

血友病

Haemophilia

名誉主编 王振义
主编 杨仁池 王鸿利
副主编 赵永强 王学锋
主审 李家增

上海科学技术出版社

血友病

名誉主编	王振义	
主 编	杨仁池	王鸿利
副主编	赵永强	王学锋
主 审	李家增	

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

血友病/杨仁池,王鸿利主编. —上海:上海科学技术出版社,2007.6

ISBN 978-7-5323-8881-3

I. 血... II. ①杨... ②王... III. 血友病—诊疗 IV. R554

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 033632 号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社

(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)

新华书店上海发行所经销

苏州望电印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 15

字数 300 千字

2007 年 6 月第 1 版 2007 年 6 月第 1 次印刷

定价 48.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内 容 提 要

本书是国内第一部血友病专著,由教育部重点学科点(内科学血液病)、实验血液学国家重点实验室和血友病中心协作网的专业人员共同编写,涉及临床医学各个专门学科及基础医学领域。全书共分6个部分,分别介绍正常止血机制和血友病的分子缺陷、血友病的临床表现、血友病的诊断与遗传咨询、血友病及其相关并发症的治疗、血友病的心理问题和护理,以及其他国家血友病防治经验及世界血友病联盟推荐的防治指南等。以此为血友病相关人员提供一个简单的平台,普及和推广血友病相关的专业知识,提高我国血友病防治的水平,建立适合我国国情的血友病防治模式。

本书读者对象主要为临床各级和各科医师、护理人员、检验技术人员、大专院校师生以及研究生等。

编写人员名单

名誉主编 王振义

主 编 杨仁池 王鸿利

副主编 赵永强 王学锋

主 审 李家增

编委(按姓氏笔画排列)

Man - Chiu Poon 王学锋 王鸿利 孙 竞 杨仁池 吴竞生 张心声
陈丽霞 赵永强

参与编写人员(按姓氏笔画排列)

Koon - Hung Luke Man - Chiu Poon 马伯霞 王 伟 王学锋
王晓燕 王鸿利 王婷婷 朱铁楠 华宝来 孙 竞 杨仁池 李 健
李泽辉 李洪强 吴竞生 张 磊 张洁夏 陈丽霞 周荣富 赵永强
蒋德席 廖应熙

前 言

血友病是由于凝血因子Ⅷ或Ⅸ缺乏所致的一种常见的遗传性出血性疾病,迄今尚无根治的方法。替代治疗(输注凝血因子浓缩物、新鲜冰冻血浆或冷沉淀)是目前本病唯一有效的治疗措施。由于经济等诸方面的原因,我国血友病的防治与发达国家相比差距很大,关节畸形等的发生率很高,严重影响患者的生活质量乃至寿命。

最近,在世界血友病联盟(WFH)资助下,由上海、北京、天津、广东、安徽和山东六家血友病治疗中心建立了协作网,希望能够建立适合我国国情的血友病防治模式。血友病患者作为一个独立个体,出血可发生于身体各个器官。对出血及有关并发症的处理涉及临床各个专业或学科。国内目前还没有全面系统介绍血友病防治的专著,在这种情况下我们组织教育部重点学科点(内科学血液病)、实验血液学国家重点实验室以及血友病中心协作网的专业人员编写此书,目的在于普及和推广血友病相关的专业知识,提高我国血友病防治的水平。

本书是国内第一部血友病专著,涉及临床医学各个专门学科以及基础医学领域。全书共分6个部分:第一章主要是血友病的历史回顾,同时对正常止血机制和血友病的分子缺陷进行了详细介绍;第二章主要介绍血友病的临床表现;第三章重点介绍血友病的临床诊断、实验室诊断、鉴别诊断、家系调查以及携带者检测和产前诊断;第四章全面系统地介绍了血友病及其相关并发症的治疗;第五章探讨了血友病的心理问题、护理及加拿大血友病防治经验;附录主要介绍其他国家血友病防治的经验以及WFH推荐的防治指南。

本书的特点:①全面、系统:对血友病的概念、病因、发病机制、诊断、鉴别诊断和治疗等方面进行了全面而系统的阐述。②新颖、实用:详细介绍了有关血友病防治的最新研究进展,为有关人员提供了实用的参考书。希望本书能为与血友病相关的各方面人员提供一个简单的平台,有助于正确诊断与合理处理。

本书是一本临床实用型专著,读者对象主要定位于临床各级和各科医师、护理人员、检验技术人员、大专院校师生以及研究生等。

本书的出版,得益于作者的长夜青灯,编辑的工笔匠心,以及诺和诺德血友病基金资助。在此,对他们及所有帮助过该书出版的人一并致以深切谢意。

由于我们才疏学浅,有关文献浩如烟海,且作者水平和风格各异,该书一定有不少难尽人意之处,望同道、读者不吝赐教。

编 者

2007年2月

目 录

第一章 概述	1
第一节 血友病的历史.....	1
第二节 正常止血机制.....	5
第三节 血友病的分子缺陷	20
第二章 临床表现	36
第一节 骨骼肌肉出血	36
第二节 皮肤及浅表黏膜出血	40
第三节 内脏出血	40
第四节 神经系统出血	42
第五节 血友病假肿瘤	45
第六节 血友病并发症	46
第三章 诊断与遗传咨询	48
第一节 临床诊断与家系调查	48
第二节 实验室诊断与评价	50
第三节 血友病携带者的检测与产前诊断	52
第四章 治疗	70
第一节 凝血因子浓缩物的制备	71
第二节 替代治疗	84
第三节 物理治疗	93
第四节 滑膜切除术.....	101
第五节 围手术期处理.....	107
第六节 口腔疾病的防治.....	109
第七节 非血友病患者的抑制物.....	113
第八节 基因治疗.....	123
第九节 输血相关并发症及其治疗.....	136
第十节 预防治疗.....	156
第五章 其他	161
第一节 血友病的心理问题.....	161

2—————血友病

第二节 血友病的护理·····	170
第三节 加拿大血友病防治经验·····	178
附录一 世界血友病联盟推荐的防治指南·····	194
附录二 世界血友病联盟及其对我国血友病防治的贡献·····	226
附录三 含有阿司匹林的药物清单·····	228

概 述

第一节 血友病的历史..... (1)	四、抗凝机制..... (17)
一、血友病的早期历史..... (1)	第三节 血友病的分子缺陷..... (20)
二、血友病的近况..... (4)	一、因子Ⅷ基因和因子Ⅸ基因..... (20)
三、我国传统医学中有关出血性疾病的描述..... (4)	二、FⅧ和FⅨ基因的多态性..... (23)
第二节 正常止血机制..... (5)	三、血友病A和B的家系分析..... (25)
一、参与凝血过程的因子..... (5)	四、血友病基因突变..... (26)
二、凝血过程及其调节..... (10)	五、血友病分子病理学..... (31)
三、参与机体抗凝的各种因子..... (14)	六、结语..... (34)

第一节 血友病的历史

一、血友病的早期历史

血友病的历史是与人类对于凝血机制的认识紧密相连的。很早人们已经认识到损伤后从流动的血液变成黏性凝固物质的改变。古希腊人已经记录了这一改变。他们发现当血凝块渐渐皱缩时,逐渐挤出黄色液体,现在称为血清。他们还观察到当血凝块在水中洗涤后,只剩下白色的致密纤维蛋白。19世纪以前,有关学者先后提出了4种假说来解释为何血液会凝固:冷却假说、静止假说、生命力(vital force)假说和空气假说。早在公元前,希腊医生 Hippocrates 和 Aristotle 就提到了血液凝固,他们均认为血液凝固与血液离开机体后冷却有关。1619年,英国医生 William Harvie 发现了血液循环,并且提出血液保持在运动状态可以抑制其发生凝固,而血液保持静止状态就会促进血液凝固。以 John Hunter 为首的一派则认为血液之所以凝固是因为血液失去了生命力。以 William Hewson 为首的则认为血液凝固与空气有关。

直到18世纪20年代早期,法国外科医生 Jean-Louis Petit 报道截肢后止血是由于血液在血管内形成了凝块,才首次将血液凝固与止血联系起来。1828年,Friedrich Hopff 发现在男性发生的家族性出血倾向与血液的显著低凝相关,因此提出血液凝固是防止出血必

需的。随着异常凝血及其与出血的关系的发现,有关血液凝固的研究也大大加快,John Hunter 和 William Hewson 发明了研究血液凝固的方法,从而否定了在他们之前的各种有关血液凝固的假说。1836年,Andrew Buchanan 报道在血液刚刚凝固的血清中具有凝血潜能,但这一报道未引起重视。直到 Alexander Schmidt 再次发现这一现象,才形成了血液凝固的化学基础的概念,从而也导致了参与血液凝固的各种成分的相继发现。首先是 Olof Hammarsten 发现了纤维蛋白原,紧接着 Cornelius Pekelharing 发现了凝血酶原,Maurice Arthus 发现了钙离子。1905年,Paul Morawitz 在上述发现的基础上提出了血液凝固的经典理论。在随后的40年中,对这一经典理论的争论不断,尽管其间先后发现了肝素、维生素K和双香豆素,有关血液凝固的概念并无进展。

在发现维生素K之前,临床上人们只认识两类出血性疾病:血小板减少性疾病和血友病。早在公元2世纪的巴比伦犹太法典里就有了关于血友病的记载。如果患者血小板不少,不论男女,均将其诊断为血友病。对于与上述两种疾病均不符合的,则归于“假血友病”。

当时已经了解组织液体能够启动凝血过程,血浆中的蛋白参与了这个过程,其中一种纤维蛋白原在另一种蛋白凝血酶的作用下转变为纤维蛋白。如果把钙离子去除,则凝血过程就发生障碍;如果钙离子重新放回,则血液恢复凝血过程。这是一个很关键的发现,今天用的凝血试验都依赖于这一发现。

1905年德国人 Paul Morawitz 发表了一篇有关凝血的论文,为现代理论和实践的发展提供了依据。至20世纪末发现了经钙离子及血液中一种叫做凝血酶原激酶的作用下,凝血酶原转变成凝血酶。凝血酶将纤维蛋白原转变为纤维蛋白。

这些反应是我们现在认识的凝血的终末阶段,自从 Morawitz 的论文发表后,凝血酶原激酶被认为由大量不同蛋白原组成,它们一起作用,激发最终纤维蛋白凝块的出现。

不同蛋白的发现以及它们如何一起发挥作用有赖于一些试验的引入,这些试验使得科学家们得以在实验室内通过分离抗凝物质以及对患有出血性疾患的患者的研究对凝血反应学说进行补充。在研究为何 Alberta 和 North Dakota 的牛会死于出血性疾病时,有人发现被牛食入的甜三叶草中所含的一种物质,叫做香豆素,这种物质被美国威斯康星州的 Link 及他的同事分离出来,从其中提取了第一种能够口服的抗凝剂。其中一种叫华法林(warfarin),最初用作鼠药(现在仍然是),但很快变为一种用来救治血栓性疾病患者的最广泛的药物。其名字由几个首写字母组成,“w”来自 Wisconsin,“a”来自 alumni,“r”来自 research,“f”取自 foundation,以及“arin”取自香豆素 coumarin。

双香豆素类并非用于人类的第一个抗凝剂。在美国由 Howell 进行的凝血研究中,一个学生叫 Jay McLean,试着分离出启动凝血途径的物质。已知这种物质存在于组织中,Jay McLean 试着从肝脏中发现它。然而在1916年,他发现了抗凝剂肝素,“hepar”即希腊语肝脏。肝素以多种方式发挥迅速而重要的作用,包括用于需要进行心脏手术或肾脏机器透析的患者的治疗。

在早期试验中用兔子大脑提供凝血酶原激酶添加到试验的混合物中,实际上,其他组织也能起到相同的作用。但这一点直到1943年奥斯陆的一位患者呈现一种出血性疾病才被知晓。她的医生冒着生命危险公然反抗德国纳粹占领挪威时的法令,骑车赴郊外去捕捉兔子。通过一系列精彩的试验,Owren 证实了他的患者得了一种以前不知的疾病。她并没有缺乏那时已知的4种因素——凝血酶原、纤维蛋白、钙离子及“组织液体”,导致疾病的原因便归咎于第五种因子,后来被命名为因子V。

在第二次世界大战期间所认识的凝血机制模式显然并不完善。所发现的 5 种因子没有一种能够解释血友病,没人解释用华法林抗凝的血液所做的各种试验之间的差别。导致差别的因素在 20 世纪 40 年代被发现,后来命名为因子 VII。第一个被发现有因子 VII 缺陷的患者是一位小女孩(1951 年)。就在第二次世界大战前,人们开始认识到血浆中凝血因子的缺乏导致血友病的事实。该因子被称为抗血友病球蛋白(AHG),后来被命名为因子 VIII。在 1952 年, Biggs 等在牛津, Aggeler 等在旧金山分别描述了 Christmas 病和血浆凝血活酶成分(PTC)缺乏症。Christmas 是牛津小组描述的其中一个患者的姓, PTC 则是新发现的所缺的凝血因子,因为在患者血浆中加入凝血活酶可以使延长的凝血时间纠正。

1954 年在巴黎举行的国际止血与血栓协会学术研讨会上正式将因子 VIII 缺乏命名为血友病 A, 因子 IX 缺乏命名为血友病 B(而不是 Christmas 病)。

20 世纪 50 年代发现了其他的因子,1961 年用罗马数字将它们编号。为了避免因不同国家不同科学家的命名而引起混淆,国际委员会引入了更为合理的命名方法。现在有 12 种因子在凝血的主要通路上,另外还有一些其他的因子在旁路上。它们如何相互起作用并最终导致纤维蛋白的形成仍需探索和实验。重要的是对它们的认识使科学家和医生能对每种缺陷导致的出血性疾病进行正确的治疗。

血友病的历史可能与人类的历史一样长久,但如果不是因为英国维多利亚女王的后裔(图 1-1-1),人类对该疾病就可能不会有如此深入的认识。由于因子 VIII 和 IX 缺陷以相同的方式遗传,因而在家族遗传史上差异不明显。直到今天我们也无法确定维多利亚女王的后裔患的是何种类型的血友病。随着 Waldemar 的死亡(1945 年),在困扰了部分欧洲王室近 100 年的生活,并改变了欧洲历史之后,血友病才最终在欧洲王室中消失。这也是为何欧洲非常重视血友病研究的原因之一。

维多利亚女王家谱

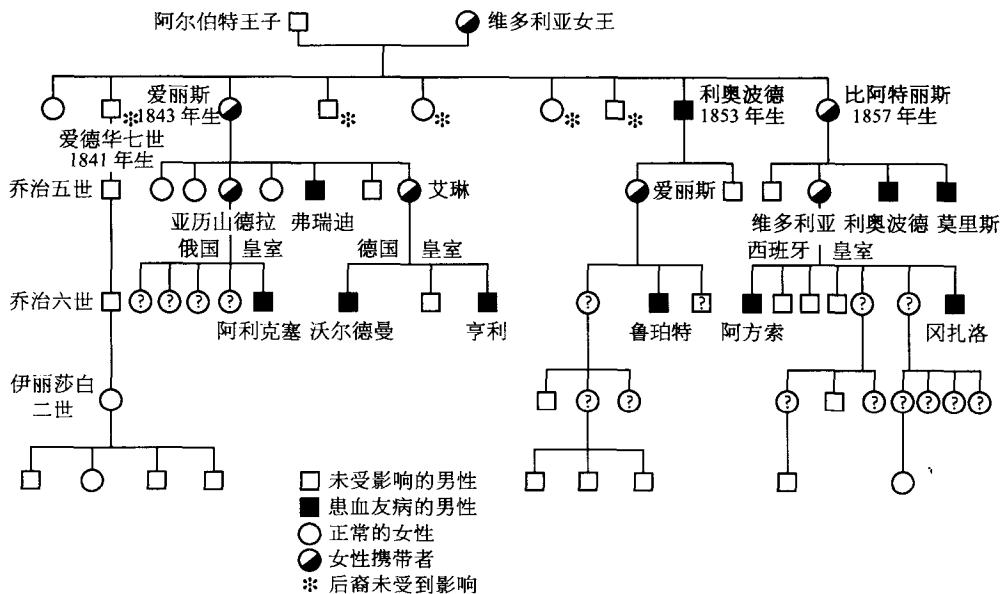


图 1-1-1 欧洲王室的血友病家系图

二、血友病的近况

在 1959 年之前,血友病 B 的治疗主要是靠全血或血浆(包括新鲜或冰冻血浆),血清也被报道有效。用凝血因子浓缩物治疗血友病 B 患者由法国在 1959 年首先使用。美国直到 1969 年才批准含有所有维生素 K 依赖的凝血因子的浓缩物用于血友病 B 患者。

近年来,血友病的防治进展很大,这与早期的工作是密不可分的。第一,英国牛津的 Mcfarlane 教授及其同事发现血友病 A 缺乏因子Ⅷ,可以通过输注正常的新鲜血液或血浆而纠正,为现代血友病治疗奠定了基础。第二,世界大战促成组建的各种输血服务组织,包括在许多国家都存在的红十字会及红新月会。第三,由美国及欧洲药物公司从商业上开始对分馏技术的应用,这些技术对从人类和猪的血浆中提取的以及通过 DNA 技术制备而来的凝血因子的纯化起着非常重要的作用。这些技术包括从最终药物中去除不想要的污染物,包括病毒及一些外源蛋白。

近年来,至少对于发达国家的患者来说,用于血友病治疗的血制品变得更为有效、更容易得到。继新鲜血后,20 世纪 60 年代早期开始研制新鲜冰冻血浆,随后由来自美国加利福尼亚州斯坦福的 Judith Pool 及其同事研制发明了冷沉淀。在采用这些单一供者来源的治疗方法的同时,许多国家开始从众多供者的富集血浆中提取浓缩物,分馏的方法是由北美的 Cohn 和瑞典的 Blombäck 等引入的,现已被世界上许多血液实验室采用。由药厂引进的病毒灭活的凝血因子浓缩物给成千上万的血友病患者带来了有效的治疗手段,并且使开发大规模的家庭治疗和预防方案成为可能。

随着分子生物学技术的发展,有关血友病的基因治疗目前也在各国开展,并取得了可喜的结果。

三、我国传统医学中有关出血性疾病的描述

我国最早的《黄帝内经》在《灵枢·百病始生》篇中对出血性疾病已有描述:“阳络伤则血外溢,血外溢则衄血;阴络伤则血内溢,血内溢则后血。”“衄血”指上部外部出血,包括鼻和口腔出血等。“后血”指下部出血,包括便血等。东汉的《金匱要略·惊悸吐衄下血胸满瘀血病脉证治》篇:“病人面无色,无寒热,脉沉弦者,衄。”描述因出血而失血,无外感发热,与紫癜及凝血机制异常所致出血性疾病相似。隋朝《诸病源候论》“血病诸候”探讨出血性疾病的病候病源特点,其中“舌上出血候”、“九窍四肢出血候”所述包括口、舌、鼻、眼、皮肤、肌肉、关节及内脏出血诸症,出血范围、严重程度与凝血因子缺乏的临床表现近似。清朝的《血证论》提出了止血、消瘀、宁血和补虚为治疗血证的四大步骤。

随着现代医学的发展,我国于 20 世纪 50 年代开始陆续在各地建立了出凝血实验室,有关出血性疾病的诊治也逐步发展起来。

(杨仁池)

参 考 文 献

1. Owen Jr. CA. A History of Blood Coagulation. Minnesota: Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2001.
2. Jones P. Living with Haemophilia. 5th ed. New York: Oxford University Press Inc, 2002.

第二节 正常止血机制

人体的正常止血机制包括 3 个要素：血管壁、血小板和血浆促/抗凝血蛋白。组织损伤后,通过血小板的黏附和聚集,马上形成血小板栓子,随即机体的血液凝固过程启动,通过一系列相互依赖的酶促反应,最终形成纤维蛋白凝块。由于与血友病发病相关的异常在凝血因子部分,本节主要探讨血浆促/抗凝血蛋白在正常止血机制中的作用。

一、参与凝血过程的因子

(一) 促凝酶原

1. 凝血因子 XI (FXI) FXI 是一种糖蛋白,含糖量为 5%,血浆中 FXI 的分子量为 160 kDa,由重链区(Glu1 - Arg369)和轻链区(Ile370 - Val670)两部分组成。重链区中 369 个氨基酸残基形成 4 个串联重复序列(Apple 区,A 区),每个序列含有 90 或 91 个氨基酸残基,其中包括 6 或 7 个半胱氨酸残基,分别形成 3 个二硫键。在这 4 个区中,有 23%~34% 的氨基酸序列是相同的。重链区是 FXI 与其他因子相互作用的部位,其中 A1 区中 Val59 - Lys83 是 FXI 与高分子量激肽原(HK)结合的部位,而 A4 区中 Ala317 - Gly350 是 FXI 结合 FXIa 的部位,这些结合部位在 FXI 的立体结构中暴露于分子表面,从而有利于 FXI 与上述因子发生作用。FXI 亚单位的轻链区是由肽链羧基端区的 238 个氨基酸残基组成,轻链区是活性中心的所在部位。FXI 是由 2 个相同的亚单位(单体)组成的同二聚体,亚单位间靠各自第 4 个 A 区的 Lys321 形成二硫键连接在一起。而每个亚单位是一含有 607 个氨基酸残基的多肽链,分子量为 80 kDa。FXI 基因全长约 23 kb,有 15 个外显子和 14 个内含子,外显子 1 编码 5'非翻译区,外显子 2 编码信号肽,4 个 A 区由外显子 3~10 编码,每个 A 区由 2 个外显子编码,其余 5 个外显子则编码羧基末端区。FXI 是机体正常止血功能所需的一种凝血因子。

2. 凝血因子 XII (FXII) FXII 是由 596 个氨基酸组成的单链糖蛋白,含糖量约 13.5%,糖基化位点位于 Asn230 和 Asn414 上。14 个外显子分别编码 7 个结构/功能区:自氨基末端起分别是 II 型纤维连接蛋白区、表皮生长因子(EGF)样区、I 型纤维连接蛋白区、EGF 样区、铰链(kringle)区、富脯氨酸区和催化区。FXII 主要由肝脏合成,在凝血中的作用是参与内源性凝血途径的接触相激活。鉴于先天性 FXII 缺乏的患者临床上并无出血征象,目前人们普遍认为 FXII 并不是机体生理性凝血过程所必需的凝血因子。

3. 激肽释放酶原(PK) PK 是存在于血浆中的一种糖蛋白,由 619 个氨基酸残基组成的单链分子。血浆 PK 由肝脏合成,有 2 种相近的形式,分子量分别为 85 kDa 和 88 kDa,2 种形式间的差别主要是与分子轻链区相连的糖基链不同。PK 的结构与 FXI 亚单位相近,两者的氨基酸序列有 58%同源。PK 由重链区(氨基末端区 371 个氨基酸残基)和轻链区(羧基末端区 248 个氨基酸残基)两部分组成。与 FXI 亚单位一样,PK 分子重链区的 371 个氨基酸残基也排列成 4 个 A 区;轻链区是酶(原)活性部位所在区域,其结构与其他丝氨酸蛋白酶轻链区相似。PK 在凝血过程中的作用是参与内源性凝血途径的接触相激活。与 FXII 一样,PK 并不是机体生理性凝血过程所必需的凝血因子,它的缺乏并不导致临床出血现象。

(二) 依赖维生素 K 的酶原

依赖维生素 K 的酶原包括凝血酶原、FⅦ、FⅨ和 FⅩ。此外,抗凝因子蛋白 C 及其辅因子蛋白 S,以及蛋白 Z 也属此类。依赖维生素 K 的酶原的共同特征是均含有 4 个主要结构域:1 个羧基谷氨酸(Gla)结构域、2 个铰链或 EGF 结构域、1 个丝氨酸蛋白酶结构域。FⅦ、FⅨ和 FⅩ同属 FⅨ家系,其基因在结构和组织上均十分相似,都由 8 个外显子和 7 个内含子组成。外显子 1 编码信号肽,外显子 2 编码含羧基化识别位点的原肽和 Gla 结构域,外显子 3 编码芳香氨基酸堆砌域,外显子 4、5 各编码一个 EGF 结构域,外显子 6 编码活化肽,外显子 7、8 编码催化结构域。Gla 是可以和 Ca^{2+} 结合的氨基酸,依赖维生素 K 的凝血因子与 Ca^{2+} 结合后发生构象改变,从而显露出与磷脂膜结合的特征,进而参与凝血过程。所有依赖维生素 K 的酶原都是在肝脏内合成的。

1. 凝血酶原 即凝血因子 II,是最早被提纯并测知氨基酸序列的凝血因子,是一单链糖蛋白,含糖量约为 8%,3 条不同的糖基链分别连于 Asn78、Asn100 和 Asn373 上,分子量为 72 kDa,由 579 个氨基酸残基组成。凝血酶原基因共有 14 个外显子和 13 个内含子。外显子 1 编码信号肽,外显子 2 编码含 γ 羧基化识别位点的原肽和 Gla 结构域,外显子 3 编码芳香氨基酸堆砌域(以上 3 个外显子与 FⅨ家系在结构和组织上有同源性),外显子 4~7 编码 2 个铰链区,外显子 8、9 编码受 FⅩa 作用的溶蛋白裂解位点,外显子 10~14 则编码凝血酶的催化结构域。凝血酶原基因的这一部分与 FⅨ家系基因中编码同源区域的部分有较大的差别,因为构成丝氨酸蛋白酶催化三联体的氨基酸分布于不同的外显子内:组氨酸位于外显子 10,天冬氨酸位于外显子 11,丝氨酸则位于外显子 13,而在 FⅨ基因家系,整个催化结构域是由 2 个而不是 5 个外显子编码的。

凝血酶原的 Gla 区的主要功能是结合 Ca^{2+} 并进一步与磷脂膜结合。在无 Ca^{2+} 存在情况下,该区的立体结构呈不规则状;而结合 Ca^{2+} 后,该区则富含 α 螺旋和 β 片层结构。最近的研究表明,该区 10 个 Gla 中某一些残基可能对维持该区的 Ca^{2+} 结合功能非常重要,而另一些残基可能与磷脂膜结合有关;2 个 K 区(kringle1 和 kringle2,即 K1 和 K2)各含有约 80 个氨基酸残基,两者均借助二硫键分别形成三环状结构,而其立体结构呈扁椭圆形。一般认为,这种结构的功能是参与因子与其底物、辅因子或受体间的相互作用。凝血酶原分子中的 K2 可与辅因子——FV 结合。近来研究还证明,K2 中尚含有与 FⅩ作用的部位(His205 - Arg220)。紧接 K 区的是凝血酶原的催化区,该区又包括激活区和丝氨酸蛋白酶区。激活区是凝血酶原被激活转为凝血酶的部位;而丝氨酸蛋白酶区具有蛋白酶活性,含有识别并裂解底物的部位,该区结构与胰蛋白酶及其他丝氨酸蛋白酶者相类似。凝血酶原的活性氨基酸是该区 His363、Asn419 和 Ser382;该区 Arg382 - Arg393 段被称为“阴离子结合部位”,是凝血酶原与纤维蛋白原、凝血酶调节蛋白、水蛭素作用的部位。

2. 凝血因子 VII(FⅦ) FⅦ在正常人血浆中的浓度很低,仅为 0.5~2.0 mg/L,是一单链蛋白,含糖量约为 13%,分子量为 50 kDa,由 406 个氨基酸残基组成。Gla 是 FⅦ与 Ca^{2+} 结合和发挥功能所必需的;2 个 EGF 区(EGF1 和 EGF2)各由约 45 个氨基酸残基组成,分别含有 3 个二硫键,以特征性共价结构方式排列。EGF 区的功能尚未完全弄清,但众多研究表明,EGF1 为 FⅦ与组织因子(TF)结合所必需的,且该区对 FⅦ发挥生物活性非常重要。另外,在 EGF1 区中含有一个不依赖 Gla 的 Ca^{2+} 高亲和力结合部位;催化区与其他凝血因子相似,包括激活区和蛋白酶区。激活区是 FⅦ被激活而转化为 FⅦa 的部位,而蛋白

酶区是识别并裂解底物的部位。FⅦ的作用主要是与 TF 形成活性复合物(TF - FⅦ)后激活 FX 而启动外源性凝血途径。

3. 凝血因子Ⅸ(FⅨ) 分子量为 56 kDa,是由 415 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,含糖量约 17%。与 FⅦ一样,成熟 FⅨ也分为 4 个结构/功能域,自氨基末端起分别为 Gla 区、2 个 EGF 区(EGF1 和 EGF2)和 1 个催化区。Gla 区由氨基末端的 45 个氨基酸残基组成,其中包括 12 个 Gla 残基,分别位于第 7、8、15、17、20、21、26、27、30、33、36、40 位。2 个 EGF 区(EGF1 和 EGF2)各由约 40 个氨基酸残基组成,其中各包括有 6 个半胱氨酸残基,分别形成 3 个二硫键。EGF1 区是 FⅨ发挥功能所必需的,它在 FⅨ被 TF - FⅦa 复合物激活和 FⅨ与 FⅧa 形成复合物激活 FX 等方面起重要作用。催化区由 FⅨ分子的羧基端部分组成,含有一激活肽和胰蛋白酶样区。在 FⅨ被激活时,激活肽被裂解而形成一独立的短肽。胰蛋白酶样区的结构与其他丝氨酸蛋白酶相似,其活性中心是该区的 Ser365 残基。

4. 凝血因子Ⅹ(FⅩ) FⅩ是一种双链糖蛋白,其活性部位和氨基末端的氨基酸序列与其他依赖维生素 K 的凝血因子非常相似,但是在整体结构上则有所不同。它在血浆中以双链形式存在,轻链(17 kDa)与重链(49 kDa)间由二硫键相连。

(三) 促凝辅因子

不同酶复合物的辅因子蛋白可分为 2 类:可溶性辅因子(FV 和 FⅧ)和整合细胞膜蛋白(TF)。

1. 凝血因子 V(FV) FV 是一种糖蛋白,是血浆凝血因子中最不稳定者。它是由 2 196 个氨基酸残基组成的单链分子,分子量为 330 kDa。其分子可分为重链区和轻链区两部分,重链区位于氨基末端,轻链区位于羧基末端。重链区是由 2 个结构相似的区段所组成,两区段分别命名为 A1 区和 A2 区。轻链区含有另一个 A 区(A3 区)和 2 个同源性 C 区(C1 区和 C2 区)。重链区与轻链区间由一连接区段相连接,连接区段命名为 B 区。因此,FV 的结构可表示为 A1 - A2 - B - A3 - C1 - C2。约 20% 的 FV 存在于血小板中,80% 的 FV 则作为一种可溶性蛋白存在于血浆中,单核细胞和淋巴细胞中也有少量 FV。由于血小板 FV 缺乏者 FXa 结合减少,并有出血素质,因此血小板池中的 FV 可能起主要作用。

在凝血过程中,FV 的作用是作为 FXa 的辅因子,加速后者对凝血酶原的激活。但是,在正常情况下,血浆中 FV 并不具备内在活性或活性很低,而在凝血酶或 FXa 的作用下,FV 可转为活性形式(FVa),这一过程是由凝血酶或 FXa 水解 FV 分子中 3 个肽键,即 Arg709 - Ser710、Arg1018 - Thr1019 和 Arg1545 - Ser1546 以去除 B 区来完成的。FVa 是由重链 A1 - C1 - C2 组成的双链分子,重链的分子量为 105 kDa,而轻链有 2 种形式:一种形式的分子量为 71 kDa,另一种形式的分子量为 74 kDa。FVa 本身无蛋白酶活性,但是作为 FXa 的辅因子,有其内在活性。在 Ca²⁺ 存在条件下,FVa 与 FXa 在磷脂膜表面形成复合物——FXa - FVa,从而使 FXa 催化活力大大提高。FV 和 FVa 都能与磷脂膜发生作用,而这一过程不需要 Ca²⁺ 参与。FV 与富含磷脂酰丝氨酸的磷脂膜有高亲和力。而在血小板膜表面有 2 种类型的 FV/FVa 结合部位,即高亲和力结合部位和低亲和力结合部位,但是其高亲和力结合部位只能特异性地结合 FVa,而不能与 FV 作用。FVa 在与血小板膜表面特异性部位结合后,可能成为 FXa 的受体,FXa 与之结合即形成 FXa - FVa 复合物,进而发挥凝血活性。另外,FVa 还能与内皮细胞、单核细胞和淋巴细胞表面结合,从而有利于在这些部位形成具有激活凝血酶原性能的 FXa - FVa 复合物。研究证明,FVa 是借助

其分子中的轻链与磷脂膜结合,而其具体部位很可能是在 A3 区和 C2 区。除此之外, FV a 轻链还含有 FX a、活化蛋白 C(APC)和 FV a 重链的结合部位,这些结合部位是互为独立的,但是在空间排列上却非常接近, FX a 与 FV a 的结合可通过空间位阻而影响 APC 或 FV a 重链与其结合。而 APC 与 FV a 轻链的结合会通过裂解 FV a 重链的 3 个位点(Arg306、Arg506 和 Arg679)而使 FV a 失活。在 FV a 重链中含有凝血酶原的结合部位,这对 FV a 发挥 FX a 的辅因子功能十分重要。

2. 凝血因子 VIII(FVIII) FVIII 是所有血浆凝血因子中含量最低者。FVIII 是以单链形式合成,分子量为 330 kDa,由 2 332 个氨基酸残基组成。它的氨基酸顺序和蛋白结构与 FV 非常相似,其结构中也含 3 个 A 区(A1 区、A2 区和 A3 区)、2 个 C 区(C1 区和 C2 区)和 1 个 B 区。与 FV 一样,其排列顺序也为自氨基末端起分别是 A1 - A2 - B - A3 - C1 - C2,其中 A 区、C 区顺序与 FV 相近,但是其 B 区与 FV 不同,是 FVIII 所特有的。B 区中含有 19 个连有糖链的天冬酰胺位点,而 A 区和 C 区含有 FVIII 分子中所有半胱氨酸残基的多数(19/23)。这些半胱氨酸残基在各区段内部彼此形成二硫键。血浆中 FVIII 是以异二聚体形式存在,它是由单链分子在 B - A3 连接点和 B 区内部不同位点经酶解后形成的。血浆中 FVIII 由羧基端轻链和氨基端重链所组成。轻链含有 A3 - C1 - C2 区,分子量为 80 kDa,较为固定;而重链变异较大,这主要表现在所含 B 区组分的不同,重链在最小时仅含 A1 - A2 区,不含 B 区,但是多数情况下含有长短不一的 B 区组分,重链分子量在 90~210 kDa 之间。重链和轻链间是以非共价方式连接,由 Me^{2+} 在 A1 区与 A3 区间形成键桥。用螯合剂可使 FVIII 异二聚体结构解离,同时也将会使其失去凝血活性。在血浆中, FVIII 与血管性血友病因子(vWF)形成复合物。血浆 vWF 是作为 FVIII 的载体蛋白而在凝血过程中发挥作用。

3. 组织因子(TF) 即凝血因子 III(FIII),是 FVII 的受体,是唯一不存在于正常人血浆中的凝血因子。它分布于各种不同的组织细胞中,其中脑、肺、胎盘中含量丰富。它是一种跨膜糖蛋白,分子量为 45 kDa,由 263 个氨基酸残基组成,其中氨基末端的 219 个氨基酸残基位于细胞膜外,称为“胞外区”(氨基酸残基 1~219),该区决定 TF 的促凝活性;紧接其后的 23 个氨基酸残基穿过细胞膜,称为“跨膜区”(氨基酸残基 220~242),该区是疏水性的;其余 21 个氨基酸残基位于细胞质内,称为“胞质区”。将 TF 的胞质区和跨膜区切除后得到一截短的可溶性组织因子,这一分子的活性较正常蛋白大大降低,说明 TF 的活性有赖于膜锚。可溶性 TF 虽然仍可作为辅因子与 FVII 结合,并可作为 FVIIa 的辅因子参与 FX 的激活,但是不能作为辅因子参与 FVII 的自身激活。组织因子胞质区的第 245 位是一半胱氨酸残基,这一残基可以作为软脂酸或硬脂酸的受体而通过一硫脂键与后两者共价连接,可以推测脂肪族链与 TF 胞质区的连接对增强 TF 跨膜稳定性是非常有意义的。在 TF 的胞外区还有 2 个半胱氨酸对(Cys49 和 Cys57, Cys186 和 Cys209),两者分别借助二硫键而形成共价稳定性的二硫环。二硫环对维持 TF 的功能非常重要,TF 一旦被还原将会失去功能。TF 是糖基化蛋白,据推测其糖基化部位是胞外区的 Thr13、Thr126 和 Thr139 残基。研究证明,在 TF 胞外区中,氨基端二硫键(由 Cys49 与 Cys57 残基间形成)对 TF 发挥功能并不重要,而羧基端二硫键(在 Cys186 与 Cys209 残基间形成)对维持 TF 的 FVII(FVIIa)高亲和力和辅因子功能非常重要,用丝氨酸替换这对半胱氨酸残基会使 TF 功能明显受损,羧基端二硫键(环)对维持 TF 胞外区结构的稳定性是非常必要的。

4. 高分子量激肽原(HK) HK 是一个由 626 个氨基酸残基组成的糖蛋白,是一种 α

球蛋白,分子量为 120 kDa,有 6 个结构/功能区:外显子 1~3 编码 D1 区,外显子 4~6 编码 D2 区,外显子 7~9 编码 D3 区,外显子 10 编码 D4~D6 区。其中,D1~D3 区组成分子的重链。D1 区与抑制心房利钠因子(atrial natriuretic factor)有关;而 D2、D3 区与对木瓜酶(papain)活性抑制有关,D2 区还有 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶(calpain)抑制序列,D3 区还有与血小板结合的部位;D4 区含有缓激肽肽段;D5 区富含组氨酸、脯氨酸和赖氨酸残基,是 HK 与负电荷表面结合所需的区段;D6 区位于羧基末端,含有与 FXI 和 PK 结合的部位,分子中的糖基链也富集于该区;D3~D5 区还参与细胞结合,在血浆中与 FXI 或 PK 结合形成复合物。在凝血中的作用是作为蛋白酶的辅因子参与内源性凝血途径接触相激活。它首先要经过激肽释放酶(或 FXIa、FXIa)裂解变为不含激肽的双链分子后,辅因子功能才变得明显,因此被裂解前的 HK 被认为是“前辅因子”。此外,还能抑制半胱氨酸蛋白酶的活性,可以与中性粒细胞或血小板结合而阻止凝血酶与血小板,以及纤维蛋白原与中性粒细胞或血小板的结合。

(四) 纤维蛋白原

即凝血因子 I (F I),是存在于血浆和血小板 α 颗粒中的一种糖蛋白,含糖量约 4.5%,分子量为 340 kDa。纤维蛋白原是血浆中含量最高的凝血因子,正常人血浆中的含量为 2.0~4.0 g/L,是由 3 对二硫键连接的多肽链($\text{A}\alpha$ 、 $\text{B}\beta$ 和 γ 链)组成的对称性二聚体,二硫键富集部位称为“二硫键结”(disulfide knot, DSK),糖基化位点在 $\text{B}\beta$ 链的 Asn364 和 γ 链的 Asn52。纤维蛋白原分子中 2 条 γ 链的 Cys8、Cys9 和 2 条 $\text{A}\alpha$ 链的 Cys28 间形成的 3 个二硫键将它的两个组分在多肽链氨基末端连接起来,该连接部位称为“中央区”(E 区),而远离这一连接部位的区域称为“周围区”(D 区)。在纤维蛋白原的中央区,两条 γ 链的 Cys8 和 Cys9 相互形成二硫键,使两条 γ 链以反向平行方式排列,多肽链的这种排列方式也使纤维蛋白原的两个组分以同样方式定位。电镜下,纤维蛋白原分子呈相连的三联球形:两端对称的球体较大,直径为 6 nm;中间球体较小,直径为 5 nm;球体间以带状结构相连,是由 3 条多肽链经螺旋形成,带宽 1.5 nm,长 14~16.5 nm,分子总长度为 45 nm。纤维蛋白原是由肝细胞合成的,它的 3 条多肽链分别由不同的基因编码(表 1-2-1)。3 条多肽链的基因组序列具有高度同源性,提示它们源于共同的祖先基因,且在基因的上游仍有同源性,提示在这一区域有共同的调节元件以协调合成。

(五) 凝血因子 XIII

凝血因子 XIII (F XIII)是存在于血浆、血小板和单核细胞中的一种糖蛋白。F XIII 是由 2 个 a 亚单位和 2 个 b 亚单位组成的四聚体(a_2b_2),a、b 亚单位分别是由 731 个和 641 个氨基酸残基组成的多肽链。2 个 a 亚单位相互连接组成二聚体(a_2)并形成分子的“核心”,b 亚单位则环绕分子核心以单体形式分别与二聚体连接。F XIII 是谷氨酰转氨酶(原),其活性部位在 a 亚单位,其中 Cys311 残基是活性部位中的一个必需氨基酸,a 亚单位中还可能含有 2 个 Ca^{2+} 结合部位;b 亚单位无催化活性,在血浆中它可能是作为载体蛋白并对 a 亚单位起保护和稳定作用,它还有助于 a 亚单位与纤维蛋白亲和并影响血浆 F XIII 的激活。血小板、巨核细胞、单核细胞和巨噬细胞胞质内也有 F XIII,但是仅含 a 亚单位(a_2)。正常情况下血浆 F XIII 是以酶原形式存在,它要发挥功能需首先被凝血酶(在 Ca^{2+} 参与下)激活。而其激活过程是分几步进行的:第一步是凝血酶裂解其分子中 a 亚单位的氨基端精氨酸-甘氨酸键而使 a 亚单位在释放出—含 36 个氨基酸分子量为 4 kDa 的小肽段(激活肽)后变为“a'”;第二步是在