

rythematosus compared with the adult disease [J]. *Arthritis Rheum*, 1999, 42(1):69-75.

[9] 王细宏, 朱书奇, 胡义忠, 等. 血清抗核糖体 P 蛋白抗体检测对系统性红斑狼疮的诊断价值[J]. *安徽医药*, 2010, 14(8):916-918.

[10] Abdel-Nasser AM, Ghaleb RM, Mahmoud JA, et al. Association of anti-ribosomal P protein antibodies with neuropsychiatric and other manifestations of systemic lupus erythematosus [J]. *Clin Rheum*, 2008, 27(11):1377-1385.

[11] Shinjo SK, Bonfa E. Cutaneous vasculitis in systemic lupus erythematosus; association with anti-ribosomal P protein antibody and Raynaud phenomenon [J]. *Clin Rheum*, 2010, 30(2):173-177.

[12] do Nascimento AP, Viana Vdos S, Testagrossa Lde A. Antibodies to ribosomal P proteins; a potential serologic marker for lupus membranous glomerulonephritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(5):1568-1572.

[13] Zhan Y, Melian NY, Pantoja M, et al. Dystroglycan and mitochondrial ribosomal protein l34 regulate differentiation in the Drosophila eye [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5):10488.

[14] 郭婧婧, 金燕, 梁月初, 等. 抗核糖体 P 蛋白对系统性红斑狼疮的临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(20):3137-3139.

[15] Briani C, Lucchetta M, Ghirardello A, et al. Neurolupus is associated with anti-ribosomal P protein antibodies; an inception cohort study [J]. *J Autoimmun*, 2009, 32(2):79-84.

[16] MacInnes AW, Amsterdam A, Whittaker CA, et al. Loss of p53 synthesis in zebrafish tumors with ribosomal protein gene mutations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(30):10408-10413.

[17] 洪小平, 谭艳红, 肖学吕. 抗核糖体 P 蛋白抗体及抗心磷脂抗体在神经精神性狼疮中的价值[J]. *江苏医药*, 2008, 34(8):846-848.

[18] Hwahng SH, Ki SH, Bae EJ, et al. Role of adenosine monophos-

phate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones [J]. *Hepatology*, 2009, 49(6):1913-1925.

[19] Karassa FB, Afeltra A, Ambrozic A, et al. Accuracy of anti-ribosomal P protein antibody testing for the diagnosis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; an international meta-analysis [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(1):312-324.

[20] 胡志刚, 陈国千, 邹耀红, 等. 抗核糖体 P0 蛋白抗体对系统性红斑狼疮的临床诊断意义[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(22):3630-3632.

[21] Conti F, Alessandri C, Bompane D. Autoantibody profile in systemic lupus erythematosus with psychiatric manifestations; a role for anti-endothelial-cell antibodies [J]. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(4):R366-372.

[22] Elkon KB, Bonfa E, Llovet R. Association between anti-Sm and anti-ribosomal P protein autoantibodies in human systemic lupus erythematosus and MRL/lpr mice [J]. *J Immunol*, 1989, 143(5):1549-1554.

[23] 邹自英, 李素华, 陈莉. 13 种自身抗体检测对 SLE 的诊断价值及临床意义[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(5):443-446.

[24] 武永康, 王兰兰, 秦莉. 抗核抗体的不同检测方法对系统性红斑狼疮诊断价值的系统评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(1):81-85.

[25] 李晶, 沈滢, 贾汝琳, 等. 抗核糖体 P 蛋白及亚型抗体在系统性红斑狼疮临床诊断中的价值[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(9):811-815.

(收稿日期:2011-05-20)

• 综 述 •

抗血小板治疗中血小板聚集功能检测的现状

王燕慧¹, 张 颢^{2△}综述, 金永新³审核

(甘肃省第二人民医院: 1. 重症监护病房; 2. 心内科; 3. 药剂科, 兰州 730000)

关键词: 血小板功能试验; 血栓形成; 抗血小板治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 17. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)17-1976-03

血小板在血栓形成和止血中发挥关键作用^[1], 抗血小板治疗在急性冠脉综合征和经皮冠脉介入治疗中具有十分重要的价值^[2], 在稳定性冠心病的防治中作用也已得到肯定。血小板与动脉粥样硬化性血栓疾病关系十分密切^[3]。血小板功能分析也是整体评估围手术期凝血功能的基石, 尤其在接受抗血小板药物治疗的患者, 如环氧合酶-1 抑制剂、二磷酸腺苷(AOP)拮抗剂和血小板膜糖蛋白 II b/III a(GP II b/III a)抑制剂^[4]。出血并发症和血栓事件是抗血小板治疗中的尖锐矛盾^[5], 因此抗血小板治疗中监测血小板聚集功能有重要意义。现将血小板聚集功能检测的进展综述如下。

1 血小板聚集功能试验的历史和现状

1.1 血小板聚集功能试验的历史 1880 年发现血小板^[6], 1910 年有学者开始用出血时间测定血小板功能。在 1990 年之前, 出血时间一直被认为是检测血小板功能最有用的试验。1960 年开始采用血小板透光集合度测定仪(LTA)检测血小板

功能, 随后出现许多自动化、便携式的新设备和新方法^[7]。

1.2 传统的血小板聚集功能测定方法 传统的血小板聚集功能测定方法有血小板计数、出血时间测定、血块收缩实验、全血凝固分析、活化凝血时间测定、血小板计数比值、快速血小板功能分析等。唯有快速血小板功能分析, 即采用全血比浊法反映血小板黏附功能和血小板膜糖蛋白受体 II b/III a 拮抗剂的效果, 因其方法简单、可床旁检测, 目前仍在沿用, 其他传统方法已经不再用于评价抗血小板治疗后的血小板活化状态。

1.3 检测血小板聚集功能的新仪器 研发中的仪器有血块标记分析仪(CSA)、血栓成分分析仪(TSA)等。Hemostatus 仪则可监测 GP II b/III a 拮抗剂的效果, 还有测量血小板收缩力的仪器 Hemodyne Instrument。

2 抗血小板治疗后血小板聚集功能检测方法仪器的评价

2.1 血清血栓素 B₂ 测定 免疫法可监测 11-去氢-血栓素 B₂ 的浓度, 评估阿司匹林的反应, 预测治疗结果。

△ 通讯作者, E-mail: mojishanren@realss.com.

2.2 血小板聚集率试验 血小板聚集率有比浊法和全血阻抗法两种。比浊法的原理是在富含血小板的血浆中加入致聚剂使血小板浊度减低、透光度增加,将此光浊度变化记录并形成血小板聚集曲线,反映血小板聚集反应,该法被视为金标准^[8]。比浊法主要不足在于:(1)不能完全反映体内血细胞之间的相互作用;(2)测定时间过长可致血小板功能降低;(3)对小血小板聚集物的形成不敏感,因而只能测量大的血小板聚集团;(4)离心过程会导致血小板激活和红细胞碎片中血小板的丢失;(5)高脂血症患者富含血小板的血浆会影响透光率;(6)需要较多的血液标本;(7)血小板数目的调整难以标准化。

全血阻抗法是采用电阻抗原理进行测定,不用离心,但耗时、且对小的聚集物的形成不敏感,每次测定后,需清洗电极,连接电极的电线需小心安放,不能弯曲。

2.3 Plateletwork[®]分析仪 Plateletwork[®]分析仪只需少量全血标本,用 ADP 或胶原作诱导剂,与血小板聚集率试验及其他实验室测定方法的相关性良好,与初级终点事件相关^[9]。该仪器可测定发光并检测二次凝血期的致密颗粒释放反应,改变了在激动剂作用下电极与血小板的黏附、聚集。有一种五通道的全血集合度阻抗仪器可在不同的激动剂刺激条件下用一次性实验容器和电极测定血小板功能。

2.4 VerifyNow[®]监测仪 VerifyNow[®]监测仪为快速血小板功能分析仪,其插入的微型盒内有用含花生四烯酸、ADP 或凝血酶受体激活肽等血小板激动剂和纤维蛋白原包被的微球。微型盒里的透光二重反应池能对激动剂发生血小板聚集反应并在几分钟内显示和打印结果,操作简便且与比浊法透光聚集度测定相关性良好。目前有监测阿司匹林、氯吡格雷或其他 P2Y₁₂ 受体拮抗剂的便携式仪器,但价格较昂贵^[10]。

2.5 血小板聚集试验盒和 Ichor 全血计数器 血小板聚集试验盒(Plateletworks[®])和 Ichor 全血计数器可观察含枸橼酸的 ADP 或胶原激动剂使血小板聚集的情况,与透光集合度测定相关性良好^[11-12]。血小板聚集试验盒是测定 GP II b/III a 效果的便携式设备,但检测噻吩并吡啶的作用有限。

2.6 锥形血小板分析仪 锥形血小板分析仪是测定在高剪切力条件下体内的血小板黏附和聚集。在平板上包被胶原或细胞外基质,将全血置于均一的旋转剪切力场中,自动染色、黏附旋转杯壁的血小板,通过图像分析软件计数。其优点是快速、样本量少、能模拟生理性的高剪切力。该试验可监测 GP II b/III a 拮抗剂、阿司匹林或噻吩并吡啶的抗血小板聚集效果^[13]。

Impact[®]检测仪用塑料盘替代胶原或 ECM 包被表面,完全自动化,操作简单,用血量少,6 min 出结果。该仪器含一个显微镜,可染色,成像分析血小板在平盘上的黏附和聚集功能,储存和分析图像,记录血小板覆盖范围、平均大小和血小板黏附的 DNA 分布组方图。

2.7 血小板功能分析仪-100 血小板功能分析仪-100(PFA-100)的应用已经有许多年的历史,临床实验室发表的文章也很多^[14-15]。PFA-100 在高切变率条件下吸入枸橼酸钠抗凝的全血样本,通过一个直径为 150 μm 胶原覆盖的微孔(含有 ADP 或肾上腺素),血小板激活后形成血栓堵塞小孔的时间被称为闭塞时间。该试验的优点是能模拟体内初期止血过程,操作简单、快捷、样本用量少、使用全血,与血小板透光聚集仪法相关性较好,但特异性不高。PFA-100 已广泛用于检测阿司匹林和 GP II b/III a 受体拮抗剂对血小板抑制情况,但不推荐用于监测氯吡格雷的抗血小板聚集作用^[16]。

2.8 血块凝缩测定 血块凝缩可用全血测定或在玻璃试管内

加钙后的富含血小板血浆测定,无需特殊仪器,测定析出血清的体积,操作简便,但制备富含血小板血浆较费时。血小板在凝血酶形成、血块形成以及血块凝缩中发挥作用^[17],可用富含血小板血浆测定 T 荧光凝血酶底物,计算凝血酶产生曲线下面积,评估内源性凝血酶产生能力。

2.9 血栓弹性描记仪 血栓弹性描记仪(TEG)的原理是使连接记录器和计算机的抗凝血样本杯中的悬吊针每个方向 5 度摆动加热孵化,正常抗凝血液不受悬吊针的影响,但血凝块样本杯内悬吊针在移动。试验用全血或加钙的血浆。TEG 每次试验不到 30 min,便携式,也能提供有关血块形成和溶解的数据。旋转式血栓弹性描记仪是一种改良型的 TEG,较传统的 TEG 更敏感^[18-19],甚至超过流式细胞术^[20]。其分析系统是基于一 Carr 技术研发的^[21-22],用很少量的全血就可监测血小板收缩时间(PCF)、血凝块弹性模量和凝血酶生成时间(TGT)。

2.10 流式细胞术分析 流式细胞术用全血免疫标记,避免了血小板体外医源性激活,在体外以 ADP 活化全血或富含血小板血浆,以荧光抗体 CD61PerCP 标记活化血小板在适当波长的激发光作用下,被特殊染色的细胞发射出一定量的荧光脉冲信号。探测器收集每个细胞的荧光讯号和光散射,然后传入计算机进行分析。以单个血小板数量的减少衡量血小板聚集率的大小。流式细胞术测定的血小板活化标志物还包括 P-选择素、GP II b/III a 受体、血小板、白细胞结合体等。P-选择素只表达在活化的血小板表面,是最具特异性的分子标志物。流式细胞术通过测定血小板 GP II b/III a 受体表达率,指导 GP II b/III a 拮抗剂用量。血小板表面的 P-选择素可特异性地与白细胞表面 P-选择素 GP 配体-1(PSGL-1)结合,形成白细胞结合体,后者在体内存在时间较长,可作为体内血小板持续活化的一个指标。

目前尚难确定测定抗血小板药物的抑制血小板的最恰当方法。有人对血小板凝集度透光率、VerifyNow[®]监测仪、Plateletwork[®]分析仪等平行开展研究,与主要终点事件(全因死亡、非致命性心肌梗死、支架内血栓形成或缺血性脑梗死等)比较,只有血小板凝集度透光率、VerifyNow[®]监测仪和 Plateletwork[®]分析仪与主要终点事件之间有显著的关联。

3 各类抗血小板药物抑制血小板聚集功能监测的选择

3.1 阿司匹林 急性冠脉综合征和支架术后常规双重抗血小板治疗比单用阿司匹林额外减少心血管不良事件 20%,但仍有 10% 仍然出现血栓事件^[23]。PFA-100 对阿司匹林监测特异性差。透光集合度测定发现低剂量的阿司匹林能抑制 95% 以上花生四烯酸诱导的血栓素 A₂ 生成,故对多数患者监测似不必要,但凝血效果变异或无反应者则应检测^[24]。透光集合度测定阿司匹林对血小板的抑制耗时、困难、不能常规地用于大量患者。较简单的方法如 PFA-100、VerifyNow[®]阿司匹林监测仪、血栓弹力图和尿血栓素 B₂ 测定能快捷、可靠地评价阿司匹林抑制血小板的情况^[25]。用 PFA-100 检测出的阿司匹林无反应率高于其他方法。阿司匹林 VerifyNow[®]检测仪与透光集合度测定试验结果吻合率达 87%。

3.2 氯吡格雷 估计氯吡格雷抵抗发生率为 4%~30%^[27]。对氯吡格雷效果的监测首选流式细胞术检测 P2Y₁₂ 受体特异的血管舒张刺激磷氨酸蛋白磷酸化作用,其次为 VerifyNow[®] P2Y₁₂ 法和 ADP 诱导的比浊法血小板集合度。

3.3 GP II b/III a 拮抗剂 监测 GP II b/III a 拮抗剂的效果,血小板透光集合度测定、流式细胞术或抗体免疫法费时、昂贵,且需要专门的实验室。VerifyNow[®]系统操作简单、价廉、快

捷、方便,且与透光集合度测定、放射标记等方法结果相关性良好,与临床结局之间有显著的相关性^[26]。

4 结 语

诸多新的循证医学证据反复证实了抗血小板治疗在急性冠脉综合征、经皮冠状动脉介入治疗以及稳定性冠心病治疗中的价值,但抗血小板治疗的效果具有多样性甚至抵抗。检测血小板聚集功能有助于早发现抗血小板治疗药物反应的多样性或抵抗。血小板透光聚合度测定为金标准方法,但尚难普及。流式细胞术设备特殊,技术要求高,成本昂贵。新的方法使血小板活化功能检测简便易行。

参考文献

- [1] Xiang YZ, Xia Y, Gao XM, et al. Platelet activation, and antiplatelet targets and agents; current and novel strategies[J]. *Drugs*, 2008, 68(12): 1647-1664.
- [2] Jennings LK, Saucedo JF. Antiplatelet and anticoagulant agents: key differences in mechanisms of action, clinical application, and therapeutic benefit in patients with non-ST-segment-elevation acute coronary syndromes[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2008, 23(4): 302-308.
- [3] Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(12): 3378-3384.
- [4] Hofer CK, Zollinger A, Ganter MT. Perioperative assessment of platelet function in patients under antiplatelet therapy[J]. *Expert Rev Med Devices*, 2010, 7(5): 625-637.
- [5] Rovellini A, Folli C, Cardani F, et al. Thromboembolic and haemorrhagic events in permanent atrial fibrillation: observational study in an emergency department[J]. *Eur J Intern Med*, 2009, 20(8): 756-759.
- [6] Harrison P. Progress in the assessment of platelet function[J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(3): 733-744.
- [7] Madsen EH, Saw J, Kristensen SR, et al. Long-term aspirin and clopidogrel response evaluated by light transmission aggregometry, VerifyNow, and thrombelastography in patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Clin Chem*, 2010, 56(5): 839-847.
- [8] Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma; description of procedures with the aim to develop standards in the field[J]. *Am J Clin Pathol*, 2005, 123(2): 172-183.
- [9] Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation [J]. *JAMA*, 2010, 303(8): 754-762.
- [10] Jakubowski JA, Li YG, Small DS, et al. A comparison of the VerifyNow P2Y12 point-of-care device and light transmission aggregometry to monitor platelet function with prasugrel and clopidogrel; an integrated analysis[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 56(1): 29-37.
- [11] Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, et al. Frequency of non-response antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization[J]. *Am J Cardiol*, 2004, 93(4): 456-458.
- [12] van Werkum JW, Kleibeuker M, Postma S, et al. A comparison

between the Plateletworks-assay and light transmittance aggregometry for monitoring the inhibitory effects of clopidogrel[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 140(1): 123-126.

- [13] van Werkum JW, Bouman HJ, Breet NJ, et al. The Cone-and-Plate (let) analyzer is not suitable to monitor clopidogrel therapy: a comparison with the flowcytometric VASP assay and optical aggregometry[J]. *Thromb Res*, 2010, 126(1): 44-49.
- [14] Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults[J]. *Br J Haematol*, 2005, 130(1): 3-10.
- [15] Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction[J]. *J Lab Clin Med*, 2001, 138(3): 152-163.
- [16] Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, et al. Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation [J]. *JAMA*, 2010, 303(8): 754-762.
- [17] Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, et al. Towards a standardization of thrombin generation assessment; the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinscope assay [J]. *Thromb J*, 2005, 3: 16.
- [18] Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA. Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(9): 1705-1709.
- [19] Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G. Value of thromboelastography in the assessment of platelet function [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2003, 9(2): 137-142.
- [20] 任艺虹, 盖鲁粤, 杨庭树, 等. TEG 和流式细胞测定技术对血小板活性抑制程度的比较研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(4): 366-367.
- [21] Carr ME, Martin EJ, Kuhn JG, et al. Onset of force development as a marker of thrombin generation in whole blood; the thrombin generation time (TGT) [J]. *J Thromb Haemost*, 2003, 1(9): 1977-1983.
- [22] Carr ME Jr. Development of platelet contractile force as a research and clinical measure of platelet function [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2003, 38(1): 55-78.
- [23] Angiolillo DJ. Variability in responsiveness to oral antiplatelet therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103(3 Suppl): 27A-34A.
- [24] Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, et al. Aspirin resistance; position paper of the Working Group on Aspirin Resistance [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(6): 1309-1311.
- [25] Feuring M, Schultz A, Losel R, et al. Monitoring acetylsalicylic acid effects with the platelet function analyzer PFA-100 [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2005, 31(4): 411-415.
- [26] Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(8): 1157-1164.

(收稿日期: 2011-05-09)