

医学
拾萃

IMPROVE REVIEW

血栓弹力图篇
Trombelastogram

二〇一九年十月刊
October, 2019

Article Reading Guidance
文献导读

Article Abstract Collection
文献摘要

Featured Article
文献精读

Original Article Reading
文献原文

IMPROVE 陽普醫療
IMPROVE MEDICAL

医学
拾萃

CONTENTS

 Article Reading Guidance
文献导读 | p01

 Article Abstract Collection
文献摘要 | p15

 Featured Article
文献精读 | p30

 Original Article Reading
文献原文 | p38

主编 邓冠华 博士
Chief Editor Dr. Guanhua Deng

联合主编 朱勇 博士
Co-Editor-in-Chief Dr. Yong Zhu

执行主编 高树勇
Executive Editor Shuyong Gao

专刊编辑 李小林 博士 孙其岭 博士 杨艳 博士
Special Editor Dr. Jerry Li Dr. Qiling Sun Dr. Yan Yang

田艳丽 博士 罗江兰
Dr. Yanli Tian Jianglan Luo

审核编辑 吴涛明
Audit Editor Taoming Wu

协作单位 阳普学院
Partnership Improve College

广东省医用材料血液相容性研究企业重点实验室
Guangdong Enterprise Key Laboratory of
Blood Compatibility of Medical Materials

美国吉迪思诊断有限公司
GIMDX, Inc.

联系方式 yxsc@improve-medical.com
Contact Us

 **陽普醫療**
IMPROVE IMPROVE MEDICAL



电子文献



Article Reading Guidance

文献导读

本期综述主要介绍血小板生理功能以及其与多种疾病的相关性，并系统介绍了近年来血小板检测方法的变更。血小板功能检测正处于精准医学和深度表型分析等新时代的前沿，全面细致的血小板功能分析越来越多地用于多种研究领域。新开发的诊断技术和仪器将可能应用于各种不同的临床部门和实验室。目前血栓弹力图检测可床旁快速评估血小板、凝血和纤溶系统的能力，可为实验室监测凝血功能提供有效帮助。

血小板生理及功能检测方法学进展

众所周知，根据最新的细胞学凝血机制理论，血小板在止凝血过程中的作用进一步被加强，被认为是中心的关键的一环，血小板活化过程中的膜表面、释放的颗粒物等均对凝血过程有贡献（图 1 和图 2）^[1-3]。事实上，除了止血功能外，血小板的其他新功能不断被发现：参与炎症的调节、机体的免疫防御、伤口愈合、肿瘤生长和转移等。因此在临床活动中，对血小板功能性监测越来越重视，本文拟将对血小板功能监测的方法进行一个综合性概述，希望能对临床医生的工作有所启发。

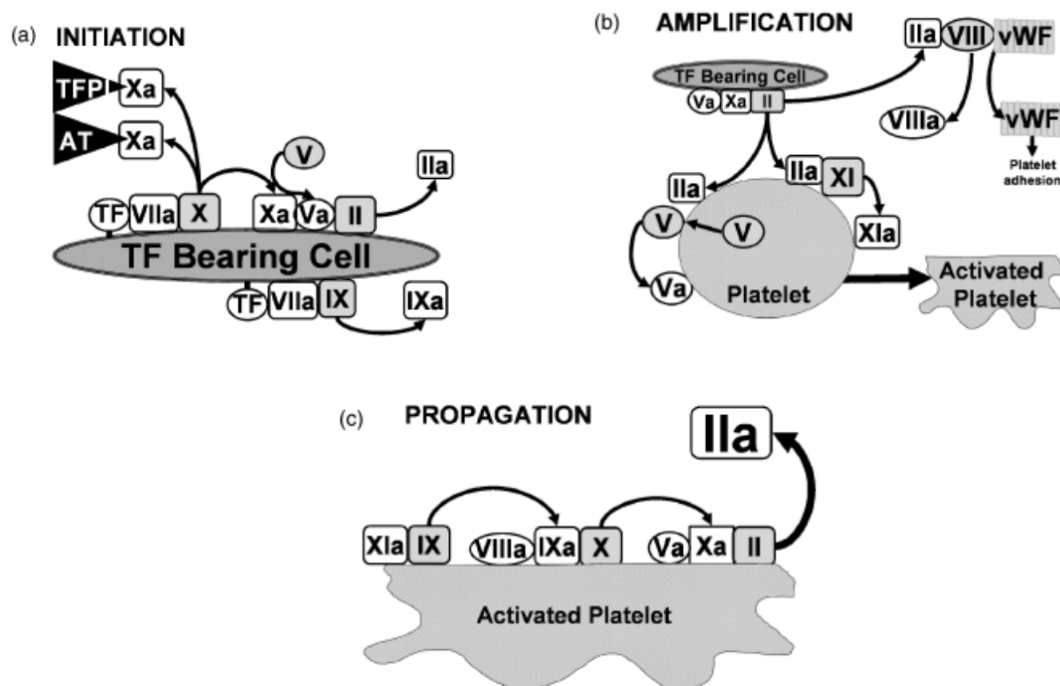
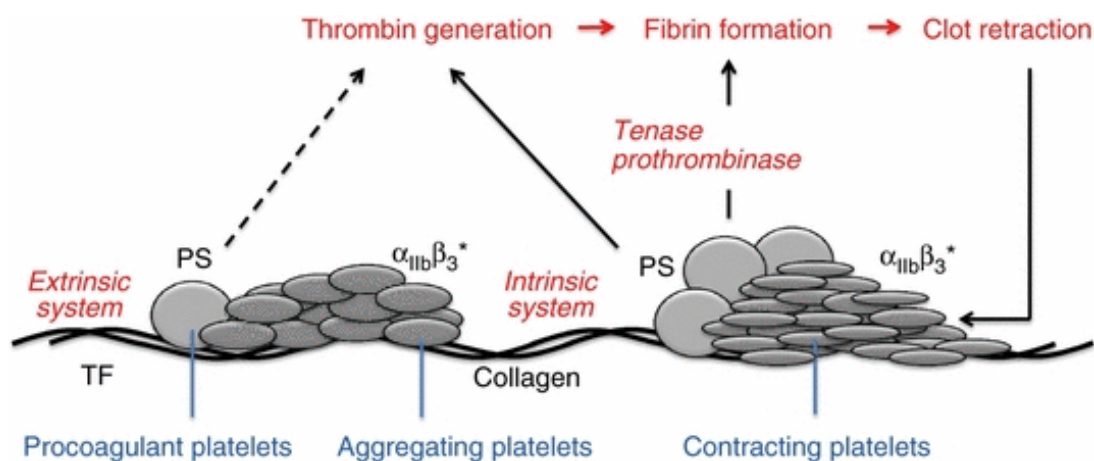


图 1. A Cell-based model of hemostasis^[2]

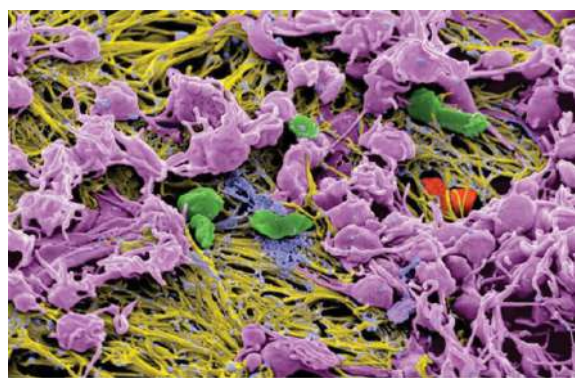
图2. 血小板参与凝血的机制^[4]

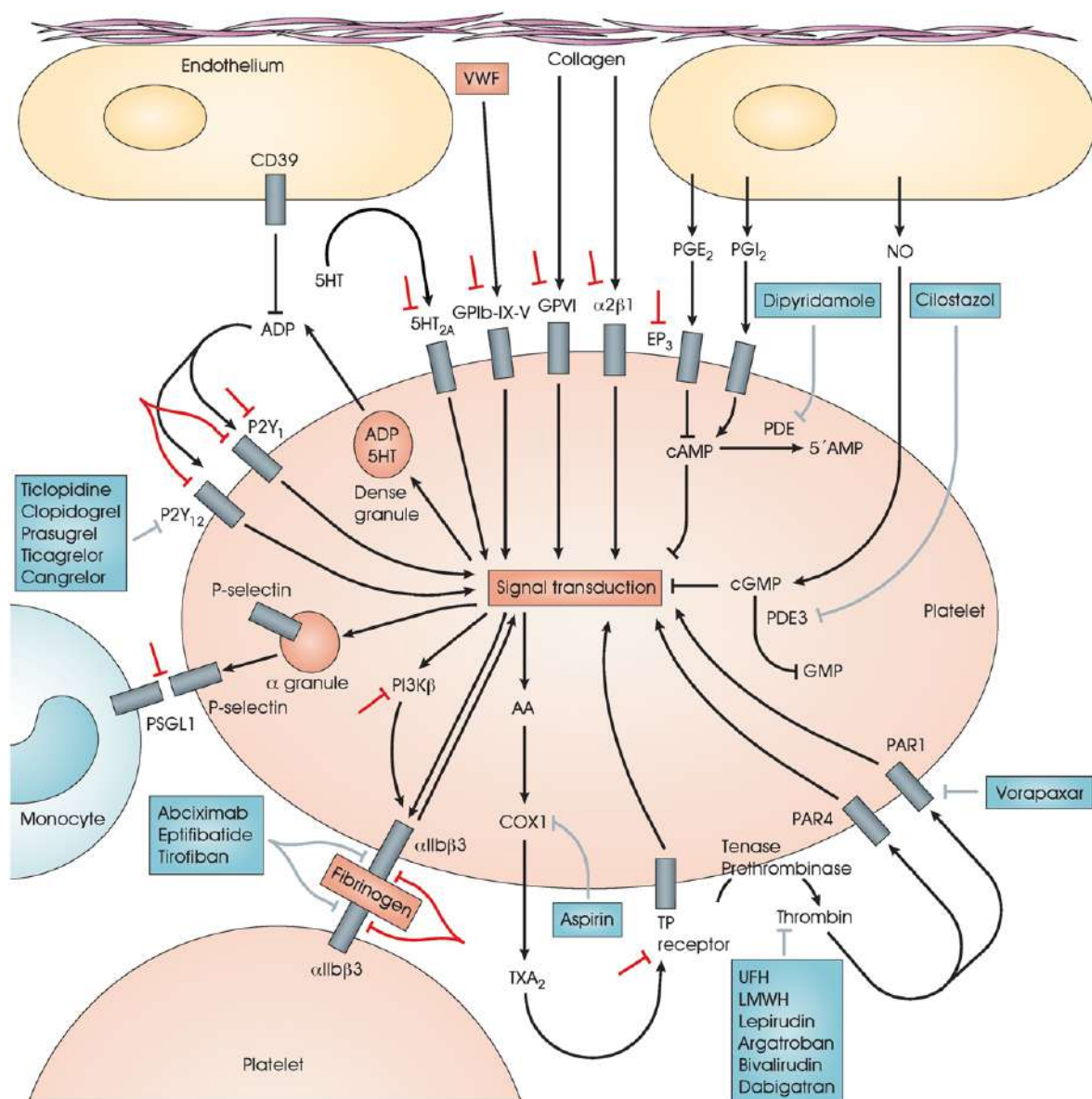
血小板生理特点

关于血小板生理，不是新的话题了，有趣的是，它仍然有着众多的未解之谜。血小板是血液中体积最小的血细胞（直径1 ~ 3 μm），是巨核细胞释放入血液循环的无核圆盘状细胞“碎片”，主要功能是参与生理止血过程、促进凝血和维持毛细血管壁的完整性和正常通透性。血小板活化是血小板执行其各种功能的重要环节，而活化后的释放基础是血小板浆里含有的三种颗粒，即 α 颗粒、致密颗粒和溶酶体颗粒（图3）。

α 颗粒是血小板中体积最大（200 ~ 500 nm）、含量最多（50 ~ 80/cell）的颗粒。在电镜下观察，其结构可分为四区，从外向内依次是：颗粒外膜、管道支持结构、低电子密度区和高电子密度类核。颗粒外膜结构与血小板外膜无异，同样含有糖蛋白 GPIIb/IIIaP、P-选择素（P-selectin）和整合素 αIIbβ3。管道结构里有 vWF 的多聚物复合体。低电子密度区含纤维蛋白原、凝血酶第三因子及白蛋白。高电子密度类核区内含有 β 血小板球蛋白（beta-thromboglobulin, β-TG）、血小板第四因子（platelet factor, PF4）和一些非特异性的蛋白聚糖。有些 α 颗粒还含有小泡（40 ~ 100 nm）或称之为外核体。小泡里的物质大多并不是血小板所特有。相对于 α 颗粒

而言，致密颗粒在人血小板内含量相当低，每个血小板仅含 3 ~ 8 个。致密颗粒也叫致密体或 delta 颗粒，是三种颗粒中体积最小的，用透射电子显微术观察时为一高电子密度点，形状一般为圆形或球形。其外膜上含有与 α 颗粒相同成分，如 P-选择素和纤维蛋白原等^[3]，还有一些与溶酶体膜相同的成分，如 CD63（lysosome-associated membrane proteins, LAMP 3）和 LAMP 2 等，还有一些小分子物质，如 ADP、Ca²⁺、血清素等，这些物质对血小板的活化和分泌至关重要（图4和表1）^[5]。此外，研究血小板的基因组学和蛋白组学的结果提示，还有许多未知的因素影响着血小板的功能^[6, 7]。

图3. 电镜下活化的血小板^[5]

图 4. 血小板的信号传导通路^[5]表 1. 血小板颗粒的类型和性质^[5]

	数量/血小板	直径 (nm)	表面积 (μm^2) /血小板	常见标志物
α 颗粒	50 ~ 80	200 ~ 500	14	VWF CXCL-4 (PF4)
致密颗粒	3 ~ 8	150	< 1	CD63 血清素
溶酶体	< 3	200 ~ 250	< 1	酸性磷酸酶

缩写: CXCL4, chemokine (C-X-C motif) ligand 4; PF4, platelet factor 4; VWF, von Willebrand factor.

血小板的功能

1. 血小板与凝血功能

凝血过程有一套严格的控制和调节机制。在血栓形成和止血过程中，血小板在支持和限制凝血活性方面提供了其突出和

独特的作用，主要通过以下几个方面：1) 与暴露的磷脂酰丝氨酸 (PS) 形成前凝血表面 (图 5)；2) 提供凝血酶和纤维蛋白形成的部位；3) 纤维蛋白凝块收缩。以上每个方面都有若干因子参与其中，详见表 2^[8]。

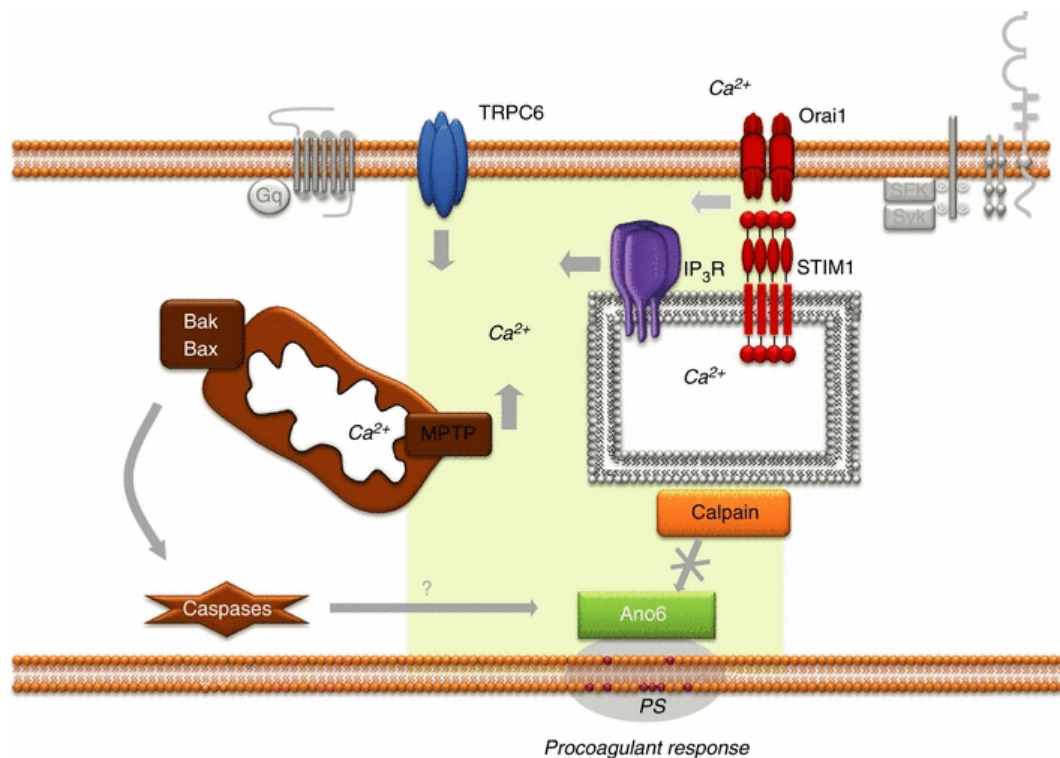


图 5. 血小板活化后提供 PS-暴露表面^[4]

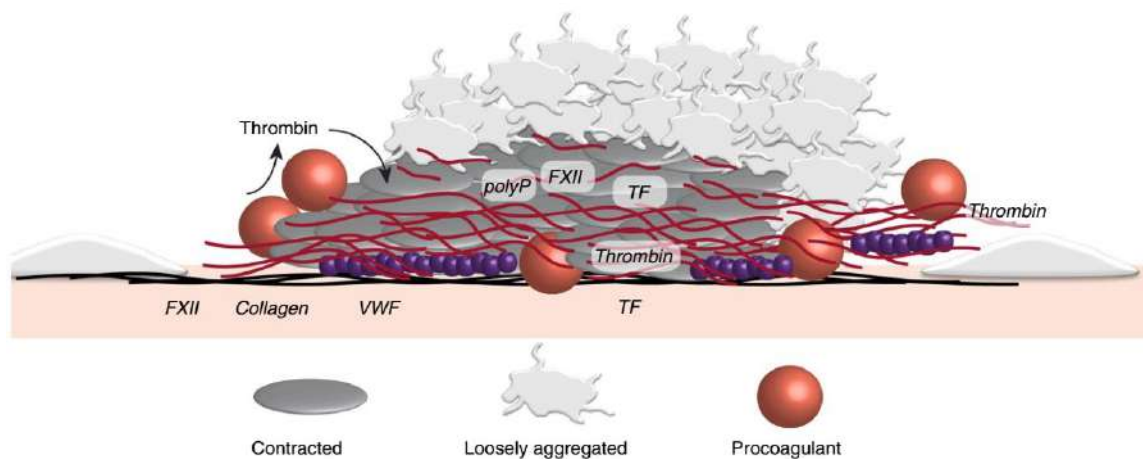


图 6. 血小板提供凝血酶和纤维蛋白形成的部位^[3]

表 2. 人体血小板参与凝血酶生成和凝块收缩凝血的蛋白^[8]

成分/组分名称	相关因子	对凝血的影响
血小板受体和膜蛋白类		
IP 受体	前列腺素 E1	TG
G13 蛋白	mSRI 肽	CR
缝隙连接	甘珀酸, Gap27, 18 β -GA	CR
糖蛋白 VI	9O12 Ab	TG
整合素 α 2 β 1	6F1 Ab	TG
整合素 α IIb β 3	Glanzmann 患者, 阿昔单抗	CR, TG
Orai1	2-APB	TG
P2Y12	抗血小板药坎格雷洛, 替格瑞洛	TG
血小板信号蛋白类 (激酶类)		
PI3 kinase β	TGX-221	TG
SFK	PD0173952	CR
Syk	Syk inhibitor II	TG
血小板信号蛋白类 (非激酶类)		
Cbl	OXSI-2, PP2	CR↓
环氧合酶	阿司匹林	TG↓
WASP	WAS 患者	CR↓
血浆蛋白类		
XII 因子	玉米胰蛋白酶抑制剂	TG↓
VII 因子	FVII	TG↓

缩写: TG = 凝血酶生成, CR = 血凝块收缩

血小板与凝血系统之间的微妙作用与平衡是维持血管内血液流动的关键。为了实现这一目标, 血小板在血管壁附近流动过, 这是由于血液成分的生物物理学性质和血管内的剪切力共同作用使然。当血管受到损伤时, 这种接近血管壁的方式使血小板可以快速做出反应。通常认为这种反应发生在几个阶段, 从粘附到内皮下细胞外基质与血小板上特异性的受体, 包括结合 Von Willebrand 因子的 GP1b/V/IX 复合物, 以及血小板表

面结合胶原的 GPVI 和 α IIb β 1 受体。在血小板与血管壁连接之后, 血小板内的信号转导和最初呈圆形或“板”状的血小板变得更加扁平。接着牢固粘附, 导致形成最初的血栓或栓塞, 同时活化的血小板将通过整合蛋白受体 α IIb β 3 介导的血小板相互作用, 从循环中抓取新的血小板, 从而使血栓“长大” (图 7)^[9]。

Platelet role in hemostasis and thrombosis

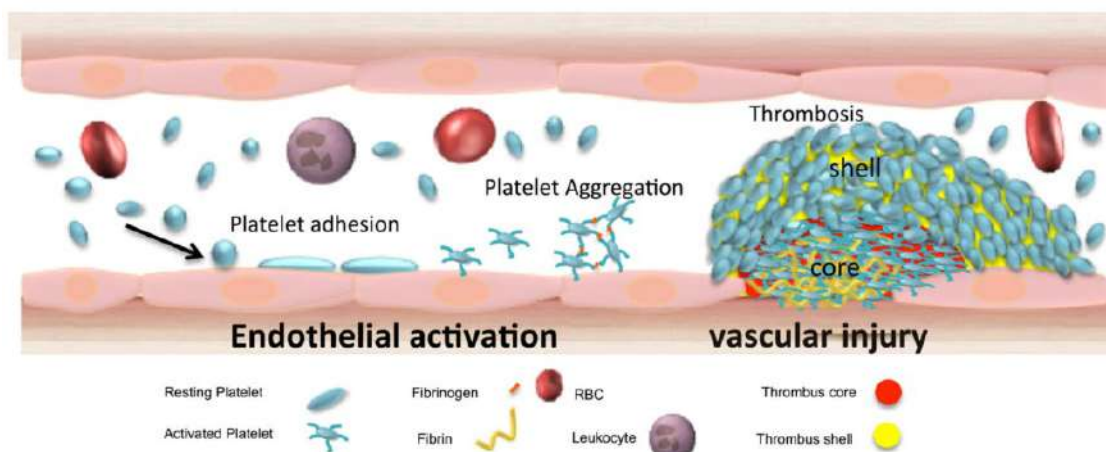


图 7. 血小板与凝血系统的相互作用

2. 血小板与炎症

最近的证据表明血小板处于影响正常白细胞生物学和炎症信号的多种炎症过程的中间。许多关键的观察支持血小板作为免疫细胞的概念。血小板中 Toll 样受体 (TLRs) 的表达表明了直接与白细胞相似的微生物病原体接触的能力。只需一小部分数量的血小板即可保持足够的止血作用, 这表明有过量的血小板可以作为识别外来颗粒的“监视”者^[10]。事实上, 有许多证据表明血小板与心血管疾病的发展相关。慢性炎症是导致动脉粥样硬化的主要因素。有文献记载血小板粘附于血管性血友病因子 (VWF) 并与血管内皮细胞结合, 这种相互作用导致内皮表面白细胞的聚集成团和滚动^[11]。因此, 血小板不仅将白细胞带到炎症可能导致动脉粥样硬化的部位, 也可携带其他促炎性介质, 如血栓素和 CD40 配体^[3, 12]。

此外, 血小板-白细胞聚集物的形成也允许血小板参与调节免疫反应。如前所述, 血小板通过释放 CD154 来增强适应性免疫反应; 此外, 它们能够通过主要在主要组织相容性复合物 I 中表达抗原来提高特定的 CD8⁺ T 细胞^[13]。尽管可能更多血小板在免疫级联反应中发挥作用, 但在免疫级联反应中, 血小板的作用是通过释放 CD154 来增强适应性免疫反应。目前的知识体系在很大程度上与血小板作为免疫系统延伸的概念一致, 但尚未被发现。

还有一股不可忽视的力量, 即血小板活化后释放的一些微粒与引起类风湿性关节炎的慢性炎症有关。具体地说, 有报道称在类风湿性关节炎的小鼠模型中, 血小板微粒的释放会引起滑膜细胞进一步的炎症效应器功能, 从而放大疾病中的滑膜炎^[14]。微粒释放由血小板表面受体糖蛋白 VI 介导, 后者与血小板表面的 FcR-γ 链复合。糖蛋白 VI 最典型的配体是胶原, 这

种结合可能通过 FcR-γ 胞质尾部的免疫受体酪氨酸活化基序传递信号^[15]。血小板微粒在其他炎症状态中的相关性尚不清楚。

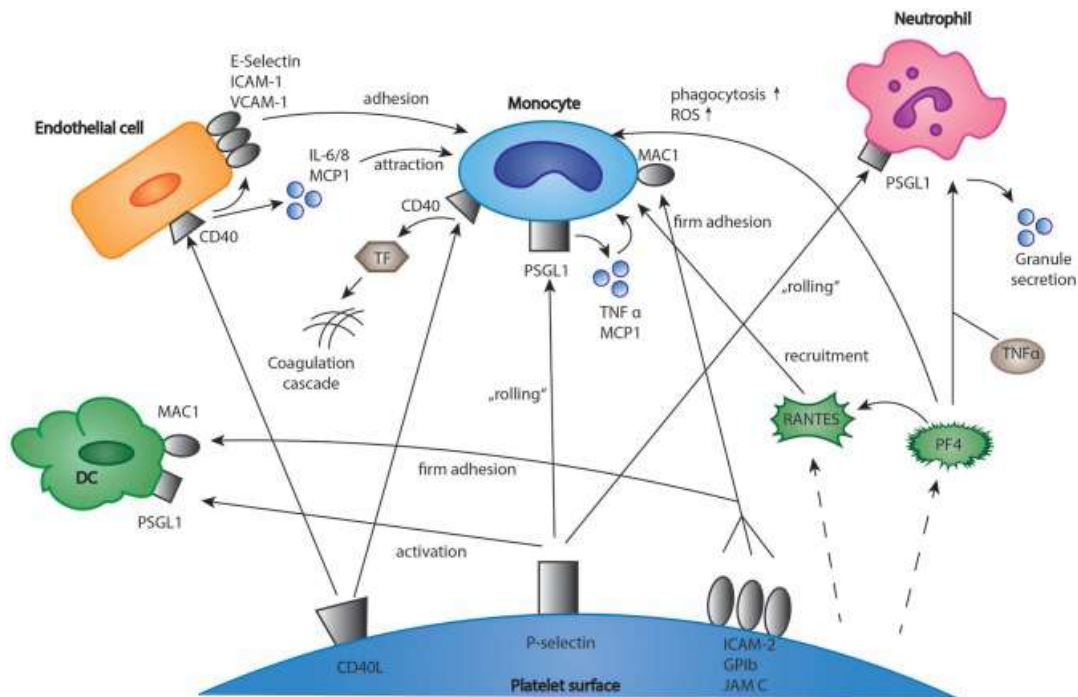


3. 血小板与肿瘤

实际上, 血栓、炎症和癌症是相互关联的, 循环血小板是每个过程共同的一个细胞元素。不过血小板对炎症途径和癌症的作用尚不明确, 似乎是复杂和多方面的。上一节中我们已经大致阐述了血小板与炎症的一些纠缠不清的过程, 本节我们将重点讲讲血小板与肿瘤的故事。

2000 年, Hanahan 和 Weinberg 定义了肿瘤的 6 个特征:

- (1) 生长信号的自给自足; (2) 对生长抑制信号的不敏感;
- (3) 抵抗细胞死亡; (4) 无限的复制潜能; (5) 持续的血管生成; (6) 转移^[16]。2011 年, 特征清单有所更新, 增加了如恶性转化所需的细胞和微环境改变、细胞能量调节失调、避免免疫破坏、基因组不稳定和肿瘤促进炎症等特征^[17]。事实上, 许多这些特征类似于发炎状态, 将血小板置于一个连接血栓、炎症和癌症的交互中心^[18] (图 9)。

图 8. 血小板与炎症细胞之间的反应^[3]

Platelets and the Hallmarks of Cancer

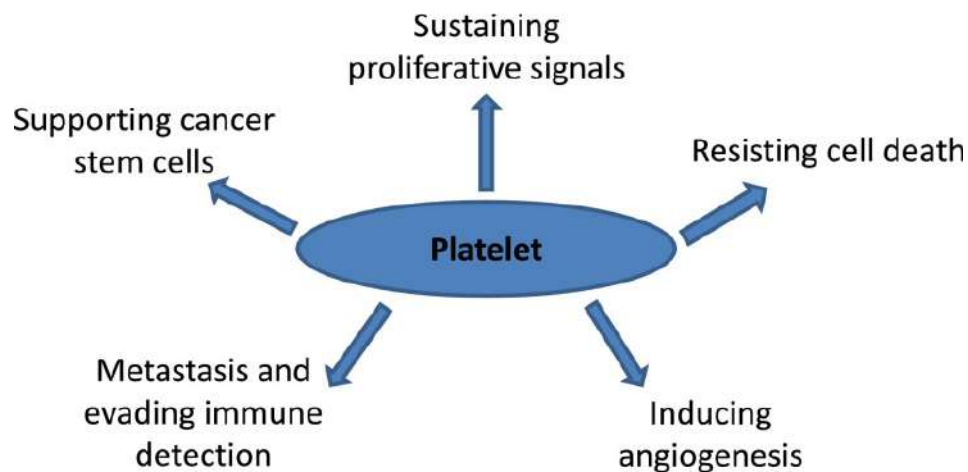


图 9. 血小板与肿瘤

已经发表的数据表明,高血小板计数与多种癌症的转移增加和不良预后有关,这说明血小板在癌症的发展和转移中起着不可忽视的作用^[19]。一方面肿瘤细胞通过许多受体和信号分子与血小板相互作用^[20]。例如,肿瘤细胞释放可激活血小板的可溶性分子,包括 ADP 和凝血酶 B,而血小板与肿瘤细胞的直接接触也会导致活化。血小板肿瘤细胞聚集是通过 RGD 结合蛋白(包括纤维蛋白原、血管性血友病因子和纤维连接蛋白)

将血小板整合素 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 结合到肿瘤细胞整合素 $\alpha_v\beta_3$ 形成的,这一过程被称为肿瘤细胞诱导的血小板聚集(TCIPA)。血小板源性微粒(PDMPs)也通过产生基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、血管源性血小板源性生长因子和组织因子来促进转移和血管生成。当肿瘤细胞激活血小板时,这些通路形成了一个相互促进的循环,进一步支持了肿瘤细胞的生长、侵袭和转移。另一方面,活化的血小板也同时有促进肿瘤转移的作

用,包括促进肿瘤细胞-髓-间充质转换(EMT)、周围细胞外基质(ECM)的降解、增加血管通透性以及帮助恶性肿瘤转移至远处的组织^[21]。

另外还有一个有趣的发现。血液中存在肿瘤细胞活化的血小板时,可能使癌症患者易发生血栓事件。阿曼德·特鲁索博士于 1865 年首次发现该现象,至此,癌症与静脉血栓栓塞(VTE)风险之间的关系已经有很好的文献记录^[22]。2007 年的一项研究证明,接受化疗的癌症患者发生 VTE 的可能性是接受化疗的患者的 47 倍^[23]。总的来说,活动性癌症使 VTE 的风险增加了 4 到 7 倍,并且癌症相关的 VTE 也在增加^[24]。肿瘤细胞通过多种机制刺激凝血发生和血栓形成。其中,肿瘤细胞产生的组织因子和肿瘤衍生因子对凝血激活起了一定的促进作用,肿瘤细胞释放的活化血小板和负电荷磷脂也可通过接触

激活(内在)途径刺激凝血,这些发现进一步证明了血小板在癌症相关静脉血栓形成中起着重要作用^[25]。

血小板功能检测

近年来,血小板功能的评估在各种临床环境中变得越来越必要:1)识别出血性疾病患者;2)监测抗血小板治疗的反应;3)评估围手术期止血;以及4)在输血医学中。事实上,血小板功能检测需要基于不同的检测原理以反应血小板不同的问题,很少有实验能够“一体化”反应血小板活化途径。目前市场上有几种主流的血小板功能检测系统,根据检测原理可分为四大类:1)基于血小板粘附和聚集的评估;2)基于剪切力作用;3)基于血凝块粘弹性物理性质的分析;4)基于血小板表面标志物的测量。表3中汇总了不同方法的几个代表性检测系统,我们将开始分别对它们进行阐述。

表 3. 不同原理的血小板功能检测系统^[26-29]

方法	标本类型	基本原理
1. 基于血小板聚集		
透光率比浊法（LTA）	枸橼酸化富血小板血浆	富血小板的血浆（PRP）是相对不透光的细胞混悬液，血小板聚集后透光率增加，通过测定 PRP 样本透光率的变化可以分析血小板的功能。
电阻抗法（代表：Multiplate™ analyzer, Plateletworks）	枸橼酸化全血	利用电阻抗原理通过连续计数，检测不同激活剂诱导下血小板聚集情况。
2. 基于剪切力		
PFA-100/PFA-200	枸橼酸化全血	在高切变率条件下，利用不同激活剂激活血小板，检测血小板聚集情况。
3. 基于血液粘弹性物理性质的分析		
血栓弹力图（血小板图）	枸橼酸化全血	用物理学原理监测血凝块形成的全过程，有特定参数和试剂反应血小板功能和血小板对药物的反应性。
ROTEM	枸橼酸化全血	
SONOCLOT	枸橼酸化全血	
4. 基于血小板表面标志物的测量		
流式细胞学方法	枸橼酸化全血，PRP	利用抗原抗体原理，使用已经抗体检测血小板表面标志物，如膜表面标志物。
ELISA 方法	PRP	通常用于检测可溶性的血小板释放物，如 PF4, β-TG, 可溶性 P-选择素, 血栓烷 A2 及代谢物等。

1. 透光率比浊法 (LTA)

透光率比浊仪 (LTA) 曾一度被认为是血小板功能检测的金标准。其原理为:

富血小板的血浆 (PRP) 是相对不透光的细胞混悬液, 血小板聚集后透光率增加, 通过测定 PRP 样本透光率的变化可以分析血小板的功能。富血小板血浆在各种诱聚剂作用下发生血小板聚集, PRP 的悬浊度下降, 透光率增加 (贫血小板血浆 (PPP) 样本的透光率设定为 100%), 因此 LTA 可实时测定血小板聚集的动态变化 (以百分比表示) [30]。

因为血小板可以被多种诱聚剂、在不同的浓度条件下激活, 因此 LTA 检测的优点之一就是灵活性。血小板之间相互作用的动力学信息与血小板激活的不同阶段——从血小板形态变化到释放颗粒、从不稳定的聚集到牢固聚集相对应, 这些动态变化可由电子显微镜观察确认。因此 LTA 为详细研究血小板的活化途径提供了可能, 在过去 50 年中成为大多数专业实验室研究血小板功能的优选方案。

但是从另一角度看, LTA 是一种相对非生理条件的试验: 需从全血中分离血小板; 低剪切力搅动; 需加入诱聚剂才产生聚集。这些试验条件不能完全模拟血管壁损伤导致的小血小板粘附、活化和聚集过程。传统的 LTA 试验要检测一整套血小板诱聚剂, 需要大量的血样, 操作人员必须具备深厚的专业操作训练和结果解读能力, 容易受一些外在条件影响 [30, 31]。由此促使人们试图开发出自动 LTA 分析仪或新的、更容易操作的血小板功能检测方法。其他检测方法因此应运而生。

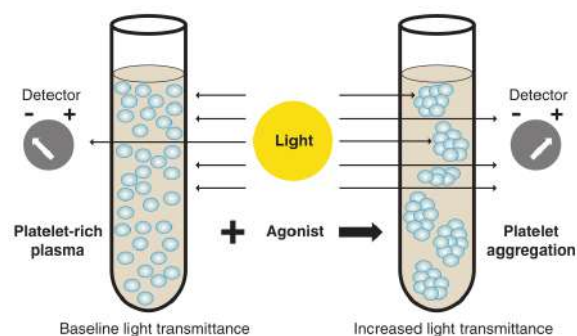


图 10. LTA 原理示意图 [32]

2. 电阻抗法

电阻抗法检测原理是血小板凝聚过程中血液样本的电阻抗会发生变化。检测时把正负两个电极浸入生理盐水稀释的全血样本中, 用常规血小板诱聚剂启动血小板凝聚, 同时记录血小板凝聚过程中血液样本电阻抗的变化。Multiplate 分析仪 [33]

(罗氏诊断, 瑞士巴塞尔) 和 Plateletworks (海伦娜, 美国) 属于此类。基于电阻抗法检测原理的大部分设备均可根据不同的应用, 预先设置相应的诱聚剂, 用于出血疾病的诊断和监控抗血小板药物的疗效。

正如试验名称所示, 本检测法使用全血样本, 这是电阻抗法对抗 LTA 的主要优势。但是, 有几项已知的因素大大影响电阻抗法的临床应用, 包括血样的红细胞比容、血小板计数、使用的抗凝剂、从血样采集到检测的时间间隔等 [34]。此项试验需要的血样小, 标本不需要离心处理, 因此不会导致血小板活化或部分血小板亚群丢失, 而且所需时间短, 上述优势使其成为一项令人感兴趣的临床检查方法, 尤其是用于监控抗血小板药物的疗效和围术期血小板功能检测 [33, 35, 36]。然而, 由于缺乏此方法在分析血小板功能障碍方面的数据, 限制了其在遗传性血小板疾病研究中的应用。

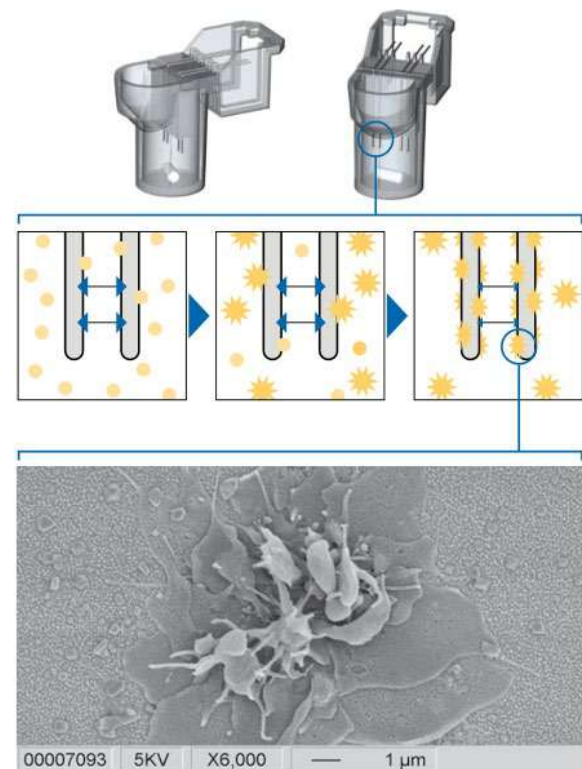


图 11. Multiplate Analyzer 检测原理 (图片来源于网络)

3. 血栓弹力图

血栓弹力图检测方法的出现被认为是凝血功能检测史上的一次革命。血栓弹力图血液粘弹性检测的方法学 (Viscoelastic coagulation assay, VCA), 1948 年由德国学者 Hartert 首次提出 [37], 通过监测血凝块形成过程中的粘弹性变化从而评估从血栓形成到溶解的整体止血功能。血栓弹力图检测有多种不同的试剂组合 (表 4), 可以单独使用, 也可以联合使用, 可以

监测用 AA 或 ADP 途径抗血小板药物的疗效,因此此项检测可用于研究血小板功能和监控抗血小板药物。血栓弹力图系统中,检测血小板功能的主要指标是血小板聚集抑制率,定义为 $[(MA_{ADP} \text{ 或 } AA - MA_{\text{纤维蛋白}}) / (MA_{\text{凝血酶}} - MA_{\text{纤维蛋白}})] \times 100\%$; 其中, MA_{AA} 是指花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 诱导的血凝块最大振幅, MA_{ADP} 是指二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导的血凝块最大振幅, $MA_{\text{纤维蛋白}}$ 是指纤维蛋白的血凝块最大振幅, $MA_{\text{凝血酶}}$ 是指凝血酶诱导的血凝块最大振幅,结果解读见 (表 5)。血栓弹力图的主要优点是直接以全血为标本,能提供一个直观的完整的血液凝集发生、发展和变化的过程,包括凝块形成的动态变化、凝块强度和纤维蛋白溶解,缺点是对中度以下的小血小板功能变化不敏感,目前临床上主要使用血栓弹力图方法用于: 1) 监测整体的凝血功能; 2) 指导个性化输血策略,尤其是大出血时的输血管理; 3) 监测肝素和抗血小板药物疗效^[38-40]。

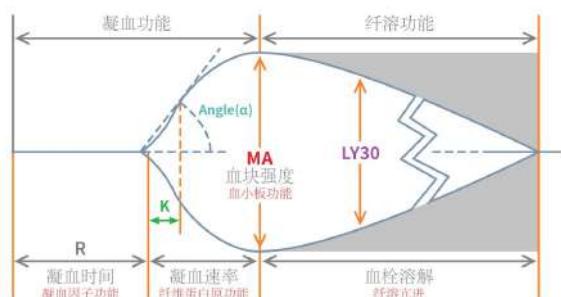


图 12. 血栓弹力图结果示意图

不可否认,血栓弹力图在临床的实际应用当中,仍存在一定的局限性,例如无法检测由血小板与血管内皮相互作用异常导致的小血小板功能障碍(如尿毒症患者);普通血栓弹力图检测激活凝血酶途径,若患者已接受抗血小板治疗,则普通血栓弹力图就无法反映患者的凝血功能;目前尚缺乏统一的参考标准,现行的正常值范围较大,给临床解读血栓弹力图结果带来了一定的困扰等问题,但这些缺陷并不妨碍它成为目前世界上最先进的凝血检测手段之一^[41, 42]。

血小板功能检测的分析前控制

鉴于以上所描述的血小板功能的诸多影响因素,建议在做血小板功能分析前应当严格进行分析前控制,包括患者准备、抗凝剂的选择、标本的运输与保存等。

1. 患者准备

多种不同的生理条件可影响血小板功能,包括昼夜节律(生物钟)、锻炼、空腹、饮用咖啡或含有咖啡因的饮料和吸烟。要进行血小板功能检测最好在以下生理状态采集血样: 空腹、禁烟和避免饮用咖啡或含有咖啡因的饮料^[43]; 检测当天避免高强度的体育锻炼; 停用影响血小板功能的药物和治疗 10 ~ 14 天(包括治疗炎症的非激素类药物、抗血小板药物、磷酸二酯酶抑制剂、精神安定剂和其他草药治疗剂)^[44]。

2. 抗凝剂要求

由于血小板功能检测项目比较多,对标本的处理也不一样,故对于哪种抗凝剂最适合通用于所有的小血小板功能检测还存在争论,但就上述我们所描述的几种检测方法而言,大多数检测均默认为枸橼酸抗凝标本 109 mM (3.2%) 或 129 mM (3.8%) 最适合^[45, 46]。应避免使用乙二胺四乙酸 (EDTA), 因为 EDTA 不可逆地分解纤维蛋白原受体糖蛋白 II b/IIIa, 从而防止纤维蛋白原结合^[47]。

3. 标本采集和储存要求

血样通过静脉穿刺获得,患者仰卧位,至少使用 21 g 针和最少的血瘀以避免血小板活化。虽然在儿科环境中,较低规格的针头可能会诱发血小板活化,有时也会使用 23 g 的针头,仔细使用可能被认为是合适的^[47]。血液取样后,轻轻转动几次试管,使血液和抗凝剂充分混合。全血标本从患者运送到实验室的方式也可能影响标本。在运输过程中,建议将试样保持在室温,并用手持管子直立。应避免使用气动管道系统,除非已验证其用途是否适合。随后的样本处理取决于检测是使用富含血小板的血浆还是全血。

表 4. 血栓弹力图的试剂类型和检测项目

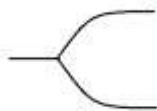
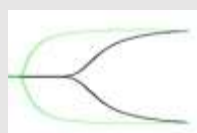
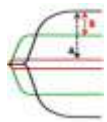
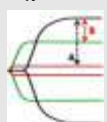
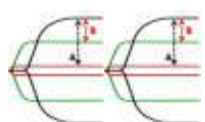
检测项目	对应试剂盒	主要作用	报告图形与参数
普通检测	活化凝血检测试剂盒	1. 评估凝血全貌，判断凝血状态； 2. 区分原发和继发纤溶亢进，早期诊断 DIC； 3. 判断促凝和抗凝等药物的疗效，例如华法令、比伐卢定、重组 VII 因子等；	R、K、Angle、MA、LY30、EPL 
快速检测	凝血激活检测试剂盒	4. 评估血栓发生概率，对血栓风险进行分层，预防手术后血栓形成； 5. 指导成分输血。	ACT、K、Angle、MA 
肝素酶对比	肝素酶包被试剂杯	1. 评估肝素、低分子肝素以及类肝素药物疗效； 2. 评估是否存在肝素抵抗或过量； 3. 评估使用鱼精蛋白后中和肝素的效果。	$R' = R (\text{普通杯}) - R (\text{肝素酶杯})$ 
血小板图试验-AA 途径	血小板聚集功能检测试剂盒——AA 激活途径	1. 测定使用阿司匹林抗血小板药物的疗效； 2. 评估使用抗血小板药物后的出血原因； 3. 服用抗血小板药物的病人手术前，手术中出血的风险评估； 4. 评估缺血和出血事件发生的风险。	$\text{AA 抑制率 (\%)} = \frac{(MA_{CK} - MA_{AA})}{(MA_{CK} - MA_A)} \times 100\%$ 
血小板图试验-ADP 途径	血小板聚集功能检测试剂盒——ADP 激活途径	1. 测定使用氯吡格雷等抗血小板药物的疗效； 2. 评估使用抗血小板药物后的出血原因； 3. 服用抗血小板药物的病人手术前，手术中出血的风险评估； 4. 评估缺血和出血事件发生的风险。	$\text{ADP 抑制率 (\%)} = \frac{(MA_{CK} - MA_{ADP})}{(MA_{CK} - MA_A)} \times 100\%$ 
血小板图试验-AA 及 ADP 途径	血小板聚集功能检测试剂盒——AA 及 ADP 激活途径	1. 测定双联抗血小板药物的疗效； 2. 评估使用抗血小板药物后的出血原因； 3. 服用抗血小板药物的病人手术前，手术中出血的风险评估； 4. 评估缺血和出血事件发生的风险。	$\text{AA 抑制率 (\%)}$ $\text{ADP 抑制率 (\%)}$ 

表 5. 血小板图检测结果解读

结果解读	AA 途径： 阿司匹林等	ADP 途径： 氯吡格雷、普拉格雷等
	AA 抑制率%	ADP 抑制率%
药物高反应性 (出血风险)	> 90%	> 90%
药效较好	50% ~ 90%	30% ~ 90%
药物低反应性 (血栓风险)	< 50%	< 30%

总结

过去 50 年真正是血小板功能检测的黄金时代，LTA 和流式细胞术的使用促进了我们对血小板生物学、生理学和病理学的理解。与此同时，通过对能有效抑制血栓形成的血小板靶点的研究，使科研人员开发出了各种抗血小板药物。简便易用的床旁检测方法使得血小板功能检查更靠近患者，而不必在专业的血液学实验室中进行。目前血小板功能检测所面临的挑战包括：1) 确定这些检测方法对于预测血栓形成和出血是否具有真正的临床指导意义；2) 针对每一个患者开发出个体化的解决方案，减轻患者的临床风险。

血小板功能检测正处于精准医学和深度表型分析等新时代的前沿，全面细致的血小板功能分析越来越多地用于多种研究领域，其中血小板生物学和生理学的研究推动了对炎症、免疫和癌症等复杂生物系统的理解。

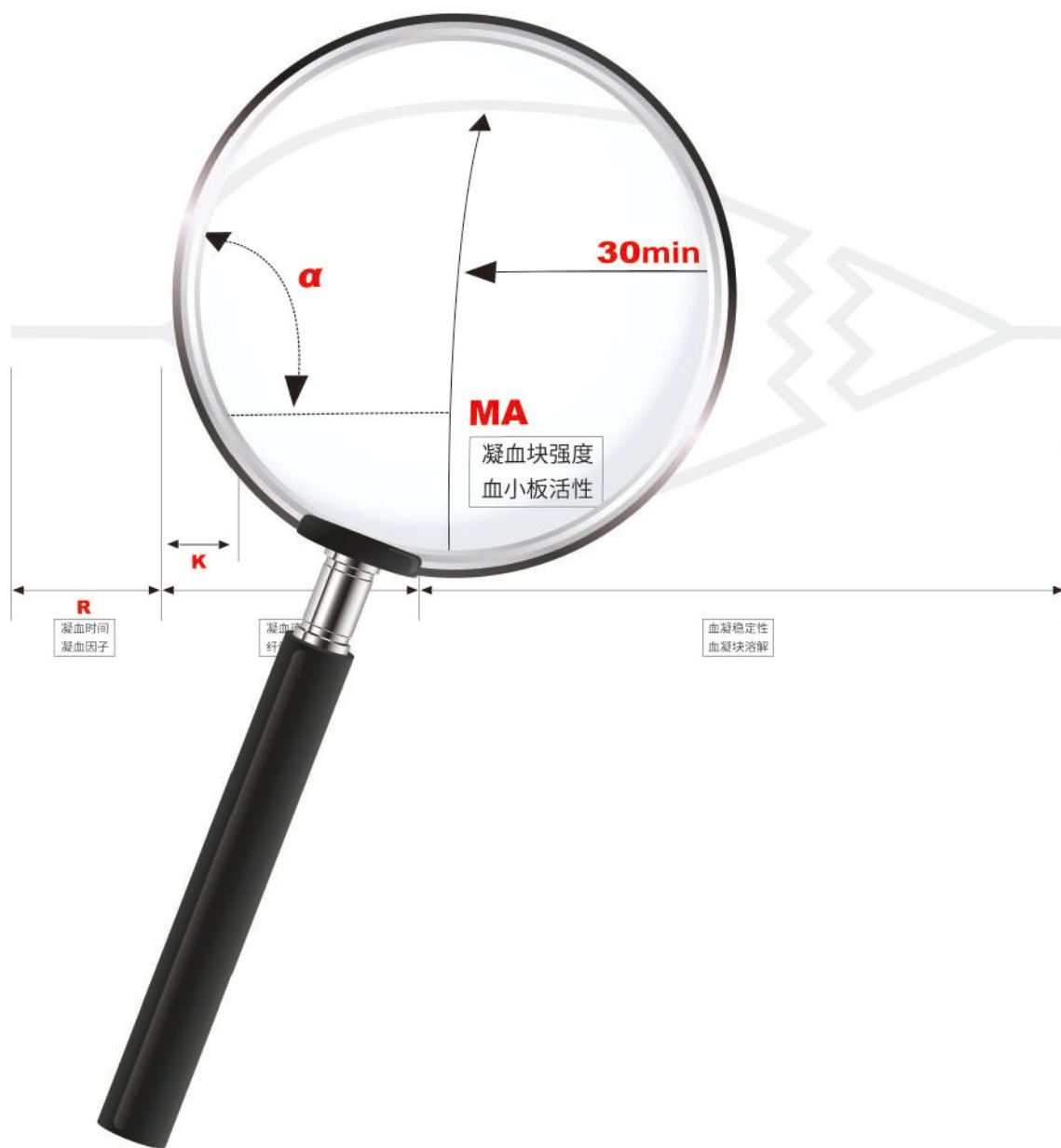
未来的血小板功能检测将从高通量深度表型分析等技术收集丰富的数据，并将这些成果转化为切实可行的疾病诊断依据和理想的药物治疗靶点，从而改进病人的预后。总之，血小板功能的检测正处于特别有趣的时期，新开发的诊断技术和仪器将可能应用于各种不同的临床部门和实验室。

参考文献

- Hoffman M, M.D., A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.*, 2001. 85: p. 968-965.
- Stephanie A. Smith, D., MS DACVIM, The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2009. 19(1): p. 3-10.
- Felix Eisinger, J.P.a.H.F.L., The Platelet Response to Tissue Injury. *Frontiers in Medicine*, 2018. 5(317): p. 1-15.
- HEEMSKERK, J.W.M., Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *Thromb Haemost.*, 2013. 11: p. 2-16.

- Gremmel T, F.A.r., Michelson AD., Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.*, 2016. 42(3): p. 191-204.
- Jones CH, B.S., Garner SF, Stephens J, de Bono B, et al., A functional genomics approach reveals novel quantitative trait loci associated with platelet signaling pathways. *Blood* 2009. 114(7): p. 1405-1416.
- Macaulay IC, C.P., Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D, Watkins NA., Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest* 2005. 115: p. 3370-3377.
- Susanne M. de Witt, R.V., Judith M.E.M. Cosemans, Insights into platelet-based control of coagulation. *Thrombosis Research*, 2014. 133(S2): p. S139-148.
- Holinstat I, M., Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.*, 2017. 36(2): p. 195-198.
- KJ, C., Platelets and pathogens. *Cell Mol Life Sci.*, 2010. 67(4): p. 495-498.
- Bernardo A, B.C., Nolasco L, Choi H, Moake JL, Dong JF., Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress. *J Thromb Haemost.*, 2005. 3(3): p. 562-570.
- RP., P., Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2000. 97(13): p. 6930-6932.
- Chapman LM, A.A., Field DJ, et al., Platelets present antigen in the context of MHC class I. *J Immunol.*, 2012. 189(2): p. 916-923.
- Boilard E, N.P., Larabee K, et al., Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science.*, 2010. 327(5965): p. 580-593.
- Watson SP, H.J., Pollitt AY., GPVI and CLEC-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost.*, 2010. 8(7): p. 1456-1467.
- Hanahan D, W.R., The hallmarks of cancer. *Cell.*, 2000. 100(1): p. 57-70.
- Hanahan D, W.R., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, 2011. 144(5): p. 646-674.

18. Gay LJ, F.-H.B., Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. , 2011. 11(2): p. 123-134.
19. Buegry, D., Wenz, F., Groden, C., and Brockmann, M. A, Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int. J. Cancer*, 2012. 130: p. 2747-2760.
20. Bambace, N.M., and Holmes, C. E, The platelet contribution to cancer progression. *J. Thromb. Haemost.*, 2011. 9: p. 237-249.
21. Borsig, L., The role of platelet activation in tumor metastasis. *Expert Rev. Anticancer Ther.* , 2008. 8: p. 1247-1255.
22. Varki, A., Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007. 110: p. 1723-1729.
23. Khorana, A.A., Francis, C. W., Culakova, E., Kuderer, N. M., and Lyman, G. H. , Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J. Thromb. Haemost.* , 2007. 5: p. 632-634.
24. Key, N.S., Khorana, A. A., Mackman, N., McCarty, O. J. T., White, G. C., Francis, C. W., et al., Thrombosis in cancer: research priorities identified by a national cancer institute/national heart, lung, and blood institute strategic working group. *Cancer Res.*, 2016. 76: p. 1-5.
25. Meikle, C.K., et al., Cancer and Thrombosis: The Platelet Perspective. *Front Cell Dev Biol*, 2016. 4: p. 147.
26. Rita Paniccia, R.P., Agatina Alessandrello Liotta, Rosanna Abbate., Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* , 2015. 11: p. 133-148.
27. Whiting, P., et al., Viscoelastic point-of-care testing to assist with the diagnosis, management and monitoring of haemostasis: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*, 2015. 19(58): p. 1-228, v-vi.
28. Benes, J., J. Zatloukal, and J. Kletecka, Viscoelastic Methods of Blood Clotting Assessment - A Multidisciplinary Review. *Front Med (Lausanne)*, 2015. 2: p. 62.
29. Fahrendorff, M., R.S. Oliveri, and P.I. Johansson, The use of viscoelastic haemostatic assays in goal-directing treatment with allogeneic blood products - A systematic review and meta-analysis. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2017. 25(1): p. 39.
30. B. LINNEMANN, J.S., H. MAN I, S. P R O C H N O W and E. L I N D H O F F - L A S T, Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007. 6: p. 677-683.
31. Michael Merolla, B., Michael A Nardi, BS, and Jeffrey S Berger, MD, MS, Centrifugation Speed Affects Light Transmission Aggregometry. *Int J Lab Hematol.* , 2012. 34(1): p. 81-85.
32. EL, H.A.G., Platelet Function Tests: Preanalytical Variables, Clinical Utility, Advantages, and Disadvantages. *Methods Mol Biol.*, 2017. 1646: p. 305-320.
33. Valarche V, D.C., Boutekedjiret T, Dreyfus M, Proulle V., Multiplate whole blood impedance aggregometry: a new tool for von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.*, 2011. 9(8): p. 1645-1647.
34. Femia EA, S.M., Lecchi A, Cattaneo M, Effect of platelet count on platelet aggregation measured with impedance aggregometry (Multiplate™ analyzer) and with light transmission aggregometry. *J Thromb Haemost*, 2013. 11(12): p. 2193-2196.
35. Flechtenmacher N, K.F., Dittmer R, et al., Clopidogrel Resistance in Neurovascular Stenting: Correlations between Light Transmission Aggregometry, VerifyNow, and the Multiplate. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2015. 36(10): p. 1953-1958.
36. George MJ, B.J., MacFarlane B., Multiplate and TEG platelet mapping in a population of severely injured trauma patients. *Transfus Med Hemother*, 2018. 28(3): p. 224-430.
37. Hartert, H., Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren(Blood coagulation studies with thrombelastography: a new evaluation technique). *Klinische Wochenschrift*, 1948. 26: p. 577-583.
38. Hunt, H., et al., Thromboelastography (TEG) and rotational thromboelastometry (ROTEM) for trauma induced coagulopathy in adult trauma patients with bleeding. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015(2): p. CD010438.
39. Conte AH, e.a., Thromboelastography (TEG) is still relevant in the 21st century as a point-of-care test for monitoring coagulation status in the cardiac surgical suite. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 2017. 21(3): p. 212-216.
40. Tapia NM, C.A., Norman M, et al., TEG-guided resuscitation is superior to standardized MTP resuscitation in massively transfused penetrating trauma patients. *J Trauma Acute Care Surg*, 2013. 74(2): p. 378-385.
41. Di Filippo A, G.C., Perretta L, et al. , Low central venous saturation predicts poor outcome in patients with brain injury after major trauma: a prospective observational study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2009. 17: p. 23-30.
42. Dickinson KJ, T.M., Homer-Vanniasinkam S. , The surgical application of point-of-care haemostasis and platelet function testing. *Br J Surg*, 2008. 95: p. 1317-1330.
43. BJ, M., The influence of diet and nutrients on platelet function. *Semin Thromb Hemost.*, 2014. 40(2): p. 214-226.
44. RE, S., Drugs that affect platelet function. *Semin Thromb Hemost.* , 2012. 38(8): p. 865-883.
45. Adcock DM, H.D., Kottke-Marchant K et al, Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma based coagulation assays and molecular hemostasis assays; Approved guideline, 5th edn.PA. CSLI document H21-A5-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CSLI), Wayne, , 2008.
46. Harrison P, M.I., Mumford A et al, Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol* 2011. 155: p. 30-44.
47. Christie DJ, A.T., Carrington LR et al, Platelet function testing by aggregometry; Approved guideline. CSLI document H58- A. Clinical and Laboratory Standards (CSLI), Wayne, PA, 2008.



阳普医疗ImproClot®血栓弹力图仪, 数据胜于雄辩!



阳普医疗ImproClot® 血栓弹力图仪



Article Abstract Collection

文献摘要

本期摘要主要介绍和比较血小板功能检测方法：光透射聚集法、电阻抗法和粘弹性检测方法。评估血小板药物对抗血小板治疗的效果和在心血管疾病的二级预防中的作用。粘弹性检测方法已在心血管外科中得到很好的应用，评估血小板输注对抗血小板药物相关脑出血（ICH）患者的术中和术后效果。

参考文献摘要翻译

1. Niklas Boknäs MD, PhD, Ankit S. Macwan PhD, Anna L. Södergren PhD, Sofia Ramström PhD. Platelet function testing at low platelet counts: When can you trust your analysis? Res Pract Thromb Haemost. 2019;3:285-290.

摘要

背景：尽管流式细胞仪通常作为检测血小板减少症的首选方法，但与光透射聚集法（LTA）和多电极聚集法（MEA）相比，低样本计数对流式细胞术血小板功能检测（FC-PFT）结果的相对影响尚未见报道。

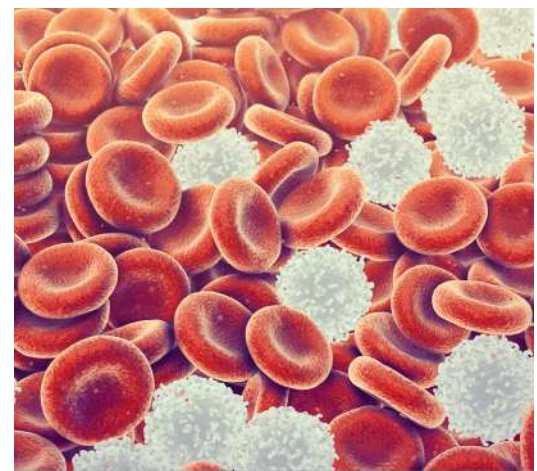
目的：使用与相同的抗凝剂和激活剂浓度比较不同样品血小板计数（10, 50, 100 和 $200 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ）对 FC-PFT, LTA 和 MEA 测量的血小板活化的影响。

方法：用两种常用的血小板激活剂（ADP [$6.5 \mu\text{mol/L}$] 和 PAR1-AP [TRAP, $32 \mu\text{mol/L}$]）激活血小板。通过将含有或不含红细胞的不同比例的富含血小板和血小板的水蛭素的血浆组合，获得指定的样品血小板计数。

结果：在 FC 中，经 PAR1-AP 刺激后，P-选择素暴露量和 PAC-1 结合量在 $10 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 时降低（分别约为 20% 和 50%），但当 ADP 作为激动剂时相对不变（ $n = 9$ ）。当样品与腺苷三磷酸双磷酸酶预孵育时，用 PAR1-AP 观察到的血小板计数依赖性效应被消除，这意味着减少的嘌呤能信号传导是主要的潜在因素（ $n = 5$ ）。无论使用何种激活剂（ $n = 7$ ），基于聚集测定的

PFT 均显示在 $50 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 下降 50%，在 $10 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 下降 80% 以上。

结论：虽然 FC-PFT 在血小板计数较低的情况下通常优于基于聚集计量的 PFTs，但仍需要仔细优化实验参数，以消除血小板计数相关的影响。

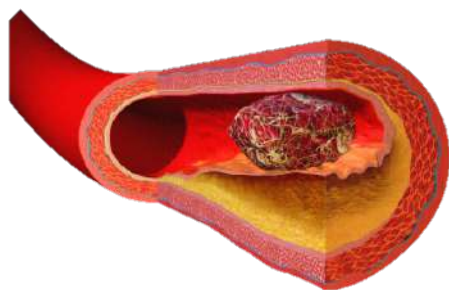


2. Frauke Swieringa PhD, Henri M.H. Spronk PhD, Johan W.M. Heemskerk PhD, Paola E.J. van der Meijden PhD. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. Res Pract Thromb Haemost. 2018;2:450-460.

摘要

血小板以多种方式与凝血系统相互作用，不仅在血栓形成

阶段，而且在形成的血栓内的特定区域。本文综述了血小板控制凝血酶生成、纤维蛋白形成和结构以及抗凝的最新概念。说明了通过血小板胶原受体（糖蛋白 VI）和凝血酶的联合信号传导如何诱导（抗）凝血因子的分泌，以及磷脂酰丝氨酸的表面暴露，从而催化凝血酶的生成。粘附复合物糖蛋白 Ib-V-IX 和整联蛋白 $\alpha IIb\beta 3$ 也促进了该促凝血小板反应。在血小板-纤维蛋白血栓的累积中，外源性的组织因子驱动的凝血途径在早期阶段占优势，而内源性的因子 XII 途径似乎在稍后的时间点促进凝血。凝血酶的早期产生已经加强血小板反应，并通过松散聚集、收缩和暴露磷脂酰丝氨酸的血小板斑块刺激血栓内异质性。活化血小板表面形成的纤维蛋白不仅支持血栓生长，还能捕获凝血酶。血栓中的纤维蛋白分布似乎依赖于局部促凝血剂触发和血流速率。临床研究支持血小板-凝血相互作用的重要性，显示联合治疗在心血管疾病的二级预防中的有益作用。



3. **Alexandros Tsoupras, Ioannis Zabetakis, Ronan Lordan. Platelet aggregometry assay for evaluating the effects of platelet agonists and antiplatelet compounds on platelet function in vitro. *MethodsX* 6 (2019) 63-70.**

摘要

血小板聚集测定法通常用于分析血小板功能，本方法描述了人血小板活化因子（PAF）、凝血酶、胶原蛋白、二磷酸腺苷（ADP）、花生四烯酸等激活剂诱导血小板聚集的人血小板富血小板血浆（PRP）和血小板贫血小板血浆（PPP）的制备过程。

该方法可用于体外评估这些激活剂的聚集作用，并评估几种生物活性抗血小板药物（天然或药理学来源的化合物）在人类 PRP 中的抗聚集作用。

这种多功能方法可用于基础和临床研究，用于评估生理

或病理条件下的血小板聚集（主要心血管危险因素），血小板激动剂和抑制剂。

该方法可用于餐后及体外干预研究中评估血小板活性。

4. **Felix Eisinger, Johannes Patzelt and Harald F Langer. The Platelet Response to Tissue Injury. *Frontiers in Medicine*, 2018, 5(317): 1-15.**

摘要

近年来，各种研究越来越多地强调了血小板在细胞止血和凝血中核心的调节作用。事实上，越来越多的证据表明，在特定条件下，血小板可作为血管系统、止血和免疫系统之间的介质。因此，它们在损伤或炎症反应后涉及组织重塑和组织重组的许多过程中是必需的。这些过程包括促进炎症过程，细菌和病毒感染期间对先天和适应性免疫应答的贡献，血管生成的调节，以及稳态组织稳态或组织分解后细胞凋亡的调节。总之，血小板对组织稳态的控制作用可能比一般认为的要大得多。本综述总结了血小板作为组织重塑网络一部分的现有知识，旨在为临床治疗提供可能的转化意义。

5. **Ashraf Fawzy, Julie A. Anderson, Nicholas J. Cowans, Courtney Crim, Robert Wise, Julie C. Yates and Nadia N. Hansel. Association of platelet count with all-cause mortality and risk of cardiovascular and respiratory morbidity in stable COPD. *Respiratory Research* (2019) 20:86-95.**

摘要

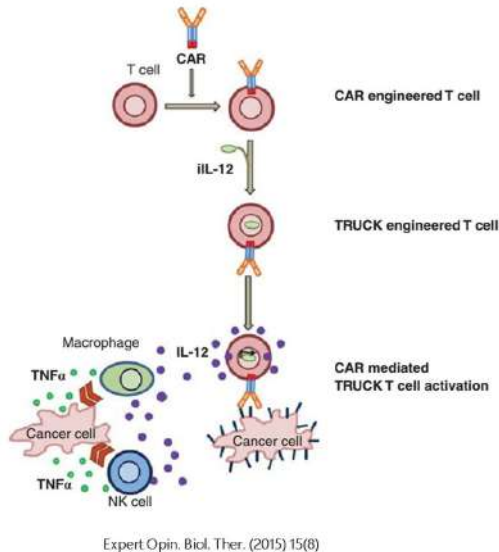
背景：血小板计数是一般人群和老年人的预后指标。COPD (AECOPD)急性加重期血小板增多与死亡率有关；然而，血小板计数与稳定期 COPD 死亡率之间的关系尚不清楚。

方法：我们对研究中 1797 例患者的子样本进行了事后继发性分析，以了解在基线抽取血样的 COPD (SUMMIT)患者的死亡率和发病率。参与者是现在或以前的吸烟者，40 ~ 80 岁，中度 COPD 和病史或心血管 (CV) 疾病风险增加。主要结果是治疗后全因死亡率。次要结果包括首次治疗中度/重度 AECOPD 和治疗后 CV 复合事件 (CV 死亡、心肌梗死、中风、不稳定型心绞痛和短暂性脑缺血发作)。多变量 Cox 比例风险模型用于研究终点与血小板计数五分位数分组、利用两项分数多项式的连续血小板计数、低、正常和高血小板计数

(< 150 、 ≥ 150 至 < 300 、 $\geq 300 \times 10^9/L$) 的相关性。

结果：患者的生命状态为 2.3 ± 0.9 年，发病终点为 1.6 ± 1.1 岁，其中 105 例 (5.8%) 死亡，651 例 (36.2%) 经历 AECOPD (159 例严重 AECOPD)，86 例 (4.8%) 经历过 CV 事件。观察到血小板计数与全因死亡率之间的 U 形关联。与血小板计数的第三个五分位数组 (Q3) 相比，最低的五分之一组 (Q1；风险比[HR]：1.73；95%置信区间 [CI]：0.93 ~ 3.23) 和最高的五分位数组增加了死亡风险 (Q5；HR：1.66；95%CI：0.89 ~ 3.10)。使用临床临界值，与正常血小板计数 (≥ 150 至 $< 300 \times 10^9/L$) 相比，血小板减少症患者 (HR：1.46；95%CI：0.81 ~ 2.64) 和高血小板患者的全因死亡风险名义上增加计数 (HR：1.66；95%CI：0.96 ~ 2.86)。与 Q3 相比，CV 事件名义上增加 Q5 (HR：1.71；95%CI：0.83 ~ 3.49) 和 Q1 (HR：1.41；95%CI：0.70 ~ 2.85)。血小板计数与 AECOPD 之间无关联。

结论：在稳定的 COPD 中，血小板计数呈现 U 形关联，3 年全因死亡风险增加，但血小板计数水平高于或低于其死亡率增加的风险无法确定。



6. Cotoia et al. Platelet indices and outcome after cardiac Arrest. BMC Emergency Medicine (2018) 18:3.

摘要

背景：血小板变量，包括血小板分布宽度 (PDW) 和平均血小板体积 (MPV)，与危重病患者的预后相关。我们

评估了心脏骤停 (CA) 后患者的这些变量。

方法：所有成人 CA 患者在 8 年内 (2006 ~ 2014) 入住重症监护病房 (ICU) 并接受目标管理治疗。我们检索了入院头 2 天所有有关 CA 特征、血小板计数、PDW 和 MPV 的数据。3 个月的不良神经结果被定义为 3 ~ 5 分的脑功能表现类别。

结果：我们纳入 384 名患者 (年龄 62 [52 ~ 75] 岁；270/384 男性)：231 名患者 (60%) 在 30 天内死亡，246 名患者 (64%) 患有不利的 3 个月神经学结果。入院时，血小板计数，PDW 和 MPV 分别为 $87 [126 \sim 261] \times 10^3$ 个细胞/ mm^3 ，17 [16.3 ~ 17.3]% 和 8.3 [7.6 ~ 9.2] μm^3 。血小板计数在前 2 天显著下降，而 PDW 和 MPV 没有显著变化。在存活者和非存活者之间或者具有不利和有利的神经学结果的患者之间，血小板计数，PDW 或 MPV 的入院时间或时间进程值之间没有显著差异。

结论：在我们的 CA 后患者队列中，PDW 和 MPV 与结果无关。



7. Hao Zhou, Li Chen, and Hongtian He. Intraoperative and postoperative effects of TEG-guided platelet transfusion on antiplatelet drug-related intracerebral hemorrhage patients. Exp Ther Med. 2019 Mar; 17(3): 2263-2267.

摘要

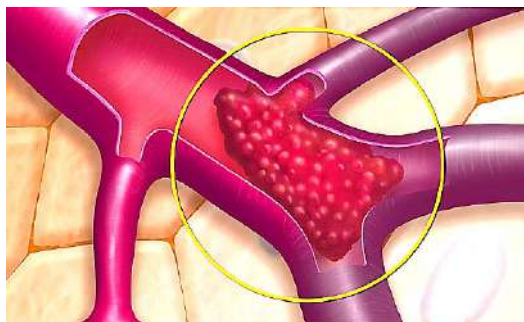
研究了血小板输注对抗血小板药物相关脑出血 (ICH) 患者的术中和术后效果。对 82 名接受抗血小板药物引起的急诊手术治疗的 ICH 患者进行了回顾性研究。其中，51 例接受血小板输注治疗的患者作为观察组，31 例未接受血小板输注的患者作为对照组。在血栓弹力图的指导下，比较观察组和对照组的术中和术后出血量，输血量 and 继发出血率。术前两组凝血常规检查结果均在正常范围内，但血栓弹力图表明血小板功能过度抑制 (血小板抑制率 $> 89\%$)。两组患者治疗后血小板数明显增加，观察组血小板数明显高于对照组 ($p < 0.05$)。

观察组术中出血量明显低于对照组。观察组输血总量明显低于对照组 ($Z = 2.681$, $p = 0.036$)，观察组术后血肿残余量明显低于对照组 ($t = 2.145$, $p = 0.035$)。观察组的引流量明显低于对照组 ($t = 2.401$, $p = 0.019$)。观察组仅 3.92%，对照组 19.35% 进行二次手术，两组间继发出血复发率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.610$, $p = 0.048$)。血栓弹力图检测指标可以更全面，准确地评估患者术前凝血功能。本研究提示术前血小板输注可以在一定程度上改善 ICH 患者术后出血，减少输血量 and 继发性出血率。

8. **Oleg V. Kim, Rustem I. Litvinov, Mark S. Alber, John W. Weisel. Quantitative structural mechanobiology of platelet-driven blood clot contraction. Nat Commun. 2017; 8: 1274.**

摘要

血凝块收缩在预防出血和血栓性疾病中起重要作用。在这里，我们揭示和量化单个血小板水平的凝块收缩的结构机制。收缩的一个关键基本步骤是血小板与纤维蛋白相连的连续伸展-收缩。与细胞沿着纤维移动的其他细胞基质系统不同，“手牵手”的纵向拉伸导致附着在血小板上的纤维缩短和弯曲，从而导致纤维扭结。当连接到多根纤维时，血小板通过横向于其纵轴拉动纤维而使纤维蛋白网络致密化。单个血小板和聚集体使用肌球蛋白收缩机制和整联蛋白介导的粘附来重塑细胞外基质，诱导纤维蛋白压缩成与活化的血小板紧密相关的成束的附聚物。血小板收缩显示的血小板驱动机制证明了细胞运动原理的重要性以及在生物学应用。



9. **Katalin Koltai, Gabor Kesmarky, Gergely Feher, Antal Tibold, Kalman Toth. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. Int J Mol Sci. 2017 Aug; 18(8): 1803.**

摘要

血小板在正常止血中起基础作用，而其遗传或获得性功能障碍涉及多种出血性疾病或血栓形成事件。目前有几种实验室方法或即时检验方法可用于临床和实验环境。这些方法描述了基于血小板聚集，血小板粘附，凝块形成期间的粘弹性，血栓素代谢的评估或某些流式细胞术的血小板功能的不同方面。血小板聚集测定法应用于不同的临床环境，作为监测对抗血小板治疗的疗效，围手术期出血风险的评估，遗传性出血性疾病的诊断或输血医学。血小板功能驱动抗血小板治疗的理论基础是基于对接受经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 的患者的几项研究结果，这些研究发现，尽管 P2Y₁₂ 抑制，但高血小板反应活性与支架血栓形成或心血管死亡等缺血性事件之间存在关联。然而，最近的大规模随机对照试验一直未能证明基于血小板功能测试的个性化抗血小板治疗的益处。

10. **Rita Paniccia, Raffaella Priora, Agatina Alessandrello Liotta, Rosanna Abbate. Platelet function tests: a comparative review. Vasc Health Risk Manag. 2015; 11: 133-148.**

摘要

在生理止血中，血小板在血管损伤上迅速聚集可以通过快速形成血小板血栓来防止出血。定性和/或定量血小板缺陷促进出血，而抗血小板治疗患者血小板的高残留反应性导致血栓栓塞并发症。血小板活化的不同阶段（粘附、形态改变、释放反应和聚集）的生物化学机制已经被很好地描述出来，然而它们还没有完全转化为实验室检测。通过流式细胞术研究血小板功能的实验室测试，例如出血时间，光透射血小板聚集，荧光检测，全血阻抗聚集测定和血小板活化，传统上用于诊断止血障碍和管理患有血小板和止血缺陷的患者，但他们的使用仍限于专业实验室。迄今为止，使用更简单易用的相关装置专用于血小板功能的即时检验 (POCT) 现已可用 [即 PFA-100, VerifyNow 系统, 多板电极聚集 (MEA)]。POCT 包含了一些新的方法，这些方法可以在关键的临床环境中使用，也可以在一般的实验室中使用，因为它们快速且易于使用，使用全血而不需要进行样本处理。事实上，这些用于评估遗传性和获得性出血疾病和/或监测抗血小板治疗的不同血小板方法正在传播，血小板功能的研究正在加强。本文综述了血小板功能试验及其方法特点和临床应用。

11. Cristina Solomon, Marco Ranucci, Gerald Hochleitner. Assessing the Methodology for Calculating Platelet Contribution to Clot Strength (Platelet Component) in Thromboelastometry and Thrombelastography. *Anesth Analg*. 2015 Oct; 121(4): 868-878.

摘要

血栓弹力图 (TEG®) 和旋转血栓弹力测定 (ROTEM®) 是研究血凝块粘弹性最常用的方法。基于 ROTEM 的出血治疗算法建议, 一旦 ROTEM 纤维蛋白试验的凝块强度得到纠正, 将血小板给予具有低 EXTEM 凝块强度的患者 [例如, 10 分钟时凝块振幅 (A10) < 40 mm]。基于 TEG 的算法通常使用低值的最大振幅 (例如, < 50 mm) 作为施用血小板的触发器, 然而, 该参数反映了各种血液成分对凝块的贡献, 包括血小板和纤维蛋白/纤维蛋白原。形成凝血强度的血小板成分可提供比全血 TEG® 或 ROTEM® 测定的凝块振幅更敏感的血小板缺乏指示。形成凝块的血小板组分来自在有和没有血小板抑制的情况下进行的 TEG®/ROTEM® 测试的结果。在本文中, 我们回顾了为什么这个计算应该基于凝块弹性 (例如, 带有 E 参数的 TEG® 和带有 CE 参数的 ROTEM®) 的基础, 而不是凝块振幅 (例如, 带有 A 参数的 TEG® 或 ROTEM®)。这是因为与凝块振幅不同, 凝块弹性反映了血凝块抵抗装置内旋转的力, 并且凝块振幅 (变量 X) 和凝块弹性 (变量 Y) 之间的关系是非线性的。X (ΔX) 的特定增量将与 Y 的不同增量 (ΔY) 相关联, 这取决于 X 的初始值。当正确计算时, 使用凝块弹性数据, 凝块的血小板成分可提供对急诊出血时血小板缺乏的有价值的见解。

12. Yan Hou, Naadiya Carrim. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *J Biomed Res*. 2015 Nov; 29(6): 437-444.

摘要

血小板是骨髓巨核细胞产生的无核细胞。虽然血小板的产生、成熟和清除机制仍未完全明了, 但在过去 1 ~ 20 年中已经取得了重大进展。在血液循环中, 血小板可在血管损伤部位迅速粘附和聚集, 形成血小板栓塞 (即第一波止血)。活化的血小板还可以提供带负电荷的富含磷脂酰丝氨酸的膜表面, 其增强基于细胞的凝血酶的产

生, 这促进血液凝固 (即第二次止血)。因此, 血小板在止血中起着重要作用。然而, 同样的止血过程也可能引起血栓形成和血管闭塞, 这是导致动脉粥样硬化病变破裂后心脏病发作和中风的最常见机制。在这篇综述中, 我们将介绍血小板在止血和血栓形成中的经典机制和新发现的途径, 包括纤维蛋白原非依赖性血小板聚集和血栓形成, 以及在经典的第一波止血之前的血浆纤维蛋白介导的止血 “蛋白质波”。此外, 我们简要讨论了血小板在炎症和动脉粥样硬化中的作用以及控制动脉粥样硬化血栓形成的潜在策略。



13. Lawrence F. Brass, Scott L. Diamond, and Timothy J. Stalker. Platelets and hemostasis: a new perspective on an old subject. *Blood Adv*. 2016 Nov 29; 1(1): 5-9.

摘要

对于对血小板生物学感兴趣的临床医生和科学家来说, 这是一个激动人心的时刻。改进的成像方法允许在动物模型中以更高的分辨率实时观察血小板的作用。扩展蛋白质组和基因数据集有助于更好地理解血小板活化。新的基因编辑方法使得用转基因动物模型测试新想法变得更简单、更快、更便宜。将系统生物学方法与计算方法相结合, 可以使人们对血小板活化有更广阔的认识, 从而有可能在硅中开发出能够在体内进行测试的思路。一个结果是有可能重新审视止血反应的主流智慧, 扩展并偶尔反驳之前的观点。

系统生物学是对复杂相互作用的研究, 其中一些属性只有在考虑多个细胞或多个途径时才能被理解。在这里, 我们将考虑两个例子, 其中改进的方法和面向系统的方法提供了对最基本的血小板功能的见解: 参与对受伤的止血反应。第一个例子考虑了在损伤部位堆积血小板的简单行为有助于通过改变血小板激活发生的环境来校准止血反应的方式。第二个例子考虑血小板内的个体信号事件如何形成一个综合网络, 其特性来自各个途径。

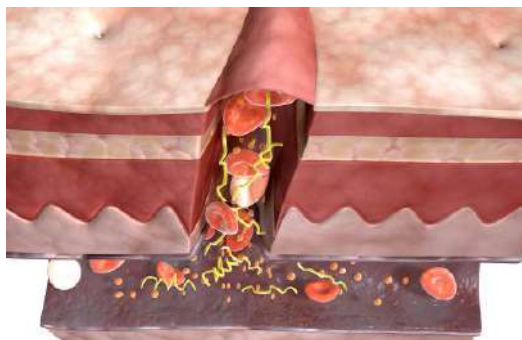
14. Agnieszka Skorko, Matthew Thomas. Research protocol for platelets in out-of-hospital cardiac arrest: an observational, case-controlled, feasibility study to assess coagulation and platelet function abnormalities with ROTEM following out-of-hospital cardiac arrest (PoHCAR). *BMJ Open*. 2017; 7(7): e015663.

摘要

介绍：在英国，院外心脏骤停（OHCA）的年发病率约为 60000 例。接受复苏的患者中不到 10% 能存活出院。对于假定心脏病因的 OHCA，最佳抗血小板治疗目前尚不清楚。以往的研究表明，心脏骤停后存在促凝状态，这种状态可能导致血栓的形成，并导致不良的预后。然而，抗血小板治疗的施用需要与这些个体面临的出血风险增加相平衡。

方法和分析：本观察性可行性研究将招募 30 名实现自发性循环后 OHCA 返回的个体，在 6 个月期间进入单个三级中心，并符合 Utstein 队列标准（见心脏骤停、VF 或无脉搏 VT 和可能导致骤停的心脏原因）。经皮冠状动脉介入治疗（PCI）和 PCI 后 12 小时、24 小时和 48 小时，将进行旋转血栓弹性测量和血小板功能评估。作为对照，30 名有 ST 段抬高心肌梗死并接受原发性 PCI 的患者将进行同样的血液取样。在研究完成后，将保留血浆样品并进行批次测试，检测蛋白 C、蛋白 S，凝血酶-抗凝血酶复合物，凝血酶，抗凝血酶，纤溶酶原激活物抑制剂-1，纤溶酶-抗纤溶酶复合物，二聚体，血小板因子-4 的水平，P-选择素，E-选择素和凝血酶原片段 1 和 2，并对 30 天的并发症进行随访。

道德和传播：该研究已获得 Wales REC 7 研究伦理委员会的批准。结果将提交给同行评审的医学期刊和适当的国家和国际会议。结果将通过我们的患者和公共利益团体在当地传播。



15. Mercy Halleluyah Periyah, Ahmad Sukari Halim, and Arman Zaharil Mat Saad. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2017 Oct 1; 11(4): 319-327.

摘要

血液是珍贵的，因为它是健康的基本必需品；我们的身体需要稳定的氧气供应，并通过血液来输送，以到达数十亿个组织和细胞。造血是产生所有血统血细胞的过程。然而，血小板是由称为巨核细胞的巨大骨髓细胞产生的最小的血液成分，它们在血栓形成和止血中起着基础作用。血小板通过粘附、活化和聚集来发挥其止血能力，这些作用在组织损伤时触发，并且这些作用刺激凝血因子和其他介质来实现止血。此外，这些协调的一系列事件是伤口愈合阶段的重要生物过程。本综述的目的是总结并突出血小板控制的实现止血的重要途径。此外，本文还介绍了血小板的作用机制，包括粘附、活化、聚集和凝血，以及有助于止血和伤口愈合的因素。

16. Tomas Vymazal. Massive hemorrhage management—a best evidence topic report. *Ther Clin Risk Manag*. 2015; 11: 1107-1111.

摘要

介绍：大出血仍然是潜在的可预防性死亡的主要原因。更好的出血控制可以提高 10% ~ 20% 的患者存活率。为了使急性创伤性凝血病发生率最小化，已经制定了相关的输血干预概念。这些干预措施仍然没有标准化，并且在医疗中心之间有所不同。

材料和方法：在文献检索的基础上，利用免费关键词和医学主题标题（Mesh）索引，分析了 2000 年以来在 Medline、PubMed 和 Google Scholar 等期刊上发表的有关大出血、成分治疗、新鲜全血和纤维蛋白原的文章，其影响因子 > 1.000。这些文献证据包括实验室试验和输血干预措施/粘弹性试验与标准实验室试验、成分治疗对患者预后的影响、新鲜全血对患者结局的影响以及纤维蛋白原在严重出血中的作用。对所获得的信息进行了比较、评价，并重点介绍了一种充分的、基于个人的大出血管理方法。

结果：粘弹性全血检测在凝血病的识别和严重出血患者适当治疗的指导决策方面优于标准凝血检测。以 1:1:1:1 的比例替换血浆、红细胞、血小板和纤维蛋白

原似乎是全血丢失的最佳替代物。没有证据表明冷沉淀能改善严重出血患者的预后。目前的文献提倡输注温暖新鲜的全血，这在某些临床情况下似乎优于成分疗法。一些作者建议，纤维蛋白原和其他凝血因子应根据血液凝块的粘弹性属性进行管理。

结论：这份证据最充分的主题报告提供了关于大出血管理的全面信息。



17. Anne Wikkelso, Jørn Wetterslev, Ann Merete Møller, and Arash Afshari. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. Cochrane Database Syst Rev. 2016 Aug; 2016(8): CD007871.

摘要

背景：严重出血和凝血病是严重的临床病症，与高死亡率有关。血栓弹力图（TEG）和旋转血栓弹力测定法（ROTEM）越来越多地用于指导输血策略，但他们的作用仍存在争议。此评论于 2011 年首次发布，2016 年 1 月更新。

目标：我们评估了血栓弹力图（TEG）或旋转血栓弹力检测（ROTEM）引导输血在成人和儿童出血中的益处和危害。我们观察了各种结果，如总死亡率和出血事件，进行了分组和敏感性分析，检查了偏倚的作用，并应用试验序列分析（TSA）来检查迄今收集到的证据的数量。

检索方法：在本次更新的综述中，我们从以下电子数据库中确定了随机对照试验（RCT）：Cochrane 对照试验中心登记册（CENTRAL；2016，第 1 期）；MEDLINE；文摘；科学引文索引扩大；国际科学网；CINAHL；紫丁香；和中国生物医学文献数据库（截至

2016 年 1 月 5 日）。我们联系了试验作者，之前评论的作者以及该领域的制造商。原始搜索于 2010 年 10 月进行。

选择标准：我们纳入了所有随机对照试验，无论盲法或语言如何，将 TEG 或 ROTEM 指导下的输血与临床判断指导下的输血、标准实验室试验指导下的输血或两者结合进行比较。我们还包括与标准实验室测试或其他器械联合使用的包括 TEG 或 ROTEM 在内的介入算法。主要分析包括 TEG 或 ROTEM 与任何比较器的试验。

数据收集和分析：两位评论作者独立提取数据；我们通过讨论解决了任何分歧。我们以 95%置信区间（CI）的风险比（RR）呈现了干预效果对二分法结果的汇总估计。由于数据不对称，没有为连续的结果数据提供元分析。我们的主要结果指标是全因死亡率。我们进行了亚组和敏感性分析，以评估基于 TEG 或 ROTEM 引导算法的凝血病的存在，以及成人和儿童对各种临床和生理结果的影响。我们通过评估试验方法的组成部分来评估偏差的风险，通过 TSA 评估随机错误的风险。

主要结果：我们在这篇更新的综述中总共包含了 17 项研究（1493 名参与者），其中 8 项为新的研究（617 名参与者）。我们共有 15 项试验为荟萃分析提供了数据。我们认为只有两项试验具有较低的偏倚风险。大多数研究包括接受心脏手术的参与者。我们发现了 6 项正在进行的试验，但无法从中检索到任何数据。与采用任何方法引导的输血相比，TEG 或 ROTEM 似乎降低了总体死亡率 [7.4% vs. 3.9%；风险比（RR）0.52，95%CI 0.28 ~ 0.95；I² = 0%，8 项研究，717 名参与者，低质量证据]，但仅有 8 项试验提供了死亡率数据，2 项试验为零事件试验。我们的分析显示，TEG 或 ROTEM 与所有参与者在混合红细胞（PRBC）（RR 0.86，95%CI 0.79 ~ 0.94；I² = 0%，10 项研究，832 名参与者，低证据质量）、新鲜冷冻血浆（FFP）（RR 0.57，95%CI 0.33 ~ 0.96；I² = 86%，8 项研究，761 名参与者，低证据质量）、血小板（RR 0.73，95%CI 0.60 ~ 0.88，I² = 0%，10 项研究，832 名参与者，低证据质量）以及用 FFP 或血小板进行整体止血输血的比例（低质量的证据）相比，具有统计学意义。Meta 分析还显示，透析依赖性肾功能衰竭的参与者较少。我们发现需要手术再干预的比例（RR 0.75，95%CI 0.50 ~ 1.10；I² = 0%，9 项研究，887 名参与者，证据质量低）和过度出血事件或大量输血（RR 0.38，95%CI 0.38 ~ 1.77；I² = 34%，2 项研究，280 名参与者，证据质量低）没有差异。计划的亚

组分析未显示任何显著差异。根据研究中存在的高偏差风险、较大的异质性、低事件数、不精确性和间接性，我们将证据质量评定为低质量。TSA 指出，到目前为止，在死亡率方面，仅达到所需信息大小的 54%，同时可能有证据表明输血结果有益。总的来说，评估结果与 TEG 或 ROTEM 指导下出血患者输血的益处一致。

作者的结论：越来越多的证据表明，应用 TEG 或 ROTEM 引导的输血策略可以减少对血液制品的需求，但会提高出血患者的发病率。然而，这些结果主要基于选择性心脏手术（包括心肺转流）的试验，证据水平仍然很低。需要进一步评估急性环境下 TEG 或 ROTEM 引导的输血以及低偏倚风险研究中的其他患者类别。

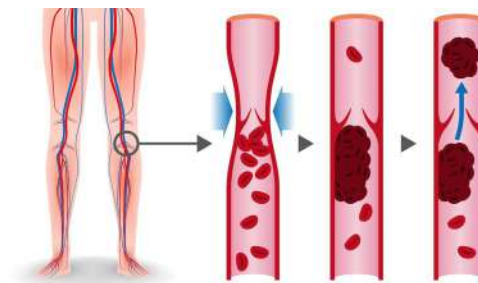


18. Kazuhiro Takahashi, Shunji Nagai. **Thrombocytopenia after liver transplantation: Should we care?** *World J Gastroenterol.* 2018 Apr 7; 24(13): 1386-1397.

摘要

短暂性血小板减少是肝移植（LT）后的常见现象。肝移植后，血小板计数下降，并在术后第 3 ~ 5 天达到最低点，血小板计数平均下降 60%；血小板计数在 LT 后大约两周恢复到术前水平。推测可能存在的机制包括血液稀释、血小板生成减少、整合增加、药物治疗、感染、血栓形成或这些过程的组合。然而，确切的机制仍不清楚。近年来，血小板在肝移植中的作用得到了强调，除止血和血栓形成外，血小板的作用也受到了特别关注。以前的研究表明，围手术期血小板减少症会导致移植体再生不良，增加术后发病率，恶化移植体，降低肝移植后患者的短期和长期存活率。增加围手术期血小板计数的血小板治疗，如血小板生成素、血小板生成素受体激动剂、血小板输注、脾切除术和静脉注射免疫球蛋白治疗，可能有改善移植体存活的潜力，但缺乏临床试验。

进一步的研究是有必要的，以检测血小板减少是否是移植体功能不良和术后并发症的直接原因或结果，并确定谁需要血小板治疗，以防止术后并发症，从而改善移植后的结果。



19. Donat R. Spahn, Bertil Bouillon. **The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fifth edition.** *Crit Care.* 2019; 23: 98.

摘要

背景：严重创伤继续给世界各地的医疗保健系统带来挑战，创伤后出血仍然是受伤患者中潜在的可预防性死亡的主要原因。本文件旨在为创伤后大出血和凝血病的管理提供指导，并鼓励根据个人机构环境和资源调整本文所述的指导原则。

方法：泛欧创伤高级出血护理多学科工作组成立于 2004 年，目前的作者小组包括六个相关的欧洲专业协会的代表。该小组采用一种结构化的、基于证据的共识方法来解决科学问题，这些问题是每项建议的基础和支持理由。专家意见和当前的临床实践也被考虑在内，特别是在没有或不能进行随机临床试验的领域。根据自上一版以来出现的科学证据和观察到的临床实践变化，对现有建议进行了重新审查和修订。制定了新的建议，以反映当前的临床问题和产生新研究数据的领域。

结果：我们对创伤后凝血病病理生理学理解的进步支持了更好的管理策略，包括早期个体化目标导向治疗改善严重损伤患者预后的证据。当前指南的总体组织设计旨在以大致的时间顺序反映患者路径上的临床决策过程。建议被分组在关键决策点的基本原理后面，关键决策点是面向患者或问题的，而不是与特定的治疗模式相关的。虽然这些建议为大出血和凝血病的诊断和治疗提供了指导，但新出现的证据支持作者小组的观点，即通过教育、建立和坚持本地临床管理算法可以实现最大的结果改善。

结论：多学科方法和坚持循证指南是改善患者预后的关键。如果纳入当地实践，这些临床实践指南有可能确保欧洲内外的统一护理标准，并为严重出血创伤患者提供更好的结果。

20. Mathilde Fahrendorff, Roberto S. Oliveri, and Pär I. Johansson. The use of viscoelastic haemostatic assays in goal-directing treatment with allogeneic blood products—A systematic review and meta-analysis. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2017; 25: 39.

摘要

背景：在许多医疗和外科环境中都会遇到严重出血患者的管理。对这些患者来说，常见的高风险是由于凝血障碍引起失血而导致死亡。本荟萃分析的目的是系统地回顾和评估随机对照试验（RCTs），这些试验的对象是出血并急需输血的患者，以评估粘弹性止血试验（VHA）指导对出血，输血需求和死亡率的影响。

方法：对于 PubMed 和 Embase 进行过的随机对照试验，1) 根据 VHA [血栓弹性图（TEG）或旋转血栓弹性测定（ROTEM）] 算法指导（干预组）输血或临床医生的判断和/或基于传统凝血检测对患者进行输血（对照组）；2) 具有充分出血和/或输血和/或死亡率的报告。从每个试验中提取出血、输血和死亡率的数据，并纳入荟萃分析。

结果：包括 15 个随机对照试验（n = 1238 例患者）。九项试验涉及心胸患者，一项试验涉及肝移植，一项试验涉及烧伤创面的外科切除，一项试验涉及创伤，一项试验针对肝硬化患者，一项试验在接受脊柱侧凸手术的患者中进行，还有一项试验对出现出血的产后女性进行随机治疗。在 VHA 指导组中，输注红细胞（RBC）、新鲜冰冻血浆（FFP）和出血量显著减少，而血小板输注需求和死亡率则无显著差异。



21. Eduardo Gonzalez, MD, Ernest E. Moore, MD, et al. Goal-directed Hemostatic Resuscitation of Trauma-induced Coagulopathy. *Ann Surg.* 2016 Jun; 263(6): 1051-1059.

摘要

背景：大量输血方案（MTPs）已成为治疗出血性创伤患者的标准治疗方案，但指导这些方案的策略却千差万别。我们进行了一项实用的随机临床试验（RCT），以验证以下假设：与传统凝血试验（CCA）指导的 MTP 相比，粘弹性试验血栓弹力图（TEG）指导的 MTP 可提高患者生存率。

方法：这项随机对照试验从符合 MTP 启动标准的一级创伤中心招收患者。MTP 启动后，患者被随机分为两组：一组由 TEG 指导的 MTP 目标治疗，另一组由 CCA（即国际标准化比值、纤维蛋白原、血小板计数）治疗。主要结果是 28 天存活率。

结果：111 例患者被纳入意向治疗分析（TEG=56，CCA=55）。TEG 组的生存率明显高于 CCA 组（log-rank $p = 0.032$, Wilcoxon $p = 0.027$ ）；CCA 组 20 例死亡（36.4%），而 TEG 组有 11 例死亡（19.6%）（ $p = 0.049$ ）。大多数患者死亡发生在抵达医院后的前 6 小时内（21.8% CCA 组 vs. 7.1% TEG 组）（ $p = 0.032$ ）。CCA 患者的红细胞单位数量与 TEG 患者相似 [CCA: 5.0 (2 ~ 11), TEG: 4.5 (2 ~ 8)]（ $p = 0.317$ ），但血浆单位更多 [CCA: 2.0 (0 ~ 4), TEG: 0.0 (0 ~ 3)]（ $p = 0.022$ ），并且在复苏的前 2 小时里，血小板单位更多 [CCA: 0.0 (0 ~ 1), TEG: 0.0 (0 ~ 0)]（ $p = 0.041$ ）。

结论：与 CCA 指导的 MTP 相比，使用目标导向、TEG 指导的 MTP 复苏严重创伤患者可提高生存率，并且在复苏早期使用较少的血浆和血小板输注。

22. Laursen TH, Meyer MAS, Meyer ASP, Gaarder T. Thrombelastography early amplitudes in bleeding and coagulopathic trauma patients: Results from a multicenter study. *J Trauma Acute Care Surg.* 2018 Feb;84(2):334-341.

摘要

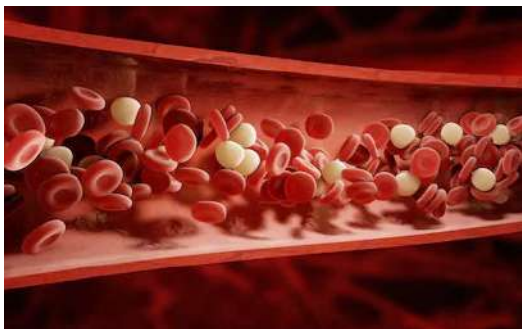
背景：粘弹性止血试验，血栓弹力图（TEG）和旋转血栓弹性测定（ROTEM）的早期振幅快速地提供了结

果，这对出血患者的复苏至关重要。本研究调查了一个大型多中心研究，在三个北欧一级创伤中心住院的中度至重度创伤患者中，TEG 早期振幅与标准 TEG 变量之间的关系。

方法：来自伦敦、英国、哥本哈根、丹麦和挪威奥斯陆的 404 名临床怀疑有严重损伤的创伤患者的前瞻性观察研究。在到达时记录生化和临床数据，包括结果和 TEG 参数。提取高岭土 TEG、快速 TEG 和功能纤维蛋白原曲线，记录早期振幅 A5 和 A10（5 和 10 分钟时的振幅）。根据 INR 为 1.2、小于或大于 1.2，以及输血需求（12 小时内未输血，1 ~ 9 个红细胞单位和 ≥ 10 个红细胞单位）对患者进行分层。

结果：总共包括 404 名患者，损伤严重程度评分中位数为 13 分。在所有研究的分析中，A5/A10 和最大振幅之间有很强的正相关。除 rTEG 最大振幅和 kTEG 最大振幅外，所有 TEG 值均与输血患者的死亡率显著相关。与高岭土 TEG 相比，快速 TEG 和功能纤维蛋白原从开始测定到 A5 和 A10 的时间最短。与快速 TEG 最大振幅相比，快速 TEG A5 减少了超过 50% 的时间。

结论：我们发现，在伴有凝血障碍和大量输血需求的创伤患者中，TEG 早期振幅 A5/A10 与快速 TEG、高岭土 TEG 和功能纤维蛋白原的最大振幅之间有很强的相关性。引入早期振幅可缩短凝血障碍的诊断时间，可用于创伤患者的 TEG 监测。进一步的随机对照试验评估 TEG 在指导止血复苏中的作用是有必要的。



23. Matthias Hartmann, Cynthia Szalai, and Fuat H Saner. Hemostasis in liver transplantation: Pathophysiology, monitoring, and treatment. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 28; 22(4): 1541-1550.

摘要

最新发现，晚期肝病患者的病理生理和止血监测对肝移

植过程中的凝血管理具有重要影响。越来越多的证据表明，在肝硬化患者中经常观察到的凝血因子和血小板计数的变化不能解释为弥散性出血风险的可靠指标。相反，对止血的不同看法导致了再平衡凝血系统的概念：虽然认识到肝硬化中促凝血因子减少很重要，但是肝脏中产生的抗凝血因子和纤维蛋白溶解蛋白的合成很明显也减少了。同样，血小板计数的减少可能被高度活跃的 von Willebrand 因子多聚体引起的血小板聚集性增加所抵消。因此，凝血系统需要重新平衡。虽然在正常的“无应激”条件下很少观察到弥散性出血，但当补偿机制失效时，弥散性出血或血栓形成都可能发生。虽然大多数肝移植患者患有严重的肝硬化，但肝功能因此可以保留促凝血和抗凝血因子的产生，特别是在胆汁淤积性肝病中。在肝移植过程中，止血系统会发生深刻的变化。手术出血可导致弥漫性出血，因为凝血因子和血小板已经减少。与创伤诱导的凝血病相比，缺血和组织创伤可导致止血的变化。从移植器官的再灌注开始通常有另一个常见的干扰是高纤维蛋白溶解，它最终会促使纤维蛋白原的完全消耗和糖萼脱落引起内源性肝素化。此外，肝移植中的血栓事件并不少见，并会因此增加死亡率。除了传统的实验室方法外，肝移植中常用床旁凝血监测（如：血栓弹力图、血栓弹力测定）来快速诊断纤维蛋白原和血小板计数的下降以及高纤维蛋白溶解，并指导血液制品、因子浓缩物和抗纤维蛋白溶解剂的治疗。还有证据表明，使用基于床旁凝血监测的结果，可以减少血液制品使用，减少失血，并最终降低死亡率。值得注意的是，在床旁监测抗凝血途径和血栓形成风险是不可能的，因此建议谨慎和限制性地使用血液制品。

24. Liang Shen, Sheida Tabaie, and Natalia Ivascu. Viscoelastic testing inside and beyond the operating room. *J Thorac Dis.* 2017 Apr; 9(Suppl 4): S299-S308.

摘要

出血是增加围手术期发病率和死亡率的主要因素。目前诊断凝血障碍的方法有很多局限性，包括实验时间长，缺乏凝血级联的具体异常信息，缺乏体内适用性，缺乏指导输血的能力。粘弹性试验为许多此类问题提供了一种有前途的解决方案。最受研究的两个系统，血栓弹力图（TEG）和旋转血栓弹力测定（ROTEM），提供了血凝块从起始，形成到溶解的信息，并用相应图形和数字表示。在系统回顾粘弹性试验的临床效益时，分析的大多数试验是在心脏手术患者中进行的。文献综述表

明，在以粘弹性试验而非临床判断或常规实验室试验为指导的输注患者中，红细胞悬液（pRBC）、血浆和血小板的输注均减少。粘弹性试验组的死亡率似乎较低，尽管手术再干预率和大量输血率没有差异。成本效益研究似乎也有利于粘弹性测试。粘弹性测试也在其他临床环境下的小规模地进行了研究，如败血症、产科出血、遗传性出血障碍、围手术期血栓栓塞风险评估以及机械循环支持系统或直接口服抗凝剂（DOACs）。虽然结果很有趣，但迄今为止还没有进行过系统的、更大的试验。粘弹性测试仍然是一种相对新颖的评估凝血状态的方法，其应用的证据似乎有利于减少血液制品的输注，尤其是心脏手术患者。



25. Mia-Jeanne van Rooy, Wiebren Duim, Rene Ehlers, Antoinette V. Buys, and Ethersia Pretorius. Platelet hyperactivity and fibrin clot structure in transient ischemic attack individuals in the presence of metabolic syndrome: a microscopy and thromboelastography® study. *Cardiovasc Diabetol.* 2015; 14: 86.

摘要

背景：中风通常在短暂性脑缺血发作（TIA）之前发生。短暂性脑缺血发作通常与代谢综合征（引起慢性炎症）有关，导致促炎和促凝血环境。本研究的目的是确定在存在代谢综合征的短暂性脑缺血发作患者与健康人相比，血小板和纤维蛋白网络形态或凝血特征是否发生改变。

材料和方法：这项研究由 40 名自愿者组成。20 名患者在过去 48 小时内发生过短暂性脑缺血发作，至少有 2 个代谢综合征危险因素，20 名健康且年龄匹配作为对照组。扫描电子显微镜和原子力显微镜用于研究血小板和纤维蛋白形态，原子力显微镜用于研究血小板和纤维蛋白纤维弹性，血栓弹力图用于研究凝血功能。对两组进行统计学分析比较。在所有情况下， p 值小于 0.05 被认为

为具有统计学意义。

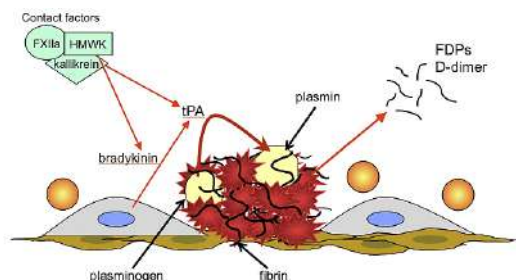
结果：对照组血小板呈球形，仅存在少量伪足，短暂性脑缺血发作个体血小板呈大量伪足并扩散，提示活化，血小板聚集也存在。健康个体的纤维蛋白网由粗纤维和细纤维组成，形成有组织的纤维网络。短暂性脑缺血发作个体的纤维蛋白网组织较少，纤维张力较小。与健康对照组相比，TIA 组纤维蛋白纤维厚度显著增加（ $p < 0.001$ ）。较粗的纤维形成具有较厚的纤维蛋白纤维团的不规则网络。实验组血小板和纤维蛋白纤维弹性显著降低（ p 值分别为 0.0042 和 0.0007）。患病个体的止血情况与健康对照组无显著差异（ $p > 0.05$ ），表明凝血级联功能正常。

结论：研究表明，病理性血栓形成不是由凝血级联的改变引起的，而是由血小板的过早激活（由于慢性炎症）引起的，进而导致纤维蛋白形成的改变。

26. C. Longstaff. Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost.* 2018 Apr; 16(4): 652-662.

摘要

检测纤维蛋白溶解方法的发展和标准化进程比凝血试验进展缓慢，目前仍缺乏常规的纤维蛋白溶解高通量筛选试验。在实验室研究中，有多种方法可用于了解纤维蛋白溶解的调节及其对止血平衡的作用。正常血液中的纤维蛋白溶解缓慢。出于实际目的，可以将纤溶酶原激活剂添加到凝固血浆中，或者制备用于减少内源性抑制剂的球蛋白，但是这些操作使得结果复杂化。鉴定“纤维蛋白溶解缺陷”的观察性研究得出结论，过量的纤维蛋白溶解抑制剂、纤溶酶原激活物抑制剂 1（PAI-1）或凝血酶激活纤维蛋白溶解抑制剂（TAFI）、酶原或活性酶可能会增加血栓形成的风险。然而，结果并不总是一致的，这些抑制剂以及纤维蛋白降解产物（D-二聚体）的测量都存在充分标准化的问题。很少有方法可以用来研究流动或全血中的纤维蛋白溶解，但是粘弹性方法（VMs）如 ROTEM 和 TEG 确实可以研究细胞的贡献，尤其是血小板。VMs 临床上用于诊断与高死亡率相关纤溶亢进。关于 VMs 作为一种床旁监测方法的有效性，特别是在创伤中，存在着一个争论。尽管许多纤维蛋白溶解方法存在困难，但纤维蛋白溶解系统的研究正在取得进展，与止血蛋白的相互作用也越来越广泛，我们将来会有更完整的模型，更好的诊断方法和治疗方法。



27. Thomas Kander, Josef Dankiewicz, Hans Friberg, and Ulf Schött. Platelet aggregation and clot formation in comatose survivors of cardiac arrest treated with induced hypothermia and dual platelet inhibition with aspirin and ticagrelor; a prospective observational study. *Crit Care*. 2014; 18(5): 495.

摘要

介绍：我们对用轻度诱导低温治疗的心脏骤停幸存者进行了一项前瞻性观察研究，评估了低温和常温下的不同血小板功能检查。我们还研究了胃排空和血管扩张剂刺激的磷蛋白（VASP）之间的关系。

方法：根据是否给予口服替格瑞洛和阿司匹林双重血小板抑制，将院外心脏骤停的昏迷幸存者分为两组。在达到目标温度（33°C）后 12 ~ 24 小时收集第一份血液样品（T1），并与在每组中达到常温（37°C）（T2）后 12 ~ 28 小时收集的血液样品进行比较。所有样品均通过 Sonoclot 粘弹性，基于流式细胞术的 VASP 和多电极聚集测定法，Multiplate® 进行分析；二磷酸腺苷（ADP）、胶原（COL），凝血酶受体激动剂肽（TRAP）和花生四烯酸（ASPI）。Sonoclot 和 Multiplate® 仪器设置在体内温度下。测量鼻胃管的胃液分泌，以评估每次口服抗血小板药物的吸收。用 Wilcoxon 配对有符号检验计算各组间 T1 和 T2 的差异。显著性水平设为 $p < 0.01$ 。

结果：总共包括 23 名患者。在具有双重血小板抑制的患者中（ $n = 14$ ），Multiplate® 分析显示 ADP 刺激的血小板没有变化。与 T1 相比，T2 的 COL，TRAP 和 ASPI 聚集率更高。Sonoclot 分析显示，激活的凝血时间（ACT）没有变化，但 T2 时的凝块率（CR）和血小板功能（PF）均高于 T1。VASP 从 53 ± 28 （T1）降至 24 ± 22 （T2），（ $p < 0.001$ ）。T1 前吸入的胃液分泌量与 VASP（T1）相关， $r = 0.81$ （ $p < 0.001$ ）。在没有血小板抑制的患者中（ $n = 9$ ），T1 和 T2 在双重血小板抑制

的患者中有相似的变化，而 VASP 没有变化。

结论：我们已经证实，在接受低温治疗的心脏骤停患者中，血小板聚集和血栓形成随时间增加。在口服双重血小板抑制的患者中，替格瑞洛的作用被延迟，可能是由于胃排空缓慢。

28. Mark Walsh, Stephanie Fritz, Daniel Hake, et al. Targeted Thromboelastographic (TEG) Blood Component and Pharmacologic Hemostatic Therapy in Traumatic and Acquired Coagulopathy. *Curr Drug Targets*. 2016 Jun; 17(8): 954-970.

摘要

创伤诱导的凝血病（TIC）是最近描述的一种疾病，一般是通过常规凝血试验（CCTs）诊断，例如凝血酶原时间/国际标准化比率（PT/INR），活化部分凝血酶原时间（APTT），血小板计数，和纤维蛋白原水平。这些 CCTs 的敏感性和特异性不同，使得创伤凝血研究人员和临床医师使用粘弹性测试（VET），如血栓弹力图（TEG），以目标导向的方式为这些创伤提供血栓弹性成像，指导进行止血和辅助治疗（TTHAT）。该综述描述了 VETs（特别是 TEG）在创伤和获得性非创伤诱导的凝血病中提供 TTHAT 的效益。



29. Nikolaos Spinthakis, MBBS, Mohamed Farag, MSc, et al. More, More, More: Reducing Thrombosis in Acute Coronary Syndromes Beyond Dual Antiplatelet Therapy-Current Data and Future Directions. *J Am Heart Assoc*. 2018 Feb; 7(3): e007754.

摘要

急性冠状动脉综合征（ACS）的发病机制常见于动脉血栓的形成，这是血小板激活和凝血级联触发的结果。为了降低未来血栓事件的风险，ACS 患者使用双抗血小板疗法（DAPT）进行治疗，即阿司匹林与 P2Y₁₂ 抑制剂，如氯吡格雷、替格瑞洛或普拉格雷。尽管采用 DAPT，但约 10% 的 ACS 患者在随后的 30 天内反复出现重大心血管不良事件。在本次综述中，我们概述了迄今为止的研究，以及旨在将抗血栓药物更有效地组合治疗 ACS 患者的研究。我们选择将审查限制在没有心房颤动的 ACS 患者，因为那些心房颤动患者有明确的指示联合治疗，包括口服抗凝，我们认为应该作为一个单独的对待队列。在本文中，我们将讨论现有临床试验数据的限制和未来方向，并就如何改变实践以降低风险最大的人群冠状动脉血栓形成的风险提出建议，同时对出血的影响最小。



30. Timothy H Pohlman, Alison M Fecher, and Cecivon Arreola-Garcia. Optimizing transfusion strategies in damage control resuscitation: current insights. *J Blood Med.* 2018; 9: 117-133.

摘要

从临床和实验室对损伤引起的特定凝血缺陷的研究，损伤控制复苏（DCR）成为出血性休克最有效的管理策略。持续大量失血的创伤患者的 DCR 包括 1) 出血控制；2) 宽松的低血压；3) 创伤引起的凝血病的预防和矫正，这里统称为创伤急性凝血病（ACOT）。患有 ACOT 的创伤患者具有较高的输血需求，最终可能需要静脉输血，并且有更高的出血风险。与创伤相关的止血系统的独特损伤包括获得性定量和定性血小板缺陷、低凝血和高可凝状态，以及纤溶系统调节失调引起纤溶亢

进的现象。此外，ACOT 是全身宿主防御调节障碍综合征的组成部分，具有多种表型症状，可与其他急性全身生理疾病（如败血症、心肌梗死和心脏骤停）类似。复苏科学的进展一直在以加速的速度继续，管理灾难性失血的临床医生可能完全了解与 DCR 相关的重要进展。因此，我们回顾最近的发现，进一步描述 ACOT 的病理生理学，并描述这一新信息在出血性休克患者的复苏策略的优化中的应用。

31. Tobias Geisler, Jean Booth, Elli Tavlaki, et al. High Platelet Reactivity in Patients with Acute Coronary Syndromes Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: Randomised Controlled Trial Comparing Prasugrel and Clopidogrel. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0135037.

摘要

背景：普拉格雷在减少急性冠脉综合征的血小板聚集方面比氯吡格雷更有效。在氯吡格雷治疗的高残留血小板反应（HRPR）患者（即反应不良）中，关于普拉格雷用药剂量的数据是有限的。

目标：确定普拉格雷剂量对患者血小板功能的影响，对接受急性冠状动脉（ACS）的皮下冠状动脉干预的氯吡格雷和高血小板反应作用。

患者：被安排服用氯吡格雷的 ACS 患者发现血小板反应性 = 40 AUC，即“反应不良者”被随机地被随机化为服用普拉格雷（60 mg 负荷和 10 mg 维持剂量）或氯吡格雷（600 mg 重装和 150 mg 维持剂量）。主要结果是研究服用给定剂量药物后 1、4 个小时后，血小板反应性患者 < 40 AUC 的比例。44 名患者被登记，研究提前终止，因为引入新的 P2Y₁₂ 抑制剂，氯吡格雷的使用急剧下降。

结果：在研究后 4 小时服用药物，100% 的患者使用普拉格雷治疗，而 91% 的患者使用氯吡格雷治疗者有血小板反应性 < 40 AUC ($p = 0.49$)，而在 1 小时的比例分别为 95% 和 64% ($p = 0.02$)。在普拉格雷和氯吡格雷组研究药物后 4 小时和 1 小时的平均血小板反应分别为 12 vs. 22 ($p = 0.005$) 和 19 vs. 34 ($p = 0.01$)。

结论：常规血小板功能测试可识别氯吡格雷具有高残留血小板反应性（“反应不良”）的患者。普拉格雷的策略，而不是氯吡格雷导致更早和更持久的抑制血小板反应。未来的试验需要确定这是否对临床有益处。

32. Jun-Jie Zhang, Xiao-Fei Gao, Zhen Ge, et al. High platelet reactivity affects the clinical outcomes of patients undergoing percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc Disord.* 2016; 16: 240.

摘要

背景：血小板反应和临床结果之间的关系，特别是支架血栓形成的关系，不是那么清楚。我们调查高血小板反应是否影响支架（DES）植入患者的临床结果。

方法：所有接受 DES 植入治疗的注册个体均采用 PL-11、血小板计数方法进行评估。主要终点是 2 年出现确定和可能的支架血栓形成事件。次要终点是主要不良心血管和脑血管事件（MACCE），包括所有原因死亡、自发性心肌梗死（MI）、靶血管血运重建（TVR）和缺血性中风。

结果：我们中心共有 1331 名住院的病人。有 91 名病人（6.8%）在阿司匹林上发现高血小板反应（HPR），437 名患者（32.9%）在氯吡格雷发生 HPR。在 2 年随访中，服用阿司匹林的 HPR 患者（9.9% vs. 0.4%， $p < 0.001$ ），以及服用氯吡格雷 HPR（3.0% vs. 0.1%， $p < 0.001$ ）的患者支架血栓形成发生率。在阿司匹林组 HPR 中，MACCE 增加（16.5% vs 8.5%， $p = 0.021$ ），主要是由所有原因死亡（7.7 % vs. 1.6%， $p = 0.002$ ）和 MI（9.9% vs. 1.9%， $p < 0.001$ ）的较高因素推动阿司匹林组的 HPR。同样，在氯吡格雷组 HPR 中，MACCE 的发病率较高（12.4% vs. 7.4%， $p = 0.004$ ）。所有出血和出血性中风均无差异。

结论：本研究表明，阿司匹林和氯吡格雷的高血小板反应性与 DES 植入后增加的支架血栓形成有关。

33. Thomas Gremmel, Renate Koppensteiner, and Simon Panzer . Comparison of Aggregometry with Flow Cytometry for the Assessment of Agonists'-Induced Platelet Reactivity in Patients on Dual Antiplatelet Therapy. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0129666.

摘要

关于通过流式细胞仪检测血小板对花生四烯酸（AA）和二磷酸腺苷（ADP）反应性凝集和血小板活化之间的一致性数据很少。因此，我们将三个血小板聚集试验与

流式细胞仪进行比较，以评估对抗血小板治疗的反应。在 316 名接受阿司匹林和氯吡格雷治疗的患者中，通过光透射聚集试验（LTA）、VerifyNow 和多电极凝固素（MEA）测定血小板 AA 和 ADP 的反应。AA 和 ADP 诱导的 P 选择蛋白表达和活性糖蛋白（GP）IIb/IIIa 由流式细胞仪测试确定。LTA、VerifyNow P2Y12 和 MEA 对 ADP 的响应显著相关（均 $p < 0.001$ ），LTA 与 VerifyNow P2Y12 的相关性最好（ $r = 0.63$ ）。所有聚合测试的 ADP 诱导血小板反应性与 ADP 诱导的 P 选择表达和激活的 GPIIb/IIIa（所有 $p < 0.001$ ）显著相关。验证现在 P2Y12 测定和激活的 GPIIb/IIIa（ $r = 0.68$ ）之间存在最佳相关性。在所有测试系统（所有 p ）对 ADP 的高治疗残留血小板反应（HRPR）患者中，P-选择素和激活 GPIIb/IIIa 在抗 ADP 反应中的血小板表面表达均显著升高（ $p < 0.001$ ）。在 LTA 的 AA 诱导血小板反应与 VerifyNow 阿司匹林测定（ $r = 0.15$ ， $p = 0.007$ ）之间观察到相当差的相关性，而两种方法都与 MEA 不相关。AA 诱导的血小板反应性与所有聚集测试显著相关，但与 AA 诱导的 P-选择素表达（全部 $p < 0.05$ ）显著相关，而 LTA 仅 AA 诱导血小板反应与 AA 诱导的激活 GPIIb/IIIa（ $r = 0.21$ ， $p < 0.001$ ）显著相关。在 HRPR 患者中，LTA AA 和 MEA AA（均为 $p < 0.02$ ）的 P-selectin 的血小板表面表达明显高于 AA。相反，P-选择素表达对 AA 的反应与没有 HRPR 的患者相似，通过 VerifyNow 阿司匹林测定（ $p = 0.5$ ），血小板表面激活 GPIIb/IIIa 响应 AA 所有测试系统（所有 $p > 0.1$ ）没有 HRPR 与 AA 的患者之间没有显著差异。总之，ADP 引起的血小板反应通过凝固学部分转化为流式细胞仪测定。相比之下，AA 诱导的血小板反应性在不同血小板聚集测试之间以及凝固法和流式细胞仪之间关联性差。总体而言，这两种方法捕获了血小板功能的不同方面，因此在激活剂引起的血小板反应性评估中不可互换。需要临床结果数据来确定哪些测试系统和设置与不同的疾病患者不良后果相关。





阳普医疗ImproClot®血栓弹力图仪
呵护你的健康!



阳普医疗ImproClot® 血栓弹力图仪



本文是于 2018 年发表于心血管权威期刊 Res Pract Thromb Haemost 杂志的一篇综述，作者 Paola E.J. van der Meijden，来自于荷兰马斯特里赫特大学的心血管研究所。综述从血小板的信号传导角度阐述了血小板与凝血系统发生的相互作用，虽按目前的研究水平仍未能完全搞清楚血小板是如何与凝血系统发生作用，但作者列出了数项研究，证明在血栓性疾病治疗的过程中，可能抗血小板、抗凝等多种手段共用才可能获得最大的临床效果。我们认为该综述可能为临床医生带来极具价值的思考。

纤维蛋白凝块中血小板与凝血活化的系统性形成

摘要

血小板通过多种方式与凝血系统发生相互作用，不仅仅是在血栓形成的阶段，也在形成血栓的特定位置。本文综述了血小板影响凝血酶生成、纤维蛋白形成和结构以及抗凝的最新概念。同时文中也阐述了血小板受体如何通过胶原（糖蛋白 VI）和凝血酶的联合信号诱导（抗）凝血因子的分泌，以及磷脂酰丝氨酸的表面暴露，从而催化凝血酶的生成。

这种促凝血血小板反应也由具有粘附功能的复合物糖蛋白 Ib-V-IX 和整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 促进。在血小板-纤维蛋白血栓形成的早期阶段，外源性、组织因子诱导的凝血途径占主导地位，而内源性、凝血因子 XII 途径似乎在后期有所促进。早期的凝血酶可以增强血小板反应，刺激血栓内的异质性，使血小板聚集、收缩和磷脂酰丝氨酸暴露。

活化的血小板表面形成的纤维蛋白层可支持血栓生长，也能捕获血栓。血栓中纤维蛋白的分布似乎依赖于局部促凝触发因素和血流速度。临床研究结果提示应重视血小板和凝血系统之间相互作用，联合治疗在心血管疾病的二级预防中的有益作用也印证了这一观点。

关键词：凝血；纤维蛋白原；血小板；血栓；血栓形成

原文出处：Swieringa F, Spronk H M H, Heemskerk J W M, et al. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation[J]. Research and practice in thrombosis and haemostasis, 2018, 2(3): 450-460.

作者：Frauke Swieringa PhD^{1,2}, Henri M.H. Spronk PhD¹, Johan W.M. Heemskerk PhD¹, Paola E.J. van der Meijden PhD¹

邮箱：p.vandermeijden@maastrichtuniversity.nl

要点：

- 活化血小板分泌凝血因子，暴露 PS，支持凝血酶和纤维蛋白的形成；
- 血小板对胶原和凝血酶的受体是互补的，相互促进；
- 血小板-纤维蛋白血栓形成过程中，内源性和外源性凝血途径是反向平衡的；
- 临床研究结果支持血小板与凝血系统之间的高度相互作用。

1 | 概述

在过去的十年里,人们已经清楚地认识到,经典的止血和血栓形成的概念,即首先依靠血小板,其次依靠凝血系统,但这一概念需要加以修订了。血小板和凝血系统激活并不是相互独立的过程,需要被视为高度相互作用和相互联系的过程^[1,2]。从活体实验的血栓形成模型中、体外动脉和静脉解剖血栓的临床样本以及抗血小板和抗凝治疗的互补作用中可以明显看出血小板与凝血系统之间相互作用的(病理)生理学中的重要性。

小鼠模型研究结果表明:(i)胶原和凝血酶通过组织因子(TF)启动动脉血栓形成^[3];(ii)血小板和凝血激活都促进动脉和静脉的血栓形成过程^[4];(iii)凝血最终产物纤维蛋白存在于血栓形成的初始阶段^[5];(iv)基本上所有血栓形成模型都对血小板或凝血因子缺陷敏感^[6]。

血小板与凝血系统的相互作用可以理解为血栓形成过程中的一个阶段性过程^[7,8]。或者更确切地说,正如我们现在开始理解的那样,它是在血栓形成过程中的特定位点发生的一系列相互作用。一般认为血栓的形成始于血管壁中胶原和TF的暴露,引发血小板粘附,并伴随着凝血酶的形成。在增强阶段,血小板以多种方式促进凝血酶积累,聚集的血小板发生收缩。还有,我们认为是最后阶段的纤维蛋白形成阶段,尽管现在人们认识到“最终产物”纤维蛋白在血小板和凝血激活中都有作用。

2 | 血小板如何控制凝血酶的生成?

血小板通过多种方式调节凝血反应,导致凝血酶的产生;通过磷脂酰丝氨酸(PS)暴露;通过糖蛋白复合物 GPIIb-V-IX、整合素 α IIb β 3 和 GPVI 结合凝血因子;以及通过凝血酶诱导的蛋白酶活化受体的活化(PARs)(图 1A)。如何在概念上整合这些交互模型,是一个热门的研究领域。

2.1 | PS 暴露的发生和作用

在膜表面暴露带负电荷的磷脂 PS 是止血的一个控制过程,正如最近在携带 PS 暴露缺陷的血小板的小鼠模型中所观察到的结果那样^[9]。然而,在损伤或活化时,内皮细胞和其他血管细胞也能提供一个 PS 暴露表面。对血小板而言,PS 暴露是由强激活剂(通过持续的细胞溶质 Ca^{2+} 的升高)以及凋亡(通过非 Ca^{2+} 依赖的半胱氨酸蛋白酶)或坏死触发的^[10]。据证实,离子通道 anoctamin-6(基因 *ANO6* 或 *TMEM16F*)在 Ca^{2+} 依赖性 PS 暴露(也称为磷脂紊乱)以及活化血小板的肿胀和膨胀中起着关键作用^[11]。若表达有缺陷的 anoctamin-6,例如在 Scott 综合征(*ANO6* 突变)或有缺陷的小鼠中,会导

致轻微出血表型,以及血小板不能通过 Ca^{2+} 依赖性 PS 暴露和膨胀^[12]。导致 PS 暴露的典型激动剂组合是胶原蛋白加凝血酶,依赖于 GPVI 的信号传导。依赖于 Ca^{2+} 持续升高的下游信号传导分子包括 Fc 受体 γ 链($\text{FcR}\gamma$)、LAT、SRC 激酶家族(SFK)、SYK、磷脂酶 $\text{C}\gamma 2$ ($\text{PLC}\gamma 2$)和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)亚型 β 和 γ ^[2]。其他的信号通路途径途径是通过 Orai1 通道和 STIM1 传感器使 Ca^{2+} 进入细胞外,以及从线粒体^[13]释放 Ca^{2+} 。由蛇毒素红细胞色素或内源性配体足蛋白激活的 C 型凝集素样受体 2(CLEC-2),导致类似的信号级联反应。有趣的是,在红细胞表面形成的血栓显示出相对较高程度的 PS 暴露,提示 CLEC-2 的作用^[8]。结构上,PS 暴露的血小板迅速膨胀并转变成气球状,从而增加其前凝血表面^[14]。

PS 暴露的血小板具有促凝血作用,归因于含有凝血因子的 Gla-结构域的高亲和力结合,即(活化的)凝血酶原、FVII、FIX 和 FX^[15]。辅因子 FV 可通过其 C2 结构域与 PS 膜结合^[7]。显微镜观察结果表明,液化酶(FVIIIa 和 FIXa,激活 FX)和凝血酶原酶(FVa 和 FXa,激活凝血酶原)复合物与 PS 暴露血小板的成分几乎完全共定位^[16,17]。值得注意的是,对于 FVIII(a),只观察到稀疏的共定位,其中大多数 FVIII 与 von Willebrand 因子(VWF)共定位,提示可能有一个供应池^[17]。动力学研究表明,含有 PS 的膜能使液化酶和凝血酶原酶复合物的活性提高 1000 倍^[18]。暴露 PS 的血小板也通过一种机制释放出细胞外囊泡(微粒),这种机制目前还不清楚。这种囊泡可在某些病理生理条件下发生积聚^[19]。

PS 暴露的血小板常与包膜血小板混淆^[20],后者形成亚群,也发生在强激动剂刺激后,其特征是形成一个包含转谷氨酰胺酶锚定的血小板衍生蛋白的共价包膜^[21]。从概念上讲,现在人们认为,在最初的 PS 暴露后,需要凝血酶激活 FXIII 来解离谷氨酰胺转氨酶的激活,并允许血小板表面包括纤维蛋白在内的多种蛋白质的交联^[20]。转谷氨酰胺酶和整合素 α IIb β 3 的相互作用均是血小板控制纤维蛋白形成所必需的元素。

活化的血小板携带并分泌多种凝血因子(凝血酶原、Fv、F8 转录物、FXIII、纤维蛋白原)和抗凝因子(抗凝血酶、各种丝氨酸蛋白酶抑制剂)。从血浆和血小板中凝血因子的丰富性分析中得出的结论是(图 2),凝血过程后期涉及的一些特殊罕见的因子在血小板中均有储存。可以假设,尤其是后者对于形成足以支持止血的“强”血栓很重要。典型例子是一名严重先天性 FV 缺乏的患者,其中残余血小板储存的 FV 被认为足以防止严重出血。在这名患者中,富血小板血浆中也检测到凝血酶的生成^[22]。

总之，这导致了一个概念，即活化的血小板（被凝血酶共同激活）分泌凝血因子，暴露 PS，支持凝血酶的生成，并在其表面形成纤维蛋白包层。

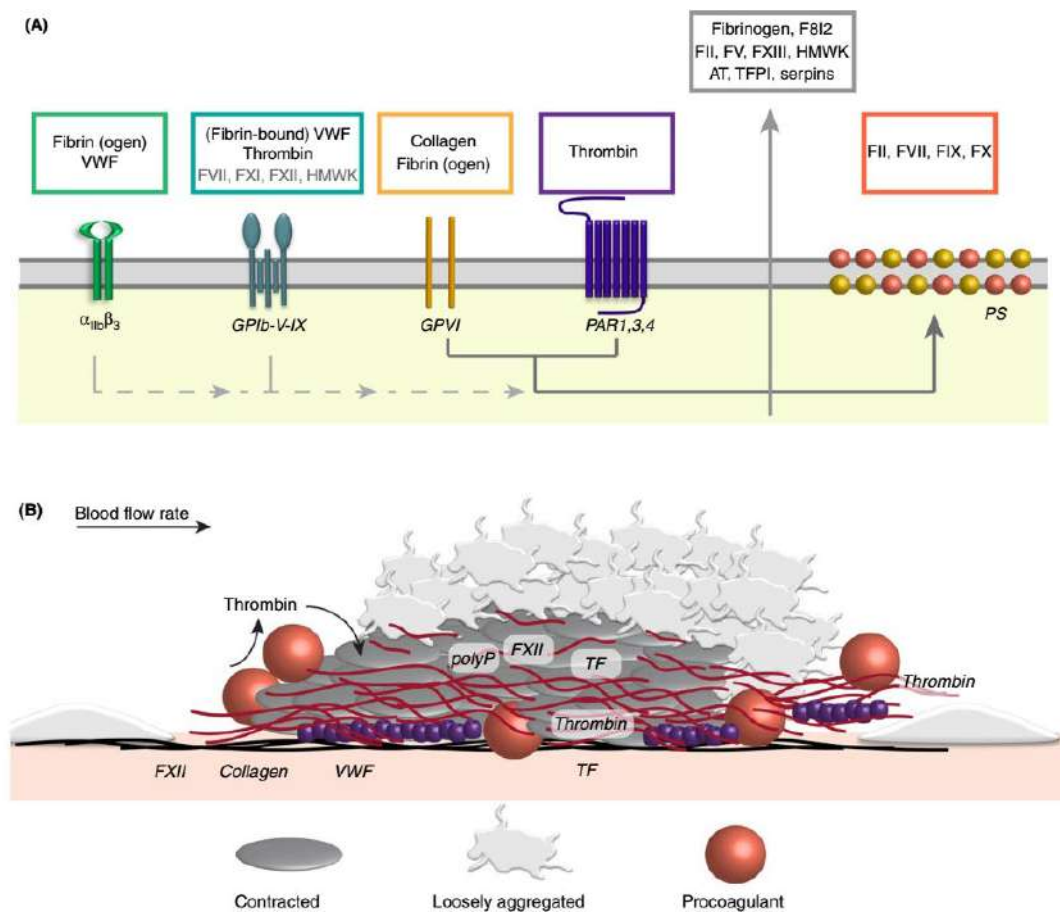


图 1. 单个血小板上的血小板纤-凝血系统相和作用和血小板-纤维蛋白血栓的形成。(a) 关键血小板受体及其（促凝）配体作为血小板促凝功能的组成部分。图中表明血小板受体对 PS 暴露（直线、诱导、虚线、支持）和促凝因子与 PS 暴露表面结合的贡献，促进凝血酶的生成。此外，通过分泌多种（抗）凝血因子，活化血小板调节凝血反应。(b) 血小板-纤维蛋白血栓显示血小板与凝血系统的动态相互作用：局部血小板异质性、凝血酶反馈和密集的血管定向纤维蛋白。这里强调的是纤维蛋白网络的扩展，及招募和激活其他的小血小板。有关详细说明，请参阅正文。

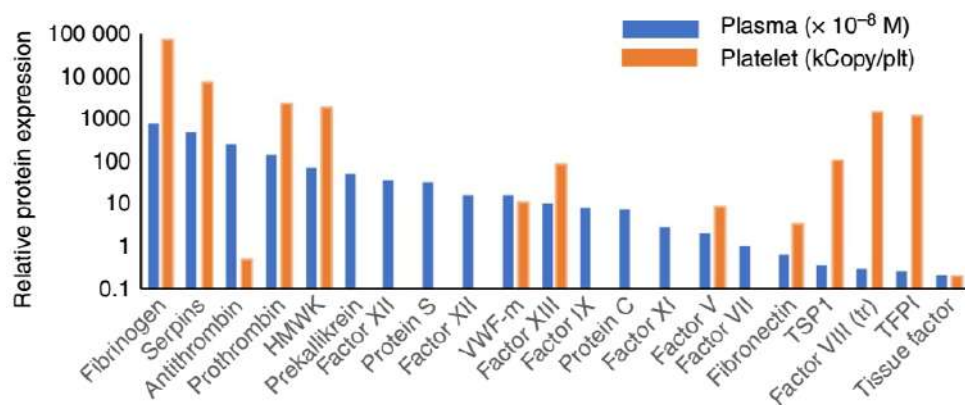
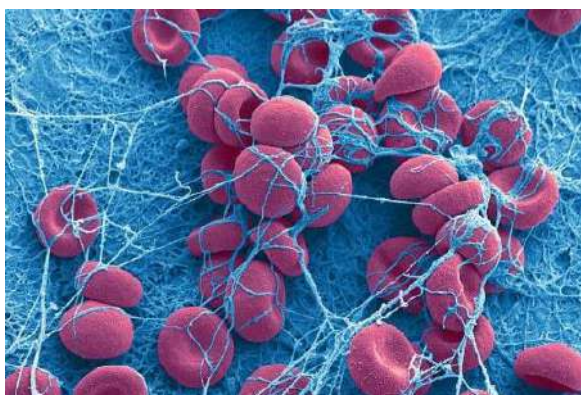


图 2. 血小板和血浆中（抗）凝血蛋白的相对丰度。图中所示为质谱法测定的特定的单个血小板（灰色）所示（抗）凝血因子的蛋白质拷贝数（kCopy）。此外，图示也有正常血浆中的平均因子水平（ $\times 10^{-8}$ mol/L，黑色）。对于 FVIII，血小板拷贝数指的是 F8 转录物 F8I2。HMWK，高分子量激肽原；VWF-m，VWF 单体；TSP1，血小板反应蛋白 1；TFPI，组织因子途径抑制剂。

2.2 | GPIb-V-IX 与 VWF/FVIII 及其他因素的相互作用

GPIb-V-IX 复合物与固定化 VWF 的相互作用是剪切依赖性血栓形成的一个初始步骤，其含义是确保血小板促凝活性。GPIb 复合物与细胞骨架紧密相连，从而确定血小板结构^[23]。就其本身而言，GPIb-V-IX 与 VWF 的相互作用仅诱导微弱的细胞内信号（涉及 14-3-3、SFK、PI3K 和小 GTP 酶，亚型），仅导致整合素 α IIB β 3 活化和血小板扩散有限^[24]。一份初步报告表明，这种相互作用，在凝结血浆中的作用中为提高血小板（和 PS）依赖性凝血酶的产生^[25]。然而，最近的数据表明，糖蛋白复合物在血小板前凝血活性中的作用与 VWF 和 GPIba 无关^[26]。有趣的是，14-3-3 ζ 在线粒体依赖性 PS 暴露中的作用似乎与 VWF-GPIb 相互作用无关^[27]。因此，关于这个话题还不能轻易做总结。

血小板 GPIb-V-IX 复合物进一步为凝血酶提供了一个高亲和力的相互作用位点，从而通过 PAR1 和 PAR4 受体增强血小板活化^[28]。此外，GPIb 复合物可结合多种其他凝血因子，如 FVII (a)、FXI、FXII 和高分子量激肽原。凝血因子与 GPIb-V-IX（或载脂蛋白 E 受体 2）结合（凝血酶除外）的功能性后果仍不清楚^[7]。最近的一篇论文指出，凝血酶通过依赖 GPIb 的方式激活 FXI，导致高血压小鼠的血管炎症^[29]，从而提示 GPIb、凝血酶和 FXI 相互之间存在复杂的作用系统。



2.3 | 整合素 α IIB β 3 的相互作用

血小板表面有大量整合素 α IIB β 3，估计每个血小板有 8 万份拷贝，也与肌动蛋白细胞骨架有关。整合素结合纤维蛋白原、纤维连接蛋白、VWF 和其他血浆蛋白，在激动剂诱导的构象变化后导致开放、激活的状态^[30]。整合素的激活是血小板聚集的关键，因此对于血栓的形成和血流中的稳定性至关重要^[31,32]。在配体所占 α IIB β 3 的信号传导外，可触发数种凝血刺激血小板反应。最近的证据表明 α IIB β 3 可以机械地感知可溶性纤维蛋白原，而非与血小板结合的纤维蛋白原，以避免“自发”血小板活化^[33]。

在血栓形成过程中，整合蛋白通过 SRC 和 SYK 酪氨酸激酶在信号传导中可加强初始凝血酶诱导的 Ca^{2+} 升高，从而介导 PS 暴露并随后产生大量凝血酶^[34]。这就解释了为什么整合素拮抗效应能使富含血小板血浆中凝血酶生成减少，从而延长凝血时间^[35]。在最近的一些动态研究中表明， α IIB β 3 拮抗剂阿昔单抗治疗不稳定冠脉综合征患者不仅抑制血小板聚集，还能抑制纤维蛋白形成^[36]。总的来说，整合素信号似乎增强了促凝性 PS 的暴露，但它不足以单独导致这种情况。

血小板纤维蛋白血栓的收缩也需要整合素发挥由外-内的信号传递^[37]，目前的理解是 α IIB β 3 的激活是一个高度动态的过程，需要自分泌和旁分泌因子，特别是 ADP（通过 P2Y₁₂ 受体）持续的血小板刺激^[38]。 α IIB β 3 在活化过程中提供了一种负反馈机制，在高 Ca^{2+} 、PS 暴露的血小板中， β 3 链和相关蛋白（包括 SRC 和 talin）的钙蛋白酶分解介导了该机制^[39]。

总之，复合物 GPIb-V-IX 和 α IIB β 3 在凝血中的粘附作用似乎是三方面的，即：（i）促进（凝血酶传递，增强信号传导）；（ii）结构（细胞骨架连接，锚定纤维蛋白）；（iii）为多种凝血因子提供结合位点。

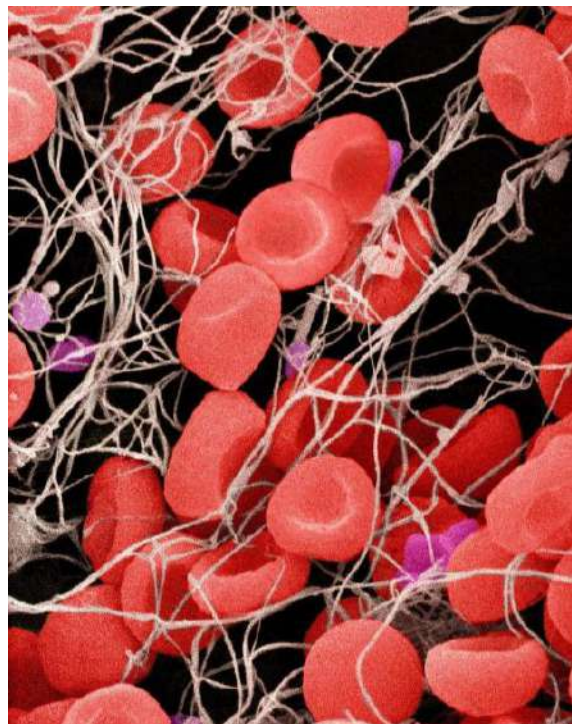
2.4 | GPVI 的启动和反馈作用

稳定的血小板粘附到 I 型胶原（VWF 结合）依赖于受体 GPVI 和整合素 α 2 β 1^[40,41]。凝血酶明显是促进了该传导过程，因为它可能增加 Ca^{2+} 、整合素 α 2 β 1 和 α IIB β 3 的激活和 PS 的暴露^[18]。在小鼠模型中，阻断 GPVI 或缺乏 $\text{Fc}\gamma$ R₁、LAT，Syk 或 PLC γ 2，可导致胶原诱导的血栓形成减少，PS 暴露和凝血酶生成减少^[42]。另一方面，PLC γ 2 的功能获得性突变增加了胶原诱导的血栓形成和 PS 暴露^[43]。

关于 GPVI 在血栓形成后期的额外作用的第一个证据来自于观察性证据，在一个 FeCl_3 诱导损伤的小鼠模型中，GPVI 缺乏或耗尽主要影响后期血栓形成和血管阻塞^[44]。这与最近确定的 GPVI 可作为纤维蛋白受体的说法一致，可能与血小板-纤维蛋白血栓的持续生长有关^[45]。对于人类和小鼠血小板，纤维蛋白粘附导致 GPVI 信号体的形成，与 α IIB β 3 无关^[45]。在这种情况下也可以测量到 PS 暴露的增加，而且，在 GPVI 缺陷患者的富含血小板的血浆中，凝血酶的生成明显受损，同时在低（300/s）和高（1500/s）剪切率下血小板对纤维蛋白的粘附力降低^[46]。

除了血小板和凝血激活之间的这些正反馈回路外，还有证据表明存在负反馈过程，通过激活血小板上 FXa 依赖性的 GPVI 脱落实现^[47]。有趣的是，在这种 GPVI 蛋白水解酶分解中没有发现蛋白酶凝血酶的作用。

总之，这表明纤维蛋白在胶原和凝血酶对血小板的相互刺激作用中发挥着各自的作用。



2.5 | 凝血酶受体的相互作用

凝血酶是一种关键的蛋白酶，与凝血级联的启动和传播、血小板活化和纤维蛋白形成有关^[2]。凝血酶原通过其 Gla 结构域与保凝血血小板结合。一旦被切断，凝血酶与血小板 GPIIb 和 PAR 受体（人类为 PAR1/4，小鼠为 PAR3/4）启动强烈相互作用，从而诱导多种反应。在人类情况下，与 PAR1 相比，PAR4 的分裂需要更高浓度的凝血酶^[48,49]。这两种亚型都是 Gq 偶联受体，通过 PLC β 传递信号，导致可量化的细胞溶质 Ca²⁺ 达到峰值，并且仅限制 PS 暴露^[50]。凝血酶诱导的 PAR 激活增强了 GPVI 诱导的血小板 PS 暴露。

血流速度被发现是决定血小板活化过程中 PAR 亚型的一个调节因子，即在（病理学上）高剪切率下下降^[51]。在流动条件下，凝血酶最初与暴露于血小板的 PS 结合，然后重新定位到新形成的纤维蛋白纤维^[16]。因此，在成长的血栓中，大多数凝血酶似乎被纤维蛋白捕获。换句话说，从血小板血栓延伸出来的纤维蛋白纤维起着凝血酶沉的作用，将这种蛋白酶限制在血栓附近。早期的研究结果表明，纤维蛋白凝血酶被抗凝血酶抑制，这意味着凝血酶在血栓附近的活性相对较高。

PAR 型凝血酶受体还可被多种基质金属蛋白酶（包括 ADAM175 和中性粒细胞衍生组织蛋白酶 G）切割^[53-55]。PAR 的切割也可通过活化蛋白 C（APC，对 PAR1 特异）和纤维蛋

白溶解蛋白酶质粒（对 PAR4 特异）完成^[56]。然而，在血液流动条件下，酶（凝血酶除外）对 PAR 裂解的相对贡献尚不清楚。

胶原（GPVI）和凝血酶（PAR1/4 人，3/4 小鼠）的血小板活化受体在信号传导方面是互补的，因此彼此的活性增强（例如，在 PS 暴露中）。这两种受体类型均可在血栓形成和凝血的早期（TF 产生的凝血酶，胶原暴露）和晚期（纤维蛋白作为凝血酶沉，GPVI 作为纤维蛋白受体）发挥作用。

3 | 血小板如何控制纤维蛋白的形成和性质？

纤维蛋白活跃地形成在活化血小板的表面，通过外源性（TF，FVII）和内源性（FXII，FXI）凝血途径触发。血小板进一步改变纤维蛋白网络结构，协调凝块的收缩（图 1b）。血小板和血流如何改变纤维蛋白凝块的形成和结构的作用机制，目前还不清楚。

3.1 | 血小板表面的纤维蛋白形成

传统观点认为，血小板血栓的生长是由凝血酶和纤维蛋白稳定的，这些凝血酶和纤维蛋白可能是通过外源性和内源性凝血途径作用而成的^[57,58]。机制研究也表明，在足够的凝血酶生成时，纤维蛋白网络可以从血小板和血栓区域延伸^[59]。血小板依赖性纤维蛋白的形成特别是由 TF 触发的，并有助于形成密集的血栓核心^[60]。在包膜血小板上也可以观察到广泛的纤维蛋白形成，并且在这里依赖于转谷氨酰胺酶（FXIII）活性和 α IIB β 3 结合^[20]。

3.2 | TF 和 FVII 的作用

外源性途径的触发是通过 TF 发生的，TF 这种膜蛋白高度表达于内皮下细胞（平滑肌细胞、成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞），并在一定程度上表达于炎症的内皮细胞^[2,61]。通过 TF 产生凝血酶需要有促凝膜，这可以由暴露血小板的 PS 提供^[2]。血小板可以进一步传递蛋白质二硫化物异构酶，这有助于将 TF 解密为其活性形式。血小板表达的有限量 TF 是否能够触发凝血酶的生成，一直存在争议^[62]。血小板很可能从其前体细胞遗传 TF，因为功能活性 TF 可以在从巨核细胞分泌的血小板中识别出来^[63]。然而，鉴于血小板中存在相对较高的组织因子途径抑制剂（TFPI），血小板源性 TF 的实际作用可能仅限于特定环境。表达 TF 的细胞外囊泡（微粒）的生理作用尚不清楚^[64]。在血小板-纤维蛋白血栓的体内形成过程中，TF-FVII（a）复合物可以起到限速作用^[65]。

同样在体外流动条件下，固定化 TF（和 FVII）与胶原一起支持高水平的凝血酶生成^[66]，为在后期起作用的 FXI 和纤

维蛋白提供了一种有效的凝血酶捕获机制^[67]。

3.3 | FXI, FXII 和多磷酸盐的作用

在健康或动脉粥样硬化动脉损伤后，使用缺陷小鼠模型进行活体实验，证明了由 FXII 和 FXI 完成的固有凝血途径对血小板纤维蛋白血栓形成的重要性^[66,68,69]。特别是在低 TF 水平下，这一途径可被认为是血小板纤维蛋白凝血酶形成的关键^[66]。实验小鼠模型支持 FXII 和 FXI 在血栓稳定（后期）中的作用，因为前激肽释放酶、FXII 或 FXI 的缺乏促进了血栓栓塞^[70]。同样，药物抑制 FXII 通路导致血小板从动脉血栓表面分离^[71]。

FXII /FXI 通路的内在触发因素包括与胶原结合^[58]，同时它也与纤维蛋白纤维结合，但不与暴露于血小板的 PS 结合^[66]。在发展中的血栓中，纤维蛋白纤维中存在 FXII 可确保纤维蛋白依赖于固有凝血途径的进展。然而，这个 FXII 池也可以改变纤维蛋白凝块的结构。

血小板通过分泌的多磷酸盐通过 FXII（auto）激活增强凝血反应^[72]。然而，FXII 的激活作用受到质疑，因为血小板分泌的可溶性多聚磷酸盐不包含合适的更长的链长度来实现这一点^[73]。动力学研究表明，血小板衍生的短链多聚磷酸盐能够增强 FV 和 FXI 的活性，从而促进血栓的稳定性。最近的研究表明，与血小板膜相关的聚磷酸盐纳米粒子可以提供 FXII 激活电位，这一争议似乎可以得到解决^[74]。

从目前的研究结果来看，血小板-纤维蛋白血栓形成的外源性（TF，FVII）和内源性（FXII，FXI）凝血途径之间似乎存在一种“反向平衡”。外源性途径在血管壁附近最为活跃，稍后血小板（细胞外囊泡）表达 TF 的作用可能很小；内源性途径在胶原表面适度刺激，随后可能通过聚磷酸盐簇增强。

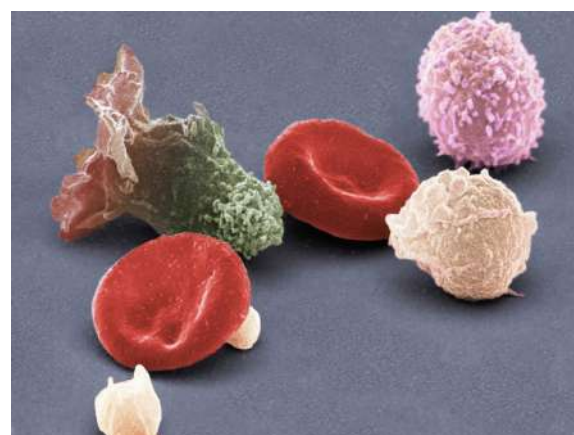
3.4 | 纤维蛋白形成和性质的调节

几项观察表明，血小板依赖性纤维蛋白的形成始于血栓基底（TF 部位附近），然后在血栓内和血栓外向生长，这取决于局部促凝触发因素^[75]。弹性力学性能分析表明血小板血栓内纤维蛋白弹性较低。血小板血栓之外的高弹性的关键因素是相对较低的血流和较低的 TF 触发。当弹性降低时，例如通过抑制纤维蛋白聚合，血栓变得容易脱落栓塞^[76]。

通过调节局部凝血酶浓度^[77]，血小板也可以间接影响周围纤维蛋白网络的结构。普遍的概念是，在低凝血酶浓度下，粗纤维蛋白纤维形成松散的网络（更容易纤维蛋白溶解），而在高凝血酶浓度下，细纤维蛋白纤维形成紧密的网络（更耐溶解）^[78]。对耐溶解的解释是在较薄的纤维蛋白纤维上产生低

组织纤溶酶原激活剂（TPA）介导的纤溶酶。红细胞的结合可能导致高密度纤维蛋白纤维在有限纤维形成区域附近的不同区域^[79]。在特定情况下，中性粒细胞和红细胞也能促进凝血酶的生成。这里不对此作进一步讨论。

血小板-纤维蛋白相互作用的复杂性在与完全纤维蛋白原缺乏患者的研究中变得明显。这些患者可能同时患有动脉和静脉血栓事件^[80]。这可以解释为较高的循环凝血酶活性，因为产生的凝血酶不再被纤维蛋白保留，因此凝血酶诱导的血小板活化增加^[81]。另一方面，患者血栓中缺少纤维蛋白会降低稳定性并增加栓塞^[82]。在斯科特综合征患者的血小板或缺乏维生素 6 的小鼠中，PS 暴露有缺陷，纤维蛋白的形成也受损^[9,75]。



3.5 | 血块收缩

血小板纤维蛋白血栓形成后，血栓收缩是必要的适当止血，因为它收紧伤口边缘。血栓收缩也可以被认为是血小板接触依赖性信号的一种方式^[83]。最有可能的情况是，血栓收缩指的是在纤维蛋白环境中收紧血小板-血小板接触的相同过程^[37]，尽管血栓收缩在没有纤维蛋白的情况下也可能在有限程度上发生^[84]。

凝血酶存在时，凝块收缩依赖于纤维蛋白（ogen）与激活的 α Ib β 3 的结合以及随后的信号事件的外部，最终导致肌球蛋白-肌球蛋白重排^[30]。来自多个缺乏（整合素）信号蛋白或缺乏细胞骨架相关蛋白的小鼠菌株的血小板显示凝血收缩受损^[37]。值得注意的是，暴露在血小板中的未聚集的 PS 并没有参与这一过程，可能是因为肌球蛋白细胞骨架的钙蛋白酶降解^[39]。

综上所述，凝块收缩可确保血栓内的血管导向纤维蛋白显示：(i) 低弹性（高硬度）；(ii) 紧密堵塞；(iii) 和血栓稳定作用。其基本机制仍需进一步阐明。

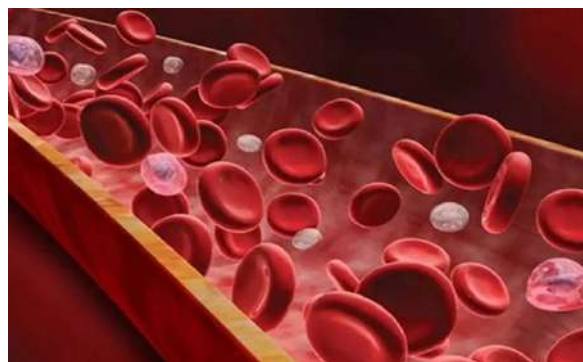
4 | 血栓异质性的反馈回路

多种因素可被列出用以在循环或组装成血栓中血小板的结构和功能异质性。在生长的血栓中，单个血小板暴露于不同的微环境中（例如，与胶原结合或与 TF 相邻）^[7]。然而，对似乎暴露在相同微环境中的单个粘附血小板之间的反应变化也进行了研究^[42]。血小板异质性的内在因素在很大程度上是未知的，但可能包括巨核细胞和血小板老化之间的差异^[85]。体内观察也指出血栓形成的总体异质性^[60]。血小板（有分泌和整合素激活）似乎是血栓核心中密集的血小板，由血栓外壳中松散粘附的血小板包围。这意味着血栓核心存在一定程度的跨细胞通讯，如确实有报道^[86]。相邻的血小板可以形成间隙连接，这可能是密集包装和血小板收缩的需要^[87]。

例如，在胶原和凝血酶共刺激下，高浓度 Ca^{2+} 流入的血小板在体外和体内作为另一个凝血酶群体出现。这些血小板的特点是 PS 暴露，气球和微粒脱落^[88]。在小鼠模型体内，注射 PS 清除剂（膜联蛋白 A5 或内酰胺结合蛋白）导致动脉血栓形成减少，强调了该人群的促凝血功能^[4,89]。通常，这些血小板不能激活 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ^[39]，并与聚集血小板的斑块分离^[16]。血栓异质性可能是由于血小板暴露于可溶性激动剂（如 ADP、血栓素和凝血酶）以及不同的血流动力学环境下，导致单个血小板之间的内在差异^[2]。其他导致不均匀血栓生长的因素可能是血管床和损伤血管的（病理）生理状态。

微流体研究指出，在流动条件下，暴露血小板的 PS 和凝血酶活性之间存在正反馈回路。因此，当血友病血液或稀释性凝血障碍中凝血受到限制时，尤其是血小板的假爆炸数量会减少^[75]。这表明 PS 暴露的凝血酶依赖性增强导致了额外的凝血酶生成。血栓内纤维蛋白溶解因子、纤溶酶也存在异质性，最好与暴露于血小板的 PS 结合^[90]。

总结性讲，血栓的形成依赖于血小板与凝血系统的持续动态相互作用。不同斑块（松散）聚集、收缩和 PS 暴露血小板的血栓内异质性由凝血酶生成和凝血酶反应的正反馈环加强。



5 | 血小板如何控制抗凝?

促凝因子和抗凝因子都能很好地平衡凝血活性。血液中存在几种抗凝因子，包括蛋白 C/蛋白 S 复合物、TFPI 和抗凝血酶。关于血小板在抗凝过程中的作用的信息有限。

5.1 | 蛋白质 C、蛋白质 S 和 TFPI

维生素 K 依赖性蛋白 C 和 S 通过其 Gla 结构域与暴露于 PS 的膜结合，蛋白 C 作为蛋白酶，蛋白 S 作为膜结合辅因子。凝血酶活化蛋白 C（APC）选择性地灭活 FVIIIa 和 FVa，从而抑制 Tenase 和凝血酶原酶活性。蛋白 C/S 抗凝途径如何促进血栓形成尚不清楚。临床上，有 FV-Leiden 突变（携带不能被 APC 灭活的 FVa 突变）的患者静脉血栓栓塞风险增加，这一事实强调了 APC 裂解的重要性。另一方面，具有纯合 FV-Leiden 突变的小鼠显示肠系膜动脉血栓形成正常^[4]。一项荟萃分析显示，携带 FV-Leiden 等位基因的患者心肌梗死和冠状动脉狭窄的相对风险仅增加 1.17，提示与动脉血栓形成的相关性不超过中度^[91]。

抗凝血因子 TFPI 是一种 Kunitz 型蛋白酶抑制剂，能可逆地抑制 TF/FVIIa、FXa 和蛋白 C 通路，通过抑制辅因子 FVa 和 FVIIIa 的蛋白水解酶作用来抑制凝血酶的生成。携带所有三个 Kunitz 结构域的亚型 TFPI α 以一种蛋白质 S 依赖的方式，积极抑制 TF/FVIIa 和 FXa^[92]。当 TFPI α 在血液中低浓度循环时，血小板分泌可能导致其局部水平升高^[64]。在（包膜上的）血小板表面确实检测到了 TFPI。活体实验表明，小鼠 TFPI 能抑制血栓的生长。离体时（血浆）TFPI 的作用似乎局限于凝血强度较低的情况^[93]。

5.2 | 抗凝血酶

抗凝血酶是一种关键的丝氨酸蛋白酶抑制剂，针对多种活化凝血因子，尤其是凝血酶，在较小程度上是 FVIIa 和 FIXa-XIIa^[2]。在血栓形成过程中尚未鉴定出来抗凝血酶。

有趣的是，暴露 PS 的血小板可以作为凝血和抗凝因子的装配点。然而，抗凝剂如何与凝血因子竞争尚不清楚。对于活性部位抑制剂、抗凝血酶和 C1 抑制剂，血小板结合部位尚不清楚。

综上所述，目前尚不清楚抗凝因子如何与血小板相互作用，抗凝机制如何限制血栓的生长和稳定性。

6 | 血流速度的矛盾效应

一般来说，动脉血栓（形成于高壁切变率）富含白色血小板和纤维蛋白纤维，而静脉血栓（形成于低切变率）通常更

红，带有纤维蛋白网络、血小板团块和合并的红细胞^[94]。微流体研究为这些过程提供了研究方法。

血小板和凝血活性都依赖于局部血流和剪切条件。这里的一个相关参数是壁切变率（近壁滑动率），它在循环的静脉部分较低，并逐渐从微循环的大动脉上升到小动脉^[95]。在动脉血流条件下，血小板沉积，通过 GPIb-V-IX 与 VWF 的相互作用，与壁面剪切速率（以及因此产生的流速）成正比，因此血栓形成增加。

GPVI 和 P2Y₁₂ 受体的作用也以较高的剪切速率增加^[96]。在病理学上，非常高的壁剪切率高达 10000 s⁻¹，在狭窄部位，VWF 从内皮释放，从而进一步加强血小板沉积^[97]。另一方面，在较低的流速下，凝固过程得到增强，因为这限制了稀释，并促进凝血酶的积聚。数学模型表明，流速决定了凝血因子的转运速率，从而决定了纤维蛋白聚合的程度^[98]。

因此，根据流动条件，血小板粘附（高剪切）或凝血酶/纤维蛋白生成（低流动）可作为血栓形成的驱动因素^[16,75]。通过扩展，剪切力和流速的局部差异可能导致在生长的血栓中形成不同的凝血酶和纤维蛋白^[99]。通常情况下，血栓生长过程中的剪切率和流速会急剧增加，这种情况由狭窄部位引起，促进血小板粘附，但也会导致血栓脱落。另一方面，在血栓和狭窄部位附近，间质流速相对较低，这将防止凝血因子稀释^[100]。这可能解释了血栓内部和周围的不均匀纤维蛋白积聚。血流也通过增强血小板纤维蛋白凝血的溶解来刺激纤维蛋白溶解过程，前提是存在纤维蛋白溶解触发剂，如 tPA^[90]。

大血管的血流和血管壁的剪切条件可以相互决定血小板纤维蛋白血栓的整体形成，也可以决定血栓内凝血酶和纤维蛋白积累的部分异质性。



7 | 一些临床考虑

用于心血管事件二级预防的抗血栓治疗通常包括两种抗血小板药物，药物起效通常需要一定时间。在多项研究中，双抗血小板治疗（阿司匹林加 P2Y₁₂ 受体阻滞剂）已证明是有益的，尽管复发性血栓事件并未完全消除，出血事件的风险相对较高^[101]。已发现 PAR1 拮抗剂 vorapaxar 可能效果稍有改善。Vorapaxar 只阻断凝血酶的血小板效应，而不影响凝血酶在凝血中的作用^[102]。TRA2P-TIMI 50 研究评价了在稳定的急性冠状动脉综合征患者中，Vorapaxar 加阿司匹林和氯吡格雷（P2Y₁₂ 拮抗剂）的联合治疗，结果提示心血管事件有所降低，但以出血风险增大为代价^[103]。并发症可能是由于的 Vorapaxar 血小板非依赖性作用，例如对内皮细胞和平滑肌细胞 PAR 受体的作用。

关于凝血靶向问题，早期的研究，WARIS^[104]和 ASPECT^[105]试验均证明维生素 K 拮抗剂对冠状动脉疾病的二级预防具有临床益处，尽管出血增加。然而，双抗血小板治疗被发现更有效。最近，直接凝血酶和 FXa 抑制剂的效果被进行了直接评估，主要是结合双抗血小板治疗。APPRAISE-2 试验中，在阿司匹林和 P2Y₁₂ 抑制剂的基础上使用阿派沙班（FXa 抑制剂），由于对复发和更高的大出血有负面影响，该试验被提前终止^[106]。ATLAS ACS-2 试验检测了低剂量利伐沙班（FXa 抑制剂），对大多数接受双抗血小板治疗（阿司匹林加噻吩吡啶）的患者再次进行了检测，主要终点的结果即心肌梗死、心血管死亡或中风的复合终点更为乐观，尽管再次以出血事件为代价^[107]。

最近，多项研究将低剂量利伐沙班与 P2Y₁₂ 拮抗剂或阿司匹林联合使用。最近发表的 Compass 试验报告了低剂量利伐沙班联合阿司匹林与阿司匹林在主要终点方面的优势^[108]。两组在颅内出血或致命性出血方面无差异，但合并治疗后再次出现大出血。ATLAS ACS-2 研究表明，与单独使用双重抗血小板治疗相比，联合抑制血小板（阿司匹林加 P2Y₁₂ 拮抗剂）和凝血（利伐沙班）可降低体内血栓形成的风险^[109]。

因此，临床研究支持血小板活化（通过可溶性激动剂 ADP 和血栓素）和凝血（凝血酶）在复发性心血管疾病中的高度相互作用，也支持止血的控制。对于联合治疗，需要微调靶向，以最大限度地抑制血栓形成，并尽可能降低出血风险。

Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation

Frauke Swieringa PhD^{1,2} | Henri M.H. Spronk PhD¹ | Johan W.M. Heemskerk PhD¹ | Paola E.J. van der Meijden PhD¹

¹Department of Biochemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht University, Maastricht, The Netherlands

²Leibniz Institute for Analytical Sciences, ISAS, Dortmund, Germany

Correspondence

Paola E.J. van der Meijden, Department of Biochemistry, Cardiovascular Research Institute Maastricht (CARIM), Maastricht University, Maastricht, The Netherlands. Email: p.vandermeijden@maastrichtuniversity.nl

Funding information

Support was obtained from the Cardiovascular Centre (HVC) (J.H, P.v.d.M.) and the Alexander von Humboldt Foundation (F.S.).

Abstract

Platelets interact with the coagulation system in a multitude of ways, not only during the phases of thrombus formation, but also in specific areas within a formed thrombus. This review discusses current concepts of platelet control of thrombin generation, fibrin formation and structure, and anticoagulation. Indicated are how combined signalling via the platelet receptors for collagen (glycoprotein VI) and thrombin induces the secretion of (anti)coagulation factors, as well as surface exposure of phosphatidylserine, thereby catalysing thrombin generation. This procoagulant platelet response is also facilitated by the adhesive complexes glycoprotein Ib-V-IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. In the buildup of a platelet-fibrin thrombus, the extrinsic, tissue factor-driven coagulation pathway is predominant in early stages, while the intrinsic, factor XII pathway seems to promote at later time points. Already early generation of thrombin enforces platelet responses and stimulates intra-thrombus heterogeneity with patches of loosely aggregated, contracted, and phosphatidylserine-exposing platelets. Fibrin actively formed on the surface of activated platelets supports thrombus growth, but also captures thrombin. The fibrin distribution in a thrombus appears to rely on the local procoagulant trigger and the blood flow rate. Clinical studies support the importance of the platelet-coagulation interplay, by showing beneficial effects of combination therapy in the secondary prevention of cardiovascular disease.

KEYWORDS

coagulation, fibrin, platelets, thrombin, thrombus formation

Essentials

- Activated platelets secrete coagulation factors, expose PS, and support thrombin and fibrin formation.
- Platelet receptors for collagen and thrombin are complementary and enforce each other's activity.
- The extrinsic and intrinsic pathways are inversely balanced in the formation of a platelet-fibrin thrombus.
- Clinical studies support the high degree of interactions between platelets and coagulation.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2018 The Authors. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* published by Wiley Periodicals, Inc on behalf of International Society on Thrombosis and Haemostasis.

1 | INTRODUCTION

Over the last decade, it has become clear that the conventional concept of hemostasis and thrombosis, relying on platelets first and coagulation second, needs to be revised. Platelet and coagulation activation are not separate processes, but need to be considered as highly reciprocal and interconnected processes.^{1,2} The importance in (patho)physiology of the interplay between platelets and coagulation is evident from *in vivo* experimental thrombosis models, from clinical samples of dissected thrombi in arteries and veins *ex vivo*, as well as from complementary effects of antiplatelet and anticoagulant therapies. Mouse studies have shown that: (i) collagen as well as thrombin via tissue factor (TF) initiate arterial thrombus formation,³ (ii) both platelet and coagulation activation contribute to the thrombotic process in arteries and veins,⁴ (iii) the coagulation end product fibrin is present in initial stages of a thrombus,⁵ and (iv) essentially all thrombosis models are sensitive to deficiencies in either platelet or coagulation factors.⁶

How platelets interact with the coagulation system can be understood traditionally as a phased process during thrombus formation.^{7,8} Or rather, as we begin to understand it now, as a sequence of interactions occurring in specific areas within the developing thrombus. The general consideration is that thrombus formation starts with exposure of collagen and TF in the vessel wall, triggering platelet adhesion along with formation of first traces of thrombin. In amplification phases, procoagulant platelets in various forms promote thrombin accumulation, and aggregated platelets contract. Then there is, what we thought to be the final stage, the phase of fibrin formation, although it is now realised that the “end product” fibrin can have a role in both platelet and coagulation activation.

2 | HOW DO PLATELETS CONTROL THROMBIN GENERATION?

Platelets regulate coagulation reactions leading to thrombin generation in multiple ways; by phosphatidylserine (PS) exposure; by binding coagulation factors via the glycoprotein complexes GPIb-V-IX, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and GPVI; and via thrombin-induced activation of the protease-activated receptors (PARs) (Figure 1A). How to conceptually integrate these interaction models, is an active area of research.

2.1 | Establishment and roles of PS exposure

Exposure of the negatively charged phospholipid PS at the membrane surface has shown to be a controlling process in hemostasis, as recently observed in mice carrying platelets with deficient PS exposure.⁹ Yet, upon injury or activation, also the endothelium and other vascular cells can provide a PS-exposing surface. In platelets, the PS exposure is triggered by strong agonists (via prolonged elevated cytosolic Ca^{2+}), as well as in apoptosis (Ca^{2+} -independently via caspases)¹⁰ or necrosis.¹⁰ It was established that the ion channel, anoctamin-6 (gene *ANO6* or *TMEM16F*), is a crucial player in

Ca^{2+} -dependent PS exposure (also indicated as phospholipid scrambling), as well as swelling and ballooning of activated platelets.¹¹ Defective anoctamin-6 expression, such in patients with Scott syndrome (*ANO6* mutations) or deficient mice, leads to a mild bleeding phenotype, and platelets with failure to Ca^{2+} -dependent PS exposure and ballooning.¹² A typical agonist combination causing PS exposure is that of collagen plus thrombin, relying on signalling via GPVI. Downstream signalling components required for a prolonged Ca^{2+} elevation are the Fc receptor γ -chain (FcR γ), LAT, Src-family kinases (SFK), Syk, phospholipase $C\gamma_2$ (PLC γ_2), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) isoforms β and γ .² Other contributing pathways are entry of extracellular Ca^{2+} via Orai1 channels and the STIM1 sensor, and Ca^{2+} liberation from mitochondria.¹³ Activation of the C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2), by the snake venom toxin rhodocytin or the endogenous ligand podoplanin, results in a similar signalling cascade. Interestingly, thrombi formed on a rhodocytin surface showed relatively high PS exposure, pointing to a role of CLEC-2.⁸ Structurally, PS-exposing platelets rapidly swell and transform to a balloon shape, thereby increasing their procoagulant surface.¹⁴

The procoagulant role of PS-exposing platelets have been attributed to the high-affinity binding of Gla-domain containing coagulation factors, i.e. (activated) prothrombin, FVII, FIX, and FX.¹⁵ Cofactor FV can bind to PS membranes via its C2 domain.⁷ Microscopy studies indicated a near complete colocalization of the constituents of the tenase (FVIIIa and FIXa, activating FX) and prothrombinase (FVa and FXa, activating prothrombin) complexes with PS-exposing platelets.^{16,17} Of note, for FVIII(a) only sparse colocalization was observed, with the majority of FVIII costaining with von Willebrand factor (VWF), likely acting there as a supply pool.¹⁷ Kinetic studies have shown that PS-containing membranes enhance the activities of tenase and prothrombinase complexes by up to 1000-fold.¹⁸ PS-exposing platelets also shed extracellular vesicles (microparticles) via a mechanism that is still partly unclear. Such vesicles can accumulate under pathophysiologic conditions.¹⁹

The PS-exposing platelets are often confused with coated platelets.²⁰ The latter form a subpopulation, also arising after strong agonist stimulation, which is characterized by the formation of a covalent coat, containing transglutaminase-anchored platelet-derived proteins.²¹ Conceptually, it is now believed that, after initial PS exposure, FXIII activation by thrombin is required to de-encrypt the transglutaminase activity, and to allow cross-linking of multiple proteins including fibrin at the platelet surface.²⁰ Both transglutaminase and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ interactions are required for a platelet control of fibrin formation.

Activated platelets carry and secrete multiple coagulation factors (prothrombin, FV, an F8 transcript, FXIII, fibrinogen) and anticoagulation factors (antithrombin, various serpins). The picture that emerges from the abundance analysis of coagulation factors in both plasma and platelets (Figure 2) is that especially factors implicated in later stages of the coagulation process are stored in platelets. It can be hypothesized that especially the latter are important for formation of a sufficiently “strong” thrombus supporting hemostasis.

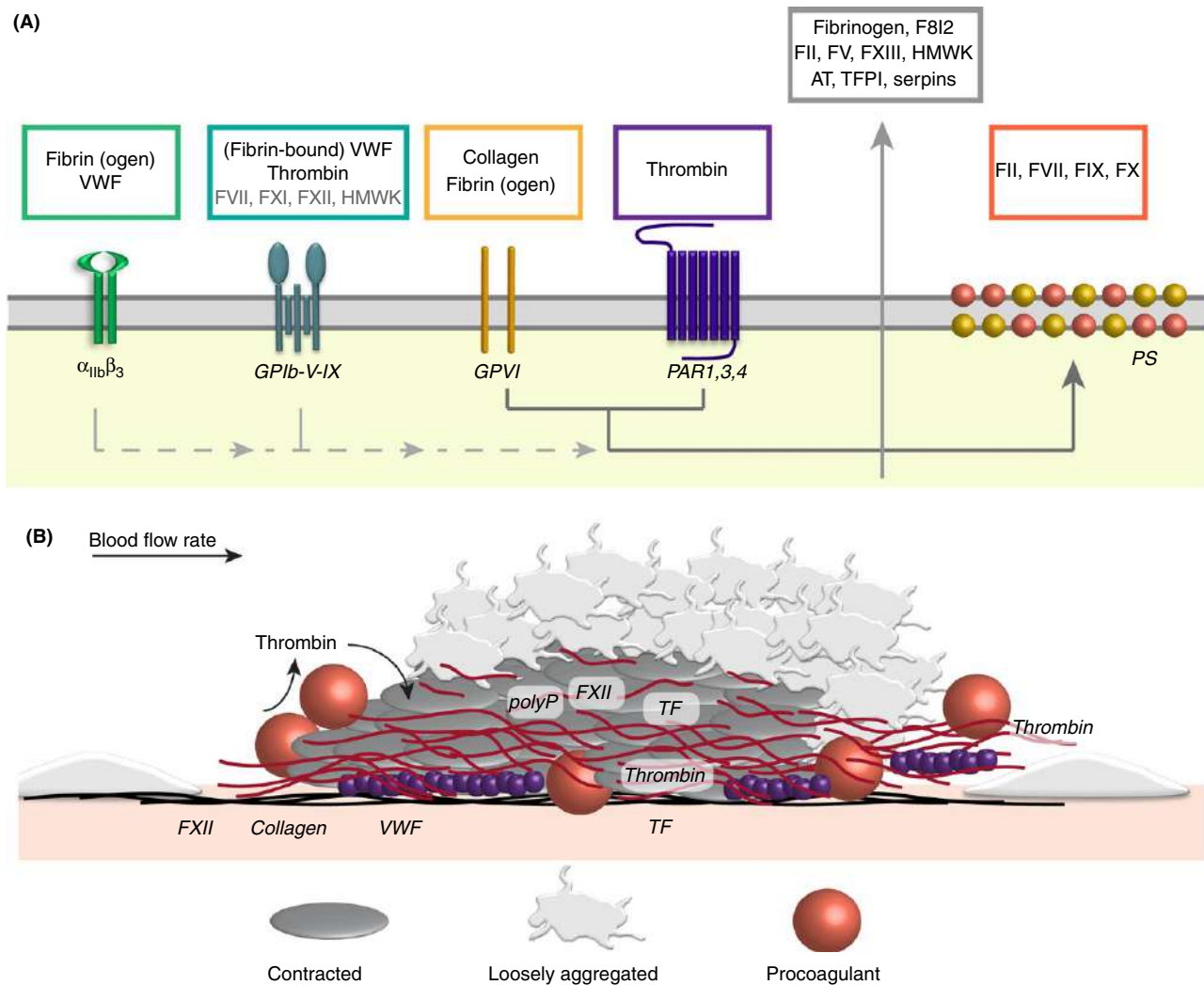


FIGURE 1 Platelet-coagulation interactions on individual platelets and in a platelet-fibrin thrombus. (A) Key platelet receptors and their (procoagulant) ligands as constituents of the platelet procoagulant function. Indicated is the contribution of platelet receptors to PS exposure (straight line, inducing; dashed line, supporting) and the binding of procoagulant factors to the PS-exposing surface, magnifying thrombin generation. Also by secreting a variety of (anti)coagulant factors, activated platelets modulate the coagulant response. (B) Platelet-fibrin thrombus showing the dynamic interaction between platelets and the coagulation system with: local platelet heterogeneity, thrombin feedback and dense vascular-oriented fibrin. Highlighted herein is the extension of the fibrin network recruiting and activating additional platelets. For further description, see text.

Exemplary is a patient with severe congenital FV deficiency, in whom residual platelet-stored FV was considered to be sufficient to prevent major bleedings. In this patient, also thrombin generation was detected in platelet-rich plasma.²²

Together, this leads to a concept, where activated platelets (coactivated by thrombin) secrete coagulation factors, expose PS, support thrombin generation, and form a fibrin coat at their surface.

2.2 | Interactions of GPIb-V-IX with VWF/FVIII and other factors

Interaction of the GPIb-V-IX complex with immobilized VWF is an initial step in shear-dependent thrombus formation and, by

implication, for ensuing platelet procoagulant activity. The GPIb complex is tightly connected with the cytoskeleton, thus defining the platelet structure.²³ On its own, GPIb-V-IX interaction with VWF induces merely weak intracellular signals (involving 14-3-3, SFK, PI3K, and small GTPase isoforms), causing only limited integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and platelet spreading.²⁴ An initial report suggested that this interaction, in coagulating plasma, enhances platelet (and PS)-dependent thrombin generation.²⁵ However, more recent data point to a role of the glycoprotein complex in platelet procoagulant activity independent of VWF and GPIb α .²⁶ Intriguingly, also a role of 14-3-3 ζ in mitochondrial-dependent PS exposure appeared to be independent of VWF-GPIb interactions.²⁷ Hence, the last word on this topic has not yet been said.

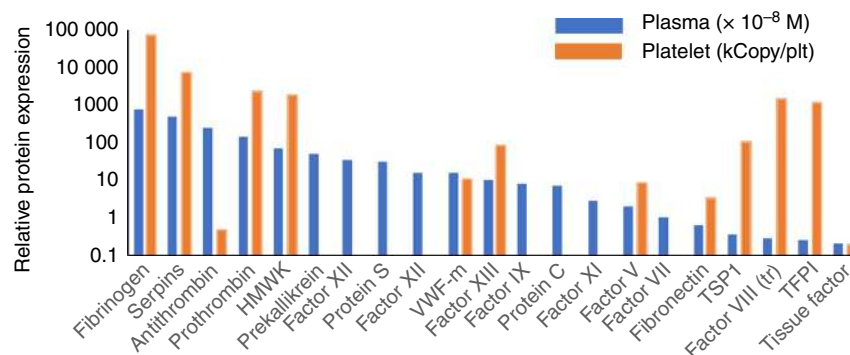


FIGURE 2 Relative abundance of (anti)coagulation proteins in platelets and plasma. Shown are the protein copy numbers (kCopy) of indicated (anti)coagulant factors per platelet (grey) as determined by mass spectrometry.¹¹⁰ In addition, average factor levels in normal plasma ($\times 10^{-8}$ mol L⁻¹, black). For FVIII, the platelet copy number refers to the F8 transcript F8I2. HMWK, high molecular weight kininogen; VWF-m, VWF-monomers; TSP1, thrombospondin 1; TFPI, tissue factor pathway inhibitor

The platelet GPIb-V-IX complex furthermore provides a high-affinity interaction site for thrombin, thus potentiating platelet activation through PAR1 and PAR4 receptors.²⁸ In addition, the GPIb complex can bind multiple other coagulation factors, such as FVII(a), FXI, FXII, and high molecular weight kininogen. The functional consequences of coagulation factor binding (other than thrombin) to GPIb-V-IX (or alternatively the apolipoprotein E receptor 2) is still largely unclear.⁷ A recent paper indicated that thrombin-stimulated FXI activation, in a way depending on GPIb, contributes to vascular inflammation in hypertensive mice,²⁹ thus pointing to a complex interaction system of GPIb, thrombin and FXI.

2.3 | Interactions of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is expressed abundantly with an estimated 80 000 copies per platelet, also with links to the actin cytoskeleton. The integrin binds fibrinogen, fibronectin, VWF, and other plasma proteins, after an agonist-induced conformational change that results in an open, activated state.³⁰ Integrin activation is pivotal for platelet aggregation, and hence for thrombus buildup and stability under flow.^{31,32} Subsequent outside-in signalling of ligand-occupied $\alpha_{IIb}\beta_3$ can trigger several coagulation-stimulating platelet responses. Recent evidence shows that $\alpha_{IIb}\beta_3$ can mechanically sense soluble fibrinogen versus platelet-bound fibrinogen to avoid “spontaneous” platelet activation.³³

During thrombus formation, integrin outside-in signalling via Src and Syk tyrosine kinases can enforce the initial thrombin-induced Ca²⁺ rises that mediate PS exposure and ensuing massive thrombin generation.³⁴ This explains why integrin antagonism causes a decreased thrombin generation in platelet-rich plasma and, thus, prolongs the clotting time.³⁵ In flow studies, treatment of patients with unstable coronary syndrome with the $\alpha_{IIb}\beta_3$ antagonist, abciximab, did not only suppress platelet accumulation, but also fibrin formation.³⁶ Overall, integrin signalling appears to enhance procoagulant PS exposure, but is insufficient to cause this by itself.

Integrin outside-in signalling is also required for the retraction of a platelet-fibrin thrombus.³⁷ Current understanding is that the activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ is a highly dynamic process, requiring persistent platelet stimulation provided by autocrine and paracrine factors, especially ADP (via P2Y₁₂ receptors).³⁸ A negative feedback mechanism is provided by $\alpha_{IIb}\beta_3$ in-activation, which in high-Ca²⁺, PS-exposing platelets is mediated by calpain cleavage of the β_3 chain and associated proteins, including Src and talin.³⁹

Summarizing, the roles of the adhesive complexes GPIb-V-IX and $\alpha_{IIb}\beta_3$ in coagulation appear to be threefold, namely: (i) facilitating (thrombin delivery, enhanced signalling), (ii) structural (cytoskeletal linked, anchoring fibrin), (iii) providing binding sites for multiple coagulation factors.

2.4 | Initiating and feedback interactions of GPVI

Stable platelet adhesion to collagen type I (to which VWF binds) relies on the receptors GPVI and integrin $\alpha_2\beta_1$.^{40,41} Thrombin clearly supports the signalling processes, as it potentiates the rises in Ca²⁺, activation of integrins $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$, and exposure of PS.¹⁸ In mice, blocking of GPVI or deficiency in either FcR γ , LAT, Syk or PLC γ 2, resulted in diminished collagen-induced thrombus formation, PS exposure as well as thrombin generation.⁴² On the other hand, a gain-of-function mutation in PLC γ 2 increased collagen-induced thrombus formation and PS exposure.⁴³

First evidence for an additional role of GPVI in later stages of thrombus formation came from the observation that, in a mouse model of FeCl₃-induced injury, GPVI deficiency or depletion mostly affected later stages of thrombus formation and vessel occlusion.⁴⁴ This agrees with a recently identified role of GPVI as receptor for fibrin, likely to be relevant for continued growth of a platelet-fibrin thrombus.⁴⁵ For both human and mouse platelets, fibrin adhesion leads to formation of a GPVI signalosome, independently of $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁴⁵ Increased exposure of PS is measured in this condition as well. Furthermore, in platelet-rich plasma from GPVI-deficient patients, a

marked impairment was seen of thrombin generation, along with reduced platelet adhesion to fibrin at low (300 s^{-1}) and high (1500 s^{-1}) shear rates.⁴⁶

In addition to these positive feedback loops between platelet and coagulation activation, there is evidence for a negative feedback process, realised by FXa-dependent shedding of GPVI on activated platelets.⁴⁷ Interestingly, no role of the protease thrombin was found in this GPVI proteolytic cleavage.

Taken together, this indicates that fibrin can play its own role in the mutually stimulatory effects of collagen and thrombin on platelets.

2.5 | Interactions by thrombin receptors

Thrombin is a key protease implicated in the initiation and propagation of the coagulation cascade, in platelet activation and in fibrin formation.² Prothrombin binds to procoagulant platelets via its Gla-domains. Once cleaved, the thrombin strongly interacts with the platelet GPIb and PAR receptors (PAR1/4 in human, PAR3/4 in mouse), thus inducing multiple responses. In the human situation, higher concentration of thrombin are required for the cleavage of PAR4, when compared to PAR1.^{48,49} Both isoforms are Gq-coupled receptors and signal via PLC β , causing quantifiable cytosolic Ca²⁺ spiking,⁵⁰ and only limited PS exposure. Thrombin-induced PAR activation enhances the GPVI-induced PS exposure of platelets.

The blood flow rate was found to be a modulating factor determining the contribution of PAR isoforms to platelet activation, i.e., declining at (pathologically) high shear rates.⁵¹ Under flow conditions, thrombin initially binds to PS-exposing platelets, but then relocates to the newly formed fibrin fibers.¹⁶ Hence, in a developed thrombus, most of the thrombin appears to be captured by fibrin. In other words, the fibrin fibers extending from a platelet thrombus function as a thrombin sink, confining this protease to the thrombus proximity. Early findings suggested that fibrin-bound thrombin is protected from inactivation by antithrombin,⁵² implicating that thrombin's activity near a thrombus is relatively high.

The PAR-type thrombin receptors can additionally be cleaved by several matrix metalloproteinases including ADAM17^{53,54} and neutrophil-derived cathepsin G.⁵⁵ Cleavage of PARs can also be accomplished by activated protein C (APC, specific for PAR1), and the fibrinolysis protease plasmin (specific for PAR4).⁵⁶ However, the relative contribution of PAR cleavage by proteases other than thrombin under flow conditions is still unknown.

The platelet-activating receptors for collagen (GPVI) and thrombin (PAR1/4 human, 3/4 mouse) are complementary in signalling and thus enforce each other's activity (e.g., in PS exposure). Both receptor types can act in both early stages (TF-produced thrombin, collagen exposure) and late stages (fibrin as a thrombin sink, GPVI as fibrin receptor) of thrombus formation and clotting.

3 | HOW DO PLATELETS CONTROL FORMATION AND PROPERTIES OF FIBRIN?

Fibrin is actively formed on the surface of activated platelets, with triggering via both the extrinsic (TF, FVII) and intrinsic (FXII, FXI) coagulation pathways. Platelets furthermore alter the fibrin network structure and coordinate the contraction of a clot (Figure 1B).

How platelets and flow change the formation and structure of fibrin clots is still largely unknown.

3.1 | Fibrin formation at the platelet surface

The traditional view is that the growth of a platelet thrombus is stabilized by thrombin and fibrin, likely formed via both the extrinsic and intrinsic routes.^{57,58} Mechanistic studies also showed that, at sufficient thrombin generation, the fibrin network can extend from the platelet and thrombus area.⁵⁹ The platelet-dependent fibrin formation is in particular triggered by TF, and contributes to the formation of a densely packed thrombus core.⁶⁰ Extensive fibrin formation can also be observed on coated platelets and, here, relies on transglutaminase (FXIII) activity and $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ binding.²⁰

3.2 | Roles of TF and FVII

Triggering of the extrinsic pathway occurs through TF, a membrane protein highly expressed on subendothelial cells (smooth muscle cells, fibroblasts, monocytes, macrophages) and at a limited extent on the inflamed endothelium.^{2,61} Thrombin generation via TF requires the presence of procoagulant membranes, which can be provided by PS-exposing platelets.² Platelets can furthermore deliver protein disulphide isomerases, which help to de-encrypt TF into its active form. There is a long debate whether the limited amount of TF expressed by platelets is capable to trigger thrombin generation.⁶² Platelets most likely inherit TF from their precursor cells, since functionally active TF could be identified in proplatelets shed from megakaryocytes.⁶³ However, given the presence of relatively high amounts of tissue-factor pathway inhibitor (TFPI) in platelets, the actual contribution of platelet-derived TF likely is limited to specific environments.⁶⁴ The physiological role of TF-expressing extracellular vesicles (microparticles)⁶⁵ is not well understood.

During the *in vivo* buildup of a platelet-fibrin thrombus, the TF-FVII(a) complex can play a rate-limiting role.⁶⁶ Also under flow conditions *ex vivo*, immobilized TF (and FVII) together with collagen supports high levels of thrombin generation, with a late-stage contribution of FXI and with fibrin serving a potent thrombin-capturing mechanism.⁶⁷

3.3 | Roles of FXI, FXII and polyphosphates

The importance of the intrinsic coagulation pathway, accomplished by FXII and FXI, in platelet-fibrin thrombus formation has been shown *in vivo* using deficient mice upon injury of healthy^{68,69}

or atherosclerotic⁶⁶ arteries. Especially at low TF levels, this pathway can be considered pivotal for the formation of platelet-fibrin thrombi.⁶⁶ Experimental mouse models support a role of FXII and FXI in (later stages) of thrombus stabilization, since deficiencies in prekallikrein, FXII, or FXI promoted thrombus embolization.⁷⁰ Similarly, pharmacological inhibition of the FXII pathway resulted in detachment of platelets from the surface of arterial thrombi.⁷¹

Intrinsic triggers of the FXII/FXI pathway include binding to collagen,⁵⁸ while it also binds to fibrin fibers but not to PS-exposing platelets.⁶⁶ The presence of FXII at fibrin fibers in a developing thrombus may ensure fibrin-dependent progression of the intrinsic coagulation pathway. However, this FXII pool can also modify the fibrin clot structure.

Platelets can enhance coagulation via FXII (auto)activation through secreted polyphosphates.⁷² However, the FXII-activating role has been questioned, as soluble polyphosphates secreted by platelets do not contain the proper longer chain length to enable this.⁷³ Kinetic studies indicated that the platelet-derived, short-chain polyphosphates rather enhance FV and FXI activation, and thus promote clot stability. The controversy may be resolved by recent insight that the FXII-activating potential can be provided by nanoparticles of clustered polyphosphates, associated with the platelet membrane.⁷⁴

Overviewing the current findings, there appears to be an “inverted balance” between the contribution of extrinsic (TF, FVII) and intrinsic (FXII, FXI) pathways in the formation of a platelet-fibrin thrombus. The extrinsic route is most strongly active near the vessel wall with perhaps a small role of platelets (extracellular vesicles) expressing TF later on; the intrinsic route is moderately stimulated on collagen surfaces, and possibly enhanced later via polyphosphate clusters.

3.4 | Regulation of fibrin formation and properties

Several observations have shown that platelet-dependent fibrin formation starts at the thrombus base (near the site of TF), then growing upwards within and outside the thrombus, depending on the local procoagulant trigger.⁷⁵ Analysis of the elastic-mechanical properties pointed to a relatively low elasticity of the fibrin inside platelet thrombi. Key elements for high elasticity, outside of platelet thrombi, were a relatively low blood flow and a low TF trigger. When reducing the elasticity, e.g., by inhibiting fibrin polymerization, thrombi become vulnerable to shed emboli.⁷⁶

By regulating the local thrombin concentration,⁷⁷ platelets can also indirectly influence the structure of the surrounding fibrin network. The prevailing concept is that, at low thrombin concentrations, thick fibrin fibers are formed in a loose network (more susceptible for fibrinolysis), while at high thrombin concentrations thin fibrin fibers pack into a tight network (more resistant to lysis).⁷⁸ An explanation for the lytic resistance is the low tissue plasminogen activator (tPA)-mediated plasmin generation at thinner fibrin fibers. Incorporation of red cells may lead to distinct regions of highly packed fibrin fibers next to areas of limited fiber

formation.⁷⁹ Under specific circumstances, also neutrophils and red blood cells can contribute to thrombin generation. This is not further discussed here.

The complexity of platelet-fibrin interactions becomes evident from studies with patients with complete fibrinogen deficiency. These patients can suffer from both arterial and venous thrombotic events.⁸⁰ This is explained by a higher circulating thrombin activity, as generated thrombin is no longer retained by fibrin, with as a result increased thrombin-induced platelet activation.⁸¹ On the other hand, a lack of fibrin in the patients' thrombi reduces the stability and increases embolization.⁸² In platelets from Scott syndrome patients or anoctamin-6 deficient mice, with defective PS exposure, fibrin formation is also impaired.^{9,75}

3.5 | Clot retraction

After the formation of a platelet-fibrin thrombus, clot retraction is essential for proper hemostasis as it tightens the wound edges. Clot retraction can also be considered as a way of platelet-platelet contact-dependent signalling.⁸³ Most likely, thrombus contraction refers to the same process of tightening platelet-platelet contacts in a fibrin environment,³⁷ although thrombus contraction can also occur at limited extent without fibrin.⁸⁴

Clot retraction, in the presence of thrombin, relies on the binding of fibrin(ogen) to activated $\alpha_{IIb}\beta_3$ and subsequent outside-in signalling events, ultimately leading to actin-myosin rearrangements.³⁰ Platelets from multiple mouse strains with deficiencies in (integrin) signalling proteins, or lacking cytoskeleton-associated proteins show an impairment in clot retraction.³⁷ Strikingly, the nonaggregated, PS-exposing platelets do not contribute to this process, likely because of calpain degradation of the actin cytoskeleton.³⁹

Taking this together, clot retraction may ensure that the vascular-oriented fibrin within a thrombus shows: (i) low elasticity (high stiffness), (ii) tight packing, (iii) and thrombus stabilising effect. The underlying mechanisms still need further elucidation.

4 | THE FEEDBACK LOOPS OF THROMBUS HETEROGENEITY

Multiple factors have been listed explaining the structural and functional heterogeneity of platelets, while in circulation or when assembled into thrombi.⁷ In a growing thrombus, individual platelets become exposed to different micro-environments (e.g., binding to collagen or adjacent to TF). However, response variation has also been examined between single adhered platelets, seemingly exposed to the same micro-environment.⁴² The intrinsic factors of platelet heterogeneity are largely unknown, but likely include variation between megakaryocytes and the ageing of platelets.⁸⁵ In vivo observations also point to an overall heterogeneity in thrombus buildup.⁶⁰ Platelets (with secretion and integrin activation) appear to be densely packed platelets in the thrombus core, which is

surrounded by loosely adhered platelets in the outer thrombus shell. This implies a certain degree of cross-cellular communication in the thrombus core, such as indeed has been reported.⁸⁶ Neighboring platelets can form gap junctions, which might be a requirement for dense packing and platelet contraction.⁸⁷

Platelets with high Ca^{2+} fluxes, for instance upon collagen and thrombin costimulation, appear as another population in thrombi in vitro and in vivo. These platelets are characterized by PS exposure, ballooning, and microparticle shedding.⁸⁸ In mice, the injection of a PS scavenger (annexin A5 or lactadherin) resulted in a reduced arterial thrombus formation, underlining the procoagulant function this population.^{4,89} Typically, these platelets are unable to $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation,³⁹ and are separated from the patches of aggregated platelets.¹⁶ This thrombus heterogeneity likely is caused—next to intrinsic differences between individual platelets—by different exposure of the platelets to soluble agonists such as ADP, thromboxane and thrombin, as well as by a varying hemodynamic environment.² Other factors for heterogeneous thrombus growth can be the vascular bed and the (patho)physiological state of the injured vessel.

Microfluidics studies have pointed to a positive feedback loop between PS-exposing platelets and thrombin activity under flow conditions. Thus, where coagulation is restricted—in hemophilia blood or dilutional coagulopathy—especially the population of PS-exposing platelets becomes reduced.⁷⁵ This points to a thrombin-dependent enhancement of PS exposure that results in additional thrombin generation. Intrathrombus heterogeneity is also observed for the fibrinolysis factor, plasmin, preferably binding to PS-exposing platelets.⁹⁰

Conclusively, thrombus formation relies on a continuous and dynamic interaction between platelets and the coagulation system. Intrathrombus heterogeneity with different patches of (loosely) aggregated, contracted and PS-exposing platelets is enforced by the positive feedback loop of thrombin generation and thrombin responses.

5 | HOW DO PLATELETS CONTROL ANTICOAGULATION?

Coagulant activity is tightly balanced by both pro- and anticoagulant factors. Several anticoagulation factors are present in the blood, including the protein C/protein S complex, TFPI and antithrombin. Limited information is available on a role of platelets in the anticoagulant processes.

5.1 | Protein C, protein S and TFPI

The vitamin K-dependent proteins C and S are known to bind to PS-exposing membranes via their Gla-domains, with protein C as protease and protein S as membrane-binding cofactor. Thrombin-activated protein C (APC) selectively inactivates FVIIIa and FVa, thus suppressing tenase and prothrombinase activities. How the protein C/S anticoagulant pathway contributes to thrombus formation is

unknown. Clinically, the importance of APC cleavage is emphasised by the fact that patients with a FV-Leiden mutation (carrying a FVa mutation that cannot be inactivated by APC) have an increased risk of venous thromboembolism. On the other hand, mice with a homozygous FV-Leiden mutation displayed normal mesenteric arterial thrombus formation.⁴ A meta-analysis revealed a relative risk increase of myocardial infarction and coronary stenosis for carriers of the FV-Leiden allele of only 1.17, suggesting a no more than moderate association with arterial thrombosis.⁹¹

The anticoagulant TFPI, a Kunitz-type protease inhibitor, reversibly inhibits the TF/FVIIa, FXa, and protein C pathways, attenuating thrombin generation through proteolytic inhibition of the cofactors FVa and FVIIIa. The isoform TFPI α , carrying all three Kunitz domains, actively inhibits TF/FVIIa and FXa, interestingly in a protein S-dependent manner.⁹² While TFPI α circulates in the blood at low concentrations, levels may locally increase due to platelet secretion. TFPI has indeed been detected on the surface of (coated) platelets. In vivo, mouse TFPI was shown to suppress thrombus growth.⁶⁴ Ex vivo, the role of (plasma) TFPI appeared to be confined to conditions of low coagulant strength.⁹³

5.2 | Antithrombin

Antithrombin is a key serpin (serine protease inhibitor) that targets multiple activated coagulation factors, especially thrombin and to a lesser extent FVIIa and FIXa-XIIa.² Antithrombin is an effective inhibitor of thrombin generation in plasma, and its activity is greatly enhanced by heparins. Antithrombin has not yet been identified in developing thrombi.

Interestingly, PS-exposing platelets can serve as assembly sites for both coagulant and anticoagulant factors. How anticoagulants compete with the coagulant factors, however, remains unclear. For the active-site inhibitors, antithrombin and C1 inhibitor, no platelet binding sites are known.

Taken together, no more than little is known how anticoagulant factors interact with platelets, and how anticoagulant mechanisms can restrict thrombus growth and stability.

6 | PARADOXICAL EFFECTS OF BLOOD FLOW RATE

In general, arterial thrombi (formed at high wall shear rates) are rich in white platelets and fibrin fibers, whereas venous thrombi (formed at low shear rates) are usually more red with a fibrin network, platelet clumps, and incorporated red blood cells.⁹⁴ Microfluidics studies have provided insight into these processes.

Both platelet and coagulant activity rely on the local blood flow and shear conditions. A relevant parameter here is the wall shear rate (near-wall sliding rate), which is low in the venous part of the circulation, and gradually rises from large arteries to small arterioles of the microcirculation.⁹⁵ At arterial flow conditions, platelet deposition and hence thrombus formation increases with the wall-shear

rate (and hence flow rate) through GPIIb-V-IX interaction with VWF. Also the contribution of GPVI and P2Y₁₂ receptors increases at higher shear rate.⁹⁶ At pathological, very high wall shear rates up to 10 000 s⁻¹, at sites of stenosis, VWF is released from the endothelium, thus further enforcing platelet deposition.⁹⁷ On the other hand, coagulation processes are enhanced at lower flow rates, as this limits dilution and facilitates thrombin accumulation. Mathematical models show that flow rate determines the transport rates of coagulation factors and thereby the extent of fibrin polymerization.⁹⁸

Accordingly, depending on the flow conditions, either platelet adhesion (high shear) or thrombin/fibrin generation (low flow) can act as driving factors for thrombus formation.^{16,75} By extension, local differences in shear and flow rate may result in a differential formation of thrombin and fibrin within a growing thrombus.⁹⁹ Typically, shear and flow rates will drastically increase during thrombus growth, a condition fostered by stenotic sites, which promote platelet adhesion, but also embolus shedding. On the other hand, interstitial flow rates can be relatively low near developing thrombi and stenotic sites, which will prevent coagulation factors from dilution.¹⁰⁰ This may explain the heterogeneous fibrin buildup often seen in and around a thrombus. Blood flow also stimulates the fibrinolysis process by enhancing the dissolution of platelet-fibrin thrombi, provided the presence of a fibrinolysis trigger such as tPA.⁹⁰

The prevailing flow and wall shear conditions may, reciprocally, determine not only the global buildup of a platelet-fibrin thrombus, but also part of the heterogeneity in thrombin and fibrin accumulation within the thrombus.

7 | SOME CLINICAL CONSIDERATIONS

Antithrombotic therapy for the secondary prevention of cardiovascular events typically consists of two antiplatelet drugs, given for a certain period of time. In multiple studies, dual antiplatelet therapy (aspirin with P2Y₁₂ receptor blocker) has shown to be beneficial, although recurrent thrombotic events are not completely eliminated and the risk of bleeding events is relatively high.¹⁰¹ As a possible improvement, the PAR1 antagonist vorapaxar has been examined. Vorapaxar only blocks the platelet effects of thrombin, while leaving unaffected thrombin's effects in coagulation.¹⁰² The TRA2P-TIMI 50 study evaluated a combination of vorapaxar with aspirin and clopidogrel (P2Y₁₂ antagonist) in patients with stable acute coronary syndrome, and reported a lowering in cardiovascular events, but at the expense of increased major bleeding.¹⁰³ Complications here can be platelet-independent effects of vorapaxar, i.e., on endothelial and smooth muscle cell PAR receptors.

Concerning coagulation targeting, the early WARIS¹⁰⁴ and ASPECT¹⁰⁵ trials demonstrated a clinical benefit of vitamin K antagonists for the secondary prevention of coronary artery disease, although bleeding increased. Yet, dual-antiplatelet therapy was found to be more effective. More recently, direct thrombin and FXa inhibitors were evaluated in such patients, mostly in combination with

dual antiplatelet therapy. The APPRAISE-2 trial, using apixiban (FXa inhibitor) on top of aspirin plus P2Y₁₂ inhibitor, was terminated prematurely, due to negative effects on recurrence and higher major bleeding.¹⁰⁶ The ATLAS ACS-2 trial tested a low dose of rivaroxaban (FXa inhibitor), again for the majority of patients on top of dual antiplatelet therapy (aspirin plus thienopyridine), and had a more positive outcome on the primary endpoint—a composite of myocardial infarction, cardiovascular death or stroke—albeit again at the expense of bleeding events.¹⁰⁷

More recently, multiple studies have combined low rivaroxaban with either a P2Y₁₂ antagonist or aspirin. The recently published COMPASS trial reports a superiority of low-dose rivaroxaban plus aspirin versus aspirin alone regarding the primary endpoint.¹⁰⁸ No difference was found between the groups in intracranial or fatal bleeding, but major bleeding again was by the combined treatment. The ATLAS ACS-2 study indicated that joint inhibition of platelets (aspirin plus P2Y₁₂ antagonist) and coagulation (rivaroxaban), when compared to dual antiplatelet therapy alone, reduced the risk of in-stent thrombosis.¹⁰⁹

Clinical studies thus support the high degree of interactions between platelet activation (by soluble agonists ADP and, thromboxane) and coagulation (thrombin) in recurrent cardiovascular disease, and also in the control of hemostasis. For combination therapies, fine-tuned targeting will be needed to achieve maximal suppression of thrombus formation with minimal bleeding risk.

RELATIONSHIP DISCLOSURE

P.v.d.M. reports a collaboration with Bayer. F.S., H.S., and J.H. have nothing to disclose.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.S. reviewed the literature and drafted the manuscript. H.S., J. H., and P.v.d.M. completed and revised the manuscript.

REFERENCES

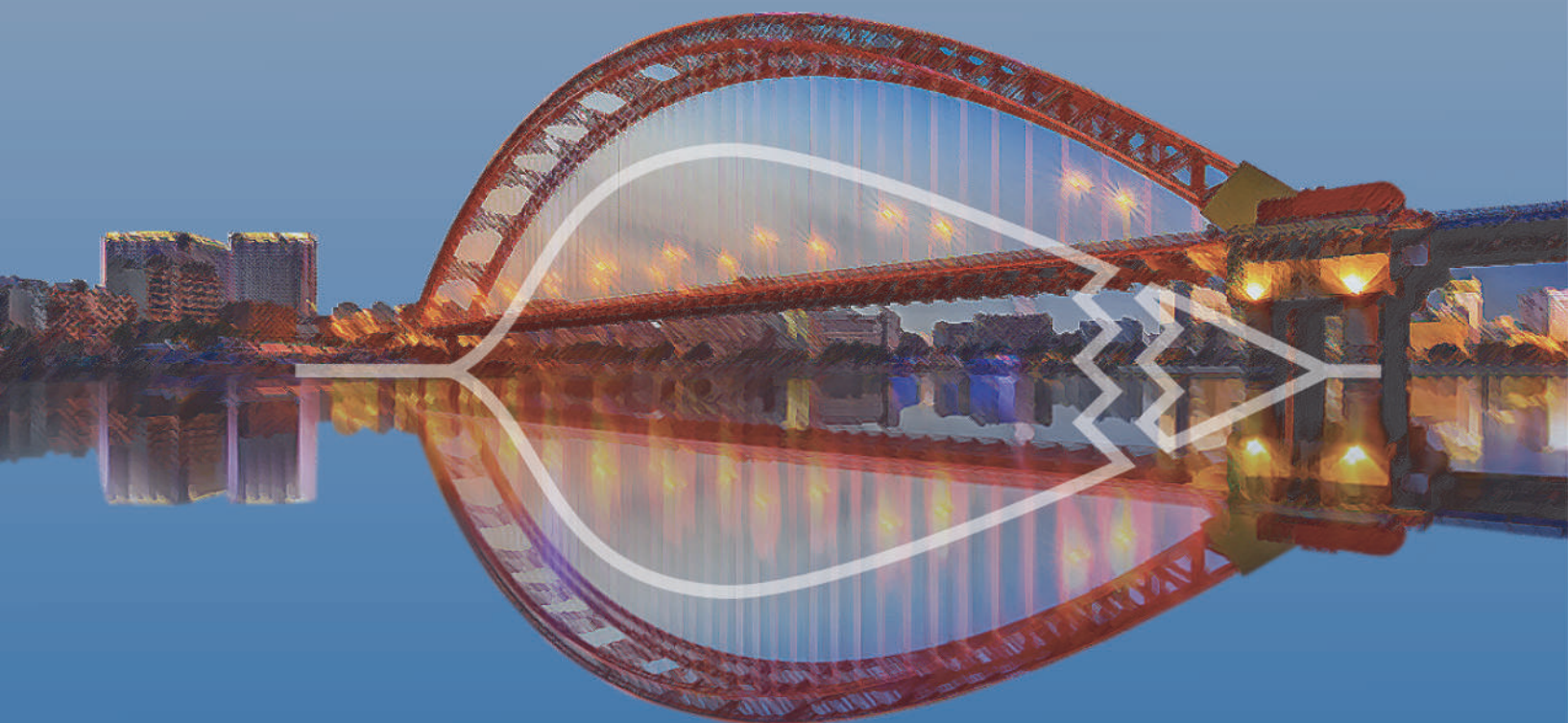
1. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008;451:914–8.
2. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PS. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93:327–58.
3. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006;107:3902–6.
4. Kuijpers MJ, Munnix IC, Cosemans JM, et al. Key role of platelet procoagulant activity in tissue factor- and collagen-dependent thrombus formation in arterioles and venules in vivo. Differential sensitivity to thrombin inhibition. *Microcirculation*. 2008;15:269–82.
5. Furie B, Furie BC. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest*. 2005;115:3355–62.
6. Jackson SP. Arterial thrombosis: insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17:1423–36.
7. Heemskerk JW, Mattheij N, Cosemans JM. Platelet-based coagulation: different populations, different functions. *J Thromb Haemost*. 2013;11:2–11.

8. De Witt SM, Lamers MM, Swieringa F, et al. Identification of platelet function defects by multi-parameter assessment of thrombus formation. *Nat Commun*. 2014;5:4257.
9. Baig AA, Haining EJ, Geuss E, et al. TMEM16F-mediated platelet membrane phospholipid scrambling is critical for hemostasis and thrombosis but not thromboinflammation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:2152–7.
10. Jackson SP, Schoenwaelder SM. Procoagulant platelets – are they necrotic? *Blood*. 2010;116:2011–8.
11. Mattheij NJ, Braun A, van Kruchten R, et al. Survival protein anoctamin-6 controls multiple platelet responses including phospholipid scrambling, swelling and protein cleavage. *FASEB J*. 2016;30:727–37.
12. Van Kruchten R, Mattheij NJ, Saunders C, et al. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation. *Blood*. 2013;121:1850–7.
13. Braun A, Vogtle T, Varga-Szabo D, Nieswandt B. STIM and Orai in hemostasis and thrombosis. *Front Biosci*. 2011;16:2144–60.
14. Agbani EO, van den Bosch MT, Brown E, et al. Coordinated membrane ballooning and procoagulant spreading in human platelets. *Circulation*. 2015;132:1414–24.
15. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1381–9.
16. Berny MA, Munnix IC, Auger JM, et al. Spatial distribution of factor Xa, thrombin, and fibrin(ogen) on thrombi at venous shear. *PLoS ONE*. 2010;5:e10415.
17. Swieringa F, Kuijpers MJ, Lamers MM, van der Meijden PE, Heemskerk JW. Rate-limiting roles of tenase complex of factors VIII and IX in platelet procoagulant activity and formation of platelet-fibrin thrombi under flow. *Haematologica*. 2016;100:748–56.
18. Heemskerk JW, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thromb Haemost*. 2002;88:186–93.
19. Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;31:15–26.
20. Mattheij NJ, Swieringa F, Mastenbroek TG, et al. Coated platelets function in platelet-dependent fibrin formation via integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and transglutaminase factor XIII. *Haematologica*. 2016;101:427–36.
21. Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*. 2007;109:1931–7.
22. Duckers C, Simioni P, Spiezia L, et al. Residual platelet factor V ensures thrombin generation in patients with severe congenital factor V deficiency and mild bleeding symptoms. *Blood*. 2010;115:879–86.
23. Clemetson KJ. A short history of platelet glycoprotein Ib complex. *Thromb Haemost*. 2007;98:63–8.
24. Canobbio I, Balduini C, Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell Signal*. 2004;16:1329–44.
25. Béguin S, Kumar R, Keularts I, Seligsohn U, Collier BS, Hemker HC. Fibrin-dependent platelet procoagulant activity requires GPIb receptors and von Willebrand factor. *Blood*. 1999;93:564–70.
26. Ravanat C, Strassel C, Hechler B, et al. A central role of GPIb-IX in the procoagulant function of platelets that is independent of the 45-kDa GPIbA N-terminal extracellular domain. *Blood*. 2010;116:1157–64.
27. Schoenwaelder SM, Darbousset R, Cranmer SL, et al. 14-3-3 ζ regulates the mitochondrial respiratory reserve linked to platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Nat Commun*. 2016;7:12862.
28. De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R. Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of PAR-1 on intact platelets. *J Biol Chem*. 2001;276:4692–8.
29. Kossmann S, Lagrange J, Jackel S, et al. Platelet-localized FXI promotes a vascular coagulation-inflammatory circuit in arterial hypertension. *Sci Transl Med*. 2017;9:eaah4923.
30. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:288–300.
31. Goto S, Tamura N, Ishida H, Ruggeri ZM. Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:155–62.
32. Cosemans JM, Iserbyt BF, Deckmyn H, Heemskerk JW. Multiple pathways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost*. 2008;6:1253–61.
33. Zhang Y, Qiu Y, Blanchard AT, et al. Platelet integrins exhibit anisotropic mechanosensing and harness piconewton forces to mediate platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:325–30.
34. Van der Meijden PE, Feijge MA, Swieringa F, et al. Key role of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:3481–92.
35. Goto S, Tamura N, Li M, et al. Differential effects of various anti-GPIIb/IIIa agents on shear-induced platelet activation and expression of procoagulant activity. *J Thromb Haemost*. 2003;1:2022–30.
36. Dangas G, Badimon JJ, Collier BS, et al. Administration of abciximab during percutaneous coronary intervention reduces both ex vivo platelet thrombus formation and fibrin deposition: implications for a potential anticoagulant effect of abciximab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:1342–9.
37. De Witt S, Verdoold R, Cosemans JM, Heemskerk JW. Insights into platelet-based control of coagulation. *Thromb Res*. 2014;133:S139–48.
38. Canobbio I, Stefanini L, Cipolla L, et al. Genetic evidence for a predominant role of PI3Kb catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets. *Blood*. 2009;114:2193–6.
39. Mattheij NJ, Gilio K, Van Kruchten R, et al. Dual mechanism of integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ closure in procoagulant platelets. *J Biol Chem*. 2013;288:13325–36.
40. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, et al. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\text{b}1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J*. 2001;20:2120–30.
41. Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, et al. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood*. 2004;103:1333–41.
42. Auger JM, Kuijpers MJ, Senis Y, Watson SP, Heemskerk JW. Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *FASEB J*. 2005;19:825–7.
43. Evers M, Pozgai R, Varga-Szabo D, et al. Platelet hyperactivity and a prothrombotic phenotype in mice with a gain-of-function mutation in phospholipase Cg2. *J Thromb Haemost*. 2010;8:1353–63.
44. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein VI deficiency equally protects mice from mechanically and FeCl_3 -induced thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9:1423–6.
45. Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, et al. Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets. *Blood*. 2015;126:1601–8.
46. Mammadova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, et al. Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation. *Blood*. 2015;126:683–91.
47. Al-Tamimi M, Grigoriadis G, Tran H, et al. Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa. *Blood*. 2011;117:3912–20.
48. Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu WF, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator

- of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:11189–93.
49. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1800–14.
 50. Van Gorp RM, Feijge MA, Vuist WM, Rook MB, Heemskerk JW. Irregular spiking in free calcium concentration in human platelets. Regulation by modulation of the inositol trisphosphate receptors. *Eur J Biochem*. 2002;269:1543–52.
 51. Lee H, Sturgeon SA, Jackson SP, Hamilton JR. The contribution of thrombin-induced platelet activation to thrombus growth is diminished under pathological blood shear conditions. *Thromb Haemost*. 2012;107:328–37.
 52. Weitz JL, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest*. 1990;86–91:385.
 53. Andrews RK, Karunakaran D, Gardiner EE, Berndt MC. Platelet receptor proteolysis. A mechanism for downregulating platelet reactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1511–20.
 54. Trivedi V, Boire A, Tchernychev B, et al. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic site. *Cell*. 2009;137:332–43.
 55. Sambrano GR, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Coughlin SR. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem*. 2000;275:6819–23.
 56. Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, Kunapuli SP. Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem*. 2004;279:18434–9.
 57. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1687–93.
 58. Van der Meijden PE, Munnix IC, Auger JM, et al. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus and clot formation. *Blood*. 2009;114:881–90.
 59. Reininger AJ, Bernlochner I, Penz SM, et al. A 2-step mechanism of arterial thrombus formation induced by human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1147–58.
 60. Stalker TJ, Welsh JD, Brass LF. Shaping the platelet response to vascular injury. *Curr Opin Hematol*. 2014;21:410–7.
 61. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry*. 2006;45:12020–8.
 62. Müller I, Klocke A, Alex M, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J*. 2003;17:476–8.
 63. Brambilla M, Facchinetti L, Canzano P, et al. Human megakaryocytes confer tissue factor to a subset of shed platelets to stimulate thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2015;114:579–92.
 64. Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, Bonesho CE, Mast AE. Murine hematopoietic cell tissue factor pathway inhibitor limits thrombus growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:821–6.
 65. Owens AP, Mackman N. Role of tissue factor in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14:394–401.
 66. Kuijpers MJ, van der Meijden PE, Feijge MA, et al. Factor XIIa regulates the pathological process of thrombus formation on ruptured plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1674–80.
 67. Zhu S, Lu Y, Sinno T, Diamond SL. Dynamics of thrombin generation and flux from clots during whole human blood flow over collagen/tissue factor surfaces. *J Biol Chem*. 2016;291:23027–35.
 68. Kleinschnitz C, Stoll G, Bendszus M, et al. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med*. 2006;203:513–8.
 69. Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood*. 2010;116:3981–9.
 70. Renné T, Pozgajova M, Grüner S, et al. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*. 2005;202:271–81.
 71. Hagedorn I, Schmidbauer S, Pleines I, et al. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation*. 2010;121:1510–7.
 72. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*. 2009;139:1143–56.
 73. Smith SA, Choi SH, Davis-Harrison R, et al. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on the polymer size. *Blood*. 2010;116:4353–9.
 74. Verhoef JJ, Barendrecht AD, Nickel KF, et al. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*. 2017;129:1707–17.
 75. Swieringa F, Baaten CC, Verdoold R, et al. Platelet control of fibrin distribution and microelasticity in thrombus formation under flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:692–9.
 76. Colace TV, Muthard RW, Diamond SL. Thrombus growth and embolism on tissue factor-bearing collagen surfaces under flow. Role of thrombin with and without fibrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1466–76.
 77. Blomback B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res*. 1994;75:521–38.
 78. Wolberg AS, Aleman MM, Leiderman K, Machlus KR. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited. *Anesth Analg*. 2012;114:275–85.
 79. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb Haemost*. 2009;102:1169–75.
 80. Girolami A, de Marinis GB, Bonamigo E, Lombardi AM. Recombinant FVIIa concentrate-associated thrombotic events in congenital bleeding disorders other than hemophilias. *Haematology*. 2012;17:346–9.
 81. Korte W, Feldges A. Increased prothrombin activation in a patient with congenital afibrinogenemia is reversible by fibrinogen substitution. *Clin Invest*. 1994;72:396–8.
 82. Remijn JA, Wu YP, IJsseldijk MJ, Zwaginga JJ, Sixma JJ, de Groot PG. Absence of fibrinogen in afibrinogenemia results in large but loosely packed thrombi under flow conditions. *Thromb Haemost*. 2001;85:736–42.
 83. Schoenwaelder SM, Yuan Y, Josefsson EC, et al. Two distinct pathways regulate platelet phosphatidylserine exposure and procoagulant function. *Blood*. 2009;114:663–6.
 84. Auger JM, Watson SP. Dynamic tyrosine kinase-regulated signaling and actin polymerisation mediate aggregate stability under shear. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1499–504.
 85. Baaten CC, ten Cate H, van der Meijden PE, Heemskerk JW. Platelet populations and priming in hematological diseases. *Blood Rev*. 2017;31:389–389.
 86. Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS, Jackson SP. Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol*. 2003;160:1151–61.
 87. Vaiyapuri S, Jones CI, Sasikumar P, et al. Gap junctions and connexin hemichannels underpin hemostasis and thrombosis. *Circulation*. 2012;125:2479–91.
 88. Munnix IC, Kuijpers MJ, Auger JM, et al. Segregation of platelet aggregatory and procoagulant microdomains in thrombus formation.

- Regulation by transient integrin activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2484–90.
89. Shi J, Pipe JT, Heegaard CW, Gilbert GE. Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis in vivo: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *J Thromb Haemost.* 2008;6:1167–74.
 90. Whyte CS, Swieringa F, Mastenbroek TG, et al. Plasminogen associates with phosphatidylserine-exposing platelets and contributes to thrombus lysis under flow. *Blood.* 2015;125:2568–78.
 91. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet.* 2006;367:651–8.
 92. Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:3106–11.
 93. Thomassen S, Mastenbroek TG, Swieringa F, et al. Suppressive role of tissue factor pathway inhibitor-a in platelet-dependent fibrin formation under flow is restricted to low procoagulant strength. *Thromb Haemost.* 2018;118:502–13.
 94. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res.* 2014;114:1852–66.
 95. Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL. Platelets and shear stress. *Blood.* 1996;88:1525–41.
 96. Nergiz-Unal R, Cossemans JM, Feijge MA, et al. Stabilizing role of platelet P2Y₁₂ receptors in shear-dependent thrombus formation on ruptured plaques. *PLoS ONE.* 2010;5:e10130.
 97. Westein E, van der Meer AD, Kuijpers MJ, Frimat JP, van den Berg A, Heemskerk JW. Atherosclerotic geometries spatially confine and exacerbate pathological thrombus formation poststenosis in a von Willebrand factor-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110:1357–62.
 98. Neeves KB, Illing DA, Diamond SL. Thrombin flux and wall shear rate regulate fibrin fiber deposition state during polymerization under flow. *Biophys J.* 2010;98:1344–52.
 99. Welsh JD, Colace TV, Muthard RW, Stalker TJ, Brass LF, Diamond SL. Platelet-targeting sensor reveals thrombin gradient within blood clots forming in microfluidic assay in mouse. *J Thromb Haemost.* 2012;10:2344–453.
 100. Onasoga-Jarvis AA, Puls TJ, O'Brien SK, Kuang L, Liang HJ. Thrombin generation and fibrin formation under flow on biomimetic tissue factor-rich surfaces. *J Thromb Haemost.* 2014;12:373–82.
 101. Wallentin L, Becker RC, Budai A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2009;361:1045–57.
 102. Angiolillo DJ, Capodanno D, Goto S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. *Eur Heart J.* 2010;31:17–28.
 103. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med.* 2012;366:1404–13.
 104. Smith P, Arnesen H, Holme I. The effect of warfarin on mortality and reinfarction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1990;323:147–52.
 105. ASPECT Investigators. Effect of long-term oral anticoagulant treatment on mortality and cardiovascular morbidity after myocardial infarction. Anticoagulants in the secondary prevention of events in coronary thrombosis (ASPECT) research group. *Lancet.* 1994;343:499–503.
 106. Alexander JH, Lopes RD, James S, et al. Apixaban with antiplatelet therapy after acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2011;365:699–708.
 107. Mega JL, Braunwald E, Wiviott SD, et al. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012;366:9–19.
 108. Eikelboom JW, Connolly SJ, Bosch J, et al. Rivaroxaban with or without aspirin in stable cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2017;377:1319–30.
 109. Gibson CM, Chakrabarti AK, Mega J, et al. Reduction of stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with rivaroxaban in ATLAS-ACS 2 TIMI 51. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:286–90.
 110. Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 2012;120:e73–82.

How to cite this article: Swieringa F, Spronk HMH, Heemskerk JWM, van der Meijden PEJ. Integrating platelet and coagulation activation in fibrin clot formation. *Res Pract Thromb Haemost.* 2018;2:450–460. <https://doi.org/10.1002/rth2.12107>



阳普医疗ImproClot®血栓弹力图仪, 架设健康的桥梁!



阳普医疗ImproClot® 血栓弹力图仪

广州阳普医疗科技股份有限公司出版
仅供阳普医疗内部使用。
本刊所连载及翻译文章, 版权属原作者及
阳普医疗所有, 请勿用于其他用途!

MKD-069

医学
拾萃

IMPROVE REVIEW

 广州阳普医疗科技股份有限公司
GUANG ZHOU IMPROVE MEDICAL INSTRUMENTS CO., LTD

地址：广州市经济技术开发区科学城开源大道102号

服务热线：400-130-0030

电话：+86 20-3231-2666

传真：+86 20-3231-2667

网站：www.improve-medical.com

邮编：510530