



全国血栓/止血与微循环学术会议

论文汇编

全国血栓/止血与微循环学术会议

主 办

《微循环学杂志》社

湖北省微循环学会

协 办

武汉中太生物技术有限公司

2006 年 3 月 22 ~ 25 日

中国·昆明

目 录

专题报告

ረ. 1. ሆኖ ለገዢው ሰው ገንዘብ ማግኘት ሲቻል ለገዢው ሰው ማግኘት ሲቻል

2 型糖尿病合并脑梗死患者颈动脉及血脂、纤维蛋白原的改变	王玉祥 李志群 孙向东(100)
甜菜碱优化 LD-PCR 检测血友病 A 基因倒位的初步研究	吴 斌 杨 威(102)
敌鼠钠盐中毒的新认识(附 30 例报告)	敏志刚 田丰仓 高舜明等(105)
隐性心肌缺血者检测血脂及血液流变学的意义探讨	张静然 梁 玲 戴耀宗(107)
应用 PT 和 APTT 对术前患者进行出凝血时间检验的可靠性分析	刘淑舫 于 庭 赵丽艳(109)
临产孕妇凝血四项和 D-二聚体水平分析及临床意义	曹庭凤 朱端翔(110)
凝血实验室检测的质现状分析	李书杰 王润书(111)
妊娠期血糖异常孕妇的血液流变学研究	孙慧谨(115)
特急性外伤性颅内血肿治疗体会	吴卫军(116)
三腔二囊管简便牵引固定法的使用	余幼鸣 吕永慧 杨 洁等(117)
以血尿为首发症状的鼠药中毒误诊 2 例报告	徐秀月 杨 威(119)
赤峰市健康人群血浆 F_{1+2} 和 D-dimer 检测的意义	阚秉辉(120)
急性脑梗死患者血浆 GMP-140 含量的变化及临床意义	杨从茂(122)
癌胚抗原与 CA125 联合检测在卵巢癌中的诊断价值	谭云昌 吴 穷 吕文静(123)
用猪脑磷脂制作活化部分凝血活酶试剂的评价	王金鹏 王建俊 王玉官(124)
校正抗凝剂量对严重贫血标本 PT、APTT 结果的影响	陈永玲 王昌富(126)
糖尿病人甲襞微循环分析	胡 俊(128)
内皮细胞内 VASP 磷酸化促进其在血管支架材料上的粘附作用	李 华 魏 蕾 王贵学(129)
肝炎后肝硬化腹水及腹水消退后肝阻抗血流图变化	郝少银(130)
抗凝治疗急性心梗导致失血性休克 1 例	曹月香 冯书文(130)
黄芪多糖对胰岛素信号调节分子蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 的影响	张敬芳 吴 勇 王光浩(131)
血清果糖胺水平对人体微循环的监测意义	高 霞 王玉林 李艳莲等(132)
烧伤皮瓣修复过程中静脉回流障碍的防治	张 佳 谢卫国(132)
INR 系统的局限性探讨	吕海军 周 洪(133)
尿 γ -GT、 β_2 -MG、尿微量白蛋白联合检测在早期肾损伤中的 诊断意义	黄宏耀 朱 波 王 翠等(133)
血栓与止血试验分析前质量控制	吴正林(133)
调整加样秩序,延长试剂使用时间	王 群(134)

血小板粘附机制及实验室检查方法(摘要)

阮长耿

苏州大学第一附属医院 江苏省血液研究所, 苏州 215006

1 血小板粘附机制

在正常循环血液中,血小板处于静息状态,而在某些生理状态或病理状态下,血小板可被激活,发生变形、粘附、聚集和释放反应。

血小板与非血小板表面的粘着称为血小板粘附作用。在正常情况下,血管内皮细胞不与血小板发生反应,当血管壁的完整性被破坏,暴露出内皮下成份,血小板通过其表面的糖蛋白受体与内皮下的特异性配体结合,从而启动一系列的信号传导和血小板栓子形成的级联放大反应。

血小板粘附机制主要与以下三个部分相关联:

- (1) 血液流变学因素(血流剪切力和红细胞数);
- (2) 血小板膜糖蛋白受体(GPIb-IX-V复合物、GPVI、GPIIb/IIIa等);
- (3) 内皮下配体(vWF、胶原、纤维蛋白原等)。

GPIb-IX-V复合物是参与血小板粘附的主要糖蛋白,其生理功能为:

- (1) vWF的受体功能;
- (2) 凝血酶高亲和性受体;
- (3) 维持血小板膜结构的完整性。

GPVI和GPIIb/IIIa主要参与和胶原的粘附过程,而GPVI主要参与血小板粘附后的信号传导和血小板活化过程。

vWF是一系列高分子量的多聚体组成,由血管内皮细胞和巨核细胞合成,具有两大重要功能:

- (1) 介导血小板粘附到受损血管壁表面,启动血小板的粘附;
- (2) vWF与FVIII以非共价键形成复合物,起着稳定FVIII,延长其半寿期的作用。

2 常见病

2.1 血管性血友病(von Willebrand disease, vWD)

是一种由于 von Willebrand 因子(vWF)质或量异常所引起的最常见的遗传性出血性疾病。以皮肤和粘膜出血、女性月经增多为特征。把vWD分为三型:1型、2型、3型。1型和3型是vWF量的缺陷,2型是vWF质的异常。根据遗传特点、临床表现、vWF多聚体结构及分子病理机制的不同,2型vWD又分为2A、2B、2M和2N四种亚型。2A型血浆中大、中分子量的多聚体消失。2B型是由于vWF与血小板膜糖蛋白Ib(GPIb)结合异常增高,血浆中缺少大分子量的多聚体。2N型是由于vWF与FVIII结合部位的功能缺陷,导致vWF不能结合FVIII,从而失去对FVIII的保护作用。2M型是血浆中多聚体形态正常,但vWF存在质的异常,vWF与血小板膜糖蛋白Ib(GPIb)结合异常降低。血管性血友病的遗传方式多为常染色体显性遗传,3型和2N型vWD呈常染色体隐性遗传。

2.2 巨血小板综合征(Bernard Soulier Syndrome 简称BSS)

是编码血小板膜 GPIb-IX-V复合物的基因缺陷而导致的一种罕见的遗传性出血性疾病,以出血时间延长、血小板减少、血小板巨大为特征。实验室检查:血小板数低于正常,血小板体积巨大,瑞斯托霉素不能诱导血小板聚集,ADP、胶原和肾上腺素诱导的血小板聚集正常或增多。本病通常呈常染色体隐性遗传。

3 实验室检查方法

血小板粘附试验(PAdT)原理是根据血小板粘附特性,一定量血液与一定表面积异物接触后,即有相当数目的血小板粘附于异物表面上,通过测定接触前后血小板数之差,即为粘附于异物表面的血小板数,由此可以求出占血小板总数的百分数。

方法:①Salzman 改良法(玻璃珠柱法);②体内法。

临床意义:血小板粘附率增高见于高凝状态和血栓栓塞性疾病;血小板粘附率降低见于血小板无力症、巨大血小板综合征、血管性血友病等。

血小板功能分析仪(PFA-100)原理:将枸橼酸抗凝的全血以高切变率通过一毛细管滴至一薄膜中央的小孔(150 μm),该薄膜已覆盖有胶原,并含有肾上腺素或 ADP。全血中血小板粘附于胶原并被肾上腺素或 ADP 进一步活化,形成血小板栓子阻塞小孔,仪器自动记录阻塞时间。PFA-100 反映了初期止血过程,可替代出血时间测定。临床意义:①本试验依赖于 vWF,对除 2N 型之外的其它各型 vWD 都有很高的诊断价值;②监测抗血小板药物的治疗作用。

Flow-Chamber 法原理和临床意义:根据在不同剪切力条件下,血小板膜表面不同受体和血管壁内相应配体参与血小板粘附,将肝素抗凝血泵入小室流动,使血小板与包被有胶原的小室内壁接触,通过控制剪切力、暴露时间、血栓形成表面和再循环,来进行参与血小板粘附的分子基础研究和抗血栓药物的疗效的评价。

血栓与止血检测进展

王鸿利

上海第二医科大学附属瑞金医院、上海血液学研究所, 上海 200025

✓ 近年, 随着基础理论和实验技术的发展, 血栓与止血检验及其临床应用也有了很大的进展, 本文就此作一简述。

1 血小板微颗粒检测^[1,2]

血小板被激活后, 它以出芽方式形成囊泡或以伪足断裂方式形成直径为 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ 的血小板颗粒 (platelet microparticle, PMP)。PMP 的体积较正常血小板为小, 但有完整的血小板膜结构和功能。PMP 膜上可表达多种血小板膜糖蛋白 (GP) IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)、GPIb/IX-V、血小板活化因子 (PAF)、 β -淀粉样前体蛋白、 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶 Calpain 以及有促凝作用的磷脂等。因此检测血循环中的 PMP 可较完整地反映血小板参与血栓形成和血液凝固的功能。

〔检测方法〕 流式细胞术。主要试剂为 CD61 parep; 多甲藻素-叶绿素蛋白标记的抗血小板糖蛋白 GPIIIa 的单克隆抗体。

〔参考值〕 66 ± 17 个/ 10^4 PLT (山东大学齐鲁医院报道)

〔临床意义〕 PMP 主要用于动脉血栓性疾病的检测, 它是动脉血栓形成的敏感和特异的分子标志物。

(1) 急性冠脉综合征 (ACS): 有证据显示, PMP 参与动脉粥样硬化和血管再梗塞的病理过程。Gawaz 等对急性心肌梗死 (AMI) 胞行 PTCA 患者进行系列血小板功能研究, 发现 PTCA 术后患者的血小板数因消耗增加而减少, PMP 因大量形成而增多, 后者又参与冠脉血栓的形成。Katopodis 等对行冠脉血管成形术的 ACS 患者, 将血小板激活状态分为试验组 (近期发生 AMI、不稳定性心绞痛) 和正常对照组。结果发现, 试验组患者的 PMP 水平较正常对照组明显增高。

(2) 脑血栓形成: 对大血管血栓、小血管血栓、多发性脑梗死和阿尔茨海默病患者进行 PMP 检测。结果发现, 阿尔茨海默病患者的 PMP 水平与正常对照组无统计学差异, 而其他疾病组患者的 PMP 水平均显著高于正常对照组, 且治疗后有明显的降低, 而且小血管血栓组患者的 PMP 水平又高于大血管血栓组患者。表明 PMP 水平的增高, 主要反映小动脉的血栓形成和血栓阻塞。

2 血小板-白细胞聚集体检测^[1,3]

血小板被激活后, 血小板释放 P-选择素 (P-selectin 或 GMP-140)。P-选择素与白细胞和 (或) 单核细胞膜上的 P-选择素配体糖蛋白-1 (PSLG-1) 结合形成血小板-白细胞聚集体 (platelet-leucocyte aggregate) 和 (或) 血小板-单核细胞聚集体 (platelet-monocyte aggregate)。该聚集体是反映动脉血栓形成的特异性标志物之一。

〔检测方法〕 流式细胞术。主要试剂为: FITC 标记的鼠抗人 GPIb (CD42b) 单克隆抗体, 藻红蛋白标记的抗人白细胞 CD45 单克隆抗体, FITC 标记的抗人 P-selectin (CD62P) 单克隆抗体。

〔参考值〕 瑞典学者报道血小板-白细胞聚集体为 $15.3 \pm 8.5\%$ (PLA/L)。

〔临床意义〕 动物实验和临床研究表明, 血小板-白细胞聚集体是更敏感和更特异的血栓标志物。一组 93 例胸痛患者, 其中 9 例为 AMI 患者, 其血小板-单核细胞聚集体为 $34.2 \pm 10.3\%$, 84 例非 AMI 胸痛患者的血小板-单核细胞聚集体为 $19.3 \pm 1.4\%$, 二组差异显著 ($P < 0.05$); AMI 胸痛组和非 AMI 胸痛组患者的血小板-单核细胞聚集体水平, 均较 10 例正常对照组的血小板-单核细胞聚集体水平为高 ($P < 0.001$)。

3 血管性血友病因子裂解蛋白酶活性检测^[4,5]

生理情况下, 由血管内皮细胞合成的血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 主要受 vWF 裂解蛋白酶 (vWF cleaving proteinase, vWF-CP) 的调节。vWF-CP 作用于 vWF 分子量为 250 000 多聚体的 Try

(842) - Met(843)之间的肽键,将它们水解成分子量为 176 000 和 140 000 的两个小分子肽段。此时 vWF 不能过度地参与血小板的粘附和聚集,因此 vWF - CP 是限制血栓形成的标志物之一。

[检测方法] ELISA。以 III 型胶原包被酶标板,2.5% BSA 封闭,分别加入未透析的标本和经 Slide - A - Lyzer 透析过的标本,一抗为兔抗人 vWF 多抗,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,加入底物 OPD 于 490 nm 显色。结果以透析前后的 OD490 比值作为该份标本的残余胶原结合活性(vWF:CBA 或 R - CBA)表示,R - CBA 越高,vWF - CP 活性越低。

[参考值] 83 例正常人①血浆($n=30$):vWF:CBA 范围为 2.1% ~ 40.5% ($21.9 \pm 9.2\%$);②血清($n=53$):vWF:CBA 范围为 2.4% ~ 52.0% ($20.5 \pm 10.8\%$)(苏州大学附一院)。

[临床意义]

(1)血栓性血小板减少性紫癜(TTP) 由于患者的 vWF - CP 基因缺陷或患者血浆中存在抗 vWF - CP 自身抗体,使 vWF - CP 血浆水平显著降低,不能正常裂解超大分子量的 vWF 多聚体(UL - vWF)。体内聚集的 UL - vWF 易与血小板结合,促使血小板粘附和聚集,引起 TTP 病理过程的发生和发展。一组 5 例 TTP 患者检测 vWF:CBA 结果为 48.1% ~ 96.5% ($78.2 \pm 20.0\%$),较正常对照组明显增高,反映患者 vWF - CP 明显降低。

(2)血管性血友病(vWD) 据报道,21 例 vWD 患者血浆 vWF:CBA 水平明显低于 30 例正常人、15 例血友病患者及 30 例其他出血性疾病患者($P < 0.001$)。在 vWD 中:1 型患者的 vWF:Ag/vWF:CBA 比值 ≈ 1.0 ;2 型患者的 vWF:Ag/vWF:CBA 比值 > 2.0 ;3 型患者的 vWF:Ag 与 vWF:CBA 都极低,其 vWF:Ag/vWF:CBA 比值具有可变性。

(3)恶性肿瘤 恶性肿瘤患者的 vWF - CP 活性水平显著低于正常人,伴有远处转移患者的 vWF - CP 活性水平更低,接受手术治疗后患者的 vWF - CP 可升高,导致血浆大分子 vWF 多聚体增多,促使 vWF 参与血小板的粘附和聚集,加剧肿瘤患者的高凝集状态和血栓形成,反映 vWF 是参与恶性肿瘤血栓形成机制之一。

4 双相 APTT(biphasic APTT)检测^[6]

凝血是一个动态酶促反应的变化过程。传统的 APTT 检测只能提供凝血终点这一单个的信息。双相 APTT 检测是在常规 APTT 检测的基础上,联合利用光度计和分析软件,全程记录血浆凝固进展的浊度变化,并且绘制血液凝固过程中的透光度的波形变化图,可以提供在纤维蛋白聚集体形成之前凝血时间、速率、加速度等变化的多种量化的信息。

[检测方法] 目前主要应用法国生物梅里埃(bioMerieux)公司的 MDA 血凝分析仪进行检测。在对 DIC 患者检测时,可以观察到异常的透射波形图,从而用于 DIC 的早期诊断。

[临床意义] 对诊断 DIC 前期(pre - DIC)特别有份值。在对 1 470 个标本的检测中证实,双相 APTT 诊断 DIC 的敏感性为 97.6%,特异性为 98%。大于 50% 的患者在 DIC 前 18h 就出现波形的变化。

5 凝血酶激活的纤溶抑制物检测(TAFI)^[7,8]

凝血酶 - 凝血酶调节蛋白复合物(T - TM)将由肝脏合成的、分子量为 55KD 的凝血酶激活的纤溶抑制物(thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI)的 Arg(92) - Ala(93)之间的肽键水解后,脱去一个活化肽,TAFI 变成活化型的 TAFI α 。TAFI α 具有抑制纤溶酶原转化为纤溶酶的生物活性,但是 TAFI 也受蛋白 C 抑制物(PCI)的抑制。

[检测方法] 采用 ELISA 法(双抗体夹心法)测定 TAFI:Ag。以鼠抗人 TAFI 单克隆抗体包被酶标板,加入标准品或样品后,再加入辣根过氧化物酶标记的抗人 TAFI 抗体,充分作用后加入邻苯二胺使之显色,颜色深浅与样本 TAFI 的含量成正比。TAFI:A 采用发色底物法测定。

[参考值] TAFI:Ag($n=34$)为 $77 \pm 28\%$ (21% ~ 133%);TAFI:A($n=34$)为 24 ± 5 mg/L (14 ~ 34 μ g/L)(上海瑞金医院)。

[临床意义]

(1)深静脉血栓(DVT):Tiburg 等对 474 例初发 DVT 患者的 TAFI:Ag 进行检测,发现其水平增高。口服避孕药的正常生育期妇女,若 TAFI:Ag 的水平超过 90%,其 DVT 的危险性增高 2 倍,此时患者的纤溶活性减低。

(2)动脉血栓(冠心病):瑞金医院对 19 例冠心病患者检测了 TAFI:Ag 和 TAFI:A,发现冠心病患者的 TAFI:Ag 和 TAFI:A 的水平均高于正常对照组($P < 0.001$),与 Silveira 报道 11 例冠心病的检测结果一致,表明患者的纤溶活性明显降低。此外,TAFI 水平升高也见于不稳定性心绞痛。

(3)微血栓(DIC):瑞金医院对 15 例 DIC 患者检测了 TAFI:Ag 和 TAFI:A,发现患者的水平明显低于正常对照组($P < 0.001$),表明患者纤溶活性明显升高。

(4)其他:TAFI 水平升高还见于感染、炎症、因子 V Leiden 突变;TAFI 水平减低还见于某些凝血因子缺乏(血友病、FXI 缺乏症)、急性早幼粒细胞白血病(TAFI:A 减低 66%,但 TAFI:Ag 正常)。

6 可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体检测(sEPCR)^[9,10]

可溶性血管内皮细胞蛋白 C 受体(soluble endothelial protein C receptor, sEPCR)是由血管内皮细胞产生,部分与内皮细胞连接称膜连 EPCR,一部分游离于血浆称 sEPCR。克隆的膜连 EPCR cDNA 全长 1.3 kb,是一种由 221 个氨基酸组成跨膜糖蛋白。膜连 EPCR 通过促进 T-TM 复合物与 PC 的结合,进而放大 PC 的活性;此外,EPCR 还对体内急性炎症反应和 DIC 的发生具有保护作用。然而,血浆中 sEPCR 与膜连的 EPCR 具有相反的作用。sEPCR 也可与 PC 和活化蛋白 C(APC)结合,抑制 PC 的活化和抑制 APC 的抗凝活性,减轻膜连 EPCR 的增强 PC 活化和 APC 的抗凝作用,所以血浆 sEPCR 水平的增高是反映血管损伤和抗 APC 抗凝作用的特异性标志物。

[检测方法] 双抗体夹心 ELISA 法。以单克隆一抗包被酶标板,分别加入血浆标本和不同稀释度的 sEPCR 标准品后,以生物素标记的单克隆二抗作为检测抗体,加入底物后显色,绘制标准曲线。

[参考值] 血浆 sEPCR 为 $115.2 \pm 20.7 \mu\text{g/L}$ 。

[临床意义] 安徽省立医院报道的结果见表 1。

表 1 部分血栓病患者检测血浆 sEPCR 的结果

疾 病	例数	血浆 sEPCR($\mu\text{g/L}$)	P 值
正常对照值	20	115.2 ± 20.7	
冠心病组	30	134.2 ± 69.6	
心绞痛	17	148.9 ± 87.9	
心肌梗死	8	117.6 ± 33.8	
糖尿病组	56	177.0 ± 81.4	< 0.001
败血症组	30	172.6 ± 43.7	< 0.001
SLE 合并血栓组	14	144.7 ± 33.9	< 0.005
SLE 血栓组	49	165.8 ± 45.3	< 0.001

7 蛋白 C Global 试验^[11]

凝血酶(T)与血管内皮细胞表面的凝血酶调节蛋白(TM)形成复合物(T-TM),后者使蛋白 C(PC)转化为活化蛋白 C(APC)。APC 在蛋白 S(PS)的辅助下,灭活因子 Va 和因子 VIIIa,还抑制纤溶酶原激活抑制物-1(PAI-1)使纤溶活性增强。然而,Agkistrodon contorix 蛇毒可以取代 T-TM 复合物直接激活 PC,使 PC 转化为 APC,APC 也受 PCI 的抑制。

[检测方法] 在待测血浆中加入蛇毒温育,蛇毒可直接激活蛋白 C(PC),使 PC 转变为活化蛋白 C(APC)。随后在检测系统中加入 APTT 试剂以检测依赖 PC 活性的血浆凝固时间(Protein C activity-dependent clotting time,PCAT)。若待测血浆中的 PC 系统正常,则加入 Ca^{2+} 后血浆凝固时间显著延长。为了避免诸多因素的影响,本试验设计了对照组,即在试验过程中以缓冲液代替 PC 激活剂,血浆不依赖 PC 活性的血浆凝固时间(PCAT/O),其结果应短于 60 秒。

[参考值] PCAT 为 85~200 秒,PCAT/O 为 33~55 秒($n=234$)。

[临床意义] 本试验对 PC 活性低于参考值 70% 的检出率为 90%;对 PS 活性低于参考值的 60% 的检出率为 89%;对凝血因子 V Leiden 突变的检出率为 100%;对凝血酶原(FII)20210 G→A 突变的检出率为 84%。本试验的检出特异性为 79%。因此,本试验多用于蛋白 C、蛋白 S、FV Leiden 突变和 FII 20210 G→A 突变的检测,起到蛋白 C 系统筛选检测作用。

但是,本试验也有假阳性,见于凝血因子 V、VIII 活性升高、口服抗凝剂和狼疮抗凝物质等。

8 抗体芯片技术

抗体芯片(Antibody Microarray)是蛋白芯片的一种,是将能识别特异抗原的抗体制成微阵列,检测生物样品中抗原蛋白表达模式的方法。这种抗体微阵列可以在一次简单实验中同时检测样品中的数百甚至数千种蛋白质的表达情况,并且可以在一张芯片上对两种样品的表达模式进行比较分析。这使抗体芯片在毒性实验、疾病研究和药物开发上有着广泛的应用前景。

抗体芯片的检测操作并不要求特殊的技能,一般常规的操作就可以完成以往极为复杂耗时的工作。整个检测操作流程包括:从组织或细胞、体液中提取蛋白质,并用 Cy5 和 Cy3 两种不同颜色的荧光分子分别标记被检测样品和对照样品,去除多余的标记分子后与芯片杂交孵育,最后扫描分析结果。整个过程从样品制备到结果分析只要一天即可完成。在抗体芯片制作方面,如何获得高质量的抗体、提高特异性、减少交叉反应是制作高质量抗体芯片的主要考虑因素。

抗体芯片技术在血栓与止血检验领域有着很好的应用前景。目前正在研发过程中的出凝血疾病诊断抗体芯片,是将针对各种凝血因子和抗凝血因子的单克隆抗体分别固定在合适的片基上,来检测血清标本中各种凝血因子和抗凝血因子的抗原,从而可以迅速诊断遗传性易栓症和出血性疾病。

9 蛋白 Z 抗原检测^[12]

蛋白 Z(protein Z, PZ)是二十世纪 90 年代发现的一种血液凝固调节蛋白,为一种维生素 K 依赖的单链糖蛋白,由肝脏合成后分泌入血。人 PZ 的相对分子量为 62 kb,半寿期为 2.5 天,其基因位于 13q34。在 Ca^{2+} 和磷脂存在时,PZ 可与蛋白 Z 依赖的蛋白酶抑制物(protein Z-dependent protease inhibitor, ZPI)结合,并进一步与 FXa 形成 Xa-ZPI-PZ 复合物而使因子 Xa 在一分钟内使失去 95% 以上的凝血活性。

【检测方法】 目前多采用法国 Stago 公司的 ELISA 试剂盒检测。

【参考值】 法国学者报道 1.04 ~ 3.57 mg/L。

【临床意义】 目前 PZ 在临床上的意义尚不十分清楚。Wasse 等研究发现 PZ 缺乏(<1.0 mg/L)在缺血性脑卒中和健康对照中分别为 20% 和 5%,二者具有显著性差异,PZ 缺乏可使缺血性脑卒中的危险性提高 4 倍。Sofi 等报道在急性冠脉综合征病人当中 PZ 水平明显低于健康对照,说明 PZ 缺乏是导致急性冠脉综合征的独立的危险因素。

10 植入前单细胞基因诊断技术^[13,14]

植入前诊断(preimplantation genetic diagnosis, PGD)是辅助生殖技术与遗传学技术相结合的一种产前诊断技术。其基本思路为体外受精后发育至 6~8 细胞期的胚胎在显微操作下活检 1~2 个单卵裂球细胞进行基因或染色体分析,选择正常胚胎植入宫内,从而获得健康胎儿。PGD 避免了早期或中期妊娠后再行产前诊断产妇所面临可能流产带来的巨大身心创伤;避免了关于流产的伦理学争议;避免了绒毛取样、羊膜腔穿刺、脐带穿刺带来的出血、流产、宫内感染等并发症。

基因分析是 PGD 中难度最大的部分:标本量少,要求在 48 小时内对标本做出诊断,并对诊断策略的灵敏性和特异性有很高的要求。目前针对单基因疾病的检测常用 PCR 技术;针对染色体异常的检测常用 FISH 技术。常用的单细胞 PCR 技术有:巢式 PCR、荧光 PCR、荧光定量 PCR、多重 PCR、全基因组扩增(whole genome amplification, WGA)等。运用技术进行单细胞遗传学诊断时要满足以下四个标准:敏感性、可靠性、准确性及对污染的控制。为了满足上述要求,目前常用的 PCR 策略有:荧光多重 PCR、多重巢式 PCR、PEP 后续多位点的巢式 PCR 等。

在对血友病 A 进行的 PGD 中,由于 FVIII 基因结构的复杂性及突变的高度异质性,迄今为止报道得较少,且所用的策略多为联合多个多态性位点的间接诊断或性别筛查,如血友病 A 男性患者想要一个男性胎儿用 FISH 进行性别鉴定。

开展并完善 HA 植入前诊断,对杜绝患儿出生、降低 HA 的发病率、减少流产带来的伦理学争议和产妇所面临的巨大身心创伤都具有十分重要的意义,为今后的发展方向。

- 1 阮长耿. 血小板与血栓性疾病. 中华医学杂志. 2003;83(增刊):1~3
- 2 王传新, 牛爱军, 卢振铎, 等. 特发性血小板减少性紫癜患者血小板微颗粒检测与抗血小板膜表面糖蛋白CD62P的相关性. 中华医学杂志. 2002;83:1918~1920.
- 3 Li N, Goodall AH, Hjerdahl P. A sensitive flow cytometric assay for circulating platelet-leucocyte aggregates. Br J Haematol. 1997;99:808~816.
- 4 张广森. vWF、vWF裂解酶与血栓性血小板减少性紫癜. 中华医学会血液学学会第九届全国血栓与止血学术会议论文摘要汇编. (2002年, 9月 福州)15~18.
- 5 高维强, 苏健, 邢秀萍, 等. 五例血栓性血小板减少性紫癜患者血浆vWF-CP活性水平的检测. 中华医学会血液学学会第九届全国血栓与止血学术会议论文摘要汇编. (2002年9月, 福州)23~24.
- 6 Toh CH, Giles AR. Waveform analysis of clotting test optical profiles in the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation(DIC). Clin Lab Haem. 2002;24:321~327.
- 7 Bauma BN, Marx PF, Mosnier LO, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI, plasma procarboxypeptidase B, procarboxypeptidase R, procarboxypeptidase U). Thromb Res. 2001;101(5):329~354.
- 8 Wang W, Boffa MB, Bjarar L, et al. A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. J Biol Chem. 1998;273(42):27176~27181.
- 9 Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, et al. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. Blood. 1998;91(2):725~727.
- 10 周志中, 吴竞生, 徐俊, 等. 可溶性血管内皮细胞蛋白受体的检测. 血栓与止血杂志. 2002;8(2):57~59.
- 11 王学锋, 王鸿利主编. 血栓与止血的检测及应用. 上海:世界图书出版公司. 2002;230~243.
- 12 Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, et al. Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. Lancet. 2001;357(9260):933~934.
- 13 Gigarel N, Frydman N, Burlet P, et al. Single cell co-amplification of polymorphic markers for the indirect preimplantation genetic diagnosis of hemophilia A, X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked hydrocephalus and incontinentia pigmenti loci on Xq28. Hum Genet. 2004;114(3):298~305.
- 14 Santalo J, Grossmann M, Gimenez C, et al. The decision to cancel a preimplantation genetic diagnosis cycle. Prenat Diagn. 2000;20:564~566.

糖尿病血管病变机制与防治进展

刘声远

华中科技大学同济医学院病理生理学系, 武汉 430030

糖尿病的血管病变是糖尿病的主要并发症。其大血管病变性质为动脉粥样硬化, 主要累及主动脉、冠状动脉等大血管。而糖尿病的微血管病变是糖尿病特有的慢性血管并发症, 主要表现在视网膜、肾等微血管病变。糖尿病血管病变机制与防治研究是近些年来研究的热点。

1 机制进展

1.1 血管内皮依赖性舒张功能降低

糖尿病大血管病变早期主要为血管内皮依赖性舒张功能降低, 其可能机制:

1.1.1 非对称型左旋二甲基糖氨酸(ADMA)升高:研究发现血糖控制良好的糖尿病患者血 ADMA 升高, 且与总胆固醇、低密度脂蛋白水平正相关, 慢性高甘油三酯血症可导致 ADMA 升高。而血浆 ADMA 升高与血管舒张降低程度负相关, 这是 ADMA 升高使 NO 合成减少所致。而血管紧张素可能参与了这一过程。血浆 ADMA 升高是糖尿病早期血管内皮依赖性舒张功能减退的一个重要机制。

1.1.2 高血糖、高胆固醇血症:糖尿病时高胆固醇, 高血糖使 NOS 生成或生物活性下降, 从而 NO 产生减少, 血管内皮依赖性舒张功能减退。

1.2 大血管动脉粥样硬化

1.2.1 遗传因素:2 型糖尿病发生大血管病变的危险性较正常人高约 3 倍, 其中又有 50% ~ 75% 的患者死于心血管并发症。糖尿病大血管病变的发生有明显的家族聚集性, 提示 2 型糖尿病大血管病变的发生与遗传背景关系密切。目前研究较多的候选基因有: (1) 载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE) 基因: apoE 作为配基与 apoE 受体或低密度脂蛋白 (LDL) 受体结合调节脂代谢, 影响血脂水平。多数学者认为 apoE 基因多态性可能与 2 型糖尿病脂质代谢紊乱相互作用, 增加了心血管病变的发生率。(2) 脂蛋白脂酶 (Lipoprotein Lipase, LPL) 基因: LPL 是分子量为 54KD 的糖蛋白, 经载脂蛋白 APO-C II 激活, 对乳糜微粒 (CM) 和 VLDL 中甘油三酯的分解发挥作用, LPL 基因突变与冠状动脉心脏病 (CHD) 发病相关。(3) 胆固醇酯转移蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 基因: CETP 是一种疏水糖蛋白, 主要存在于高密度脂蛋白 (HDL) 和极低密度脂蛋白中。CETP 介导脂蛋白之间脂质的交换。使胆固醇从 HDL 和 VLDL、中等密度脂蛋白 (IDL) 和 LDL 转运, 然后通过 LDL 受体在肝脏被分解。CETP 基因突变可导致血中高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平明显升高, 可增加患 CHD 的危险性。(4) 二乙基对硝基苯磷脂酶 (paraoxonase, PON) 基因: PON 基因家族至少包括 PON1、PON2、PON3 三个成员, PON1 基因产物为对氧磷脂酶, 主要在肝脏中表达, PON2、PON3 的生理功能尚未阐明。研究表明, PON 基因 B 等位基因是 CHD 的独立高危因素。(5) 脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 基因: FABP 参与细胞内长链脂肪酸的吸收, 细胞内代谢和 (或) 转运。FABP 基因突变与 2 型糖尿病合并 CHD 显著相关。(6) 晚期糖基化终产物 (AGEs) 受体 (advanced glycation end product receptor, RAGE) 基因: RAGE 分布于单核-巨噬细胞、T 淋巴细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肾小球系膜细胞、神经元、肿瘤细胞等多种细胞表面。研究表明, AGEs 等配体与 RAGE 结合使细胞粘附分子、细胞因子 (白介素-6、单核细胞超化蛋白-1) 分泌, 从而导致了糖尿病大血管病变及心脏病的发生。RAGE 在大血管病变的发生过程中起放大血管炎症, 加速动脉粥样硬化的作用。(7) 其它候选基因: 血管紧张素转换酶 (ACE) 基因, 血管紧张素 II 受体 (ATR) 基因、纤维蛋白原 (Fg) 基因、亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 基因, 以上基因的多态或变异可通过影响体内表达产物的水平, 从多方面参与 2 型糖尿病 (T2DM) 合并大血管病变的发生、发展, 与 AS 的进程独立相关。虽然目前对 T2DM 合并大血管病变的相关基因做了大量的研究, 但有些结果并不一致, 其机制有待进一步研究。

1.2.2 纤溶活性下降:近年来研究表明, 糖尿病患者血浆组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 水平降低, 纤溶酶原激活物抑制物 (PAI)-1 活性升高, 从而使纤溶活性降低。但也有关于 2 型糖尿病患者血浆 t-PA 水平并

不下降的报道。这可能是糖尿病患者血管内皮细胞代偿使 t-PA 不下降所致。但当这种代偿作用不足时,即表现为 t-PA 水平下降,PAI-1 升高,从而导致纤溶活性下降。国内外研究表明,血浆纤溶活性降低在糖尿病血管病变中发挥了重要作用。

1.2.3 炎症反应:正常血管内皮细胞可产生多种因子,对于保持血管正常舒张和收缩,防止炎症和血小板粘附,防止脂质在血管壁异常积聚具有积极作用。越来越多的证据表明,炎症反应在糖尿病大血管病变中起重要作用。

糖尿病糖基化终末产物(AGEs)、高甘油三酯(TG)血症、低高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、高小而致密的 LDL(sLDL)、糖基化 LDL(gLDL)、氧化 LDL(ox LDL)以及胰岛素抵抗等,可使血管内皮细胞发生损伤。糖尿病患者血循环中各种刺激物,使体内单核-巨噬细胞、血管内皮细胞、泡沫细胞、脂肪细胞等表达多种促炎分子,如白细胞介素(IL-1、IL-6、IL-8、IL-18)、活性氧、C 反应蛋白(CRP)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子(G-CSF、M-CSF)、血小板源性生长因子(PDGF)、转化生长因子(TGF)- β 、核因子- κ B(NF- κ B)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及肿瘤坏死因子(TNF- α)等。近年在脂肪组织内发现有肾素-血管紧张素系统(RAS),对脂肪细胞的分化、成熟及合成释放炎症介质有直接作用。白细胞聚集、粘附、激活和迁移,血小板粘附和激活以及纤维蛋白降解,导致一定程度的放大炎症反应,在 AS 发生过程中的细胞募集、迁移、增殖以及脂质和蛋白(包括细胞外基质蛋白)合成调控中发挥重要作用。当脂核较大,纤维帽较薄,以巨噬细胞为主时, γ -干扰素和基质金属蛋白酶, TNF- α 、IL-6 等参与炎症和 AS 斑块分解,导致斑块糜烂或破裂,继而有血小板活化和血栓形成,造成血管狭窄或闭塞,临床表现为血管事件。炎症在糖尿病大血管病变的发生、发展中起着重要作用。目前已形成胰岛素抵抗(IR)、DM 及大血管病变的炎症发病学说。该学说的提出,刷新了包括 IR 及冠心病等在内的代谢综合症的发病机理,促进了老药新机制的研究。

1.3 循血管病变

糖尿病微血管病变机制的研究是近年来糖尿病并发症领域中的热点,但迄今为止并未形成一致的看法。存在四种假说:(1)多元醇通路学说;(2)蛋白激酶 C 系统学说;(3)氧化应激学说;(4)非酶糖基化学说。

1.3.1 趋化因子:糖尿病合并微血管病变时,趋化因子表达与病变的发生、发展有关。糖尿病患者高血糖、蛋白尿、血管紧张素、糖基化蛋白等因素影响趋化因子的表达,如单核细胞趋化蛋白-1 可引起单核-巨噬细胞、T 细胞浸润肾组织,并释放细胞因子、生长因子等,促进细胞增殖及细胞外基质积聚,从而导致糖尿病肾病(DN)及糖尿病视网膜病(PDR)的发生发展。

1.3.2 氧化应激:糖尿病高血糖可促进氧化应激,氧化应激参与了微血管病变的发生发展。

1.3.3 内皮祖细胞:内皮祖细胞(EPC)是一类能增殖并分化为血管内皮细胞的前体细胞。自 1997 年首次证明出生后循环和外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞——血管 EPC 后,越来越多的证据表明,成人血管新生不仅存在血管形成,还包括依赖于 EPC 的血管生成。研究发现糖尿病患者 EPC 增殖能力低于非糖尿病患者,并与糖化血红蛋白 A1c(HbA1c)水平呈负相关。T2DM 患者的 EPC 与活化内皮细胞的粘附、增殖及形成小血管能力降低,从而使糖尿病患者新血管形成能力受损,然而糖尿病的患者却伴有视网膜的血管新生,即糖尿病视网膜病变。这种所谓的“糖尿病矛盾现象”,目前机理不明。但研究发现,骨髓来源的 EPC 在成人视网膜血管新生模型中起作用。糖尿病患者眼组织中血管内皮生长因子(VEGF)显著升高,以及糖尿病患者血中胰岛素均能刺激 EPC 增殖,从而刺激血管新生。

1.3.4 血管内皮生长因子(VEGF):VEGF 是促进血管皮内生长和渗透的分子,参与了微血管病变的发生发展。日前认为糖尿病患者高血糖通过蛋白激酶 C 机制,促进 VEGF 的表达而参与了糖尿病肾病的发生、发展。

1.3.5 血管紧张素 II(Ang II):血管紧张素 II 在糖尿病的发生、发展中可能起重要作用,其活性受到 I 型血管紧张素 II 受体(AT1R)调节。Ang II 作为缩血管物质主要优先作用于糖尿病肾脏肾小球出球小动脉,增加肾小球跨膜毛细血管压而损伤肾小球,促进肾小球硬化。Ang II 可作为一种生长和基质促进因子加重肾小球损害。糖尿病肾病时,高血糖引起 Ang II 上调,通过 AT1 受体而损害肾小球。Ang II 可上调 MCP-1 参与糖尿病肾病的发生。

1.3.6 糖基化终末产物-糖基化终末产物受体(AGE-RAGE):AGE-RAGE 通过 NF- κ B 和激活蛋白-1(AP-1)因子转录激活血管内皮生长因子(VEGF)基因引起血管形成,在糖尿病视网膜病变发生发展中起

作用。RAGE 高表达增加了肾小球系膜细胞合成 IV 型胶原,促使肾脏足细胞、微血管内皮细胞,分泌 VEGF,刺激微血管内皮细胞增殖,并形成管腔结构,导致了糖尿病肾病的发生。

1.3.7 瘦素:血管增生是糖尿病微血管病变的主要病理基础。瘦素是血管增生的诱导剂,可促进血管内皮细胞的增殖和维持细胞的存活。研究表明,过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)激活可通过下调细胞对瘦素的表达而抑制新生血管形成。

2 防治进展

2.1 糖尿病心血管疾病危险因素的综合控制

必须改变以往以控制血糖为中心的治疗观念。应早期诊断,早期干预,在严格控制血糖的基础上,通过积极控制血压,纠正血脂异常,加强运动,减轻体重,改善胰岛素抵抗及戒烟等全面控制糖尿病患者的心血管疾病的危险因素。这是糖尿病治疗的新观念。

2.2 改善血管内皮依赖性舒张功能

2.2.1 饮食干预:(1)L-精氨酸(L-Arg),作为 NOS 的底物参与 NO 生成,对维持血管正常功能起重要作用。可改善血管内皮依赖性舒张功能(EDV),减少血小板聚集和单核细胞粘附,减少动脉粥样硬化(AS)的发展。(2)抗氧化维生素:VitE 可减少冠心病的风险。抗氧化作用的机制主要是减轻 LDL 氧化易感性,清除体内自由基。

2.2.2 他汀类药物:疗效较好,不良反应少,是目前临床应用较广的降低胆固醇的药物之一。可上调 eNOS 的表达,改善内皮依赖性血管舒张功能(EDV)。

2.2.3 降低 ADMA:ADMA 升高是糖尿病早期大血管 EDV 降低的重要机制,应积极探索降低 ADMA 的途径,寻找新的改善 EDV 措施。

2.3 抗炎治疗

2.3.1 他汀类药物:他汀类药物是近年来发现的安全有效降脂药,应首选。研究表明,该类药具有显著降脂作用,减轻或消除炎症反应,保护残存的血管内皮细胞,对心血管疾病具有独特的防治和保护作用。

2.3.2 阿斯匹林:该药具有抗炎、抗血小板聚集的作用。小剂量阿斯匹林能够降低糖尿病(DM)及非 DM 患者心血管疾病的风险;大剂量阿斯匹林可改善胰岛素敏感性、降低血糖水平,通过减少 AS 斑块内巨噬细胞迁移和增殖来减轻动脉炎症的反应,起抑制和稳定 AS 斑块作用。

2.3.3 胰岛素强化治疗:高血糖是引起 β 细胞功能持续减退的重要原因,同时还是微血管并发症的主要原因和大血管病变的重要危险因素。目前认为 2 型糖尿病患者应尽早使用胰岛素使血糖达到理想控制水平,缓解高糖毒性和脂毒性,抑制炎症反,使 β 细胞功能得到最大程度的恢复,缓解糖尿病病情。而不应再将胰岛素作为糖尿病治疗的最后选择。研究表明,早期、短期使用胰岛素强化治疗可恢复患者依从口服降糖药的敏感性,胰岛素分泌和作用得到改善,胰岛素敏感性增加,纤溶酶原激活物抑制物(PAI)-1 活性下降,抑制 CRP 的合成,抑制 NF- κ B 及 MCP-1 的表达,降低血浆组织因子,PAI-1 及 MCP-1 的浓度,且胰岛素具有抗炎作用。

2.3.4 过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) α/γ 激动剂:PPAR 属于核超家族的一员,和其相应配体结合后调节相应靶基因的表达。PPAR 激动剂能够抑制粘附分子以及凝血酶诱导的内皮素-1 的表达,调节 PAI-1 的水平,还能通过磷脂酰肌醇-3 激酶-Akt 途径抑制内皮细胞的迁移,进而调节血管张力和内径,激动 PPAR- α 能减少 IL-6、前列腺素的产生。激动 PPAR- γ 还可使血栓素受体表达下降,抑制平滑肌细胞的增殖。PPAR 激动剂是通过抑制炎症因子、组织因子、MMP 的产生和巨噬细胞活性而稳定 AS 斑块的。

2.3.5 二甲双胍:二甲双胍的靶分子是 AMP 激活的蛋白激酶(AMPK),通过 AMPK 介导,二甲双胍可诱导脂肪的氧化及减少脂肪的合成,增加周围组织葡萄糖的吸收,抑制肝糖异生和肝糖输出,改善胰岛素敏感性和糖代谢。具有抗炎作用,可降低 DM 患者血清 CRP 及 PAI-1 依度,减少 2 型 DM 患者 AS 的风险。

2.3.6 血管紧张素(AT)转换酶抑制剂(ACEI)和 AT 受体拮抗剂(ARB):研究表明,ARB 和 ACEI 可以改善 DM 或 DM 前期患者的胰岛素敏感性,阻断肾素-血管紧张素系统(RAS),可以增加脂联素水平和降低 TNF- α 水平、抗炎、增加胰岛素敏感性。

2.3.7 抗氧化剂:氧化应激被认为是 AS 炎症过程的始动因素之一,降低氧化应激可能降低炎症状态。目前常用的几种抗氧化剂如 VitE、VitC、类胡萝卜素等。

目前对炎症在 2 型糖尿病发生发展中作用的研究提示,在遗传背景下,高热量摄入、肥胖、胰岛素抵抗及高血糖均可使氧化应激增加,产生炎症因子。这些炎症因子通过炎症过程进一步加重胰岛素抵抗,导致 β 细胞衰竭,并在大血管并发症的发生发展中起着重要作用。因此,抗炎治疗可能成为全面控制代谢紊乱,预防及治疗 2 型糖尿病大血管并发症的新策略。

2.4 趋化因子拮抗剂

随着对趋化因子研究的深入,针对趋化因子及其受体的治疗措施已成为糖尿病微血管病变治疗的一个新靶点。研究表明,分别使用血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)及血管紧张素 I 受体拮抗剂,可降低大鼠的 MCP-1 水平,且蛋白尿程度及巨噬细胞对肾小球的浸润均减少。

2.5 内皮祖细胞促进血管新生

内皮祖细胞(EPC)的生物学特性及其促进缺血组织的血管新生作用,有可能作为糖尿病血管新生疗法的选择之一,有待深入研究。

2.6 晚期糖基化终末产物受体(RAGE)调节血管新生

近年来研究发现 RAGE 能够调节血管生成。阻断 RAGE 通路可减缓平滑肌细胞增殖、迁移,降低细胞外基质蛋白的合成,抑制血管管腔结构形成,减少新生血管。新发现的 sRAGE(又称分泌型 RAGE)可以消除 AGEs 对内皮细胞的作用,能保护糖尿病人的血管,应用 sRAGE 治疗后能显著改善糖尿病的各种并发症,提示 RAGE 是治疗糖尿病性,甚至是非糖尿病性血管病变的一个新的药物靶点。

2.7 提高纤溶活性

低脂肪、高纤维素饮食能升高血浆 t-PA 水平,降低 PAI-1 活性;严格的有氧锻炼可直接诱导纤溶基因在骨骼肌和循环系统的表达,改善局部和系统的纤溶活性,对糖尿病血管病变的发生有一定预防作用;二甲双胍能增加 2 型糖尿病患者的纤溶活性,具有心血管保护作用。噻唑烷二酮类药物能有效降低胰岛素水平,增加胰岛素敏感性,抑制 PAI-1 的产生。血管紧张素转换酶抑制剂能升高血浆 t-PA 水平,降低 PAI-1 活性。VitE 可降低糖尿病患者血浆 PAI-1 水平。提高 T2DM 患者纤溶活性,对防治大血管病变有十分重要的意义。

2.8 糖尿病下肢动脉缺血的介入治疗

下肢动脉缺血的介入治疗主要集中在股腘动脉和胫腓动脉。介入治疗的最佳时机是中等缺血的病人,介入治疗的方法包括经皮血管成形术、血管内支架术、血管腔内硬化斑块旋切术和激光血管成形术。

2.9 基因治疗

目前基因治疗常规用于心血管系统疾病存在许多困难,但是该方法在动物模型研究中已证明是有效的,有希望成为心血管疾病的重要防治手段。

血栓与微循环中流动的白细胞微栓

曾昭炜

武汉大学人民医院, 武汉 430060

凝血血栓形成(Thrombosis)与纤溶血栓溶解(Thrombolysis),是机体内的一个重要的调节系统,其机理较为复杂,血液在血管内流动,正常情况下,不断地有纤维蛋白析出集向缘流(Edge Flow)而贴附在血管腔而形成薄层,与此同时,纤溶系统的各种因子亦在活动,不断地将已析出的纤维蛋白溶解而除掉此薄层,此种析出和溶解两个过程同时并行,以保持血管腔面的清洁,不致形成栓塞,使血流畅通,本文仅就血栓的主要成份,形成血栓的条件和血栓的类别结合疾病简述如下:

1 血栓的主要成份

1.1 纤维蛋白与纤维蛋白原

血浆中的凝血因子,除了FⅢ外(Tissue Factor)均是以酶原状态溶解于血浆中,故此血液不发生凝固,不会发生血栓,一旦凝血因子活化,形成凝血活酶(Prothrombinase),使凝血酶原(Prothrombin)形成凝血酶(Thrombin),作用于纤维蛋白原(Fibrinogen)则形成纤维蛋白(Fibrin)纤维蛋白是血栓结构中的主要成份之一,但是,纤维蛋白原则是血栓的起动成份。

血浆中的纤维蛋白原带正电荷(Positive Charge),由肝脏合成,肝脏重1500g,每天约合成1.7~5g,在人体的半衰期平均为3.1日^[1]、严重的肝脏疾病影响纤维蛋白原的合成,故不易形成血栓。

1.2 血小板

血小板带负电荷(Negative Charge),由红骨髓中的单核巨细胞(Megakaryocyte)的原生质脱落而成,无核,平均直径为2.5 μm,小于红细胞的1/3倍,在人体中的平均寿命约10天,其主要的生理功能是(1)粘附:当血管内皮细胞受损时,粘附于带正电荷的胶原纤维上;(2)聚集:在血浆中,当血流的切应力降低时,与纤维蛋白原结合一起撤向缘流,与受损的内皮细胞粘附,且在粘附的基础上,释放二磷酸腺苷(ADP)和血栓素(TXA₂),累加血小板聚集;(3)释放:血小板发生不可逆的聚集后,释放出一些生物活性物质如5-羟色胺、组织胺、儿茶酚胺、PF₃、PF₆等凝血因子,进一步促使血液凝固形成血栓;(4)变形:血小板中含有收缩蛋白,由于它的收缩可使得血凝块紧缩而释放血清,在血小板减少症时,则凝血时间延长;(5)维持毛细血管的通透性:血小板作用于内皮细胞,对毛细血管起着支持作用,以维持组织间的物质交换,若血小板数量减少,则毛细血管的脆性增加,表现在皮肤、皮下形成淤点或紫癜;(6)血小板有吸附作用:可将血液中的异物或细菌吸附于表面,使其不会发生作用,故此起到防护作用。

1.3 VWF(Von Willebrand Factor)和FⅧ

VWF是由血管内皮细胞和红骨髓单核巨细胞所合成的糖蛋白(Glycoprotein),而FⅧ又称为纤维蛋白稳定因子,在肝脏中合成,以酶原的形式存在于血浆中,可以使可溶性纤维蛋白变为不溶性且较坚实的纤维蛋白凝块,且VWF与凝血因子FⅧ结合并作为载体,并且是血小板糖蛋白Ib、IIb、IIIa的受体,当血管内皮细胞受损时聚集于受损的血管内皮细胞下,启动血栓形成,另外内皮细胞中的VWF释放入血液中介导血小板的粘附,Ida Martinelli论述了VWF和FⅧ是动脉和静脉血栓形成的危险因子^[2],但是,若血浆中血小板缺乏伴有FⅧ合成减少,则彼此粘附的作用降低,不能使破损的血管壁堵塞而止血,轻微机械性损伤,就可以导致出血,常有鼻衄现象,称之为假血友病(Von Willebrand Disease)。

2 血栓形成的条件

2.1 正常血管内皮细胞

内皮细胞是血管腔面的单层扁平细胞,厚度为0.1~1 μm,多边形,宽约10~15 μm长约25~50 μm,沿血管的长轴排列,除了毛细血管外,其它血管区都有平滑的细胞,血管壁是具有分层结构的组织,构成毛细血管壁的是由内皮细胞,基底膜和周细胞三者所构成,周细胞的主要功能是生成基底膜和胶原纤维^[3],另外,

毛细血管的内皮细胞表面,存在一种可溶性乳胶样可水解的分子结构,称之为 Glcocalyx(糖盏),厚度为 50 ~ 100 nm,是一种非流动性吸附蛋白,与血浆蛋白相互作用,以保持血管内皮的正常功能和通透性^[4]。

2.2 内皮细胞受损

正常的血管内皮细胞与血管内流动的血细胞不直接接触,两者之间间隔着血浆相互作用,形成一种自然屏障,对血管起保护作用,当内皮细胞受损、光滑的血管内壁被破坏,则带正电荷的胶原纤维暴露,使带负电荷的血小板粘附,加之前述 FVIII 和 VWF 的作用而形成血栓,损伤血管内皮细胞的因素很多,常见有病毒、细菌的内毒素,免疫复合物、外伤、缺氧、一氧化碳、活性氧、冻伤、烧伤、突发高血流切变力等,在日常生活中,酗酒、淫乱等均可使内皮细胞受损。

2.3 血液流变性与血栓形成

血液在血管内流动,正常情况下,中间的流速较快叫轴流(Axis Flow),在靠血管腔面的血流较慢叫做缘流(Edge Flow),从轴流至缘流以分层的方式流动称为片流或层流(Laminar Flow)血液内部、液层与液层间的移动产生内摩擦力,内摩擦力的方向,是沿液层层面的切线向前移动、内摩擦力的大小即粘度(Viscosity),使液体内部各液层发生流动变形的液体流动的力称切变力,单位面积上所承受的切变力称切变应力或称剪切应力(Shear stress),平行液面发生切变变形随时间的变化率称切变速率或称剪切率(Shear rate),在血管中,流动的血液若经过内壁不光滑之处,如动脉炎、静脉炎、动脉粥样硬化,血流可呈湍流(Turbulent Flow),流经血管膨出或内陷处,如血管瘤,血流可呈涡流(Eddy Formation Flow)等,以上这些流态与血栓形成有密切的关系。

2.4 血细胞聚集

在血细胞中,血小板最小,无核,最轻,直径为 2.5 μm ,红细胞直径为 7 ~ 8 μm ,无核,携带血红蛋白,白细胞直径较大为 12 μm ,有核,但较红细胞轻,血细胞在血管内流动,常态下,血小板、白细胞、红细胞处在轴流,且在层流的切线上血小板居中,白细胞次之,血细胞聚集时切变力降低,切变应力随之降低,则切变速率减慢时,首先是血小板偏离轴流,吸附带正电荷的纤维蛋白原沿其层流的切线方向,向缘流而去,接着是白细胞跟随而上,当血管内皮细胞损伤时,首先是血小板粘附,接着发生聚集释放反应,形成血栓。

3 血栓的类别与疾病

在循环系统的任何部位都可以发生血栓,从结构、形态和色泽上可以分为四种。

3.1 白色血栓

多发生在动脉,主要由血小板和纤维蛋白所构成,例如在冠状动脉粥样硬化的基础上开始有纤维蛋白原和纤维蛋白附着,此时可以无症状,而在病情进展时发生心绞痛,若循环中血小板和纤维蛋白所构成的白色栓子,在突发高切变力下累加在原有的已附着有纤维蛋白的动脉粥样硬化的斑块上,则发生急性心肌梗死。

这种情况在早期作心电图可以见到 ST 段抬高,且在临床上常发心绞痛,称之为急性冠脉综合征^[1],其它如肢体的动脉闭塞性疾病,可发生苍白、发凉、无脉、间歇性跛行等。

3.2 红色血栓

由纤维蛋白网络红细胞和少量的白细胞而组成红色血栓,多发生于血流较缓慢的静脉,在静脉压低于逐段静脉的回心静脉压时,如微循环障碍,或静脉阻塞,阻塞的远心端静脉压高出生理静脉压时,如髂总静脉综合征、血栓性静脉炎、重力腿(Gravitational Leg)等可发生红色血栓, Watson H 报导^[5]超过 8 小时以上的旅行,可以发生静脉栓塞,超过 12 小时的飞行有 0.5% 发生静脉栓塞症,这是由于供氧不足、低气压、凝血质被激活所致,但红色血栓较松散,进入循环后易解体。

3.3 混合性血栓

在肢体静脉瓣破损处或静脉汇合处,血流发生涡流,血小板在涡流中碰撞,抛向破损处而附壁,并加入白细胞,纤维蛋白和红细胞等而形成一种灰红色的血栓硬结,肢体肿胀,往往破溃形成慢性溃疡。另外有动静脉瘘的疾病,血液通过动脉射流到静脉中去,则受损的肢体,静脉淤血,而动脉缺血,其末端内皮细胞受损,可发生混合性血栓;在血栓性闭塞性脉管炎的患者,是动静脉联合性疾病,是一种慢性发展过程,一方面动脉形成侧肢循环,另一方面炎症波及静脉使组织肿胀,淋巴循环障碍,此时所形成的血栓是混合性血栓。

3.4 流动的白色微血栓