

· 综 述 ·

血小板功能评价方法

于 茜, 王 凡, 刘宏斌*

(解放军总医院南楼心血管内科, 北京 100853)

【摘 要】 血小板功能与心血管疾病关系十分密切, 随着对疾病认识的增加, 血小板功能检测方法也逐渐获得发展。光比浊法自发明以来一直被认为是血小板功能检测方法的金标准。近些年, 随着对疾病、治疗的多方面认识以及科技的进步, 不断涌现出了各种试验方法。但不管金标准还是最新方法, 均存在着或多或少的缺陷及某个方面的优点。本文将对目前较常用血小板功能检测方法作一综述。

【关键词】 血小板功能; 血小板缺陷; 抗血小板治疗

【中图分类号】 R446. 11

【文献标识码】 A

【DOI】 10. 11915/j. issn. 1671-5403. 2016. 11. 209

Methods for platelet function testing

YU Qian, WANG Fan, LIU Hong-Bin*

(Department of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853)

【Abstract】 Platelet function is closely associated with cardiovascular diseases. With the increased awareness of the diseases, there are more and more methods for platelet function test developed. Since the invention of light transmission aggregometry (LTA), it has been thought to be the golden standard of platelet function testing. In recent years, various test methods have been developed with the increasing awareness of disease and treatment as well as technological advances. However, despite the gold standard or the latest methods, they have more or less flaws and some aspects of advantage. In this article, we introduced and summarized currently available methods of measuring platelet function.

【Key words】 platelet function; platelet defects; antiplatelet therapy

This work was supported by the Project of Central Health Care Committee (W2015ZD02).

Corresponding author: LIU Hong-Bin, E-mail: liuhbin301@sohu.com

血小板作为血液中一种特殊的细胞成分, 广泛参与了炎症、宿主防御、组织修复等生理过程, 但最重要的仍是参与正常的止血功能^[1,2]。因此, 抗血小板治疗广泛发展与应用的同时, 利用血小板功能检测方法监测抗血小板治疗的有效性 & 识别动脉疾病高风险患者越来越重要。随着对血小板多方面功能的认识以及社会科技进步, 出现了各种基于不同原理的检测方法。但由于技术处理或原理的单一性, 目前大多处于实验室研究阶段, 临床应用受限。本文对近年来实验室或临床的常用设备作一综述, 综合分析利弊。

1 血小板聚集功能分析方法

1.1 光比浊法

1.1.1 原理介绍 20 世纪 60 年代, Born 设计了光

比浊法 (light transmission aggregometry, LTA), 其作为血小板检测方法的金标准直到现在地位仍是不可动摇的, 是很多鉴别和诊断血小板功能缺陷的专业实验室最为常用的方法^[3]。LTA 的测试原理是计算富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 样品的透光度变化。PRP 是含有大量悬浮细胞的浑浊溶液, 悬浮细胞会大大减少光的透射。血小板聚集堆在激活剂加入后出现, 悬浮细胞沉淀, 光透射增加 (100% 设定为乏 PRP), 随血小板聚集实时测量动力学变化。设备配备自动设置功能 (透光度为 100% 及 0% 的条件)、存储软件和配有搅拌棒的一次性比色杯。设备将获得信号自动转化为曲线图形, 与透光度的变化平行。在 PRP 中, 不同的激活剂加入可致不同的血小板途径活化, 从而可了解血小板功能的不同特性。最常用的激活剂有二磷酸腺

收稿日期: 2016-04-26; 修回日期: 2016-06-20

基金项目: 中央保健委员会项目 (W2015ZD02)

通信作者: 刘宏斌, E-mail: liuhbin301@sohu.com

苷 (adenosine diphosphate, ADP)、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA)、胶原和肾上腺素。

1.1.2 优缺点 LTA 能用多种激活剂及不同浓度引发血小板激活及聚集,因此提供了学习更多血小板激活途径细节的机会;且因 LTA 与出血及缺血事件相关,成为在过去 50 年里大多数专业实验室备受欢迎的检测方法^[4]。尽管 LTA 被认为重要且全面,但还是存在一些特殊问题:(1)受不同的分析前条件(如:抗凝血药类型、血浆脂质、溶血、低血小板计数)影响;(2)不同的程序条件(如 PRP 的准备、不同浓度的激活剂)易造成误差;(3)在完成实验和解释结果中,需实验室人员具备良好的技术、经验和专业知识;(4)试验中的条件未能精确模拟生理条件^[3,4]。因此,LTA 需要不断地被发展的标准化过程验证^[5]。

1.1.3 临床应用 LTA 是血小板检测方法的金标准,是诊断多种血小板缺陷和监测抗血小板治疗的最常用技术^[6]。研究发现^[7],瑞斯托菌素能促进血管性血友病因子(von willebrand factor, VWF)和糖蛋白(glycoprotein, GP) I b/IX/V 复合物的整合,可作为激活剂发现血管性血友病和血小板功能失调(如 Bernard-Soulier 综合征)。用 LTA 监测抗血小板治疗能在高风险心血管患者中预测主要不良心血管事件(major adverse cardiovascular events, MACE),由 ADP-LTA 和 AA-LTA 定义的残留血小板活性率,均与缺血事件(如急性冠脉综合征、稳定型心绞痛)的发展相关。目前在实验室或临床研究中,常用由 ADP 和 AA 触发的血小板聚集截点值鉴别那些对抗血小板制剂没有反应且高风险 MACE 的急性冠脉综合征患者^[8]。

1.2 VerifyNow 系统

1.2.1 原理介绍 VerifyNow 是全自动的快速检测系统,用于监测抗血小板治疗^[9]。原理为血小板聚集到试剂盒内纤维蛋白原覆盖的珠子上,与活化的 GP II b/III a 受体成比例。光学浊度计反应的透光度随激活的血小板与附着在球体的纤维蛋白原的聚集而增加,凝集随透光增加的程度而增大。在这项检测方法中,凝血酶受体激活肽(thrombin receptor activating peptide, TRAP)用作激活剂,最大程度刺激血小板聚集。以聚集速率和程度计算血小板聚集单位(platelet aggregation units, PAU)。目前,又有对靶向药物敏感的 2 个试剂盒可用:(1)用阿司匹林作为激活剂表达为阿司匹林反应单位(aspirin reaction units, ARU);(2)PRU 试验(对噻吩并吡啶治疗敏感)表达为 P2Y12 反应单位(P2Y12 reaction units, PRU)。

1.2.2 优缺点 检测快速,采用全血,无需样本预处理和运输,无需专业实验室或操作者,无需用药前基础值,致聚剂和抗凝剂的作用无影响^[8]。影响试验的因素包括:取血进入试验的时间、血小板计数、血细胞比容、甘油三酯、纤维蛋白原水平。此外,试验设备昂贵,因此大多用于科研^[10]。

1.2.3 临床应用 Verifynow 系统被广泛用于监测急诊心脏手术室的抗血小板治疗,无需专业实验室帮助^[10]。2014 年《抗血小板药物治疗反应多样性临床检测和处理的专家建议》中提出^[11], P2Y12 抑制剂治疗反应监测推荐应用 VerifyNow 或血小板血管扩张剂刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)检测,无条件时可采用 LTA 方法,但需注意操作标准化。另外,Verifynow 系统在抗血小板治疗患者中的应用已扩展至外科,尝试预测术后出血^[12]。

1.3 Plateletworks 分析仪

1.3.1 原理介绍 Plateletworks 是一种即时检验分析仪,用于诊断性筛选试验。分析仪用阻抗法比较对照样品乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid, EDTA)管中的血小板计数和添加 ADP 或 AA 后聚集的试验样品(柠檬酸盐管)中的血小板计数。

1.3.2 优缺点 无需处理全血、结果即刻获得,比 LTA 重复性较好,充实了血小板整体功能中血小板计数的角色,可应用在血小板减少患者中^[13]。不利因素是试验需在采集血样后的几分钟内进行,严格的时间控制使这项设备在操作区域上应用受限。

1.3.3 临床应用 Plateletworks 分析仪将有可能成为心脏介入或外科手术中有用的工具,在急诊护理条件下,Plateletworks 也可显示出检测血小板计数和功能的临床价值^[14]。

2 基于凝血块形成及稳定性的分析方法——血栓弹力图

2.1 原理介绍

血栓弹力图(thromboelastography, TEG)为整体止血过程,目前常用的是 TEG 分析仪 5000 系列^[15],动态监测从凝血开始至血小板聚集、血凝块形成以及纤维蛋白溶解的整体过程,以血块形成及溶解过程中全血在粘弹力上的变化为分析基础^[15,16]。根据所用试剂可进行不同的试验,了解不同途径的止血:如添加肝素酶能评估全血中肝素的抗凝程度,添加血小板受体激活剂(如 ADP 或 AA)能监测抗血小板药物疗效。

2.2 优缺点

试验能很快完成(<30 min),允许全血成分之间的相互作用,更接近生理状态,能提供完整的凝血轮廓,不受肝素类物质的影响。缺点在于实验室之间可能存在变异性^[17],且TEG需在37℃进行,无法监测较低温度时患者的凝血动态。

2.3 临床应用

TEG已在成分输血、创伤、急诊、外科手术(如心脏手术、肝移植、产科手术等)及临床试验等领域得到广泛应用,用于评估术后出血风险^[18]。还可在冠心病个体中评价凝血状态,监测不同抗栓疗效,协助拟定个体化治疗方案,减少血栓和出血风险。血小板图检测已被证实可靠且分析变异小^[19]。然而,更大规模的前瞻性研究还有待完成,以明确这些设备在监测抗血小板治疗中的合适角色。

3 流式细胞仪

3.1 原理介绍

流式细胞仪(flow cytometry, FC)血小板分析能提供在体血小板功能状态信息,是分子水平观察血小板聚集功能的一种新方法^[20,21]。常用的血小板活化标志物包括:血小板表面表达的P选择素(CD62p标记,作为 α 分泌颗粒的标志)、膜糖蛋白GP IIb/IIIa复合物(用单克隆抗体PAC-1检测)和VASP(作为P2Y₁₂受体活化依赖信号标志)。通过免疫荧光标记后,由光学系统激发出不同散射光,光电信号传入计算机系统处理,结果再以平均荧光强度暗指细胞数量的直方图表现出来。通过测定循环中活化血小板(circulating activated platelets, CAP)判断血小板的功能状态。

3.2 优缺点

用少量全血即可完成,避免样品准备步骤,允许生理环境中血小板相互作用,且能单独完成血小板计数^[22]。但设备昂贵,需要专业操作者及相关培训,且分析前阶段需精心准备防止误差产生^[22];测定的蛋白分子活性敏感度高,易受多种实验条件的影响^[23];解释结果有主观性,造成实验室之间重复性及可比性差。

3.3 临床应用

近年来FC分析血小板功能被广泛应用,如测量血小板计数,明确血小板活化状态,诊断血小板受体功能或数量异常,监测抗血小板药物疗效。FC能发现很多遗传性或获得性血小板功能失调和储存池疾病,被认为是检测血小板病的首选试验^[22]。FC还能识别血小板的促凝能力和激活状态(如在急性

冠脉综合征或体外循环时),评估血库中储存血小板的状态^[24]。但目前研究表明,PAC-1和CD62p蛋白分子因不稳定而不适宜于抗血小板疗效常规检测^[23]。

4 剪切力诱导血小板聚集的方法

4.1 血小板功能分析仪

4.1.1 原理介绍 20世纪90年代中期,血小板功能分析仪(platelet function analyzer, PFA)-100设备更新为PFA-200并投入使用,被认为是测试出血时间(bleeding time, BT)的标准化体外替代试验^[25]。少量柠檬酸盐全血在高剪切力条件下通过毛细管抽吸到覆盖不同激活剂的带孔(147 μ m)薄膜上,激活剂结合高剪切力在试剂盒中激活血小板,发生聚集。设备测量剪切力下减慢或停止的全血血流,以及血小板聚集封锁孔隙的时间(closure time, CT)。试验包括两种试剂盒:胶原和ADP(CADP试剂盒)或者肾上腺素(CEPI试剂盒)。FDA已批准第3种INNOVANCE PFA P2Y试剂盒用来检测P2Y₁₂途径,监测抗血小板药物如氯吡格雷的疗效;试剂盒中薄膜孔更小(100 μ m),内含ADP和PGE₁的结合物^[26]。

4.1.2 优缺点 测试简单快速,只需少量全血,无需多余的样品准备及大量的专业技术培训^[4]。另外,此试验阴性预测值较高,尤其对于严重血小板功能缺陷和血管性血友病(von willebrand disease, VWD) II、III型^[27]。但是,PFA-100/200对多种影响血小板功能的因素敏感,血小板计数、血细胞比容及抗凝剂特性会影响CT,因此在血小板 $<50 \times 10^9/L$ 或血细胞比容 $<25\%$ 时,临床医师需要仔细结合考虑^[3]。另外,高VWF、纤维蛋白原、红细胞水平可能缩短CEPI CT^[27]。

4.1.3 临床应用 试验应用剪切力模拟在体条件,相当高水平依靠VWF,适合筛选VWD及其治疗监测^[28]。但PFA-100/200方法对微小血小板功能缺陷不敏感,需要被更多专业实验证实^[27]。在抗血小板药物疗效检测方面,PFA虽然显示了与LTA、TEG较高的一致性,但方法学依赖性高,实用性稍差,仍需更严格的质控^[29]。

4.2 Cone and Plate(Let)分析仪

4.2.1 原理介绍 一种创新的快速检测方法,人工在聚氯乙烯板(含促血栓形成物质)加样孔中添加少量全血,椎体旋转产生剪切力刺激血小板活化、黏附,将多余血液成分洗掉后自动染色,通过显微镜观察,软件拍摄一系列加样板连拍图像,测量其表面覆

盖血小板聚集物的百分数(代表血小板黏附)和聚集堆平均大小(代表血小板聚集)。

4.2.2 优缺点 设备全自动化,无需移液,无需样品准备,简单快速可行,但依赖血浆、血细胞比容及血小板计数。装置中剪切力可调,可模拟血小板生理环境或接近于动脉粥样硬化疾病的病理状况^[30]。

4.2.3 临床应用 此设备相关临床经验少,很少应用于临床大样本中。该系统可相容性诊断血小板缺陷,但价值不大,临床实用性仍需评估^[31]。

5 检测血栓素代谢物的方法

5.1 原理介绍

血栓素 A₂(thromboxane A₂,TXA₂)是血小板活化后由 AA 快速合成的,在磷脂膜释放。TXA₂ 增强血小板活化,招募其他血小板到血管损伤部位,引起血管收缩,加速止血过程。因为半衰期短,TXA₂ 在血浆或全血中很难检测,最常用的代谢物是血栓烷素 B₂(thromboxane B₂,TXB₂)和 11-去氢-血栓烷素 B₂(DH-TXB₂),后者较前者更稳定。关于 TXA₂ 代谢物的定量分析,放射免疫测定法已过时弃用,目前常用酶联免疫测定或质谱分析法^[32],采用 37℃ 全血凝固 30~60 min 后的血浆或血小板活化聚集后 PRP 血浆检测 TXB₂,或在尿液中检测 DH-TXB₂。

5.2 优缺点

测量 TXA₂ 代谢物可直接评估在体环氧合酶途径,了解血小板活化状态。但血小板生物合成 TXA₂ 的量(1~2 pg/mL)和容量(300~400 ng/mL)之间有很大差异。因此,有人认为在血清或血浆中检测 TXB₂ 受取样时人工激活血小板的影响。

5.3 临床应用

血清和尿中 TXB₂ 浓度与 TXA₂ 生物合成密切相关,在不同疾病中其含量不同。目前广泛用于发现血栓素合成缺陷及对阿司匹林的反应^[22,33]。在血小板对 AA 反应异常时,测量 TXA₂ 代谢物能鉴别因对血清素受体反应下降血小板产生 TXA₂ 能力的异常^[34]。

6 总结

迄今,已出现基于各种不同原理的试验设备用于检测部分或整体的血小板功能,越来越多的方法更多关注于凝血、出血障碍以及监测抗血小板治疗有效性。随着技术发展,试验方法或设备的升级能指导临床医师对出血风险做更正确快速的诊断,在术前、术后更精准地调整抗血小板方案。虽然前景美好,在各种检测方法之间也存在着很大问题:检测

方法缺乏明确的指南或指征;不同检测方法之间相关性差;缺少精确分析前的质量控制以减少人工误差^[30]。因此,除提高试验及设备可用性外,可靠性以及质控测试的研究显得日益重要。

【参考文献】

- [1] Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration[J]. *ThrombHaemost*, 2011, 105(Suppl 1): S13-S33.
- [2] Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture[J]. *J Intern Med*, 2014, 276(6): 618-632.
- [3] Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases[J]. *Circulation*, 2004, 110(19): e489-e493.
- [4] Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays[J]. *Transfus Apher Sci*, 2003, 28(3): 307-317.
- [5] Femia EA, Pugliano M, Podda G, et al. Comparison of different procedures to prepare platelet-rich plasma for studies of platelet aggregation by light transmission aggregometry [J]. *Platelets*, 2012, 23(1): 7-10.
- [6] Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH[J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11(6): 1183-1189.
- [7] Gadisseur A, Hermans C, Berneman Z, et al. Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease[J]. *Acta Haematol*, 2009, 121(2-3): 71-84.
- [8] 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.
- [9] Dobrovolsky AB, Laguta PS, Guskova EV, et al. Effect of fibrinogen on platelet reactivity measured by the VerifyNow P2Y12 assay[J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2016, 81(5): 439-444.
- [10] Angiolillo DJ, Curzen N, Gurbel P, et al. Pharmacodynamic evaluation of switching from ticagrelor to prasugrel in patients with stable coronary artery disease: results of the SWAP-2 study (switching anti platelet-2) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(15): 1500-1509.
- [11] Chinese Society of Cardiology. Chinese expert recommendation on the testing and management of antiplatelet agents response variability[J]. *Chin J Cardiol*, 2014, 42(12): 986-991. [中华医学会心血管病学分会. 抗血小板药物治疗反应多样性临床检测和处理的专家建议[J]. *中华心血管病杂志*, 2014, 42(12): 986-991.]
- [12] Yu PJ, Cassiere HA, Dellis SL, et al. P2Y12 platelet function assay for assessment of bleeding risk in coronary artery bypass grafting[J]. *J Card Surg*, 2014, 29(3): 312-316.
- [13] McNair E, Qureshi AM, Bally C. Performance evaluation of the Plateletworks® in the measurement of blood cell counts as compared to the Beckman Coulter UniceL DXH 800 [J]. *J Extra*

- Corpor Technol, 2015, 47(2): 113–118.
- [14] Dalen M, van der Linden J, Lindvall G, *et al.* Correlation between point-of-care platelet function testing and bleeding after coronary artery surgery[J]. *Scand Cardiovasc J*, 2012, 46(1): 32–38.
- [15] Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry[J]. *Clin Lab Haematol*, 2005, 27(2): 81–90.
- [16] Ganter MT, Hofer CK. Coagulation monitoring: current techniques and clinical use of viscoelastic point-of-care coagulation devices[J]. *Anesth Analg*, 2008, 106(5): 1366–1375.
- [17] Chitlur M, Sorensen B, Rivard GE, *et al.* Standardization of thromboelastography: a report from the TEG-ROTEM working group[J]. *Haemophilia*, 2011, 17(3): 532–537.
- [18] Wikkelsøe AJ, Afshari A, Wetterslev J, *et al.* Monitoring patients at risk of massive transfusion with Thrombelastography or Thromboelastometry: a systematic review[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011, 55(10): 1174–1189.
- [19] Cattano D, Altamirano AV, Kaynak HE, *et al.* Perioperative assessment of platelet function by Thromboelastograph Platelet Mapping in cardiovascular patients undergoing non-cardiac surgery[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2013, 35(1): 23–30.
- [20] Pati HP, Jain S. Flow cytometry in hematological disorders[J]. *Indian J Pediatr*, 2013, 80(9): 772–778.
- [21] Carubbi C, Masselli E, Gesi M, *et al.* Cytofluorimetric platelet analysis[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40(1): 88–98.
- [22] E Kehrel B, F Brodde M. State of the art in platelet function testing[J]. *Transfus Med Hemother*, 2013, 40(2): 73–86.
- [23] Zhao YF, Ren JW, Cong YL. Light transmission aggregometry and flow cytometry to examine the effect of clopidogrel[J]. *J Mod Lab Med*, 2015, 30(2): 23–26. [赵运凤, 任军伟, 丛玉隆. 光电比浊法血小板聚集仪与流式细胞仪检测氯吡格雷药效[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2): 23–26.]
- [24] Middelburg RA, Roest M, Ham J, *et al.* Flow cytometric assessment of agonist-induced P-selectin expression as a measure of platelet quality in stored platelet concentrates[J]. *Transfusion*, 2013, 53(8): 1780–1787.
- [25] Koessler J, Ehrenschrwender M, Kohsar A, *et al.* Evaluation of the new INNOVANCE® PFA P2Y cartridge in patients with impaired primary haemostasis[J]. *Platelets*, 2012, 23(8): 571–578.
- [26] Edwards A, Jakubowski JA, Rechner AR, *et al.* Evaluation of the INNOVANCE PFA P2Y test cartridge: sensitivity to P2Y₁₂ blockade and influence of anticoagulant[J]. *Platelets*, 2012, 23(2): 106–115.
- [27] Harrison P, Mackie I, Mumford A, *et al.* Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function[J]. *Br J Haematol*, 2011, 155(1): 30–44.
- [28] Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100[J]. *Seminars Thromb Hemost*, 2008, 34(8): 709–733.
- [29] Favaloro EJ, Bonar R. External quality assessment/proficiency testing and internal quality control for the PFA-100 and PFA-200: an update[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2014, 40(2): 239–253.
- [30] Williams CD, Cherala G, Serebruany V. Application of platelet function testing to the bedside[J]. *Thromb Haemost*, 2010, 103(1): 29–33.
- [31] 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 flow cytometric VASP assay and optical aggregometry[J]. *Thromb Res*, 2010, 126(1): 44–49.
- [32] Gremmel T, Perkmann T, Seidinger D, *et al.* Differential impact of inflammation on six laboratory assays measuring residual arachidonic acid-inducible platelet reactivity during dual antiplatelet therapy[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2013, 20(7): 630–645.
- [33] Pakala R, Waksman R. Currently available methods for platelet function analysis: advantages and disadvantages[J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2011, 12(5): 312–322.
- [34] Harrison P, Lordkipanidze M. Testing platelet function[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2013, 27(3): 411–441.

(编辑: 吕青远)