

文章编号:1004-7220(2023)03-0608-07

运用微流控技术分析替洛非班对剪切力诱导血小板聚集的抑制效果

高雪梅, 黄小静, 张天聪, 宦宣容, 陈丹, 何翠, 李远

(重庆医科大学附属永川医院 中心实验室, 重庆 402160)

摘要:目的 观察替洛非班对不同剪切力诱导血小板聚集的抑制效果,为临床不同血流动力学环境下形成血栓情况提供用药参考。方法 采用软光刻工艺加工聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS)-玻璃微通道芯片。收集健康志愿者枸橼酸钠抗凝全血,用不同浓度替洛非班体外孵育后,分别以 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的入口条件流过直通通道和 80% 狭窄微通道 150 s,直通通道中 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时壁面剪切率分别为 300、1 500 s^{-1} ,80% 狭窄通道中 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时最大壁面剪切率分别为 1 600、7 500 s^{-1} 。用显微镜拍摄荧光标记血小板在玻璃表面的黏附聚集图像,并用 Image J 分析荧光图像。以血小板表面覆盖率为血小板聚集行为的量化指标,计算不同剪切率条件下替洛非班抑制血小板的半抑制率浓度 (IC_{50})。流式细胞仪检测以 52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流过 80% 狭窄微通道后全血中血小板活化指标 (CD62P, PAC-1)。结果 替洛非班抑制血小板聚集具有剂量依赖性,且抑制效果与剪切率相关。在 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 条件下,直通通道内浓度达 100 nmol/L 时,聚集几乎完全被抑制;80% 狭窄通道内浓度达 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,聚集几乎完全被抑制。直通通道中 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时 IC_{50} 分别为 2.3、0.5 nmol/L;80% 狭窄通道中 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时 IC_{50} 分别为 20.73、4.5 nmol/L。病理性高剪切力可诱导血小板活化,替洛非班可抑制该活化行为。结论 替洛非班可有效抑制剪切力诱导的血小板聚集,临床实践中应根据不同剪切力环境下形成的血栓给予不同浓度替洛非班治疗。

关键词: 血小板聚集; 微流控技术; 剪切力; 替洛非班

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.03.027

Analysis of the Inhibitory Effect of Tirofiban on Shear-Induced Platelet Aggregation by Microfluidic Technique

GAO Xuemei, HUANG Xiaojing, ZHANG Tiancong, HUAN Xuanrong, CHEN Dan, HE Cui, LI Yuan

(Central Laboratory, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China)

Abstract: **Objective** To observe the inhibitory effect of Tirofiban on different shear-induced platelet aggregation, and to provide medication suggestions for the treatment of thrombosis in different hemodynamic environment. **Methods** Polydimethylsiloxane (PDMS)-glass microchannel chips were fabricated by soft lithography. The whole blood of healthy volunteers anticoagulated with sodium citrate was collected and incubated with different concentrations of Tirofiban *in vitro*. The blood flowed through the straight microchannel or channel with 80% narrow for 150 seconds at the speed of 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 52 $\mu\text{L}/\text{min}$, respectively. The wall shear stress rates in

收稿日期:2022-06-14; 修回日期:2022-07-26

基金项目:国家自然科学基金项目(11702047),重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2017shmsA130009),重庆市科卫联合医学科研项目中青年高端人才项目(2023GDRC008),重庆医科大学附属永川医院研究生创新基金项目(YJSCX202204)

通信作者:李远,研究员,E-mail:liyuan_1985999@163.com

straight channel at 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 52 $\mu\text{L}/\text{min}$ were 300 s^{-1} and 1 500 s^{-1} , respectively. The maximum wall shear rates in the channel with 80% occlusion at 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 52 $\mu\text{L}/\text{min}$ were 1 600 s^{-1} and 7 500 s^{-1} , respectively. The adhesion and aggregation images of fluorescent labeled platelets on glass surface were photographed with the microscope, and the fluorescent images were analyzed with Image J. The platelet surface coverage ratio was used as a quantitative index of platelet aggregation behavior, and the IC_{50} of Tirofiban for platelet inhibition was calculated under different shear rates. Flow cytometry was used to detect the platelet activation index (CD62P, PAC-1) in the whole blood at 52 $\mu\text{L}/\text{min}$ in channel with 80% occlusion. **Results** Tirofiban inhibited platelet aggregation in a dose-dependent manner, and the inhibitory effect was related to the shear rate. Under the shear rates of 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 52 $\mu\text{L}/\text{min}$, the aggregation was almost completely inhibited when the concentration in straight channel reached 100 nmol/L. When the concentration in channels with 80% occlusion reached 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, the aggregation was almost completely inhibited. IC_{50} values at 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 52 $\mu\text{L}/\text{min}$ in straight channel were 2.3 nmol/L and 0.5 nmol/L, respectively. IC_{50} values at 11 $\mu\text{L}/\text{min}$ and 52 $\mu\text{L}/\text{min}$ in channels with 80% occlusion were 20.73 nmol/L and 4.5 nmol/L. Pathologically high shearforce induced an increase in platelet activation, which could be inhibited by Tirofiban. **Conclusions** Tirofiban can effectively inhibit shear-induced platelet aggregation, and different concentrations of Tirofiban should be given according to the thrombus formed in different shear force environment in clinic practice.

Key words: platelet aggregation; microfluidic technology; shear stress; Tirofiban

在人体的血液循环体系中,血栓的形成受血小板及血流动力学的影响,其又可导致血小板理化性质发生改变^[1-2]。血小板黏附聚集是生理性止血的重要基础,同时也是诱发血栓性疾病和植入性医疗器械表面血栓形成的病理因素之一^[3]。血小板的黏附聚集受血流动力学参数的影响,不同剪切率下介导血小板黏附聚集的主要受配体不同,血栓生长的情况也不同^[4-8]。剪切率低于 1 000 s^{-1} 时,主要是由整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ (即血小板膜糖蛋白(GP) II b/III a)与纤维蛋白原(Fg)的结合介导血小板发生黏附聚集,而剪切率为 1 000~10 000 s^{-1} 时主要是由 GP I b-IX 与血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)的 A1 区域的结合和整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 与 vWF 的 RGD 序列结合介导血小板黏附聚集^[9-10]。当剪切力诱导 vWF 与血小板表面的 GP I b 结合发生黏附后,由“内向外”的信号传递可激活 GP II b/III a,使其暴露出 PAC-1 位点与 Fg 结合,GP II b/III a 与 Fg 结合不仅介导了血小板聚集,还产生“外向内”的信号传递进一步激活血小板,释放二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)和血栓烷 A2(thromboxanes A₂, TXA₂)等化学激动剂进一步促使血小板活化^[11-12]。

替洛非班(Tirofiban)是一种可逆性非肽类血小板 GP II b/III a 受体拮抗剂,通过竞争性地与血小板

GP II b/III a 受体结合,占据血小板 GP II b/III a 上与 Fg 结合的位点 PAC-1,达到抑制血小板聚集和活化的效果^[13-17]。替洛非班在临床上常用于治疗进展性卒中,预防支架血栓^[18]。然而,不同情况下替洛非班的用量往往根据指南和临床经验而定,患者常有出血风险^[19]。关于替洛非班抑制血小板活化的定量研究,多为静态条件下使用化学激动剂激活血小板,缺乏考虑人体内剪切力对血小板的持续影响。且目前已有实验表明,替洛非班可抑制剪切力诱导的血小板活化^[20]。但是有关动态条件下替洛非班抑制剪切力诱导血小板活化的定量研究,还鲜有报道。

本文以微流控技术探究替洛非班对剪切力激活血小板抑制的量效关系。本课题组前期建立的微流控模型和其他微流控实验使用的芯片相比,通道底面的玻璃上无胶原等黏附蛋白修饰。在本模型中,玻璃相当于一种外源性植入材料,可直接吸附血浆中的蛋白(纤维蛋白原、vWF 等)以介导血小板的黏附聚集,减小由于蛋白包被不均等带来的结果误差^[21-24]。本文使用的狭窄模型既提供了实验所需的高剪切力,也在一定程度上模拟了狭窄血管中的流场变化。通过观察流动条件下替洛非班对血小板黏附聚集的抑制效果,推断替洛非班在不同剪切力环境中用量的规律。 IC_{50} 作为替洛非班抑

制血小板聚集效果的判断指标,为临床中不同剪切力环境下血栓治疗使用替洛非班用量提供参考依据。

1 实验

1.1 方法

1.1.1 血液样品采集 采用6名健康人全血,由重庆市血液中心永川分中心招募。纳入标准为志愿者自述1月内无服药史、手术史和酗酒史,血小板数量、红细胞比容、凝血功能均在正常参考值区间。本研究经重庆医科大学附属永川医院伦理委员会批准,采血前志愿者均签署知情同意。

1.1.2 微流控观察血小板聚集 分析血小板黏附聚集的微流控芯片由微通道和两侧的样品池及出口组成,其中通道高70 μm,宽700 μm,长7 mm,样品池直径7 mm,出口直径1.5 mm,80%狭窄模型的狭窄处宽140 μm。将聚二甲基硅氧烷 (polydimethylsiloxane, PDMS) 基质 (Dow Corning 公司,美国) 和固化剂混合而成的预聚物浇铸在芯片阳模上,抽真空除气泡,固化。利用平头打孔器打孔形成样品池和出口,氧等离子清洗机 (Harrick 公司,美国) 处理后与清洗干净的载玻片进行不可逆键合,形成 PDMS-玻璃微流控芯片。该简易微流控装置中剪切率的计算公式为:

$$v = 6Q / (a^2b)$$

其中: v 为剪切率,单位 s^{-1} ; Q 为流量,单位 $\mu L/s$; a 、 b 分别为微通道深度和宽度,单位 mm。以不同流速通过直通道和 80% 狭窄通道,模拟人体不同剪切率情况。直通道中,11、52 $\mu L/min$ 时壁面剪切率分别为 300、1 500 s^{-1} ;狭窄通道中,11、52 $\mu L/min$ 时最大壁面剪切率分别为 1 600、7 500 s^{-1} 。

静脉血液样品用 3.2% 柠檬酸钠抗凝管 (山东威高集团医用高分子制品股份有限公司) 采集,室温下保存,4 h 内使用。将抗凝全血按照 500 : 1 (v/v) 比例用钙黄绿素 (终浓度为 4 $\mu mol/L$, Intivrogen 公司,美国) 荧光标记,然后将全血分成对照组和实验组,其中实验组替洛非班 (上海陶术生物科技有限公司) 有 4 个药物浓度 (1.25、2.5、5 和 10 nmol/L) 及 3 个浓度 (10、100 nmol/L 和 1 $\mu mol/L$) 的两个梯度。

检测设备及分析过程如图 1 所示。以 11、52 $\mu L/min$ 抽吸直通道中血样 (即模拟健康血管生理剪切率 300、1 500 s^{-1}),或以 11、52 $\mu L/min$ 抽吸狭窄通道中荧光标记血样 (即模拟病理性狭窄血管剪切率 1 600、7 500 s^{-1}),同时高速摄像机 (Qicam 公司,加拿大) 拍照记录血小板的黏附聚集情况。用 Image J 分析血小板表面覆盖率,替洛非班抑制血小板聚集的 IC_{50} 。

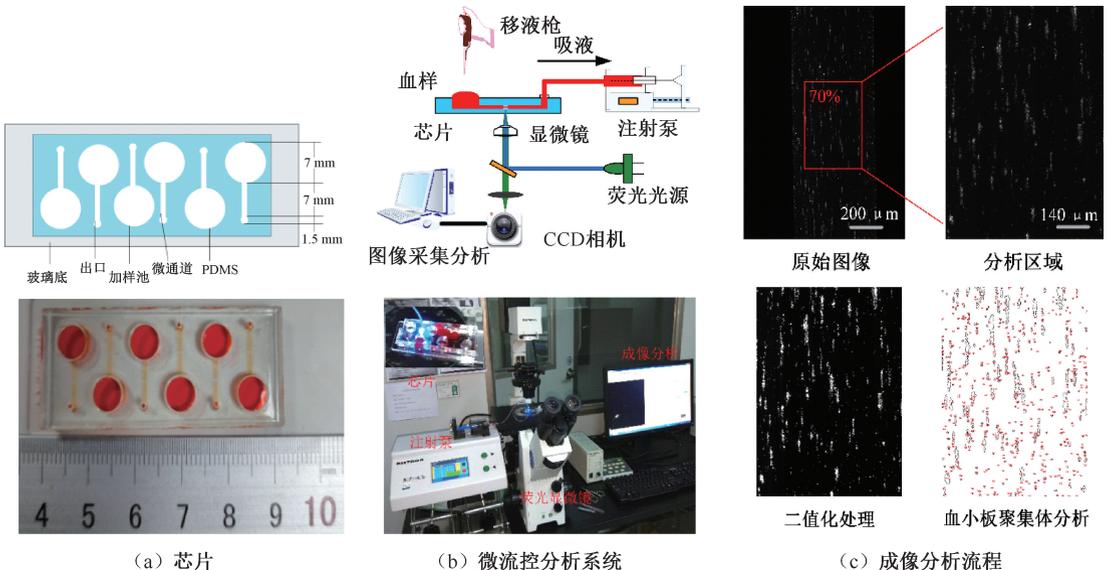


图 1 微流控分析实验设备

Fig.1 Microfluidic devices (a) Chip, (b) Microfluidic analysis system, (c) Image analysis process

1.1.3 流式分析剪切激活后血小板活化状态 将微流控芯片用 BSA 封闭, PBS 清洗后以备用。将全血分成阴性对照管, 阳性对照管, 实验管(替洛非班终浓度分别为 $1 \mu\text{mol/L}$), 空白管和单染管[anti-CD61/ PerCP-eFluor710 (Invitrogen 公司, 美国); anti-CD62P/ PE (Invitrogen 公司, 美国); anti-PAC-1/ FITC (Thermo fisher 公司, 美国)]。阳性对照组和实验组做剪切诱导血小板, 使用 80% 狭窄通道, 流速 $52 \mu\text{L}/\text{min}$, 壁面剪切率为 $7\ 500 \text{ s}^{-1}$, 通道模型参数见图 2。收集处理好的血样后, 向测活化指标的样品管中加入 0.5% BSA, 全血和荧光标记抗体并轻微混匀, 常温避光孵育后加 1% 多聚甲醛固定。

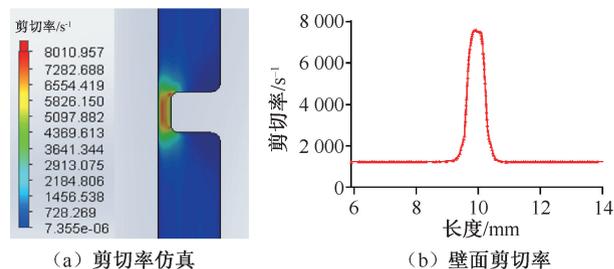


图 2 狭窄模型

Fig. 2 Occlusion model (a) Shear rate simulation, (b) Wall shear rate

注: 图 2(a) 所示为 80% 狭窄通道中狭窄区域剪切率仿真。

流式细胞仪(Beckman Coulter 公司, 美国)对样本进行采集分析。在 CytExpert 软件中调出对应散点图和直方图。用空白管调节电压, 单染管调节补偿后, 对照管进行圈门, 采用 flowjo 处理并分析收集的所有事件。

1.2 统计学分析

所有计量资料用平均值 \pm 标准差表示, 统计分析采用 Graph pad 软件, 多组间均值比较采用单因素重测方差分析(ANOVA), 采用 Tukey 检验进行两两均值比较; 两组均值比较采用配对 t 检验, IC_{50} 值计算采用 $\log M$ 转换和 $\log(\text{抑制剂})$ 归一化-可变斜率最小二乘法拟合。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板聚集情况和替洛非班抑制效果

采用血小板表面覆盖率分析血小板在不同流场条件下的聚集情况。在 300 s^{-1} 低剪切率下, 血小板聚集体呈分散点状; 在 $1\ 500 \sim 7\ 500 \text{ s}^{-1}$ 高剪切率下, 血小板聚集体沿流线方向呈头大尾小的条索状, 剪切率越高, 条索状面积越大。通过药物组与对照组相比, 替洛非班对剪切诱导的血小板聚集有明显抑制作用, 在 nmol/L 单位浓度即可发挥作用, 在 $\mu\text{mol/L}$ 单位浓度可实现几乎全抑制, 体现出抑制作用的剂量依赖性; 同一浓度时的抑制作用在高剪切率下比在低剪切率下强, 体现出替洛非班抑制血小板聚集的剪切率依赖性。

2.2 直通通道中替洛非班抑制血小板聚集效果比较

直通通道模型 $11, 52 \mu\text{L}/\text{min}$ 流速下剪切率分别为 $300, 1\ 500 \text{ s}^{-1}$ 。模拟健康的动静脉血流动力学环境, 计算在该条件下不同药物浓度处理后血小板表面覆盖率。结果显示, 当浓度达 100 nmol/L 时, 动静脉条件下的血小板聚集几乎都被抑制完全(见图 3)。通过降低替洛非班浓度实验, 计算 $11, 52 \mu\text{L}/\text{min}$ 流速下其 IC_{50} 分别为 $2.3, 0.5 \text{ nmol/L}$ 。

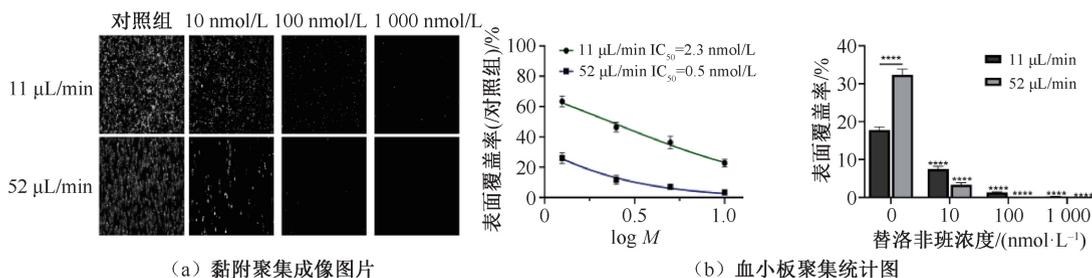


图 3 直通通道血小板黏附聚集结果

Fig. 3 Results of platelet adhesion and aggregation in straight channel (a) Images of adhesion and aggregation, (b) Statistical charts of platelet aggregation

注: 图 3(b) 分别为血小板黏附聚集的表面覆盖率参数直方图和 IC_{50} 参数计算曲线图, $\log M$ 代表替洛非班浓度对数函数值; $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 。下同。

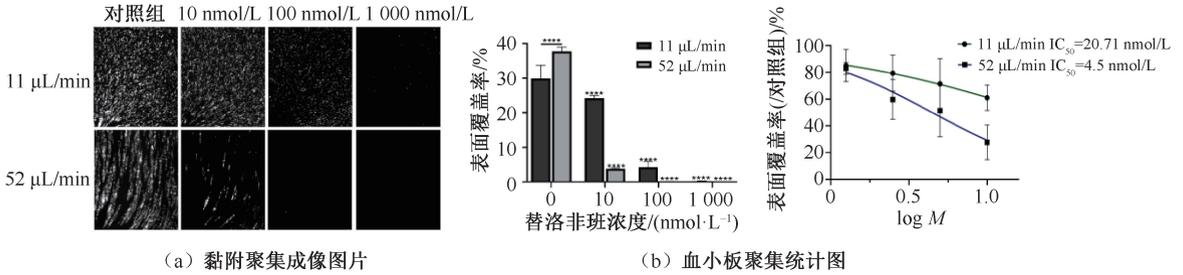


图4 80%狭窄通道中血小板黏附聚集结果

Fig. 4 Results of platelet and aggregation in channel with 80% occlusion (a) Images of adhesion and aggregation, (b) Statistical charts of platelet aggregation

2.3 狭窄通道中替洛非班抑制血小板聚集效果的比较

80%狭窄通道模型 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下剪切率分别为 1 600、7 500 s^{-1} 。模拟有血栓造成血管狭窄的动静脉血流动力学环境,计算在该条件下不同药物浓度处理后血小板的表面覆盖率。结果表明,当浓度达 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时,动静脉条件下的血小板聚集几乎都被抑制完全(见图4)。通过降低替洛非班使用浓度实验,计算得在 11、52 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速下其

IC_{50} 分别为 20.7、4.5 nmol/L 。

2.4 替洛非班抑制病理性高剪切诱导的血小板活化

采用双指标阳性百分比和指标平均荧光强度分析血小板活化指标^[15]。结果表明,与阴性和阳性对照组相比,经替洛非班处理的实验组血小板活化指标 PAC-1 和 CD62P 的表达显著降低,说明替洛非班对剪切诱导的血小板活化有明显抑制(见图5)。

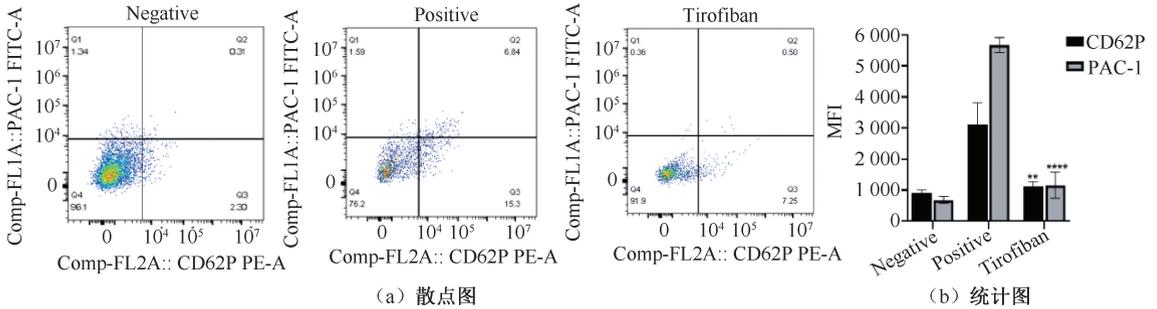


图5 病理高剪切率下剪切后血小板活化结果

Fig. 5 platelet activation results after Pathological shearing at high shear rate (a) Scatter diagrams, (b) Statistical chart

注:图5(a)为活化指标 CD62P 和 PAC-1 的流式散点图,图5(b)为活化指标 CD62P 和 PAC-1 平均荧光强度参数直方图。Negative、Positive、Tirofiban 分别代表阴性组、阳性对照组和替洛非班处理实验组。

3 讨论

研究表明,剪切力是激活血小板的一个重要因素^[1]。血小板在玻璃表面形成均一分布且稳定黏附的血小板聚集体。本实验用无蛋白修饰的通道模型得到了和蛋白修饰的通道模型相同的血小板黏附聚集效果^[22-23],说明无蛋白修饰的通道微流控技术适用于观察全血中血小板活性。血浆中的蛋白可吸附到玻璃表面介导血小板的黏附聚集,这不

仅降低了修饰蛋白的不均匀所造成的实验误差,也减少了实验操作步骤,降低了不确定因素的干扰^[21]。由于血小板血栓的形成在不同的壁面剪切率下有所不同,实验选择直通渠道中 300、1 500 s^{-1} 和狭窄通道中 1 600、7 500 s^{-1} 各观察 150 s,可观察到人体不同剪切率下血小板的聚集情况以及在该剪切率下替洛非班对血小板聚集的抑制效果。本实验体外观察到替洛非班抑制血小板聚集存在的剪切率依赖性,提示替洛非班临床实际用量时需要考

考虑剪切力因素。相比 300 s^{-1} , 生理性高剪切率 $1\ 500\text{ s}^{-1}$ 和狭窄时病理性高剪切率 $1\ 600$ 、 $7\ 500\text{ s}^{-1}$ 条件下形成的血小板聚集体沿流线方向延伸并增大, 说明血小板聚集程度随壁剪切率增大而增大, 血小板活化程度随壁面剪切率增大而增加(见图 3.4)。本文推测, 该结果与高壁面剪切率条件下玻璃表面(即通道底内部边缘)血小板数量增多, vWF 结合位点暴露程度增加有关^[21]。

与对照组相比, 微量的替洛非班(100 nmol/L)对血小板的黏附聚集有明显的抑制作用, 且抑制作用呈剂量依赖性。通过 IC_{50} 可推断出, 在健康动静脉环境或在具有同等狭窄程度的动静脉中, 随着剪切率的增加, 替洛非班抑制血小板聚集的效果更好。推测原因为随着剪切率增加, 血小板活化聚集程度增大。同时, 血液中红细胞与血小板撞击, 血小板向血管壁径向迁移增加, 造成血栓中血小板成分越多^[24], 针对抗血小板治疗的用药效果更好; 从单个血小板参与聚集情况来看, 在低剪切率时主要由 GP II b/III a 结合 Fg 介导血小板黏附, 发生活化聚集, 替洛非班抑制靶点为 GP II b/III a 的活性位点 PAC-1, 导致在低剪切力条件下需要更多剂量替洛非班抑制 GP II b/III a 的活化。

与直通道相比, 当微通道中存在狭窄时, 抑制血小板的聚集需要更大剂量的替洛非班药物。推测原因为狭窄导致剪切率骤然升高, 剪切率出现升降的梯度分布, 血管中流场发生改变, 血小板聚集体体积增大。聚集体的出现加大了流场的变化, 使得流场与血小板聚集体之间呈正反馈效应。血小板聚集体内核活化程度相比外壳活化程度高, 在经历剪切率时核心区域相比外壳聚集血小板更稳定^[25]。当聚集体由于狭窄导致剪切率升高而增大时, 需要更高剂量的替洛非班才能抑制血小板的活化聚集。

80% 狭窄通道剪切全血后血小板发生了活化, P-选择素释放, PAC-1 暴露, 且替洛非班可抑制剪切力诱导的血小板活化(见图 5)。该结果与预期相符, 表明实验模型中的剪切力达到了激活血小板的效果。由于血小板在玻璃表面的黏附聚集模型可在一定程度上反映植入性生物材料-血小板介导的病理性血栓形成过程, 本实验也进一步验证了替洛非班作为抗血小板抑制剂可有效抑制外源性植入

材料表面血小板血栓的形成^[26]。

4 结论

本文以剪切力作为激活血小板的因素, 探究替洛非班对不同剪切力激活血小板的抑制效果。替洛非班可抑制流动状态下的血小板黏附聚集, 并呈剂量依赖; 同一模型中随着剪切率的升高, IC_{50} 降低, 提示替洛非班抑制血小板聚集具有剪切率依赖。本研究结果说明, 预防健康血管中血小板的聚集血栓形成, 或抑制狭窄血管中血小板聚集血栓形成, 剪切率越低处需要的替洛非班浓度越高。因此, 在临床用药时, 除了需要考虑替洛非班的剂量, 还需要考虑血栓所处的血流动力学环境。参考本文中在直通道中 300 s^{-1} 时的 IC_{50} 为 2.3 nmol/L , $1\ 500\text{ s}^{-1}$ 时的 IC_{50} 为 0.5 nmol/L , 以及 80% 狭窄通道中 $1\ 600\text{ s}^{-1}$ 时的 IC_{50} 为 20 nmol/L 和 $7\ 500\text{ s}^{-1}$ 时的 IC_{50} 为 4.7 nmol/L , 临床在输注替洛非班时可在现有用药指南上根据这一量效关系适当增减用量。

参考文献:

- [1] NESBITT WS, WESTEIN E, TOVAR-LOPEZ FJ, et al. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation [J]. Nat Med, 2009, 15(6): 665-673.
- [2] 闫晓彤, 乐恺, 张燕, 等. 冠状动脉斑块分型及分叉角度对斑块影响的血液动力学模拟[J]. 医用生物力学, 2022, 37(4): 676-683.
YAN XT, LUE K, ZHANG Y, et al. Effects of plaque classification and bifurcation angle on vulnerable atherosclerotic plaques: A hemodynamic simulation [J]. J Med Biomech, 2022, 37(4): 676-683.
- [3] WONG KHK, EDD JF, TESSIER SN, et al. Anti-thrombotic strategies for microfluidic blood processing [J]. Lab Chip, 2018, 18(15): 2146-2155.
- [4] GONCALVES I, NESBITT W S, YUAN Y, et al. Importance of temporal flow gradients and integrin α IIb β 3 mechanotransduction for shear activation of platelets [J]. J Biol Chem, 2005, 280(15): 15430-15437.
- [5] BARK DL, PARA AN, KU DN. Correlation of thrombosis growth rate to pathological wall shear rate during platelet accumulation [J]. Biotechnol Bioeng, 2012, 109(10): 2642-2650.
- [6] BROWN CH, LEVERETT LB, LEWIS CW, et al. Morphological, biochemical, and functional changes in human platelets subjected to shear stress [J]. J Lab Clin

- Med, 1975, 86(3): 462-471.
- [7] SHI X, YANG J, HUANG J, *et al.* Effects of different shear rates on the attachment and detachment of platelet thrombi [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3): 2447-2456.
- [8] VAN ROOIJ BJM, ZAVODSZKY G, HOEKSTRA AG, *et al.* Haemodynamic flow conditions at the initiation of high-shear platelet aggregation: A combined *in vitro* and cellular *in silico* study [J]. *Interface Focus*, 2021, 11(1): 20190126.
- [9] JACKSON SP. The growing complexity of platelet aggregation [J]. *Blood*, 2014, 109(12): 5087-5095.
- [10] KROLL MH, HELLUMS JD, MCINTIRE LV, *et al.* Platelets and shear stress [J]. *Blood*, 1996, 88(5): 1525-1541.
- [11] SENIS YA, MAZHARIAN A, MORI J. Src family kinases: At the forefront of platelet activation [J]. *Blood*, 2014, 124(13): 2013-2024.
- [12] GOTO S, TAMURA N, ISHIDA H, *et al.* Dependence of platelet thrombus stability on sustained glycoprotein IIb/IIIa activation through adenosine 5'-diphosphate receptor stimulation and cyclic calcium signaling [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(1): 155-162.
- [13] ESTEVEZ B, SHEN B, DU X. Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 24-29.
- [14] YANG M, HUO X, MIAO Z, *et al.* Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor tirofiban in acute ischemic stroke [J]. *Drugs*, 2019, 79(5): 515-529.
- [15] 刘思璐, 刘晓玲, 吴建华, 等. 流体剪应力作用下 VWF-A1A2A3 介导的血小板 P-选择素的原位表达 [J]. *医用生物力学*, 2017, 32(2): 188-204.
- LIU SL, LIU XL, WU JH, *et al.* VWF-A1A2A3-mediated expression of P-selectin in platelets under flow shear stress [J]. *J Med Biomech*, 2017, 32(2): 188-204.
- [16] WANG X, DORSAM RT, LAUVER A, *et al.* Comparative analysis of various platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on shear-induced platelet activation and adhesion [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 303(3): 1114-1120.
- [17] KING S, SHORT M, HARMON C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 78(8): 10-16.
- [18] TANG L, TANG X, YANG Q. The application of tirofiban in the endovascular treatment of acute ischemic stroke: A meta-analysis [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2021, 50(2): 121-131.
- [19] SHERIFF J, MALONE LE, AVILA C, *et al.* Shear-induced platelet activation is sensitive to age and calcium availability: A comparison of adult and cord blood [J]. *Cell Mol Bioeng*, 2020, 13(6): 575-590.
- [20] DUPUY L, JU LA, PASSAM FH. Straight channel microfluidic chips for the study of platelet adhesion under flow [J]. *Bioprotoc*, 2019, 9(5): e3195.
- [21] 张天聪, 陈丹, 廖娟, 等. 生理性流动条件下血小板在玻璃表面的聚集行为 [J]. *医用生物力学*, 2022, 36(3): 425-432.
- ZHANG TC, CHEN D, LIAO J, *et al.* Platelet aggregation on glass surface under physiological flow condition [J]. *J Med Biomech*, 2022, 36(3): 425-432.
- [22] 黎洋, 丁玲, 邓素容, 等. 在生理流动条件下分析血小板黏附聚集的简易微流控芯片技术 [J]. *军事医学*, 2017, 41(7): 586-593.
- [23] BRANCHFORD BR, NG CJ, NEEVES KB, *et al.* Microfluidic technology as an emerging clinical tool to evaluate thrombosis and hemostasis [J]. *Thromb Res*, 2015, 136(1): 13-19.
- [24] CASA LDC, KU DN. Thrombus formation at high shear rates [J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2017, 19: 415-433.
- [25] HOLINSTAT M. Normal platelet function [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2): 195-198.
- [26] 何菲, 张天聪, 陈丹, 等. 显微三维成像技术分析替罗非班抑制血小板黏附聚集的影响 [J]. *分析化学*, 2022, 50(2): 244-252.