

[文章编号] 1000-2200(2005)06-0502-03

·临床医学·

# 妊娠期高血压疾病患者血小板活化检测的临床意义

靳丽杰<sup>1</sup>, 吕合作<sup>2</sup>, 牡丹丽<sup>1</sup>, 席玉玲<sup>1</sup>, 赵发英<sup>1</sup>, 李柏青<sup>2</sup>

[摘要] 目的: 探讨妊娠期高血压疾病患者血小板活化情况及临床意义。方法: 采用全血法流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测妊娠期高血压疾病患者血小板膜表面活化纤维蛋白原受体(FIB-R)的表达, 同时用发色底物法检测实验对象的凝血四项, 并与对照组检测结果比较。结果: 妊娠期高血压疾病患者血小板活化的强度和比例均明显高于正常妊娠组和非妊娠组妇女( $P < 0.01$ ), 三者的凝血酶原时间和活化部分凝血酶原时间差异均有显著性( $P < 0.01$ ), 而凝血时间和纤维蛋白原差异均无显著性( $P > 0.05$ )。结论: 同常规凝血四项检测相比, 全血法 FCM 检测血小板膜表面活化 FIB-R 可灵敏地反映患者血小板活化状态, 判断妊娠期高血压疾病病情, 为预测和诊断子痫前期以及是否有 DIC 倾向提供一项早期指标。

[关键词] 妊娠并发症; 妊娠期高血压疾病; 血小板活化; 流式细胞术; 纤维蛋白原受体

[中国图书资料分类法分类号] R 714.253 [文献标识码] A

## Clinical significance of detecting the activation of blood platelet in patients with hypertension disorder in pregnancy by flow cytometry

JIN Li-jie<sup>1</sup>, LÜ He-zuo<sup>2</sup>, DU Dan-li<sup>1</sup>, XI Yu-ling<sup>1</sup>, ZHAO Fa-ying<sup>1</sup>, LI Bai-qing<sup>2</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004; 2. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the clinical significance the activation state of blood platelet in patients with hypertension disorder in pregnancy. **Methods:** The expression of activated fibrinogen receptor on the surface of blood platelet in patients with hypertension disorder in pregnancy was determined in whole blood by flow cytometry (FCM), and four parameters of blood coagulation were tested by chromogenic assays. **Results:** The intensity and the ratio of activated blood platelet in pregnant women with hypertension disorder were significantly higher than those in normal gravida and non-pregnant women ( $P < 0.01$ ). There was significant difference in prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) between pregnant women with hypertension disorder, normal gravida and non-pregnant women, but no significant difference of coagulation time and fibrinogen between them was found.

**Conclusions:** Comparing with assay of four parameters of blood coagulation, detection of activated fibrinogen receptor on surface of blood platelet in whole blood by FCM can reflect the activation state of blood platelet and evaluate the state of the disease in pregnant women with hypertension disorders. It can serve as an early indicator to predict and diagnose preeclampsia of the disease and tendency of disseminated intravascular coagulation.

[Key words] pregnancy complications; hypertension disorder in pregnancy; platelet activation; flow cytometry; fibrinogen receptor

妊娠期高血压疾病(hypertension disorder in pregnancy)是孕妇特有的一种全身性疾病, 严重威胁母婴健康。妊娠妇女血液中血小板和凝血因子增加, 血小板功能亢进, 活性增强, 因而血液处于高凝状态。血液呈高凝状态是妊娠期高血压疾病的重要发病因素, 对其病情严重程度和预后有重要影响<sup>[1]</sup>。目前, 临床上常采用动态发色底物法检测凝血四项<sup>[2]</sup>, 以反映患者凝血状态, 但其敏感性较差; 收集富含血小板的血浆, 用流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测血小板表面活化标志, 虽然提高了检测的敏感性, 但在标本处理过程中容易导致血小板活化, 从而影响检测的准确性。本实验采用

全血法 FCM 检测血小板早期活化指标纤维蛋白原受体(FIB-R), 探讨妊娠期高血压疾病患者的血小板活化状态与妊娠期高血压疾病严重程度的关系, 以寻找一项能准确预测妊娠期高血压疾病的早期监测指标。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为 2003 年 9 月~2004 年 9 月在本院待产的孕妇 80 例, 年龄 21~35 岁, 其中初产妇 51 例, 经产妇 29 例。80 例孕妇中, 正常孕妇 20 例, 妊娠期高血压疾病患者 60 例。在孕(35±1)周时检测孕妇外周血中活化血小板的数目和凝血四项。另选择 10 名同年龄组的正常妇女作阴性对照。妊娠期高血压疾病诊断标准采用人民卫生出版社全国高等医药院校教材《妇产科》(第 6 版)的分类标准。

1.2 标本采集 用大号针管轻柔抽取患者血液, 置枸橼酸钠抗凝的真空采血管中, 抽出的最初 2 ml 血

[收稿日期] 2005-04-15

[作者单位] 1. 蚌埠医学院附属医院 妇产科, 安徽 蚌埠 233004;

2. 蚌埠医学院 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 靳丽杰(1972-), 女, 安徽宿州人, 讲师, 主治医师。

弃去不用。

1.3 流式细胞术检测 取血后 10 min 内完成染色,取新流式管 2 根,分别为“对照管”A 和“测定管”B;对照管分别加适量的 IgM 同型对照抗体(Mouse IgM-FITC, BD Pharmingen<sup>TM</sup> #555583)和 CD61-PerCP(BD 公司, #72869);测定管加适量 PAC-1-FITC(IgM, BD 公司 #78437)和 CD61-PerCP。各管加磷酸盐缓冲液(PBS)400  $\mu$ l,抗凝全血 1  $\mu$ l,轻轻混匀,室温下避光 15 min。加含 1% PFA 的 PBS 400  $\mu$ l,上机检测。用 CD61-PerCP 和 SSC 设门,选定血小板,用“对照管”调仪器(调 FL1 于 10 以内,峰值为 5 左右),检测测定管 B 的 PAC-1 值。资料分析使用 CELLQUEST 软件,CD61-PerCP 和 SSC 设定 R1,直方图分析 PAC-1 阳性血小板百分比和平均荧光强度。

1.4 凝血四项检测 用发色底物法检测患者的凝血四项,仪器为 Sysmex 公司 CA-1500 型全自动血液凝固分析仪。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

2.1 流式细胞术检测活化血小板表面 FIB-R 的表达 IgM-FITC 同型对照无明显非特异性染色;正常人 PAC-1 阳性率为(3.21 $\pm$ 1.13)%,平均荧光强度为(2.72 $\pm$ 1.26);而妊娠期高血压疾病患者上述指标明显升高,PAC-1 阳性率为(15.52 $\pm$ 4.37)%,平均荧光强度为(14.67 $\pm$ 4.21),典型结果见图 1。

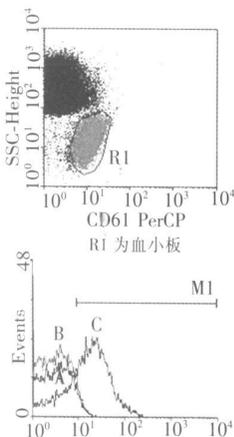


图 1 流式细胞术检测活化血小板表面纤维蛋白原受体的表达[以 R1 设门,直方图分析活化血小板(PAC-1-FITC<sup>+</sup>)的比例。A: IgM-FITC 同型对照;B: 正常对照;C: 妊娠期高血压疾病]

2.2 流式细胞术测定血小板活化的结果 妊娠期高血压疾病患者的血小板活化百分比和强度均明显高于正常非妊娠妇女和正常孕妇( $P < 0.01$ ),而在正常非妊娠妇女和正常孕妇,血小板活化百分比和强度差异均无显著性( $P > 0.05$ )。同时在不同类型

妊娠期高血压疾病患者中,随着疾病严重程度的加重,血小板活化的强度和比例均相应升高( $P < 0.05$ )(见表 1)。

2.3 发色底物法检测凝血四项的结果 用动态发色底物法检测实验对象的凝血四项时,各组患者的凝血酶原时间(PT)和活化部分凝血活酶时间(APTT)差异均有显著性( $P < 0.01$ ),而凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB)之间差异均无显著性( $P > 0.05$ )(见表 2)。

表 1 FCM 测定血小板活化结果( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	血小板活化状态	
		FIB-R (%)	FIB-R (MFI)
正常非妊娠妇女	10	3.21 $\pm$ 1.13	2.72 $\pm$ 1.26
正常孕妇	20	5.34 $\pm$ 1.37	7.15 $\pm$ 1.94
妊娠期高血压疾病			
轻度	14	8.71 $\pm$ 2.04 <sup>△△</sup>	9.83 $\pm$ 2.43 <sup>△△</sup>
中度	22	14.52 $\pm$ 3.28 <sup>△△##</sup>	15.67 $\pm$ 3.17 <sup>△△##</sup>
重度	24	38.46 $\pm$ 5.34 <sup>△△##+</sup>	22.38 $\pm$ 3.56 <sup>△△##+</sup>
F	—	362.36	132.47
P	—	< 0.01	< 0.01
MS <sub>组内</sub>	—	11.565	7.825

*q* 检验: 与正常妇女比较 \*\* $P < 0.01$ ; 与正常孕妇比较  $\Delta\Delta$  \*\* $P < 0.01$ ; 与轻度妊娠期高血压疾病组比较 ## $P < 0.01$ ; 与中度妊娠期高血压疾病组比较 ++ $P < 0.01$

表 2 发色底物法检测凝血四项结果( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	PT(s)	APTT(s)	TT(s)	FIB(g/L)
正常非妊娠妇女	10	12.23 $\pm$ 1.43	32.82 $\pm$ 5.36	16.54 $\pm$ 2.18	3.21 $\pm$ 0.54
正常孕妇	20	12.54 $\pm$ 1.56	36.56 $\pm$ 6.27	16.37 $\pm$ 2.37	3.34 $\pm$ 0.61
妊娠期高血压疾病					
轻度	14	12.98 $\pm$ 1.25	37.47 $\pm$ 4.51	16.24 $\pm$ 2.08	3.42 $\pm$ 0.67
中度	22	13.61 $\pm$ 1.84	41.47 $\pm$ 3.43	15.89 $\pm$ 2.26	3.53 $\pm$ 0.84
重度	24	14.10 $\pm$ 1.48	46.73 $\pm$ 2.75	14.64 $\pm$ 2.52	3.65 $\pm$ 0.89
F	—	4.29	24.81	2.18	0.83
P	—	< 0.01	< 0.01	> 0.05	> 0.05
MS <sub>组内</sub>	—	2.429	19.89	5.401	0.571

## 3 讨论

妊娠期高血压疾病是妊娠期所特有的疾病,多发生于妊娠 20 周以后,临床表现为高血压、蛋白尿、水肿,重度子痫患者可出现抽搐、昏迷、DIC,甚至死亡。正常妊娠时,孕妇外周血中血小板活性增加,血液处于高凝状态,但凝血系统与纤溶系统处于动态平衡中。妊娠期高血压疾病时凝血系统与纤溶系统失去动态平衡,血小板活性增强,凝血系统功能增强。研究结果已证实<sup>[3]</sup>,重度妊娠期高血压疾病时,血液处于慢性 DIC 状态,凝血及纤溶活性出现明显异常,外周血小板活化、聚集和破坏明显增多。Facchinetti 等<sup>[4]</sup>认为,血小板活性增强不仅是子痫前期的特征,而且可能是其发病原因。而血小板中一氧化氮合酶(NOS)可调节一氧化氮(NO)合成,血

小板合成和释放的 NO 能抑制血小板聚集,降低血小板活性。Delacretaz 等<sup>[5]</sup>发现,与正常孕妇相比,子痫前期患者血小板内 NOS 活性明显低下,NO 生成减少,导致血小板活化聚集增强,因此血小板活性增加可能是影响妊娠期高血压疾病病理生理变化的关键因素,是预测妊娠期高血压疾病病情轻重的早期指标。

目前临床上通常采用发色底物法检测患者的凝血四项,以反映患者的血液凝固状态,但其敏感性欠佳。本实验采用全血法 FCM 检测血小板的活化状态,通过双色标记,检测外周血中血小板上 FIB-R 的表达,从而确定血小板的活化程度和比例。FIB-R 为血小板活化的早期标志物,它是活化 gp II b/IIIa 复合物,其商品化的特异性抗体为 PAC-1<sup>[6]</sup>。本实验结果显示,妊娠期高血压疾病患者血小板活化的强度和百分比明显高于正常孕妇和非妊娠妇女 ( $P < 0.01$ )。同时可以看出,随着妊娠期高血压疾病严重程度的加重,血小板活化的强度和比例逐渐升高;而正常孕妇与非妊娠妇女比较,差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。本文结果显示同常规动态发色底物法

检测患者凝血四项的方法相比,全血法 FCM 检测患者的血小板活化百分比和强度可灵敏反映妊娠期高血压疾病的血小板活化程度,从而为预测和诊断子痫前期并发 DIC 提供一项早期指标,可用来判断妊娠期高血压疾病的严重程度,对妊娠期高血压疾病的诊断和治疗有一定指导意义。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Sheu JR, Hsiao G, Lin WY, et al. Mechanisms involved in agonist-induced hyperaggregability of platelets from normal pregnancy [ J ]. *J Biomed Sci*, 2002, 9( 1 ): 17 ~ 25.
- [ 2 ] 鹿新红, 宋红美. ACL-200 血凝仪检测凝血四项影响因素分析 [ J ]. 实用医技杂志, 2004, 11( 5 ): 602 ~ 603.
- [ 3 ] 李益清, 尹松梅. 正常妊娠和妊娠期高血压疾病患者血小板活化的研究进展 [ J ]. 中国血液流变学杂志, 2003, 13( 1 ): 93 ~ 95.
- [ 4 ] Facchinetti F, Neri I, Piccinini F, et al. Effect of L-arginine load on platelet aggregation [ J ]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1999, 78( 6 ): 515 ~ 519.
- [ 5 ] Delacretaz E, de Quay N, Waeber B, et al. Differential nitric oxide synthase activity in human platelets during normal pregnancy and pre-eclampsia [ J ]. *Clin Sci ( Lond)*, 1995, 88( 6 ): 607 ~ 610.
- [ 6 ] Michelson AD. Flow cytometry: A clinical test of platelet function [ J ]. *Blood*, 1996, 87( 12 ): 4 925 ~ 4 936.

(上接 501 页)

3.3 胎膜早破与早产 本资料胎膜早破者的早产发生率为 22.5%, 高于对照组的 5.9% ( $P < 0.005$ )。与有关文献报道的早产率 20.6% 接近<sup>[4]</sup>。胎膜早破是产科常见的并发症,胎膜破裂后子宫腔内压力降低,体积缩小,导致早产,其早产的发生率较未破膜者高 2~5 倍<sup>[5]</sup>。因此,胎膜早破认为是早产的重要因素。胎膜早破主要与生殖道上行性感染有关,对孕期及孕前生殖道感染的筛查和及时治疗可降低早产的发生率。另外,子宫颈机能不全、子宫腔内压力异常、创伤以及胎膜结构发育异常、孕妇缺乏某些微量元素和维生素等因素,也与胎膜早破有关,故积极寻找诱发胎膜早破的高危因素,进行重点监护并采取合理措施,可降低其发生率。

3.4 妊娠高血压与早产 本资料妊娠高血压组的早产率 13.7%, 高于无妊娠高血压组的早产率 6.1% ( $P < 0.005$ )。妊娠高血压是妊娠期间常见的并发症,对母婴危害较大,尤其重度妊娠高血压综合征(妊高征)、先兆子痫、子痫的孕妇其早产率是正常的 4.7 倍<sup>[6]</sup>。妊高征患者从尿中排出大量蛋白,机体蛋白质减少,造成机体营养不良和贫血,引起母体与胎儿的应激,从而刺激 CRH 的合成,CRH 浓度增加导致早产。因此,在妊娠期加强监护,定期检查,预防妊高征是降低早产的一个重要措施。

3.5 孕期感染性疾病与早产 孕期感染性疾病主要包括肾炎、肝炎、胆汁淤积症、泌尿道感染、生殖道

感染。感染是导致胎膜早破的重要因素,子宫颈及阴道的微生物产生蛋白水解酶,水解子宫颈口附近的胎膜的细胞上物质,使胎膜脆性增加;感染刺激机体中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞脱颗粒释放溶酶体酶,经过一系列反应促进机体产生 PG,引起子宫收缩,子宫腔压力增加。在子宫腔压力增加、胎膜强度减弱的情况下,易发生胎膜早破,从而导致早产。

此外,母亲孕前 2 年月经不规则、母亲生育年龄  $\geq 30$  岁及母亲职业为工人、教师、医务、技术人员也是早产的危险因素。早产是围生儿发病、死亡和远期致残的主要原因,发病率为 5%~15%<sup>[7]</sup>,也是影响儿童健康水平和生存质量的不利因素之一。因此,预防早产,必须针对早产的高危因素,在孕前、孕期和产前积极实施干预措施。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 李东至. 早产发生机理的研究进展 [ J ]. 国外医学·妇幼保健分册, 2002, 13( 1 ): 1 ~ 3.
- [ 2 ] 齐璇, 辛晓燕, 陈必良. 早产的病因与围产儿结果分析 [ J ]. 实用临床医药杂志, 2003, 7( 1 ): 90, 96.
- [ 3 ] 王秀平, 常美英. 早产病因及预防 [ J ]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13( 13 ): 1 735.
- [ 4 ] 刘慧. 影响早产的相关因素分析 [ J ]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19( 6 ): 518 ~ 519.
- [ 5 ] 边秀珍. 201 例早产因素的临床分析 [ J ]. 浙江医学, 2003, 25( 4 ): 237 ~ 238.
- [ 6 ] Elijah S, Weiner E, Nachum Z, et al. Epidemiologic risk factors for preterm delivery [ J ]. *Isr Med Assoc J*, 2002, 4( 12 ): 1 115 ~ 1 117.
- [ 7 ] 乐杰. 妇产科学 [ M ]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 4.