

# 标本存放温度和时间对血浆中抗凝蛋白活性的影响

李 蕾, 王培昌<sup>△</sup>(首都医科大学宣武医院检验科, 北京 100053)

**【摘要】 目的** 探讨标本存放温度和时间对血浆中抗凝蛋白活性的影响。**方法** 用真空采血管采集住院患者空腹静脉血 20 例, 无黄疸、脂血、溶血, 即刻以 3 000 r/min 离心 10 min, 上机测得的结果与在室温(20~25 ℃)、4 ℃和 -20 ℃放置 4 h、12 h、24 h、7 d、14 d 的血浆标本测得的结果分别进行比较。**结果** 在室温下保存 ATⅢ、PC 活性 24 h 内均无明显变化, 仅 PS 活性明显降低, 7 d 和 14 d 时检测抗凝蛋白活性均明显降低( $P < 0.05$ ); 在 4 ℃放置 7 d ATⅢ、PC 活性有所降低, 但与即时活性相比差异无统计学意义, 而 PS 活性明显下降( $P < 0.05$ ), 14 d 时三者活性均明显下降( $P < 0.05$ ); 在 -20 ℃保存 14 d 甚至更长时间抗凝蛋白活性均无明显降低。**结论** 为保证抗凝蛋白活性, 血液标本应置于低温保存并尽快检测。

**【关键词】** 抗凝蛋白; 抗凝血酶Ⅲ; 蛋白 C; 蛋白 S; 温度; 时间

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.020 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)17-2533-02

**Influence of storage time and temperature on plasma anticoagulation protein activity** LI Lei, WANG Pei-chang<sup>△</sup> (Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of storage time and temperature on anticoagulation protein activity in plasma. **Methods** Fasting venous blood was collected from 20 inpatients without jaundice, lipidemia and hemolysis by vacutainer, immediately centrifuged by 3 000 r/min for 10 min and detected. The detected results were compared with those stored in the room temperature(20-25 ℃), at 4 ℃ and -20 ℃, for 4 h, 12 h, 24 h, 7 d, 14 d respectively. **Results** The ATⅢ and PC activity of the sample stored in the room temperature within 24 h had no significant change, but only the PS activity was significantly decreased, the anticoagulation protein activity detected on 7, 14 d was significantly decreased( $P < 0.05$ ); the ATⅢ and PC activity of the sample stored at 4 ℃ for 7 d was decreased, but the difference had no statistical significance compared with those of immediately detected samples, but the PS activity was significantly decreased( $P < 0.05$ ), the activity of 3 indexes on 14 d was decreased significantly ( $P < 0.05$ ); the activity of anticoagulation protein of the sample stored at -20 ℃ for 14 d or even longer time had no obvious decrease. **Conclusion** The blood samples should be placed in the low temperature and detected as soon as possible for ensuring the anticoagulant protein activity.

**【Key words】** anticoagulation protein; antithrombinⅢ; protein C; protein S; temperature; time

抗凝血酶Ⅲ(ATⅢ)、蛋白 C(PC)和蛋白 S(PS)是人体内重要的生理性抗凝蛋白, 参与维持体内凝血与抗凝系统的动态平衡。其中, ATⅢ是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 主要作用于凝血酶和因子Ⅹ $\alpha$  而发挥其抗凝活性<sup>[1]</sup>; PC 在被激活形成活化 PC 后可灭活血浆中的凝血因子 V $\alpha$  和Ⅷ $\alpha$ , PS 是其重要的辅因子<sup>[2]</sup>。上述生理性抗凝蛋白的先天性或获得性缺乏(如肝脏疾病、维生素 K 缺乏、口服避孕药、妊娠等)均可导致静脉血栓栓塞症(VTE)的发生<sup>[3]</sup>。目前临床上对抗凝蛋白水平的检测越来越多, 为了减少分析前因素对检测结果的影响, 尤其是标本采集后存放时间和温度等因素的影响, 因此, 本室对不同温度和时间内抗凝蛋白活性做如下研究, 并报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本** 选取 2014 年 3~6 月住院患者的凝血标本 20 例, 无溶血、黄疸、脂血。患者早晨空腹, 自肘静脉采集两管凝血标本。采血管是以 109 mmol/L 枸橼酸钠为抗凝剂的定量真空采血管, 各采集至 3 mL, 抗凝剂和血的比例为 1:9, 并将其相互混合, 即刻离心。

**1.1.2 仪器与试剂** 应用法国 Diagnostica Stago 公司的全自动凝血分析仪及其配套试剂和质控血浆。ATⅢ批号: 112286;

PC 批号: 111458; PS 批号: 111433; 离心机为普通离心机。

**1.1.3 质控品** 应用法国 Diagnostica Stago 公司生产的正常和病理质控品, 每天随标本进行测定, 质控结果在受控范围方可进行试验, 以保证结果准确性。质控品批号为 111101。

**1.2 方法** 将采集的凝血标本即刻以 3 000 r/min 离心 10 min, 分离乏血小板血浆, 即刻测定抗凝蛋白活性, 其余血浆一部分置于室温加盖容器保存, 一部分置于 4 ℃冰箱密封保存, 一部分置于 -20 ℃冰箱密封保存, 并分别将于 4 h、12 h、24 h、7 d、14 d 测定的结果与即时测得的结果进行比较。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS16.0 软件包进行统计学处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用配对  $t$  检验; 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 在室温(20~25 ℃)下血浆标本放置不同时间对抗凝蛋白活性检测结果的影响** 从表 1 看, 室温下 ATⅢ、PC 和 PS 的活性随血浆标本放置时间而降低。其中 ATⅢ和 PC 在 4、12、24 h 的检测方法与即时检测结果相比活性有所降低, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 分别放置 7 d 后活性明显下降( $P < 0.05$ ), 14 d 后测得的结果与即时检测相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PS 活性在室温放置 12 h 内检测结果无明显

降低, 24 h 后明显下降 ( $P < 0.05$ ), 放置 7 和 14 d 后活性明显降低 ( $P < 0.05$ )。

表 1 室温下血浆标本放置不同时间对抗凝蛋白检测结果的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	n	ATⅢ	PC	PS
即时	20	107.9 ± 12.4	113.2 ± 12.8	116.1 ± 14.3
4 h	20	110.2 ± 10.8	109.4 ± 11.3	114.3 ± 13.6
12 h	20	105.4 ± 13.6	107.9 ± 13.5	108.9 ± 12.4
24 h	20	103.8 ± 15.3	108.6 ± 10.2	96.5 ± 9.7*
7 d	20	94.5 ± 10.9*	96.7 ± 9.8*	76.3 ± 13.2*
14 d	20	83.7 ± 11.5*	85.6 ± 10.1*	68.9 ± 10.4*

注:与即时相比,\*  $P < 0.05$ 。

**2.2** 在 4 °C 下血浆标本放置不同时间对抗凝蛋白活性检测结果的影响 从表 2 看,在冰箱冷藏室 4 °C 保存,ATⅢ和 PC 的活性随血浆标本放置时间的延长无明显降低,放置 14 d 时两者活性均明显下降 ( $P < 0.05$ );PS 活性在 4 °C 保存 24 h 无明显变化,但随着时间延长活性逐渐降低,7 d 后检测结果与即时检测相比有明显下降 ( $P < 0.05$ ),14 d 后活性下降明显 ( $P < 0.05$ )。

表 2 4 °C 下血浆标本放置不同时间对抗凝蛋白检测结果的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	n	ATⅢ	PC	PS
即时	20	107.9 ± 12.4	113.2 ± 12.8	116.1 ± 14.3
4 h	20	108.1 ± 13.5	115.7 ± 13.4	117.0 ± 15.6
12 h	20	105.9 ± 11.6	116.3 ± 9.5	114.8 ± 10.6
24 h	20	107.4 ± 13.9	113.9 ± 10.8	108.2 ± 13.7
7 d	20	106.8 ± 14.6	109.5 ± 11.3	95.3 ± 14.1*
14 d	20	92.5 ± 8.9*	93.2 ± 13.1*	86.2 ± 13.4*

注:与即时相比,\*  $P < 0.05$ 。

**2.3** 在 -20 °C 下血浆标本放置不同时间对抗凝蛋白活性检测结果的影响 从表 3 看,在冰箱冷冻室 -20 °C 保存不同时间下,血浆中 ATⅢ、PC 和 PS 的活性与即时检测相比均有所下降,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 -20 °C 下血浆标本放置不同时间对抗凝蛋白检测结果的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

时间	n	ATⅢ	PC	PS
即时	20	107.9 ± 12.4	113.2 ± 12.8	116.1 ± 14.3
4 h	20	112.2 ± 13.5	116.6 ± 14.7	119.4 ± 16.1
12 h	20	106.7 ± 15.1	115.2 ± 13.5	114.5 ± 15.7
24 h	20	109.5 ± 11.9	113.7 ± 15.4	113.8 ± 14.9
7 d	20	104.3 ± 15.7	114.5 ± 16.1	110.9 ± 15.3
14 d	20	103.9 ± 14.8	108.6 ± 15.0	109.5 ± 16.7

### 3 讨论

抗凝蛋白在人体的出血与止血平衡中发挥着重要作用,从而保持血液的正常流动状态。抗凝蛋白的先天性或获得性缺陷使机体处于高凝状态并易发生血栓栓塞性疾病。有文献报道中国汉族深静脉血栓患者抗凝蛋白缺乏的检出率高达 50%,以 PS 缺乏为主,其次是 PC 和 ATⅢ的缺乏<sup>[4-8]</sup>。抗凝蛋白活性检测是诊断抗凝蛋白缺乏最常用的手段,对静脉血栓栓塞疾病(VTE)的病因诊断及预防具有重要意义。

本院申请 ATⅢ、PC 和 PS 活性检测的科室主要为神经内/外科、血管外科、血液科等临床科室,住院患者血液采集大多由夜班护士完成,门诊标本由抽血室护士完成,由于血液标

本数量多及送检流程不合理,送到检验科后放置时间一般会超过最佳检测时间(2 h 内)而导致检测结果不同<sup>[9-10]</sup>。另外,抗凝蛋白活性检测不属于凝血常规和急诊检测项目,且标本量较少,考虑到试剂成本、临床需求等因素,本科仅 ATⅢ常规检测,PC 和 PS 2 周检测 1 次。因此,血液标本的保存时间和温度对抗凝蛋白活性的检测结果影响至关重要。

本文研究表明,在室温下保存 ATⅢ、PC 活性在 24 h 内均无明显变化,仅 PS 活性明显降低,7 和 14 d 检测时三种抗凝蛋白活性均明显降低 ( $P < 0.05$ );在 4 °C 放置 7 d 时 ATⅢ、PC 活性有所降低,但与即时检测活性相比差异无统计学意义,但 PS 活性明显下降,14 d 时三者活性均明显下降;在 -20 °C 保存 14 d 甚至更长时间抗凝蛋白活性均无明显降低。

从以上研究结果可知,凝血标本采集后若由于各种原因不能即时检测,室温放置时,ATⅢ、PC 在室温下保存不宜超过 24 h,PS 不能超过 12 h。标本离心后置置于 4 °C,ATⅢ、PC 可保存 7 d,PS 应在 24 h 内尽快检测;在 20 °C 三者可保存 14 d 甚至更长时间。基于以上研究本科室 ATⅢ作为常规检测项目,而 PC、PS 标本离心后分离取血浆于 -80 °C 低温冰箱保存,检测前 37 °C 水浴复融,对检测结果不会有显著影响。因此,对于检测周期长的标本需置于低温保存以更好的保持蛋白活性,从而保证检测结果的准确性和可靠性。

### 参考文献

- [1] Hepner M, Karlaftis V. Antithrombin[J]. Methods Mol Boil, 2013, 992(8): 355-364.
- [2] Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIII  $\alpha$ [J]. J Biol Chem, 1994, 269(29): 18735-18738.
- [3] De Stefano V, Simioni P, Rossi E, et al. The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S[J]. Haematologica, 2006, 91(5): 695-698.
- [4] 白春梅, 潘家琦, 范连凯, 等. 静脉血栓患者抗凝蛋白缺陷研究[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(11): 746-748.
- [5] Shen MC, Lin JS, Tsay W. High prevalence of antithrombin III, protein C and protein S deficiency, but no factor V Leiden mutation in venous thrombophilic Chinese patients in Taiwan[J]. Thromb Res, 1997, 87(4): 377-385.
- [6] Liu HW, Kwong YL, Bourke C, et al. High incidence of thrombophilia detected in Chinese patients with venous thrombosis[J]. Thromb Haemost, 1994, 71(4): 416-419.
- [7] Chen TY, Su WC, Tsao CJ. Incidence of thrombophilia detected in southern Taiwanese patients with venous thrombosis[J]. Ann Hematol, 2003, 82(2): 114-117.
- [8] 秦晓玉, 宋燕, 陈宁恒, 等. 静脉血栓栓塞症患者血清 AT、蛋白 C、蛋白 S 水平临床分析[J]. 中国医药科学, 2014, 4(1): 12-14.
- [9] 丛玉隆. 关于卫生部出凝血时间操作规程《通知》的理解[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 22(3): 183-185.
- [10] 卜国平, 曹伟建. 凝血实验的影响因素探讨[J]. 江西医学检验, 2005, 23(8): 353-354.