

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0704-03

血小板活化与脑梗死及颈动脉粥样硬化的相关性

陈秋月¹, 丁美萍², 金笑平¹, 林仙方³, 陈葆国⁴

(浙江省台州医院 1. 神经内科, 3. 超声室, 4. 中心实验室, 浙江省临海市 317000;

2. 浙江大学医学院附属第二医院神经内科, 浙江省杭州市 310009)

[关键词] 神经病学; 血小板活化; 脑梗死; 动脉粥样硬化; 颈动脉; 流式细胞术; 彩色多普勒超声

[摘要] 探讨血小板活化程度与脑梗死及颈动脉粥样硬化的关系。用流式细胞术检测 73 例动脉粥样硬化性脑梗死患者及 61 例对照者全血血小板膜糖蛋白 PAC-1 和 CD62P 阳性率, 同时行颈动脉彩色多普勒超声检查。与对照组相比, 脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 阳性率(颈动脉粥样硬化脑梗死组分别为 14.13 ± 5.75 和 15.80 ± 8.89 , 颈动脉正常脑梗死组分别为 11.70 ± 5.32 和 12.36 ± 6.49) 均显著高于对照组(颈动脉粥样硬化对照组分别为 7.78 ± 5.17 和 7.55 ± 5.28 , 颈动脉正常对照组分别为 4.77 ± 3.71 和 5.05 ± 4.01) ($P < 0.01$); 不管在脑梗死组还是对照组中, 颈动脉粥样硬化者 PAC-1 和 CD62P 阳性率显著高于颈动脉正常者 ($P < 0.05$), 且以颈动脉粥样硬化脑梗死组最高。此结果提示, 血小板活化程度与脑梗死、颈动脉粥样硬化二者均有关系, 活化血小板在动脉粥样硬化性脑梗死患者发病中可能起着重要作用。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

The Relationship between Platelet Activation and Cerebral Infarction as well as Carotid Atherosclerosis

CHEN Qiu Yue¹, DING Mei Ping², JIN Xiao Ping¹, LIN Xian Fang³, and CHEN Bao Guo⁴

(1. Department of Neurology, 3. Department of Ultrasound, 4. Department of Central Laboratory, Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Linhai 317000; 2. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

[KEY WORDS] Platelet Activation; Cerebral Infarction; Atherosclerosis; Carotid Artery; Flow Cytometry; Color Doppler Ultrasound

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between platelet and cerebral infarction as well as carotid atherosclerosis. **Methods** Positive rates of PAC-1 and CD62P, which are both platelet membrane glycoproteins, were measured by flow cytometry in blood samples while carotid artery were evaluated by color Doppler ultrasound in 75 patients with atherosclerotic cerebral infarction and 61 healthy examination persons. **Results** Positive rates of PAC-1 and CD62P in the cerebral infarction groups no matter with or without carotid atherosclerosis were significantly higher than that in the corresponding control groups. In addition, the positive rates in the groups with carotid atherosclerosis were significantly higher than those in the groups without carotid atherosclerosis both in cerebral infarction groups and in control groups. Furthermore, the positive rates in the groups of cerebral infarction with carotid atherosclerosis were the highest. **Conclusion** The level of platelet activation is associated with cerebral infarction and carotid atherosclerosis. Activating platelet may play an important role in atherosclerotic cerebral infarction.

随着免疫学及分子生物学的发展, 有关活化血小板在血栓性疾病中的作用近年来有了更深入的研究, 活化血小板在动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, As)中也起着重要的作用^[1]。有关血小板活化与颈 As 关系国内外研究甚少, 而有关颈 As 脑梗死患者血小板活化程度, 国内尚罕见报道。我们利用流式细胞术对研究对象外周血血小板活化标记物 PAC-1 和 CD62P 进行检测, 同时行颈动脉 B 超的检查, 以探讨血小板活化与脑梗死及颈 As 的关系。

1 对象和方法

1.1 研究对象

脑梗死组选自 2002 年 8 月~2003 年 7 月收住我院神经内科动脉粥样硬化性脑梗死患者, 诊断依据 1995 年第四届全国脑血管病学术会议制定的动脉粥样硬化性脑梗死诊断标准, 并经头 MRI 检查确诊, 除外椎-基底动脉系统闭塞引起的脑梗死, 并除外感染、心、肺、肝、肾疾病, 血液病, 组织损伤者, 所有患者均是发病 2 天内入院。共 73 例, 其中男 36 例, 女 37 例, 年龄 41~79 岁, 平均 61.7 ± 9.9 岁。

对照组为健康体检者, 经头颅 CT 或 MRI 检查有无症状性脑梗死者不纳入。共 61 例, 其中男 30 例, 女 31 例, 年龄 42~82 岁, 平均 60.9 ± 10.1 岁。

[收稿日期] 2004-01-13

[修回日期] 2004-08-20

[作者简介] 陈秋月, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为脑血管疾病。丁美萍, 主任医师, 科主任, 研究方向为脑血管疾病和癫痫。金笑平, 主任医师, 科主任, 研究方向为脑血管疾病。

所有研究对象在来院前 2 周均未用过阿司匹林、潘生丁、肝素等影响血小板的药物。二组在年龄、性别构成比、血小板计数、血压、空腹血糖、血脂水平等基线资料比较,在统计学上无显著性差别($P > 0.05$, 表 1, Table 1)。

表 1. 脑梗死组与对照组基线资料比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of basic data between cerebral infarction group and control group

指标	对照组	脑梗死组
性别 (男/女)	30/31	36/37
年龄 (岁)	60.9 $\pm$ 10.1	61.7 $\pm$ 9.9
血小板计数 ($\times 10^9/L$)	165.4 $\pm$ 68.4	170.1 $\pm$ 9.1
收缩压 (mm Hg)	149.2 $\pm$ 17.6	156.4 $\pm$ 19.4
舒张压 (mm Hg)	90.0 $\pm$ 13.3	94.2 $\pm$ 16.5
空腹血糖 (mmol/L)	5.6 $\pm$ 0.9	5.67 $\pm$ 0.87
甘油三酯 (mmol/L)	1.3 $\pm$ 0.6	1.37 $\pm$ 0.63
总胆固醇 (mmol/L)	5.0 $\pm$ 1.0	5.54 $\pm$ 1.23

1.2 PAC-1 和 CD62P 的检测

采用美国 Becton-Dickinson 公司生产的流式细胞仪进行检测。大号针管采血,抽出前 2 mL 血弃去,采 2 mL 血放入枸橼酸钠抗凝真空采血管,将 5 μ L 全血分别加入事先置有单抗的 Faclon 试管内,管壁上不残留血液,实验管加入 PAC-1 FITC、CD62P PE、CD61 PerCP 荧光抗体各 20 μ L,对照管加入 PAC-1、IgG1 PE (CD62P PE 同型对照)、CD61 PerCP 荧光抗体各 20 μ L, RGDS (PAC-1 阻断剂) 10 μ L (Falcon 管、荧光抗体均购自美国 BD 公司),轻轻混匀,室温避光反应 20 min,每管加入 1% 多聚甲醛固定液混匀,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 阴暗处放置 30 min,24 h 内上机检测有 PAC-1 和 CD62P 表达的阳性血小板百分率(下称 PAC-1 和 CD62P 阳性率)。

1.3 颈动脉彩色多普勒超声检测

由一位经验丰富的超声医师专人负责。采用美国 GE 公司 SYSTEM FIVE 型彩色多普勒超声探测仪,探头频率 10 MHz。检查前病人休息 5 min,取平卧位,头偏向一侧,探头放置颈根部,胸锁乳突肌前缘气管旁,沿颈动脉走向,自下而上作连续纵、横切面扫查。仔细检测颈动脉内膜中膜厚度,有无斑块,斑块的形态、大小、性质。内膜粗糙,厚度 ≥ 1.0 mm,或局部有斑块者诊断为颈 As^[2]。颈 As 斑块的诊断标准为局部内膜中膜厚度 > 1.20 mm,或比邻近部位厚 0.50 mm,或彩色图象显示血管腔某处彩色血流缺损,缺损面积 ≥ 10 mm² 者^[3]。

1.4 第二次分组

根据 B 超检查结果再对研究对象进行第二次分组:颈 As 组和 CA 正常组。其中脑梗死组中有颈 As 患者 34 例,男 17 例,女 17 例,年龄 41~78 岁,平均 61.4 $\pm$ 9.1 岁;CA 正常患者 39 例,男 18 例,女 21 例,年龄 46~79 岁,平均 60.9 $\pm$ 10.4 岁。对照组中有颈 As 者 17 例,男 8 例,女 9 例,年龄 42~82 岁,平均 60.5 $\pm$ 10.9 岁;CA 正常者 44 例,男 24 例,女 20 例,年龄 42~77 岁,平均 59.4 $\pm$ 9.9 岁。

1.5 统计学处理

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析。四组均数间两两比较采用 $F+q$ 检验。

2 结果

2.1 血小板活化程度与脑梗死的关系

各组 PAC-1 和 CD62P 的测定结果见表 2 (Table 2)。可见颈 As 脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 在血小板膜上表达的阳性率均显著高于颈 As 对照者($P < 0.01$),颈动脉正常脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 阳性率也均显著高于颈动脉正常对照组($P < 0.01$)。说明脑梗死患者血小板活化程度显著增高。

表 2. 各组 PAC-1 和 CD62P 表达的阳性率比较

Table 2. Comparison of positive rates of PAC-1 and CD62P among several groups ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	PAC-1	CD62P
CA 正常对照	44	4.8% $\pm$ 3.7%	5.1% $\pm$ 4.0%
颈 As 对照	17	7.8% $\pm$ 5.2% ^a	7.6% $\pm$ 5.3% ^a
CA 正常脑梗死	39	11.7% $\pm$ 5.3% ^{bc}	12.4% $\pm$ 6.5% ^{bc}
颈 As 脑梗死	34	14.1% $\pm$ 5.8% ^{bcd}	15.8% $\pm$ 8.9% ^{bcd}

CA 为颈动脉。a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 CA 正常对照组比较; c: $P < 0.01$, 与颈 As 对照组比较; d: $P < 0.05$, 与 CA 正常脑梗死组比较。

2.2 血小板活化程度与颈动脉粥样硬化的关系

从表 2 (Table 2) 可见,颈 As 脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 在血小板膜上表达的阳性率均显著高于 CA 正常脑梗死组($P < 0.05$),同样,颈 As 对照组 PAC-1 和 CD62P 阳性率也均显著高于颈动脉正常对照组($P < 0.05$)。说明无论在脑梗死组还是对照组中,颈 As 者血小板活化程度显著高于颈动脉正常者。

2.3 脑梗死与颈动脉粥样硬化的关系

从表 2 (Table 2) 还可见, PAC-1 和 CD62P 阳性率在四组中以颈 As 脑梗死组最高,在统计学上有显著

性差异。

3 讨论

血小板聚集是血栓形成的重要步骤,血小板聚集的发生首先要血小板的活化,然后才能使血小板发挥粘附、聚集、释放等生物学行为。PAC-1 是 GPIIb/IIIa 活化后暴露的纤维蛋白原受体,即活化的 GPIIb/IIIa 复合物,一个纤维蛋白原分子可至少与两个 GPIIb/IIIa 复合物结合,所以血小板能通过各自表面 GPIIb/IIIa 复合物与纤维蛋白原受体结合形成团块,同时它还能与其他一些粘附蛋白如 von Willebrand 因子等结合,在血小板之间起到“桥梁”作用,因此 PAC-1 形成是血小板聚集的必要条件,是血小板活化的早期标志物;CD62P(即 P 选择素)是血小板 α 颗粒膜糖蛋白成分,静息血小板仅少量表达,当血小板活化时 α 颗粒大量释放到血小板表面,介导血小板在内皮细胞上滚动、粘附以及血小板与中性粒细胞和单核细胞间的相互作用,它是血小板活化后期的标志物^[4,5]。

当今脑血管疾病严重危害中老年人的健康,国内外均有资料显示血小板活化与脑血管病关系密切^[6,7],颈 As 是脑血管重要的危险因素之一,国内梁旭等^[8,9]研究血小板活化与颈 As 有关系,血小板活化与脑梗死、颈 As 二者的关系如何,活化血小板在伴颈 As 脑梗死发病有何作用,国内罕见报道。

本文发现,颈 As 脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 的阳性率显著高于颈 As 对照组,CA 正常脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 阳性率也显著高于 CA 正常对照组。因此,脑梗死组 PAC-1 和 CD62P 的阳性率显著增高,提示脑梗死患者血小板活化程度增高,功能异常活跃。Frijns 等^[10]认为组织缺血后再灌注产生大量氧自由基及凝血酶等,凝血酶促使内皮细胞和血小板表达 CD62P,后者又进一步导致白细胞粘附和粘附后的细胞变化,组织因子暴露,凝血系统活化,反过来进一步活化血小板,形成恶性循环。推测脑梗死患者血小板活化程度增高可能与此机制有关。

动脉粥样硬化(As)可致血管内皮损伤,PGI₂ 和 NO 合成减少,内皮下胶原组织暴露,血小板向内皮下粘附,激活血小板膜受体,使血小板发生活化反应;粥样斑块发生又可造成局部血管狭窄,血液流速、流态发生变化,此时血流受到的剪切力要远高于生理水平,高剪切力作用可使血小板表面 PAC-1 和 CD62P 表达明显增加^[11]。本文资料表明无论在脑梗死组还是对照组中,有颈 As 组血小板活化程度显

著高于颈动脉正常组,提示血小板活化与颈 As 形成有关,推测与局部内皮损伤,斑块的形成致局部剪切力改变有关。而颈 As 与缺血性脑血管病发生关系密切,推测活化血小板在其中起着重要的作用。

因血小板活化程度增高与脑梗死、颈 As 二者均有密切的关系,这就导致了如本文资料所显示的脑梗死伴颈 As 患者血小板活化程度最高,而高度活化的血小板又可聚集成团,使血液非牛顿粘度增高,同时释放血栓素 A₂,使红细胞变形能力降低,导致血粘度增高;又影响血管内皮功能^[12],促进血栓的形成,故针对此点采取血小板膜糖蛋白拮抗剂去抑制血小板的功能用于治疗目的是符合逻辑的,也是非常必要的。

我们以高分辨率彩色多普勒 B 超显像技术对颈动脉颅外段进行无创检查,能准确地检测动脉内中膜厚度及动脉斑块的存在,采用流式细胞仪来测定血循环中血小板膜糖蛋白 PAC-1 和 CD62P 表达,此方法简便、快速、灵敏、特异,能准确地反映出血小板的活化程度和功能状态,是目前研究血小板活化的重要手段。

[参考文献]

- [1] Unno N, Nakamura T, Kaneko H, Uchiyama T, Yamamoto N, Sugatani J, et al. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase deficiency is associated with atherosclerotic occlusive disease in japan. *J Vasc Surg*, 2000, **32** (2): 263-267
- [2] 邹艳秋. 动脉粥样硬化. 见:邹艳秋,戈晓华主编. 颈部动脉超声多普勒实用手册. 北京:学苑出版社,1997; 29-39
- [3] 陈丽萍,于国良,杨春海. 高分辨率超声检测高血压和冠心病患者的动脉壁厚度及粥样斑块. *中国超声医学杂志*, 1998, **14** (3): 13-15
- [4] Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods*, 2000, **21** (3): 259-270
- [5] Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, Hentzen E, Kansas GS, Snapp KR, et al. Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin. *Circulation*, 1998, **98** (9): 873-882
- [6] Karakantza M, Maniatis A, Metallinos CI, et al. In vivo platelet activation in ischemic stroke patients. *Stroke*, 2003, **34** (10): 174-175
- [7] 吴玉泉,陈清勇,霍正禄,沈企周,成军,郑伟,等. 急性脑梗死患者血小板粘附分子检测的临床意义. *中华实用医学杂志*, 2002, **4** (24): 5-7
- [8] 梁旭,孙枫,罗林杰,李富荣,戴勇. 颈动脉粥样硬化程度与血小板活化的相关性分析. *四川大学学报(医学版)*, 2003, **34** (1): 95-97
- [9] 潘水源,王立,万岁桂. α 型糖尿病患者活化血小板糖基化复合物水平与颈动脉粥样硬化的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 245-247
- [10] Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke*, 1997, **28** (11): 2 214-218
- [11] 李锦洋,从玉隆,邓新立,胡金麟,秦小玲. 剪切力作用对血小板膜糖蛋白分子表达的影响. *中华医学杂志*, 2002, **82** (4): 267-270
- [12] 张树羽,汪恕萍. 糖耐量减低患者血小板活化和血管内皮功能的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 430-433

(此文编辑 胡必利)