

参考文献

- 1 Matucci - cerinic M, Lombardi A, Lotti T, *et al.* Fibrinolytic activity in the synovial membrane of osteoarthritis [J]. *Br J Rheumatol*, 2005, 29 (4): 253 - 294
- 2 Szekaneca Z, Haines GK, Koch AE. Differential expression of the urokinase receptor (CD87) in arthritic and normal synovial tissues [J]. *J Clin Pathol*, 1997, 50: 314 - 319
- 3 Cevinie MM, Generini S, Partsch G, *et al.* Synovocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor - 1 and display u - PA receptors on their surface [J]. *Life Sci*, 2008, 63: 441 - 453
- 4 Mandl - Weber S, Haslinger B, Lederer SR, *et al.* Heat - killed microorganisms induce PAI - 1 expression in human peritoneal mesothelial cells: role of interleukin - 1 alpha [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 37 (4): 815 - 819
- 5 李茂强, 李宽新, 史晨辉, 等. 骨关节炎滑膜的 uPA 表达与关节软骨破坏程度的相关研究 [J]. *中国内镜杂志*, 2006, 12 (24): 29 - 31

(收稿: 2011 - 06 - 24)

(修回: 2011 - 07 - 08)

吸烟对氯吡格雷抗血小板活化作用的影响

徐 鹏 王宁夫 周 亮 叶显华 童国新 冷建杭

摘 要 **目的** 验证吸烟能否使冠心病患者冠状动脉介入治疗 (PCI) 术后近期氯吡格雷抗血小板活化的作用增强。**方法** 入选择期行冠脉造影并成功行冠脉介入治疗 (PCI) 的不稳定心绞痛患者 42 例, 分为吸烟组 (22 例) 和非戒烟组 (20 例)。各组入院后均给予氯吡格雷 300mg 顿服, 术后继续每日给予氯吡格雷 75mg 口服。服药前以流式细胞仪测定各组 CD61、CD62p 的阳性表达率; 术后 24、72h 再次测定 CD61、CD62p 的阳性表达率。**结果** PCI 术后 24h 两组的 CD61、CD62p 表达较术前无显著变化 (CD61: $-1.16\% \pm 19.06\%$ vs $-0.98\% \pm 22.19\%$, $P=0.36$; CD62p: $-1.93\% \pm 10.80\%$ vs $-2.07\% \pm 15.49\%$, $P=0.96$); PCI 术后 72h 吸烟组 CD61、CD62p 表达较术前有下降趋势, 而非吸烟组无下降趋势 (CD61: $-2.19\% \pm 21.72\%$ vs $5.27\% \pm 26.58\%$, $P=0.46$; CD62p: $-6.13\% \pm 18.74\%$ vs $0.12\% \pm 12.78\%$, $P=0.25$), 但是这些差异无统计学意义。**结论** 吸烟未增强冠心病患者 PCI 术后近期氯吡格雷的抗血小板活化作用。本实验未能验证吸烟能增强冠心病患者 PCI 术后近期氯吡格雷的抗血小板活化作用这一结论。

关键词 吸烟 冠心病 活化血小板 氯吡格雷

Impact of on Clopidogrel Against Platelet Activation. Xu Peng, Wang Ningfu, Zhou Liang, Ye Xianhua, Tong Guoxin, Leng Jianhang. Hanzhou First People's Hospital and Hangzhou affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To confirm if cigarette smoke could enhance the role of clopidogrel against platelet activation in early post - PCI patients. **Methods** Totally 42 patients with unstable coronary artery disease undergoing elective coronary angiography and successful intervention (PCI), were selected, and divided into smoking group (22 cases) and non - smoking cessation group (20 cases). Each group as given 300mg clopidogrel at once after admission and followed with 75mg daily. CD61, CD62p positive rate of expression were determined by flow cytometry before the medication and re - determined after 24, 72h of PCI. **Results** The changes of CD61, CD62p expression in both groups after 24h PCI had no significant difference (CD61: $-1.16\% \pm 19.06\%$ vs $-0.98\% \pm 22.19\%$, $P=0.36$; CD62p: $-1.93\% \pm 10.80\%$ vs $-2.07\% \pm 15.49\%$, $P=0.96$). In smoking group 72h after PCI, CD61, CD62p expression was still lower than before, while the non - smoking group had no longer the performance (CD61: $-2.19\% \pm 21.72\%$ vs $5.27\% \pm 26.58\%$, $P=0.46$; CD62p: $-6.13\% \pm 18.74\%$ vs $0.12\% \pm 12.78\%$, $P=0.25$), but these differences were not statistically significant. **Conclusion** Smoking doesn't significantly increase the antiplatelet of clopidogrel in early post - PCI. This study failed to verify the conclusion that smoking could increase the antiplatelet of clopidogrel in early post - PCI.

Key words Smoking; Coronary heartdisease; Activated platelet; Clopidogrel

作者单位: 310006 南京医科大学附属杭州医院暨杭州市第一人民医院心内科 (徐鹏、王宁夫、周亮、叶显华、童国新); 检验科 (冷建杭)
通讯作者: 王宁夫, 电子信箱: wangningfu@hotmail.com

最近有研究报告, 由于吸烟具有促进氯吡格雷向活性产物转化的作用, 故吸烟可以使氯吡格雷抑制血小板聚集和活化的作用增强, 而且冠心病的预后也显著得到改善^[1]。对这些研究结果的解释和一些专家

的观点与以往吸烟有害的研究结论相矛盾,在学术界引起关注和争论。然而,吸烟作为心血管疾病的独立危险因素,其致病作用已得到明确证实,大量临床研究显示吸烟者患冠心病的危险是不吸烟者的 1.5 ~ 4.0 倍;吸烟者患心肌梗死的危险是不吸烟者的 3 倍左右。因此吸烟有益于增加氯吡格雷抑制血小板聚集和活化的结论有待于进一步验证。本研究旨在验证吸烟是否在冠心病患者冠状动脉介入治疗(PCI)术后近期有增强氯吡格雷抗血小板活化作用。

对象与方法

1. 入选标准:随机入选 2009 年 2 ~ 10 月在笔者医院诊断为不稳定心绞痛初次择期行冠脉造影的病人,符合冠脉介入治疗(PCI)术标准并成功地行介入治疗的病人分为吸烟组(22 例)和非吸烟组(20 例)。吸烟组的标准:吸烟 1 年以上并且近 24h 内吸烟,每日超过 10 支;非吸烟组的标准:既往无吸烟史和已经戒烟 10 年以上者。

2. 排除标准:两组均排除急性心肌梗死、既往吸烟但已戒烟或虽然未戒烟而近 24h 内未吸烟者、氯吡格雷过敏、过去两个月内有献血史、出凝血功能障碍、胃肠道手术史(阑尾切除术除外)、肝肾疾病、病毒性肝炎携带者、甲状腺功能亢进或减退、肿瘤、感染性疾病、自身免疫性疾病、有其他动、静脉血栓疾病者及重度心力衰竭(NYHA IV 级)。

3. 服用药物:所有患者入院后即顿服拜阿司匹林 300mg、氯吡格雷 300mg,随后按拜阿司匹林 100mg 每天 1 次、氯吡格雷 75mg 每天 1 次服用,同时根据冠心病治疗原则服用他汀、硝酸酯等药物,有高血压、糖尿病患者继续服用相关药物;冠脉造影后如需行 PCI 术者,术后继续服用氯吡格雷 75mg 每天 1 次、拜阿司匹林 100mg 每天 1 次。拜阿司匹林 100 毫克/片,产自德国拜耳公司,氯吡格雷 75 毫克/片,产自法国赛诺菲-安万特公司。

4. 样本采集:所有患者入院后即采集外周静脉血 3ml;PCI 术后患者在术后 24、72h 早晨空腹再次采集外周静脉血 3ml。将所采集的静脉血加入 3.13% 枸橼酸钠(CTAD)抗凝管。

5. 活化血小板的测定:荧光抗体染色:采用三色荧光染色,于 FALCON 试验管中加入 PAC-1-FITC、CD62p-PE、CD61-PerCP 抗体各 20 μ l,各管分别加入混匀的全血 5 μ l;在对照管中加入 PAC-1-FITC、IgG1-PE、CD61-per-cp 各 20 μ l 及 RGDS 10 μ l。室温下避光孵育 20min,加入 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 1% 多聚甲醛(PFA),充分混匀,阴暗处放置,24h 内上流式细胞仪分析检测。流式细胞仪(FCM):开机后以 CaliBRITE3 荧光微球和 FACDComp 自动软件检查仪器灵敏度,并自动设定实验的获取条件,包括光电倍增管(PMT)电压和荧光补偿等,然后以 CellQuest 软件用样本进一步优化实验获取条件,并检测各组样本管,获取 10000 个细胞,最后用 CellQuest 软件分析 CD61、CD62p 阳性颗粒的百分率。所有试剂均由美国 BD 公司生产,固定液 PFA 由美国 Sigma 公司生产,FACSCalibur 流

式细胞仪购自美国 BD 公司。

6. 统计学方法:数据统计及计算使用 SPSS 16.0 完成,各组数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,基线数据比较采用卡方检验,各组实验数据间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基线情况:两组在年龄、高血压、高脂血症、糖尿病、脑血管病及服用质子泵抑制剂(PPI)等方面的差距无明显统计学意义(表 1)。

表 1 两组患者的一般情况

项目	吸烟($n=22$)	非吸烟($n=20$)	<i>P</i>
年龄(岁)	63.82 $\pm$ 8.73	70.71 $\pm$ 10.14	0.20
高血压	11	11	0.75
高脂血症	16	16	0.52
高甘油三酯血症(>200mg/dl)	7	4	0.62
高胆固醇血症(>150mg/dl)	16	16	0.52
HDL-C(>130mg/dl)	0	1	0.89
糖尿病	7	5	0.62
脑血管病	0	3	0.21
颈动脉斑块	1	2	0.81
术后服用奥美拉唑	2	2	0.60
术后服用其他 PPI	3	1	0.61
术后总的 PPI 服用	5	3	0.70

2. 服用氯吡格雷前和 PCI 术后 24、72h 的 CD61、CD62p 改变:服用氯吡格雷前和 PCI 术后 24、72h 的 CD61、CD62p 的各组数据资料见表 2。

表 2 PCI 术前、术后 24、72h 各组的 CD61、CD62p 表达率

项目(%)	非吸烟($n=20$)	吸烟($n=22$)	<i>P</i>
术前 CD61	26.48 $\pm$ 17.66	33.89 $\pm$ 22.79	0.23
术前 CD62p	30.21 $\pm$ 17.33	31.65 $\pm$ 16.15	0.78
术后 24h CD61	24.81 $\pm$ 16.35	32.54 $\pm$ 18.47	0.26
术后 24h CD62p	27.68 $\pm$ 16.01	29.68 $\pm$ 18.62	0.72
术后 72h CD61	31.65 $\pm$ 20.47	31.61 $\pm$ 18.61	0.70
术后 72h CD62p	30.48 $\pm$ 17.51	26.38 $\pm$ 15.44	0.40

3. 服用氯吡格雷前和 PCI 术后 24、72h 的 CD61、CD62p 表达率、差值的比较见表 3。数据显示,两组术后 24、72h 的 CD61、CD62p 阳性表达率与术前比较无显著改变;其中术后 24h 两组的 CD61、CD62p 表达较术前均有下降的趋势,但组间比较无明显统计学差异;吸烟组在术后 72h 的 CD61、CD62p 表达较术前仍有下降趋势,而非吸烟组已无下降表现,但是组间比较也无统计学差异。

表 3 PCI 术后 24、72h 与 PCI 术前 CD61、CD62p 表达率差值的变化(%)

项目	非吸烟(<i>n</i> = 20) (<i>P</i>)	吸烟(<i>n</i> = 22) (<i>P</i>)	<i>P</i>
术后 24hCD61 与术前相比	- 1.16 ± 19.06 (0.78)	- 0.98 ± 22.19 (0.84)	0.36
术后 24hCD62p 与术前相比	- 1.93 ± 10.80 (0.43)	- 2.07 ± 15.49 (0.55)	0.96
术后 72hCD61 与术前相比	5.27 ± 26.58 (0.42)	- 2.19 ± 21.72 (0.70)	0.46
术后 72hCD62p 与术前相比	0.12 ± 12.78 (0.96)	- 6.13 ± 18.74 (0.23)	0.25

讨 论

烟草烟雾中的一氧化氮、一氧化碳、氧自由基等物质损害血管内皮、增加血液黏稠度和血小板聚集、活化的能力、促进血栓形成,诱发或加剧心血管疾病,不论主动还是被动吸烟者,心血管疾病都明显增加。吸烟作为心血管疾病的独立危险因子,其致病作用已得到明确证实,但是近期对一些吸烟与血栓的临床试验结果的解释造成一些学术争论。CLARITY - TIMI 28 试验的结果分析发现,氯吡格雷降低了冠脉造影前总体梗死相关的主要终点事件和病死率,但吸烟≥ 10 支/天者获益要明显高于不吸烟者;同样,氯吡格雷在降低 30 天全因死亡、心肌梗死和急性血运重建方面,吸烟≥ 10 支/天者也优于不吸烟者^[1]。Jeong 等^[2]对 138 名急性心肌梗死并且进行支架置入的患者进行研究,发现每日抽烟≥ 10 支的患者其 5 和 20μmol/L ADP 诱导下的血小板聚集率都明显低于非吸烟者 (40.9% ± 16.1% vs 46.6% ± 11.7%, *P* = 0.028, 53.8% ± 16.6% vs 59.2% ± 12.2%, *P* = 0.040),在吸烟的健康志愿者和急性 ST 段抬高性心肌梗死患者身上发现氯吡格雷的抗血小板作用有增加的表现。

对此类研究结果如何解释是目前学术争论的焦点。一些作者认为吸烟促进了氯吡格雷向其活性成分的转化。氯吡格雷属第 2 代噻吩吡啶类药物,其原药无活性,体内经肝脏细胞色素 P450 转化的代谢物方具抗血小板聚集活性。Yousef 等^[3]观察了正常志愿者吸烟对氯吡格雷药代动力学的影响,发现相对非吸烟者,吸烟者的氯吡格雷(原形及无活性羧酸代谢产物)曲线下面积(AUC)下降 30%,半衰期下降 35%,而血浆峰值浓度和达峰值浓度的时间无差异。研究发现吸烟可以干扰 CYP 亚型,诱导 CYP1A2、CYP2C19 等的表达,从而促进氯吡格雷向活性产物方向的代谢^[4,5]。

事实上,吸烟是否增加氯吡格雷的抗血小板作用,学术界也有一定的争议,Cho 等^[6]的相关研究证实急性心肌梗死患者中吸烟与血小板活性的降低没有相关性,而 PCI 术后吸烟≥ 10 支/日的患者氯吡

格雷也没有进一步降低血小板活性。另一种观点认为吸烟本身有急性诱导血小板聚集的作用,氯吡格雷阻断血小板聚集作用的增强是一种对吸烟者造成凝血功能失调的反应,在某种程度上也表明吸烟者与非吸烟者可能在血栓发生机制上有所不同,吸烟者更需要氯吡格雷治疗。Addad 等^[7]对稳定型冠心病患者的研究证实这一观点。Cucina 等^[8]研究证实烟草中的尼古丁可以增加血管内皮细胞和巨核细胞表面 P2Y12 受体的表达,虽然该实验没有直接有关于血小板的数据,因为血小板由成熟的巨核细胞脱落而来,故推测血小板分泌的 ADP 表面 P2Y12 受体表达也因吸烟而增加,从而使氯吡格雷的抗血小板作用增加。

本实验采用常用的血小板活化标志物 CD61、CD62p 作为观测血小板活化程度的指标。Cd61 是血小板膜糖蛋白Ⅲa(GPⅢa)代表的 CD 抗原,与 GPIIb 构成 GPⅡb/Ⅲa 复合物,是血小板含量最多的糖蛋白,研究证实 GPⅡb/Ⅲa 与纤维蛋白原的结合是血小板聚集的最后通路^[9]。CD62p 是 α 颗粒膜表面的糖蛋白 GMP-140 代表的 CD 抗原,又称 P-选择素,其在血小板质膜上的表达或其阳性血小板的百分率的增加被认为是活化血小板的特异性标志物^[10]; CD62p 的强表达在血小板活化后 10min 时出现,活化有赖于 GPⅡb/Ⅲa 与纤维蛋白原的结合,因此 CD62p 是血小板活化的晚期标志物^[11]。本试验数据显示 PCI 术前、术后两组间 CD61、CD62P 的表达没有明显差异,术后 24h 的 CD61、CD62P 的表达较术前有所下降(CD61: - 1.16% ± 19.06% vs - 0.98% ± 22.19%, *P* = 0.36; CD62p: - 1.93% ± 10.80% vs - 2.07% ± 15.49%, *P* = 0.96),可以认为与氯吡格雷的抗血小板作用有关;术后 72h 吸烟组的 CD61、CD62P 的表达较术前仍略有下降,非吸烟组则不再降低(CD61: - 2.19% ± 21.72% vs 5.27% ± 26.58%, *P* = 0.46; CD62p: - 6.13% ± 18.74% vs 0.12% ± 12.78%, *P* = 0.25),两组间比较没有统计学意义。即本实验的结果显示吸烟未能增强冠心病患者 PCI 术后早期氯吡格雷的抗血小板活化作用。

本实验未能进一步验证 CLARITY - TIMI 28 等试验的结论,可能的原因有:①吸烟增强氯吡格雷抗血小板作用,同时也增加了血小板活化能力,两者的作用有所抵消;②CLARITY - TIMI 28 等试验中未进一步明确入院及随访过程中的戒烟情况,不良终点事件的减少还可能与戒烟本身有关,因为终点事件的减少与吸烟的数量明显相关;③上文中提到的一些氯吡格雷相关的试验是在健康志愿者或者体外完成的,且氯吡格雷存在较大的个体差异性,吸烟对氯吡格雷抗血小板作用的影响究竟如何,目前尚缺乏大规模临床证据。

因为目前关于吸烟对氯吡格雷抗血小板作用方面的实验不多,而且相关试验中以 CD61、CD62p 等标志物来测定血小板作用的报道较少。由于受样本偏少、患者合并高血压等疾病的影响及入院后短期减少或停止吸烟等因素的影响,本研究结果有一定的局限性。因此,吸烟是否可以增加氯吡格雷的抗血小板作用,还需大样本的临床观察以进一步明确。

本实验表明吸烟的冠心病患者未发现 PCI 术后早期氯吡格雷的抗血小板活化作用增强,因此本实验未能验证吸烟能增加冠心病患者 PCI 术后近期氯吡格雷的抗血小板活化作用这一结论。关于吸烟者 PCI 术后服用氯吡格雷是否有额外临床获益的问题,本文未做探讨,还需大样本的临床观察以进一步澄清。

参考文献

- Desai NR, Mega JL, Jiang S, *et al.* Interaction between cigarette smoking and clinical benefit of clopidogrel[J]. J Am Coll Cardio,

2009,53(15):1273 - 1278

- Jeong YH, Cho JH, Kang MK, *et al.* Smoking at least 10 cigarettes per day increases platelet inhibition by clopidogrel in patients with ST - segment - elevation myocardial infarction[J]. Thromb Res, 2010, 126(4):e334 - e338
- Yousef AM, Arafat T, Bulatova NR, *et al.* Smoking behaviour modulates pharmacokinetics of orally administered clopidogrel[J]. J Clin Pharm Ther, 2008, 33(4):439 - 449
- Jeurissen SM, Punt A, Boersma MG, *et al.* Human cytochrome p450 enzyme specificity for the bioactivation of estragole and related alkenylbenzenes[J]. Chemical Research in Toxicology, 2007, 20(5):798 - 806
- Liu XL, Wang ZJ, Yang Q, *et al.* Impact of CYP2C19 polymorphism and smoking on response to clopidogrel in patients with stable coronary artery disease[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(22):3178 - 3183
- Cho JH, Jeong YH, Ahn YJ, *et al.* The impact of smoking on post - clopidogrel platelet reactivity in patients with acute myocardial infarction[J]. Korean Circ J, 2010, 40(3):119 - 124
- Addad F, Chakroune T, Asma A, *et al.* Clopidogrel but not Aspirin prevents acute smoking - induced platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease[J]. Thromb Res, 2009, 123(4):640 - 643
- Cucina A, Fuso A, Coluccia P, *et al.* Nicotine inhibits apoptosis and stimulates proliferation in aortic smooth muscle cells through a functional nicotinic acetylcholine receptor[J]. J Surg Res, 2008, 150(2):227 - 235
- Calvete JJ. Structures of integrin domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of alpha IIb beta3[J]. Exp Biol Med, 2004, 229(8):732 - 744

(收稿:2011 - 04 - 13)

(修回:2011 - 05 - 03)

(上接第 190 页)

- Artis D. Epithelial cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(6):411 - 420
- Uhlig HH, Powrie F. The role of mucosal T lymphocytes in regulating intestinal inflammation[J]. Springer Semin Immunopathol, 2005, 27(2):167 - 180
- Podd BS, Thoits J, Whitley N, *et al.* T cells in cryptosporidiosis share TCR gamma variable region junctional sequences with gamma delta T cells in the small intestinal epithelium of mice[J]. J Immunol, 2006, 176(11):6532 - 6542
- Hooper LV. Bacterial contributions to mammalian gut development[J]. Trends Microbiol, 2004, 12(3):129 - 134
- Leaphart CT, Cavallo J, Gribar SC, *et al.* A critical role for TLR 4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair[J]. J Immunol, 2007, 179(7):4808 - 4820
- Caplan MS, Miller R, Kaup S, *et al.* Bifidobacterium supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in neonatal rat model[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3):577 - 583
- Jilling T, Simon D, Lu J, *et al.* The role of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis[J]. J Immunol, 2006,

177(5):3273 - 3282

- Hunter CJ, Petrosyan M, Ford HR, Prasad Rao NV. Enterobacter sakazakii: an emerging pathogen in infants and neonates[J]. Surg Infect, 2008, 9(5):533 - 539
- van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, *et al.* Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with enterobacter sakazakii in powdered milk formula[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1):293 - 297
- Simmons BP, Gelfand MH, Metts L, *et al.* Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of powdered infant formula[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1989, 10(9):389 - 401
- Hunter CJ, Singamsetty VK, Chokshi NK, *et al.* Enterobacter sakazakii enhances epithelial cell injury by inducing apoptosis in a rat model of necrotizing enterocolitis[J]. J Infect Dis, 2008, 198(4):586 - 593
- Cabana MD, Shane AL, Cao C, *et al.* Probiotics in primary care pediatrics[J]. Clin Pediatr (Phila), 2006, 45(5):405 - 410
- Bin - Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, *et al.* Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants[J]. J Pediatr, 2005, 147(2):192 - 196

(收稿:2011 - 06 - 08)

(修回:2011 - 06 - 20)