

C-蛋白質

的簡介

中國醫技系助教
劉國慶

S、前言

近來在血液凝固方面的研究最主要的進展乃是一種存於人類血漿中被稱為C-蛋白質的發現。C-蛋白質(Protein-C)(以下簡稱C-蛋白)是一種Vitamin K依賴性的血漿酶元(Zymogen), 為人體內一種天然凝血抑制劑。活化型的C蛋白能以有限度地蛋白溶解作用(Proteolysis)使第V因子和第VIII因子去活化而遂行其抗凝作用。它也是一種有效的纖維蛋白溶解劑, 並可因增加血漿酶元(Plasminogen)活化劑之活性而增強血凝塊溶解作用。

在健康的個體中, C蛋白的含量約4 Ug/ml或正常的71~152%。在遺傳性或後天性血凝性疾(Thrombotic disease), 此量會降低, 是故, C蛋白不啻為一項診斷血凝性疾病的參考指標。

S、歷史回顧

Seegers首先在牛血漿中發現C蛋白, 當時稱為“自體凝血酶元II-A”。瑞典的Stenflo鑑定出此相同物質稱之“C-蛋白”。在此蛋白分離過程中, Stenflo得到4個波峰(peak)並將它們依序標示成A~D, 而第三個波峰含有一具抗凝活性的複合體, 他認為此物取一特定名稱即C-蛋白。Kissel是第一位從人類血漿中分離出C蛋白的學者。而對它的結構、功能及臨床意義之闡釋方面頗有貢獻的則有Comp及Esmon和Griffin等人。

S、C蛋白的結構:

人類C蛋白如牛的酶元(Bovine zymogen)般, 是由一條分子量約41,000的重鏈和一條分子量約21,000的輕鏈由雙硫鏈連接而成。重鏈(Heavy chain)含有活性的絲氨酸(Serine), 而輕鏈的胺基終端部分則含有結合上鈣的 r -羧基羧氨酸(r -carboxyglutamic acid)殘餘基。又在輕鏈的71位處有一單獨的胺基酸, β -羧基天冬氨酸(β -hydroxyaspartic acid), 在此同時其功能仍不清楚。不過, 在重鏈上發生活化作用時, 其活化位及肽鏈會釋放出來。

S、C蛋白的活化

C蛋白平時以其未活化酶元形式存於循環血中。凝血酶(thrombin)是目前唯一已知的生理上C蛋白活化劑。其能藉著C蛋白重鏈上介於第12位的精氨酸(arginine)和13位的白胺酸(leucine)間發生的單一裂解作用露出活化位上的絲氨酸殘餘基(Serine residue)而活化它。雖然凝血酶能活化C蛋白, 但是其活化速率却很慢。不過, 若在內皮細胞表面轉因子(endothelial surface cofactor)稱為凝血調節素(thrombomodulin)的存在下, 則活化速率將加快許多, 當鈣存在時一種以1:1緊密結合的複合體~凝血酶~凝血調節素複合體被產生出來, 此複合體可使C蛋白活化速率加快20,000倍。凝血調節素乃一種分子量約74,000的蛋白質。凝血酶一旦與之結合後便不再如“前凝固劑”(procoagulant)般的功能。轉化纖維蛋白元(fibrinogen)成纖維蛋白(fibrin)或啟動血小板(plaquet)活化, 却經由C蛋白活化過程變成抗凝劑。實驗顯示此種凝血酶特性的改變不會造成永久性的凝固活性喪失, 只是一種可逆性作用。

凝血調節素的抗凝功能有二種方式: (1)刺激凝血酶依賴性之C蛋白活化, 及(2)直接抑制凝血酶的“前凝固”(procoagulation)活性。這些作用是在血管性內皮表面催化成的。值得一提的是在微循環(microcirculation)中內皮細胞暴露於血液中的表面積會增加到約5,000 cm²/ml, 相較之下, 在大血管或組織培養實驗中表面積對容積比約1~10 cm²/ml, 所以凝血調節素促成性的C蛋白活化作用及凝血酶清除作用(clearance)將首先發生在微循環中。鬱血(stasis)會延遲凝血酶到達微循環中, 是故將會抑制C蛋白活化和內皮細胞促成性的凝血酶清除作用。Salem等人曾提及體外實驗中, 當人血凝固時少量的C蛋白便被激活了, 他們說明了Va(活化型V)因子也能加速凝血酶-催化型C蛋白活化作用的速率。Va因子與凝血調節素有數點不同: Va因子依賴性的C蛋白活化不需依賴Ca⁺⁺, 若凝血酶及Va因子間形成複合體則此物對凝血酶的親和力至少也比凝血調節素低100倍以上。Va因子並不改變凝血酶的分子受質特性, 且此蛋白活化之速率不超過其由凝血調節素而得的10%, 至於此二大活化系統間如何相互作用則仍有待進一步研究。

S、活化型C蛋白的抗凝作用

C蛋白被凝血酶(thrombin)活化後, 其活化型的C蛋白會與一種稱為S蛋白(Protein S)的輔因子形成一種1:1之複合體。S蛋白是一種分子量69,000的單鏈糖蛋白(glycoprotein), 此物首先被Di Scipio及其同仁在牛及牛血漿中分離出, 又其最先被研究出的地方是美國的西雅圖, 故稱為S蛋白。

就像C蛋白一樣, S蛋白是一種含有許多 r -羧基羧氨酸殘餘基(r -carboxyglutamic

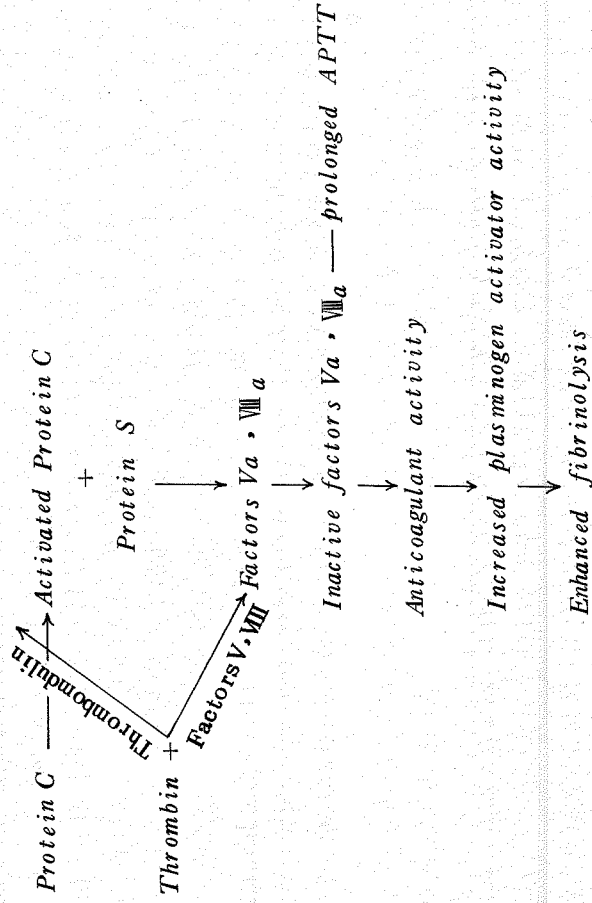
acid residue) 的 Vitamin K-dependent protein。當 C 蛋白與 S 蛋白形成複合體時則活化 C 蛋白與磷脂質囊泡 (phospholipid vesicle) 表面的結合會加速，因此，S 蛋白作用如同輔因子 (cofactor) 般使活化型 C 蛋白更接近其受質。此外，並加速活化型第五因子的去活化活化型 C 蛋白的專屬受質 (specific substrates) 為第五因子 (factor V) 和 factor VIII: C, F_{VIII}:c (factor VIII: C) 為具凝固活性的 VIII 因子之低分子量部份。

為達到最大凝固劑活性 (maximum coagulant activity), V 及 VIII: C 首需經輔因子 Va 及 VIII_a 指引下受凝血酶的少許蛋白溶解作用，然後活化型 C 蛋白再引發進一步的 Va 及 VIII_a 之蛋白溶解 (proteolysis) 而去除這些分子的活性。在典型實驗中，只要加入至少 200 ng 的活化型 C 蛋白至 0.2 ml 的血漿中便會使 Kaolin-cephalin (白陶土-腦磷脂) 凝固時間從 45 秒增加到 1200 秒以上。至於活化型 VIII 因子 (VIII_a) 當受質時，必須注意的是，只有此分子的 VIII: C 部分是去活化型的，活化型 C 蛋白對 factor VIII 之高分子量部分的 von willebrand 分子沒有顯著的影響，此部分免疫學上稱為 VIII: Ag。

活化型 C 蛋白也能加強纖維蛋白溶解作用 (fibrinolysis) Comp 和 Esmon 曾做過如下實驗，即將少量的活化型 C 蛋白注入狗的體內後，結果發現循環血中之血漿酶元 (plasminogen) 活化劑的活化性呈戲劇性的急劇昇高。因此他們認為第二傳訊質 (secondary messenger) 於焉產生結果導致 fibrinolysis 增加。

綜上所述，可知活化型 C 蛋白就像是凝血路徑的終末酵素 (terminal enzyme) 和直接負責第五和第八因子去活化作用的酵素。不過，其它血漿中的維生素 K 依賴性蛋白質，S 蛋白却是維持適當的活化型 C 蛋白抗凝活性所必需。

下面是 C 蛋白和 S 蛋白及其它相關凝固因子間相互 (作用) 關係之簡圖：



【註】APTT: Activated Partial Thromboplastin Time

§、活化型 C 蛋白抑制物

近年來已有許多學者投入 C 蛋白的研究行列，且亦有所進展，如 Suzuki 等已分離出具有功能性的活化型 C 蛋白抑制劑。據他們研究認為活化型 C 蛋白抑制劑缺乏之不可能同時引起第 V / VIII 因子的缺乏。因為：首先，前驅蛋白質 Cprecursor protein) 相對地會抵抗由活化型 C 蛋白所引發的去活化作用。其次，抑制物缺乏之程度和第 V / VIII 因子缺乏的嚴重程度間並無直接關連。幸好吾人已應用到具有功能性的抑制物去活化 C 蛋白，加上為病人施行適當的血漿置換術，使得這種抑制物在第 V / VIII 因子缺乏方面所扮演的角色已更能為人闡明了。

§、臨床意義：

至目前為止，已有許多的研究顯示 C 蛋白和血栓病發作有顯著的關連。一般而言，血中 C 蛋白含量減少的人較易有發生血栓的傾向 (危險性)。在許多家庭 (家族) 研究中曾發現 C 蛋白抗原含量低到常人的 40% 就足以造成復發性血栓病 (recurrent thrombotic disease)。例如 Griffen 曾診斷出一件家族性病例，其血中 antithrombin III (抗凝血酶 III) 和 plasminogen (血漿酶元) 含量適中，但只有約常人 38~49% 的 C 蛋白，此 case 是屬於遺傳性的 C 蛋白缺乏造成之復發性血栓病。

其它外國學者也有報告指出剛出生後不久之嬰兒，因缺少 C 蛋白而死亡於大量的靜脈血栓症 (massive venous thrombosis) 的病例。

C 蛋白缺乏是一種自體顯性遺傳 (autosomal dominant trait)，異合子型 (heterozygous) 會發生靜脈血栓性疾，同合子型 (homozygous) 則會造成新生兒期的致死性血栓症。此外，除了先天性 C 蛋白缺乏症，亦有後天性 C 蛋白缺乏症的報告，這些例子包括有新生兒、慢性肝病者、散佈性血管內凝血症 (DIC: Disseminated intravascular coagulation) 呼吸窘迫症候群 (Respiratory distress syndrome) 以及接受大或小手術後的病人。

罹患 C 蛋白的正常抑制劑之病人會有出血性病變。Suzuki 及其伙伴已描述出這種蛋白質的特性：乃一種分子量 57,000 的蛋白質，它是在肝中製造出來，然後循環於血漿中，正常血漿中蛋白質含量約 2.6~8.0 ug/ml。Carfield 及 Kisiel 發現正常患者 (normal patient) 及罹患複合性 V / VIII 因子缺乏之病人的血漿 C 蛋白之“抗凝劑” (anticoagulant) 並無明顯差異。

此處所謂正常患者乃指未缺少 V / VIII 因子之病人。

§、實驗室檢查及評估：

因為 C 蛋白在臨床診斷上的意義日形顯要，所以該項目測定已成為一項重要的診斷工具。目前已發展出之測試血漿 C 蛋白的方法，簡介於後：

一 Rocket electroimmunoassay method (“火箭式”電泳免疫分析法)

- (1) 原理：乃應用抗人類 C 蛋白的抗血清來測定 C 蛋白抗原。
- (2) N.R: 正常參考值約 4 ug/ml 或正常人的 71% 至 152%。

二 Functional assay (功能分析)

(1) 原理：乃利用純化的癩血調節素 (*thrombomodulin*) 活化血漿 C 蛋白並藉著醯胺溶解 (*amidolysis*) 活性來測定活化型 C 蛋白 (*activated protein C*) 。

(2) *N.R.*: 3.8 至 5.8 $\mu\text{g/ml}$ ，活性/抗原比例約 1.10 ~ 0.90。

(3) 測試方法：①將癩血調節素與癩血酶 (1 : 1 莫耳) 複合物加入血漿中活化 C 蛋白。

②利用山羊抗人類 C 蛋白 *Ig G agarose* 吸附活化型 C 蛋白 ~ 免疫吸附 (*immunosorbing*) 。

③然後與發色元性受質 (*chromogenic substance*) *S-2238* 一起孵育 (*incubate*) 。

(4) 附註：此法並不是測定活化型 C 蛋白分子的“抗癩劑”或“纖維蛋白溶解”，性質而是測其：①扮演“癩血酶 - 血調節素”受質的能力和②對合成的受質 (*synthetic substrate*) 之“溶醯胺”活性 (*amidolytic activity*) 。

雖然 C 蛋白測定對出血性疾和血栓症的診斷裨益良多，但所有的檢驗項目無一不是萬能的，C 蛋白測定也不例外，仍有些限制，現就簡述於後：

(1) 口服抗癩劑會擾亂到 C 蛋白缺乏症的診斷，因在治療期間，抗原量和維生素 *K* 依賴性癩血因子兩者皆會減低。

(2) 測定正在服用口服型抗癩劑的病人之 C 蛋白含量並不適當，因為 C 蛋白量在口服抗癩劑治療時降低的速率比 *X* 因子和癩血酶元還快，所以將會導致錯誤的結果。

此外，還有一點需注意的就是：在懷疑為 C 蛋白缺乏的病人中至少需測四次分隔時段的檢驗，並且必須在無癩血的情況下為之。

S、結論：

C 蛋白在調節癩血機轉方面扮演著一項主要的角色。

(1) 它是一種強效而具高度專一性的“抗癩劑”和有有效的“溶纖維蛋白劑”。

(2) 遺傳性和後天性 C 蛋白缺乏可導致血栓性疾，此時出血性病變乃源於伴隨抑制劑缺乏而來的複合性 *V/VIII* 因子缺乏症。

(3) C 蛋白缺乏可能是造成血栓性併發症 (*thrombotic complications*) 的首要原因，特別是發生在年輕的成年人。

S、未來展望

(1) 就目前吾人對 C 蛋白的認識來說，缺乏 *S* 蛋白或癩血調節素皆如同缺少 C 蛋白的患者般，會出現復發性血栓性併發症。

(2) 吾人可依發生在內皮細胞促成性 (*endothelial cell-mediated*) 的 C 蛋白活化作用方面之退化性血管病 (*degenerative vascular disease*) 的影響來作為探討血管病如何與血栓症相互關連的參考。

(3) 經過了多次體內和體外試驗與研究 C 蛋白的作用。吾人將可預期未來 C 蛋白，活化型 C 蛋白或者，血栓調節素也許可用於治療血栓性疾。若依目前的科技水準，相信不久後必能實現該項預期目標，讓我們共同期待“明天會更好”！

參考資料：

(1) Charles T. Esmon: Protein - C: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications. *Blood* 1983; 62(6): 1155 - 1158.

(2) Drakenberg T. Fernlund P, Roepstorff P, Stenflo T: β -hydroxy - aspartic acid in vitamin K - dependent protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:1802.

(3) Tonathan L, Miller: Blood.coagulation and fibrinolysis. in John Bernard Henry (eds): *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory methods.* ed. 17 U.S., W.B. Saunders Company, 1984, P.769

(4) Karol A. La Croix, Gerald L. Davis: A Review of Protein C and its Role in Hemostasis. *J Med Technol* 1985; 2(2): 95-98

(5) Marlar R. Kleiss A, Griffin J: Mechanisms of action of human activated protein C, A thrombin - dependent anticoagulant enzyme. *Blood.* 1982; 59: 1067

(6) Salem H, Broze G, Miletich J, Majerus P: Human coagulation factor Va is a cofactor for the activation of protein C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80: 1584