

# 冠状动脉支架术对冠心病患者血小板活化功能的影响

徐新生, 沈彦明, 宋建军, 王竹文, 苏洪山, 李国平, 王洪光, 冯领周, 周美辉

(山东省东营市人民医院心内科, 山东省东营市 257091)

[关键词] 内科学; 冠心病; 急性心肌梗死; 不稳定型心绞痛; 支架置入术; 血小板活化; 凝血酶敏感蛋白

[摘要] 目的 探讨冠心病患者行冠状动脉内支架置入术前后血小板活化指标的变化, 了解冠心病不同临床类型支架置入数与血小板活化指标之间的关系。方法 利用流式细胞术和单克隆抗体测定 48 例稳定型心绞痛、45 例不稳定型心绞痛患者与 37 例急性心肌梗死患者外周血中血小板膜糖蛋白 CD62p、CD63 和凝血酶敏感蛋白的阳性表达率, 并与 45 例冠状动脉造影正常者作对照分析。结果 稳定型心绞痛患者、不稳定型心绞痛患者和急性心肌梗死患者支架置入后 CD62p、CD63 和凝血酶敏感蛋白的阳性表达率均显著高于支架置入前 ( $P < 0.01$ ); 不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组治疗前亦高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而稳定型心绞痛组治疗前与对照组比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。稳定型心绞痛组和不稳定型心绞痛组 CD62p、CD63 和凝血酶敏感蛋白的阳性表达率与支架置入个数有关, 置入支架越多阳性表达率越高。结论 不稳定型心绞痛患者及急性心肌梗死患者存在血小板高活化状态、动脉粥样硬化斑块破裂以及急性血栓形成。支架置入术对冠状动脉内皮的损伤加强了血小板的活化, 增加了血栓形成的风险。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Coronary Stenting Impact Platelet Activation in Patients with Coronary Artery Disease

XU Xin-Sheng, SHEN Yan-Ming, SONG Jian-Jun, WANG Zhu-Wen, SU Hong-Shan, LI Guo-Ping, WANG Hong-Guang, FENG Ling-Zhou, and ZHOU Mei-Hui

(Department of Cardiology, Dongying People's Hospital, Dongying 257091, China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Disease; Acute Myocardial Infarction; Unstable Angina Pectoris; Stable Angina Pectoris; Stenting; Platelet Activation; Thrombin Sensitive Protein

[ABSTRACT] **Aim** To approach the change of platelet activation before and after stenting for coronary artery disease and the relationship among stable angina pectoris (SAP), unstable angina pectoris (UAP), acute myocardial infarction (AMI), number of stent implantation and platelet activation. **Methods** Detection of positive expression of platelet membrane glycoprotein CD62p, CD63 and thrombin sensitive protein (TSP) was performed by flow cytometry and monoclonal antibody in 175 patients. They were divided into four groups: SAP group (48 patients with stable angina); UAP group (45 patients with unstable angina); AMI group (37 patients with acute myocardial infarction) and control group (45 patients with angiography). **Results** There were increased the levels of CD62p, CD63 and thrombin sensitive protein expression after stent implantation in coronary artery disease ( $P < 0.01$ ), and the expression levels of UAP group and AMI group were higher than that of control group ( $P < 0.01$ ). The positive expression of CD62p, CD63 and thrombin sensitive protein were related to number of stenting. The more stenting, the higher positive expression. **Conclusion** Unstable angina and acute myocardial infarction presented high level of platelet activation, atherosclerosis plaque rupture and prone to thrombosis. Stenting induced endothelial damage augmented platelet activation and increased the risk of thrombosis.

血小板活化导致血小板功能亢进, 活化的血小板粘附和聚集导致血栓形成<sup>[1]</sup>。冠状动脉内急性血栓形成是急性冠状动脉综合征的重要病理变化<sup>[2]</sup>, 冠状动脉支架置入术是治疗急性冠状动脉综合征的

有效手段之一, 而冠状动脉内支架置入引起的斑块破裂与内皮损伤又激活血小板, 易引起急性血栓形成<sup>[3]</sup>。本研究应用流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测冠心病患者冠状动脉支架置入前后血小板膜糖蛋白的变化并与对照组比较, 探讨支架置入与血小板活化的关系。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象及分组

选择 2002 年 2 月~2005 年 3 月本院心脏介入

[收稿日期] 2006-02-15 [修回日期] 2006-10-20

[作者简介] 徐新生, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事冠心病发病机制以及冠心病介入治疗的基础与临床研究, 联系电话为 0531-88383290, E-mail 为 xuxinshengdr@yahoo.com.cn。通讯作者沈彦明, 副主任医师, 主要从事冠心病的临床研究, 联系电话为 0546-8319018, E-mail 为 shenym163@163.com。苏洪山, 主任医师, 主要从事心血管病的临床研究, 联系电话为 0546-8336906, E-mail 为 suhongshan2004@163.com。

中心的住院患者 175 例,均按照 AHA 和 ACC 诊断标准确诊。其中支架治疗组 130 例,男 87 例,女 43 例,年龄  $64 \pm 12$  岁 (43~81 岁),包括稳定型心绞痛 (stable angina pectoris, SAP) 48 例、不稳定型心绞痛 (unstable angina pectoris, UAP) 45 例和急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 37 例;急性心肌梗死患者自发病到介入手术时间为 30 min~11 h,平均  $4.2 \pm 1.8$  h;所有患者均给予冠状动脉内支架置入治疗。对照组 45 例,均为因胸痛进行冠状动脉造影结果正常者,男 28 例,女 17 例,年龄  $63 \pm 13$  (39~75) 岁。支架治疗组患者合并高血压 105 例,糖尿病 32 例;对照组合并高血压 28 例,糖尿病 8 例。各组患者基本情况见表 1。

表 1. 各组患者基本情况的比较

| 指 标             | SAP 组       | UAP 组       | AMI 组      | 对照组         |
|-----------------|-------------|-------------|------------|-------------|
| <i>n</i>        | 48          | 45          | 37         | 45          |
| 年龄(岁)           | $45 \pm 12$ | $41 \pm 10$ | $46 \pm 9$ | $63 \pm 13$ |
| 男性(例)           | 32          | 30          | 25         | 28          |
| 高血压(例)          | 43          | 36          | 26         | 28          |
| 糖尿病(例)          | 13          | 11          | 8          | 8           |
| 吸烟史(例)          | 23          | 20          | 21         | 20          |
| 血脂异常(例)         | 40          | 41          | 32         | 39          |
| 心力衰竭(例)         | 6           | 8           | 19         | 3           |
| 硝酸酯类(例)         | 41          | 45          | 31         | 16          |
| 钙拮抗剂(例)         | 19          | 21          | 13         | 16          |
| $\beta$ -阻滞剂(例) | 23          | 14          | 27         | 19          |
| 阿司匹林(例)         | 41          | 43          | 28         | 33          |

## 1.2 试剂和仪器

单克隆抗体 (McAb): 抗  $\alpha$  颗粒膜蛋白 140 (CD62p-FITC) McAb、抗溶酶体膜蛋白 GP53 (CD63-PE) McAb 和抗人血小板凝血酶敏感蛋白 (thrombin-sensitive protein-PE, TSP-PE) McAb 均由法国 Immunotech 公司提供。冠状动脉内支架为上海微创公司 Microport Mustang 支架,直径 2.5~3.5 mm,长度 13~29 mm。

## 1.3 支架置入术

所有患者术前 1 h 内均服用氯吡格雷 300 mg 和阿司匹林 300 mg。常规介入操作下球囊预扩张后行支架置入术或直接支架置入术。支架置入前 10 min、支架置入术后 30 min、24 h 和 48 h 分别取外周静脉血。

## 1.4 血小板悬液的制备

依地酸二钠 (EDTA<sub>2</sub>Na) 抗凝血 2 mL 置于塑料管中,800 r/min 离心 15 min,取上层富含血小板血浆 (PRP) 3 500 r/min 离心 15 min,弃上清液后加磷酸缓冲液 (PBS) 3 000 r/min 离心 10 min,洗涤 2 次,1% 多聚甲醛室温固定 30 min,置 4℃ 冰箱保存备用。

## 1.5 血小板膜受体的标记

将固定后的血小板悬液 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入抗血小板膜受体的相应荧光标记抗体,置室温 30 min,加入 PBS 2 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 1 mL PBS 将血小板悬浮,上机检测。

## 1.6 流式细胞术

采用美国 Becton-Dickinson 公司生产的 Vantage 流式细胞仪对血小板表面活化标志物蛋白表达水平进行检测,数据存入软盘供嗣后分析。

## 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.5 分析软件进行方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

# 2 结 果

## 2.1 支架置入对血小板表面活化标志物蛋白表达水平的影响

支架治疗组患者分别置入支架 1~4 个 (表 2)。治疗组患者 3 种血小板表面活化标志物蛋白术前均处于较低水平,术后 30 min 明显升高,术后 24 h 和 48 h 均低于术后 30 min。所以本研究以术后 30 min 血小板表面活化标志物蛋白表达水平作为主要研究对象。

术前 SAP 组与对照组血小板表面活化标志物的蛋白表达水平差异无显著性。UAP 组及 AMI 组术前血小板表面活化标记物蛋白 CD62p、CD63 和凝血酶敏感蛋白表达水平高于 SAP 组和对照组 ( $P < 0.01$ )。SAP 组、UAP 组和 AMI 组术后 CD62p、CD63 以及 TSP 表达水平较术前均明显升高 ( $P < 0.01$ , 表 3)。

表 2. 支架治疗组冠状动脉内支架置入数

| 支架置入数 | SAP 组<br>( <i>n</i> = 48) | UAP 组<br>( <i>n</i> = 45) | AMI 组<br>( <i>n</i> = 37) |
|-------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 个   | 27                        | 18                        | 29                        |
| 2 个   | 14                        | 17                        | 6                         |
| 3 个   | 5                         | 8                         | 2                         |
| 4 个   | 2                         | 2                         | 0                         |

表 3. 各组血小板表面活化标志物蛋白表达水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , %)

| 分 组   |           | n  | CD62p                          | CD63                           | TSP                             |
|-------|-----------|----|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| SAP 组 | 术前        | 48 | 1.23% $\pm$ 1.43%              | 1.90% $\pm$ 1.79%              | 1.81% $\pm$ 1.47%               |
|       | 术后 30 min | 48 | 8.92% $\pm$ 1.54% <sup>b</sup> | 8.15% $\pm$ 1.94% <sup>b</sup> | 9.78% $\pm$ 2.01% <sup>b</sup>  |
| UAP 组 | 术前        | 45 | 5.55% $\pm$ 1.26% <sup>a</sup> | 4.68% $\pm$ 1.66% <sup>a</sup> | 5.98% $\pm$ 1.62% <sup>a</sup>  |
|       | 术后 30 min | 45 | 9.01% $\pm$ 1.46% <sup>b</sup> | 8.09% $\pm$ 1.89% <sup>b</sup> | 9.67% $\pm$ 1.98% <sup>b</sup>  |
| AMI 组 | 术前        | 37 | 5.65% $\pm$ 1.63% <sup>a</sup> | 5.02% $\pm$ 1.83% <sup>a</sup> | 6.01% $\pm$ 1.89% <sup>a</sup>  |
|       | 术后 30 min | 37 | 9.65% $\pm$ 1.32% <sup>b</sup> | 8.91% $\pm$ 1.25% <sup>b</sup> | 10.01% $\pm$ 1.28% <sup>b</sup> |
| 对照组   | 术前        | 45 | 1.05% $\pm$ 0.51%              | 1.71% $\pm$ 0.44%              | 1.37% $\pm$ 0.35%               |
|       | 术后 30 min | 45 | 1.11% $\pm$ 0.62%              | 1.65% $\pm$ 0.49%              | 1.35% $\pm$ 0.31%               |

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与术前比较。

## 2.2 支架置入数对血小板表面活化标志物蛋白水平的影响

支架置入个数与 3 种血小板表面活化标志物蛋白表达水平密切相关。稳定型心绞痛组和不稳定型心绞痛组置入 2 个支架以及 3 个支架患者的 CD62p、CD63 和 TSP 表达水平高于置入 1 个支架者 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 而急性心肌梗死组不同的支架置入个数者其 CD62p、CD63 和 TSP 表达水平差异无显著性(表 4)。置入 4 个支架者病例数太少未进行统计学分析。

表 4. 支架置入个数与 3 种血小板表面活化标志物蛋白表达水平的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 分 组   |       | 1 个              | 2 个                          | 3 个                           |
|-------|-------|------------------|------------------------------|-------------------------------|
| SAP 组 | CD62p | 6.21 $\pm$ 1.24  | 8.90 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup> | 9.12 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>  |
|       | CD63  | 5.35 $\pm$ 1.83  | 8.05 $\pm$ 1.83 <sup>a</sup> | 8.33 $\pm$ 2.01 <sup>b</sup>  |
|       | TSP   | 4.36 $\pm$ 1.96  | 9.73 $\pm$ 2.02 <sup>b</sup> | 10.01 $\pm$ 2.11 <sup>b</sup> |
| UAP 组 | CD62p | 7.61 $\pm$ 1.20  | 9.10 $\pm$ 1.54 <sup>a</sup> | 9.15 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>  |
|       | CD63  | 6.10 $\pm$ 1.24  | 8.11 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup> | 8.13 $\pm$ 1.95 <sup>a</sup>  |
|       | TSP   | 7.11 $\pm$ 1.69  | 9.63 $\pm$ 1.89 <sup>a</sup> | 9.27 $\pm$ 1.63 <sup>a</sup>  |
| AMI 组 | CD62p | 9.11 $\pm$ 1.40  | 9.78 $\pm$ 1.33              | 9.37 $\pm$ 1.51               |
|       | CD63  | 9.01 $\pm$ 1.26  | 8.89 $\pm$ 1.31              | 9.28 $\pm$ 1.21               |
|       | TSP   | 10.69 $\pm$ 1.35 | 10.02 $\pm$ 1.30             | 9.96 $\pm$ 1.37               |

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与置入一个支架组比较。

## 3 讨论

血小板在正常血液循环中处于静息状态, 当血管内皮损伤或在某些生理或病理刺激因子作用下, 血小板发生活化反应。在血栓发生过程中, 由于血管内皮损伤, 血管内皮下胶原暴露, 使流经此处的血小板被激活, 主要表现为存在于静息血小板胞浆内  $\alpha$  颗粒膜上的糖蛋白 CD62p 和溶酶体膜上的 CD63

随活化血小板脱颗粒而与血小板膜融合, 在血小板膜上表达成为活化血小板的分子标记物 4, 凝血酶敏感蛋白(TSP) 在血小板释放  $\alpha$  颗粒后通过  $\text{Ca}^{2+}$  可与膜蛋白结合成为血小板活化的一个良好指标。利用荧光素标记血小板活化标志的单克隆抗体及流式细胞计数器可直接敏感特异地反映人体内血小板的活化程度和功能状态<sup>[5]</sup>。研究表明急性冠状动脉综合征常常与动脉粥样硬化斑块破裂和血小板活化血栓形成有关。冠状动脉介入治疗包括经皮冠状动脉腔内成形术以及支架置入术, 其治疗急性冠状动脉综合征效果明显好于药物治疗<sup>[6]</sup>, 但是介入治疗也造成动脉内皮的损伤和粥样斑块的破裂, 两者都可造成血小板的激活, 增加了急性血栓形成的风险。

本研究采用 McAb 经流式细胞术检测表达有活化分子标记物的血小板数量, 并观察 3 种指标的变化。结果发现, 冠状动脉造影正常者血液循环中血小板有少量活化, 这是机体为维持凝血抗凝系统功能平衡而存在的生理现象。稳定型心绞痛组术前血小板表面活化蛋白标志物与对照组比较差异无显著性, 而不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组术前血小板表面活化蛋白标志物明显高于对照组, 提示急性冠状动脉综合征患者存在血小板高活化状态、动脉粥样硬化斑块破裂以及急性血栓形成。稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组和急性心肌梗死组术后 CD62p、CD63 和 TSP 表达水平均较术前增高, 表明支架置入术对冠状动脉内皮的损伤更加强了血小板的活化, 增加了血栓形成的风险。

冠状动脉内支架置入的数量与血小板的活化水平也有一定关系。稳定型心绞痛组和不稳定型心绞痛组置入 2 个和 3 个支架的患者血小板表面活化蛋白标志物表达水平均高于置入 1 个支架者, 提示随着支架置入数量的增加对冠状动脉内皮的损伤也增加, 血小板的活化水平相应增高。而急性心肌梗死

组不同支架置入个数患者的血小板表面活化蛋白标志物水平差异无显著性,可能与急性心肌梗死患者梗死相关血管处有较大的急性血栓形成、介入手术前血小板活化水平已经明显升高有关,急症介入手术只干预罪犯血管而没有干预其它狭窄病变,所以血小板的活化水平与支架置入的数量无关。

损伤后的血小板聚集高峰一般是在损伤后 24 h。本研究中,术后 30 min 血小板的活化水平高于 24 h 以及 48 h 的水平。出现这种情况的原因除了不稳定型心绞痛和急性心肌梗死患者介入损伤之前已有一段时间的自发的内皮损伤以外,还可能与介入手术前 1 h 才开始应用氯吡格雷有关。有研究表明 ADP 受体拮抗剂可以减少血小板的活化<sup>[7]</sup>,术后 30 min 时氯吡格雷尚未发挥最大药效,而 24 h 以后血小板的活化则受到明显抑制。同时,氯吡格雷的应用也可能是本研究中血小板表面活化标志物表达水平较低的原因之一。

#### [参考文献]

- [1] 顾苏兵,张文亚,陈桂花,赖小彪,张剑梅,张继业. 颈动脉粥样硬化致血小板活化及其与急性脑梗死的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (5): 439-442
- [2] Rauch U, Osende JL, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences [J]. *Ann Intern Med*, 2001, 134: 224-238
- [3] Markus J, Peter S, Sebastian S, Schultheiss HP, Rauch U. Randomized comparison of platelet-leukocyte aggregates and platelet activation in blood: heparin coated coiled wire stent implantation versus balloon angioplasty in acute myocardial infarction[J]. *Thromb Res*, 2003, 112: 285-289
- [4] Metzelaar MJ, Wijngaard PL, Peters PJ, Sixma JJ, Nieuwenhuis HK, Clevers HC. CD63 antigen a novel lysosomal membrane glycoprotein cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cell[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266 (5): 3 239-245
- [5] Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: Comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1995, 21: 146-151
- [6] Grines CL, Cox DA, Stone GW, Garcia E, Mattos LA, Giambartolomei A, et al. Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341: 1 949-956
- [7] Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Schomig A. Platelet activation and coronary stenting: effect of antithrombotic therapy [J]. *Circulation*, 1996, 94: 279-285

(此文编辑 朱雯霞)

#### •征订•

## 欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》 (原《中国临床康复》)杂志

本刊 2007 年更名,但仍是美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘》(EM)、俄罗斯《文摘杂志》(P)、波兰《哥伯尼索引》(IC)、中国科技论文统计源期刊、中国中文(临床医学类)核心期刊、《中国高影响力医学期刊论文计量报告》(第 1 版)收录期刊、中国科技核心期刊、中国科技期刊精品数据库等收录期刊。更名是为了更快的实现国际化的目标。

本刊 2005 年所发表的文章,被美国《化学文摘》单篇收录率> 50%。因此,作者在本刊发稿可有较大机会实现单篇文章被国际数据库收录的愿望,不仅体现了该篇稿件的学术价值,同时在作者晋升、评聘、课题评奖中会起到重要的作用。

2007 年本刊对发稿重点提出新的要求:为进一步提高学术质量,在生物材料研究方面重点突出:组织工程支架材料、组织工程材料学特征及人工器官和医学植入的材料学与人体生物相容性等问题。④在组织构建研究方面重点突出:各组织器官构建、组织工程生物活性因子、组织工程分子生物学、组织工程实验技术方法等。④在种子细胞研究方面重点突出:干细胞生物学特征、干细胞移植、干细胞因子、干细胞实验技术方法、干细胞临床应用相关基础实验。在器官移植研究方面重点突出:大器官移植、组织移植、细胞移植,并关注异种异体移植及医学植入体植入、人工器官植入的研究进展。在康复工程研究方面重点突出:康复工程理论、康复工程临床应用、生物医学工程学、生物医学电子学、生物医学光子学、生物医学成像及图像处理、计算机及脑的生物信息处理及组织器官生物力学及三维有限元分析。在临床康复研究方面重点突出:康复预防、康复技术、心理康复、运动医学、康复评估、康复理论。

欢迎上述研究的英文稿件和应用中医药方法研究的相关稿件投稿。

本刊出版周期:一般稿件修回后 6 个月出版,“绿色特快通道”承诺修回稿件 3 个月内出版。

咨询电邮为 CRTER\_szb200@163.com; 电话为 024-23389106, 024-23384352; 传真为 024-23381085; 投稿电邮为 kf23385083@sina.com, kf22838105@sina.com。

国内订阅邮发代号为 8-584; 本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱,邮编为 110004; 12 元/册。更多信息详见 <http://www.zglckf.com>。