

FCM、ELISA 和 TEG 对急性脑梗死患者抗血小板治疗的监测

毛晓薇, 毛伦林, 李毅鸣, 管阳太

(第二军医大学附属长海医院神经内科, 上海市 200433)

[关键词] 受试者工作特征曲线; 流式细胞术; 酶联免疫吸附法; 血栓弹力描记术; 阿司匹林; 急性脑梗死; 抗血小板治疗; 个体化治疗

[摘要] **目的** 构建受试者工作特征(ROC)曲线模式,评价不同检测方法对急性脑梗死患者阿司匹林抵抗的监测作用,为临床阿司匹林个体化治疗提供指导。**方法** 对我院 2010 年 2 月到 2011 年 10 月之前未服用抗血小板药物的 127 例急性脑梗死患者分别在使用阿司匹林治疗前和治疗后 1 周采用流式细胞术(FCM)测定全血中血小板表面糖蛋白 P 选择素(CD62P)表达率、酶联免疫吸附法(ELISA)定量检测尿 11-脱氢血栓素 B2(11-DH-TXB2)含量和血栓弹力描记术(TEG)检测花生四烯酸(AA)诱导的血小板抑制率。比较上述 3 种方法监测阿司匹林抵抗(AR)的灵敏度、特异度及 ROC 曲线下面积(AUROC)。**结果** 阿司匹林治疗后 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量均较治疗前显著下降,血小板抑制率较治疗前有明显改善,组间比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。CD62P、11-DH-TXB2、TEG-AA 检测方法间有一定的相关性。FCM 监测阿司匹林抵抗的灵敏度、特异度和 AUROC 分别为 86.7%、79.8% 和 0.805,ELISA 分别为 78.5%、64.7% 和 0.767,TEG-AA 分别为 81.7%、87.3% 和 0.984。**结论** TEG 检测对急性脑梗死患者阿司匹林疗效具有较高的临床应用价值,对急性脑梗死患者抗血小板个体化治疗更具指导作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Comparison of Flow Cytometry, ELISA and Thrombelastograph Monitoring Antiplatelet Therapy in Patients with Acute Cerebral Infarction

MAO Xiao-Wei, MAO Lun-Lin, LI Yi-Ming, and GUAN Yang-Tai

(Department of Neurology, Changhai Hospital, the First Affiliated Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[KEY WORDS] Receiver Operating Characteristic Curve; Flow Cytometry; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Thrombelastograph; Aspirin; Acute Cerebral Infarction; Antiplatelet Therapy; Individual Therapy

[ABSTRACT] **Aim** To compare three different test methods monitoring the situation of inhibited platelet function in patients with acute cerebral infarction taking aspirin orally by establishing receiver operating characteristic (ROC) curve models, and to provide guidance for individual antiplatelet therapy. **Methods** From February 2010 to October 2011, 127 patients with acute cerebral infarction not taking antiplatelet agents before were enrolled. The rate of CD62P expression was detected with flow cytometry (FCM), urinary 11-dehydro-thromboxane B2 levels was determined quantitatively with ELISA, the AA induced platelet inhibition rate was performed with thrombelastography (TEG) before and after 7-day treatment with aspirin orally. The sensitivity, specificity, and the area under the ROC curve (AUROC) of the three methods were calculated to evaluate their effects. **Results** CD62P expression rate, urine 11-dehydro-thromboxane B2 levels and platelet aggregation rate were significantly declined after treatment in aspirin group, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). After treatment CD62P, urine 11-dehydro-thromboxane B2 levels and AA-induced TEG, had a certain correlation. The sensitivity, specificity and AUROC of the three methods were as follows: CD62P 86.7%, 79.8% and 0.805; 11-DH-TXB2 78.5%, 64.7% and 0.767; TEG-AA 81.7%, 87.3% and 0.984. **Conclusions** TEG has a high clinical value on monitoring the efficacy of aspirin in patients with acute cerebral infarction, which can provide more individualized guidance for antiplatelet treatment.

[收稿日期] 2012-01-10

[作者简介] 毛晓薇, 硕士研究生, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 631154539@qq.com。通讯作者管阳太, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为脑血管病与神经免疫性疾病, E-mail 为 yangtaiguan@hotmail.com。

脑梗死是由于脑动脉粥样硬化、血管内膜损伤使脑动脉管腔狭窄,进而因多种因素使局部血栓形成,使动脉狭窄加重或完全闭塞,导致脑组织缺血、缺氧、坏死,引起神经功能障碍的一种脑血管病,是严重危害人类健康的疾病,易导致死亡和残疾^[1]。当前国内外的缺血性心脑血管疾病防治指南均推荐应用抗血小板药物。阿司匹林作为抗血小板药物广泛用于心脑血管疾病的一、二级预防,可明显减少各类栓塞和血栓形成事件^[2],但仍有部分患者虽然长期服用常规剂量的阿司匹林(75~325 mg),其血小板聚集能力仍未被很好抑制,称为生化阿司匹林抵抗,有的患者仍发生血栓栓塞事件,称为临床阿司匹林抵抗或阿司匹林治疗失败^[3]。

随着抗血小板药物种类的增多和药物在患者身上生物学作用的不均一性,检测个体对抗血小板治疗的反应是非常有意义的,可以据此调节个体的用药类型和剂量达到最优化,来控制 and 减少发生血栓和出血的风险^[4]。本研究将构建受试者工作特征(ROC)曲线模型,综合评价流式细胞术(flow cytometry, FCM)、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和血栓弹力描记术(thrombelastography, TEG)三种方法分别监测阿司匹林抵抗(AR)发生率,并进行对比分析,探讨定义抵抗的临界值选择,以期对抗血小板药物治疗与监测寻找最佳的实验诊断方法。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选用我院2010年2月~2011年10月急性脑梗死患者127例,既往无服用阿司匹林史或未服用阿司匹林>6个月。其中男性69例,女性58例,年龄53~84岁,平均 61.85 ± 4.97 岁,均经头颅MRI+DWI确诊为急性脑梗死,NIHSS评分1~12分,平均4.7分。同时选择同期健康体检者10例作为健康对照组,男性6例,女性4例,年龄46~79岁,平均 60.13 ± 5.84 。排除标准:(1)意识障碍、生命体征不稳定;(2)房颤等其他可能导致栓塞性疾病;(3)动脉炎、遗传性急性缺血性脑血管病等非动脉粥样硬化致急性缺血性脑血管病;(4)严重精神疾病症状,临床不能配合的患者;(5)严重肝肾疾病患者及严重全身消耗性疾病患者;(6)一月内有胃肠道或其他严重出血性疾病;(7)骨髓增生症病史;(8)服用其它非甾体类抗炎药物;(9)注射肝素或低分子肝素或肝素诱导的血小板减少;(10)有家族或个人

出血史;(11)血小板计数 $>450 \times 10^9/L$ 或 $<150 \times 10^9/L$;(12)血红蛋白 $<80 g/L$;(13)入院一周前有重大手术史;(14)异型蛋白血症;(15)服用抗凝血药物;(16)服用阿司匹林以外的抗血小板药物。将符合标准的病例组127例入选阿司匹林治疗组,入院后每日服用阿司匹林100 mg,至少连续服用7天以上。所有入选者均签署知情同意书。

1.2 仪器及试剂

德国MACSQuant流式细胞仪;TEG5000型及配套试剂盒(Haemoscope);荧光CD62PAPC, MouseIgGAPC(Becton, Dickinson and Company);11-DH-TXB2 ELISA试剂盒(Cayman Chemical);血小板聚集诱导剂AA(Chrono-log)。肠溶阿司匹林片由拜耳医药保健有限公司生产,规格为每片100 mg。

1.3 全血CD62P表达率检测

采用FCM检测。清晨空腹抽取肘静脉血,取全血分别加入置有抗体的流式管内,避免震荡。对照管加IgG APC、试验管加CD62P APC。为减少血小板体外活化,实验操作均在2 h内完成。

1.4 尿11-DH-TXB2含量检测

采用ELISA检测。留取晨尿,3000 r/min离心10 min,取上清-80℃保存。收齐样本后严格按照试剂盒说明操作。

1.5 血小板抑制率检测

采用TEG检测。清晨空腹抽取肘静脉血,分别以枸橼酸钠和肝素为抗凝剂。实验操作均在2 h内完成,依据检测结果计算出抑制率。血小板抑制率按公式^[1] $MA_{AA}\% = [(MA_{AA} - MA_{fibrin}) / (MA_{thrombin} - MA_{fibrin})] \times 100\%$ 。MA_{AA}%为AA诱导的血小板抑制率,MA_{AA}为AA诱导的血凝块强度,MA_{thrombin}为凝血酶诱导的凝块强度,MA_{fibrin}为纤维蛋白的凝块强度。

1.6 诊断标准的设定

按如下公式分别计算抑制率,根据ROC曲线法设定AR诊断标准:CD62P抑制率(%)=(治疗前CD62P-治疗后CD62P)/治疗前CD62P×100%,尿11-DH-TXB2抑制率(%)=(治疗前尿11-DH-TXB2-治疗后尿11-DH-TXB2)/治疗前尿11-DH-TXB2×100%,TEG血小板抑制率(%)=(治疗后MA%-治疗前MA%)/治疗前MA%×100%。

1.7 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;治疗前后比较采用配对 t 检验;率的比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用Pearson相关法。采用ROC法设定AR诊断标准,绘制ROC曲线并计算曲线下面积。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入院时 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量及 TEG 血小板抑制率

急性脑梗死组入院时 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量高于健康对照组, TEG 血小板抑制率低

表 1. 入院时 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量及 TEG 血小板抑制率

Table 1. CD62P expression rate, urine 11-DH-TXB2 content and TEG-AA inhibition rate when entering the hospital

分 组	例数	CD62P 表达率	尿 11-DH-TXB2 含量 (ng/L)	TEG-AA 抑制率
健康对照组	10	17.63% ± 3.14%	579.14 ± 87.29	34.53% ± 8.67%
阿斯匹林组	127	21.39% ± 4.71% ^a	839.25 ± 116.46 ^a	18.95% ± 4.17% ^a

a 为 $P < 0.01$, 与健康对照组比较。

表 2. 阿斯匹林治疗前后各指标的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The changes of indicators before and after aspirin treatment

项 目	治疗前	治疗后
CD62P 表达率	21.39% ± 4.71%	9.91% ± 4.17% ^a
TEG-AA 抑制率	18.95% ± 4.17%	65.19% ± 22.89% ^a
尿 11-DH-TXB2 含量 (ng/L)	839.25 ± 116.46	435.53 ± 176.71 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与治疗前比较。

2.3 不同检测方法间的相关性

对 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量、TEG 血小板抑制率这些方法进行相关性检验, 结果显示, 这些方法间有一定的相关性 (表 3)。

表 3. 不同检测方法间的相关性

Table 3. Different correlation between the detection methods

	CD62P	TEG-AA	尿 11-DH-TXB2
CD62P	-	-0.396 ^a	0.538 ^a
TEG-AA	-	-	-0.367 ^a
尿 11-DH-TXB2	-	-	-

a 表明在 0.01 水平 (单侧) 上相关。

2.4 应用 ROC 曲线评价三种检测方法的预测价值

根据 ROC 曲线法诊断切点的灵敏度和特异度, 以灵敏度与特异度之和的最高值为诊断最优切点, 不同检测方法诊断 AR 准确性以 ROC 曲线下面积 (AUROC) 表示; FCM 监测 AR 灵敏度、特异度和 AUROC 分别为 86.7%、79.8% 和 0.805, ELISA 分别为 78.5%、64.7% 和 0.767, TEG-AA 分别为 81.7%、87.3% 和 0.984 (表 4 和 5 及图 1)。

于健康对照组 ($P < 0.01$; 表 1)。

2.2 治疗前后 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量及 TEG 血小板抑制率的变化

与治疗前比较, 治疗后 CD62P 表达率和尿 11-DH-TXB2 含量显著降低, TEG 血小板抑制率显著升高 ($P < 0.01$; 表 2)。

表 4. 三种检测方法进行 ROC 曲线分析结果

Table 4. The results of three detection methods by ROC curve analysis

统计指标	CD62P	尿 11-DH-TXB2	TEG-AA
AR	18.89%	13.39%	26.77%
AS	81.11%	86.61%	73.23%
AUROC	0.805	0.767	0.984
标准误	0.051	0.056	0.012
95% CI	0.705 ~ 0.905	0.657 ~ 0.877	0.961 ~ 1.000

统计指标 AS 为阿斯匹林敏感。

表 5. 三种检测方法不同诊断界值筛查效果分析

Table 5. Different diagnostic cut off value by three detection methods screening effect for AR

变 量	切点 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	灵敏度 + 特异度
CD62P	0.227	91.3	64.7	1.56
	0.248	86.7	79.8	1.66
	0.271	82.8	72.6	1.55
	0.286	79.6	70.6	1.50
	0.187	90.8	47.1	1.32
尿 11-DH-TXB2	0.214	88.2	51.8	1.40
	0.262	78.5	64.7	1.43
	0.361	72.0	65.1	1.37
	0.314	98.9	55.9	1.54
	0.326	88.3	68.8	1.57
TEG-AA	0.395	81.7	87.3	1.69
	0.402	77.4	90.1	1.67

3 讨论

评价血小板对药物的反应尚缺乏“金标准”。多数学者认为, 所谓阿斯匹林“抵抗”就是不同患者对阿斯匹林抗血小板治疗作用的反应存在差异^[5]。在实验室主要根据阿斯匹林抑制 TXA2 产生的失效

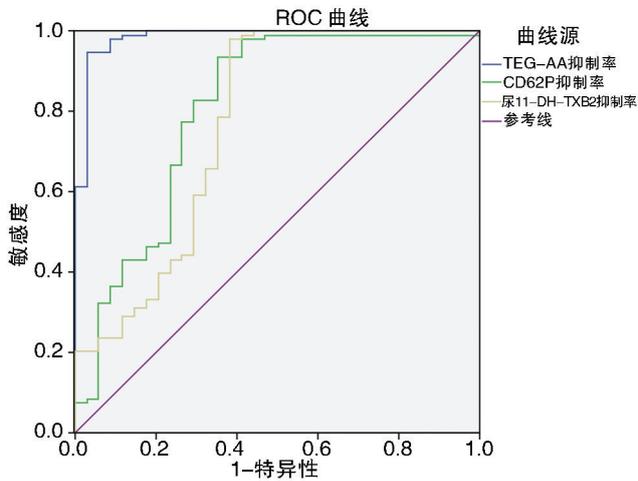


图 1. 受试者工作特征曲线和 ROC 曲线下面积

Figure 1. Receiver operating characteristic curve and the area under the ROC curve

(狭义)或抑制血小板聚集功能的失效(广义)来诊断阿司匹林抵抗^[6]。由于检测方法不同,激动剂浓度差异和诊断临界值不同,各研究报道的阿司匹林低反应发生率在 1% ~ 45% 之间。理想的检测方法应具有良好的灵敏度和特异度。因此本研究选用 FCM、ELISA、TEG 三种方法,用 CD62P、尿 11-DH-TXB2、TEG-AA 抑制率作为观察指标,并利用 ROC 曲线法对诊断阈值的设定,对 AR 进行筛查,并对各种筛查方法进行灵敏度、特异度和准确性评价,进一步提高诊断效能。

血小板活化时,血小板 α 颗粒膜与质膜融合,CD62P 暴露于血小板质膜表面,成为血小板活化的一个特征性指标^[8]。阿司匹林抗血小板聚集的作用机制为不可逆地使血小板环氧酶乙酰化,使花生四烯酸(AA)的代谢产物 TXA2 生成减少,进而阻断血小板聚集^[5]。TXA2 可以诱发血栓形成,其可水解为无活性的 TXB2,尿中 11-DH-TXB2 是血中 TXB2 的稳定代谢产物,其检测依赖于阿司匹林治疗靶点 COX-1,与临床事件相关。TEG 早期应用于器官移植及监测肝素类药物,2004 年用血小板定位图试验来监测抗血小板药物的疗效。抗血小板药物疗效监测方法-血小板定位图试验经 FDA 批准上市后,近年来用于临床监测抗血小板药物的疗效^[1]。

ROC 曲线又称受试者工作特征曲线,AUC 的大小可以作为提高诊断方法准确性评价指标,克服了其他准确性评价指标的局限性,能将诊断方法的灵敏度与特异度结合起来进行分析,全面而直观^[7]。

本研究中,血小板 CD62P 抑制率 < 24.8%、尿

11-DH-TXB2 抑制率 < 26.2% 或 TEG-AA 抑制率 < 39.5% 的患者可认为存在 AR。通过 CD62P 表达率、尿 11-DH-TXB2 含量、TEG 血小板抑制率测得 AR 的发生率分别为 18.89%、13.39% 和 26.77%,与其它研究报道基本相符^[9]。ROC 曲线下面积反映诊断试验的准确性,实验结果提示 AUROC: TEG-AA > CD62P > 11-DH-TXB2。可以认为,相比于其他两种监测方法,TEG 的诊断准确性最好,更有助于指导临床个体化抗血小板治疗。Bochsen 等^[10] 研究显示,TEG 监测血小板功能结果误差 $\leq 5\%$ 。我们的前期研究^[1] 对 68 名急性缺血性脑卒中患者进行了 TEG 检查监测血小板活性,对出现阿司匹林反应低下的患者及时调整了抗血小板药物,发现血小板抑制率明显上升。因此,我们认为 TEG 可以用于临床抗血小板药物的疗效监测,而且检测操作简便,重复性好,能较好地反映血栓形成和血栓溶解的信息,更有助于临床缺血性脑卒中患者抗血小板个体化治疗的指导。

[参考文献]

- [1] 李毅鸣,管阳太. TEG 在脑梗塞患者抗血小板治疗上的应用研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38 (10): 1 978-979.
- [2] Macchi L, Sore LN, Christiaens L, et al. Aspirin resistance: definitions, mechanisms, prevalence, and clinical significance [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12 (2): 251-258.
- [3] Sanderson S, Emery J, Baglin T, et al. Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications [J]. Ann Intern Med, 2005, 142 (5): 370-380.
- [4] 吴帅,朱宣,管阳太,等. 抗血小板药物治疗的实验室检测 [J]. 中华脑血管病杂志, 2009, 3 (6): 303-308.
- [5] Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease [J]. Am J Cardiol, 2001, 88 (3): 230-235.
- [6] Ben-Dor I, Kleiman NS, Lev E. Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy [J]. Am J Cardiol, 2009, 104: 227-233.
- [7] 潘宝骏,张锡彬,刘少娟,等. SPSS 中的 ROC 分析用于检验诊断方法的评价 [J]. 海峡预防医学杂志, 2003, 9 (3): 16-20.
- [8] Macchi L, Christiaens L, Brabant S, et al. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate [J]. Thromb Res, 2002, 107: 45-49.
- [9] Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery dis [J]. Eur Heart J, 2007, 28: 1 702.
- [10] Bochsen L, Wiinberg B, Kjelgaard-Hansen M, et al. Evaluation of the TEG platelet mapping TM assay in blood donors [J]. Thromb J, 2007, 5 (1): 3.

(此文编辑 文玉珊)