

论 著

(重症凝血专题)

应用血栓弹力图评价乌司他丁的体外抗凝作用

宋景春, 胡 炜, 杨 洋, 林青伟, 曾庆波, 邓星平

【摘要】 目的 应用血栓弹力图仪评价不同剂量乌司他丁的体外抗凝作用。 **方法** 招募健康志愿者 20 名, 男 10 名, 女 10 名, 从肘静脉采集静脉血 4 mL, 按乌司他丁剂量设置空白对照组、低剂量组 (1000 IU/mL)、中剂量组 (2000 IU/mL) 和高剂量组 (4000 mL/IU), 同时检测血栓弹力图, 并对 R 值、K 值、 α 角、最大振幅 (MA) 和综合凝血指数 (CI) 参数进行统计学分析。 **结果** 与对照组比较, 低、中、高剂量组的 R 值和 K 值均显著延长 ($P < 0.05$), α 角、MA 和 CI 均显著降低 ($P < 0.05$)。与低剂量组比较, 中剂量组和高剂量组的 R 值均显著延长 ($P < 0.05$), MA 和 CI 均显著降低 ($P < 0.05$)。针对健康男性, 对照组与低剂量组在各项指标上均差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与对照组与低剂量组比较, 中剂量组和高剂量组的 R 值和 K 值均显著延长 ($P < 0.05$), MA 和 CI 均显著降低 ($P < 0.05$)。针对健康女性, 与对照组比较, 低、中、高剂量的 R 值和 K 值均显著延长 ($P < 0.05$), α 角、MA 和 CI 均显著降低 ($P < 0.05$), 但低、中、高剂量组间的 R 值、K 值、 α 角、MA 和 CI 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 **结论** 乌司他丁在体外能够明显抑制凝血因子活性、降低纤维蛋白原及血小板功能, 促使机体形成低凝状态。这种体外抗凝作用与剂量和性别显著相关。

【关键词】 乌司他丁; 血栓弹力图; 凝血; 体外; 性别

【中图分类号】 R973.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2018)05-0480-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.05.007

Effects of ulinastatin on coagulation *in vitro* in Chinese healthy volunteers

SONG Jing-chun, HU Wei, YANG Yang, LIN Qing-wei, ZENG Qing-bo, DENG Xing-ping

(Intensive Care Unit, the 94th Hospital of PLA, Nanchang 330002, Jiangxi, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the anticoagulant effect of different doses of ulinastatin (UTI) *in vitro* by using thromboelastography (TEG). **Methods** Twenty healthy volunteers were enrolled, female and male in half. The blood samples 4mL were drew from the elbow vein and analyzed simultaneously by TEG. The control group (CG), low-dose group (1000 IU/mL, LUG), middle-dose group (2000 IU/mL, MUG) and high dose group (4000 IU/mL, HUG) were set up according to the dose of UTI. The value of R, K, α angle, MA and CI were analyzed statistically. **Results** Compared with CG, the R and K values of LUG, MUG and HUG were significantly prolonged ($P < 0.05$), α , MA and CI were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with LUG, the R values of MUG and HUG were significantly prolonged ($P < 0.05$), MA and CI values were significantly decreased ($P < 0.05$). For male group, there was no significant difference between mCG and mLUG in TEG ($P > 0.05$). Compared with mCG and mLUG, the R and K value of mMUG and mHUG were significantly prolonged ($P < 0.05$), α , MA and CI significantly were decreased ($P < 0.05$). For female group, compared with fCG, the R and K value of fLUG, fMUG and fHUG were significantly prolonged ($P < 0.05$), α , MA and CI were significantly decreased ($P < 0.05$), but there was no statistical difference in R value, K value, α angle, MA and CI between the fMUG, fLUG and the fHUG ($P > 0.05$). **Conclusion** Ulinastatin can significantly inhibit the activity of coagulation factor, reduce the function of fibrinogen and platelet, and thus convey anticoagulant effect *in vitro*, which is associated with dose and gender.

【Key words】 ulinastatin; thromboelastography; coagulation; *vitro*; gender

作者单位: 330002 南昌, 解放军第九四医院重症医学科 (宋景春、
胡 炜、杨 洋、林青伟、曾庆波、邓星平)

0 前 言

乌司他丁(ulinastatin, UTI)是从健康男性尿液中提取的酸性糖蛋白,由 143 个氨基酸组成,相对分子质量约 67 000,属蛋白酶抑制剂^[1]。乌司他丁对胰蛋白酶、 α -糜蛋白酶、透明质酸酶、巯基酶、纤溶酶等多种酶具有良好的抑制作用,并能减少中性粒细胞弹性蛋白酶的释放,稳定溶酶体膜并抑制溶酶体酶的释放^[2-3]。药品说明书限定乌司他丁主要用于治疗急性胰腺炎和急性循环衰竭的抢救,推荐剂量为每次 10 万 IU 静脉注射,1 天 3 次^[4]。另有研究报道乌司他丁具有很强的抗炎作用,并在脓毒症、感染性疾病、肾病、体外循环和肿瘤等疾病领域也有良好的疗效,使用剂量上甚至有使用每日 1000 万 IU 持续静脉注射的报道,但这种超适应证和超剂量的使用方法,迄今仍缺乏有力的实验证据^[5-8]。究其原因,难以广泛开展超适应证、超剂量使用乌司他丁进行高质量的临床研究至关重要。

血栓弹力图仪(thromboelastography, TEG)是针对全血标本的凝血检测设备,能够在体外通过测定血栓形成速度、强度和溶解过程,真实而全面地反映凝血功能状态^[9-10]。因此,本研究拟尝试通过血栓弹力图仪在体外评价超剂量乌司他丁对健康人群凝血状态的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择年龄 ≥ 18 岁的健康志愿者 20 名,年龄 22~38 岁,平均年龄(27.6 ± 5.04)岁。其中男 10 名,平均年龄(29.3 ± 6.2)岁;女 10 名,平均年龄(25.9 ± 2.96)岁。排除标准:具有遗传性凝血病或其他影响凝血功能的疾病,3 个月内有服药史。所有对象均空腹从肘静脉采血 4 mL,置于枸橼酸抗凝管中(枸橼酸血液比例为 1:9)。将 10 万单位乌司他丁溶于 1 mL 0.9%氯化钠注射液,配成 100 IU/ μ L 的乌司他丁溶液。将每名志愿者的 4 mL 静脉血分为 1 mL 血标本 4 份,根据乌司他丁的使用剂量设置空白对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组。其中空白对照组按说明书进行常规检测,低、中、高剂量组分别加入 10、20、40 μ L 乌

司他丁溶液至 1 mL 血标本中,低、中、高剂量组乌司他丁终浓度依次为 1000、2000、4000 IU/mL。根据性别设置亚组分析,分为男性空白对照组及低、中、高剂量组和女性空白对照组及低、中、高剂量组。本研究获得医院伦理委员会批准(批准号:LC2018005),所有志愿者均自愿参与本研究并签署知情同意书。

1.2 研究方法

1.2.1 仪器和试剂 血栓弹力图仪(西芬斯,北京乐普医疗科技)及配套试剂(包括高岭土试剂瓶、0.2 mol/L 氯化钙和普通杯等),乌司他丁(广东天普生化医药),0.9%氯化钠注射液。

1.2.2 血栓弹力图检测 按说明书操作步骤进行,所有血样本均在 40 min 内完成 TEG 监测。测试完毕后,记录血栓弹力图的主要参数,包括凝血反应时间(R)、血块形成速率(K)、血块形成动力学(α 角)、血块最大强度(MA)和凝血综合指数(CI)。R 时间反映参加凝血启动过程的凝血因子的综合作用,正常范围为 4~8 min。K 时间是从 R 时间终点到描记幅度达到 20 mm 所需的时间,反映血凝块形成的速率,代表纤维蛋白聚合并与血小板交互反应形成血块的过程,正常值为 1~4 min。 α 角是从血凝块形成点到描记图最大的曲线弧度处作切线与水平线的夹角,正常范围为 47°~74°。 α 角与 K 时间密切相关,影响因素均为纤维蛋白原和血小板。MA 反映血凝块的最大强度,主要受血小板和凝血因子 XⅢ的影响,正常值为 55~73 mm。CI 反映样本在各种条件下凝血的综合状态, < -3 为低凝, $> +3$ 为高凝。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计分析软件对数据进行统计分析。计量资料采用单样本 K-S 法进行正态分布检验,符合正态分布的数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布的数据采用中位数(四分位数间距)表示。进行多组间比较,非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis 法,通过方差齐性检验的数据采用单因素方差分析(one way ANOVA)最小显著性差异法(LSD 法),方差不齐的数据采用 one way ANOVA Tamhane's T2 法。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同剂量乌司他丁对健康人血栓弹力图参数的影响 与空白对照组比较,低剂量组、中剂量组和高剂量组 R 值和 K 值均显著延长 ($P<0.05$), α 角、MA 和 CI 均显著降低 ($P<0.05$)。与低剂量组比较,中剂量组 R 值和 K 值显著延长, α 角、MA 和 CI 均显著降低 ($P<0.05$)。同样与低剂量组比较,高剂量组的 R 值显著延长 ($P<0.05$), MA 和 CI 显著降低 ($P<0.05$), 中剂量组和高剂量组在各项指标上差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 不同剂量乌司他丁对健康男性血栓弹力图参数的影响 与男性空白对照组比较,男性低剂量组 R、K、 α 角、MA 和 CI 参数差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与男性空白对照组和男性低剂量组比较,男性中剂量组和高剂量组的 R 值和 K 值均显著延长 ($P<0.05$), α 角、MA 和 CI 均显著降低 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 不同剂量乌司他丁对健康女性血栓弹力图参数的影响 与女性空白对照组比较,女性低、中、高剂量组的 R 值和 K 值均明显延长 ($P<0.05$), α 角、MA 值和 CI 均显著降低 ($P<0.05$)。但女性低、中、

高剂量组各组间的 R 值、K 值、 α 角、MA 和 CI 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

3 讨 论

乌司他丁是一种尿胰蛋白酶抑制剂,有报道乌司他丁可改善脓毒症患者免疫、心脏及其他各脏器功能,临床上已用于抗急性组织损伤、减弱炎症损害等方面^[11-12]。近年来有相关文献报道乌司他丁对凝血系统也有一定的影响,如 Ge 等^[13]报道乌司他丁可以纠正血液的高凝状态,降低手术后下肢深静脉血栓 (DVT) 的发生率。Kim 等^[14]报道乌司他丁可能通过延长体外循环 (CPB) 后患者的凝血酶原时间 (PT) 和活化部分凝血活酶时间 (APTT), 从而影响凝血功能。临床上经实践大剂量乌司他丁治疗弥散性血管内凝血 (DIC) 有效^[8],但具体的机制并不清楚,也缺乏标准。TEG 是一种接近人体生理水平和内环境的检测方式,其通过微量的全血检测能对凝血因子、纤维蛋白原、血小板聚集功能以及纤维蛋白溶解等方面进行凝血全貌的检测和评估。本研究即采用 TEG 评价不同剂量乌司他丁的体外抗凝作用。

表 1 不同剂量乌司他丁对健康人血栓弹力图参数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	R (min)	K (min)	α 角 ($^{\circ}$)	MA (mm)	CI
空白对照组	7.97 \pm 1.74	2.20 (1.80, 3.08)	55.17 \pm 10.37	60.92 \pm 5.32	-2.27 \pm 2.58
低剂量组	10.27 \pm 1.72 *	3.60 (2.65, 3.88) *	48.38 \pm 9.29 *	56.01 \pm 5.54 *	-5.23 \pm 2.28 *
中剂量组	11.96 \pm 2.61 **	4.90 (3.43, 5.58) **	39.58 \pm 11.03 **	47.68 \pm 6.94 **	-8.56 \pm 3.49 **
高剂量组	12.66 \pm 2.42 **	3.75 (2.88, 5.15) *	44.84 \pm 10.33 *	50.10 \pm 7.95 **	-8.03 \pm 3.47 **

与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与低剂量组比较, # $P<0.05$

表 2 不同剂量乌司他丁对健康男性和女性血栓弹力图参数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	R (min)	K (min)	α 角 ($^{\circ}$)	MA (mm)	CI
男性					
空白对照组	9.22 \pm 1.31	2.98 \pm 0.84	47.71 \pm 8.49	58.93 \pm 5.19	-4.08 \pm 2.02
低剂量组	10.47 \pm 2.11	3.26 \pm 0.78	49.80 \pm 7.76	57.02 \pm 5.81	-5.08 \pm 2.39
中剂量组	13.25 \pm 2.58 **	5.64 \pm 1.26 **	33.42 \pm 8.29 **	45.01 \pm 3.28 **	-10.51 \pm 3.03 **
高剂量组	13.73 \pm 1.99 **	4.35 \pm 1.46 ** Δ	42.29 \pm 8.37 ** Δ	48.39 \pm 5.68 **	-9.26 \pm 2.68 **
女性					
空白对照组	6.71 \pm 1.09	1.99 \pm 0.44	62.63 \pm 5.59	62.90 \pm 4.92	-4.05 \pm 1.63
低剂量组	10.07 \pm 1.55 Δ	3.42 \pm 0.85 Δ	46.96 \pm 10.83 Δ	55.00 \pm 5.37 Δ	-5.37 \pm 2.29 Δ
中剂量组	10.66 \pm 2.00 Δ	3.99 \pm 1.86 Δ	45.73 \pm 10.20 Δ	50.35 \pm 8.66 Δ	-6.60 \pm 2.83 Δ
高剂量组	11.59 \pm 2.42 Δ	3.73 \pm 1.42 Δ	47.39 \pm 11.87 Δ	51.81 \pm 9.73 Δ	-6.80 \pm 3.85 Δ

与男性空白对照组比较, * $P<0.05$; 与男性低剂量组比较, # $P<0.05$; 与男性中剂量组比较, Δ $P<0.05$; 与女性空白对照组比较, Δ $P<0.05$

凝血因子、血小板和纤维蛋白原在止血和血栓形成过程中各自扮演着重要角色。血小板是一期止血的基础,为凝血系统活化及凝血酶的最终形成提供磷脂表面,并且活化血小板可释放多种促凝物质;纤维蛋白原是纤维蛋白的前体,作为凝血因子 I 直接参与凝血过程,其被凝血酶裂解后形成的纤维蛋白单体,是血栓的重要成分,同时纤维蛋白原是参与血小板聚集的重要辅助因子,在激活的血小板之间作为桥梁与血小板膜上的糖蛋白受体(Gp II b/III a)结合,从而促进血小板聚集和血栓形成^[15]。本研究结果显示,与对照组比较,低剂量、中剂量、高剂量组的 R 值和 K 值均显著延长, α 角、MA 和 CI 均显著降低,说明乌司他丁能改变血块的动力学,通过抑制凝血因子活性、降低纤维蛋白原和血小板功能方面产生低凝效应。中剂量和高剂量组的 R 值较低剂量组延长,MA 和 CI 降低,提示随剂量的增加,乌司他丁对凝血因子活性和血小板功能抑制作用增强。

凝血因子多是丝氨酸蛋白酶,其活性部位均含有一个必不可少的丝氨酸残基。乌司他丁是丝氨酸蛋白酶抑制剂,能通过抑制凝血因子 V、VIII、XII 等的过度激活从而减少凝血因子的消耗。这是乌司他丁抗凝作用的机制之一。Pugia 等^[16]报道乌司他丁第二个 Kunitz 结构域能够影响凝血因子,尤其是 X 因子活性,同时还可以抑制血小板聚集。Nishiyama 等^[17]报道腹部手术前应用乌司他丁可以降低术后纤维蛋白降解产物(FDP)、纤溶酶-纤溶酶原抑制物复合物(PIC)和凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)水平,抗凝血酶(AT)下降的幅度也较未使用乌司他丁的患者要低。这些研究结果均与本研究的结论相符。

对于健康男性,与对照组比较,低剂量组的各参数无统计学意义;但中剂量组的 R 值与 K 值延长, α 角、MA 和 CI 均降低;高剂量组的 R 值显著延长,MA 和 CI 均显著降低, α 角无显著差异。这说明乌司他丁剂量增加到 2000 IU/mL 时,才对男性具有显著的抗凝作用。而对于健康女性,与对照组比较,低剂量、中剂量、高剂量组的 R 值和 K 值延长, α 角、MA 和 CI 降低,然而低剂量组、中剂量组与高剂量组之间各参数无统计学意义。这说明 1000 IU/mL 的

乌司他丁就对女性具有明显的抗凝作用,但随着剂量的增加,其抗凝作用并未增强。由此可见,乌司他丁剂量敏感性存在性别差异,该差异性可能与乌司他丁是从男性尿液提取的制作的因素有关。同时,这种差异性对临床上应用乌司他丁进行个体化治疗具有一定的指导意义。此外,如果按照人均 3000 mL 有效血容量计算,本研究采用的每毫升全血容纳 1000 U、2000 U 和 4000 U 的乌司他丁约相当于在体单次 300 万、600 万和 1200 万的乌司他丁剂量,如果考虑首过效应,可能达到本试验相应血药浓度的剂量更高。这也为临床专家经验性大剂量使用乌司他丁临床有效,提供了一定的临床证据。

综上所述,通过血栓弹力图我们观察到大剂量的乌司他丁有体外抗凝作用,这种抗凝作用体现在抑制凝血因子活性、降低纤维蛋白原及血小板功能,且与剂量与性别相关。在体内的抗凝效果如何,尚需要进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Liu DH, Yao YT, Li LH, *et al.* Effects of Ulinastatin on In Vitro Storage Lesions of Human Red Blood Cells[J]. *Clin Lab*, 2017, 63(4):833-838.
- [2] Pan Y, Fang H, Lu F, *et al.* Ulinastatin ameliorates tissue damage of severe acute pancreatitis through modulating regulatory T cells[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2017, 14:7.
- [3] Tao Z, Hu FQ, Li CF, *et al.* Effect of ulinastatin, a human urinary protease inhibitor, on heatstroke-induced apoptosis and inflammatory responses in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1):335-341.
- [4] Chen Q, Hu C, Liu Y, *et al.* Safety and tolerability of high-dose ulinastatin after 2-hour intravenous infusion in adult healthy Chinese volunteers: A randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0177425.
- [5] Wang LZ, Luo MY, Zhang JS, *et al.* Effect of ulinastatin on serum inflammatory factors in Asian patients with acute pancreatitis before and after treatment: a meta-analysis[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2016, 54(11):890-898.
- [6] Moggia E, Koti R, Belgaumkar AP, *et al.* Pharmacological interventions for acute pancreatitis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, 4:CD011384.
- [7] Han D, Shang W, Wang G, *et al.* Ulinastatin- and thymosin α 1-

- based immunomodulatory strategy for sepsis: a meta-analysis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 377-382.
- [8] 李银平.关于乌司他丁临床使用问题的研讨—重症医学专家客座纪要[J]. *中华危重病急救医学*, 2011, 23(11): 703-704.
- [9] Kim SY, Gu JY, Yoo HJ, *et al.* Benefits of thromboelastography and thrombin generation assay for bleeding prediction in patients with thrombocytopenia or hematologic malignancies[J]. *Ann Lab Med*, 2017, 37(6): 484-493.
- [10] Othman M, Kaur H. Thromboelastography (TEG)[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1646: 533-543.
- [11] 郑春雨, 张伟, 梁永刚. 热应激大鼠早期炎症因子水平及乌司他丁干预的效果[J]. *医学研究生学报*, 2011, 24(1): 25-28.
- [12] 杨洪光, 李峰, 游淑红, 等. 乌司他丁联合连续性血液滤过治疗多器官功能障碍综合征 53 例临床观察[J]. *东南国防医药*, 2008, 10(3): 189-191.
- [13] 葛叶盈, 成建庆, 席文娇, 等. 乌司他丁对髋关节置换患者围术期凝血功能和深静脉血栓形成的影响[J]. *中华外科杂志*, 2011, 49(9): 816-819.
- [14] Kim NY, Shim JK, Bang SO, *et al.* Effects of ulinastatin on coagulation in high-risk patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery[J]. *Korean J Anesthesiol*, 2013, 64(2): 105-111.
- [15] Hayward CPM. How I investigate for bleeding disorders[J]. *Int J Lab Hematol*, 2018, 40 (Suppl 1): 6-14.
- [16] Pugia MJ, Lott JA. Pathophysiology and diagnostic value of urinary trypsin inhibitors[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(1): 1-16.
- [17] Nishiyama T, Yokoyama T, Yamashita K. Effects of a protease inhibitor, ulinastatin, on coagulation and fibrinolysis in abdominal surgery[J]. *J Anesth*, 2006, 20(3): 179-182.

(收稿日期: 2018-06-11; 修回日期: 2018-08-20)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 吕锋烽)