

急性冠脉综合征患者血小板蛋白酶活化受体-1的表达^①

覃月秋, 楚罗湘, 高艳

(广西医科大学第四附属医院, 广西 柳州 545005 E-mail: deepest54@163.com)

摘要:目的 观察急性冠脉综合征(ACS)患者血小板蛋白酶活化受体-1(PAR-1)的表达,为探讨多种途径抗血小板聚集治疗提供依据。**方法** 临床研究共纳入150例研究对象,分为急性ST段抬高型心肌梗死(STEMI组)、急性非ST段抬高型心肌梗死(NSTEMI组)、不稳定型心绞痛1组(UA-1组,任何一支血管狭窄 $\geq 75\%$)、不稳定型心绞痛2组(UA-2组, $50\% \leq$ 任何一支血管狭窄 $< 75\%$)、对照组(Cont组,冠脉造影、心肌酶谱正常),每组30例。通过ELISA方法检测富血小板血浆PAR-1的表达。**结果** Cont组、UA-2组、UA-1组、NSTEMI组、STEMI组的PAR-1浓度依次逐渐升高,分别为(2.35 \pm 0.10) ng/ml、(2.66 \pm 0.14) ng/ml、(2.85 \pm 0.17) ng/ml、(3.81 \pm 0.15) ng/ml、(3.95 \pm 0.24) ng/ml,各组总体比较差异有统计学意义($F = 182.869, P < 0.001$),5个研究组组间两两比较结果显示,除STEMI和NSTEMI组间、UA-1和UA-2组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),其余急性心肌梗死各组(STEMI、NSTEMI组)与心绞痛各组(UA-1、UA-2组)两两比较差异有统计学意义($P < 0.001, P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),ACS各组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** ACS患者血小板PAR-1表达明显增加,PAR-1通路激活可能是ACS发生的始动因素,因此适当抑制PAR-1表达或许成为抗血小板聚集治疗新的有效靶点。

关键词: 急性冠脉综合征;蛋白酶活化受体-1;抗血小板聚集

中图分类号: R331.124 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2018)02-0112-04
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.02.004

Expressions of platelet protease activated receptor-1 in patients with acute coronary syndrome

Qin Yueqiu, Chu Luoxiang, Gao Yan

(The Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, Guangxi
E-mail: deepest54@163.com)

Abstract: Objective To observe the expressions of platelet protease activated receptor-1(PAR-1) in patients with acute coronary syndrome(ACS) and provide evidences for exploring various ways of antiplatelet aggregation therapy. **Methods** A total of 150 patients were selected as the clinical study objects and were divided into acute ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) group, acute non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI) group, unstable angina (UA)-1 group (any one of the vessel branch stenosis $\geq 75\%$), UA-2 group ($50\% \leq$ any one of the vessel branch stenosis $< 75\%$) and control group(Cont group: normal coronary arteriogram and myocardial enzymogram), 30 cases in each group. The expression of PAR-1 in platelet-rich plasma was detected by ELISA. **Results** The concentrations of PAR-1 in Cont group, UA-2 group, UA-1 group, NSTEMI group and STEMI group gradually increased in turn, and they were (2.35 \pm 0.10) ng/ml, (2.66 \pm 0.14) ng/ml, (2.85 \pm 0.17) ng/ml, (3.81 \pm 0.15) ng/ml and (3.95 \pm 0.24) ng/ml respectively, and the overall comparison of PAR-1 among the five groups showed that there were statistically significant differences ($F = 182.869, P < 0.001$). As for the results of two groups comparison, except the comparisons of PAR-1 between the STEMI and NSTEMI groups, and between the UA-1 and UA-2 groups showed no statistically significant differences ($P > 0.05$), the differences between acute myocardial infarction groups (STEMI, USTEMI group) and angina groups (UA-1, UA-2 group) were statistically significant ($P < 0.001, P < 0.01$ or $P < 0.05$), the differences between the ACS groups and the control group were statistically significant ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of platelet PAR-1 in ACS patient is significantly increased, and PAR-1 pathway activation may be the initiating factor in the occurrence of ACS. So proper inhibition of PAR-1 expression may be a new effective target for antiplatelet aggregation therapy.

Key words: acute coronary syndrome; protease activated receptor-1; antiplatelet aggregation

① 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160030)

凝血酶是最强的血小板激活剂之一,蛋白酶活化受体-1(Protease activated receptor-1, PAR-1)是最主要的人类血小板凝血酶受体, PAR-1 与低浓度的凝血酶结合即可激活血小板^[1], 血小板活化是急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)发生的重要环节,抗血小板治疗除抑制环氧化酶和 ADP 受体的经典途径外, PAR-1 可作为抗血小板治疗的另一个靶点。本文通过临床研究 ACS 患者血小板 PAR-1 表达的变化,为多种途径抗血小板聚集治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2016年6月—2017年12月就诊于柳州市工人医院心血管病区的150例患者为研究对象,其中ACS患者120例,对照组30例,具体为:急性ST段抬高型心肌梗死(acute ST-segment elevation myocardial infarction, STEMI)组30例(STEMI组),急性非ST段抬高型心肌梗死(acute non-ST-segment elevation myocardial infarction, NSTEMI)组30例(NSTEMI组),不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)-1组30例(UA-1组:任何一支血管狭窄 $\geq 75\%$),不稳定型心绞痛-2组30例(UA-2组:50% \leq 任何一支血管狭窄 $< 75\%$),对照组30例(Cont组:冠脉造影、心肌酶谱正常)。入选标准:①年龄40~80岁;②住院期间行冠脉造影检查;③入院前未服用抗血小板聚集、他汀类药物;④签字同意参与研究。排除标准:①急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)已给予溶栓或急诊介入手术或已使用抗血小板药物;②严重肝功能不全或肾功能不全;③急性脑血管意外、白血病、严重贫血、外周血管闭塞、系统性红斑狼疮、消化道穿孔出血及恶性肿瘤;④急慢性感染、创伤或手术 < 2 周;⑤恶性心律失常、心脏骤停、休克、急性左心衰等抢救患者。STEMI诊断参照2015年中国《急性ST段抬高型心肌梗死诊断治疗指南》^[2], NSTEMI、UA诊断参照2011年美国心脏病协会/美国心脏协会UA和NSTEMI指南^[3]。本研究方案经

过我院伦理委员会审查同意,所有研究对象自愿签署知情同意书。

1.2 研究方案 所有研究对象住院期间完善血常规、生化、凝血、脑钠肽、心电图、心脏彩超、腹部彩超、冠脉造影检查,统计性别、年龄、吸烟史、高血压、血糖、血脂、体重指数(body mass index, BMI)等一般指标并进行比较。所有研究对象于入院时立即静脉采血约20 ml,除常规、生化、凝血等化验外,取5 ml 静脉血制备富血小板血浆(platelet-rich pPlasma, PRP)以检测 PAR-1 浓度,得到结果后比较各组 PAR-1 水平的差异。

1.3 制备富血小板血浆 取外周静脉血5 ml,用3.8%枸橼酸钠按血与抗凝剂体积比例为9:1进行抗凝,在室温下以150 r/min离心20 min,采集上层PRP。剩余血液再以500 r/min离心10 min获得贫血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP),利用PPP调整PRP中的血小板数目,实验过程血小板的数目调整为 3×10^{11} 个细胞/L。

1.4 酶联免疫吸附测定法(ELISA) 人PAR-1检测试剂盒购自武汉优尔生科技股份有限公司,根据试剂盒说明书进行操作,采用ELISA法检测临床收集分离的PRP中的PAR-1表达。

1.5 统计学方法 所有数据均采用SPSS 22.0进行统计学分析,计数资料用频数表示,计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,对计数资料采用 χ^2 检验,对计量资料总体进行方差齐性检验及方差分析,用LSD进行多重比较,计量资料组间两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 统计结果显示BMI($F = 2.668, P = 0.032$)、TC($F = 3.453, P = 0.011$)、糖尿病($\chi^2 = 11.146, P = 0.025$)在各组总体比较中差异有统计学意义,年龄、性别、吸烟、高血压病、LDL、TG差异无统计学意义,见表1、表2。

表1 一般资料统计(计量资料) ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄 (岁)	BMI (kg/m ²) ^a	TC (mmol/L) ^a	TG (mmol/L)	LDL (mmol/L)
STEMI组	30	50.2 \pm 6.5	25.2 \pm 2.2	5.9 \pm 1.2	1.4 \pm 0.4	4.5 \pm 0.9
NSTEMI组	30	52.8 \pm 7.5	25.9 \pm 3.1	5.7 \pm 0.8	1.4 \pm 0.5	4.6 \pm 0.8
UA-1组	30	49.6 \pm 7.9	26.9 \pm 3.3	5.5 \pm 0.9	1.5 \pm 0.6	4.3 \pm 0.6
UA-2组	30	51.4 \pm 8.4	24.5 \pm 2.2	4.8 \pm 0.7	1.5 \pm 0.7	4.4 \pm 0.7
Cont组	30	50.5 \pm 7.3	22.1 \pm 2.5	4.5 \pm 0.5	1.3 \pm 0.5	4.0 \pm 0.5

注: BMI: 体重指数, TC: 总胆固醇, TG: 总甘油三酯, LDL: 低密度脂蛋白; 总体比较, a: $P < 0.05$

2.2 临床各组血小板 PAR-1 的水平比较 结果显示 Cont 组、UA-2 组、UA-1 组、NSTEMI 组、STEMI 组的 PAR-1 浓度依次逐渐升高, 各组总体比较中差异有

统计学意义($F = 182.869, P < 0.001$)。对 Cont 组、UA-2 组、UA-1 组、NSTEMI 组、STEMI 组进行组间两两比较, STEMI 和 NSTEMI 组间、UA-1 和 UA-2

表2 一般资料统计(计数资料)

组别	n	高血压 (Y/N)	吸烟 (Y/N)	性别 (男/女)	糖尿病 (Y/N) ^a
STEMI组	30	16/14	19/11	19/11	22/8
NSTEMI组	30	16/14	23/7	22/8	18/12
UA-1组	30	16/14	17/13	17/13	16/14
UA-2组	30	17/13	16/14	16/14	17/13
Cont组	30	15/15	15/15	15/15	8/22

注:Y:有,N:无,总体比较,a: $P < 0.05$

组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),STEMI和UA-1组、STEMI和UA-2组、NSTEMI和UA-1组、NSTEMI和UA-2组比较差异均有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),ACS各组(STEMI组、NSTEMI组、UA-1组、UA-2组)与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.001$)。具体见图1、表3。

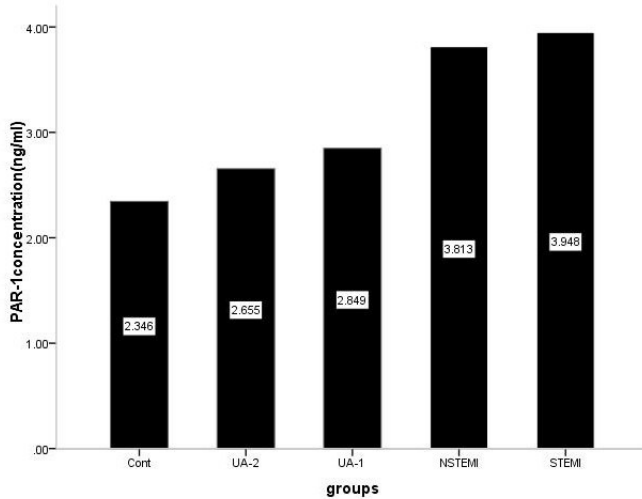


图1 各组血小板血浆 PAR-1 表达浓度

表3 各组血小板血浆 PAR-1 浓度的比较

组别	PAR-1($\bar{x} \pm s$, ng/ml)
Cont组	2.35 ± 0.10 ^{abcd}
UA-2组	2.66 ± 0.14 ^{efg}
UA-1组	2.85 ± 0.17 ^{hi}
NSTEMI组	3.81 ± 0.15 ^j
STEMI组	3.95 ± 0.24

注:a:与UA-2组比较, $t = 3.809$, $P < 0.001$;b:与UA-1组比较, $t = 4.503$, $P < 0.001$;c:与NSTEMI组比较, $t = 5.467$, $P < 0.001$;d:与STEMI组比较, $t = 5.602$, $P < 0.001$;e:与UA-1组比较, $t = 1.530$, $P = 0.056$;f:与NSTEMI组比较, $t = 2.987$, $P = 0.002$;g:与STEMI组比较, $t = 3.213$, $P < 0.001$;h:与NSTEMI组比较, $t = 2.225$, $P = 0.012$;i:与STEMI组比较, $t = 2.678$, $P = 0.005$;j:与STEMI组比较, $t = 1.356$, $P = 0.078$

3 讨论

ACS是临床中常见的严重心血管疾病,包括STEMI、NSTEMI和UA,是由冠状动脉粥样硬化

(atherosclerosis, AS)斑块破裂或侵袭而继发的不完全或完全闭塞性血栓形成所致。据统计,2014年中国急性心肌梗死(AMI)死亡率城市为55.32/10万,农村为68.60/10万,中国2002年到2014年AMI死亡率总体呈上升态势,40岁以后开始显著上升,其递增趋势近似于指数关系^[4-5],2013年杨功焕等^[6]在Lancet上发表的文章显示,我国缺血性心脏病死亡人数为948700人,其中约70%的致死性心血管疾病与AS斑块破裂有关。血小板激活、粘附和聚集是AS斑块破裂以致动脉血栓形成的关键性起始步骤,而血栓形成是ACS发生及冠状动脉血运重建后心脏缺血性并发症的主要病理生理学因素。

在目前临床治疗中,抗血小板聚集仍是当前ACS的重要治疗措施之一,临床上对ACS患者通常采用双重抗血小板聚集治疗,如联合口服阿司匹林和氯吡格雷、阿司匹林和普拉格雷、阿司匹林和替格瑞洛等,主要是通过激活TXA2和P2Y12ADP途径,循证医学证实这两种途径药物联合应用对抗血小板聚集及预防血栓事件起积极作用^[7]。但临床上仍有部分ACS患者在接受规范的双重抗血小板聚集治疗后仍再发血栓事件^[8],这可能是因为在除了TXA2和P2Y12ADP途径以外还存在其他途径激活血小板并形成血栓。凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶,除了促进凝血因子V、Ⅷ、Ⅺ的产生以及裂解纤维蛋白原转化为纤维蛋白外,还参与血管张力调节、平滑肌细胞增殖和炎症反应,同时也是血小板活化最有力的激动剂之一。人类血小板表面表达PAR-1与PAR-4两种受体,PAR-1介导血小板对凝血酶的初始应答,激活的PAR-1信号迅速脱敏,能在低浓度凝血酶的情况下激活血小板,而PAR-4只有在高浓度凝血酶条件下才能发挥作用,因此认为PAR-1在凝血酶激活中起主要作用,是人类血小板最主要的凝血酶受体^[9-11]。目前对ACS使用凝血酶抑制剂主要是通过拮抗凝血因子Ⅹa^[12],对PAR-1通路的研究相对较少。

本课题组以往研究提示ACS患者PAR-1浓度比稳定型心绞痛和正常对照组明显升高,并且体外研究利用普伐他汀干预可以显著降低ADP诱导的血小板PAR-1的表达^[13]。本研究对ACS患者进行更具体的分组,以便更详细地研究ACS中血小板PAR-1的表达情况。其中AMI分为STEMI和NSTEMI,UA根据冠脉狭窄程度进行区分,结果显示Cont组、UA-2组、UA-1组、NSTEMI组、STEMI组的PAR-1浓度逐渐升高,ACS各组血小板PAR-1表达较对照组明显增加,且AMI患者(STEMI组、NSTEMI组)比UA患者(UA-1组、UA-2组)血小板血浆PAR-1的表达更强烈,这提示凝血酶途径在血小板诱发的心血管血

栓事件中起重要作用, PAR-1 受体表达升高是促发 ACS 的一个关键步骤。但我们亦观察到虽然 PAR-1 浓度在 STEMI 组比 NSTEMI 组、UA-1 组比 UA-2 组升高, 但组内比较差异无统计学意义, 这可能提示 PAR-1 通路的激活主要是 ACS 发生的始动因素, 虽贯穿 ACS 始终, 但当冠脉严重狭窄或次全闭塞时, 因血流受阻严重, 大量红细胞和部分纤维蛋白、白细胞迅速凝固导致血管完全闭塞, 而并非完全是血小板聚集所致的栓塞。因此我们认为 PAR-1 参与血小板的活化, 是 ACS 发生的始动因素, 检测血小板 PAR-1 的表达可能为临床诊断和判断 ACS 进展提供重要的参考依据, 阻断 PAR-1 受体或许成为抑制血小板活性、降低血栓事件的另一个有效途径。

目前临床中尚缺乏抑制 PAR-1 通路有效而安全的方法。Zhang P 等在 2012 年报道, PAR-1 抑制剂 PZ-128 在豚鼠和狒狒中, 抑制了 PAR-1 聚集和动脉血栓形成, 并与口服氯吡格雷有很强的协同作用, 血小板功能在 24 h 后完全恢复, 而且 PZ-128 对灵长类动物或经皮冠状动脉介入治疗的患者血液中的出血或凝血参数没有影响^[14]。但在 Bonaca MP 等^[15]、Whellan DJ 等^[16]、Bohula EA 等^[17] 多个临床研究结果显示, PAR-1 拮抗剂 Vorapaxar 虽然可以使心肌梗死患者心血管死亡和再发缺血事件的风险降低, 但同时也导致出血事件的风险增加, 因而目前 PAR-1 拮抗剂在临床上的应用仍受限制。

总之, 本次研究结果显示 ACS 患者血小板 PAR-1 的表达水平明显增强, 但 STEMI 和 NSTEMI 组间、UA-1 和 UA-2 组间比较无显著差异, 提示 PAR-1 途径是血小板诱发的血栓事件的始动因素, 因单纯 PAR-1 拮抗剂在临床使用中出血风险较高, 那么进一步探讨通过抑制 PAR-1 表达又能降低出血风险的治疗方案对 ACS 的防治有着重要的临床意义, 也是我们临床上抗血小板聚集治疗亟待解决的难题。

参考文献:

[1] Alberelli MA, De Candia E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology[J]. *Vascul Pharmacol*, 2014, 62(2): 72-81.

[2] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 急性 ST 段抬高型心肌梗死诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2015, 43(5): 380-393.

[3] Wright RS, Anderson JL, Adams CD, et al. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on

Practice Guidelines [J]. *Circulation*, 2011, 123(18): 2022-2060.

[4] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2015》概要[J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(6): 521-528.

[5] Makki N, Brennan TM, Girotra S. Acute coronary syndrome[J]. *J Intensive Care Med*, 2015, 30(4): 186-200.

[6] Yang G, Wang Y, Zeng Y, et al. Rapid health transition in China, 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2013, 381(9882): 1987-2015.

[7] Gilard M, Morice MC. Double antiplatelet therapy duration: standardize or personalize? [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 65(20): 2222-2224.

[8] Weitz JI. Insights into the role of thrombin in the pathogenesis of recurrent ischaemia after acute coronary syndrome[J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(5): 924-931.

[9] 张倩, 陈岑, 杨丰庆, 等. 激动剂诱导血小板活化机制及抗血小板药物研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2014, 45(6): 632-648.

[10] Flaumenhaft R1, De Ceunynck K2. Targeting PAR1: Now What? [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(8): 701-716.

[11] Fender AC, Rauch BH, Geisler T, et al. Protease-Activated Receptor PAR-4: An Inducible Switch between Thrombosis and Vascular Inflammation? [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(11): 2013-2025.

[12] 胡伟. 替罗非班在高危非 ST 段抬高急性冠脉综合征患者介入治疗中的应用研究[J]. *右江民族医学院学报*, 2015, 37(3): 371-372.

[13] 楚罗湘, 覃月秋, 莫昌干, 等. 急性冠脉综合征患者血小板蛋白酶活化受体-1 的表达及普伐他汀体外干预的影响[J]. *实用医学杂志*, 2015, 31(24): 4018-4021.

[14] Zhang P, Gruber A, Kasuda S, et al. Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin[J]. *Circulation*, 2012, 126(1): 83-91.

[15] Bonaca MP, Scirica BM, Creager MA, et al. Vorapaxar in patients with peripheral artery disease: results from TRA2 {degrees} P-TIMI50 [J]. *Circulation*, 2013, 127(14): 1522-1529.

[16] Whellan DJ, Tricoci P, Chen E, et al. Vorapaxar in acute coronary syndrome patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: subgroup analysis from the TRACER trial (Thrombin Receptor Antagonist for Clinical Event Reduction In Acute Coronary Syndrome) [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(11): 1048-1057.

[17] Bohula EA, Bonaca MP, Braunwald E, et al. Atherothrombotic risk stratification and the efficacy and safety of vorapaxar in patients with stable ischemic heart disease and previous myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2016, 134(4): 304-313.

收稿日期: 2018-03-08; 修回日期: 2018-04-12