

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.04.013

冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证与外周血小板微粒膜蛋白表达的相关性

胡元会^{*}, 贾秋蕾, 孟昊, 褚瑜光, 石晶晶

(中国中医科学院广安门医院, 北京市宣武区广安门内大街北线阁 5 号, 100053)

摘要 目的 探讨冠心病不稳定型心绞痛血瘀证形成的可能机理。方法 选取冠心病不稳定型心绞痛患者 110 名, 其中血瘀证组 60 例和非血瘀证组 50 例。检测两组患者外周血小板微粒及其表面膜蛋白血小板膜糖蛋白 CD62P、血小板激活复合物 1 (PAC-1)、血小板膜糖蛋白 Ib α 、白细胞分化抗原 40 配体 (CD40L) 的表达, 分析上述指标与冠心病血瘀证的相关性。结果 冠心病不稳定型心绞痛血瘀证患者血小板微粒及其表面血小板膜糖蛋白 CD62P、PAC-1、CD40L 表达水平明显高于非血瘀证组 ($P < 0.05$), 并与血瘀证存在正相关 ($P < 0.05$), r 值分别为 0.427、0.294、0.200、0.218。结论 冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证的形成可能与血小板微粒的黏附、聚集、促炎症反应作用有关。

关键词 冠心病; 不稳定型心绞痛; 血瘀证; 血小板微粒; 膜蛋白

冠心病归属于中医学“胸痹心痛”范畴, 研究表明, 冠心病的中医证型以血瘀证居多^[1]。冠心病血瘀证的形成主要与脂质代谢紊乱^[2]、炎症反应^[3]、血管内皮功能障碍^[4]及凝血/纤溶系统改变^[5]有关。血小板微粒可以表达血小板膜上的 40 多种糖蛋白, 如血小板膜糖蛋白 CD62p、CD63 及暴露纤维蛋白原结合位点的 GP II b/III a、GPIIb/IX^[6]。本研究采用流式细胞术检测冠心病不稳定型心绞痛患者外周血小板微粒膜表面血小板膜糖蛋白 Ib α (GPIIb α)、白细胞分化抗原 40 配体 (CD40L)、CD62p 及血小板激活复合物 1 (PAC-1) 的表达水平, 比较上述指标在冠心病不稳定型心绞痛血瘀证及非血瘀证中的差异, 为冠心病血瘀证的形成提供理论基础。

1 临床资料

1.1 诊断标准

冠心病诊断标准参照《缺血性心脏病的命名及诊断标准》^[7], 结合冠状动脉 CT 或冠状动脉造影提示冠状动脉主要血管直径狭窄程度 $\geq 50\%$, 或既往有心肌梗死病史。不稳定型心绞痛诊断标准符合《不稳定型心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南》^[8]。心功能分级方法参照美国纽约心

脏病协会 (NYHA) 制定的标准^[9]: I 级, 活动量不受限制, 平时一般活动不引起疲乏、心悸、呼吸困难或心绞痛; II 级, 体力活动受到轻度的限制, 休息时无自觉症状, 但一般体力活动下可出现疲乏、心悸、呼吸困难或心绞痛; III 级, 体力活动明显受限, 小于平时一般活动即引起上述的症状; IV 级, 不能从事任何体力活动, 休息状态下出现心力衰竭的症状, 体力活动后加重。

中医辨证标准参照《血瘀证诊断参考标准》^[10]: 1) 舌质紫暗或有瘀斑瘀点; 2) 典型涩脉或无脉; 3) 痛有定处 (或锥刺性痛或不喜按); 4) 瘀血腹证; 5) 癥积; 6) 离经之血 (出血或外伤瘀血); 7) 皮肤黏膜瘀斑、脉络异常; 8) 痛经伴色黑有血块或闭经; 9) 肌肤甲错; 10) 偏瘫麻木; 11) 瘀血狂躁; 12) 理化检查具有血液、循环淤滞表现。凡具有任何 1 项可诊断为血瘀证。

1.2 纳入标准

1) 符合冠心病诊断标准; 2) 符合不稳定型心绞痛诊断标准; 3) 心功能 I ~ II 级; 4) 符合血瘀证辨证标准; 5) 年龄 45 ~ 80 岁; 6) 自愿参加并签署知情同意书。

符合条件 1)、2)、3)、4)、5)、6), 纳入冠心病血瘀证组; 符合条件 1)、2)、3)、5)、6) 者, 纳入冠心病非血瘀证组。

^{*} 通讯作者: huiyuhui55@sohu.com

1.3 排除标准

1) 高血压病控制欠佳, 收缩压 ≥ 160 mmHg 或舒张压 ≥ 100 mmHg; 2) 合并严重脑血管疾病; 3) 合并其他心脏疾病, 如心肌炎、心内膜炎、风湿性心脏病及心肌病; 4) 两周内曾有急性感染病史或近期曾服用抗炎药物; 5) 严重肝肾功能不全; 6) 合并恶性肿瘤、血液疾病或自身免疫性疾病者; 7) 妊娠期或哺乳期妇女。

1.4 一般资料

研究对象为 2015 年 8—12 月于中国中医科学院广安门医院心血管科住院的冠心病不稳定型心绞痛患者 110 例。其中血瘀证组 60 例, 男 27 例, 女 33 例, 平均年龄 (62.81 ± 7.35) 岁, 平均病程 (12.75 ± 8.05) 年, 体重指数 (BMI) (24.21 ± 2.60) kg/m^2 , 空腹血糖 (5.90 ± 1.10) mmol/L。非血瘀证组 50 例, 男 26 例, 女 24 例, 平均年龄 (65.90 ± 9.08) 岁, 平均病程 (11.39 ± 9.33) 年, BMI (24.09 ± 2.52) kg/m^2 , 空腹血糖 (5.94 ± 1.34) mmol/L。两组一般资料比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

2 方法

2.1 主要试剂和仪器

异硫氰酸荧光素标记的抗 PAC-1 单克隆抗体 (货号: 3430507), 别藻青蛋白标记的抗 GPIIb α 单克隆抗体 (货号: 551061), 藻红素标记的抗血小板 GPIIb/IIIa (CD41a-PE) (货号: 555467), PE-CF594 标记的抗 CD40L 单克隆抗体 (货号: 563589), BV421 标记的抗 CD62p 单克隆抗体 (货号: 564038), 多甲藻黄素-叶绿素蛋白-菁染料标记的 Annexin V (货号: 561431), 10 $\times$ Binding-buffer (货号: 556454), 以上试剂均为美国 BD Pharmingen 公司产品。平均直径 1.0 μm 、浓度为 $9.1 \times 10^{10}/\text{ml}$ 的标准微球 (货号: PP-40-40), 平均直径 2.0 μm 、浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的绝对计数微球 (货号: ACBP-20-40), 均由美国 Spherotech 公司提

供。LSR Fortessa 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司产品。

2.2 细胞微粒的提取及检测

用 3.8% 柠檬酸钠抗凝管抽取患者清晨空腹肘静脉血 2 ml, 常温下保存, 全血经 160 g 10 min 离心后, 取上层血浆, 获得富血小板血浆, 将其再次以 1500 g 离心 15 min, 取上层血浆, 获得贫血小板血浆; 将贫血小板血浆以 13 000 g 高速离心 10 min, 取上层血浆, 获得无血小板血浆。

在试验管中各加入标本 60 μl , CD41a-PE 20 μl , CD62p-BV421 5 μl , PAC-1-FITC 20 μl , CD42b-APC 20 μl , CD40L-PE-CF594 2.5 μl , 轻轻混匀, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光孵育 15 min, 加入 1 ml PBS 重悬, 以 20 000 g 离心 30 min, 去上清液, 留沉淀; 加入 1 : 10 稀释的 Binding-buffer 100 μl , 之后加入 Annexin V-PerCP-CY5.5 2 μl , 常温避光孵育 20 min。取平均直径 1.0 μm 的微球 1 μl , 加入 9.1 ml PBS 和 9.1 μl Tween20, 充分震荡后, 上机作为定位对照。上机前加入 2.0 μm 的绝对计数微球 50 μl , Binding-buffer 500 μl , 上机后以门内收取 500 个微球作为终点。计算公式为: 微粒数/样本体积 (μl) = (微粒数/内参微球数) $\times$ (捕获微球数/样本体积)。

建立前向角光散射 (FSC) 和侧向角散光 (SSC) 散点图, 收集和分析微粒和绝对计数微球产生的信号。根据定位对照图选取 FSC/SSC 坐标 $< 1.0 \mu\text{m}$ 微球荧光强度作为微粒获取第一设门区域 (P1), 再以 CD41a 和 Annexin V 荧光散点图双阳性范围作为血小板微粒获取第二设门区域, PAC-1 和 CD62P 荧光散点图以及 CD42b 和 CD40L 荧光散点图均以 PMPs 设门分析。见图 1。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理。计量资料符合正态分布时用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; 非正态分布数据用 $M (Q_{25} \sim Q_{75})$, 采用非参数检验。计数资料组间比较采用卡方检验。

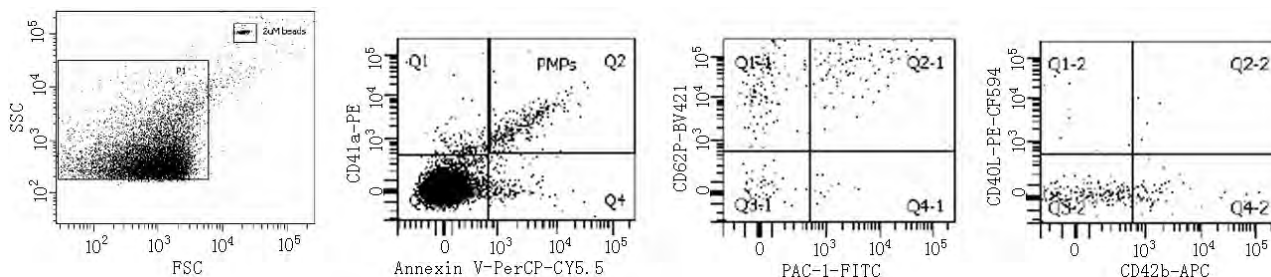


图 1 血小板微粒表面功能蛋白图

表 1 两组冠心病不稳定型心绞痛患者外周血血小板微粒水平及 CD62p、PAC-1、GPIIb/IIIa、CD40L 水平比较 [M (P25 ~ P75)]

组别	例数	血小板微粒 (/μl)	CD62p (%)	PAC-1 (%)	GPIIb/IIIa (%)	CD40L (%)
血瘀证组	60	300.16 (189.12 ~ 499.68)	47.76 (34.95 ~ 61.05)	5.12 (3.17 ~ 10.09)	13.69 (8.00 ~ 16.51)	17.94 (8.66 ~ 24.02)
非血瘀证组	50	171.77 (102.25 ~ 285.38)	3.41 (1.87 ~ 5.68)	3.41 (1.87 ~ 5.68)	12.50 (9.52 ~ 16.47)	10.90 (6.15 ~ 19.59)
P 值		<0.001	0.03	0.036	0.358	0.019

注: PAC-1, 血小板激活复合物 1; GPIIb/IIIa, 血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa; CD40L, 白细胞分化抗原 40 配体

相关性分析符合正态分布时采用 *Pearson* 法, 非正态分布采用 *Spearman* 法。

3 结果

3.1 两组患者外周血血小板微粒水平及 CD62p、PAC-1、CD42b、CD40L 水平比较

表 1 示, 血瘀证患者血小板微粒水平高于非血瘀证患者 ($P < 0.01$)。血瘀证组 CD62p、PAC-1、CD40L 水平高于非血瘀证组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 血瘀证组 CD42b 水平与非血瘀证组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证与外周血血小板微粒水平及 CD62p、PAC-1、CD40L 表达水平的相关性分析

表 2 示, 以血小板微粒水平及 CD62p、PAC-1、CD40L 为自变量, 以冠心病不稳定型心绞痛血瘀证为因变量进行单因素相关性分析, 结果显示, 血小板微粒水平、CD62p、PAC-1、CD40L 与冠心病不稳定型心绞痛血瘀证存在正相关。

表 2 冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证与外周血血小板微粒及其膜蛋白表达的相关性分析

证型	血小板微粒	CD62p	PAC-1	CD40L	
血瘀证	<i>r</i> 值	0.427	0.294	0.200	0.218
	<i>P</i> 值	<0.001	0.003	0.035	0.018

注: PAC-1, 血小板激活复合物-1; CD40L, 白细胞分化抗原 40 配体

4 讨论

研究表明, 血瘀证患者的凝血酶原时间缩短, 血液呈高凝状态^[1]。血瘀的程度越重, 激活的血小板比例越高, 并见到糖萼增厚, 细胞膜与细胞内膜间的相互转变及异常运动增剧, 聚集时细胞膜融合早, 吞噬能力降低, 腺苷酸环化酶活性降低^[2]。冠心病血瘀证中, 血小板表面 P-选择素的表达增强, 与血瘀证积分呈正相关^[3]。蛋白质组学研究发现, 血小板功能蛋白 cDNA FLJ 53327 及 cDNA FLJ 43573 表达在冠心病血瘀证中增多, 二者是血小板活化过程中表达分泌的蛋白, 血小板功能蛋白可能是冠心病血瘀证的物质基础之一^[4]。冠心

病血瘀证患者存在内皮功能障碍。冠心病血瘀证患者中, 内皮素^[5]、血栓素 A2^[6]、血管紧张素 II^[7] 升高, 一氧化氮、6-酮-前列腺素 F1α^[8] 降低, 内皮细胞分泌的血清可溶性细胞间黏附分子和血清可溶性血管细胞黏附分子 1 增加, 与血瘀证的形成及病情变化密切相关^[9]。冠心病血瘀证患者的抗凝血作用的血栓调节蛋白、抗凝血酶减少^[10], 并存在纤溶系统异常, PAI-1 活性升高, 而 t-PA 活性明显降低^[11]。

本研究结果显示, 血小板微粒及 CD62p、PAC-1、CD40L 水平在血瘀证组均高于非血瘀证组 ($P < 0.05$), 且与血瘀证呈正相关。CD62p 阳性的血小板微粒缩短凝血时间, 激活血小板, 促进血栓生成^[12]。在冠心病血瘀证患者中, 血小板 CD62p 浓度与血瘀证积分呈显著正相关, 提示 CD62p 可以反映血瘀证的严重程度。而 PAC-1 与纤维蛋白原结合, 充当聚集的桥梁, 促进血小板的进一步活化, 从而使血小板发生聚集和释放反应。CD40L 可以促进血小板-白细胞聚合物形成, 对白细胞的聚集有促进作用^[13]。CD40L 与其受体 CD40 结合可激活血小板, 促其表达 CD62p、伪足形成, 诱导表达组织因子进而增强促凝血活性^[14]。血小板微粒通过其黏附、聚集及促炎症反应作用参与了冠心病血瘀证的形成。

参考文献

- [1] 陈可冀. 实用血瘀证学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 236-262.
- [2] 毛威, 叶武, 刘强, 等. 冠心病中医辨证分型与胰岛素抵抗关系的初步研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21 (9): 657-659.
- [3] 王强, 黄绍湘, 刘钧超, 等. 冠心病血瘀证与超敏 C-反应蛋白关系的临床探讨 [J]. 广西中医药, 2005, 28 (3): 7-8.
- [4] 任毅, 陈可冀, 张敏州, 等. 冠心病中医证型与大内皮素、N 末端脑钠肽的相关性 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27 (1): 210-212.
- [5] 毛以林, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病血瘀证与凝血因子 VII 的关系 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4 (17): 2094-2095.

- [5] NOMURA S. Function and clinical significance of platelet-derived microparticles [J]. Int J Hematol, 2001, 74(4): 397-404.
- [6] 国际心脏病学会和协会及世界卫生组织临床命名标准化联合专题组. 缺血性心脏病的命名及诊断标准 [J]. 中华心血管病杂志, 1984, 9(1): 75.
- [7] 柯元南, 陈纪林. 不稳定性心绞痛和非 ST 段抬高心肌梗死诊断与治疗指南 [J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(4): 295-304.
- [8] 陆再英, 钟南山. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 170.
- [9] 血瘀证研究国际会议. 血瘀证诊断参考标准 [J]. 中西医结合杂志, 1989(2): 111.
- [10] 张苑桐, 褚瑜光, 胡元会, 等. 冠心病血瘀证与凝血功能及血小板参数相关性分析 [J]. 中医杂志, 2015, 56(16): 1390-1393.
- [11] 吴锦, 陈可冀. 冠心病血瘀证患者血小板膜系统的超微结构和功能 [J]. 中国循环杂志, 1989, 4(4): 317.
- [12] 沈庆乐, 张存琪. 血瘀证冠心病的 GMP-140、VWF 和 NO 的变化及临床意义 [J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(19): 1855-1856.
- [13] 李雪峰, 蒋跃绒, 高铸辉, 等. 冠心病血瘀证血小板差异功能蛋白筛选、鉴定及功能分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(5): 467-473.
- [14] 徐睿, 李源, 黄熙, 等. 川芎嗪对冠心病血瘀证患者血浆内皮素的影响及其动态变化 [J]. 广东药学院学报, 2001, 17(4): 264-265, 271.
- [15] 冼绍祥, 黄鹂, 刘小虹, 等. 冠心病心脉瘀阻证和血瘀证差异的临床研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(5): 321-323, 373.
- [16] 袁肇凯, 黄献平, 谭光波, 等. 冠心病血瘀证血管内皮细胞功能的检测分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(5): 407-410.
- [17] 王萍, 黄献平, 王丽萍, 等. 血栓前状态分子与冠心病血瘀证的相关性研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(3): 9-11, 26.
- [18] 毛以林, 袁肇凯, 黄献平, 等. 冠心病血瘀证与血小板颗粒膜蛋白和纤溶功能关系的探讨 [J]. 湖南医学院学报, 2004, 24(3): 29-31.
- [19] MONTORO-GARCÍA S, SHANTSILA E, HERNÁNDEZ-ROMERO D, et al. Small-size platelet microparticles trigger platelet and monocyte functionality and modulate thrombogenesis via P-selectin [J]. Br J Haematol, 2014, 166(4): 571-580.
- [20] HASSAN GS, MERHI Y, MOURAD W. CD40 ligand: a neo-inflammatory molecule in vascular diseases [J]. Immunobiology, 2012, 217(5): 521-532.
- [21] SANGUIGNI V, FERRO D, PIGNATELLI P, et al. CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(1): 35-42.

Correlation of Syndrome of Blood Stasis and the Expressions of Peripheral Blood Platelet Microparticle Membrane Protein in Patients with Coronary Heart Disease Unstable Angina Pectoris

HU Yuanhui JIA Qiulei, MENG Hao, CHU Yuguang, SHI Jingjing

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of the formation of blood stasis syndrome in coronary heart disease unstable angina pectoris. **Methods** One hundred and ten patients with coronary heart disease unstable angina pectoris were selected, with 60 cases of blood stasis syndrome and 50 cases of non blood stasis syndrome. Patients' peripheral blood platelet microparticle and the expressions of the surface membrane protein P-Selectin, platelet activating complex 1 (PAC-1), platelet membrane glycoprotein Ib α (CD42b) and CD40L in both groups were detected. The correlation of these indexes and coronary heart disease blood stasis syndrome was analyzed. **Results** In patients with coronary heart disease unstable angina pectoris, peripheral blood platelet microparticle and the expression levels of the surface P-Selectin, PAC-1 and CD40L of those with blood stasis syndrome were higher than those of patients without blood stasis syndrome ($P < 0.05$), which were positively correlated with blood stasis syndrome ($P < 0.05$), with r values of 0.427, 0.294, 0.200 and 0.218, respectively. **Conclusion** The formation of blood stasis syndrome in patients with coronary heart disease unstable angina pectoris of might relate to the effect of adhesion, aggregation and inflammatory response of platelet microparticle.

Keywords coronary heart disease; unstable angina pectoris; syndrome of blood stasis; platelet microparticle; membrane protein

(收稿日期: 2016-08-18; 修回日期: 2016-11-09)

编辑: 王利芬