

冠状动脉介入治疗后应用氯吡格雷治疗的患者血小板活化情况

赵 威,任 娜,刘桐言(解放军 202 医院检验科,沈阳 110003)

【摘要】 目的 探讨冠状动脉介入治疗(PCI)后,患者应用氯吡格雷作为抗血小板药物口服治疗,观察血小板活化的变化情况。**方法** 采用流式细胞术(FCM)分别对 PCI 患者和健康体检人群血小板 GPⅡ b/Ⅲ a 进行检测,同时观察 PCI 患者应用氯吡格雷治疗前、后血小板 GPⅡ b/Ⅲ a 水平的变化。**结果** 实验组入选时与健康对照组进行比较,实验组入选时 GPⅡ b/Ⅲ a 的水平较健康对照明显升高,两组血小板 GPⅡ b/Ⅲ a 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。用药 7 d 后其 GPⅡ b/Ⅲ a 水平较入选时明显下降,两组血小板 GPⅡ b/Ⅲ a 水平差异有统计学意义($P<0.05$)。而健康对照组与实验组用药 7 d 后进行比较,两组血小板 GPⅡ b/Ⅲ a 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PCI 后应用氯吡格雷治疗患者血小板活化水平大部分都有明显下降,但仍有少部分患者没有明显下降,推测可能与血小板抵抗有关。

【关键词】 冠状动脉介入治疗; 氯吡格雷; 血小板活化; 流式细胞术; 血小板 GPⅡ b/Ⅲ a

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.09.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)09-1076-02

Study of platelet activation in patients with clopidogrel therapy after coronary intervention ZHAO Wei,REN Na,LIU Tong-yan (Department of Clinical Laboratory, 202 Hospital of PLT, Shenyang, Liaoning 110003, China)

【Abstract】 Objective To observe the platelet activation changes in patients with clopidogrel therapy after percutaneous coronary intervention (PCI). **Methods** Platelet GPⅡ b/Ⅲ a level was analyzed in patients before and after undergoing PCI with clopidogrel therapy and healthy controls by using flow cytometry. **Results** The GPⅡ b/Ⅲ a level was dramatically promoted in experiment group before clopidogrel therapy than that in control group ($P<0.05$), but there was no statistical difference after 7 days after clopidogrel therapy ($P>0.05$). **Conclusion** After receiving PCI, the platelet activation level might be significantly higher than that in healthy subjects ($P<0.05$). Therapy of clopidogrel could reducing the platelet activation level in patients receiving PCI, but there were still 10.71% of patients without significant decreasing ($P>0.05$), which might be related with platelet resistance.

【Key words】 percutaneous coronary intervention; clpidogrel; platelet activation; flow cytometry; platelet glycoprotein Ⅱ b/Ⅲ a

冠状动脉综合征患者进行冠状动脉介入治疗后,在金属支架的刺激作用和球囊扩张对血管内膜的损伤下,血管内皮发生损伤,正常血液循环中处于静息状态下的血小板发生活化,容易形成血栓而导致冠状动脉再狭窄,因而冠状动脉介入治疗(PCI)术后应用抗血小板治疗非常关键。目前 PCI 术后抗血小板治疗的一线药物是氯吡格雷^[1]。因此,检测血小板糖蛋白 GPⅡ b/Ⅲ a 水平,可以反映血小板的活化水平,从而间接评价药物治疗的效果,同时如果患者对氯吡格雷反应不良,还可以提示医生改变用药方案以减少患者 PCI 术后危险的发生。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 12 月至 2012 年 4 月本院心血管内科 PCI 患者 28 例作为实验组,入选标准:(1)年龄 40~50 岁;(2)进行 PCI 术治疗;(3)心功能Ⅱ~Ⅲ级。排除标准:(1)年龄超过 50 岁;(2)有出血性疾病;(3)肝功能异常。选取健康体检人群 30 例作为健康对照组,健康对照组与实验组相比,年龄差异均无统计学意义。上述实验对象均排除有脑梗死等其他血栓性疾病史,近 1 月内未使用抗血小板与抗凝药物。

1.2 试剂与器材

1.2.1 试剂 标记纤维蛋白原受体(PAC-1)、硫氰酸荧光素(FITC)、RGDS(PAC-1 阻断剂)、CD62-PE、CD61-Percp、磷酸

盐缓冲液、二磷酸腺苷(ADP)(血小板激活剂)、多聚甲醛(PFA)。

1.2.2 器材 振荡混匀器;BD 公司 FACSCalibur 流式细胞仪;数据获取;CaliBRITE Beads/FacsComp 软件;仪器校正;Cell Quest 软件;试验数据获取分析。

1.3 试验方法

1.3.1 标本采集 抽取患者静脉血 2 mL,用 CTAD 真空采血管(血液与抗凝剂比例为 9:1)。

1.3.2 在对照管中加入 PE 同型对照(IgG1)、CD61-Percp、PAC-1+RGDS 各 20 μ L, RGDS 10 μ L。

1.3.3 在试验管中加入 PAC-1、CD62-PE、CD61-Percp 各 20 μ L。

1.3.4 在对照管和试验管中分别加入未激活和激活的血液标本 50 μ L。

1.3.5 混匀,室温暗处孵育 15 min。

1.3.6 各管中加入 1 mL 固定液,充分混匀,2~8 $^{\circ}$ C 阴暗处放置 30 min。

1.3.7 上机检测。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间结果比较采用 t 检验,以 $P<0.05$

为差异有统计学意义。

2 结 果

在流式细胞仪上的 CD61 PerCP 和侧向散射角(SSC)双参数散点图中设门画出血小板群。再以 PAC-1 FITC 和 CD62P PE 为双参数散点图分析 PAC-1 和 CD62P 阳性百分率。观察应用氯吡格雷前后患者血小板 GP II b/Ⅲa 表达情况,实验结果见表 1。由表 1 可见,入选时健康对照组、实验组 GP II b/Ⅲa 水平依次增高,与健康对照组相比 GP II b/Ⅲa 的水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组用药前和给予氯吡格雷治疗 7 d 后 GP II b/Ⅲa 水平显著下降,与入选时相比差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组入选时和治疗第 7 天 GP II b/Ⅲa 水平($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	入选时	第 7 天
健康对照组	30	4.26±1.05	—
实验组	28	13.69±1.98*	4.56±2.53**

注:与健康对照组相比,* $P<0.05$;与入选时相比,** $P<0.05$;—表示无数据。

3 讨 论

冠状动脉综合征患者在进行介入治疗后血管内皮受损,血小板激活,血液处于高凝状态,容易形成血栓。缺血事件主要与术中冠状动脉斑块机械性损伤、机体的高凝状态和血小板的过度激活等因素导致血小板易在受损斑块处形成局部血栓有关。冠状动脉由于粥样硬化,内膜增厚而使其内膜狭窄、血管壁增厚、弹力降低、血流速度改变、内膜面由于斑块凹凸不平变粗糙;血流成分中的血细胞、血小板等有形成分在斑块处碰壁;破碎使血液成分发生了变化等,均有利于血小板激活及血栓形成^[2]。PCI 是治疗冠心病的一种非常有效的方法,虽然成功率可达 95%,但 30%~40% 的患者在术后 6 个月内可发生 PCI 术后再狭窄^[3],为临床治疗带来很大困难。PCI 术后给患者应用氯吡格雷,可以减少术后冠状动脉再狭窄。氯吡格雷是继阿司匹林之后抗血小板最有效的口服药物,长期服用氯吡格雷预防缺血事件效果优于单用阿司匹林^[4]。氯吡格雷特异性阻断腺苷二磷酸与血小板膜上 P2Y12 受体结合而抑制血小板活化^[5]。PCI 术中冠状动脉内应用 GP II b/Ⅲa 受体抑制剂使局部血药浓度在短时间内急剧增高,从而充分占据活化血小板表面 GP II b/Ⅲa 受体结合位点,抑制血小板与纤维蛋白白及血管性血友病因子结合,抑制血小板血栓形成^[6]。

本研究结果显示,PCI 术后在给予氯吡格雷治疗前,实验组患者的血小板活化水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。在给予氯吡格雷治疗 7 d 后,实验组患者的血小板活化水平有了明显下降,与国外文献^[7]报道一致。但本研究发现 10.71% 的患者应用氯吡格雷治疗后血小板活化水平变化不明显,血小板聚集功能不良,患者对氯吡格雷反应低下,推测其可能与氯吡格雷抵抗有关^[8]。国外多数文献报道的氯吡格雷抵抗的发生率波动于 4.2%~31.0%^[9]。Serebrunany 等研究发现,接受常规氯吡格雷治疗后的血小板抑制曲线呈正态分布,以小于“ $\bar{x}\pm 2s$ ”为界值,则只有 4.2% 的患者存在氯吡格雷抵抗。产生氯吡格雷抵抗有如下几种临床因素:个体差异性、药物之间的相互作用、氯吡格雷的用药剂量及遗传

等^[10]。因此及时发现氯吡格雷抵抗对于 PCI 治疗的患者避免发生术后再狭窄显得尤为重要。

目前,测量血小板功能主要通过检测血小板的聚集程度及其激活标志物来反映氯吡格雷作用后血小板聚集度的变化^[11]。PAC-1 是抗人类活化血小板的单克隆抗体,只能与活化的血小板 GP II b/Ⅲa 复合物结合,能反映血小板的早期活化^[12]。多种刺激剂诱导的血小板聚集率检测是传统的血小板功能检测方法,但易受多种因素影响、操作复杂、可重复性差,因而可能并非评价血小板激活程度的最合适方法^[13-14]。GP II b/Ⅲa 在血小板静息时藏于血小板膜内侧,当血小板活化变形时,GP II b/Ⅲa 分子的构象发生改变,在血小板的表面暴露出与纤维蛋白原的受体并与纤维蛋白原结合,使血小板发生聚集^[15]。检测 GP II b/Ⅲa 在血小板表面的表达可以准确反映血小板的活化情况。而利用流式细胞术技术检测活化血小板采用抗凝全血标本,用量极少,方法更为简单、快速、准确、特异性高^[16]。

因此,目前在检测 PCI 术后应用氯吡格雷治疗的患者的血小板活化程度时,一般采用流式细胞术进行检测。在 PCI 术后检测血小板活化有非常重要的意义,不仅可以预测 PCI 术后冠状动脉再狭窄发生的概率,而且可以观察氯吡格雷对患者是否有效。若患者对氯吡格雷反应低下,可以立即改用其他抗血小板药物,以防止血小板活化水平增高而引起冠状动脉血栓的形成,可以减少 PCI 术后冠状动脉再狭窄的发生。

参考文献

[1] 杨跃进. 阜外心血管内科手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:749.

[2] 郭朝阳. 国产氯吡格雷在急性心肌梗死急诊冠状动脉内介入治疗中的临床观察[J]. 中国实用医药,2011,6(22): 164-165.

[3] 白如冰,贾绍斌. 冠状动脉介入术后血小板活化的意义[J]. 宁夏医学杂志,2003,25(8):509-511.

[4] Plsker GL, Lyeng-Willianson KA. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of thrombosis[J]. Drugs, 2007, 67(4):613-646.

[5] 刘继文,程晓曙,杨人强,等. 急性冠脉综合征患者抗血小板药物疗效和对氯吡格雷的反应性[J]. 中国循环杂志, 2008,23(3):189-192.

[6] Deibele AJ, J ennings LK, Tchong JE, et al. Intracoronary eptifibatide bolus administration during percutaneous coronary revascularization for acute coronary syndromes with e2 valuation of platelet glycoprotein II b/Ⅲa receptor occupancy and platelet function; the Intraecronary Eptifibatide(ICE) Trial[J]. Circulation, 2010, 121(6): 784-791.

[7] Belvis R, Pagonabarraga J, Santamaria A, et al. Clopidogrel in secondary ischemic stroke prevention[J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2008, 3(2):119-125.

[8] 林运灵,陈良龙. 氯吡格雷抵抗研究现状[J]. 心血管病学进展, 2007, 28(4):550-554.

[9] 汤洪顺. 氯吡格雷抵抗的研究进展[J]. (下转第 1079 页)

酶抗体阳性率差异有统计学意义($P<0.05$)。18~29 岁组 Hp 血清尿素酶抗体阳性率最低,与其他年龄组比较差异有统计学意义($P<0.05$),随着年龄的增大阳性率有增高的趋势,50~59 岁组 Hp 血清尿素酶抗体阳性率最高,与其他年龄组比较差异有统计学意义($P<0.05$),但是 50~59 岁年龄组之后随年龄增大阳性率有下降趋势。

3 讨 论

Hp 是生活于人体胃和十二指肠的一种革兰阴性细菌,呈 S 形或弧形弯曲。Hp 感染是慢性胃炎、消化道溃疡、胃癌的重要致病因子。有研究表明 Hp 与胃癌的发生关系密切,1994 年世界卫生组织国际癌症研究机构将 Hp 列为 I 类致癌物。中国属 Hp 高感染率国家,据资料统计,一般人群中平均约 59% 的人感染 Hp^[3]。因此 Hp 的检测对慢性胃部疾病的预防和有效治疗有非常重要的意义。

Hp 的检测方法有很多,包括细菌学、组织学、血清学、分子生物学以及同位素示踪等方法^[4]。其中灵敏度和准确率最高的是分子生物学,特异度最高的是同位素示踪即¹³C 尿素呼气试验(CUBT),但是最简便快捷经济实惠的是血清学方法^[5]。由于 Hp 能产生大量的尿素酶,胶体金免疫层析法检测血清尿素酶抗体具有较高的灵敏度高和特异性,是最简便快速,最经济实惠的一种检测方法。胶体金免疫层析法检测血清尿素酶抗体无需专用仪器及设备,属非侵入性检测方法,容易被体检人群所接受,是流行病学调查和健康人群体检的首选检测方法^[6]。

由表 1 可见,男女 Hp 血清尿素酶抗体阳性率差异有统计学意义,女性 Hp 血清尿素酶抗体阳性率高于男性,男性阳性率为 53.4%,女性阳性率为 58.1%。由表 2 可见,各年龄组血清尿素酶抗体阳性率差异有统计学意义,18~29 岁组阳性率低于其他各年龄组,差异有统计学意义($P<0.05$),50~59 岁组阳性率高于其他年龄组,差异有统计学意义($P<0.05$),在 18~29、30~39、40~49、50~59 岁依次升高,60~69、69 岁以上年龄组 Hp 血清尿素酶抗体阳性率又有所下降。而有 Hp 感染率调查的分析显示,Hp 感染率随年龄的增大而增加^[7]。2 项研究结果略有出入,可能与所研究的地域不同或检测方法不同有关,有待更深层的调查研究。由于 IgG 抗体的产生并达到能被检测的滴度要远远晚于 Hp 的感染,而它的消失要晚于 Hp 的消失时间,所以血清中尿素酶抗体阳性并不能证明 Hp 的“现有感染”^[8]。高达 27.4% 的弱阳性率应该值得进一步研究,也许是胶体金免疫层析法检测灵敏度的因素,对于体内血

清尿素酶抗体滴度不高的人群检测带显色就浅,容易误判为阴性,该人群可能是刚刚感染 Hp;也可能是曾经感染而 Hp 已经在体内清除完全;还有可能是免疫功能低下者,比如老人。

统计邵阳市 Hp 血清尿素酶抗体阳性率达 55.5%,即超过一半的人现在或既往有 Hp 感染,Hp 会产生毒素和酶破坏胃黏膜,从而使机体产生炎症反应和免疫反应,影响胃酸的分泌,最终会导致胃炎、胃溃疡等一系列消化系统疾病。Hp 的高感染率和高致病性应该引起重视,应该加大 Hp 知识的宣传和预防工作,有效切断传播途径。Hp 感染有明显的家族聚集性,父母双方或一方有 Hp 感染者的子女,Hp 感染率明显高于父母 Hp 均为阴性者的子女。很多研究显示,人是 Hp 感染的惟一传染源,传播途径主要是粪-口途径和口-口途径。Hp 感染预防的关键是做到饭前便后洗手,讲究饮食卫生,用餐时使用公筷或采取分餐制^[9]。

参考文献

- [1] 倪语星,尚红.临床微生物学与检验[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2010:209-211.
- [2] Tanida N, Sakagami T, Nakamura Y, et al. Helicobacter pylori and gastric cancer [J]. Nih Geka Gakkai Zasshi, 1996, 97(4): 257-262.
- [3] 胡品津,胡伏莲.中华医学会第四次全国幽门螺杆菌学术会议纪要[J].中华消化杂志,2005,25(11):698-699.
- [4] 张义平,张丽娟.幽门螺旋杆菌检测方法的比较[J].大同医学专科学校学报,2003,24(1):11.
- [5] 印德民.¹³C 呼气试验与快速尿素酶幽门螺旋杆菌测试的比较研究[J].临床医学工程,2010,17(4):48-49.
- [6] 刘红军,赵振军,聂凤英,等.幽门螺杆菌尿素酶抗体检测的临床应用[J].中国当代医药,2010,17(5):62-63.
- [7] 常项海,张慧涨,方强.胶体金法快速诊断人群幽门螺杆菌感染[J].中国卫生检验杂志,2010,20(6):1413-1414.
- [8] Marie MA. Seroprevalence of helicobacter pylori infection in large series of patients in an urban area of Saudi Arabia [J]. Korean J Gastroenterol, 2008, 52(4): 226-229.
- [9] 李佳.消化道幽门螺杆菌首选检测方法及其临床根除方案探讨[J].武警后勤学院学报:医学版,2012,21(4):263-265.

(收稿日期:2012-10-28 修回日期:2012-12-22)

(上接第 1077 页)

现代诊断与治疗,2010,21(6):349-352.

- [10] 孔祥姣,陶贵周.氯吡格雷抵抗研究进展[J].临床误诊误治,2009,22(5):78-79.
- [11] 苑磊,张代富.氯吡格雷抵抗的研究进展[J].医药导报,2010,29(12):1607-1610.
- [12] 黎庆梅,韦建瑞,洪介民,等.流式细胞术检测血小板活化的影响因素分析[J].中国病理生理杂志,2009,25(3):510-512.
- [13] Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of Clopidogrel Ac2tion: Comparison of Methods [J]. Clin

Chem, 2005, 51(6): 957-965.

- [14] Harrison P, Frelinger AL 3rd, Furman MI, et al. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory [J]. Thromb Res, 2007, 120(3): 323-326.
- [15] 刘彦虹,安晶红.脑血栓与血小板活化关系的研究[J].中国实验诊断学,2008,12(2):220-221.
- [16] 陈颖,金文君.流式细胞术检测活化血小板在脑梗死诊治中的应用[J].浙江预防医学,2009,21(2):79-80.

(收稿日期:2012-12-15)