

• 论 著 •

血小板聚集功能检测方法及参数的探索与研究

楚杜武¹, 任军伟², 丛玉隆^{3△}

(1. 北京世纪坛医院检验科 100038; 2. 兵器工业北京北方医院检验科, 北京 100089;

3. 解放军总医院西院检验科, 北京 100853)

摘要:目的 采用 5 种血小板聚集功能分析仪探讨研究血小板聚集功能检测的可靠方法与准确参数。方法 利用二磷酸腺苷(ADP)诱导光比浊血小板聚集仪(LTA)实验,流式细胞仪(FC)血小板膜糖蛋白分子 PAC-1(Fg、Ca²⁺、GP II b/III a 形成复合物的受体)、CD62p(P 选择素)活化百分率检测实验,英诺华 PL-11 血小板分析仪实验,VerifyNow 抗血小板治疗监测系统实验(VerifyNow)与血栓弹力图实验(TEG)同时检测对照组与单服用氯吡格雷组的小血小板聚集功能。结果 (1)对照组与患者组 ADP%, ADP 激活的 PAC-1、CD62p 受体活化百分率, MAR%, INHI%, TEG 测得 ADP 诱导的 MA(mm)值 6 个参数差异有统计学意义($P < 0.05$); BASE、P2Y12 受体的 PRU, 凝血酶诱导的 MA(mm)值 3 个参数差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (2) ADP% 与 (100-INHI)%, MAR%, ADP 激活的 CD62p、PAC-1 受体活化百分率呈正相关(r 分别是 0.565、0.939、0.769 和 0.583, $P < 0.05$); 与 TEG 测得 ADP 诱导的血小板聚集率值(% Agg)无相关性($r = 0.127, P > 0.05$)。结论 (1)氯吡格雷有抗血小板聚集的效果。 (2)LTA 操作便捷、廉价、结果稳定,在医院普及率高,是临床监测血小板聚集功能的首选方法。

关键词:血小板; 流式细胞仪; 血小板膜糖蛋白; 二磷酸腺苷

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.025

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2270-03

Investigation of detection methods for aggregation function of platelets

CHU Duwu¹, REN Junwei², CONG Yulong^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China; 2. Department of Clinical

Laboratory, Beijing North Hospital of China North Industries Group Corporation (CNGC), Beijing 100089, China;

3. Department of Clinical Laboratory, West Branch Hospital, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: **Objective** To adopt 5 kinds of platelets aggregation function analyzer to explore and study the reliable method for detecting the platelets aggregation function and accurate parameters. **Methods** The platelets aggregation function in the control group and the single clopidogrel group was simultaneously detected by utilizing the ADP induced light turbidimetric platelet aggregation analyzer (LTA) test, flow cytometry for PAC-1 (receptor of Fg, Ca²⁺, GP II b/III a forming complex) and CD62p (P selectin) activation percentage detection test, Innova PL-11 for platelets analysis test, VerifyNow anti-platelet therapy monitoring system and thrombelastogram (TEG). **Results** (1) The 6-parameter differences of ADP%, PAC-1 and CD62p receptor activation percentage activated by ADP, MAR%, INHI%, ADP induced MA value (mm) detected by TEG had statistical differences between the control group and the case group ($P < 0.05$); PRU of BASE and P2Y12 receptor, thrombin induced MA value (mm) had no statistical differences between these two groups ($P > 0.05$). (2) ADP% was positively correlated with (100-INHI)%, MAR%, ADP activated CD62p and PAC-1 receptor activation percentage ($r = 0.565, 0.939, 0.769, 0.583, P < 0.05$); while which had no correlation with ADP induced platelets aggregation value (% Agg) detected by TEG ($r = 0.794, 0.715, 0.889$). **Conclusion** (1) Clopidogre has the anti-platelets effect. (2) LTA is easily operating, cheap and stable in detection results, has high popularizing rate in hospitals and is the first option method for clinically monitoring the platelets aggregation function.

Key words: platelet; flow cytometry; PAC-1; CD62p; ADP

目前,我国心血管疾病患者人数已超过 2.7 亿,按全国人口 14 亿计算,近 5 个中国人中就有 1 人罹患心血管疾病。氯吡格雷现在已经成为心血管病患者最常用的抗血小板药物之一,如何更有效、更准确掌握个体患者的服药效果,科学施治,就要求有更好的临床检验监测手段。当前,主要方法包括:光比浊法血小板聚集仪(LTA)实验是观察氯吡格雷药效的金标准^[1];流式细胞仪(FC)血小板膜糖蛋白分子检测是一种在分子水平观察血小板聚集功能的新方法;VerifyNow 抗血小板治疗监测系统(VerifyNow)是近几年在国际上逐渐推广应用的新型比浊法抗血小板药物治疗监测系统;血栓弹力图(TEG)最早应用于输血的监测,目前经过改良后作为凝血监测方案已经在全世界 40 多个国家使用^[2]。阻抗法连续监测血小板聚集

的新型仪器包括英诺华 PL-11 分析仪等。这些方法各有怎样的优势和缺陷?本文通过对其功能与参数的对比、探讨,希望能够得出稳定、准确的测试方法及参数,使临床工作者选择准确、经济、有效、直接、快速的实验方法服务于患者。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 CHRONO-LOG MODEL700 血小板聚集分析仪及其配套试剂(美国 CHRONO-LOG 公司);BD FACS-Calibur 流式细胞仪(FC)及其配套原装试剂(美国 BD 公司);VerifyNow 抗血小板治疗监测系统(香港新仪仪器有限公司引进)及其配套光路质控板,试剂质控物, P2Y12 阻断剂检测板,枸橼酸钠真空采血管;Thrombelastograph 分析仪、配套高岭土试剂瓶及一次性测试杯(美国 Haemoscope 公司);PL-11 血小

板聚集分析仪及配套试剂(南京神州英诺华医疗科技有限公司);Thermo IEC CL40 离心机(美国 Thermo 公司);Sysmex XE-2100 血细胞分析仪及其配套试剂(日本 Sysmex 公司);枸橼酸钠抗凝管(美国 BD 公司)。

1.2 观察对象及标本采集 (1)使用随机数字法选取从 2011 年 7~10 月在解放军总医院健康体检的 17 例健康志愿者,其中男 15 例,女 2 例,年龄最大者 69 岁,最小者 46 岁,平均 59 岁;使用随机数字法选取 2011 年 7~11 月在解放军总医院心血管内科就诊的单独服用氯吡格雷(75 mg/d)10 d 以上的心脑血管病患者 10 例,年龄最大者 74 岁,最小者 49 岁,平均 61 岁。(2)用 5 支 3.8%枸橼酸钠抗凝和 1 支肝素抗凝真空采血管采集静脉血;5 支 3 mL,1 支 2 mL。其中 1 支 3 mL 枸橼酸钠抗凝血样在离心前先取出混匀全血 5 μ L 用于 FC 血小板膜糖蛋白 PAC-1、CD62p 受体检测,然后进行英诺华 PL-11 血小板分析仪实验;2 支 3 mL 血样进行 LTA 实验;1 支 2 mL 血样进行 VerifyNow 实验;1 支 3 mL 枸橼酸钠抗凝和 1 支 3 mL 肝素抗凝血样进行 TEG 实验。

1.3 方法 (1)二磷酸腺苷(ADP)激活 FC 血小板膜糖蛋白 PAC-1、CD62p 受体活化百分率检测:在室温 24~28 $^{\circ}$ C^[3],荧光素标记的抗血小板单克隆免疫荧光染色,在阴性对照管中加鼠 IgG1-FITC、CD61-PE 各 20 μ L,测定管中加入 CD62P-FITC、PAC-1-FITC 各 20 μ L,再分别加入 5 μ L 全血。置室温避光反应 15 min,立即加入 110 mL1%多聚甲醛(2~6 $^{\circ}$ C)混匀,2~8 $^{\circ}$ C 阴暗处放置 30 min,立即上机获取数据,检测血小板膜糖蛋白 PAC-1、CD62p 受体活化百分数。(2)加入 10 μ mol/L ADP 诱导剂进行 LTA 实验,用血细胞分析仪测定富血小板血浆(PRP)的血小板浓度,用贫血小板血浆(PPP)调整 PRP 血小板浓度为(200~300) $\times 10^9$ /L^[3],检测 ADP 诱导血小板聚集率。(3)VerifyNow 实验:先做光路质控,然后取 2 mL 的 Verifynow 专用枸橼酸钠抗凝真空采血管标本,于 24~28 $^{\circ}$ C 稳定 10 min^[3],上下颠倒混匀 10 次,倒插入分析仪中,3 min 后打印结果。(4)TEG 实验:运行 ADP 血小板图检测需采用 3 个通道,严格按照仪器说明书操作。第 1 个通道:枸橼酸化高岭土激活全血测试;第 2 个通道:A 激活剂激活的样品测试;第 3 个通道:ADP 激活样品测试,合成 3 个测试图得出血小板的氯吡格雷(ADP 受体抑制药物)抑制率。(5)英诺华 PL-11 实验:将标本置于仪器的待测试位置,按“检测”键,直至仪器提示“加入诱聚剂”,用移液器抽取 40 μ L 的诱聚剂加入标本中即可,等待测试完毕,打印结果。

1.4 观察指标 ADP 诱导 LTA 测得血小板聚集率(ADP%);FC 测得 ADP 激活血小板膜糖蛋白 PAC-1 和 CD62p 受体活化百分率;VerifyNow 测得血小板聚集基线(BASE)、P2Y12 受体的 Reaction Units 值(PRU),血小板聚集抑制百分数(INHI%);TEG 测得 ADP 诱导最大幅度(MA)(mm)值,凝血酶诱导 MA(mm)值;英诺华 PL-11 测得最大聚集率(MAR%)。

1.5 统计学处理 用 EXCEL2007 整理数据,用 SPSS13.0 软件包进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,如果不符合正态分布,组间比较使用 Mann-Whitney 两个独立样本非参数检验法,若服从正态分布使用配对 t 检验。所有观察对象 5 种测试方法测得参数的双变量相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与患者组观察指标对比 两组检测的 ADP%,ADP 激活的 PAC-1、CD62p 受体活化百分率, BASE、P2Y12 受体的 PRU, INHI%, TEG 测得 ADP 诱导的 MA(mm)值,凝血酶诱导的 MA(mm)值, MAR%结果见表 1。

表 1 各仪器测得对照组与单服氯吡格雷组参数对比($\bar{x} \pm s$)			
各仪器测得结果	对照组	单服氯吡格雷组	P
LTA 测得的 ADP%	71.4 \pm 13.8	44.5 \pm 14.2	<0.01
FC 测得的 ADP 激活 PAC-1 活化百分率(%)	89.1 \pm 12.0	41.1 \pm 11.9	<0.01
FC 测得的 ADP 激活 CD62p 活化百分率(%)	88.1 \pm 6.9	55.3 \pm 14.8	<0.01
PL-11 测得的 MAR%	70.1 \pm 9.0	53.7 \pm 6.3	<0.01
Verifynow 测得的 PRU	277.0 \pm 56.4	247.0 \pm 101.3	>0.05
Verifynow 测得的 BASE	302.0 \pm 52.4	340.0 \pm 80.5	>0.05
Verifynow 测得的 INHI(%)	11.2 \pm 8.8	29.3 \pm 16.9	<0.05
TEG 测得的 MA(ADP)(mm)	32.2 \pm 17.4	46.7 \pm 2.3	<0.05
TEG 测得的 MA(凝血酶)(mm)	7.2 \pm 7.4	13.8 \pm 9.3	>0.05

2.2 LTA、FC、VerifyNow、TEG、PL-11 测得所有观察对象相关性 本实验观察对象的 ADP%,ADP 激活的 PAC-1、CD62p 受体活化百分率, INHI%, TEG 测得 ADP 诱导的血小板聚集率值(TEG_{ADP%}), MAR%统计学双变量相关性参数见表 2。

表 2 LTA、FC、VerifyNow、TEG、PL-11 测得所有观察对象相关性						
指标	(100-INHI)%	MAR%	ADP 激活 CD62p 活化百分率(%)	ADP 激活 PAC-1 活化百分率(%)	ADP%	%Agg
(100-INHI)%	1	0.518*	0.642	0.569	0.565	-0.211*
MAR%	0.518*	1	0.802	0.632	0.939	0.059*
ADP 激活 CD62p 活化百分率(%)	0.642	0.802	1	0.877	0.769	-0.145*
ADP 激活 PAC-1 活化百分率(%)	0.569	0.632	0.877	1	0.583	0.036*
ADP%	0.565	0.939	0.769	0.583	1	0.127*
TEG _{ADP%}	-0.211*	0.059*	-0.145*	0.036*	0.127*	1

注: * $P > 0.05$,表示相关性差,且单变量方差分析斜率差异性检验 $P < 0.05$,即直线斜率、截距有差异;其他参数 $P < 0.05$,相关性良好,且单变量方差分析斜率差异性检验 $P > 0.05$,即直线斜率、截距无差异。

3 讨 论

血小板活化后,颗粒膜蛋白 CD62p、PAC-1 活性显著性改变^[4]。PAC-1 与血小板表面的 GPII b/III a 和纤维蛋白原(Fg)结合^[5],在 Ca²⁺ 的协助下发生血小板聚集^[2]。所以,检测血小板聚集功能对于早期血栓形成的风险评估,阐明疾病的病理机制及临床治疗方案的选择有重要意义。

LTA 经过 PRP 与 PPP 透光度对比,经光电转换换算为聚集百分数 ADP%^[3]。FC 以检测血小板早期活化标志物 PAC-1^[6] 及后期活化标志物 CD62P 来分析血小板聚集功能。VerifyNow 通过加入前列腺素 E1(PGE1)抑制 ADP 与 P2Y1 受体结合,特异性检测服用噻氯吡啶类药物(如氯吡格雷)抑制 P2Y12 后的血小板聚集功能。同时,以凝血酶激活通路(不受 P2Y12 阻断剂影响)的血小板聚集值作为基线,两者对比后得出 INHI%。TEG 早期用于临床输血,近年扩展到心脑血管疾病的风险评估、预测、监测^[6-7]。原理:枸橼酸化高岭土激活全血测得 MA 值(TEG 图中两线之间最大距离的 1/2,表示血块聚集的最大强度,MA_{高岭土}),激活剂 A 测得 MA 值(纤维蛋白作用部分,MA_A),ADP 测得 MA 值(MA_{ADP}),经公式 $ADP_{TEG-INHI}(\%) = \frac{MA_{高岭土} - MA_{ADP}}{MA_{高岭土} - MA_A} \times 100\%$ 计算。此凝血监测方案已在世界 40 多个国家使用^[3]。PL-11 通过加入 ADP 诱导血小板聚集前、后的血小板数量对比得出聚集率,反映血小板聚集功能。

本实验中,5 个仪器测得的健康对照组与单服氯吡格雷组参数对比,发现 VerifyNow 测得的 PRU、BASE 与 TEG 测得的 MA(凝血酶)(mm)3 个参数之间差异无统计学意义。可能原因:BASE 是凝血酶通路的血小板聚集率,MA(凝血酶)(mm)也是凝血酶激活的血小板聚集幅度值,这两个参数无差异。这说明本次实验健康对照组与患者组在凝血酶引起的凝血功能方面差异没有统计学意义,但并不能下结论:凝血酶诱导的血小板聚集功能无差别。原因有二:(1)凝血酶是人体凝血系统最主要的节点,它不仅与血小板功能相关性强,与凝血因子的功能相关性也很强。此结果的产生很可能是两者共同合力的作用,本研究并未分析凝血因子方面的状况。(2)本实验中,观察例数还不足,普遍性有待进一步的研究。其他 ADP%、ADP 激活的 PAC-1、CD62p 受体活化百分率,INHI%,TEG 测得 ADP 诱导的 MA(mm)值 6 个参数有差异,证明氯吡格雷有一定的抗血小板聚集功能,但是抑制强度不强。可能是其药效比较温和,或者是与遗传变异性、患者依从性差、氯吡格雷剂量不足以及 CYP3A4 相关的药物间相互作用等因素有关^[8]。从表 2 的结果可以看出其中相关性最好的是 ADP%和 MAR%。同时,ADP%与其他参数(TEG 测得的% Agg 除外)相关性都较好,说明了 LTA 是检查血小板聚集功能的良好方法。而其他仪器参数之间相关性一般,说明 Veri-

fyNow、FC 两种方法与 LTA 比较起来,优点并不明显。TEG 结果和其他 4 种仪器的分析结果基本无相关性,原因有:(1)本实验的检测例数较少,偶然性较大;(2)此方法学存在缺憾。具体原因需要同行们进行更深入的研究。

综上所述,PL-11 有一定的准确性与可靠性,可供临床选择;FC 特异性好、灵敏度高,但费用昂贵,对操作技能要求高,可作为常规结果的辅助性确认;VerifyNow 操作简便,适用于急诊、床边检验(POCT);TEG 展示凝血全过程,其中可发现各环节的缺陷与异常,适于凝血系统异常的观察判断。LTA 操作便捷、廉价、结果稳定,在医院普及率高,是临床监测血小板聚集功能的首选方法。

参考文献

[1] Jeong YH, Kim IS, Choi BR, et al. The optimal threshold of high post-treatment platelet reactivity could be defined by a point-of-care VerifyNow P2Y12 assay[J]. Eur Heart J, 2008, 29(17): 2186-2187.

[2] Hobson AR, Petley GW, Dawkins KD, et al. A novel fifteen minute test for assessment of individual time-dependent clotting responses to aspirin and clopidogrel using modified thrombelastography[J]. Platelets, 2007, 18(7): 497-505.

[3] 任军伟, 张艳萍, 丛玉隆, 等. 血栓弹力图与光电比浊法检测氯吡格雷抗血小板功能[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 48-50.

[4] 徐敬敏, 陈颖, 胡有东. 急性脑梗死硫酸氢氯吡格雷治疗前后 CD62P 和 CD63 的关系[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(8): 1834-1835.

[5] 张妍, 段传志, 李铁林, 等. 血小板活化特异性标志物 PAC-1 和 CD62p 与急性脑梗死病情严重程度的相关性[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2011, 37(11): 698-701.

[6] Swallow RA, Agarwala RA, Dawkins KD, et al. Thromboelastography: potential bedside tool to assess the effects of antiplatelet therapy? [J]. Platelets, 2006, 17(6): 385-392.

[7] 李建华, 曹剑, 范利. 氯吡格雷抵抗临床防治的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(12): 1324-1326.

[8] 关杰, 任军伟, 朱远, 等. 光学比浊法与连续血小板计数法监测血小板聚集功能的比较[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(8): 838-841.

(收稿日期:2016-02-28 修回日期:2016-06-27)

(上接第 2269 页)

[6] 檀玉芬, 闫惠平, 赵艳, 等. 丙型肝炎和自身免疫性肝炎自身抗体的特点分析[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(5): 622-625.

[7] 王妙婵, 徐爱芳, 刘苑. 慢性乙肝进展过程中自身抗体检测的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 852-853.

[8] 李昌华, 杨广燕. 慢性丙肝患者血清中自身抗体的检测以

及临床意义评估[J/CD]. 临床医药文献电子杂志, 2015, 23(23): 4762.

[9] 赵明才, 陈琼, 罗光成, 等. 乙型肝炎和丙型肝炎患者血清抗肝特异性抗体测定[J]. 川北医学院学报, 2012, 27(5): 450-453.

(收稿日期:2016-03-07 修回日期:2016-06-13)