

急性脑梗死患者血小板膜糖蛋白与血小板参数的研究

王 蕾¹, 田桂玲², 李 芳¹

(1. 天津市民族医院神经内科, 天津 300122; 2. 天津医科大学总医院神经内科, 天津 300052)

【摘要】 目的: 探讨血小板功能指标与急性脑梗死(ACI)的关系, 寻找精确判断血小板功能状态的方法。方法: 采用流式细胞仪(FCM)检测 51 例 ACI 患者(病例组)和 29 例健康体检者(对照组)全血活化血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 复合物单克隆抗体(PAC-1)、血小板 α -颗粒膜蛋白抗 P-选择素单克隆抗体(CD62P)的阳性率; 应用全自动血球分析仪检测血小板的参数。结果: 病例组 PAC-1、CD62P 的阳性率和血小板平均体积(MPV)均明显高于对照组, 差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而血小板计数(PC)、血小板分布宽度(PDW)和大血小板比率(LPR)有增高趋势, 但两组间比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。直线相关分析显示: PAC-1 与 MPV($r = 0.322, P = 0.004$)及 PAC-1 与 LPR($r = 0.224, P = 0.046$)之间存在正相关关系, CD62P 与 MPV 间亦存在正相关关系($r = 0.240, P = 0.032$), PC、PDW 与膜糖蛋白之间无相关关系($P > 0.05$)。结论: ACI 患者体内存在血小板活化, 血小板膜糖蛋白和血小板参数共同参与这一过程; 活化 GPⅡb-Ⅲa 与 MPV 有非常显著的正相关关系。

【关键词】 血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa; 血小板 α -颗粒膜蛋白; 血小板平均体积; 脑梗死, 急性

中图分类号: R277.7; R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)03-0173-03

Study of platelet membrane glycoproteins and parameters of platelet in acute cerebral infarction WANG Lei¹, TIAN Gui-ling², LI Fang¹. 1. Department of Neurology, Tianjin Minzu Hospital, Tianjin 300122, China; 2. Department of Neurology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the association of the function of platelet with acute cerebral infarction (ACI) and estimate accurately the function of platelet. **Methods:** A study of 51 hospitalized cases with ACI was conducted, and 29 cases of healthy subjects were randomly selected as controls. The positive percentages of activated platelet membrane glycoprotein GPⅡb/Ⅲa complex monoclonal antibody (PAC-1), platelet α -granular membrane protein, P-selectin monoclonal antibody (CD62P) were detected with flow cytometer (FCM) in all patients. Parameters of platelet were measured by using automatic blood analyzer in all patients. **Results:** Comparing the data with the clinical controls, the positive percentages of PAC-1, CD62P and mean platelet volume (MPV) were significantly higher in the patients of ACI group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no differences between the two groups in platelet count (PC), platelet distribution width (PDW) and large platelet rate (LPR) (all $P > 0.05$). PAC-1 was positively correlated with MPV ($r = 0.322, P = 0.004$) and LPR ($r = 0.224, P = 0.046$), respectively. CD62P was positively correlated with MPV similarly ($r = 0.240, P = 0.032$). On the other hand neither PC nor PDW had any correlation with platelet membrane glycoprotein ($P > 0.05$). **Conclusion:** In cases with ACI, the platelet activation, platelet membrane glycoprotein and various platelet parameters all together play a role in the pathological processes. Activated GPⅡb/Ⅲa is markedly correlated positively with MPV. The detection of platelet membrane glycoprotein and platelet parameters can estimate accurately the function of platelet.

【Key words】 platelet membrane glycoprotein GPⅡb/Ⅲa; platelet α -granular membrane protein; mean platelet volume; acute cerebral infarction

目前脑血管疾病已成为造成人类死亡的三大疾病原因之一, 存活者中 50%~70% 的患者遗留瘫痪、失语等严重残疾。在美国, 卒中是导致死亡和长期致残的第三大疾病, 大约 80% 的卒中为缺血性卒中^[1]。因此, 了解血栓形成的机制并积极预防和治疗

血栓性疾病已经成为十分迫切的课题。血栓形成涉及血管内皮细胞、血小板、凝血/抗凝、纤溶/抗纤溶等环节。在诸多环节中, 血小板的活化、黏附和聚集, 无论是在早期生理止血还是病理的血栓形成过程中均起着重要作用。血小板膜糖蛋白 GPⅡb/Ⅲa 复合物单克隆抗体(PAC-1)、血小板 α -颗粒膜蛋白(GMP-140)抗 P-选择素单克隆抗体(CD62P)在

作者简介: 王 蕾(1971-), 女(汉族), 天津市人, 医学硕士, 主治医师。

上述过程中扮演了非常重要的角色。多种因素可导致血小板活化,GP II b/III a 在血小板活化过程中由开放管道系统(OCS)和 α -颗粒膜释放转向膜外^[2];同时血小板空间构型发生改变,暴露出纤维蛋白原受体,与纤维蛋白原交联成网,导致血小板聚集,形成血小板血栓,从而诱发血栓形成的“瀑布”链锁反应。因此,PAC-1是血小板活化早期的标志物,即活化的GP II b/III a;而CD62P是血小板活化后期的标志物^[3,4],即GMP-140。本研究中采用流式细胞仪检测急性脑梗死(ACI)患者血小板膜PAC-1、CD62P的阳性率,同时分析血小板各参数,探讨ACI患者血小板膜PAC-1、CD62P与血小板参数的关系,精确判断血小板的功能状态。

1 资料与方法

1.1 研究对象:选自2005年6—12月天津医科大学总医院神经内科住院的ACI患者51例,其中男32例,女19例;年龄42~78岁,平均(61.63±8.63)岁。符合1996年全国脑血管病学术会议修订的各类脑血管病诊断标准,均经头颅CT或MRI确诊,病程1~5d。合并高血压39例,糖尿病14例,心肌缺血26例。除外栓塞,出血性梗死,严重肝、肾功能障碍,炎症,肿瘤,外伤,血液病,痴呆等患者。正常对照组29例为同期健康体检者,其中男16例,女13例;年龄43~76岁,平均(59.45±9.29)岁;高血压病7例,糖尿病3例,心肌缺血9例;除外心脑血管缺血性卒中、血栓栓塞性疾病,无严重肝、肾功能障碍及明显动脉硬化症,无炎症、肿瘤、外伤、血液病、痴呆等。

两组患者年龄、性别相匹配,差异均无显著性,具有可比性。近2周内两组患者均无服用阿司匹林等抗血小板类药物史。

1.2 主要试剂和仪器:①荧光素标记的血小板单克隆抗体(McAb):异硫氰酸荧光素(FITC)标记的PAC-1,藻红素(PE)标记的CD62P,多甲藻素-叶绿素蛋白(PerCP)标记的抗血小板GP III a单克隆抗体(CD61),PE标记的鼠IgG(MIgG,作为CD62P的同型对照),以上为美国Becton-Dickson公司产品;②PAC-1阻断剂(用于PAC-1的阴性质控):人工合成的精氨酸-甘氨酸-天冬-丝氨酸多肽[RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)肽],美国Sigma公司产品;③主要仪器:FACSsort流式细胞仪(美国Becton-Dickinson公司产品),日本东亚Sysmex K-4500型全自动血细胞分析仪。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 血小板参数检测:取患者入院后次日晨空腹肘前静脉血2ml,用质量分数为2%的乙二胺四乙酸二钾(EDTA 2K)抗凝管抗凝,血液与抗凝剂的比例为10:1。采血2h内用电阻抗法在自动血细胞分析仪上进行血常规检查。

1.3.2 血小板膜糖蛋白检测:患者入院后次日晨空腹肘前静脉取血2ml,用质量分数为3.2%的枸橼酸钠抗凝真空采血管抗凝,血液与抗凝剂的比例为9:1,混匀后0.5h内完成染色。PAC-1和CD62P的表达测定采用流式细胞仪三色荧光分析方法^[5]。在实验管和对照管中各加入5 μ l全血,用50 μ l磷酸盐缓冲液(PBS)稀释;在实验管中加入PAC-1 FITC、CD62P PE、CD61 PerCP各10 μ l;在对照管中加入PE的同型对照MIgG PE、CD61 PerCP、PAC-1 FITC各10 μ l,RGDS加5 μ l。将以上各管轻轻混匀,室温暗处孵育15~20min,然后在各管中加入体积分数为1%的多聚甲醛1ml,充分混匀,2~8 $^{\circ}$ C阴暗处放置30min,24h内上机分析。设激发光波长为488nm,发射光波长为525nm,以标准荧光微球调整CV \leq 2%,调前向角光散射(FSC)、侧向角光散射(SSC)、荧光信号均为对数放大,以CD61 PerCP和侧向角光散射双参数设血小板门,以同型对照管设定阴性群体,测定10000个血小板,计算PAC-1、CD62P阳性表达率。

1.4 统计学处理:采用SPSS11.5统计软件包进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均数比较采用非配对t检验;血小板膜糖蛋白与血小板参数的相关性用直线相关关系检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板膜糖蛋白和血小板参数的关系(表1):与对照组比较,病例组血小板膜糖蛋白PAC-1、CD62P和血小板平均体积(MPV)均明显高于对照组,差异均有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与对照组比较,血小板分布宽度(PDW)、大血小板比率(LPR)有增高趋势,血小板计数(PC)有减少趋势,但差异均无显著性(P 均 >0.05)。

2.2 血小板膜糖蛋白与血小板参数的相关性:直线相关分析显示,PAC-1与MPV和LPR之间、CD62P与MPV之间均存在正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而PC、PDW与膜糖蛋白之间无相关关系(P 均 >0.05)。

表 1 两组血小板膜糖蛋白阳性率及血小板参数的比较($\bar{x}\pm s$)Table 1 Comparison of platelet membrane glycoproteins positive rate and parameters of platelet between two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	例数(例)	PAC-1(%)	CD62P(%)	PC($\times 10^9/L$)	MPV(fl)	PDW	LPR(%)
病例组	51	53.10 \pm 21.70**	25.35 \pm 12.87**	194.20 \pm 39.26	10.15 \pm 1.12*	12.19 \pm 2.01	24.73 \pm 9.15
对照组	29	16.53 \pm 7.46	12.15 \pm 3.36	205.07 \pm 46.06	9.56 \pm 0.92	11.85 \pm 2.42	23.31 \pm 6.61

注:与对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

在正常血液循环中,血小板处于静止状态;而当受到生理或病理刺激因子作用时,血小板在 von Wille - Brand 因子(威勒布兰特因子,vWF)作用下黏附于受损血管处暴露的内皮组织。随后,黏附的血小板被内皮下组织或局部形成的凝血酶所活化,发生释放反应和花生四烯酸代谢,由前者分泌释放的二磷酸腺苷(ADP)和后者形成的血栓烷 A_2 (TXA₂)都可以引起血小板的聚集。血小板的黏附、聚集和活化反应都是通过其表面膜糖蛋白的功能实现的。关于 GP II b/III a、CD62P 与急性心脑血管病及心肺复苏的关系已见报道^[6,7]。我们在本试验中也得到同样结论:与对照组比较,病例组 PAC-1、CD62P 阳性率明显增高。提示 ACI 患者体内存在血小板活化,强力抑制血小板活化的治疗越早越好。亦有研究证实,MPV 与其功能密切相关,是生理性止血的重要变量^[8],是血小板功能的标志物。并且 PC 和 MPV 呈负相关,PC 增加则 MPV 下降,PC 减少则 MPV 上升^[9]。Greisenegger 等^[10]在一项对 1 322 例急性缺血性脑血管病患者的研究中指出,MPV 增大和卒中严重程度呈正相关,并与预后严重程度有关,PC 与卒中严重程度无关;并证实患有严重卒中的患者在卒中发生前就已表现出 MPV 增大,反映血小板活化增加。Bath 等^[11]进行的 PROGRESS 试验中也证实,对于既往有脑血管病史的高危人群,MPV 是卒中风险的独立检测指标,并指出 MPV 每升高 1 fl 卒中患病相对危险增加 12% [95% 可信区间(95%CI)4%~20%]。本研究中病例组的 MPV 显著高于对照组,与上述研究结果一致。与对照组比较,PDW、LPR 有增高趋势,PC 有减少趋势。

本研究结果显示,ACI 患者体内存在血小板活化,表现为 PAC-1、CD62P 阳性率升高,MPV 增大;且 PAC-1 与 MPV 和 LPR 之间存在正相关关系,尤其 PAC-1 与 MPV 有非常显著的正相关关系,CD62P 与 MPV 之间亦存在正相关关系,而 PC、PDW 与膜糖蛋白之间无相关关系。提示 PAC-1、CD62P 作为血小板活化标记物的同时,MPV、LPR 也可作为血小板活化与否的参考数值。综上所述,本

研究采用在检测急性动脉粥样硬化缺血性脑血管病患者血小板参数的同时,用 FCW 检测全血活化血小板膜糖蛋白分子的变化,精确判断血小板的功能状态,减少了标本分离处理过程中血小板的人为活化^[5],探讨了血小板参数与 PAC-1、CD62P 之间的联系。表明 ACI 患者体内存在着血小板活化,血小板膜糖蛋白和血小板参数共同参与了这一过程;PAC-1 与 MPV 呈显著正相关。这为指导临床预防、诊治、评估急性缺血性中风提供了简便、可行的依据。

参考文献:

- [1]Janardhan V, Qureshi A I. Mechanisms of ischemic brain injury [J]. Curr Cardiol Rep, 2004, 6(2): 117 - 123.
- [2]Mangiafico S, Cellerini M, Nencini P, et al. Intravenous glycoprotein II b/III a inhibitor (tirofiban) followed by intra-arterial urokinase and mechanical thrombolysis in stroke [J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2005, 26(10): 2595 - 2601.
- [3]Goto S, Ichikawa N, Lee M, et al. Platelet surface P - selectin molecules increased after exposing platelet to a high shear flow [J]. Int Angiol, 2000, 19(2): 147 - 151.
- [4]Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns A R, et al. Venous levels of shear support neutrophil - platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P - selectin and beta2 - integrin [J]. Circulation, 1998, 98(9): 873 - 882.
- [5]Michelson A D, Barnard M R, Krueger L A, et al. Evaluation of platelet function by flow cytometry [J]. Methods, 2000, 21(3): 259 - 270.
- [6]田凤石, 张秀泉, 赵明, 等. 老年急性缺血性心脑血管病患者血小板表面糖蛋白 II b - III a 的动态变化 [J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(5): 304 - 305.
- [7]许国根, 陈雯, 何建如, 等. 心肺复苏患者血小板膜糖蛋白的变化 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(5): 301 - 302.
- [8]Martin J F, Trowbridge A. Platelet heterogeneity: biology and pathology [M]. London: Springer - Verlag, 1990: 291 - 298.
- [9]O'Malley T, Langhorne P, Elton R A, et al. Platelet size in stroke patients [J]. Stroke, 1995, 26(6): 995 - 999.
- [10]Greisenegger S, Endler G, Hsieh K, et al. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events [J]? Stroke, 2004, 35(7): 1688 - 1691.
- [11]Bath P, Algert C, Chapman N, et al. Association of mean platelet volume with risk of stroke among 3 134 individuals with history of cerebrovascular disease [J]. Stroke, 2004, 35(3): 622 - 626.

(收稿日期:2007-03-09 修回日期:2007-05-10)

(本文编辑:李银平)