

· 论 著 ·

PCI 术后氯吡格雷影响血小板 VASP 磷酸化水平的研究

赵 威, 孙绍华, 邱广斌

(中国人民解放军第二零二医院检验科, 沈阳和平 110003)

摘要:目的 应用流式细胞仪检测血小板血管扩张剂刺激蛋白(VASP)的磷酸化程度, 评估 PCI 术后氯吡格雷的应用疗效。方法 17 例健康对照组不予任何药物干预, 26 例急性冠脉综合征患者在 PCI 术后给予氯吡格雷抗血小板治疗。分别在入选时和抗血小板治疗后第 7 天应用流式细胞仪检测血小板 VASP 磷酸化程度, 计算血小板反应性指数(PRI)。结果 急性冠脉综合征患者在 PRI 术后给予抗血小板治疗的第 7 天, PRI 明显降低, 治疗前后差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 流式细胞术检测血小板 VASP 磷酸化程度可以特异性评价氯吡格雷疗效。

关键词:流式细胞术; 急性冠脉综合征; 氯吡格雷; 血小板; 血管扩张剂刺激磷蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.01.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)01-0042-03

Research on effect of clopidogrel on platelet VASP phosphorylation level after PCI operation

Zhao Wei, Sun Shaohua, Qiu Guangbin

(Department of Clinical Laboratory, 202 Hospital of PLA, Shenyang, Liaoning 110003, China)

Abstract: Objective To use the flow cytometry to detect the platelet vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP) phosphorylation level and to evaluate the clopidogrel curative effect after PCI. **Methods** 17 cases in the control group without any drug intervention and 26 cases of acute coronary syndrome(ACS) after PCI operation with clopidogrel were selected. Platelet VASP phosphorylation levels at being selecting and on 7 d after anti-platelet therapy were detected by the flow cytometry and the platelet reactivity index (PRI) was calculated. **Results** The PRI after anti-platelet therapy in the ACS group was decreased significantly, the difference between before treatment and after treatment had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The platelet VASP phosphorylation level detected by the flow cytometry can specifically evaluate the effect of clopidogrel.

Key words: flow cytometry; acute coronary syndrome; clopidogrel; platelet; vasodilator-stimulated phosphoprotein

冠状动脉粥样硬化血栓的形成已经成为了急性冠脉综合征(ACS)和经皮冠状动脉介入治疗(PCI)后十分严重的临床不良事件^[1], 其中, 血小板激活和聚集是引发动脉血栓形成的关键因素。因此, 抗血小板的治疗已经成为急性冠脉综合征和经皮冠状动脉介入手术后患者应用药物辅助治疗的基石^[2], 在冠状动脉介入治疗时, 各种操作启动的新一轮血栓形成将直接影响 PCI 治疗的效果^[3]。当前氯吡格雷和阿司匹林的联合应用, 是预防冠状动脉相关疾病特别是 PCI 治疗后发生心血管不良事件的常规治疗方法^[4-5]。即使应用此常规治疗方案, 依然存在一小部分患者治疗达不到预期的效果, 血小板仍然出现聚集现象而导致心血管事件的再次发生。然而, 在近几年中大量的临床研究和实践表明, 患者对氯吡格雷的反应存在明显的个体差异, 用于部分患者时不能达到预期的抗血小板作用, 在接受氯吡格雷治疗的患者中仍然有一些临床事件的发生, 将此现象称为氯吡格雷抵抗^[6-7]。在阿司匹林抵抗的现象提出后, 临床也普遍关注了氯吡格雷抵抗的现象^[8]。由于氯吡格雷抵抗的患者发生动脉血栓事件的风险更大, 所以提前评估抗血小板药物效果, 为抗血小板药物抵抗的患者调整治疗策略, 提供依据变得十分重要。本试验主要应用流式细胞术对 PCI 术后患者应用氯吡格雷治疗后血小板血管扩张剂刺激磷蛋白(VASP)的磷酸化程度进行检测, 来评估氯吡格雷在急性冠脉综合征患者中的疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有标本均来自解放军第 202 医院, 健康对照组 17 例, 均来自健康体检者。急性冠脉综合征(ACS)患者 26 例为 ACS 组。健康对照组和 ACS 组患者的年龄、体质量指数、性别、糖尿病、高血压、吸烟情况等临床资料无显著性差异。两组患者在入选前 2 周内都没有接受过任何抗血小板药物的治疗, 在入选后抗血小板药物治疗第 7 天时使用 9F 针头抽取 2.7 mL 的静脉血(不能使用止血带, 前 2 mL 弃去)到含有 3.8%枸橼酸钠 0.3 mL 的 BD 抗凝管中, 轻轻摇晃 3 次混匀后 2 h 内上机检测。

1.2 仪器与试剂 流式细胞仪、VASP-FITC 试剂、IgG1-FITC 试剂、CD61-PE 抗体、Fixative 试剂、Diluent 试剂、PGE1 试剂、ADP 试剂由美国 BD 公司提供, 振荡混匀器由莱因特电子系统公司提供, BD 抗凝管由上海新睿生物科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 试验方法 健康对照组不给予任何药物的干预, 急性冠脉综合征患者给予氯吡格雷 300 mg 口服后予 75 mg qd 维持和拜阿司匹林 300 mg 负荷量嚼服后继予 100 mg qd 维持治疗, 常规给予肝素或低分子肝素, 急诊 PCI 术中、术后给予替罗非班。

1.3.1 试验操作 每个标本都准备 Falcon 管, 分别编号为 T1、T2、T3。T1 加 10 μ L PGE1(10 μ M, 终浓度, 以下相同), T2、T3 加 10 μ L PGE1+ADP(均为 10 μ M), 各管均加 10 μ L

全血,震荡混匀器低速混匀 2 s,室温避光孵育 10 min 后加 10 μL Fixative 室温下避光放置 5 min. T1、T2 加 10 μL VASP-FITC, T3 加 10 μL IgG1-FITC,室温下避光放置 5 min. 各管加 10 μL CD61-PE 室温避光孵育 5~10 min 分钟。加 1 mL Diluent 后立 2 h 内上机检测。

1.3.2 计算公式 按照静息态(PGE1)和激活态(PGE1+ADP)时矫正后的 MFI 值来计算血小板反应指数(PRI)。公式为: $MFI_{PGE1} = MFI(T1) - MFI(T3)$

$$MFI_{PGE1+ADP} = MFI(T2) - MFI(T3)$$

$$PRI = [(MFI_{PGE1} - MFI_{PGE1+ADP}) / MFI_{PGE1}] \times 100\%$$

治疗反应评价:氯吡格雷反应正常者为治疗后第 7 天 PRI 值小于入选时均数的 -2 倍标准差,氯吡格雷抵抗者为治疗后第 7 天 PRI 值大于入选时均数的 -2 倍标准差。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,其中两组中每个患者的 PRI 值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验的方法进行统计;病例组中统计氯吡格雷反应正常和抵抗者的例数,用频数表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血小板 VASP 的磷酸化检测在流式细胞仪上的散点图 在流式细胞仪上,用 SSC 和 FSC 找到血小板,如图 1。R2 区域分别为静息态、激活态和阴性同型对照时的血小板 VASP 表达情况,如图 2、3、4。

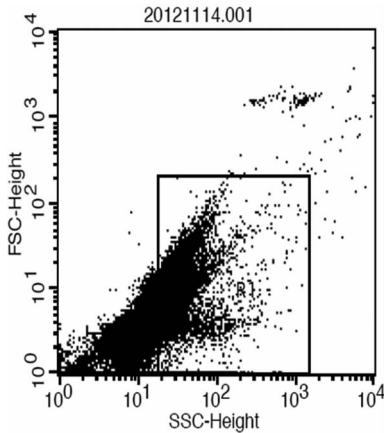


图 1 SSC、FSC 与血小板的关系图

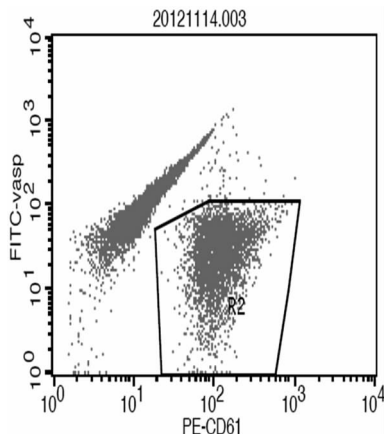


图 2 T1 管散点图

2.2 抗血小板治疗第 7 天时 PRI 结果 入选时健康对照组和 ACS 组 PRI 值分布较均匀同质(64.90%~91.80%),组间差

异无统计学意义($P > 0.05$)。抗血小板治疗第 7 天时 ACS 组 PRI 明显下降($P < 0.05$),但分布较治疗前明显离散(16.30%~79.10%)。第 7 天时 ACS 组有 7 例患者 PRI 大于入选时均数 -2 倍标准差或未服用氯吡格雷人群的总体均数 -2 倍标准差。

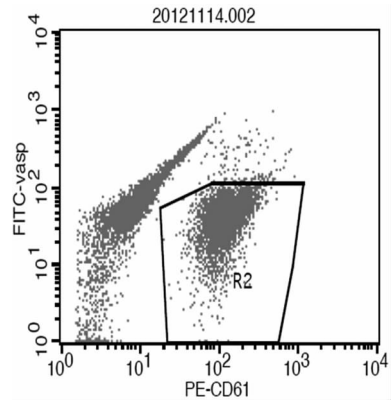


图 3 T2 管散点图

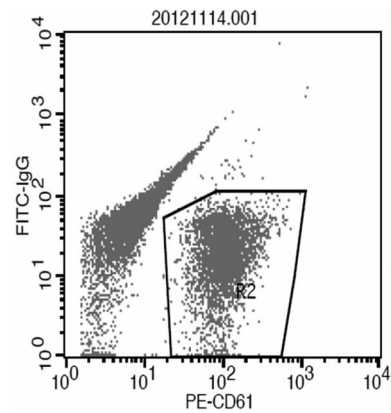


图 4 T3 管散点图

表 2 入选时和治疗第 7 天血小板反应性指数

组别	n	入选时 PRI(%)	第 7 天 PRI(%)
对照组	17	76.90 ± 5.10	—
ACS 组	26	78.10 ± 5.60	56.35 ± 14.77*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

氯吡格雷是一种噻吩吡啶类化合物,它通过抑制二磷酸腺苷受体,能快速并有效地抑制血小板聚集,是目前治疗动脉粥样硬化性疾病的主要抗血小板药物。氯吡格雷在体外不具有活性,吸收部位在胃肠道,代谢主要在肝脏内快速进行。氯吡格雷首先要进入人体内,在肝脏内与氧化酶结合使其氧化成为具有活性的代谢产物,而血小板膜表面的 ADP 受体(P2Y12)可以和氯吡格雷与氧化酶结合的代谢产物进行不可逆地选择性结合,使 ADP 抑制腺苷酸环化酶的作用受到阻止,进而促进了血管扩张剂刺激磷酸蛋白的磷酸化,并抑制了纤维蛋白原受体(GP II b/III a)的活化,从而使血小板聚集受到抑制^[9]。氯吡格雷也能够使由凝血酶和胶原引起的血小板聚集受到抑制,还可以使血小板选择蛋白的表达降低,从而抑制血小板的活化,PGE1 主要通过促进 VASP 的磷酸化使血小板的活化受到抑制^[10-12]。

本研究通过对健康对照组和 ACS 组在入选时和治疗后第

7 天测得的数据计算出的 PRI 值进行比较,在入选时健康对照组和 ACS 组 PRI 无明显差异,分布较均匀同质,而在抗血小板治疗后第 7 天 ACS 组 PRI 值明显下降,表明依据上述原理检测 VASP 的磷酸化程度并根据公式计算出的 PRI 值能够特异性地评价氯吡格雷的疗效^[13-14]。在对 ACS 组抗血小板治疗后的第 7 天患者的 PRI 值进行统计分析时,有 7 例(26.9%)患者的 PRI 值都大于入选时均数为-2 倍标准差(66.90%)或未服用氯吡格雷人群的总体均数为-2 倍标准差(66.80%),因此表明 PRI 值与血小板的基础活性以及是否使用阿司匹林的干预无关,而与使用氯吡格雷的干预有关,且近 26.9% 患者对氯吡格雷反应低下。

关于氯吡格雷抵抗,虽然研究已经证实了它的存在,但是因为不同的实验室检测方法以及不同的诊断标准,当前仍然缺乏一种关于氯吡格雷抵抗的标准定义。但大多数研究人员使用 Wiviott 等^[15]的定义,即尽管一些患者坚持服用氯吡格雷的标准剂量(300 mg 负荷量,维持量 75 mg/d),仍然存在临床上有关于动脉血栓事件的再次发生,而且检测血小板的功能表明不能够有效地抑制血小板聚集,此种现象称氯吡格雷抵抗。检测氯吡格雷抵抗的试验方法包括血小板聚集试验、检测 VASP 磷酸化水平、检测血小板表面的 P-选择素、血小板功能测定仪 PFA-100 测定闭合时间等^[16]。其中血小板聚集试验的检测是评价血小板功能的传统检测方法,但是仍然存在很多问题,此方法操作比较复杂,可重复性较差,容易受到一些因素的影响^[17]。检测血小板表面的 P-选择素虽然可以预测临床的预后情况,但价格相对比较昂贵,特异性也相对较差,很难将其应用于临床。而应用流式细胞仪检测 VASP 具有以下优点:(1)使用全血检测,仅需要 30 μL 枸橼酸钠抗凝全血;(2)样本具有高稳定性:室温下检测前可保存 48 h,甚至高达 72 h^[18];(3)目前是对 P2Y12 特异性最高的检测;(4)无干扰;(5)标准化、重复性好;(6)即开即用、单独或批量操作;(7)检测时间短(25 min);(8)CE 认证,有广泛的文献发表。Montalescot 等^[19]评价 VASP 为 ADP 诱导的血小板 P2Y12 受体激活的最合理的评估方法,因而是氯吡格雷药效最特异性的监测指标。

参考文献

[1] 何晨,袁晋青. 氯吡格雷抵抗的现状与展望[J]. 心血管病学进展, 2009,30(5):806-809.
 [2] 格日勒,任志亮. 冠心病患者氯吡格雷抵抗的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志,2008,40(12):1492-1494.
 [3] 李俊勇,齐晓勇,李英肖,等. 冠心病患者支架术后再次狭窄的多因素回归分析[J]. 中国综合临床,2005,21(12):1070-1072.
 [4] Smith SJ, Allen J, Blair SN, et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update endorsed by the National

Heart, Lung, and Blood Institute[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47(1):2130-2139.
 [5] 魏述建,陈玉国,张运. 阿司匹林和氯吡格雷抵抗的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2008,29(6):946-949.
 [6] 陈丰,彭俊,王祥贵. 氯吡格雷抵抗的研究[J]. 临床和实验医学杂志,2010,9(5):384-387.
 [7] 杨蓉,吴方. 氯吡格雷抵抗的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2009,36(7):428-431.
 [8] 刘继文,程晓曙. 氯吡格雷抵抗[J]. 国际心血管病杂志, 2006, 1(2):48-51.
 [9] Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs[J]. Nature, 2001,409(1):202-207.
 [10] Schwarz UR, Geiger J, Walter U, et al. Flow cytometric analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets[J]. Thromb Haemost, 1999,82(1):1145-1152.
 [11] Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, et al. Resistance to thienopyridines: Clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2003,59(3):295-302.
 [12] Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases [J]. J Thromb Haemost, 2005,3(1):85-92.
 [13] 陈青,米树华. 氯吡格雷抵抗影响因素的研究[J]. 中国医药, 2011,6(11):1432-1434.
 [14] 李芹,肖践明. 氯吡格雷抵抗的影响因素[J]. 医学综述, 2009, 15(9):1405-1407.
 [15] Wiviott SD, Antman EM. Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story[J]. Circulation, 2004, 109(5):3064-3067.
 [16] Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases [J]. Circulation, 2004, 110(1):489-493.
 [17] Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of clopidogrel action: Comparison of methods[J]. Clin Chem, 2005, 51(6):957-965.
 [18] Jakubowski JA, Payne CD, Li YG, et al. A comparison of the anti platelet effects of prasugrel and high-dose clopidogrel as assessed by VASP-phosphorylation and light transmission aggregometry [J]. Thromb Haemost, 2008, 99(1):215-222.
 [19] Montalescot G, Sideris G, Meuleman C, et al. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the Albion trial[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48(5):931-938.

(收稿日期:2014-11-10)

(上接第 41 页)

细菌性肺炎儿童中的变化及临床意义[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(8):62-63.
 [13] 徐冬梅,郑颖. 血清 PCT, CRP 和 IL-18 检测对急性上呼吸道感染患儿的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(11):2698-2700.
 [14] Windgassen EB, Funtowicz L, Lunsford TN, et al. C-Reactive protein and High-Sensitivity C-Reactive protein: an update for clinicians[J]. Postgrad Med, 2011, 123(1):114-119.

[15] Simon L, Gauvin F, Amre DK, et al. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(2):206-217.
 [16] Mitaka C. Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome[J]. Clin Chim Acta, 2005, 351(1/2):17-29.

(收稿日期:2014-11-15)