

- cal relevance[J]. Eur Respir J, 2010, 35(6): 1312-1321.
- [22] Dik WA. Acute lung injury: can the fibrocyte of Today turn into the fibroguide of the future? [J]. Crit Care Med, 2012, 40(1): 300-301.
- [23] Herzog EL, Bucala R. Fibrocytes in health and disease [J]. Exp Hematol, 2010, 38(7): 548-556.
- [24] Murdoch C. CXXR4: chemokine receptor extraordinaire. Immunol Rev, 2010, 177: 175-184.
- [25] Hartert TV, Peebles RS. Epidemiology of asthma: the year in review[J]. Curr Opin Pulm Med, 2000, 6(1): 4-9.
- [26] Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, et al. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma[J]. Am Rev Respir Dis, 1985, 131(4): 599-606.
- [27] Schmidt M, Sun G, Stacey MA, et al. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma[J]. J Immunol, 2003, 171(1): 380-389.
- [28] Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, et al. The registry

• 综述 •

血小板微粒在血栓性疾病中的诊断价值

杨正亮, 金红, 李琪, 陈宏娟 综述, 闫海润[△] 审校
(牡丹江医学院红旗医院检验科, 黑龙江牡丹江 157011)

关键词: 血小板微粒; 血栓性疾病; 血栓形成

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.034

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2016)16-2292-03

在血栓形成过程中, 血管内皮细胞的受损起着非常重要的作用。内皮受损后暴露的胶原激活人体的凝血因子引起血小板聚集, 引发凝血过程。血小板在活化的同时释放血小板微粒, 血小板微粒具有促凝功能。目前, 血小板微粒的检测方法主要是通过流式细胞技术, 具有非常高的精确度。血小板微粒在冠心病、脑梗死、慢性阻塞性肺疾病、糖尿病等多种血栓性疾病发病及病程发展过程中都发挥着重要作用。现就血栓形成过程、血小板微粒的生理功能、血小板微粒的检测方法以及血小板微粒在血栓性疾病形成过程中的作用进行论述。

1 血栓的形成过程

在人体血液中存在凝血与抗凝血两大系统。人体正常的生理状态下, 游离在血液中的凝血因子持续被有限地激活, 激活的凝血因子产生凝血酶, 然后催化纤维蛋白原形成少量的纤维蛋白并在心血管内膜上沉积。与此同时, 这些沉积的纤维蛋白又持续被激活的纤维蛋白溶解系统所溶解。被激活的凝血因子在发挥作用后又不断被单核巨噬细胞吞噬。这种凝血系统和纤维蛋白溶解系统在血液中所维持的动态平衡, 既维持了血液潜在的可凝固性, 又保证了血液的流体状态^[1]。但是, 在一些能够触发血液凝固的影响因素作用下, 以上动态平衡很快被打破, 一旦触发了人体的凝血机制, 就会导致血栓形成^[2]。

2 血小板微粒的生理功能

1967年, Wolf率先报道了血小板微粒的存在, 并且将它定义为“血小板尘埃”^[3]。血小板微粒是从血小板质膜中脱落而来的细小颗粒, 有完整的血小板膜蛋白以及膜脂质等结构^[4], 主要在血栓的形成、促炎性反应以及调节血管功能方面

of the international society for heart and lung transplantation: twentieth official adult lung and heart-lung transplant report-2003[J]. J Heart Lung Transplant, 2003, 22(6): 625-635.

- [29] Vanaudenaerde BM, Meyts I, Vos R, et al. A dichotomy in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation revealed by azithromycin therapy[J]. Eur Respir J, 2008, 32(4): 832-843.
- [30] Lapar DJ, Burdick MD, Emaminia A, et al. Circulating fibrocytes correlate with bronchiolitis obliterans syndrome development after lung transplantation: a novel clinical biomarker[J]. Ann Thorac Surg, 2011, 92(2): 470-477.
- [31] Fujiwara A, Kobayashi H, Masuya M, et al. Correlation between circulating fibrocytes, and activity and progression of interstitial lung diseases[J]. Respirology, 2012, 17(4): 693-698.

(收稿日期: 2016-01-28 修回日期: 2016-03-27)

发挥作用^[5-6]。

血小板微粒包含着一个特殊的蛋白质子集, Kim等^[7]用异硫氰酸荧光素(FITC)标记血小板微粒的膜联蛋白V, 然后把一部分用FITC标记的血小板微粒膜蛋白V再用细胞膜红色荧光探针(DiI-C18)标记, 通过标记的DiI-C18可以表明一些血小板微粒是由幼稚的血小板衍生而来。此外, 用GPⅡb抗体标记所有血小板衍生的微粒, 发现被GPⅡb抗体标记的微粒比被DiI-C18标记的微粒占的比例要高, 这表明血小板微粒由幼稚和成熟的血小板衍生而来。

血小板微粒是无生物学活性的细胞代谢物^[8], 但最近研究发现血小板微粒也可能在炎症、血栓形成以及血管收缩功能中发挥重要作用^[9]。血小板微粒浓度增高提示血液处于高凝状态, 发生静脉血栓的风险明显增高, 患者的预后不良^[10]。此外, 血小板微粒是血液循环中组织因子的主要载体, 组织因子是血栓形成的主要刺激物。Ramacciotti等^[11]在小鼠静脉血栓模型中发现微粒的浓度与组织因子活性有密切的联系。含有组织因子的微粒很可能成为一种有用的血栓形成特异性生物标志物。最近的研究发现微粒可携带RNA和DNA。在人体外, 微粒可携带细胞核RNA和DNA, 也可以携带细胞质RNA和DNA, 尤其是相对分子质量低的RNA。微粒可以将相对分子质量低的RNA从内皮祖细胞转运到内皮细胞, 来刺激血管的生成^[12]。

在血小板微粒的生理功能中, 最具有特征性的是血小板微粒可以通过提供阴离子磷脂表面和组织因子参与血液凝固。研究表明, 血管壁受损伤后, 血管内皮细胞脱落而导致内皮组

分暴露,其中胶原、板层素、微纤维及血管性血友病因子将会引起血小板的黏附、聚集和活化反应,产生血栓素 A2 和内皮素,使血管呈持续收缩状态^[13]。而当血小板黏附、聚集或活化时,释放出来的血小板激活因子的活性源自血小板微粒,血小板激活因子在其他激活途径下也多数与血小板微粒相关^[14],这说明了血小板微粒有很强的促凝活性。此外,研究还发现存在于血小板微粒膜上的磷脂酰丝氨酸可形成阴离子磷脂,能促进凝血酶的产生并增强组织因子的催化活性,表现出对凝血反应的促进。

在临幊上,血栓的形成是心血管事件发生非常关键的环节,也是导致患者致死率和致残率居高不下的直接原因^[15]。在对冠状动脉疾病发病机制的研究过程中,血小板微粒的作用正在引起临幊医生的注意,大量的临床试验正在对它们之间的关系进行研究。血小板微粒可能会干扰相关组织因子的表达,组织因子是人体外源性凝血途径的引发因子,血小板微粒通过这一途径可引发血栓性疾病^[16]。

3 血小板微粒的检测方法

3.1 显微镜法 最原始的检测血小板是显微镜法,使用电子显微镜可以比较直观地看到血小板微粒的外部形态以及其内部结构,但是这种方法操作繁琐,检测效率不高,准确性差且检测的精密度和分辨率不能满足临幊诊断的要求。

3.2 放射性免疫标记单抗体法 放射性免疫标记的单抗体法是先把检测标本(血清或者贫血小板血浆)离心,离心后用磷酸盐缓冲液进行1~2次洗涤沉淀,在沉淀物中加入用¹²⁵I标记的抗微粒膜上相关蛋白,待反应后再次进行洗涤,最后用计数仪或胶片曝光测洗涤沉淀物的放射剂量,从而计算出血小板微粒的含量。这种方法使用放射性碘作为标记物,由于这种放射性污染物对操作人员的健康和环境都有危害,已经逐渐被淘汰。

3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA) ELISA的原理是用血小板微粒与制备好的纯化CD41和CD42b抗体结合,形成免疫复合物,再经过温育和洗涤,去除未结合的抗体,加底物显色。ELISA的敏感性和特异性都非常高,但是由于可溶性抗原对检测结果干扰较大,容易出现假阳性或假阴性结果。

3.4 流式细胞术 流式细胞仪应用于医学领域的研究是医学发展的一个重要里程碑,流式细胞分析基于细胞自身的物理、化学特性,借助流式细胞仪的单细胞高速、精确分析技术,通过阈值、光电倍增管电压设定、阴性对照设置、荧光补偿调节以及多方式设门等操作步骤对目标细胞的理化特性进行精准分析^[17]。

流式细胞技术应用于血小板微粒的检测,是用FITC标记抗CD41a抗体,用流式细胞仪对标本进行检测,通过高精密的荧光信号转化系统和数据分析系统把血小板微粒的数量及浓度计算出来。这种方法最大的优点是高效快速,精密度高,避免了人为原因造成的结果偏差。此外,流式细胞仪可以对选中的细胞群进行数据分析,能有效地避免白细胞和红细胞对检测结果的干扰。目前,流式细胞技术已经是血小板微粒检测应用最实用的方法。

4 血小板微粒与血栓性疾病

4.1 冠心病 冠心病患者由于不稳定的动脉粥样硬化斑块破裂、糜烂以及出血,继而引发血小板聚集或血栓形成导致冠状动脉狭窄的程度加剧,或者是冠状动脉发生痉挛,导致心肌细胞供氧不足,清除心肌细胞代谢所产生的废物的能力丧失^[18]。当冠状动脉管壁的内皮细胞层破坏后被粥样斑块所取代,血小板在粥样斑块附近发生聚集,被激活后释放大量的凝血因子以

及血小板微粒,可进一步导致冠状动脉血管管壁狭窄甚至完全闭塞,造成心肌梗死。有研究表明:与健康患者相比,冠心病患者活化后的血小板释放更多微粒^[19]。目前对冠心病引起血小板微粒水平升高原因的研究倾向于认为与血管内皮功能失调,冠状动脉血管产生炎性反应以及冠状动脉内血流剪切力的改变^[20]。

4.2 脑梗死 脑梗死也称为缺血性脑卒中,它是由于多种原因所引起的大脑血液供应障碍,致使大脑局部组织缺血、缺氧而坏死,最终出现相应的神经功能缺失^[21]。目前,临幊上最常用的牛津郡社区卒中研究分型(OCSP)标准把脑梗死分为4型:腔隙性梗死型(LACI),部分前循环梗死型(PACI),后循环梗死型(POCI),完全前循环梗死型(TACI)^[22]。根据脑组织缺血坏死的机制,脑梗死分为3种病理生理学类型:脑血栓形成、脑栓塞和血流动力学机制造成的脑梗死^[23]。其中,血栓形成是脑梗死最常见的病理生理学类型,而动脉粥样硬化是血栓形成的根本原因。有关对急性脑梗死患者调查结果显示:与健康人群相比,急性脑梗死患者血液中血小板微粒浓度明显增高^[20,24]。

4.3 慢性阻塞性肺疾病 慢性阻塞性肺疾病是一种呼吸道和肺对有毒气体或颗粒的慢性炎性反应,其发病机制仍然没有被明确论述,因此临幊上对慢性阻塞性肺疾病的治疗仅仅停留在对症治疗的层面。目前,慢性阻塞性肺疾病的发病率和病死率呈逐年上升趋势,对其发病机制的研究就显得尤为重要。对慢性阻塞性肺疾病患者血液中血小板微粒水平监测的研究发现,有些患者血液中血小板微粒升高,血液处于高凝状态,发生血栓的风险比健康人要高^[25]。这提示血小板微粒在慢性阻塞性肺疾病的发病过程中起着促炎和促凝的作用。

4.4 糖尿病 糖尿病是一种由于多种因素引起的以持续性处于高血糖状态为主要特征的全身性代谢紊乱,糖尿病可以引起多个器官损害,导致眼、肾、神经、心脏和血管等组织器官的慢性进行性病变,最终可以导致器官功能缺陷甚至衰竭。糖尿病患者伴发高凝状态、冠心病以及动脉粥样硬化的风险非常高,通过对2型糖尿病患者血液中血小板微粒水平的监测发现^[26],2型糖尿病病史两年以上的患者其血液中血小板微粒水平与健康人群相比有明显差异,伴发动脉粥样硬化的患者其血小板微粒水平的差异程度更大^[27]。这些发现为通过检测糖尿病患者血液中血小板微粒的水平来评价糖尿病患者病情严重程度提供了依据。

另外,根据目前的临幊研究,其他可以引起心脑血管损伤如高血压、肺动脉高压、房颤以及脑外伤出血等疾病都能导致血液中血小板微粒水平改变,这一变化对患者血栓形成早期预测具有非常重要的临床价值。

5 小结

近年来,随着各种心脑血管疾病发病率逐年增加以及心血管搭桥再通技术的快速发展,由此引起的血栓性疾病高发病率已逐渐成为困扰患者和医务工作者的难题。对血栓性疾病的监测在诊断和治疗中的重要性显得尤为突出。血管内皮细胞损伤是造成血栓形成的一种原因;血小板的过度激活可以造成血小板微粒增多,也是血栓形成的一个原因。

在冠心病、缺血性脑梗死等心脑血管疾病中,血小板微粒的变化会早于CT、MRI等影像学指标的改变。因此,通过检测血小板微粒水平的改变,可以在疾病发生的早期进行预测,为疾病的治疗争取更多时间,提高疾病的诊断和治愈率。

目前,大多数研究者认为血小板微粒与血栓性疾病的形成有密切的关系。但是,血液中血小板微粒浓度与血栓的发生风

险之间是否存在线性关系,或者这两者存在怎样的线性关系还没有统一的认识,需要进一步研究。血液中血小板微粒水平改变能够反映患者处于高凝状态,能否准确预测血栓的形成部位,有待于进一步探索。

对血小板微粒的深入研究提示血小板微粒对血栓性疾病的诊断与防治具有重要价值。当血液中血小板微粒浓度升高时,提示患者处于高凝状态而且对患者的预后有严重的不良影响。此外,检测血液中血小板微粒浓度也可作为观察临床药效的方法。血小板微粒是预测血栓性疾病出现明显临床症状前的特异性生物标志物,可为临床早期诊断、疗效监测以及鉴别诊断提供重要的临床依据。

参考文献

- [1] 崔燕,马兰,赵雷,等.药物洗脱支架内早期血栓形成的回顾性分析[J].中国实验诊断学,2014,18(12):2029-2031.
- [2] Lippi G, Franchini M, Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease[J]. Nat Rev Cardiol, 2011,8(9):502-512.
- [3] 赵佳强,尹俊.血小板微粒在血栓与出血性疾病中的研究进展[J].诊断学理论与实践,2014,13(4):440-443.
- [4] Duche AC, Boudreau LH, Bollinger J, et al. Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A2-II A[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015,112(27): E3564-E3573.
- [5] 周延美,周延英,唐延辉.血小板减少及血液中微粒检验的研究进展[J].中国医药科学,2013,3(2):42-43.
- [6] Schwarzenberger C, Sradnick J, Lerea KM, et al. Platelets are relevant mediators of renal injury induced by primary endothelial lesions[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(11):F1238-F1246.
- [7] Kim S, Carrillo M, Radhakrishnan UP, et al. Role of zebrafish thrombocyte and non-thrombocyte microparticles in hemostasis[J]. Blood Cells Mol Dis, 2012,48(3):188-196.
- [8] Tantawy AA, Matter RM, Hamed AA, et al. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2010,27(4):283-296.
- [9] 戴进,侯华成,蒋青.深静脉血栓的血清分子标志物[J].中国骨与关节外科,2014,4(3):249-253.
- [10] 梁鹏,周新华,陈开祥.血小板微粒在心血管疾病中的研究进展[J].医学综述,2015,21(13):2340-2343.
- [11] Ramacciotti E, Hawley AE, Farris DM, et al. Leukocyte- and platelet-derived microparticles correlate with thrombus weight and tissue factor activity in an experimental mouse model of venous thrombosis[J]. Thromb Haemost, 2009,101(4):748-754.
- [12] 刘成海. SSL5 激活血小板产生血小板微粒对 THP-1 细胞的作用研究[D]. 重庆:第三军医大学,2014.
- [13] 孟庆友.miR-126 靶向 PIK3R2 调控内皮祖细胞及在静脉血栓再通中的作用研究[D]. 苏州:苏州大学,2014.
- [14] 崔静.血液肿瘤患者微粒血浆水平及其促凝活性的研究[D].北京:北京协和医学院,2013.
- [15] Alfonso F, Sandoval J. New insights on stent thrombosis: in praise of large nationwide registries for rare cardiovascular events[J]. JACC Cardiovasc Interv, 2012,5(2):141-144.
- [16] Osnes LT, Westvik AB, Joø GB, et al. Inhibition of IL-1 induced tissue factor (TF) synthesis and procoagulant activity (PCA) in purified human monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13[J]. Cytokine, 1996,8(11):822-827.
- [17] 吴国才,王珍.流式细胞技术检测血小板相关抗体在ITP 诊断中的应用研究[J].中国实验诊断学,2014,18(6):945-947.
- [18] Suades R, Padró T, Vilahur G, et al. Growing thrombi release increased levels of CD235a(+) microparticles and decreased levels of activatedplatelet-derived microparticles. Validation in ST-elevation myocardial infarction patients[J]. J Thromb Haemost, 2015,13(10):1776-1786.
- [19] 徐朝霞.血小板减少及血液中微粒的临床检验分析[J].中外医学研究,2013,11(1):3-4.
- [20] Giannopoulos G, Oudatzis G, Paterakis G, et al. Red blood cell and platelet microparticles in myocardial infarction patients treated with primary angioplasty[J]. Int J Cardiol, 2014,176(1):145-150.
- [21] 关天明,丛喜达,王立娟.脑梗死急性期OCSP分型与磁共振成像分型的关系研究[J].黑龙江医药,2015,28(3):655-656.
- [22] Sansone R, Stanske B, Keymel S, et al. Macrovascular and microvascular function after implantation of left ventricular assist devices in end-stage heart failure: Role of micro-particles[J]. J Heart Lung Transplant, 2015,34(7):921-932.
- [23] Kuriyama N, Nagakane Y, Hosomi A, et al. Evaluation of factors associated with elevated levels of Platelet-Derived microparticles in the acute phase of cerebral infarction [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2010,16(1):26-32.
- [24] Suades R, Padró T, Alonso R, et al. High levels of TSP1+/CD14²⁺ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis[J]. Thromb Haemost, 2015,114 (6): 1310-1321.
- [25] Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014,9:303-314.
- [26] Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, et al. Elevated levels of remnant lipoproteins are associated with plasma platelet microparticles in patients with type-2 diabetes mellitus without obstructive coronary artery disease [J]. Eur Heart J, 2006,27(7):817-823.
- [27] Chen Y, Xiao Y, Lin Z, et al. The role of circulating platelets microparticles and platelet parameters in acute ischaemic stroke patients[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015,24(10):2313-2320.