

· 论 著 ·

流式细胞术监测血小板活化指导颅内支架介入术后
病人抗血小板治疗的价值

李 芳 吴颖涛 马廉亭 卢文婕 杨 李

【摘要】目的 探讨流式细胞术监测血小板活化指导颅内支架介入治疗术后病人抗血小板治疗的价值。**方法** 选择 2013 年 1 月至 2016 年 4 月支架介入治疗术后病人 1 792 例,采集空腹静脉血,用 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP 激活 5 min,应用流式细胞仪监测 CD62P 阳性率,范围控制在 20.0%~50.0%。所有病人随访 1 年。**结果** 1792 例中,无不良事件 1691 例,出血 96 例,再梗死 5 例。无不良事件组 ADP 激活后 CD62P 阳性率[(42.34 \pm 19.35)%]显著低于再梗死组[(83.64 \pm 6.41)%; $P<0.05$],但是明显高于出血组[(11.32 \pm 3.96)%; $P<0.05$]。ADP 激活后 CD62P 阳性率<20.0%有 247 例,20.0%~50.0%有 1195 例,>50.0%有 345 例。<20.0%组出血发生率明显增高($P<0.05$),>50.0%组再梗死发生率明显增高($P<0.05$)。20.0%~50.0%组不良事件发生率最低($P<0.05$)。**结论** 应用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 ADP 激活血小板 5 min,采用流式细胞仪监测 CD62P 阳性率,可精准指导颅内支架介入治疗术后病人抗血小板治疗,其安全有效范围为 20.0%~50.0%。

【关键词】 颅内支架介入术;抗血小板治疗;血小板活化;流式细胞术

【文章编号】 1009-153X(2020)08-0525-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743; R 815.2

Value of platelet activation monitoring using flow cytometry to guide anti-platelet therapy in patients after intracranial stenting

LI Fang¹, WU Ying-tao¹, MA Lian-ting², LU Wen-jie³, YANG Li³. 1. Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Central Theater Command, PLA, Wuhan 430070, China; 2. Department of Neurosurgery, General Hospital of Central Theater Command, PLA, Wuhan 430070, China; 3. Department of Hematology and Oncology, Wuhan Children's Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430016, China

【Abstract】Objective To explore the value of platelet activation monitoring (PAM) using flow cytometry (FCM) to guide the anti-platelet therapy in patients after intracranial stenting. **Methods** The fasting venous blood were collected from 1 792 patients who underwent intracranial stenting from January 2013 to April 2016. After activation using 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP for 5 minutes, the CD62P positive rate was detected by FCM, and the rate was controlled within 20.0%~50.0%. All the patients were followed up for 1 year. **Results** Of 1792 patients, 1691 had no adverse events, 96 had bleeding, and 5 had re-infarction. The positive rate of CD62P in the bleeding group [(11.32 \pm 3.96)%] was significantly lower than that [(42.34 \pm 19.35)%] in the no adverse event group ($P<0.05$), which was significantly lower than that [(83.64 \pm 6.41)%] in the re-infarction group ($P<0.05$). The positive rate of CD62P was <20.0% in 247 patients, 20.0%~50.0% in 1 195 patients, and >50.0% in 345 patients. The incidence of bleeding was significantly higher in the <20.0% group than those in 20.0%~50.0% and >50.0% groups ($P<0.05$). The incidence of re-infarction was significantly higher in the >50.0% group than those in <20% and 20%~50% groups ($P<0.05$). The incidence of adverse events was significantly lower in the 20.0%~50.0% group than those in >50% and <20% groups ($P<0.05$). **Conclusions** Using the FCM to monitor the positive rate of CD62P after activation for 5 minutes by 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP can accurately guide the anti-platelet therapy for patients after intracranial stenting, and the safe and effective range of the positive rate of CD62P is 20.0%~50.0%.

【Key words】 Intracranial stenting; Antiplatelet therapy; Platelet activation; Flow cytometry

监测活化血小板比例有助于提高抗血小板治疗的安全性^[1]。与血小板聚集率、血栓弹力图比较,流式细胞术监测血小板活化是一种敏感性和特异性均

较高的方法^[2]。流式细胞术监测抗血小板治疗的研究众多,但检测方案、参考范围不一致^[3,4]。结合血小板聚集率测定及其它血小板研究,用 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP 激活 5 min 后,全血血小板活化率参考值范围为 46.6%~78.8%^[5],同时考虑氯吡格雷抑制血小板活性在 30%~60%的药效学范围,并参考我们既往研究结果^[6],拟定 ADP 激活后 CD62P 阳性率安全有效范围在 20.0%~50.0%。本文探讨此方案在颅内支架介入

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2020.08.009

作者单位:430070 武汉,中国人民解放军中部战区总医院检验科(李 芳、吴颖涛),神经外科(马廉亭);430015 武汉,华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院血液肿瘤科(卢文婕、杨 李)

通讯作者:杨 李,E-mail:yanglilifangbaby@163.com

治疗术后病人抗血小板治疗监测中应用效果。

1 资料与方法

1.1 一般情况 选择2013年1月至2016年4月颅内支架介入治疗术后病人1 792例,其中男932例,女860例;年龄24~85岁。

1.2 检测方法 采集空腹静脉血,柠檬酸钠抗凝。标本采集后15 min内检测。取10 μl全血,加入CD61-PERCP (Becton Dickinson Biosciences, cat:340506), PAC-1 FITC (Becton Dickinson Biosciences, cat:340507), CD62P PE (Becton Dickinson Biosciences, cat:348107)各10 μl染色15 min后,加入预冰冷的含1%多聚甲醛的PBS,流式细胞仪(FACSCalliber, BD Biosciences, San Diego, CA)检测ADP激活前PAC-1、CD62P阳性百分率,以及双阳性百分率。取450 μl全血加入50 μl含200 μmol/L ADP的生理盐水(美国Sigma公司)充分混匀激活5 min。取10 μl激活后的标本进行染色(方法同上),检测ADP激活后PAC-1、CD62P阳性百分率,以及双阳性百分率。ADP激活前CD62P阳性百分率为实验室标本质控,如果大于13.00%,则认为标本在检测前已经被被活化,检测结果不可靠。ADP激活后CD62P阳性百分率为评估抗血小板治疗强度指标,PAC-1阳性百分率用于评估临床替罗非班治疗效果。

1.3 临床药物调整方案 所有病人按指南推荐用量,给予阿司匹林100 mg/d和波立维75 mg/d,第4天采集静脉血进行血小板活化检测。ADP激活后CD62P阳性百分率在20.0%~50.0%,为抗血小板治疗效果合格;ADP激活后CD62P阳性百分率<20.0%,将波立维剂量减半,4 d后再检测,如果合格则纳入随访,如果仍然过低则停用波立维4 d后再检测,如果合格则单独应用阿司匹林进行抗血小板治疗并纳入随访,如果仍然过低则考虑是阿司匹林的个体差异(过度敏感),停用阿司匹林采用波立维单药抗血小板治疗并调整至合格水平后纳入随访。ADP激活后CD62P阳性百分率>50.0%,将波立维剂量增加75 mg,4 d后再检测,如果合格则纳入随访,如果仍然高

于50.0%,则考虑为波立维抵抗,更换波立维为替格瑞洛或者西洛他唑后进行剂量调整,至ADP激活后CD62P阳性百分率在20.0%~50.0%后纳入随访。

1.4 随访 所有病人随访1年,随访内容包括病人是否按要求服药,是否存在出血(主要表现为牙龈出血、不同部位皮下出血、胃肠道出血等)、是否存在胸痛、再梗死、狭窄(需影像学检查确诊)等。根据临床事件分为无不良事件组、出血组、再梗塞组。按ADP激活后CD62P阳性率分为<20.0%组、20.0%~50.0%组、>50.0%组。

1.5 统计学方法 采用SPSS 20.0软件分析;计数资料采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床事件 1 792例中,无不良事件1 691例,出血96例,再梗死5例。无不良事件组ADP激活后CD62P阳性率[(42.34±19.35)%]显著低于再梗死组[(83.64±6.41)%; $P<0.05$],但是明显高于出血组[(11.32±3.96)%; $P<0.05$]。

2.2 ADP激活后CD62P阳性率 <20.0%有247例,20.0%~50.0%有1 195例,>50.0%有345例。<20.0%组出血发生率明显增高($P<0.05$),>50.0%组再梗死发生率明显增高($P<0.05$)。20.0%~50.0%组不良事件发生率最低($P<0.05$)。见表1。

3 讨论

支架介入治疗术后抗血小板治疗是目前研究热点之一^[7,8]。现有检测方法、监测方案的焦点集中在治疗过程中药物抵抗、监测方案、检测指标的临床灵敏度和准确度^[9]。目前常用的评价指标包括血小板抑制率和P2Y₁₂反应指数等,均需要考虑血小板基础可激活率,而不同个体基础可激活血小板比例差异很大,在46.6%~78.8%^[6]。基础可激活率还受到标本采集放置时间、ADP浓度、温度等影响,因此,我们直接用ADP激活后CD62P阳性率表示可活化血小板比例,并确定其在抗血小板治疗中的安全有效范

表1 1 792例支架介入治疗术后病人ADP激活后CD62P阳性率与不良事件关系(例)

CD62P阳性率	例数	无不良事件	出血	再梗死
<20.0%	247	151(61.1%)	96(38.87%)	0(0.0%)
20.0%~50.0%	1195	1195(100.0%)*	0(0.0%)*	0(0.0%)
>50.0 %	345	345(98.57%)*	0(0.0%)*	5(1.43%)*△

注:与<20.0%组相应值比,* $P<0.05$;与20.0%~50.0%组相应值比,△ $P<0.05$

围,优点是避免了其它方法计算抑制率时要用到基础可激活血小板比例结果造成的误差,同时单时间点单次检测结果即可评价治疗效果的安全有效性。

血小板的激活通道有多种,现有抗血小板治疗药物主要作用于 AA、ADP、PGI 等通道,其中 ADP 是最重要的通道^[10]。我们的方案只监测最重要的 ADP 通道,其优势:检测简单快速,能满足临床较多标本检测的要求;同时便于标准化,节省检测成本。

流式细胞术检测血小板活化后表面标志 CD62P 或 CD63 是监测血小板活化特异性较高的方法^[4,11]。CD62P 又名血小板活化依赖性颗粒表面膜蛋白或 P-选择素,是选择素家族中的一员,为分子质量 140 kD 的膜糖蛋白颗粒,定位血小板内的 α 颗粒和内皮细胞棒管状小体内。血小板活化时,血小板 α 颗粒膜与质膜融合,CD62P 暴露于血小板质膜表面,成为血小板活化的特征性指标。波立维类药物对血小板活化的抑制是不可逆的^[12],因此直接应用可被 ADP 激活的血小板比例评估体内血小板功能,方便准确,且不受纤维蛋白和凝血酶等凝血因素影响。

本文出血组 96 例 ADP 激活后 CD62P 阳性率 < 20.0%,再缺血组 5 例 ADP 激活后 CD62P 阳性率 > 50.0%,无不良事件组 1 691 例 ADP 激活后 CD62P 阳性率在 20.0%~50.0%。支架治疗后再缺血事件的后果常常很严重,而出血事件一般较轻微。因此,大部分临床医生更看重抗血小板治疗的效果(如避免血小板抵抗等)^[13],常忽略出血事件。我们的监测方案与其它监测方案最大的不同在于:只监测血小板 ADP 通路可激活的比例,结果证明临床符合度较高。原因可能是 ADP 通路是血小板发挥血栓与止血功能最重要的通路。ADP 激活时间选择 5 min,血小板在血栓与止血的作用中处于最初阶段,选择较短的激活时间有利于观察真实的生理状态下血小板活化功能,如果出血后血小板不能立即活化,则不能发挥其正常生理功能。本文设置临床调整用药的上限和下限,与以往研究只设置实验室检测指标调整用药的上限、是否减少药物用量主要观察临床有无出血不同。

总之,阿司匹林和波立维单用或合用抗血小板治疗时,20 μ mol/L ADP 激活血小板 5 min 后,CD62P 阳性率在 20.0%~50.0%是安全有效监测范围。

【参考文献】

[1] Kozuma K. Antiplatelet therapy during perioperative period: double-edged sword [J]. J Cardiol, 2014, 64: 331-333.

[2] Michelson, Levin J. Platelets [M]. 2nd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press, 2007. 545-563.

[3] van Velzen JF, Laros-van Gorkom BA, Pop GA. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers [J]. Thromb Res, 2012, 130: 92-98.

[4] Rubak P, Nissen PH, Kristensen SD. Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry [J]. Platelets 2016, 27: 66-74.

[5] 候振江. 血液学检验[M]. 第 3 版,北京,人民卫生出版社, 2010. 247-248.

[6] 杨 李,卢文婕,蔡明俊,等. 血小板活化状态检测在颅内动脉瘤支架置入术中的应用[J]. 中国临床神经外科杂志,2013,18(9):537-539.

[7] 马高亭,缪中荣. 抗血小板治疗在血管内治疗缺血性脑血管病中的应用[J]. 中国卒中杂志,2020,15(2):202-208.

[8] 陶贵周,王耀萱. 冠心病抗血小板治疗的进展[J]. 医学与哲学(B),2018,39(12):26-27+77

[9] 张 灏,米登海. 抗血小板治疗[M]. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2011. 38-47.

[10] Sbrana S, Della Pina F, Rizza A, et al. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2008, 74(1): 30-39.

[11] Li-Na Qiu, Lin Wang, Xin Li, et al. Predictive value of high residual platelet reactivity by flow cytometry for outcomes of ischemic stroke patients on clopidogrel therapy [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2015, 24(6):1145-1152.

[12] Capodanno D, Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy: new pharmacological agents and changing paradigms [J]. J Thromb Haemost, 2013, 11(1): 316-29.

[13] Michelson AD, Linden MD, Furman MI, et al. Evidence that preexistent variability in platelet response to ADP accounts for clopidogrel resistance [J]. J Thromb Haemost, 2007, 5 (1): 75-81.

(2018-05-11 收稿,2020-05-22 修回)