

## • 基础实验研究论著 •

## 比浊法血小板聚集试验的影响因素研究\*

石红婷<sup>1</sup>, 周伯荣<sup>1△</sup>, 王 融<sup>2</sup>, 邓燕华<sup>1</sup>, 关海涛<sup>1</sup>, 刘子凡<sup>1</sup>

(广州医学院附属第三医院: 1. 神经内科; 2. 检验科, 广州 510150)

**摘要:**目的 在不同的实验条件下, 观察影响比浊法血小板聚集试验的因素。方法 选择 30 例健康对照组和 204 例病例组, 观察不同的血小板计数及诱导剂浓度对糖尿病患者餐前与餐后、采血后的检测时间、诱导剂的种类互补等不同试验条件下的血小板聚集率。结果 随着血小板计数的减少或增加, 血小板聚集率相应的减少或增加; 二磷酸腺苷(ADP)、胶原(COL)、花生四烯酸(AA)浓度增加, 血小板最大聚集率增大, 相应的阿司匹林抵抗(AR)或氯吡格雷抵抗(CR)的检出率增高; 服用不同的抗血小板药物, 糖尿病患者对以 ADP、COL、AA 为诱导剂测定的血小板聚集率, 其影响不同; 未空腹及检测时间超过 3 h 重复性较差; 服药 2 周后, COL、AA 诱导的血小板聚集率下降不明显的患者, 随着时间的延长, 6 个月后易重新出现 CR。结论 血小板计数、诱导剂浓度、糖尿病疾病、空腹状态、检测时间与比浊法检测血小板聚集率相关, 以 ADP、COL、AA 作诱导剂检测血小板聚集率较单一的 ADP 更全面、准确。

**关键词:** 血小板聚集; 血小板聚集抑制剂; 血小板计数; 比浊法

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 07. 003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)07-0774-03

## Analysis of influencing factors of turbidimetry for platelet agglutination test\*

Shi Hongting<sup>1</sup>, Zhou Borong<sup>1△</sup>, Wang Rong<sup>2</sup>, Deng Yanhua<sup>1</sup>, Guan Haitao<sup>1</sup>, Liu Zifan<sup>1</sup>

(1. Department of Cerebrovascular; 2. Department of Clinical Laboratory, the Third Affiliated Union Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou Guangdong 510150, China)

**Abstract:** Objective To investigate the influencing factors of turbidimetry for platelet agglutination test under different experimental conditions. **Methods** 30 cases of healthy subjects and 204 cases of patents were enrolled. The rate of platelet aggregation (RPA) was detected under different conditions, including platelet counts, inducer concentration and types, diabetes mellitus (DM), fasting state and detection time. **Results** With the increase or decrease of platelet counts, RPA varied correspondingly. With the increase of the concentration of adenosine diphosphate (ADP), collagen (COL) and arachidonic acid (AA), the maxim RPA and the detection rate of aspirin resistance (AR) or clopidogrel resistance (CR) increased. For patients with DM, taking different antiplatelet drugs (aspirin or clopidogrel), inducers of ADP, COL and AA were with different influence on RPA. None-fasting and detection time over 3 hours could cause poor reproducibility. For patients, in whom RPA did not decreased significantly 2 weeks after treatment by the inducing of COL and AA, with the extension of time, CR could re-emerge. **Conclusion** Platelet counts, inducer concentration, diabetes mellitus, fasting state and detection time could influence the detection of RPA by turbidimetry, and the RPA was more comprehensive and accurate with combined use of ADP, COL and AA as the inducer than ADP alone.

**Key words:** platelet aggregation; platelet aggregation inhibitors; platelet count; turbidimetry

血小板聚集试验常用于抗血小板药物的治疗监测。光学比浊法是一种较简便、实用、经济的检测血小板聚集功能的方法, 然而此方法标本制备复杂, 需要的样本量大, 检测时间较长, 技术要求高, 需特殊的实验条件等多因素影响了其结果的重复性及稳定性<sup>[1]</sup>。Sharma 等<sup>[2]</sup>提出为什么仍不能准确检测服用抗血小板药物患者的血小板功能。为此, 本研究从优化比浊法血小板聚集功能试验的影响因素着手, 探讨血小板聚集试验在何种条件下稳定性较好, 并通过不同诱导剂的应用, 评价检测血小板聚集功能的全面性及准确性。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 健康对照组 30 例(未存在脑中高危因素及脑梗死等疾病), 为该院预防保健科中老年健康体检者; 病例组 204 例(存在脑中高危因素或脑梗死等疾病), 为 2010 年 9 月至 2011 年 10 月该院神经内科门诊或住院患者。入选标准: (1)首次服用氯吡格雷(75 mg/d)或阿司匹林(100 mg/d), 或以前曾服用但已停药至少 2 周以上, 且无其过敏者; (2)服用氯吡格雷与阿司匹林其中一种, 无同时服用者; (3)近 2 周末服用

双嘧达莫、噻氯匹定等对血小板功能有一定影响的药物; (4)无严重的心肝肾功能损伤或合并出血、肿瘤以及免疫系统、呼吸系统等疾病; (5)血小板计数大于  $100 \times 10^9/L$  且小于  $500 \times 10^9/L$ ; (6)近期无行较大手术或严重外伤者; (7)出院后按要求正规服用药物者; (8)年龄大于 45 岁且小于 85 岁; (9)定期门诊随诊者; (10)患者及家属知情同意者。

**1.2 仪器与试剂** LBY-NJ4 血小板聚集仪(北京普利生公司); 二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP, 美国 Sigma 公司); 胶原(collagen, COL, 美国 Beaumont TX 公司); 花生四烯酸(arachidonic acid, AA, 美国 Sigma 公司)。

### 1.3 抗血小板药物抵抗的定义及分组

**1.3.1 定义** 氯吡格雷抵抗(clopidogrel resistance, CR): 参照 Lev 等<sup>[3]</sup>的标准, 使用  $5 \mu\text{mol/L}$  ADP 作为激动剂的血小板聚集抑制率, 即氯吡格雷给药后(2 周)血小板聚集(platelet aggregation, PA)比基线下降幅度小于或等于 10%; 参照 Baragan 等<sup>[4]</sup>的标准, 用  $5 \mu\text{mol/L}$  ADP 作为激动剂, 在治疗的任何时间内血小板反应性大于 50%。阿司匹林抵抗: 参照 Gum

等<sup>[5]</sup>的标准给药后(2 周)用 10  $\mu\text{mol/L}$  ADP 作诱导剂,其血小板平均聚集率大于或等于 70%,同时用 0.5  $\mu\text{mol/L}$  AA 作诱导剂,其血小板平均聚集率大于或等于 20%为阿司匹林抵抗(aspirin resistance, AR),阿司匹林半抵抗(aspirin semiresponder, ASR)指在上述 2 个条件中只满足 1 个条件的患者。

**1.3.2 分组** 以 ADP、COL、AA 作诱导剂,先检测病例组服药前血小板聚集率(platelet aggregation rate, PAR),再测定服药 2 周后 PAR,按服药不同分为阿司匹林组(83 例)与氯吡格雷组(121 例);按疾病分为糖尿病组与非糖尿病组;按 CR 定义标准分为 CR 组与非 CR 组,选择非 CR 组的脑梗死患者(43 例)维持常规治疗,测定 6 个月后 PAR,分为新发 CR 组(8 例)与新发非 CR 组(35 例)。

**1.4 方法**

**1.4.1 PAR 测定** 采集入选者空腹静脉血 5~6 mL,置入含 3.8%枸橼酸钠溶液 0.5 mL 的硅化试管中轻轻颠倒摇匀 10 次,及时送标本到实验室(离体 3 h 内完成试验),将新鲜血液标本离心分别提取富含血小板的血浆(platelet rich plasma, PRP)和乏血小板的血浆(platelet poor plasma, PPP),在 PRP 中加入血小板诱导剂,使血小板发生聚集,血浆浊度发生改变,血浆浊度降低,透光度增加,连续记录 PRP 的透光度或吸光度变化,判断血小板的聚集功能。为排除人为因素的影响,本研究所有的标本是由同一名检验师完成。

**1.4.2 血小板计数的选择** 选择不同的离心力(500、800、1 000、1 200、1 500、2 000 r/min)和不同的离心时间(5、10、15、20 min)制备 PRP,用 PPP 把对应 PRP 中的血小板浓度分别配制为小于  $200\times 10^9/\text{L}$ (一般约为  $150\times 10^9/\text{L}$ ),( $200\sim 300$ ) $\times 10^9/\text{L}$ (一般约为  $250\times 10^9/\text{L}$ ),大于  $300\times 10^9/\text{L}$ (一般约为  $350\times 10^9/\text{L}$ )。以 ADP(5  $\mu\text{mol/L}$ )和 COL(2  $\mu\text{g/mL}$ )、AA(0.5  $\mu\text{mol/L}$ )作为诱导剂测定健康对照组的 PAR。

**1.4.3 诱导剂浓度及糖尿病疾病的选择** PRP 血小板浓度配制至约为  $250\times 10^9/\text{L}$ ,测定不同 ADP 浓度(3、5、10  $\mu\text{mol/L}$ )、不同 COL 浓度(1、2、4  $\mu\text{g/mL}$ )和不同 AA 浓度(0.25、0.5、1  $\mu\text{mol/L}$ )的服用抗血小板药物 2 周后病例组(30 例)的

PAR;选择糖尿病组与非糖尿病组,以 ADP(10  $\mu\text{mol/L}$ )、COL(2  $\mu\text{g/mL}$ )、AA(0.5  $\mu\text{mol/L}$ )作为诱导剂检测病例组的 PAR。

**1.4.4 空腹状态及检测时间的选择** PRP 血小板浓度约为  $250\times 10^9/\text{L}$ ,以 ADP(5  $\mu\text{mol/L}$ )作为诱导剂检测同一份标本不同条件下的 PAR,10 次。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料用( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间均数比较用  $t$  检验,两个变量之间相关关系采用双变量相关分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 不同血小板计数和诱导剂浓度对血小板聚集率的影响** 随着血小板计数的减少或增加,ADP、COL 和 AA 诱导的血小板聚集率相应地减少或增加;ADP、COL 和 AA 浓度增加,血小板最大聚集率增大,相应的 AR 或 CR 的检出率也增高。见表 1、图 1 和图 2。

**2.2 糖尿病组与非糖尿病组临床资料及血小板聚集率比较** 两组患者血糖浓度差异有统计学意义( $P<0.05$ ),性别、年龄、高血压等差异无统计学意义( $P>0.05$ );糖尿病组 AR 或 CR 发生率比例较高( $P<0.05$ ),但此发生率与血糖浓度不相关( $P>0.05$ );阿司匹林组糖尿病患者对以 AA 为诱导剂测定的血小板聚集率影响较大( $P<0.05$ ),氯吡格雷组糖尿病患者对以 ADP 为诱导剂测定的血小板聚集率影响较大( $P<0.05$ )。见表 2 和表 3。

**2.3 空腹与否和标本放置时间对检测血小板聚集率重复性的影响** 检测血小板聚集率,未空腹[( $60.9\pm 3.4$ )~( $25.3\pm 9.2$ )]、采血后的时间大于 3 h[( $66.3\pm 15.4$ )~( $29.7\pm 7.4$ )]较空腹小于 3 h[( $74.3\pm 14.7$ )~( $67.6\pm 16.4$ )]重复性差,10 次平均变异幅度差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.4 脑梗死患者服用氯吡格雷 6 个月后血小板聚集率比较** 新发 CR 组,ADP 诱导的血小板聚集率治疗 2 周后与治疗前比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 COL 和 AA 差异无统计学意义( $P>0.05$ );新发非 CR 组,ADP、COL 和 AA 诱导的血小板聚集率治疗 2 周及 6 个月 after 与治疗前比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 不同的血小板计数和诱导剂浓度对血小板聚集率的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 激动剂 | 血小板计数( $\times 10^9/\text{L}$ , $n=30$ 例) |                 |                 | 诱导剂浓度( $n=30$ 例)         |                 |                 |
|-----|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
|     | <200                                      | 200~300         | >300            | A1                       | A2              | A3              |
| ADP | 41.4 $\pm$ 15.4*                          | 56.3 $\pm$ 17.1 | 63.9 $\pm$ 17.9 | 38.6 $\pm$ 13.2 $\Delta$ | 49.1 $\pm$ 14.7 | 64.2 $\pm$ 11.9 |
| COL | 51.9 $\pm$ 15.2*                          | 63.9 $\pm$ 15.3 | 72.4 $\pm$ 14.3 | 45.7 $\pm$ 12.7 $\Delta$ | 55.8 $\pm$ 13.9 | 64.8 $\pm$ 11.6 |
| AA  | 33.2 $\pm$ 17.2*                          | 46.5 $\pm$ 17.9 | 53.2 $\pm$ 16.9 | 32.7 $\pm$ 9.8 $\Delta$  | 44.1 $\pm$ 13.1 | 55.4 $\pm$ 13.4 |

\*:  $P<0.05$ ,与同组血小板计数为( $200\sim 300$ ) $\times 10^9/\text{L}$  比较; $\Delta$ :  $P<0.05$ ,与同组诱导剂浓度为 A2 比较。

表 2 糖尿病组与非糖尿病组血小板聚集率的结果比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 激动剂 | 阿司匹林组( $n=83$ 例) |                  | 氯吡格雷组( $n=121$ 例) |                  |
|-----|------------------|------------------|-------------------|------------------|
|     | 糖尿病组( $n=26$ 例)  | 非糖尿病组( $n=57$ 例) | 糖尿病组( $n=31$ 例)   | 非糖尿病组( $n=90$ 例) |
| ADP | 48.7 $\pm$ 18.3  | 47.7 $\pm$ 15.1  | 46.6 $\pm$ 19.0   | 32.5 $\pm$ 14.7  |
| COL | 49.8 $\pm$ 23.4  | 46.4 $\pm$ 14.7  | 50.2 $\pm$ 14.7   | 46.4 $\pm$ 16.8  |
| AA  | 26.1 $\pm$ 19.0  | 17.5 $\pm$ 10.8  | 40.5 $\pm$ 16.9   | 35.7 $\pm$ 14.8  |

表 3 血糖浓度与 AR 或 CR 的关系比较

| 血糖浓度( $\mu\text{mol/L}$ ) | 阿司匹林组( $n=83$ ) |                  |             | 氯吡格雷组( $n=121$ ) |                  |             |
|---------------------------|-----------------|------------------|-------------|------------------|------------------|-------------|
|                           | AR 组( $n=25$ )  | 非 AR 组( $n=58$ ) | 相关系数( $r$ ) | CR 组( $n=27$ )   | 非 CR 组( $n=94$ ) | 相关系数( $r$ ) |
| 3~8                       | 16              | 47               | 0.18*       | 22               | 86               | 0.14*       |
| >8                        | 9               | 11               |             | 5                | 8                |             |

\*:  $P>0.05$ ,血糖浓度与 AR 或 CR 无相关关系。

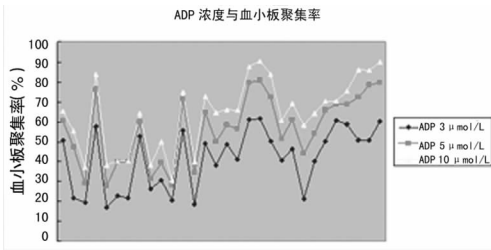


图 1 不同 ADP 浓度对血小板聚集率的影响

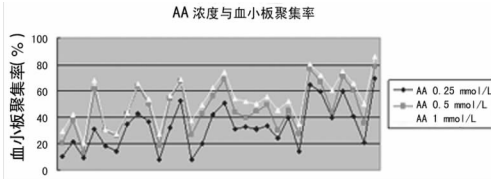


图 2 不同 AA 浓度对血小板聚集率的影响

### 3 讨论

比浊法检测血小板聚集功能是临床和研究中最常用的方法之一,并作为金标准<sup>[6-7]</sup>。曾有相关研究表明血小板浓度过低( $<200 \times 10^9/L$ )和过高( $>300 \times 10^9/L$ )都会影响血小板聚集率,从而不能将血小板聚集功能缺陷和增强的患者区分开<sup>[8]</sup>。本研究也显示,随着血小板浓度的减少或增加,ADP、COL 和 AA 诱导的血小板聚集率相应地减少或增加。Takuya 等<sup>[9]</sup>报道用  $1 \mu\text{mol/L}$  ADP, 8.3% 氯吡格雷抵抗;用  $4 \mu\text{mol/L}$  ADP, 18.1% 为抵抗。本试验表明随着 ADP、COL 和 AA 浓度增加,血小板最大聚集率增大,相应的抗血小板药物抵抗的检出率增高,但目前采用何种诱导剂浓度来检测血小板聚集功能尚未统一标准,多数临床检测 CR 采用  $5 \mu\text{mol/L}$  或  $20 \mu\text{mol/L}$  ADP,检测 AR 采用  $10 \mu\text{mol/L}$  ADP 及  $0.5 \mu\text{mol/L}$  AA 诱导剂作为检测剂量。

本研究结果显示,阿司匹林组糖尿病患者对 AA 为诱导剂检测的 PAR 影响较大,而氯吡格雷组对 ADP 为诱导剂检测的 PAR 影响较大,提示糖尿病患者可能与抗血小板药物抵抗有一定的关系。健康者胰岛素可通过抑制血小板 P2Y<sub>12</sub> 途径而降低血小板活化,减少血小板聚集<sup>[10]</sup>。Westerbacka 等<sup>[11]</sup>观察在胰岛素抵抗的肥胖症患者中胰岛素抗血小板的作用明显受限。Lepantalo 等<sup>[12]</sup>观察对氯吡格雷反应较低的患者糖化血红蛋白和 C 肽的水平均较高。本研究发现服用不同的抗血小板药物,糖尿病患者对 ADP、COL 和 AA 为诱导剂检测的血小板聚集率,其影响不同,且 AR 或 CR 的发生率与血糖浓度无明显相关性,可能与胰岛素抵抗等相关,尚需今后进一步研究论证。本试验分别对 10 例未空腹和离体超过 3 h 的同一份标本重复检测 10 次,发现其重复性较差,因此提示检测血小板聚集功能应空腹及在 3 h 内完成。

本研究考虑到随着使用氯吡格雷时间的延长,部分个体可能先后出现 CR,并且长期使用氯吡格雷理论上存在抗血小板聚集作用的逐渐下降,从而未真正起到防止血栓形成的作用。本组发现治疗 2 周后未发生 CR 的 43 例脑梗死患者中,6 个月后有 8 例新发 CR,其服药 2 周及 6 个月后 COL 和 AA 诱导的血小板聚集率都较高,表明早期仅 ADP 诱导的血小板聚集率下降大于 10%,而 COL 和 AA 诱导的血小板聚集率下降不明显的患者,随着时间的延长,易重新出现 CR,因此以 ADP、COL 和 AA 作激动剂检测血小板聚集率变化较单一的 ADP 能更早期筛选出 CR 患者,可更好地指导抗血小板药物的

应用。

综上所述,本研究表明血小板计数、诱导剂浓度、糖尿病疾病、空腹状态、检测时间与比浊法检测血小板聚集率相关,以 ADP、COL 和 AA 作诱导剂检测血小板聚集率变化较单一的 ADP 更全面。但本试验样本有限,尚存在着局限性,对比浊法血小板聚集试验的稳定性、全面性和准确性研究还需多中心、大样本的进一步研究。

### 参考文献

- [1] Gasparyan AY. Aspirin and clopidogrel resistance: methodological challenges and opportunities[J]. Vascular Health and Risk Management, 2010, 6(8): 109-112.
- [2] Sharma RK, Reddy HK, Singh VN, et al. Aspirin and clopidogrel hyporesponsiveness and nonresponsiveness in patients with coronary artery stenting[J]. VASC Health Risk Manag, 2009, 5(3): 965-972.
- [3] Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, et al. Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention; the role of dual drug resistance[J]. J Am COLL Cardiol, 2006, 47(1): 27-33.
- [4] Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, et al. Resistance to thienopyridines: clini-phosphoprotein phosphorylation [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2003, 59(3): 295-302.
- [5] Gum PA, Kottke KM, Poggio ED, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 2001, 88(3): 230-235.
- [6] Gurebl P, Becker RC, Mann KG, et al. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease[J]. J Am COLL Cardiol, 2007, 50(19): 1822-1834.
- [7] Harrison P. Platelet function analysis[J]. Blood Reviews, 2005, 19(9): 111-123.
- [8] 李涛, 屈晨雪, 王建中, 等. 光学比浊法血小板聚集试验的标准化研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(12): 2041-2043.
- [9] Takuya F, Daisuke F, Takeda H, et al. Evaluation of clopidogrel resistance in ischemic stroke patients[J]. Internal Medicine, 2011, 50(22): 31-35.
- [10] Matsuno H, Tokuda H, Ishisaki A, et al. P2Y<sub>12</sub> receptors play a significant role in the development of platelet microaggregation in patients with diabetes[J]. J CLIN Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 920-927.
- [11] Westerbacka J, Yki HJ, Turpeinen A, et al. Inhibition of platelet-collagen interaction: an in VIVO action of insulin abolished by insulin resistance in obesity[J]. Arterioscler Thromb VASC BIOL, 2002, 22(1): 167-172.
- [12] Lepantalo A, Virtanen KS, Heikkilä J, et al. Limited early antiplatelet effect of 300mg clopidogrel in patients with aspirin therapy undergoing percutaneous coronary interventions [J]. EUR Heart J, 2004, 25(6): 476-483.

(收稿日期: 2012-02-01)