

一种新型血小板聚集仪性能评价 及几种血小板分析仪的比较研究

任军伟 关杰 朱远 白洁 丛玉隆*

(解放军总医院西院检验科, 北京 100853; * 通讯作者, 北京 100853)

摘要: **目的** 通过新型 PL-11 血小板分析仪 (结果用最大聚集率, maximum aggregation rate, 以 PL-MAR%表示) 与光比浊法血小板聚集仪 (light transmittance aggregometry, LTA), 结果用血小板最大聚集率以 LTA-MAR%表示) 及 Verifynow 抗血小板治疗监测系统 (VerifyNow) 结果用血小板抑制百分数 INHI% (inhibition of platelet aggregation percentage) 表示, 用 (100-INHI%) 表示 Verifynow 血小板聚集率进行比较。**方法** 利用二磷酸腺苷 (adenosine phosphate, ADP) 诱导的 LTA 实验, ADP 诱导的 PL-11 血小板分析仪实验, VerifyNow 的 P2Y₁₂ 阻断剂检测板实验 (VerifyNow) 同时检测对照组与单服氯吡格雷患者组 (以下用患者组表示) 血小板聚集功能。**结果** ①对照组与患者组对比, LTA-MAR%, PL-MAR%, INHI% 3 个参数有统计学差异 (分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$); ②PL-MAR%, 与 (100-INHI%), LTA-MAR%呈正相关 (r 分别是 0.794、0.889)。**结论:** ①氯吡格雷有抗血小板聚集的药物效果。②PL-11 作为一种新型的血小板分析仪, 检测结果与 LTA 法、VerifyNow 法结果相关性良好, 精密度更高, 可作为血小板聚集功能检测的新方法。

关键词: 血小板聚集; PL-11; 光比浊血小板聚集仪; ADP; VerifyNow;

目前我国心血管疾病患者已超过 2.7 亿, 按全国人口 14 亿计算, 近 5 个中国人中就有 1 人患心血管疾病。随着心血管病人抗血小板药物的广泛使用, 如何更有效、更准确地掌握个体患者的服药效果, 科学地进行个体化治疗, 就需要有更好的临床检验监测手段。目前, 光比浊法血小板聚集仪 (light transmittance aggregometry, LTA) 在临床上的使用率超过 95%, 是临床应用的最多一种检测方法^[1]。VerifyNow 抗血小板治疗监测系统 (VerifyNow) 近年来在国际上广泛被研究应用, 普遍认为其结果准确、可靠。南京神州英诺华公司新推出了一种以电阻抗法连续监测血小板数量判断聚集情况的新型仪器 PL-11。本文通过 PL-11 与 LTA 及 VerifyNow 在血小板聚集功能方面的平行检测, 达到对 PL-11 检测性能和方法学的深入了解, 使其成为临床医生进行抗血小板药物药效监测及血小板功能检测不可多得的新方法, 能够更加准确、有效, 快速地服务于患者。

1 材料和方法

1.1 仪器及试剂: CHRONO-LOG MODEL700 血小板聚集分析仪及其配套试剂 (美国

CHRONO-LOG公司); VerifyNow抗血小板治疗监测系统(上海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; PL-11血小板分析仪及配套试剂(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随机选取17例健康志愿者, 男性15例, 女性2例; 随机选取单服用氯吡格雷(75mg/d) 10天以上的心脑血管病患者10例(同时未服用其他抗血小板聚集类药物)。②用4支3.8%枸橼酸钠抗凝真空采血管采集静脉血: 3支3ml, 1支2ml。2支3ml样本进行LTA实验; 1支3ml样本进行英诺华PL-11血小板分析仪实验; 1支2ml样本进行VerifyNow P2Y12阻断剂检测板实验。

1.3 方法: ①光比浊法血小板聚集仪实验^[2](light transmittance aggregometry): 使用10 μ mol/L 二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)作为诱导剂, 用血细胞分析仪测定富血小板血浆(platelet rich plasma, PRP)的血小板浓度, 用贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP)调整 PRP 血小板浓度为(200~300) \times 10⁹/L^[3], 检测 ADP 诱导血小板聚集率。②VerifyNowP2Y12 阻断剂检测板实验: 先做光路质控, 然后取 2ml 的 Verifynow 专用枸橼酸钠抗凝真空采血管标本, 于 24~28 $^{\circ}$ C 稳定 10min, 上下颠倒混匀 10 次, 倒插入分析仪中, 3min 后打印结果; ③PL-11 血小板分析仪实验: 将样本置于仪器的待测试位置, 按“检测”键, 等待测试完毕, 打印结果。

1.4 主要观察指标: ADP 诱导 LTA 测得血小板最大聚集率(LTA-MAR%); VerifiNow 测得血小板 Inhibition of platelet aggregation percentage (INHI%); PL-11 测得最大聚集率(maximum aggregation rate, PL-MAR%)。

1.5 统计学分析: 用 EXCEL2007 整理数据, 用 SPSS13.0 软件包进行对照组与患者组的配对 t 检验以及所有观察对象 3 种测试方法测得参数的双变量相关性分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组与患者组观察指标(参数)对比 LTA测得的LTA-MAR%%; VerifyNow测得的BASE、P2Y12受体的PRU, INHI%; PL-11测得的MAR%。请参见表1。

表1 LTA、VerifyNow、PL-11测得对照组与单服氯吡格雷组参数对比($\bar{x}\pm S$)

项目	对照组	单服氯吡格雷组	P 值	结果
LTA-MAR%	71.4 \pm 13.8	44.5 \pm 14.2	<0.01	有统计学差异
PL-MAR%	70.1 \pm 9.0	53.7 \pm 6.3	<0.01	有统计学差异
(VerifyNow) INHI (%)	11.25 \pm 8.8	29.3 \pm 16.9	<0.05	有统计学差异
(VerifyNow) PRU	281.1 \pm 49.4*	203.2 \pm 98.4	<0.01	有统计学差异
(VerifyNow) BASE	302 \pm 52.4	340 \pm 80.5*	>0.05	无统计学差异

*指该参数值不服从正态分布, 使用Mann-Whitney两个独立样本非参数检验法; 其余参数值服从正态分布, 使用配对t检验。

2.2 所有观察对象PL-MAR%, INHI%, LTA-MAR%3个参数双变量相关性分析 请参见表2。

表2 LTA、VerifyNow、PL-11测得参数相关性

相关系数 r	(100-INHI%)	PL-MAR%	LTA-MAR%
(100-INHI%)	1	0.794	0.709
PL-MAR%	0.794	1	0.889

注：所有参数首先通过单变量方差分析进行斜率差异性检验，结果均为 $P>0.05$ ，即直线斜率、截距无差异；然后进行参数双变量相关性分析。

3.讨论

血小板是血栓形成的重要因素，当血小板活化后，其 α 、 γ 及溶酶体等贮存颗粒中的内容物通过开放管道系统（open canalicular system, OCS）发生释放反应，颗粒膜蛋白在质膜上高水平表达，引起CD62p、PAC-1显著性改变^[4]。PAC-1与血小板表面的GP II b/IIIa和血液中的纤维蛋白原（Fg）结合^[5]，在 Ca^{2+} 的协助下发生血小板聚集^[6]。因此，检测血小板聚集功能对于早期血栓形成的风险评估，阐明相关疾病的病理机制及临床选择正确的治疗方案等有重要意义。

光学比浊血小板聚集功能检测是将PRP置于比色杯中，加入诱导剂后，用涂硅小磁粒进行搅拌，血小板逐渐聚集。光探测器接收这一血小板聚集反应体系中连续变化的光信号，经过转换，最终将透射光的强度变化通过光强度-时间变化曲线描绘出来，就可直接通过图表观察到血小板聚集的全过程，以此反映出血小板聚集的速度、程度、血小板解聚等方面的参数和信息^[7]。VerifyNow通过血小板上与ADP结合的P2Y₁₂和P2Y₁两种受体的不同，加入前列腺素E1（PGE1）抑制ADP与P2Y₁受体结合，使仪器特异性检测病人服用噻氯吡啶类（thienopyridines）药物（如氯吡格雷等）后的血小板聚集功能。同时，采用凝血酶受体激活途径（Thrombin receptor Activators）激活血小板聚集，以检测病人血小板聚集功能的基线（不受P2Y₁₂阻断剂影响的通路），两者对比之后得出药物抑制血小板聚集率—INHI%。PL-11血小板分析仪是通过在抗凝全血中加入诱聚剂使血小板发生聚集，仪器均匀选取若干测试点测定非聚全血中的血小板数量，通过与ADP诱聚前最开始测得的两次血小板数量平均值对比得出血小板聚集率，以此反映血小板聚集功能，所测参数有血小板最大聚集率（MAR%）、血小板最大聚集点（MAP%）、血小板平均聚集率（AAR%）、血小板数量、平均血小板体积（MPV）、红细胞数量、平均红细胞体积（MCV）7个参数。

本实验中，首先，从表1结果可以看出健康对照组与患者组相比，LTA-MAR%、PL-MAR%、INHI% 3个参数在2组之间都有显著性差异。这说明：①氯吡格雷具有一定的抗血小板聚集功能，只是药效不强，原因可能与其他一些因素有关，如遗传变异性、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^[8]；②PL-11作为南京神州英诺华医疗技术有限公司新近上市的新型血小板分析仪，其准确测得对照组与患者组的结果差异，证明其完全可以满足临床的检测需求。再者，PL-11测得患者PL-MAR%结果是 53.7 ± 6.3 ，与对照组MAR%结果 70.1 ± 9.0 相比，约减低24%，同时LTA测得的LTA-MAR%约减低38%，VerifyNow测得的（100-INHI%）约减低19%，PL-11的结果变化率正介于二者中间，说明PL-11方法兼具了LTA法和VerifyNow法的优点，或者说PL-11方法克服了LTA法和VerifyNow法的缺点，结果更加符合真实情况。分析原因：①LTA使用的是离心血浆，它的检测状态与体内全血的凝集状态有较大差异，主要是它去除了红细胞参与聚集所产生的效果，而红细胞对于体内血栓的形成是十分重要的；②VerifyNow虽然也是使用全血测定，但是它以凝血酶作为聚集基线（platelet aggregation baseline, BASE），这本身就不十分科学，因为众所周知，血小板有许多聚集通路，凝血酶通路并不代表真正的血小板最大聚集能力，我们在实验中经常发现P2Y₁₂受体的Reaction Units值（PRU）大于BASE的情况出现，而此时仪器给出的Inhibition of platelet aggregation percentage 即INHI%直接为“0”，事实上INHI%是否真正为“0”，我们不得而知，唯一的办法就是通过其他的检测方法重新检

验。这种情况的发生恰好证明了凝血酶通路并不代表真正血小板最大聚集能力这个论断。

从表2的结果可以看出PL-11测得的PL-MAR%与VerifyNow测得的(100-INHI%)相关性良好 ($r=0.794$), 与LTA测得的LTA-MAR%相关性非常好 ($r=0.889$)。而目前许多人仍认为LTA是血小板聚集功能检测的金标准^[1]。VerifyNow新近在国际上也逐渐被大家所认可, 所以, 3种仪器检测结果个参数之间的美好相关性充分证明了PL-11检测结果的准确性良好, 精密度相对更高。

综上所述, PL-11作为一种南京神州英诺华医疗科技有限公司新型的血小板分析仪, 通过对与LTA、VerifyNow平行测定结果的研究分析, 发现其主要优势在于: ①采用“自动连续检测”的方法, 直接对血样中诱聚剂加入后血小板数量、体积的变化进行持续监测, 测得聚集前、后血小板数量的变化, 计算得出血小板聚集功能水平, 与LTA、VerifyNow依靠光浊度变化间接信息推断相比, 检测信号更加直接, 干扰因素少, 不受溶血、脂血、黄疸等标本浊度的影响; ②采用抗凝全血作为测试样本, 基本保持与体内血液组成状态一致, 白细胞、红细胞参与检测过程, 更符合体内真实的血小板聚集状况; ③PL-11仪与LTA、VerifyNow相比, 准确性良好, 精密度更高; ④仪器同时还能提供血小板平均体积(MPV)、红细胞数量、平均红细胞体积(MCV)等参数, 一次测定, 便可对样本多个方面分析评价, 更加全面, 准确。⑤仪器操作简便、快速、检测费用低廉。综合以上几点, 证明PL-11完全可以作为临床上抗血小板药物药效监测, 血小板聚集功能检测的良好方法选择。

参考文献

- 1 Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases[J]. Circulation . 2004; 110: e489-e493.
- 2 吴涛,刘景汉,李卉,等. 亚硝基谷胱甘肽对冰冻血小板聚集及一氧化氮. 中国实验血液学杂志,2012,20:386-389.
- 3 谭大伟,朱平,李小鹰. 氯吡格雷抑制血小板功能的两种检测方法比较: 血小板聚集实验与血小板膜糖蛋白检测. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11:2021-2024.
- 4 徐培敬,陈颖,胡友东. 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 张焯, 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):698-671.
- 6 丛玉隆, 王丁等. 当代检验分析技术与临床[M]. 中国科学技术出版社. 2002: 106-115
- 7 邹雄, 丛玉隆, 陈瑜, 等. 临床检验仪器. 北京:中国医药科技出版社, 2010, 110-116.