

氯吡格雷与阿司匹林联合应用在急性脑梗死治疗中的疗效评定

赵真¹, 包正军¹, 许宏伟², 罗霄鹏¹, 彭子娟¹, 曹晓玲¹

1. 株洲市一医院神经内科, 湖南省株洲市 412000

2. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 观察急性脑梗死患者血小板上 α 颗粒膜糖蛋白 (CD62p) 及溶酶体颗粒膜糖蛋白 (CD63) 的表达, 通过血小板活化的变化, 探讨阿司匹林与氯吡格雷联合用药与阿司匹林单药治疗的疗效差异。方法 将 60 例脑梗死患者随机分为两个亚组: 单药组 (阿司匹林 0.15 g/d) 和联合用药组 (阿司匹林 0.10 g/d + 氯吡格雷 75 mg/d), 30 例健康体检者为对照组。使用流式细胞术检测所有病例 CD62p、CD63 阳性率, 对单药组和联合用药组治疗前后的 CD62p、CD63 阳性率进行比较, 同时进行 NIHSS 评分。结果 脑梗死组血小板 CD62p、CD63 阳性率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。单药组和联合用药组在治疗一周和二周后 CD62p、CD63 阳性率和 NIHSS 评分均较治疗前显著下降 ($P < 0.01$)。联合用药组治疗二周后与单药组比较 CD62p、CD63 阳性率和 NIHSS 评分明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 抗血小板治疗对脑梗死有效, 阿司匹林 + 氯吡格雷联合治疗的总体疗效明显优于单用阿司匹林, CD62p、CD63 可以衡量抗血小板治疗效果。

关键词: 氯吡格雷; 阿司匹林; 血小板活化; CD62p; CD63; 脑梗死; 流式细胞术

Therapeutic effect of combined use of clopidogrel and aspirin in the treatment of acute cerebral infarction

ZHAO Zhen, BAO Zheng-Jun, XU Hong-Wei, LUO Xiao-Peng, PEN Zi-Juan, CAO Xiao-Ling. Department of Neurology, Zhuzhou NO. 1 hospital, Zhuzhou, Hunan 412000, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of combined use of clopidogrel and aspirin in the treatment of acute cerebral infarction by measuring the expression of platelet membrane glycoprotein and lysosome membrane protein 53 in patients with cerebral infarction. **Methods** Sixty patients with cerebral infarction were randomly divided into two groups: aspirin alone (0.15 g/d) and aspirin (0.10 g/d) + clopidogrel (75 mg/d). Thirty healthy persons were used as control group. Flow cytometry was employed to detect CD62p and CD63 expression on circulating platelets. NIHSS scores were evaluated. **Results** The positive percentage of CD62p and CD63 on platelets significantly increased in patients with cerebral infarction than in controls. The positive percentages of CD62p and CD63 on platelets and NIHSS scores were significantly reduced in patients with cerebral infarction in both aspirin alone and aspirin + clopidogrel groups after 1 and 2 weeks of treatment. The group receiving a combined use of aspirin and clopidogrel showed a lower positive percentage of CD 62p and CD63 on platelets and a lower NIHSS score than the aspirin alone group 2 weeks after treatment ($P < 0.01$). **Conclusions** Antiplatelet treatment is effective in patients with cerebral infarction. A combination of aspirin and clopidogre for treatment of cerebral infarction appears to be superior to aspirin alone. CD62p and CD63 expression on the surface of plateles can be used for the evaluation of the efficacy of antiplatelet agents.

Key words: clopidogrel; aspirin; platelet activation; CD62p; CD63; cerebral infarction; flow cytometry

急性脑梗死是临床常见的高致残率、高致死率疾病。越来越多的研究表明血小板活化是血栓性疾病特别是急性脑梗死的一个重要病理生理过

程^[1, 2], α 颗粒膜糖蛋白 (CD62p) 和溶酶体颗粒膜糖蛋白 (CD63) 是公认的活化血小板的分子标志物。抗血小板治疗成为急性脑梗死重要的治疗措

基金项目: 湖南省卫生厅科研计划课题 (B2010-113)

收稿日期: 2011-12-05; 修回日期: 2012-03-21

作者简介: 赵真 (1970-), 女, 硕士, 副主任医师。主要从事脑血管病的研究。

施,阿司匹林联合氯吡格雷的双重抗血小板治疗在急性脑梗死治疗中的实验室评价未见报道。本研究通过流式细胞术检测血小板表面 CD62p 和 CD63 的表达来评价血小板的活化,尝试以此来比较阿司匹林单药与阿司匹林 + 氯吡格雷联合治疗的治疗效果。

1 资料和方法

1.1 研究对象

脑梗死组来自 2010 年 10 月至 2011 年 5 月在株洲市一医院神经内科住院的动脉粥样硬化性脑梗死患者,共 60 例。所有入选病例患者均经伦理委员会通过,并签署临床试验同意书。所有病例均符合 1995 年第四次全国脑血管病会议制订的诊断标准,并经头颅 CT 或 MRI 检查证实,排除椎 - 基底动脉系统闭塞引起的脑梗死,慢性阻塞性肺疾病,且均为发病 1 周内的急性期患者。对照组 30 例来自体检中心体检健康人员。所有研究对象在入选前 2 周末服过阿司匹林、氯吡格雷、潘生丁等影响血小板功能的药物。

将脑梗死患者随机分成两个亚组,即单药组(阿司匹林 0.15 g 组)和联合用药组(阿司匹林 0.10 g + 氯吡格雷 75 mg 组),每组 30 例。治疗当天起两组分别给予阿司匹林 0.15 g/晚、阿司匹林 0.10 g + 氯吡格雷 75 mg/晚,两组均使用长春西汀及一般治疗,避免其他对血小板活化有影响的药物的使用。

1.2 主要试剂

CD61-PerCP 为多甲藻黄素叶绿素蛋白标记的单克隆抗体;CD62p-PE 为藻红蛋白标记的单克隆抗体、CD63-FITC 为异硫氰酸荧光素标记的单克隆抗体,以上均为美国 BD 公司产品。

1.3 主要仪器

FACSCALIBUR 全自动流式细胞分析仪,美国 BD 公司产品。

1.4 三色流式分析方法检测血小板活化

1.4.1 标本的采集 患者入院后治疗前抽取静脉血采用真空采血针抽取静脉血,枸橼酸钠抗凝管(美国 BD 公司)取第二管血 2ml。治疗后一周及二周分别复查。正常对照组在体检时采血检查。

1.4.2 血小板激活 试管内加入 ADP 50 μl,全血 450 μl,轻轻摇匀。室温孵育 5 min,立刻染色。

1.4.3 荧光抗体染色 取两支 Faclon 试管,一管为阴性对照,分别加入 CD61-PerCP、CD62p-PE、

CD63-FITC 同型对照抗体各 10 μL;另一为测定管,分别加入 CD61-PerCP、CD62p-PE、CD63-FITC 各 10 μL;并分别在上述两管中加入 5 μL 全血,轻轻混匀于暗处反应 20 min,各管中加 1 ml 冷的固定液,充分混匀,在暗处放置 30 min,24 h 内上机分析。用 CD61 表达量和侧向散射光(ssc)设门找血小板群,每个标本获取 30000 个血小板,计数 104 个血小板中与荧光抗体 CD62p-PE 结合的阳性血小板数,阳性血小板百分率即为 CD62p 表达水平。CD63 的检测同 CD62p。

1.5 脑梗死组神经功能缺损程度评分

在入院第 1 天、治疗后 1 周及 2 周行 NIHSS 评分评价神经功能缺损程度。

1.6 疗效判定标准

参照全国第四届脑血管病学术会议通过的脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分的疗效判定^[3]。基本治愈:NIHSS 评分减少 91% ~ 100%;显著进步:NIHSS 评分减少 46% ~ 90%;进步:NIHSS 评分减少 18% ~ 45%;无变化:NIHSS 评分减少或增加 <18%;恶化:NIHSS 评分增加 >18%;死亡。

1.7 统计学处理

所有数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,两组间比较采用成组 *t* 检验;配对资料采用配对 *t* 检验,相关性检验采用直线相关检验,临床疗效比较采用秩和检验、 χ^2 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死组与对照组一般资料比较

脑梗死组与对照组在年龄、性别构成比、血小板计数、血压、空腹血糖、血脂水平等一般资料比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 脑梗死组与对照组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | 脑梗死组 | 对照组 |
|----------------------------|----------------|----------------|
| 性别(男/女) | 31/29 | 18/12 |
| 年龄(岁) | 63.40 ± 9.17 | 61.30 ± 6.89 |
| 血小板计数(×10 ⁹ /L) | 193.40 ± 45.53 | 176.31 ± 60.44 |
| 收缩压(mmHg) | 155.24 ± 19.87 | 147.14 ± 25.40 |
| 舒张压(mmHg) | 92.07 ± 15.63 | 90.34 ± 10.17 |
| 空腹血糖(mmol/L) | 5.44 ± 0.93 | 5.67 ± 0.77 |
| 甘油三酯(mmol/L) | 1.73 ± 0.75 | 1.57 ± 0.81 |
| 总胆固醇(mmol/L) | 4.87 ± 0.92 | 4.53 ± 0.86 |

2.2 脑梗死组与对照组 CD62p、CD63 阳性率比较

脑梗死组血小板 CD62p、CD63 的阳性率均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 脑梗死组和对照组 CD62p、CD63 阳性率比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | CD62P(%) | CD63(%) |
|------|----|---------------|---------------|
| 脑梗死组 | 60 | 4.54 ± 3.19 * | 0.81 ± 1.08 * |
| 对照组 | 30 | 1.59 ± 0.26 | 0.05 ± 0.02 |

注: * 为与对照组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 单药组和联合用药组 CD62p、CD63 和 NIHSS 评分治疗前后比较

表 3 单药组和联合用药组治疗前后 CD62p、CD63 表达水平及 NIHSS 评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 治疗前 | | | 治疗一周后 | | | 治疗二周后 | | |
|-------|----------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| | CD62p | CD63 | NIHSS | CD62p | CD63 | NIHSS | CD62p | CD63 | NIHSS |
| 单药组 | 5.47 ± 2.70 | 1.31 ± 0.85 | 6.57 ± 2.49 | 4.12 ± 3.36 * | 0.75 ± 0.49 * | 4.63 ± 2.34 * | 2.59 ± 1.92 △ ** | 0.37 ± 0.33 △ ** | 3.10 ± 2.38 △ ** |
| 联合用药组 | 5.01 ± 1.181 ♦ | 0.96 ± 0.67 ♦ | 5.83 ± 2.91 ♦ | 3.39 ± 1.66 * ● | 0.55 ± 0.46 * ● | 3.43 ± 2.43 * ● | 1.35 ± 0.79 ** | 0.22 ± 0.16 ** | 1.90 ± 2.45 ** |

注: * 治疗一周后的单药组、联合用药组分别与治疗前比较, $P < 0.01$; ☆ 治疗二周后的单药组、联合用药组分别与治疗一周后比较, $P < 0.01$; ♦ 治疗前单药组与联合用药组比较, $P > 0.05$; ● 治疗一周后的单药组与联合用药组比较, $P > 0.05$; △ 治疗二周后单药组与联合用药组相比较, $P < 0.01$ 。

2.4 单药组和联合用药组疗效比较

单药组与联合用药组基本治愈率均为 13%; 显著进步率分别为 50%、83%; 进步率分别为

单药组和联合用药组 CD62p、CD63、NIHSS 评分在治疗一周后与治疗前、治疗二周后与治疗前、治疗二周后与治疗一周后的比较中差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

单药组与联合用药组 CD62p、CD63、NIHSS 评分在治疗前比较差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。两组在治疗一周后比较差异仍然没有统计学意义 ($P > 0.05$)。在治疗二周后联合用药组的 CD62p、CD63、NIHSS 评分与单药组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

33%、3%; 总有效率分别为 96.7%、100%。联合用药组在显著进步率和总有效率明显高于单药组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 两组治疗前后临床疗效比较 [n(%)]

| 组别 | 例数 | 基本治愈 | 显著进步 | 进步 | 无效 | 总有效 |
|-------|----|-------|--------|--------|------|----------|
| 单药组 | 30 | 4(13) | 15(50) | 10(33) | 1(3) | 29(96.7) |
| 联合用药组 | 30 | 4(13) | 25(83) | 1(3) | 0 | 30(100) |

2.5 CD62p、CD63 与 NIHSS 评分间的相关分析

CD62p 与 CD63 进行相关分析, 相关系数为 0.386, $P = 0.000$ (双侧), 可认为 CD62P 与 CD63 有直线相关关系。

将 CD62p、CD63 分别与 NIHSS 评分进行相关分析, 结果发现 CD62p 与 NIHSS 评分的相关系数为 0.298, 显著性为 0.001; CD63 与 NIHSS 评分的相关系数为 0.298, 显著性为 0.000, 提示 CD62p、CD63 分别与 NIHSS 评分具有直线相关性。

3 讨论

阿司匹林 (ASA) 在防治心脑血管急性血栓栓塞性疾病方面起着重要作用, 但是对其疗效评价基本是以临床的病死率或残疾率为标准。体外血小板最大聚集率抑制实验可用来评价抗血小板药物对血小板的抑制作用, 该实验主要反映某一单一途径被阻断后对血小板聚集功能的影响。体内的血

小板活化是多途径、多因素综合作用的, 只有经体外活化剂激活后才能真实反映抗血小板药物对血小板聚集功能抑制的全身性、潜在性。因此, 血小板聚集抑制实验与血小板活化功能检测相关性不强^[4]。流式细胞仪可以灵敏地检测到活化血小板 GP 分子的变化, 并且准确测定其表达率^[4]。

本研究发现脑梗死组 CD62p 和 CD63 阳性率较对照组的明显增高, 证实了血小板活化直接参与脑梗死的发生^[5]。血小板的活化表现为变形、黏附、聚集和释放血小板因子。CD62p 属于黏附分子选择素家族, CD63 可能参与信号传递, 与血小板功能活性有关。存在于血小板胞质内的 CD62p、CD63 只有在血小板活化时才被迅速动员到血小板的表面, 介导启动血小板与白细胞、内皮细胞的黏附。

本研究在治疗一周后、治疗二周后两组的三项

指标均较治疗前有显著差异,提示通过抗血小板治疗,CD62p、CD63 阳性率均逐渐下降,血小板活化被抑制,NIHSS 评分也均随之逐渐下降,患者症状体征随之改善,说明两组治疗均有效。

激活血小板的途径包括 TXA_2 、ADP 与不依赖 TXA_2 和 ADP 的第三条途径。阿司匹林抗血小板聚集主要是使花生四烯酸代谢途径的环氧化酶活性基团中的丝氨酸 530 乙酰化后失去活性,从而抑制血栓烷 A_2 (TXA_2) 的生产,抑制血小板聚集,但是不能抑制 ADP 与不依赖 TXA_2 和 ADP 的第三条途径^[7]。氯吡格雷可以阻断不同诱导剂特别是 ADP 诱导的血小板膜糖蛋白 II b/III a 构型变化而降低其结合纤维蛋白原的能力,抑制血小板聚集,同时还可能抑制凝血酶、胶原等参与的第三条血小板活化途径^[8]。有文献提到氯吡格雷抑制 CD62p 表达的作用优于阿司匹林^[9, 10],故推测可能与氯吡格雷直接抑制血小板上的 CD62p 表达有关^[11]。因此,理论上两药合用可以加强抗血小板作用。本研究在治疗二周后联合用药组与单药组的三项指标比较均显著下降,提示阿司匹林和氯吡格雷联合治疗具有比单用阿司匹林更好的疗效。

阿司匹林与氯吡格雷的联合应用是目前冠心病抗血小板治疗的标准组合。但是在急性脑梗死治疗中,氯吡格雷只是对不能耐受阿司匹林者推荐使用,鲜见双重抗血小板治疗及疗效比较的报道。本研究证实在治疗二周后,联合用药组与单药组相比具有更好的疗效。Meyer 等^[12]亦曾报道 40 例卒中或 TIA 患者在发病后 36 h 内接受氯吡格雷和阿司匹林联合治疗,结果神经功能恶化的比例明显减少。说明双重抗血小板治疗可更有效地抑制血小板活化。治疗后一周的单药组与联合用药组的三项指标相比无显著差异,这可能与氯吡格雷治疗需 5 d 才能达到最大抗血小板作用有关^[13]。

本研究发现 CD62p 和 CD63 有明显的相关性,CD62p、CD63 阳性率与 NIHSS 评分均具有直线相关性,提示不仅在血小板聚集阶段,而且在血小板黏附阶段和介导炎性反应中二者具有一致作用。这证实了 Kcoten 等^[14]的 CD62p 表达水平与 NIHSS 评分呈正相关,而且发现了 CD63 与患者 NIHSS 评分亦呈直线相关,提示 CD62p 和 CD63 作为血小板活化指标具有一致性。

综上,我们认为血小板活化参与脑梗死的发生,在急性期抗血小板治疗是有效的治疗措施;联

合抗血小板治疗明显优于单用阿司匹林;通过流式细胞术检测 CD62p 和 CD63 可以作为抗血小板治疗疗效观察、判断预后的重要参考指标。

参 考 文 献

- [1] 阮长耿. 血小板膜糖蛋白与血栓性疾病. 中国血液流变学杂志, 2001, 11(3): 173-174.
- [2] 何继强, 秦彦文. 血小板与动脉粥样血栓. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3): 286-324.
- [3] 脑卒中患者临床神经功能缺损程度评分标准. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 381-383.
- [4] Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD, et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: Magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. Am Heart J, 2007, 153: 19-15316.
- [5] Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, et al. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol, 2007, 50: 18-22.
- [6] Grau AJ, Ruf A, Vogt A, et al. Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. Thromb haemost, 1998, 80(2): 298-301.
- [7] De Caterina R, Giannessi D, Gazzetti P, et al. Inhibition of platelet aggregation and thromboxane B2 production during aspirin treatment: Dependence on the dose of the aggregation agent. Thromb Res, 1985, 37(2): 337-342.
- [8] Herbert MJ, Frehel D, Vallee E, et al. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. Cardiovascular Drug Reviews, 1993, 11(2): 180-198.
- [9] 陈孝东, 曹勇军, 王光胜, 等. 脑梗死后血小板 CD62 p 表达的动态变化及抗血小板药物的影响. 中华老年心脑血管病杂志, 2009, 11(11): 864-866.
- [10] Yip HK, Chen SS, Liu JS, et al. Serial changes in platelet activation after ischemic stroke I Role of pharmacodynamic modulation. Stroke, 2004, 35: 1683-1687.
- [11] Ford NF. Clopidogrel resistance: pharmacokinetic or pharmacogenetic? J Clin Pharmacol, 2009, 49: 506-512.
- [12] Meyer DM, Albright KC, Allison TA, et al. LOAD: a pilot study of the safety of loading of aspirin and clopidogrel in acute ischemic stroke and transient ischemic attack. J Stroke CerebroVasc Dis, 2008, 17: 26-29.
- [13] Hassan AE, Zacharatos H, Suri MF, et al. Drug evaluation of clopidogrel in patients with ischemic stroke. Expert Opin Pharmacother, 2007, 8(16): 2825-2838.
- [14] Van Kcoten F, Ciabattini G., Kondstaol PJ, et al. Increased platelet activation in the chronic phase after cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage. Stroke, 1999, 30(3): 546-549.