·临床研究·

老年人群口服氯吡格雷后血小板聚集率与血尿酸水平相关性分析

巫开文[1],李国春[1*],李婷婷[1],曹玲玲[1],袁 辉[1],王 忆[2]

[1]南京市中心医院检验科,[2]内科,江苏 南京 210018

[摘 要] **目的**:分析老年基本健康人群口服抗血小板药物氯吡格雷后,二磷酸腺苷诱导的血小板最大聚集率(adenosine diphosphate induced platelet maximum aggregation rate,ADP-MAR)与血尿酸(uric acid,UA)的关系。**方法**:选取35例口服氯吡格雷达稳态者为实验组,35例未服用氯吡格雷者为对照组,以二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)为诱聚剂检测血小板最大聚集率(platelet maximum aggregation rate,MAR)、UA等生化指标和CYP2C19*2、*3基因多态性。单因素及多因素线性回归分析影响ADP-MAR的因素。**结果**:线性回归分析显示实验组UA水平对ADP-MAR的回归系数为0.071(95%CI:0.019~0.122,*P*=0.009),多因素调整后,回归系数为0.063(95%CI:0.004~0.122,*P*=0.037)。对照组中UA对ADP-MAR的单因素和多因素线性回归分析回归系数分别为0.028(95%CI:-0.033~0.089,*P*=0.362)和0.015(95%CI:-0.057~0.086,*P*=0.676)。**结论**:氯吡格雷抗血小板聚集效果可能与UA水平相关,UA每增加1 mmol/L,ADP-MAR将升高0.071%,提示老年口服氯吡格雷人群可监测UA水平,以评估抗血小板聚集效果。

[关键词] 血小板最大聚集率;氯吡格雷;基因多态性

[中图分类号] R446.11 [文献标志码] B [文章编号] 1007-4368(2019)01-115-04

doi:10.7655/NYDXBNS20190123

我国在老年人心脑血管疾病的二级预防中广泛使用氯吡格雷[1]。氯吡格雷作用机制是阻断二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)与血小板受体结合,抑制ADP介导的糖蛋白GPⅡb/Ⅲa复合物的活化,抑制血小板聚集。氯吡格雷是前体药物,进入体内后需经过肝细胞色素P_{450}及同工酶的转化后产生效果。氯吡格雷的复杂代谢过程,造成了其抗血小板聚集作用的个体差异[2-3]。检测ADP诱导的血小板最大聚集率(platelet maximum aggregation rate,MAR)可直观评估氯吡格雷抗血小板聚集效果。尿酸(uric acid,UA)水平与心脑血管疾病相关[4],为了明确UA在老年人口服氯吡格雷人群中的作用,及老年人口服氯吡格雷效果的其他影响因素,本研究选取服用和未服用氯吡格雷人群为研究对象,探索CYP2C19*2、*3基因多态性及常用生化指标与口服氯吡格雷后抗血小板聚集效果的相关性。

[基金项目] 南京市医学科技发展课题(YKK15225)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:njlgc@126.com

1 对象和方法

1.1 对象

选择2017年12月—2018年5月南京市中心医院就诊人群作为研究对象,年龄61~90岁,中位年龄81岁;35例口服氯吡格雷达稳态者为实验组,35例未服用氯吡格雷者为对照组,研究对象纳入标准:①年龄60~90岁;②“基本健康”或“生活能自理”[5];③实验组无急性心脑血管疾病,为二级预防心脑血管疾病而连续口服75 mg/d泰嘉(深圳信立泰药业股份有限公司)8 d以上[6];对照组2周内未服用抗血小板聚集药物。排除标准:①急性心脑血管疾病或恢复期,残疾、明显处于非健康或疾病状态;②有较严重的心、肝、肾、肺功能不全,有肺部感染或其他较严重感染者;③血小板计数 <100×10^9个/L或 >450×10^9个/L;血红蛋白<90 g/L;④对氯吡格雷过敏者;⑤凝血功能障碍及使用抗凝药物者;⑥使用阿司匹林或其他抗血小板药物者;⑦入选前4周内使用非甾体类抗炎药者,使用田七、丹参等对血小板聚集有影响的中成药或保健品者,使用抗尿酸药物者。

1.2　方法

1.2.1　临床资料收集

询问研究对象病史，收集年龄、性别等一般情况及既往史、患病史等病史信息。

1.2.2　生化指标检测

研究对象至少空腹8 h，第2日清晨抽静脉血5 mL，自然凝血后，3 000 r/min离心5 min，制备血清，检测肝肾功能等生化指标。使用罗氏8000全自动生化分析仪测定空腹血糖（fasting blood glucose，FBG）、总胆固醇（total cholesterol，TC）、甘油三酯（triglyceride，TG）、低密度脂蛋白胆固醇（low density lipoprotein cholesterol，LDL-C）、高密度脂蛋白胆固醇（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）、丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、尿素氮（blood urine nitrogen，BUN）、尿酸（uric acid，UA）和糖化血红蛋白（glycosylated hemoglobin A1c，HbA1c）。FGB采用葡萄糖氧化酶法，TC、TG检测方法为酶试剂法，HDL-C采用免疫抑制直接法，LDL-C选择计算法，ALT采用连续检测法，BUN采用酶偶联速率法，UA检测方法为尿酸酶比色法，试剂均购自德国Diasys公司，HbA1c采用微柱层析法，试剂及仪器购自美国BIO-RED公司。

1.2.3　血小板功能检测

血小板功能检测使用PL-12血小板分析仪及配套试剂（南京神州英诺华医疗科技有限公司），采用连续计数法原理（sequential platelet counting method，SPCM）进行血小板计数。研究对象空腹8 h以上，使用3.8%枸橼酸钠抗凝双层真空管采集静脉血3 mL。使用PL-12检测基础状态血小板数量2次（PLT1、PLT2），加入ADP诱聚剂后再检测3次血小板数量（PLT3、PLT4、PLT5），每次检测间隔1 min 20 s，15 min内结束。所有样本在抽血后1 h内检测完毕。系统自动计算血小板最大聚集率（max aggrecul rate，MAR），计算公式为[7]：MAR=（PLT1+PLT2）/2−MIN（PTL3，PLT4，PLT5）÷（PLT1+PLT2）/2×100%，MIN（PLT3，PLT4，PLT5）表示PLT3~PLT5中最低值。

1.2.4　CYP2C19*2、*3基因型检测

研究对象空腹至少8 h，次日清晨空腹抽取EDTA抗凝血3 mL，检测CYP2C19*2（G681A，rs4244285），*3（G636A，rs4986893）基因型。检测方法为微阵列芯片法，试剂购自北京天根生化科技和上海百傲科技。实验方法如下：采用吸附柱法提取样本DNA，进行PCR扩增：扩增管中加入19 μL CYP2C19 *2和*3扩增液，1 μL反应液，5 μL DNA模板液混匀，扩增条件为：50 ℃ 5 min→94 ℃ 5 min→94 ℃ 25 s，48 ℃ 40 s，72 ℃ 30 s，35个循环→72 ℃ 5 min。扩增产物使用BaiO-Hyb全自动杂交仪进行杂交显色，显色后芯片放入生物芯片识别仪中，用BaiO基因芯片图像分析软件V.2.0进行图像扫描与数据分析，确定CYP2C19 *2、*3基因型。

1.3　统计学方法

数据收集、统计用SPSS22.0和Excel完成。连续变量用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，t检验分析组间差异；分类变量用百分比表示，卡方检验比较组间差异；用线性回归进行单因素和多因素分析，计算回归系数和95%CI。$P \leqslant 0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　入组人群临床特征

实验组ADP-MAR低于对照组（$P < 0.05$），两组生化指标差异无统计学意义，实验组冠心病（coronary heart disease，CHD）和脑血管疾病（cerebrovascular disease，CVD）患病率高于对照组（$P < 0.001$），CYP2C19*2、*3多态性基因型在两组分布无差异（表1）。

2.2　ADP-MAR影响因素的线性回归分析

以ADP-MAR为因变量进行单因素和多因素线性回归分析，发现实验组UA是ADP-MAR的独立相关因素（回归系数0.071，P=0.009），经过调整后，此种相关因素仍存在（回归系数0.063，P=0.037，表2）。

3　讨　论

血小板功能是心脑血管疾病如卒中、心肌梗死等疾病的重要影响因素，检测血小板功能及监测口服抗血小板药物的疗效对心脑血管疾病的二级预防有重要意义。本研究采用PL-12血小板功能检测仪检测血小板聚集功能[7]，此方法简单易行，适合在临床使用，用于监测血小板聚集功能，评价抗血小板聚集治疗后疗效，评估心脑血管出血或梗死疾病的概率等。

氯吡格雷是常用的抗血小板药物，常用于急性心脑血管的治疗[8]及心脑血管疾病的二级预防。本研究发现口服氯吡格雷老年人群中，UA水平与ADP-MAR呈独立正相关，UA每增加1 mmol/L，ADP-MAR将升高0.071%，而在未服用抗血小板药物的对照组中UA与ADP-MAR并无此种相关性。尿酸主要在肝脏、肠道和血管内皮中合成，是外源性嘌呤池的最终产物，受损、死亡和凋亡的细胞经内源

表1　研究对象临床特征

项目	对照组（n=35）	实验组（n=35）	t/χ^2值	P值
ADP-MAR（%）	57.33 ± 16.58	48.27 ± 14.06	2.468	0.016
年龄（岁）	76.00 ± 10.44	79.23 ± 8.12	−1.444	0.153
男（%）	62.9	57.1	0.238	0.626
BMI（kg/m^2）	24.71 ± 4.32	29.72 ± 32.32	−0.908	0.370
FBG（mmol/L）	5.27 ± 0.80	5.13 ± 1.09	0.237	0.558
TC（mmol/L）	4.41 ± 1.05	4.02 ± 0.93	1.631	0.107
TG（mmol/L）	1.51 ± 0.91	1.38 ± 0.67	0.654	0.515
LDL-C（mmol/L）	2.43 ± 0.88	2.26 ± 0.87	0.822	0.414
HDL-C（mmol/L）	1.32 ± 0.35	1.19 ± 0.29	1.685	0.097
ALT（U/L）	19.11 ± 7.19	15.66 ± 10.40	1.618	0.110
BUN（mmol/L）	5.63 ± 2.73	5.76 ± 2.34	1.627	0.057
UA（mmol/L）	329.03 ± 86.92	302.74 ± 94.53	0.808	0.230
HBP（%）	60.0	80.0	3.333	0.068
T2DM（%）	25.7	37.1	1.061	0.303
CHD（%）	17.1	77.1	25.283	0.001
CVD（%）	42.9	91.4	18.714	0.001
CYP2C19*2多态性基因型（%）	25.7	42.9	2.283	0.131
CYP2C19*3多态性基因型（%）	11.4	5.7	0.729	0.393

BMI：体重指数；HBP：高血压病史；T2DM：2型糖尿病病史；CVD：脑血管疾病病史。

表2　UA对ADP-MAR的线性回归分析

组别		回归系数	95%CI	t值	P值
实验组	调整前	0.071	0.019~0.122	2.791	0.009
	调整后*	0.063	0.004~0.122	2.204	0.037
对照组	调整前	0.028	−0.033~0.089	0.924	0.362
	调整后*	0.015	−0.057~0.086	1.229	0.676

*：同时调整年龄、性别、TG、TG、LDL-C、HDL-C、CYP2C19*2、*3基因型。

性降解，核酸、腺嘌呤和鸟嘌呤降解为尿酸。由于人类不表达尿酸酶造成体内尿酸不能代谢[9]，大多数尿酸由肾脏过滤，并经尿液排出。其余通过肠道被细菌分解成废物，经粪便排出。低效尿酸排泄是原发性高尿酸血症和继发性高尿酸血症的主要原因。UA升高不但与痛风相关，也与多种代谢性疾病、高血压，心血管疾病、慢性肾病、T2DM、认知功能下降相关[4,10]。UA与脂质斑块及动脉硬化性疾病的相关性，或许与血小板的功能聚集增高相关[11]。

UA的致病机制可能与其被称为是具有相反作用的“悖论分子（paradox molecule）”[4]有关。在细胞外亲水环境如人血浆中，UA是一种强大的氧自由基清除剂，可以与超氧阴离子、H_2O_2、羟自由基（OH^-），尤其是过氧化亚硝酸盐反应，保护脂质过氧化作用的红细胞膜；然而，UA在某些炎性条件下，如动脉粥样硬化过程中，可作为细胞内的强氧化剂[12]，同时UA能通过刺激氮氧化合物诱导细胞内氧化应激和各种细胞类型的促炎作用[13]。有研究发现口服抗血小板药物（阿司匹林）可引起血清尿酸水平升高[14]，应动态观察血清尿酸水平，权衡治疗方案的优劣，最后根据风险-效益比进行选择。本研究中实验组和对照组UA水平差异无统计学意义，UA水平与ADP-MAR独立正相关，口服氯吡格雷时监测UA水平可以了解ADP-MAR的聚集情况，对二级预防用药有着重要的指导意义。

本研究中CYP2C19*2、*3多态性基因型未进入影响ADP-MAR的直线方程。临床上是否用CYP2C19基因型来确定氯吡格雷的反应性仍有争议[15]，或用多种基因同时评价氯吡格雷的疗效更加全面[16]。有研究发现UA、高血脂对血小板的功能改变关系密切，在高尿酸合并高血脂的患者中，血小板活化更为明显，本研究血脂指标未进入影响ADP-MAR的直线方程，其原因可能在于本研究人群的高尿酸血症者比例低（8%），血脂指标亦多在正常范围。

本研究的不足之处在于：入组研究对象偏少，且老年人基础疾病较多，增加研究对象数量，并按照基础疾病分类，可进一步细化分析血小板功能的

影响因素。

[参考文献]

[1] Adamek T. Controversies in antiplatelet therapy in the secondary prevention of stroke[J]. Eur Geria Med, 2016, 7(1):65-69

[2] Khalil BM, Shahin MH, Solayman M, et al. Genetic and nongenetic factors affecting clopidogrel response in the Egyptian population[J]. Clin Transl Sci, 2016, 9(1):23-28

[3] 付梦璐,董若兰,徐　玲,等. 氯吡格雷抵抗研究进展[J]. 医药导报,2018,37(2):139-145

[4] Caliceti C, Calabria D, Roda A, et al. Fructose intake, serum uric acid, and cardiometabolic disorders: A critical review[J]. Nutrients, 2017, 9(4):395

[5] 中国老年人健康状况分布特征及其影响因素分析[J]. 中国卫生统计,2015,32(3):401-403

[6] 徐卓文,陈新军,李伟章,等. 阿司匹林和氯吡格雷抑制血小板聚集的时效[J]. 江苏医药,2016,42(2):145-147

[7] Guan J, Cong Y, Ren J, et al. Comparison between a new platelet count drop method PL-11, light transmission aggregometry, verify now aspirin system and thromboelastography for monitoring short-term aspirin effects in healthy individuals.[J]. Platelets, 2014, 26(1):25

[8] 李济民,朱　辉,徐　可,等. 双倍剂量氯吡格雷对冠心病支架植入术后氯吡格雷低反应患者的疗效及安全性研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(8):967-972

[9] Kratzer JT, Lanaspa MA, Murphy MN, et al. Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(10):3763-3768

[10] 李国春,曹　娜,王　忆,等. 基础血尿酸水平与糖负荷后胰岛素分泌相关性研究[J]. 现代检验医学杂志,2015,30(2):105-106

[11] Krishnan E, Pandya BJ, Chung L, et al. Hyperuricemia and the risk for subclinical coronary atherosclerosis--data from a prospective observational cohort study[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(2):1-8

[12] Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, et al. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(3):343-354

[13] Yu MA, Sánchez-Lozada LG, Johnson RJ, et al. Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin, system in human vascular endothelial cells as a novel, mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction[J]. J Hyperten, 2010, 28(6):1234

[14] 宋　旸,李存江. 小剂量阿斯匹林对脑卒中患者血尿酸水平影响的临床观察[J]. 北京医学,2016,38(5):421-423

[15] Yin T, Miyata T. Pharmacogenomics of clopidogrel: evidence and perspectives[J]. Thromb Res, 2011, 128(4):307

[16] Notarangelo MF, Bontardelli F, Merlini PA. Genetic and nongenetic factors influencing the response to clopidogrel.[J]. J Cardiovasc Med, 2013, 14(14 Suppl 1):S1-S7

[17] 王　辉,董万利,方　琪,等. 高尿酸症合并高脂血症患者血小板活化功能的研究[J]. 中风与神经疾病,2014,31(7):633-635

[收稿日期] 2018-06-13