DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2019.09.07

· 临床实验研究 ·

血栓分子标志物对下肢深静脉血栓形成的诊断及抗凝疗效的评价*

文梦[1],赵慧茹[1],赵育婧[1],曹辉[1],陈玉莹[2],章文洁[2],曹翔宇[2],吴俊[1](1.北京积水潭医院检验科,北京 100035;2.北京大学医学院第四临床医院,北京 100035)

摘要:目的　观察下肢深静脉血栓患者血栓分子标志物的变化,分析其对静脉血栓形成诊断及疗效评估的价值。**方法**　选取 2018 年 12 月至 2019 年 5 月北京积水潭医院创伤骨科下肢骨折术后深静脉血栓形成(DVT)患者 64 例为 DVT 组,未诊断为 DVT 患者 39 例为非 DVT 组;同期体检健康者 28 例为健康人对照组。采集静脉血并检测初诊时及利伐沙班抗凝治疗 1 个月后血栓分子标志物,即凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、纤溶酶-α_2纤溶酶抑制剂复合物(PIC)、组织型纤溶酶原激活物-纤溶酶原激活物抑制剂复合物(t-PAIC)及可溶性血栓调节蛋白(sTM),并进行统计学分析。**结果**　DVT 组血浆 TAT、PIC、t-PAIC、sTM 水平均高于非 DVT 组(P 均<0.05),DVT 组血浆 TAT、PIC、t-PAIC 水平均高于健康人对照组(P 均<0.05),DVT 组血浆 sTM 水平与健康人对照组差异无统计学意义(P>0.05)。TAT、PIC、t-PAIC 诊断 DVT 的 ROC 曲线下面积分别为 0.997、0.980、0.758,约登指数最大时取 cut-off 值,cut-off 值分别为 2.45 ng/mL、0.715 μg/mL、0.758 ng/mL;根据测定值>cut-off 值为阳性,测定值<cut-off 值为阴性,抗凝治疗 1 个月前后患者组 TAT、PIC、t-PAIC 水平及阳性率差异均有统计学意义(P 均<0.05)。**结论**　血栓分子标志物 TAT、PIC、t-PAIC 能有效发现下肢 DVT,同时对评估 DVT 患者抗凝疗效有意义。

关键词:下肢深静脉血栓;凝血酶-抗凝血酶复合物;纤溶酶-α_2抗纤溶酶抑制剂复合物;组织型纤溶酶原激活物-纤溶酶原激活物抑制剂复合物;血栓调节蛋白;疗效监测

中图分类号:R446　　**文献标志码**:A

A evaluation of coagulation biomarkers for diagnosis and therapeutic monitoring of deep venous thrombosis of lower extremities

WEN Meng[1], *ZHAO Huiru*[1], *ZHAO Yujing*[1], *CAO hui*[1], *CHEN Yuying*[2], *ZHANG Wenjie*[2], *CAO Xiangyu*[2], *WU Jun*[1](1.*Department of Laboratory Medicine*, *Beijing Jishuitan Hospital*, *Beijing* 100035; 2.*The 4th Affiliated Hospital of Peking University*, *Beijing* 100035, *China*)

Abstracts: Objective　To evaluate the changes of molecular markers of thrombosis in patients with deep venous thrombosis of lower extremities and analyze their value in the detection of venous thrombosis and evaluate the therapeutic effects. **Methods**　In case-control study, we selected traumatic patients after surgery from Beijing Jishuitan Hospital during December 2018 to May 2019. A total of 64 patients with thrombosis were in DVT group, 39 patients without thrombosis were in non-DVT group, and 28 healthy subjects in the same period were in healthy control group. Venous blood samples were taken from all these people. Coagulation parameters thrombin-antithrombin complexes (TAT), plasmin-α_2-plasmin inhibitor complexes (PIC) and tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes (t-PAIC) were detected at first diagnosis and one month after rivaroxaban anticoagulation therapy beginning. The differences of the markers between these groups were compared. **Results**　The coagulation markers of the patients with lower extremity deep venous thrombosis increased significantly at diagnosis. The levels of plasma TAT, PIC, t-PAIC and sTM in DVT group were significantly higher than those in non-DVT group (P<0.05). The levels of plasma TAT, PIC and t-PAIC in DVT group were higher than those in healthy control group (P<0.05). There was no significant difference in sTM level between DVT group and healthy control group (P>0.05). The results and changes of TAT, PIC, t-PAIC in the patients before and after one month of anticoagulation therapy were statistically different (P<0.05) in comparison. **Conclusion**　The molecular markers of thrombosis, TAT, PIC and t-PAIC, could effectively detect deep venous thrombosis of lower extremities and showed significant efficacy in evaluating the efficacy of anticoagulation therapy.

Key words: deep vein thrombosis; thrombin-antithrombin complexes; plasmin-α_2-plasmin inhibitor complexes; tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes; thrombomodulin; efficacy monitor

* **基金项目**:北京市卫生系统第五批 215 高层次人才培养计划(编号:2015-3-034);人社部留学人员科技活动项目([2015]192)。

作者简介:文梦,1988 年生,女,技师,大学本科,从事血栓与止血方向研究。

通信作者:吴俊,主任医师,博士,硕士研究生导师,E-mail:wujunpostbox@sina.com。

深静脉血栓形成(deep vein thrombosis, DVT)与肺栓塞(pulmonary embolism, PE)统称为静脉血栓栓塞症(venous thromboembolism, VTE),现今已是除缺血性心脏病、脑卒中以外死亡率全球排名第三的心血管疾病,严重威胁患者生命安全及影响患者生活质量[1]。欧美人口 VTE 的年发病率为 0.7‰~1.4‰,且随着年龄增长继续升高,在平均年龄 70 岁时可达 2‰~7‰,虽然亚洲人群的 VTE 患病率相比较低,但随着人口的老龄化,VTE 仍然是不可忽视的疾病[2]。大多数静脉血栓患者发病时没有症状,仅约 1/10 的患者可出现非特异性体征和症状,目前 VTE 的诊断主要依靠 Wells 评分联合影像学检查及 D 二聚体。

利伐沙班是应用最为广泛的直接口服抗凝药,而其对血栓分子标志物水平的影响鲜见报道。本研究用化学发光酶免疫法检测血栓分子标志物,包括反映凝血酶生成的凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complexs, TAT),代表纤溶活性的纤溶酶-α_2纤溶酶抑制剂复合物(plasmin-α_2-plasmin inhibitor complex, PIC)、组织型纤溶酶原激活物-纤溶酶原激活抑制剂复合物(tissue-type plasminogen activator-plasminogen activated inhibitor complex, t-PAIC)以及监测内皮细胞损伤的可溶性血栓调节蛋白(souluble thrombomodulin, sTM),观察上述指标在下肢深静脉血栓患者疾病发现及抗凝疗效监测的效果。

1　对象与方法

1.1　研究对象　选择 2018 年 12 月至 2019 年 5 月于北京积水潭医院创伤骨科行下肢骨折内固定手术后常规每日 1 次使用低分子肝素 5 000 IU 抗凝治疗 4~14 d、术后伴发静脉血栓且经血管外科下肢静脉彩超确诊为 DVT 的患者 64 例作为 DVT 组,其中男 24 例,女 40 例,年龄 26~87 岁,平均 59.6 岁。对其中出院后服用利伐沙班(每日 1 次 20 mg)的 50 例患者抗凝治疗后 1 个月内的临床资料进行回顾性队列观察,随访期内无 DVT 复发和出血,无死亡病例,同时再次检测血栓标志物。

选择同期创伤骨科行下肢骨折内固定手术且术后未发生 DVT 的患者 39 例作为非 DVT 组,其中男 22 例,女 17 例,年龄 20~84 岁,平均 54.9 岁。选择体检健康者 28 例作为健康人对照组,其中男 12 例,女 16 例,年龄 26~75 岁,平均 53.6 岁。

上述研究对象均排除肿瘤、心肌梗死、脑梗死、房颤、妊娠、入组时正在口服抗凝药物者。DVT 组、非 DVT 组和健康人对照组性别构成比、年龄差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2　标本采集与检测　DVT 组患者确诊 DVT 后于清晨空腹采集静脉血 2.7 mL,非 DVT 组患者于术后 3~4 d 采集清晨空腹静脉血 2.7 mL,0.105 mol/L 枸橼酸钠抗凝,1 500×g 离心 10 min 分离血浆,于-80 ℃冻存。血浆样品复溶后用 HISCL-5000 化学发光仪及其配套 TAT、PIC、t-PAIC、sTM 化学发光试剂以化学发光酶免疫法检测 TAT、PIC、t-PAIC、sTM。严格按照试剂盒说明书操作,并在分析前用校准品及质控品(Sysmex 公司)对项目进行定标和质控。

1.3　统计学方法　用 SPSS 19.0 统计软件进行。偏态分布的计量资料用[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,多组之间比较用 Kruskal-Wallis H 检验,组间两两比较用 Kruskal-Wallis H one-way ANOVA(K samples)检验,配对样本的比较用 Wilcoxon 符号秩检验;计数资料的比较用χ^2 检验;$P<0.05$ 为差异有统计学意义。用 ROC 曲线评价血栓标志物的诊断性能。

2　结果

2.1　血栓分子标志物结果的比较　DVT 组、非 DVT 组、健康人对照组血浆血栓分子标志物水平见表 1。DVT 组血浆 TAT、PIC、t-PAIC 水平均高于健康人对照组,差异均有统计学意义(P 均<0.05),血浆 sTM 水平与健康人对照组差异无统计学意义(P>0.05);DVT 组血浆 TAT、PIC、t-PAIC、sTM 水平均高于非 DVT 组,差异均有统计学意义(P 均<0.05)。

表 1　DVT 组、非 DVT 组、健康人对照组血栓分子标志物结果的比较

分组	n	TAT(ng/mL)	PIC(μg/mL)	t-PAIC(ng/mL)	sTM(TU/mL)
DVT 组	64	8.30(5.13,12.10)	1.64(1.08,2.08)	9.05(6.85,11.85)	9.15(7.90,10.75)
非 DVT 组	39	4.40(3.00,9.30)*	0.75(0.55,1.05)*	7.00(5.30,8.30)*	7.50(6.20,8.80)*
健康人对照组	28	0.95(0.63,1.10)*#	0.46(0.36,0.55)*#	6.50(3.60,8.05)*	8.30(7.15,10.00)

注:*,与 DVT 组比较,P<0.05;#,与非 DVT 组比较,P<0.05。

2.2　血栓分子标志物诊断 DVT 的 ROC 曲线　根据健康人对照组和 DVT 组绘制血栓分子标志物诊断 DVT 的 ROC 曲线,见图 1。约登指数最大时取 cut-off值,结果见表 2。

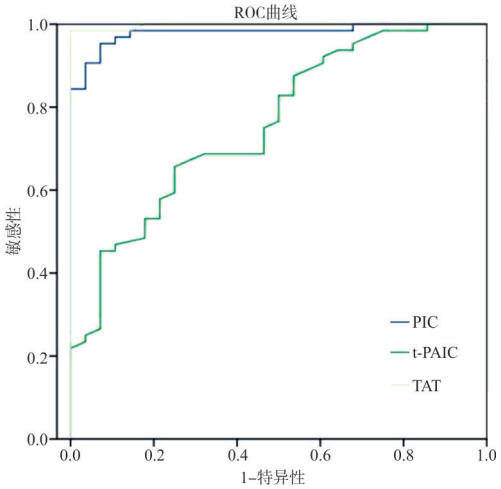

图 1　DVT 患者血栓分子标志物 ROC 曲线

表 2　血栓分子标志物的 ROC 曲线

项目	ROC 曲线下面积	cut-off 值	敏感性(%)	特异性(%)
PIC(μg/mL)	0.980	0.715	95.30	92.90
t-PAIC(ng/mL)	0.758	7.95	65.60	75
TAT(ng/mL)	0.997	2.45	98.40	100

2.3　DVT 组治疗前后血栓分子标志物比较　根据 cut-off 值将 DVT 患者服用利伐沙班抗凝治疗 1 个月前后 TAT、PIC、t-PAIC 转化为计数资料，测定值>cut-off 值为阳性，反之为阴性。TAT、PIC、t-PAIC 水平及阳性率见表 3，治疗前后 TAT、PIC、t-PAIC 水平及阳性率差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 3　DVT 患者服用利伐沙班抗凝治疗 1 个月前后血栓分子标志物水平及阳性率($n=50$)

时间	TAT		PIC		t-PAIC	
	浓度(ng/mL)	阳性率(%)	浓度(μg/mL)	阳性率(%)	浓度(ng/mL)	阳性率(%)
治疗前	8.20(5.15,1.35)	100	1.54(1.04,2.00)	94	9.10(6.85,11.80)	64
治疗后	1.30(0.90,2.00)	18	0.62(0.44,0.77)	36	6.9(5.50,8.35)	32
Z/χ^2	−6.093	138.983	−6.126	73.934	−4.600	20.513

3　讨论

静脉造影是 DVT 诊断的金标准，但有创且费用高。彩超可有效发现 DVT，但相对于静脉造影，仍存在假阴性结果，同时对血栓治疗疗效的监测不敏感。D 二聚体水平可以排除 DVT，但特异性较低，有些疾病如肿瘤、炎症、感染等 D 二聚体常增高[3]，故不能仅凭单一 D 二聚体水平增高而诊断 DVT。

本研究将创伤骨科术后患者分为 DVT 组和非 DVT 组，观察发现无论是 DVT 组还是非 DVT 组患者血浆 TAT、PIC 水平均高于健康人对照组(P 均<0.05)，表明创伤手术能激活体内凝血系统，即使术后使用低分子肝素进行预防性抗凝，凝血酶水平仍然升高。凝血酶是凝血过程中的关键酶，可以激活血小板及凝血因子促进血液凝固。生理情况下，体内凝血酶水平极低，凝血酶产生后很快与抗凝血酶共价结合，生成 TAT，故 TAT 含量可代表凝血酶的多少。TAT 水平升高表明凝血系统活化，机体可能处于高凝状态，血栓形成风险升高。

纤溶活化往往随着凝血系统的激活发生，纤维蛋白激活组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator，t-PA)，进而激活纤溶酶，纤溶酶在血中降解纤维蛋白形成 D 二聚体，而游离的纤溶酶与 α_2 纤溶酶抑制剂结合形成 PIC。术后患者 PIC 水平抑制剂升高，表明纤溶系统激活。活化的 t-PA 被纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor，PAI)抑制，形成 t-PAIC。DVT 组 PIC 及 t-PAIC水平高于非 DVT 组($P<0.05$)，表明 PIC 及 t-PAIC升高与血栓生成有关。孟英等[4]报道，在骨科手术后 t-PAIC 和 PIC 的诊断率(血栓患者阳性率)分别为 46.3%和 35.8%，远高于 D 二聚体的诊断率 25.9%，与本研究的结果相符，说明两者在血栓诊断上有意义。

血栓调节蛋白(TM)主要由血管内皮细胞生成，约 99%以上的血管内皮细胞表达 TM，辅助凝血酶激活蛋白 C 系统产生抗凝效果。TM 释放入血成为 sTM，sTM 是炎症反应或血管内皮细胞受损的重要标志蛋白[5]。本研究中术后 DVT 组 sTM 水平高于非 DVT 组($P<0.05$)，表明创伤骨科手术患者内皮细胞损伤在血栓生成中发挥了作用，内皮的损伤常伴随着凝血状态的异常，这符合 Virkow 三要素对血栓形成高风险因素的阐述。近年来 sTM 在对判断凝血状态上的意义也逐渐被认识[6-7]。

初诊时 DVT 组 TAT、PIC、t-PAIC 高于健康人对照组($P<0.05$)。ROC 曲线分析结果表明 TAT、PIC 和 t-PAIC 诊断 DVT 的 ROC 曲线下面积较大($AUC^{ROC}=0.997$、0.980、0.758)，均具有诊断血栓形成的价值。尤其是 TAT 和 PIC 敏感性及特异性均较高，可作为 DVT 诊断的良好指标。而 DVT 组与健康人对照组血浆 sTM 水平差异无统计学意义($P>0.05$)，提示在下肢深静脉血栓患者中，血管内皮损伤可能并不是导致血栓形成的主要因素。

利伐沙班是一种直接作用于凝血因子Ⅹa 的口服抗凝药,通过可逆性结合于Ⅹ因子的活性位点抑制凝血酶激活。近年来,国内外相关研究已经证明利伐沙班治疗效果优于华法林[8]。利伐沙班抗Ⅹa 活性测定可用于监测药物浓度,但并不能够代表治疗效果。TAT 测定的是血液中凝血酶生成的含量,可直接表示药物对凝血酶生成的抑制效果。本研究中 50 例(100%)患者治疗前 TAT 水平高于 cut-off 值,呈阳性,口服利伐沙班抗凝 1 个月后仅有 9 例(18%)患者 TAT 水平仍为阳性,41 例(88%)转为阴性,证明治疗有效($P<0.05$)。而治疗后 PIC、t-PAIC水平及阳性率均较治疗前降低,表明 PIC、t-PAIC亦能反映凝血状态的改善,可用来监测疗效。

4　参考文献

[1] ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to global disease burden[J]. Thromb Res, 2014, 134(5): 931-938.

[2] Corrigendum to: Diagnosis and management of acute deep vein thrombosis: a joint consensus document from the european society of cardiology working groups of aorta and peripheral circulation and pulmonary circulation and right ventricular function[J]. Eur Heart J, 2018, 39(15): 1316.

[3] 彭丁,习昕,刘双.D-二聚体检测在静脉血栓栓塞症诊断中应用的新进展[J].心肺血管病杂志,2015,34(5):422-424.

[4] 孟英,刘宁,薛冰蓉,等.应用凝血标志物诊断创伤骨科术后静脉血栓形成的病例对照研究[J].中华检验医学杂志,2016,39(10):751-755.

[5] Hughes SF, Hendricks BD, Edwards DR, *et al*. Total hip and knee replacement surgery results in changes in leukocyte and endothelial markers[J]. J Inflamm (Lond), 2010, 7: 2.

[6] 马进,夏海平,马瑞.急性脑梗死患者血浆内皮损伤标志物的变化及其临床意义[J].中国老年学杂志,2016,36(23):5851-5853.

[7] Ohlin AK, Larsson K, Hansson M. Soluble thrombomodulin activity and soluble thrombomodulin antigen in plasma[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(5): 976-982.

[8] 冯涛,邓志华,胡永毅,等.利伐沙班与华法林在治疗深静脉血栓形成患者中的疗效对比[J].血栓与止血学,2019,25(1):38-40,44.

(收稿日期:2019-07-02)
(本文编辑:王海燕)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

临床检验杂志开设稿件处理“快速通道”

为满足具有重大发现的论文、基金资助论文、研究生论文等需要加快处理的要求,本刊特设“快速通道”,对符合要求的论文采用快速审稿流程,在收稿 2 个月内将论文审稿结果(发表或修改后发表、按普通稿件处理、退稿)告知作者,一般在收稿后 6 个月内(需修改者在收到修改稿后 3 个月左右)予以刊登。“快速通道”论文投稿要求:(1)具有重大发现的论文、基金资助论文、研究生论文等需要加快处理的论文,可以进入“快速通道”处理;(2)提供说明论文需通过“快速通道”发表理由的书面申请,同时提供有资质的查新机构出具的“查新报告”;(3)论文应符合本刊《投稿须知》的要求,并附至少 1 位具高级职称的同行专家推荐意见;(4)作者可推荐 1~2 名审稿专家(需注明其详细联系方式,包括 E-mail)供编辑部参考。(5)提供作者的通讯地址、电话、手机、传真、E-mail 等联系方式。进入“快速通道”的稿件,需交纳审稿费每篇 200 元。汇款至南京市中央路 42 号临床检验杂志编辑部,附言中请务必注明“快速通道审稿费”。

《临床检验杂志》编辑部