1.24×10 ⁵ 抗体
Th	Marshall	3.2	87pmol/L AT-III

2.3 人脐静脉内皮细胞与 PC 膜或磷脂亲和性

无 FCS MEM 培养液洗涤过的培养人脐静脉内皮细胞，每 2×10^5 个细胞分别掺入 100 amol~80 nmol 的 FITC-PC，4 °C 避光保持 14 h 后，以 10~15 °C 的 50 mmol/L PB pH 8.5 洗涤细胞 3 次，进行 FCM 测量，以相同数量的内皮细胞和加相同荧光强度的 FITC-兔白蛋白的内皮细胞作参照。非参数分析显示无 Th-TM 复合物的人脐静脉内皮细胞可结合 PC 的饱和量为 16 fmol，即每个内皮细胞可结合 4.5709×10^5 个 PC 分子。单参数直方图上呈

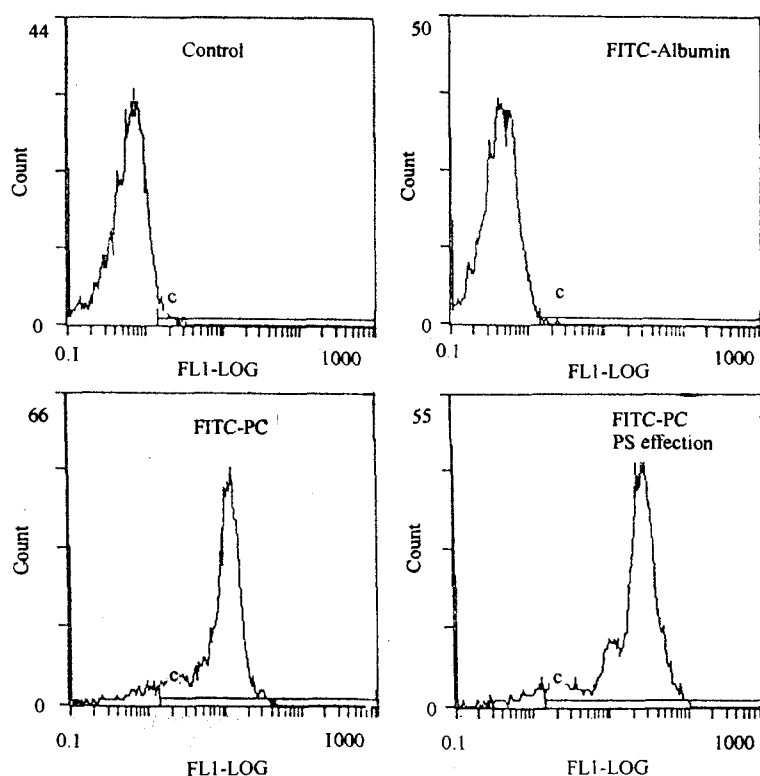


图 2 PC 与人脐内皮细胞的结合关系

上图为内皮细胞自发荧光和 FITC-白蛋白参照系

下图为 PC 与内皮细胞的结合和 PS 掺入的影响

单一峰，并不受掺入 PS 和预掺入 SZ-57 封闭 TM 的影响；掺入 Ca^{2+} 后荧光道数增加，阳性细胞数略有增加 (如图 2~4 所示)。说明人脐静脉内皮细胞表面含有不依赖于 TM，不受 PS 辅助的 PC 结合部位，结合部位可能与 PC 钙结合区域 γ -COOH Glu 重复的 EGF 有关。预经 PC 孵育的内皮细胞，在肝素存在时，用 FITC-PCI 示踪无细胞结合，表明内皮细胞表面的 PC 结合部位无激活 PC 的作用。

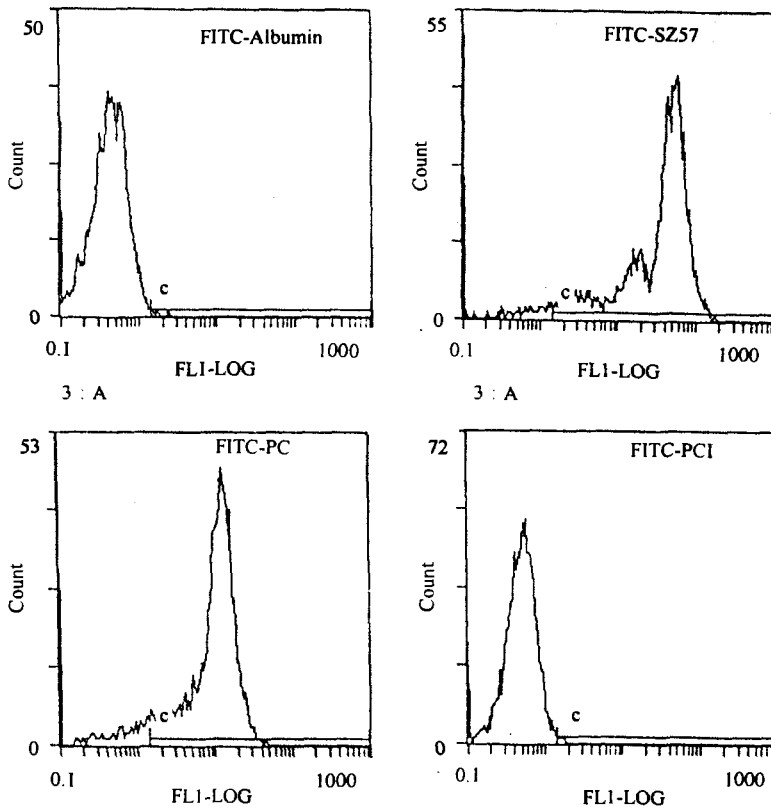


图 3 PC 与人脐内皮细胞的关系

上图为 FITC-白蛋白的参照系和 SZ-57 结合内皮细胞表面 TM；
 下图为在 SZ-57 封闭 TM 后，PC 结合内皮细胞及 PC 激活抑制状况。

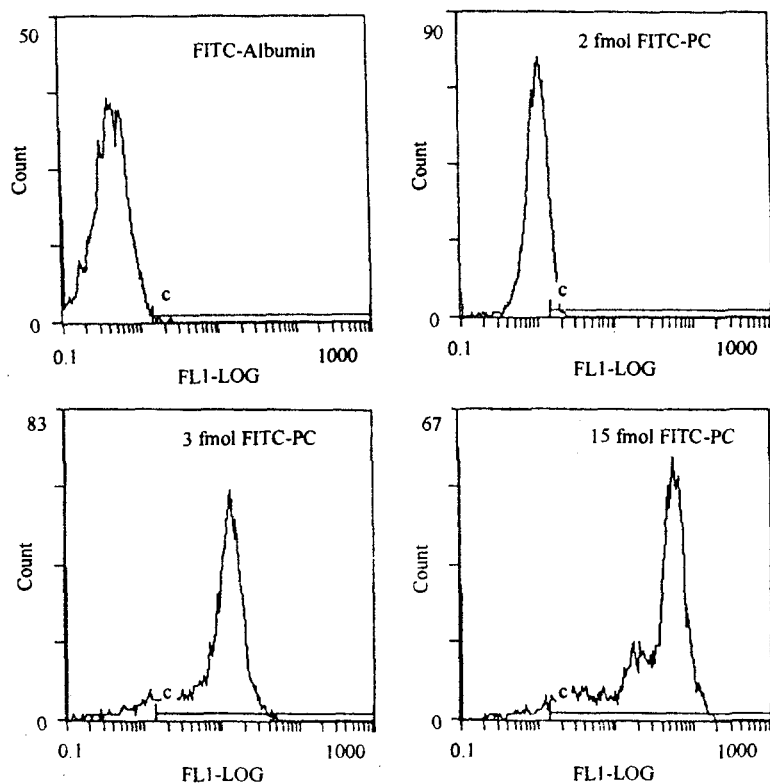


图4 PC结合人脐内皮细胞的剂量关系

2.4 非TM的Th受体与Th-TM复合物激活PC的关系

相同荧光强度的FITC-PC掺入预经0.75 u Th活化的内皮细胞，阳性细胞数和荧光道数都显著增加，饱和时可达92.4%和32.8。说明该峰是PC与Th-TM复合物结合的化合物，而非人脐内皮细胞结合PC部位的PC(见图5)。预先用SZ-57封闭内皮细胞表面的TM后，掺入FITC-Th仍显示单峰，说明除TM外，内皮细胞表面还有另外一种非TM的Th受体。在这种体系中，用FITC-PC示踪，阳性细胞数和荧光道数显著增加，说明这种非TM的Th受体也可活化PC，FITC-PCI示踪也证明了这种结论(见图6)。

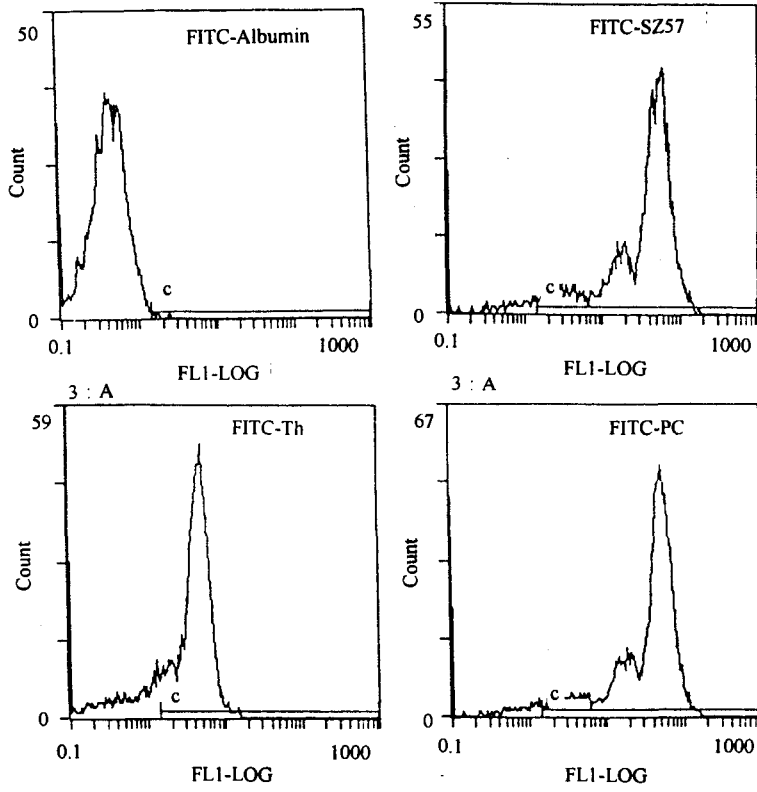


图5 PC与Th-TM复合物结合的关系

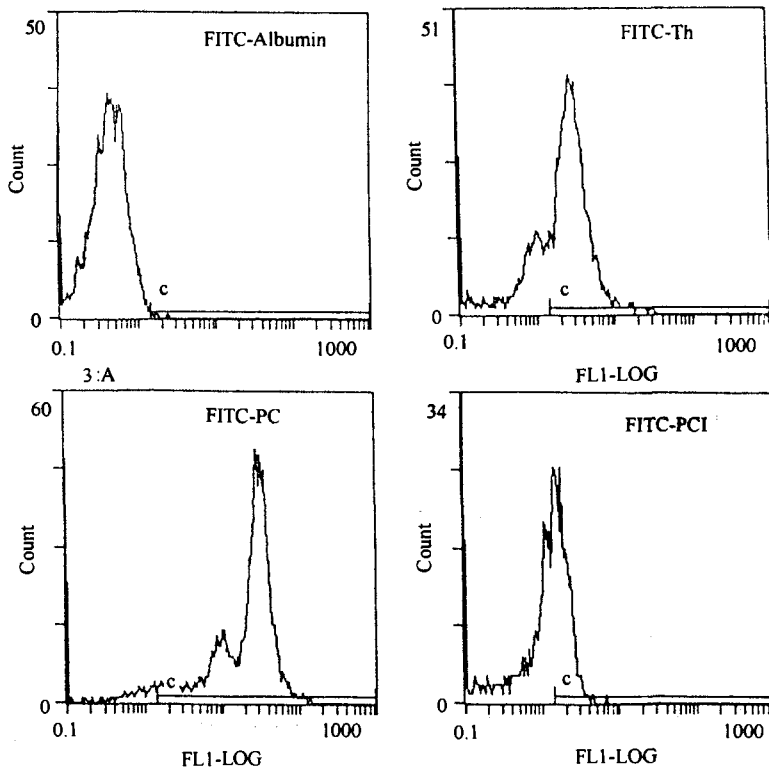


图6 PC与非Th-TM的TM受体结合及激活的关系

2.5 Th-TM 复合物与 AT-III 的关系

(1) 在含 Th-TM 复合物的内皮细胞体系中，掺入 FITC-AT-III 呈单峰；添加不同量的肝素，阳性细胞数和荧光道数无显著改变。在含 AT-III-Th-TM 复合物的内皮细胞体系中，掺入 FITC-PC，未见阳性细胞数和荧光道数增加，表明 AT-III 与 Th-TM 形成三元复合物主要受 TM 的调节，且该三元复合物形成可影响 PC 的激活 (见图 7, 8)。

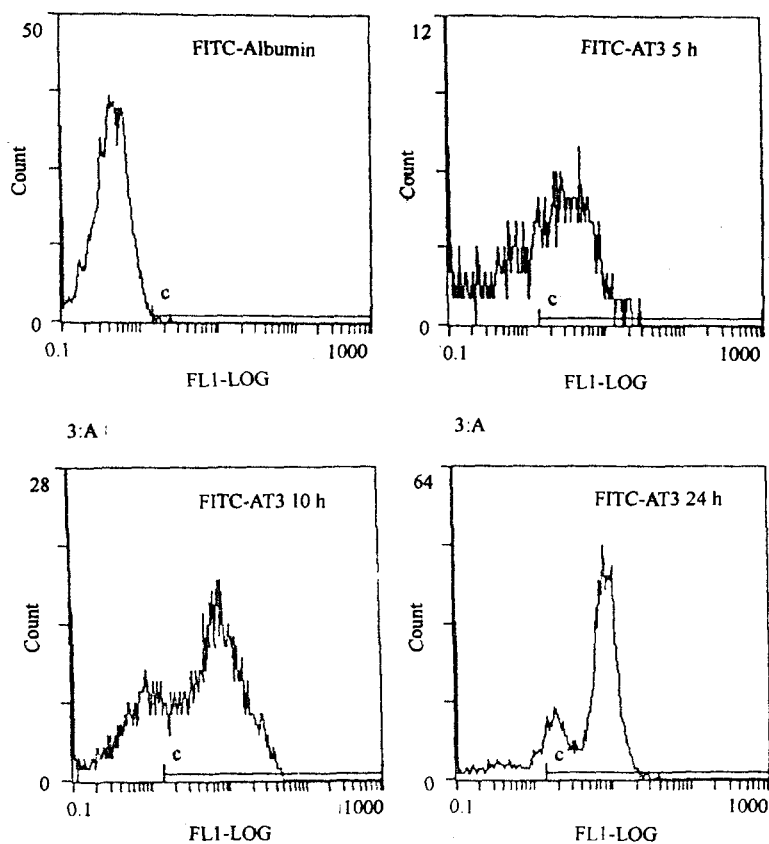


图 7 AT-III 与 Th-TM 复合物结合的时间反应动力学

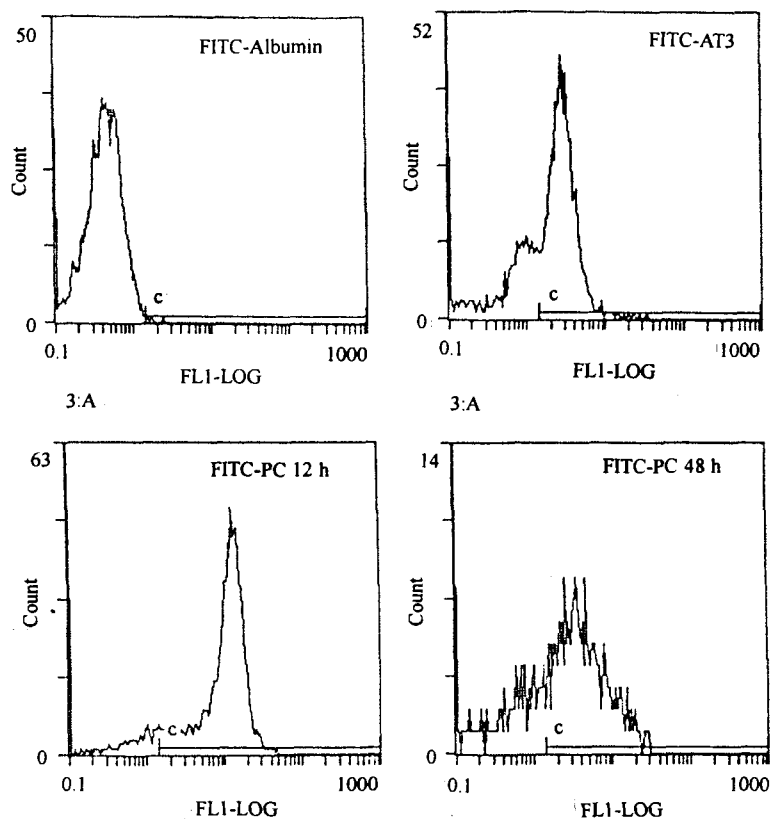


图 8 AT-III对 Th-TM 复合物激活 PC 的调节作用

2.6 APC-APTT 试验

(1) APC 浓度的影响

a. 正常血浆 PC 含量范围因测量方法各异而差别悬殊, 最大 CV% 达 36%。APTT 检查各家的正常参考值范围也难以一致, 最大 CV% 也达 39.1%^[2]。另外, APTT 异常结果的判断一般采用高于正常值的高限值 5%~10%, 实际以均值判断可达 30%~62%, 故 APC 敏感比 ($T = t_2/t_1$) 阴阳性值的确立十分困难。本文建立 T 界值的方法是将上述变异连加及 t_1 的 CV%, 确立实验 T_x 为 2.00 ($\sum X = 100\% + 36\% + 39.1\% + 62\% + 32.9\%$, 取整数)。

b. 以各 10 份男女正常人混合血浆为血浆样品, 添加不同量 APC, 分别测量 t_2 。同时做 10 个同一混合血浆不加 APC 的 APTT, 取 $X+2SD$ 为 t_1 。以该 t_1 为对照, 计算每个 T 值。从图 9 可见, 当 T_x 为 3.00 时, 对应的 APC 浓度 (即 PC 用量) 为 107.58 nmol/L (即每次试验用量 1 μg PC)。

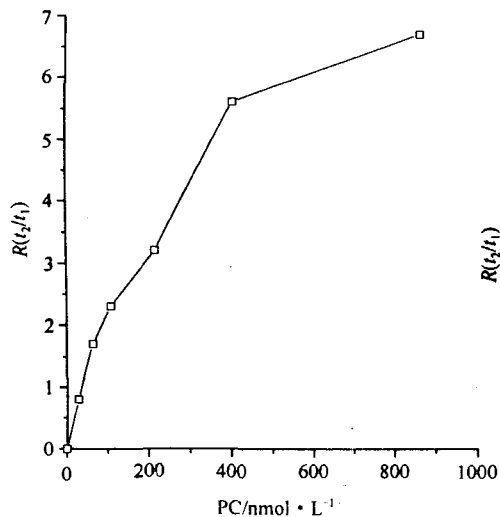


图9 APC与凝血时间比值的关系

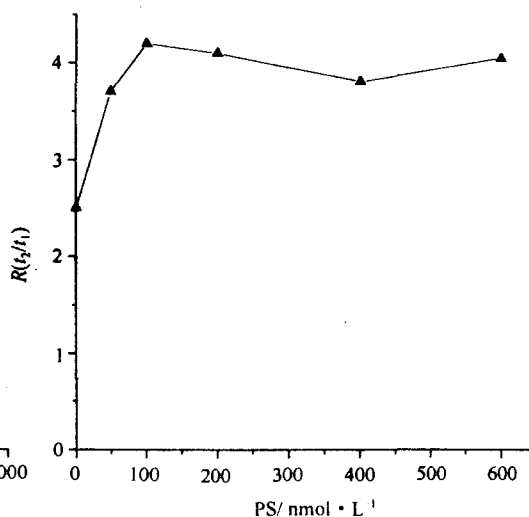


图10 PS对APC-APTT分析的影响

(2) PS浓度的影响

去PS人血浆为血浆样品，APC浓度为107.58 nmol/L，添加不同量的PS，测量APTT。可见PS用量与 t_2 呈饱和曲线，表明PS可增强APC的抗凝作用，而其本身没有丝氨酸蛋白酶活性（见图10）。

(3) 男女各20份正常血浆，分别用本文APC-APTT和瑞典Chromogenix公司APC Resistance-SC药盒测量，它们的 T_{n1} 和 T_{n2} 分别为男性 2.00 ± 0.18 ， 2.08 ± 0.11 ；女性 1.85 ± 0.14 ， 1.88 ± 0.12 ；选取男性为2.35，女性为2.12 ($\bar{X} + 1.96s$)。

(4) 初步临床应用

a. 423例正常人血浆标本（男214例，女209例）均经PC, PS, PCI, TM, AT-III RIA证明含量正常。APC-APTT的结果 T 为：男性 < 2.35 ，有19例，女性 < 2.12 ，有18例，分别占总例数的8.88%和8.61%。以 T/T_n 判别，男、女性 < 0.85 的分别为14例（6.54%）和15例（7.18%）。

b. 119例有静脉血栓史患者，经PC, PS, PCI, TM, AT-III RIA分析证明无含量异常，其血浆APC-APTT试验 T 超过界限例数20例，占16.81%；以 T/T_n 判别， < 0.85 为16例，占13.45%。其中33例与APC Resistance-SC药盒比较，阳性结果一致。

2.7 因子V G1691A点突变的PCR

(1) 以白细胞DNA为模板扩增因子V基因外显子10

用 NH_4Cl 溶血，Triton X-100裂解核膜获得白细胞DNA模板的方法进行PCR，为了

判断反应的敏感性，使每个反应中所含模板数分别为 10, 10², 10⁴, 10⁸ 个分子，结果可见反应系统中仅含 10 个模板分子时，仍然能扩增出 247 bp 片段，大小与预计的因子 V 外显子 10 号基因相同，表明所设计合成的引物及反应系统有良好的特异性和敏感性 (见图 11)。

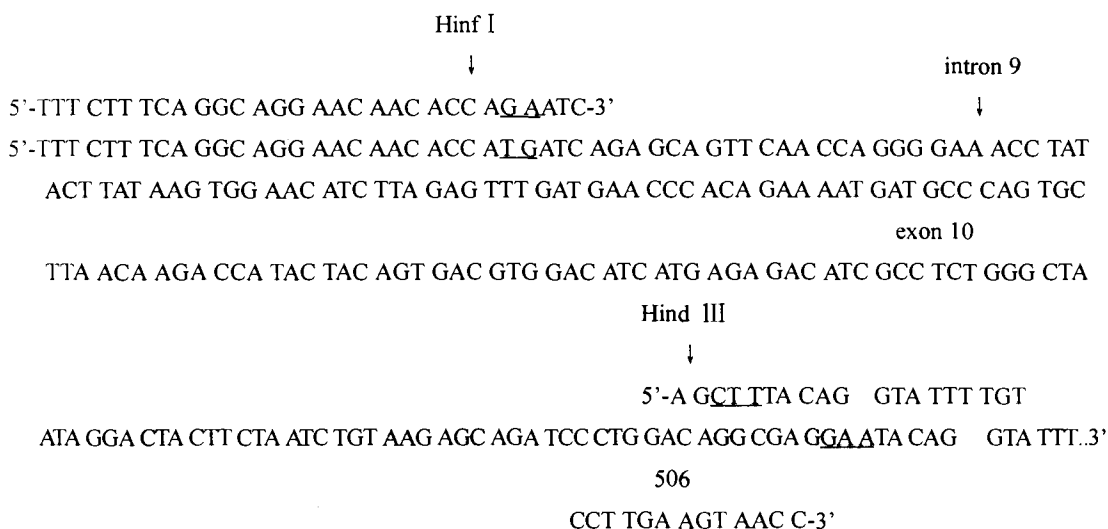


图 11 因子 V 10 号外显子核苷酸序列及因子 V G1691A PCR 引物设计

(2) 产物的应用分析

a. 上游引物、因子 V 外显子 10 号基因片段和下游引物共计 247 bp。在正常情况下，用 Hind I 切割上游引物 3' 端第 4, 5 位核苷酸，产物为 26 bp 和 221 bp 两个片段。由于 26 bp 在本实验的 PAGE 条件及 $\Phi\chi 174$ DNA 标准 (72~1353 bp) 无法检测，故只能见到 221 bp 片段。我们分析正常人因子 V PCR 产物电泳谱与理论预测相符。

b. 因子 V 1691 位 G 被 A 替代，使该密码子编码的氨基酸由 Arg 变为 Gln。用 HinfIII 切割下游引物 5' 端第 4, 5 位核苷酸和 Hinf I 配合消化应出现三个片段，即 26 bp, 32 bp 和 189 bp，后者在电泳谱上可读。本文患者因子 V PCR 产物电泳谱出现两种情况：一种是单一可读片段 189 bp；另一种是双可读片段 189 bp 和 221 bp。原因是因子 V 1691 位点突变有两种遗传状态，即纯合子遗传携带者 PCR 产物与上述理论分析得到的三个片段一致，而杂合子遗传携带者可出现四个片段，26 bp, 32 bp, 189 bp 和 221 bp (见图 12)。

3 讨论

PC 系统的功能调节涉及两方面，即 PC 活化的调节和 APC 作用的调节。在 PC 活化调节中，Th-TM 复合物是个关键因素。Kiesel 以人 α -Th 同 PC 以 50:1 的比例温育，发现 PC 可转变为 APC，但反应速度很慢。自从 1981 年 Esmon 和 Owen 发现 TM 以来，确立了 PC 主要受 Th-TM 复合物活化的影响。近期研究显示，因子 V 能与 Th-TM 复合物相互作用，FV_a 及其轻链可直接提高 Th 活化 PC 的速度，其效率只有 TM 的 1/20^[24]。与 PC 和 TM 相互作用不同的是，FV_a 与 PC 的结合依赖于 PC 结构中的 γ -COOH Glu，且有种属特异性。FV_a 还可以影响由 TM 介导的 PC 活化，且是剂量依赖的^[2]。当 FV_a 小于 50

nmol/L 时，它或其轻链可刺激位于细胞表面 Th-TM 复合物活化 PC；而高浓度 FV_a 轻链又可抑制 PC 的活化。这种 PC 系统反应底物量对反应物的调节在血凝调节中有重要作用，即在 APC 切割 FV_a 重链灭活的同时，游离的轻链又可调节 APC 的生成^[25]。

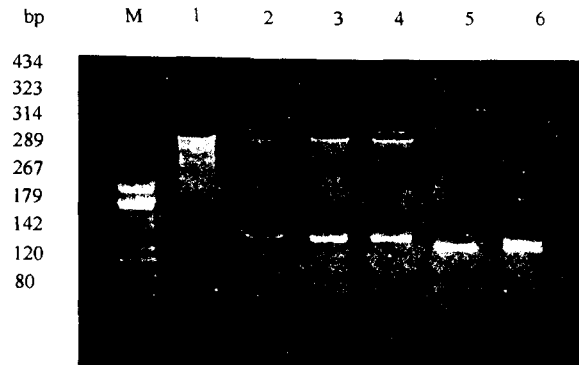


图 12 Agarose 电泳分离 PCR 扩增产物
 (1) 未经消化的因子 V10 号外显子扩增产物(247 bp);
 (2~4) 正常因子 V 经 HindIII 消化产物(221 bp);
 (5) 纯合子因子 V G1691A 突变携带者(189 bp);
 (6) 杂合子因子 V G1691A 突变携带者(221, 189 bp).

PC 激活的调节受多方面因素的影响，就其自身的条件而言， Ca^{2+} 结合区域在结构中的优势地位可为它的结合在带负电荷的磷脂表面提供物质基础^[2]。本文的结果表明，人脐静脉内皮细胞表面有结合 PC 的部位，这种结合部位结合 PC 特异，不受 PS 的影响，且结合的 PC 并不被激活。用结合 PC 的数量与已报道的内皮细胞表面 TM 表达量比较，该结合方式不可能是 TM 第 4 个 EGF 区域所为。人脐静脉内皮细胞表面的结合 PC 部位可能就是 Bangalore 等人采用 ^{125}I 同位素示踪、受体饱和等温 Scatchard 分析报道的 APC 内皮细胞结合部位。他们认为这种结合是特异、时间依赖，且可饱和和可逆的，平衡常数 K_d 为 6.8 nmol/L；竞争实验结果显示 APC 和 PC 与内皮细胞的结合区域相同，后者的 K_d 也同为 6.8 nmol/L；APC 和 PC NH_2 端 γ -COOH Glu 对这种结合是必须的^[26]。本文对内皮细胞表面 PC 结合部位数量的测量也与 Bangalore 等的报道相似。关于这种结合部位的功能有待进一步研究，可能的解释是 PC 在体内的贮存形式，避免被血浆中的蛋白水解酶裂解；另一种可能是聚集在膜表面以利于一旦 Th 出现时快速应激反应。令人感兴趣的是血浆 PC 含量也可能与 PS 一样，存在结合与游离的动态平衡，以适应生理条件的变化。这就对目前普遍采用的血浆定量和活性测量方法提出了疑问，也就是说，我们得到的只是血浆游离 PC 含量，而总 PC 含量至今尚难解决。

在 PC 激活调控的快速反应方面，有作者提出 AT-III 可与 Th-TM 复合物中的 Th 快速结合，导致 Th-ATIII 复合物从 TM 上快速解离而灭活 Th，使 Th 失去活化 PC 的功能，并与 Th-TM 复合物的形成无竞争关系^[27]。这种灭活方式的 Th 灭活半衰期只在 15 s 以内，似乎 TM 难以利用内源性 Th 活化 PC^[2]。Th 与 TM 的结合部位不是它的活性部位，而这种可逆

的、高亲和的 Th-TM 复合物不但增加 PC 激活的速度 (1000 倍以上), 还可抑制血小板激活, 纤维蛋白生成和至今所知的凝血反应。该复合物由于保留着 Th 的活性部位, 具有与 AT-III 结合的能力, 这种结合功能受肝素样物质的增强, 提示 TM 结构中的硫酸软骨素吸附量也参与调节。目前这种方式被认为是 PC 激活调节的快速反应。血浆中的另一种 Th 抑制物质肝素辅因子 II 对血管平滑肌细胞表面的硫酸乙酰肝素样物质亲和力高, 被认为是血管外的抗凝物质。我们的结果也说明了 ATIII-Th-TM 复合物的形成能明显影响 PC 的激活。有趣的是内皮细胞表面非 TM 的 Th 受体能结合 Th, 使其减缓受 AT-III 的灭活, 且又可能激活 PC, 这种矛盾的两相作用经 SZ-57 单抗封闭体系也得到了证实。这是否表明 AT-III 和 Th 体系在激活 PC 方面还存在着慢速调控作用。

PS 结构中的 Th 敏感部位可受 Th 作用而灭活 PS, 使之丧失 APC 辅因子活性。近期工作显示, PS 功能调节十分复杂。Th 灭活的 PS(tPS) 和 C_{4b} 结合的 PS(BPS) 抑制凝血酶原酶的能力与 FPS 相同, 提示 PS 及其代谢产物均有调节 Th 生成的作用, 这一特点是否影响 APC 的生成尚待进一步明确^[2]。BPS 和 tPS 分别丧失了与因子 V 或 FV_a 和因子 X_a 结合的能力, 说明 PS 自身可以与 FV_a 和因子 X_a 相互作用, 参与 PCS 反应底物灭活的调节。

APC 的灭活涉及数种物质, 如 PCI, α_1 -胰蛋白酶、 α_2 -抗纤维蛋白酶和 C_1 酯酶抑制物等, 它们与 APC 反应的二级速度常数和相对灭活效率以 PCI 最高 ($1.3 \times 10^4 \text{ mol/s}$)^[2]。PCI 只灭活低浓度的 APC^[28]。在高浓度 APC 存在时, PCI 已消耗殆尽, α_1 -胰蛋白酶和 α_2 -抗纤维蛋白酶充当灭活作用的主角。与 APC- α_1 胰蛋白酶复合物比较, APC-PCI 复合物的稳定性稍低。肝素样物质可促进 PCI 灭活 APC 的速率, 其结构基础是 PCI 的 H 螺旋可结合肝素, 导致前者构型改变。由于 AT-III 与肝素的亲和力远大于 PCI, 且血浆含量高, 所以体内肝素增加 PCI 的功能难以观察。PCI 在体内的活性表达主要受内皮细胞和内皮细胞基底膜物质调节, 含硫酸软骨素的 TM 也可促进 PCI 对 APC 的灭活作用。APC 在体外柠檬酸抗凝血中的半衰期为 31 min, 而在体内只有 12~18 min, 本文建立的体外制备的 APC 可在适当的保存条件下保持活性 4~5 天, 所以 PCI 灭活作用应是快速反应^[29]。本文的结果提示, PCI 灭活 APC 是膜依赖的, 对 PCI 在内皮细胞局部的浓聚结合 APC 是十分有利的; 同时表明 PCI 作用的膜依赖性可能与 TM 所含的肝素样物质有关, 这对 TM 参与 PC 激活和 APC 灭活机理的解释可更趋完善。另外, Th-TM 复合物形成, TM 如同接纳体 (Acceptor) 一样可通过其胞浆区段导致复合体内吞, 与初级溶酶体融合灭活 Th, 而 TM 回到膜表面, 继续发挥 Th 受体功能。有报道发现, PC 可抑制这种细胞内吞, 而 APC 无此功能, 提示在 PC 活化完成前, 内吞消化 Th 是无法进行的^[30]。

遗传性血栓形成倾向疾病的一些血栓形成危险因素在近年已得到了确认^[2]。因子 V 基因突变和具有 APC 催化耐性的异常因子 V 分子的产生是新确认的血栓形成危险因素, 是近 20 年来血栓形成理论最重要的成果。有报道 APC 耐性的发病率在西欧人群中达 3%~5%, 其中半数病人是遗传性血栓形成高危群体^[31]。APC 切割灭活 FV_a 是顺序和连续的过程。定位于 1 号染色体 (1q21~25) 的因子 V 基因 1865~1874 位的表达产物是与 APC 的结合部位, 切割部位是 1690~1692 位密码子编码的 Arg。1691 位 G→A 转换性点突变, 使 APC 耐性患者 Arg⁵⁰⁶Gln 置换处 APC 切割障碍, 导致后续的因子 V Arg³⁰⁶ 位断裂灭活无法完成。APC 切割 Arg⁵⁰⁶ 的结果是 FV_a 活性中心 Arg³⁰⁶ 位点的暴露^[32]。

静脉血栓的发生率约为千分之一, APC 耐性患者占很大比例, 这种因基因点突变所

致的遗传性疾病以往难以诊断。本文建立的 APC-APTT 试验考虑到方法学批间变异因素,选择 APC 敏感比 (T) 为判别指标稳定性较好,选择与正常 APC 敏感比 (T_n) 的比值,结果更稳定。48 例阳性血浆样本经 PCR 分析无异常,表明 APC 耐性并不等于因子 V 基因突变,因为高同型半胱氨酸血症以及狼疮抗凝剂的应用也可导致病人血浆对 APC 具有耐性。与瑞典 ChromogenixAB 公司生产的 APC Resistance-SC 比较检测结果,没有显著差异。

PCR 具有特异、高效获得基因的手段,以它灵敏、简便和快速的优点适于建立因子 V Arg⁵⁰⁶Gln 点突变检测方法。本文设计并合成了一对扩增因子 V 外显子 10 的引物,在标准实验室条件下,10 个模板分子经 35 个循环即可得到电泳片段。配以两个限制性内切酶消化,可鉴别正常因子 V 及因子 V 1691 位点突变的杂合子和纯合子携带者,方法可靠,适于临床检测。另外,由于扩增片段 247 bp,故 Taq DNA 聚合酶缺乏 3'-5' 外切核酸酶校正的错误掺入率基本可忽略^[33]。

APC-APTT 操作简便、经济,适于大规模筛选。与 APTT 不足之处相同的是,只有当所有的凝血成分均为正常时,检测结果才可靠,尤其是口服抗凝药物或样品处理不当(如肝素抗凝血浆),则可严重影响测定结果^[34]。因子 V G1691A PCR 的分析可对因子 V 突变所致 APC 耐性作出确凿的诊断。本文从法国 Robert Debe 医院获得的经 APC Resistance-SC 鉴定为阳性的 296 份标本,PCR 分析表明,法国人因子 V G1691A 发生率较高,阳性 72 例,其中纯合子 2 例,杂合子 70 例;而中国人 48 例均为阴性。据资料分析,国内尚未见因子 V G1691A PCR 的应用报道。亚洲其他黄种人居住区如日本、新加坡、台湾和香港等地区已于 1995 年相继开展了这方面的检查,也均无阳性病例报道^[2]。可以肯定地说黄种人因子 V G1691A 点突变发生率显著低于欧洲白种人。从我们的结果看黄种人 APC-APTT 阳性比例并不低于白种人,可能的原因是:(1) 有独立于因子 V G1691A 点突变以外的因子 V 或因子 VIII 突变点存在的可能;(2) 其它致 APC 耐性因素等。应该提出的是,大多数 APC 抵抗的个体并未患有血栓形成。杂合子状态的 APC 抵抗可导致受累者终生的血栓形成危险性,但除非与其它遗传性缺陷或可促使血栓形成的状况相结合,否则只是在年老时才可能有血栓形成的发生。纯合子状态的 APC 抵抗以及同时伴有两种遗传性抗凝物质缺陷的病例其血栓形成危险性很高。对 APC 抵抗个体的临床处理, Dahlback 等提出了以下几点:(1) 无个体或家族性静脉血栓形成史或无其它抗凝成分的遗传缺陷的杂合子个体,只有在已知可触发血栓形成的情况下(如外科手术)才给予预防性抗凝治疗。(2) 有静脉血栓形成史的杂合子个体应象 PC, PS 或 AT-III 缺陷的患者那样处理,在特定情况下要给予预防性抗凝治疗;血栓反复发作时要考虑长期抗凝疗法。(3) 纯合子个体或杂合子伴有另一种抗凝成分的缺陷,即使既往无血栓形成史,应大胆给予预防性治疗;血栓形成发生后应延长抗凝治疗;在决定治疗方案前,应考虑到与这种病人有关的其它一些促血栓形成因素^[1]。

参 考 文 献

- 1 Esmon C T. Regulation of coagulation: the nature of the problem. In: Advances in Applied Biotechnology Series(Vol.11), Protein C and related anticoagulants. Bruley D.F., and Droham W.N., eds. Portfolio Pub. Co. USA. 1990: 3
- 2 金坚. 蛋白 C 系统抗凝血机理的研究. 博士论文. 苏州医学院, 1996

- 3 周泉生. 血栓调节素单克隆抗体的制备及应用技术: 博士论文. 苏州医学院, 1991
- 4 吴庆宇, 潘峻亮. 内皮细胞调节血栓与止血的功能, 阮长耿主编. 血栓与止血——现代理论和临床实践. 南京: 江苏科技出版社, 1994: 3
- 5 Dahlback B, Carlsson M, Svensson P T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993, 90: 1004
- 6 周泉生, 阮长耿. 中华血液学杂志, 1991, 12: 600
- 7 赵益民, 金坚, 何杨 等. 细胞与分子免疫学杂志, 1998, 14: 209
- 8 邵慧珍. 抗凝物质检测, 王鸿利, 包承鑫, 阮长耿, 宋善俊, 邵慧珍主编. 血栓与止血检验技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 99
- 9 金坚, 何杨, 白霞 等. 标记免疫分析与临床, 1997, 4: 221
- 10 王博诚, 金坚. 中华核医学杂志, 1986, 6: 150
- 11 金坚, 罗世能, 王博诚 等. 发光学报, 1995, 16: 88
- 12 王博诚, 李金泉, 金坚 等. 中华核医学杂志, 1995, 15: 239
- 13 何杨, 金坚. 标记免疫分析与临床, 1998, 5: 38
- 14 金坚, 阮长耿, 张满达. 中国核科技报告, CINC-01179, SMC-0136, 1997
- 15 徐新来. 实验室设施条件、培养用液, 鄂征主编. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 63
- 16 Jaffe E A. J. Clin. Invest., 1973, 52: 2745
- 17 倪灿荣. 免疫荧光组织化学技术, 倪灿荣主编. 免疫组织化学实验新技术及应用. 北京: 北京科学技术出版社, 1993. 65
- 18 Cripe L D, Moore K D, Kane W H. Biochemistry, 1992, 31: 3777
- 19 金坚, 王博诚, 方平 等. Eur. J. Nucl. Med., 1998, 25: 877
- 20 张满达, 金坚, 唐小雷 等. 中华核医学杂志, 1994, 14: 15
- 21 王博诚, 金坚, 张满达. 生物化学杂志, 1994, 10: 687
- 22 金坚, 张满达, 王博诚 等. 中华核医学杂志, 1993, 13: 167
- 23 王博诚, 李金泉, 金坚 等. 生物化学杂志, 1993, 9: 204
- 24 Dahlback B. J. Clin. Invest., 1994, 94: 923
- 25 Rand M D, Kalafatis M, Mann K G. Blood, 1994, 83: 2180
- 26 Bangalore N, Drohan W N, Orthner C L. Thromb. Haemost, 1994, 72: 465
- 27 Whinna H C, Church F C. J. Protein. Chem., 1993, 12: 677
- 28 Heeb M J, Espana F, Gurber A, et al. Reaction of activated protein C with plasma serine proteinase inhibitors. In: Advances in Applied Biotechnology Series(Vol. 11), Protein C and related anticoagulants. Bruley D.F., and Drohan W.N., eds. Portfolio Pub. Co. USA. 1990. 145
- 29 Pratt C W, Church F C. Blood Coagul Fibrinolysis, 1993, 4: 479
- 30 Dittman W A, Majerius P W. Blood, 1990, 75: 329
- 31 Rosendaal F R, Koster R, Vandeubroucke J P, et al. Blood, 1995, 85: 1504
- 32 Kalafatis M, Rand M D, Mann K G. J. Biol. Chem., 1994, 269: 31869
- 33 何杨, 金坚. 中华血液学杂志, 1996, 17: 490
- 34 何杨, 金坚, 赵益民 等. 苏州医学院学报, 1998, 18: 788

图书在版编目 (CIP) 数据

中国核科技报告 CNIC-01412, NLNM-0001: 蛋白 C 系统功能调节及致血栓形成因素的研究/金坚等著. —北京: 原子能出版社, 1999. 11

ISBN 7-5022-2102-6

I. 中... II. 金... III. 核技术-研究报告-中国 IV. TL-2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 53998 号

原子能出版社出版 发行

责任编辑: 孙凤春

社址: 北京市海淀区阜成路 43 号 邮政编码: 100037

中国核科技报告编辑部排版

核科学技术情报研究所印刷

开本 787×1092 mm 1/16 印张 3/2 字数 21 千字

1999年 12 月北京第一版 1999年 12 月北京第一次印刷

印数: 1—150

定价: 5.00 元

CHINA NUCLEAR SCIENCE & TECHNOLOGY REPORT

This report is subject to copyright. All rights are reserved. Submission of a report for publication implies the transfer of the exclusive publication right from the author(s) to the publisher. No part of this publication, except abstract, may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the publisher, China Nuclear Information Centre, and/or Atomic Energy Press. Violations fall under the prosecution act of the Copyright Law of China. The China Nuclear Information Centre and Atomic Energy Press do not accept any responsibility for loss or damage arising from the use of information contained in any of its reports or in any communication about its test or investigations.

ISBN 7-5022-2102-6



9 787502 221027 >