

PL-11 两种诱导剂监测健康人服用氯吡格雷后的血小板功能变化

关杰¹, 李莉¹, 朱远¹, 任军伟^{1,2}, 李艳燕¹, 黎晓辉¹, 白洁¹, 邓新立¹, 丛玉隆¹

¹解放军总医院 南楼检验科, 北京 100853; ²兵器工业北京北方医院, 北京 100089

摘要:目的 评价新型血小板功能检测方法 PL-11 两种诱导剂对氯吡格雷短期效应的监测。方法 与以二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导的光比浊法 (ADP-LTA) 为参照, 比较 ADP(ADP-PL-11) 与胶原 (Col-PL-11) 诱导的 PL-11 对健康人服用氯吡格雷后血小板功能变化的监测。结果 25 名健康青年男性平均年龄 (27.5 ± 3.7) 岁, 服药 6 d 后, 血小板功能均有所降低。Col-PL-11 在基础值范围 64.7% ~ 83.6%(95% PI), ADP-LTA 结果在基础值范围是 65.9% ~ 89.1% (95% PI), ADP-PL-11 为 67.2% ~ 86.8% (95% PI)。服药前后 Col-PL-11 结果存在部分重叠区域。各方法相关性分别为 ADP-PL-11 vs LTA, $r=0.757$, $P < 0.001$; ADP-PL-11 vs Col-PL-11, $r=0.764$, $P < 0.001$; Col-PL-11 vs LTA, $r=0.521$, $P=0.009$ 。以 ADP 活化 LTA 结果在服药后比服药前基础值降低至少 10% ($> 10\%$) 为氯吡格雷低反应性的标准, ROC 分析得到 ADP-PL-11 (临界值 66%) 敏感度和特异性分别为 84.6%, 88.2%; Col-PL-11 (60.0%) 敏感度和特异性分别为 69.2%, 70.6%。结论 PL-11 检测氯吡格雷治疗时 ADP 比胶原具有较高的敏感度, ADP-LTA 与 ADP-PL-11 之间结果可能存在可交换性, 使 ADP 激活的 PL-11 检测可能成为替代经典光比浊法的小血小板功能监测方法。

关键词: 氯吡格雷; PL-11 血小板功能检测仪; 光比浊法; 二磷酸腺苷; 胶原

中图分类号: R 446.114.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2014)03-0238-04 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2014.03.012

网络出版时间: 2013-11-07 18:05

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20131107.1805.001.html

Role of PL-11 inducers in monitoring platelet function in healthy subjects after taking clopidogrel

GUAN Jie¹, LI Li¹, ZHU Yuan¹, REN Jun-wei^{1,2}, LI Yan-yan¹, LI Xiao-hui¹, BAI Jie¹, DENG Xin-li¹, CONG Yu-long¹

¹Clinical Laboratory in South Building, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ²Clinical Laboratory, Beijing North Hospital, Department of Armament Industry, Beijing 100089, China

Corresponding author: CONG Yu-long. Email: yulongc@263.net

Abstract: Objective To assess the role of PL-11 inducers in monitoring platelet function in healthy subjects after taking clopidogrel. **Methods** The role of PL-11 inducers, ADP and collagen, in monitoring platelet function in healthy subjects after taking clopidogrel was compared with light turbidimetric analysis (LTA) as its reference. **Results** The platelet function decreased in 25 healthy male young subjects with a mean age of 27.5 ± 3.7 years 6 days after taking clopidogrel. The baseline value for PL-11 inducer collagen, LTA and PL-11 inducer ADP was 65.9%-89.1% (95%PI), 67.2%-86.8% (95%PI), 64.7%-83.6% (95%PI), respectively. An overlapped value was found before and after taking clopidogrel. ADP was correlated with LTA ($r=0.757$, $P < 0.001$) and collagen ($r=0.764$, $P < 0.001$), collagen was correlated with LTA ($r=0.521$, $P=0.009$). The baseline value of LTA was at least 10% lower after taking clopidogrel than before taking clopidogrel, which could thus be used as the criterion for clopidogrel reactivity. ROC analysis showed that the cut-off value for ADP and collagen was 66% and 60.0%, respectively. The sensitivity and specificity of ADP and collagen were 84.6% and 88.2%, 69.2% and 70.6%, respectively. **Conclusion** The sensitivity of ADP is higher than that of collagen in monitoring the platelet function in healthy subjects after taking clopidogrel. The sensitivity of LTA and ADP is interchangeable, and can thus become a classic light turbidimetry for platelet function monitoring.

Key words: clopidogrel; PL-11; platelet function detector; turbidimetric determination; adenosine diphosphate; collagen

氯吡格雷是重要的作用于 P2Y₁₂ 受体的抗血小板药物, 由于是前体药物, 氯吡格雷需经肝脏转化发生效应, 因此其反应性存在个体差异^[1-3]。目前血小板功能检测方法均为体外检测, 不同方法检测原理及结果不同, 造成实验室及临床对血小板功能检测的差异。二磷酸腺苷 (adenosine

diphosphate, ADP) 是血小板 P2Y₁ 活化通路的特异性诱导剂, 胶原是血小板活化非特异性诱导剂, 二者均在不同血小板功能检测方法中得到使用。本试验观察基于血小板计数差值法 (platelet count drop method, PCD) 的 PL-11 利用两种不同诱导剂监测健康人服用氯吡格雷后血小板功能变化。

对象和方法

1 对象 选择我院学员队健康男性学员 25 例, 平均年龄 (27.5 ± 3.7) 岁。入选标准: 血小板计数 $> 100 \times 10^9/L$; 试验期间未服用其他影响血小板功能

收稿日期: 2013-09-07

作者简介: 关杰, 男, 在读硕士。研究方向: 血栓与止血。Email: gj1253@gmail.com

通信作者: 丛玉隆, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师。Email: yulongc@263.net

的药物(如阿司匹林或其他非甾体类抗炎药物等);试验期间排除患有急性或者慢性疾病。受试者接受 6 d 75 mg/d 氯吡格雷(波立维)治疗。检测基础值、治疗期间、停药后共 6 次,分别使用 4 种方法检测血小板功能。基础值检测另选 90 例未服用氯吡格雷的健康人,男性 76 例,女性 14 例,平均年龄(24.7±4.9)岁。本实验经本院伦理委员会审查批准,所有受试者均对本试验知情同意并签署知情同意书。

2 仪器与试剂 PL-11 血小板功能分析仪(南京神州英诺华医疗科技有限公司)及配套试剂 PLR-07 ADP(50 mmol/L),胶原(2 mg/ml);CRONO-LOG Model 700 血小板聚集仪(美国 CHRONO-LOG 公司)及 ADP 试剂(1 mmol/L)。

3 标本采集 所有血样本均为外周静脉血,早上 10:00 进行采集。受试者每次检测需采集 3 管枸橼酸盐抗凝血(2 管用于 LTA,1 管用于 PL-11)。采集时间为 0 d(基础值)、服药 3 d、服药 6 d、停药 3 d、停药 6 d、停药 9 d。

4 PL-11 血小板功能分析 PL-11 是以血细胞分析仪为基础,计数血小板激活前后的血小板数量并计算出血小板聚集率。将 0.5 ml 枸橼酸盐抗凝血移入检测试管并放置在检测处,检测开始后,PL-11 先进行两次血小板基础值计数(基础值为二者平均值),随后加入 40 μl ADP(全血中最终浓度:4 mmol/L)或 40 μl 胶原(全血最终浓度:0.16 mg/L),此时血小板开始聚集,全血中单个血小板数减少。PL-11 连续检测若干次血小板数,当计数达到最低时停止检测。仪器依据下列公式自动换算最大聚集率:最大血小板聚集率=(基础血小板数平均值-最低血小板数)÷基础血小板数平均值×100%。

5 光比浊法检测血小板聚集 通过 800 r/min(850 g) 5 min 和 4 000 r/min(120 g)8 min 分别得到富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)、乏血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。使用 CRONO-LOG Model

700 检测,以 PPP 为空白参照,PRP 中加入 5 μl ADP(ADP 最终浓度:10 μmol/L),PRP 中透光度增加,改变最大时得到最大血小板聚集率(max aggregation ratio, MAR),以百分比表示。

6 统计学处理 SPSS19.0 为主要统计学软件。连续变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。Pearson 相关性分析用于正态资料分析,Spearman 相关性分析用于非正态资料。ANOVA 检验用于不同方法结果的比较,以受试者工作曲线(ROC)分析不同方法的临界值。参考值范围依据: $\bar{x} \pm 1.96s$;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 服药后 LTA 与 PL-11 变化 PL-11 与 LTA 监测到 25 例受试者服用 75 mg/d 氯吡格雷 6 d 后,血小板功能均不同程度降低,停药 3 d 后血小板功能均开始恢复,停药 6~9 d 恢复至正常水平(图 1)。115 例健康人基础值 ADP-LTA 结果的范围是 65.9%~89.1%(95% PI),ADP-PL-11 为 67.2%~86.8%(95% PI),Col-PL-11 在基础值范围 64.7%~83.6%(95% PI)。

2 相关性及 Bland-Altman 分析 ADP-PL-11 服药前后无重叠区域。各方法相关性分别为 ADP-PL-11 vs LTA, $r=0.757$, $P < 0.001$; Col-PL-11 vs LTA, $r=0.521$, $P=0.009$; ADP-PL-11 vs Col-PL-11, $r=0.764$, $P < 0.001$ 。经 Bland-Altman 分析,ADP-LTA 与 ADP-PL-11 基础值二者之间偏差为 2.96%(图 2A),治疗期间存在绝对偏差为 6.59%(图 2B)。

3 ROC 曲线分析 以光比浊法 ADP-LTA 结果在服药后相比于服药前基础值降低至少 10%(>10%)为氯吡格雷低反应性的标准^[8-9],本试验中无氯吡格雷低反应性的受试者,以 ROC 分析得到其他各方法检测存在氯吡格雷反应性的界值为:ADP-PL-11, 66.0%(敏感度 84.6%,特异性 88.2%);Col-PL-11, 60.0%(敏感度 69.2%,特异度 70.6%)。

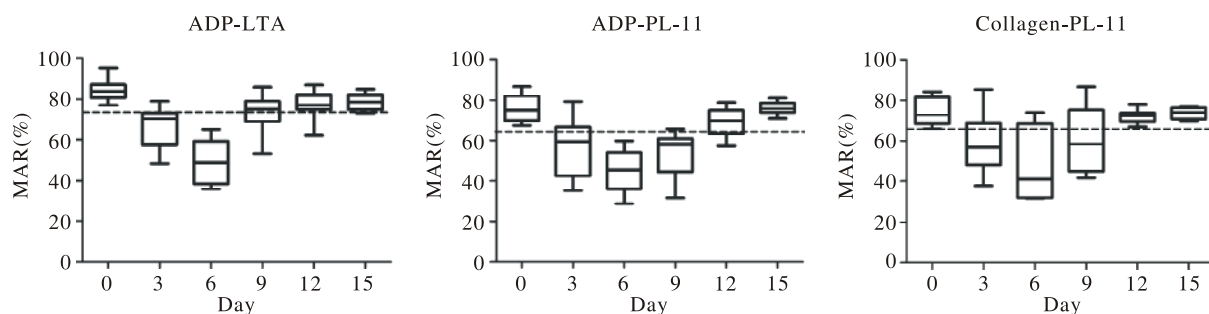


图 1 服用氯吡格雷前后各方法检测血小板功能变化

Fig.1 Platelet function in healthy subjects before and after taking clopidogrel

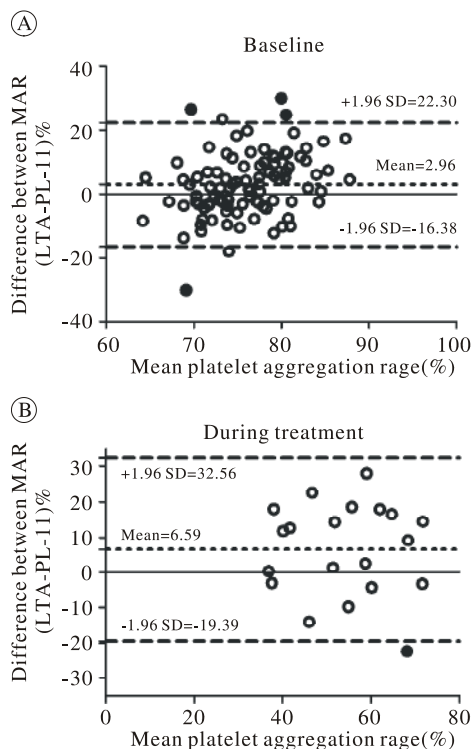


图 2 Bland-Altman 分析 ADP 诱导的 LTA 与 PL-11 之间一致性
Fig.2 Bland-Altman analysis showing consistency between ADP-induced LTA and PL-11

讨论

尽管血小板功能检测在抗血小板治疗心血管疾病的临床预后判断中起的作用尚未得到最终认定,但越来越多的研究开始关注血小板功能检测及抗血小板药物个体化治疗^[4-7]。

LTA 作为目前较受认可的血小板功能检测方法,被称作“金标准”。高 ADP-LTA 反映了低氯吡格雷反应性(或氯吡格雷抵抗),通常以服药后 LTA 结果至少降低 10% ($\geq 10\%$) 为标准。有文献报道 ADP-LTA 监测氯吡格雷治疗结果与临床预后相关^[8-9]。本试验中,受试者服药后均反应良好,未发现氯吡格雷抵抗或者低反应性的现象。Li 等^[10] 在 8 例健康患者服用 75 mg/d 氯吡格雷 1 周后也未发现低反应性。而之前有文献报道,正常人服用氯吡格雷后也有部分出现低反应性的现象^[11]。在本实验中,ADP-PL-11 与 ADP-LTA 结果存在较好的相关性,在服药后 ADP-PL-11 结果与基础值无重叠区域,而 Col-PL-11 存在重叠区域,提示 PL-11 诱导剂中,ADP 比胶原对氯吡格雷的监测假阳性率低。在本试验中,经 Bland-Altman 分析,我们谨慎地认为,ADP-PL-11 与 ADP-LTA 间在基础值与治疗期间较小的偏差值可能提示

LTA 与 PL-11 的结果存在可交换性,即互换性。但这种结果尚需要大样本量的研究予以证实。

PL-11 以血小板计数差值法为基础,较高的自动化程度与 LTA 相比更易于血小板功能监测的标准化。张有涛等^[12] 对 PL-11 血小板功能分析仪的皮内重复性、日间重复性、携带污染率、准确性等做了研究,认为其均符合要求,结果可靠。胶原作为非特异性激活剂,引起血小板活化和聚集。有文献报道胶原诱导的 LTA 能够区别未服药心血管病患者与服用阿司匹林或者同时服用阿司匹林和氯吡格雷的患者^[13]。本实验对服用氯吡格雷后血小板功能的监测显示,经 ADP 和胶原两种诱导的 PL-11 结果与“金标准”的 LTA 结果存在较好的相关性,为 PL-11 监测氯吡格雷治疗提供了依据。

传统血小板计数差值法^[14] 一般是在加入诱导剂后等待 10 min 再进行检测,有文献对血小板计数差值法检测时间进行研究,认为该方法存在时间依赖性的问题^[15]。由于其无法明确血小板达到最大聚集的时间点,易造成不可信的结果。PL-11 使用同一枸橼酸盐抗凝全血样本检测,加入诱导剂后多次测定标本中未聚集单个血小板数,直至出现最低血小板计数值时才计算出最大血小板聚集率,可明确最大聚集率发生的时间点,避免人为判断的不准确。

综上所述,PL-11 监测氯吡格雷治疗时 ADP 比胶原具有较高的灵敏度,与光比浊法在监测氯吡格雷治疗时有较好的相关性,且 ADP-LTA 与 ADP-PL-11 之间结果可能存在可替换性,ADP 激活的 PL-11 检测可能成为经典光比浊法的血小板功能监测的可替换方法。

参考文献

- Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, et al. A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37 (11): 2145-2152.
- Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38 (1): 92-99.
- Perreillo JM, Maftouh M, Andrieu A, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30 (11): 1288-1295.
- Price MJ, Barker CM. Functional testing methods for the antiplatelet effect of P2Y12 receptor antagonists [J]. *Biomark Med*, 2011, 5(1): 43-51.
- Brar SS, Ten Berg J, Marcucci R, et al. Impact of platelet reactivity on clinical outcomes after percutaneous coronary intervention. A collaborative meta-analysis of individual participant data [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58 (19): 1945-1954.

(上接240页)

- 6 Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention : the GRAVITAS randomized trial [J] . JAMA, 2011, 305 (11) : 1097-1105.
- 7 Trenk D, Stone GW, Gawaz M, et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents : results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study [J] . J Am Coll Cardiol, 2012, 59 (24) : 2159-2164.
- 8 Price MJ. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy[J] . Circulation, 2009, 119 (19) : 2625-2632.
- 9 Parodi G, Marcucci R, Valenti R, et al. High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term cardiovascular events among patients with acute coronary syndromes undergoing PCI [J] . JAMA, 2011, 306 (11) : 1215-1223.
- 10 Li C, Hirsh J, Xie C, et al. Reversal of the anti-platelet effects of aspirin and clopidogrel [J] . J Thromb Haemost, 2012, 10 (4) : 521-528.
- 11 Hjorth Madsen E, Christiansen MK, Schmidt EB, et al. Effect of exercise on platelet activation during aspirin or clopidogrel intake in healthy men [J] . Platelets, 2009, 20 (3) : 177-182.
- 12 张有涛, 赵益明, 季顺东, 等. PL-11 血小板分析仪检测功能的性能评价 [J] . 中华检验医学杂志, 2012, 35 (12) : 1139-1141.
- 13 Gurbel PA, Bliden KP, Antonino MJ, et al. The effect of elinogrel on high platelet reactivity during dual antiplatelet therapy and the relation to CYP2C19*2 genotype : first experience in patients [J] . J Thromb Haemost, 2010, 8 (1) : 43-53.
- 14 Blais N, Pharand C, Lordkipanidz é M, et al. Response to aspirin in healthy individuals. Cross-comparison of light transmission aggregometry, VerifyNow system, platelet count drop, thromboelastography (TEG) and urinary 11-dehydrothromboxane B (2) [J] . Thromb Haemost, 2009, 102 (2) : 404-411.
- 15 van Werkum JW, van der Stelt CA, Seesing TH, et al. A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention [J] . J Thromb Haemost, 2006, 4 (11) : 2516-2518.