

# 纤维连接蛋白与急性冠状动脉综合征的相关性

李凤综述, 褚俊审核

(安徽医科大学附属省立医院心内科, 安徽省合肥市 230001)

[关键词] 内科学; 急性冠状动脉综合征; 纤维连接蛋白; 血栓

[摘要] 纤维连接蛋白是一种具有广泛生物效应的高分子糖蛋白, 在细胞的粘附、迁移、分化和增殖中起关键作用。近年来不断有研究表明纤维连接蛋白在急性冠状动脉综合征的发病机制中扮演了不可或缺的角色, 具有一定的诊断和预测预后的意义。文章主要就纤维连接蛋白的结构、在血小板血栓形成中的作用及其与急性冠状动脉综合征的关系作一综述。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)主要由血管内皮细胞合成, 其它合成的细胞有成纤维细胞、肝细胞和软骨细胞等。Fn在人体中以两种形式存在: ①血浆型Fn(plasma Fn, pFn), 主要由肝细胞合成和分泌并以可溶的形式存在于血浆和其他体液中; ②细胞型Fn(cellular Fn, cFn), 由不同种类的细胞合成, 以不可溶的形式存在于多种组织的细胞外基质中。Fn参与血小板的粘附和聚集, 在血小板血栓的形成和增长过程中发挥重要作用, 参与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块的发生和发展, 与急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)关系密切。现就Fn在血小板血栓形成中的作用及其与ACS的关系作一综述。

## 1 纤维连接蛋白的结构

纤维连接蛋白是由分子量为250 kDa亚单位组成的糖蛋白二聚体, 在羧基端由二硫键连接。Fn由三种类型的同源模块组成: 12个type IV、2个type III和15~17个type II和一个不同源的可变区(V区)。Fn的变异体由单链基因通过选择性RNA剪接V/CS-1片段、E<sub>III</sub>A和E<sub>III</sub>B区(也称为EDA和EDB区)和(V+C)区, EDA区和EDB区主要在type II序列。血浆型Fn不含有EDA和EDB结构域, 但是cFn包含不同数量的EDA和EDB结构域中的任何一个。存在于每个多肽链中部的氨基酸序列Arg-Gly-Asp(RGD), 是一致的整联蛋白结合序列, 可使Fn与毗邻的细胞交联<sup>[1]</sup>。 $\alpha_5\beta_3$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 是Fn与血小板相互作用的两个主要的整合素受体, Fn通过RGD序列分别以活化依赖的方式和非活化依赖的方式粘附。但在切变应激的作用下, 也可依赖于血小板表面糖蛋白Ib, 通过血管性假血友病因子(von willebrand factor, vWF)粘附<sup>[2]</sup>。

## 2 纤维连接蛋白与血小板血栓

血小板血栓的起始步骤是血小板通过其表面受体与暴

露于损伤血管内皮下的细胞外基质内容物相互作用粘附<sup>[3]</sup>。以往认为细胞外基质内容物纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)和vWF是血小板血栓形成和增长的两个配体, 但近年来逐渐发现Fn在血栓形成中可能起作用, 许多研究提示Fn可能参与血小板的粘附和聚集, 并且其与纤维蛋白和胶原的相互作用可能是损伤后增强血栓形成的主要机制。

### 2.1 纤维连接蛋白参与血小板的粘附和聚集

近年研究表明Fn参与血小板的粘附和聚集, 但是与血小板粘附到vWF和胶原比较, 血小板粘附到Fn不依赖于切变率并且其粘附效率较低, 在切应力增加的情况下很容易分离, 表明血小板粘附到Fn比粘附到vWF和胶原表面稳定性差<sup>[4]</sup>。Ni等<sup>[5]</sup>发现在Fg缺乏的小鼠及Fg和vWF因子双重缺乏的小鼠仍有闭塞性血栓形成。然而, 在血栓和止血过程中, 不依赖于Fg和vWF的分子基础在很大程度上还不清楚。最近Yang等<sup>[6]</sup>证实, 在体外有抗凝剂的情况下, Fg和vWF缺乏时, 通常不能检查出有血小板聚集发生; 而在生理情况下, 或体外有Ca<sup>2+</sup>存在时, 腺苷二磷酸可诱导出爆发性的血小板聚集。但是同样的实验在整合素 $\beta_3^{-/-}$ 小鼠内却不能重复。研究提示 $\beta_3$ 整合素、凝血酶和Ca<sup>2+</sup>在Fg/vWF<sup>-/-</sup>血浆中血小板的聚集起关键作用, 而血浆和血小板颗粒蛋白可能参与这个过程。有研究提示在pFn基因敲除的小鼠实验中, pFn的缺失并不影响早期的血小板粘附, 但是与对照组小鼠相比, pFn缺失的小鼠小动脉血栓形成延迟了数分钟。血栓的增长比较缓慢, 因为血栓增长的同时不断有血小板和血小板团块从血栓中脱落<sup>[7]</sup>。在Fn<sup>+/-</sup>杂交的小鼠实验中也发现类似的结果, pFn的生理浓度降低了一半, 血栓的起始和生长显著缺陷, 血栓闭塞的时间延迟, 通过灌流鼠的pFn可挽救这种血栓的缺陷<sup>[8]</sup>。将免疫荧光标记的pFn中心体注入到Fn<sup>+/-</sup>小鼠, 观察到这种中心体明确局限在发展中的动静脉血栓内, 表明不论是在高切变率还是在低切变率的条件下pFn都是血栓形成的一个整体部分。另外, Zhai等<sup>[9]</sup>用免疫印迹、流式细胞术和免疫电子显微镜检查法测定1例低纤维蛋白原血症患者的血小板Fn含量, 发现其血小板Fn含量明显增高。此实验还发现Fg不仅竞争性抑制人血小板Fn的细胞内摄作用, 而且还通过纤维蛋白的形成调控血小板表

[收稿日期] 2008-06-11

[修回日期] 2008-08-19

[作者简介] 李凤, 硕士研究生, 研究方向为冠心病, E-mail为155132528@qq.com。褚俊, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础及临床研究。

面 Fn 的贮留,提示 Fn 与纤维蛋白的相互作用可能是促使 Fn 与血小板相互作用的一种机制。

## 2.2 纤维蛋白-纤维连接蛋白交联体增强血小板血栓形成

研究表明用人或小鼠的血清制备纤维蛋白、纤维蛋白-Fn 交联体和 Fn 样本,在体外实验中用免疫染色法及定量分析发现,与仅涂有纤维蛋白或 Fn 的表面相比较,涂有纤维蛋白-Fn 的交联体通过激活因子 X 的催化作用在表面形成的血栓较大且血小板的数量较多<sup>[10]</sup>。实验证明含有纤维蛋白-Fn 的基质有助于血小板的粘附和内聚物的形成;pFn 通过血小板的粘附和聚集集合,并在切应力的条件下进一步增强血栓的形成和稳定性。这些结果为 pFn 基因敲除小鼠实验<sup>[7]</sup>中观察到的不稳定血栓提供一个可能的解释,即在血小板性血栓的生长过程中缺乏 pFn 纤维蛋白的交联和缺乏 pFn 的集合。

## 2.3 纤维连接蛋白与胶原、血管性假血友病因子相互作用

Cho 等<sup>[11]</sup>发现,在静止的条件下血小板粘附到 iv 型胶原纤维而非 vWF 支持 pFn 的集合。在切变率为  $1\,250\text{ s}^{-1}$  时,血小板粘附并聚集到胶原表面可促使灌注的 pFn 集合,而血小板粘附到 vWF 上却不能。实验还发现在胶原表面灌注 50 mg/L pFn 使血小板血栓的形成大约增强了 1.5 倍,而在 vWF 的表面血小板血栓的形成并没有通过灌注 pFn 增强,并且只有少许的异硫氰酸荧光素标记的 Fn 沉积。在胶原表面形成的血栓增强作用随着灌注 pFn 浓度的增加而增加,在浓度为 250 mg/L 时产生最大的作用。此实验还发现在切变率为  $5\,000\text{ s}^{-1}$  时,胶原诱导的血小板血栓的形成需要灌注 vWF,而灌注 Fn 并不能使血栓增强。这与 Denis 等<sup>[12]</sup>发现在非常高的切应力条件下 vWF 对止血和血栓的形成起决定性作用一致,提示 Fn 在高切应力条件下对止血和血栓形成可能不是很重要。Cho 等<sup>[11]</sup>的实验表明 Fn 的沉积增加胶原表面粘附的血小板数量和血栓体积,结合先前的研究<sup>[10]</sup>,表明在适度的切应力条件下,在血管严重损伤并且充分暴露胶原和/或组织因子的部位,Fn 可能是血栓和止血事件的一个主要决定因子。

# 3 纤维连接蛋白与急性冠状动脉综合征

急性冠状动脉综合征(ACS)包括不稳定型心绞痛、非 ST 段抬高型心肌梗死和 ST 段抬高型心肌梗死,这三种病症共同的病理基础为不稳定的粥样斑块,只是继发了不同的病理改变。发生机制除了冠状动脉痉挛外,多为斑块破溃继而出血、管腔内血栓形成。近年来不断有研究表明 Fn 在血栓形成中具有重要作用,它与 ACS 关系密切。

## 3.1 纤维连接蛋白在动脉粥样硬化形成中的作用

动脉粥样硬化(As)是一种炎症性疾病导致斑块形成和促炎症反应蛋白、细胞外基质蛋白和蛋白酶的表达<sup>[13]</sup>。有研究表明 Fn 具有致 As 的作用,Tan 等<sup>[14]</sup>复制 E $\alpha$ <sup>-/-</sup>/载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠模型,载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠作为对照组。高脂和高胆固醇饮食 8、12 和 16 周后,比较两组 As 的程度,主动脉部分采用苏丹红染色,用形态测定法测定粥样硬化损伤区域大小,发现雄性小鼠 16 周后损伤区域减少 51%,而雌性小鼠

任何时间都表现一种保护作用(8 周时减少 67%,12 周时减少 60%,16 周时减少 64%)。这些损伤区域表明发生在小鼠主动脉各处粥样硬化在 E $\alpha$ <sup>-/-</sup>/载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠可受到保护,提示 E $\alpha$ -Fn 在疾病的病理生理过程中发挥致 As 作用。van Keulen 等<sup>[15]</sup>发现 Fn 的 EDA 肽在 As 斑块中的表达水平比非 As 的动脉 EDA 水平高,免疫组织化学染色发现 EDA 主要在斑块中巨噬细胞周围的细胞外基质中表达,也在富含平滑肌的区域和内皮细胞周围表达。同时发现,与有症状的患者相比,无症状的患者斑块中有较高的 EDA 值,提示可能 Fn 的 EDA 肽与人的不稳定性斑块无相关性。Dietrich 等<sup>[16]</sup>用近红外荧光成像测试一种新型改良的单链抗 Fn 的 EDB 抗体与四-磺酸化的羧花青-马来酰亚胺共轭结合(TSC-scFv),并检测在鼠 As 模型中 EDB 与巨噬细胞(Mac3 抗体)存在的关联,结果发现在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠胸主动脉和头臂动脉的损伤斑块中可检测到 EDB 免疫反应性,并且 EDB 表达与 Mac3 阳性细胞呈显著正相关,说明 EDB 的表达和巨噬细胞的表达相关。这个实验还发现在患有严重冠心病的不同患者( $n=5$ )的冠状动脉片段检测到 EDB 的免疫反应性。在损伤区域 EDB 的免疫反应性可重复被发现,而 EDB 免疫反应的区域是血管平滑肌定位的典型区域。斑块损伤区证实 EDB 和  $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白的局部免疫反应性与巨噬细胞区域密切相关。综上所述,Fn 的 EDA 和 EDB 结构域可能参与致粥样硬化斑块的炎症反应。

## 3.2 纤维连接蛋白与冠状动脉疾病

从抗血栓和纤维溶解治疗后再缺血、梗死和死亡因素来判断,冠状动脉血栓的发展是 ACS 患者预后的决定因素。在血小板  $\alpha$  分泌颗粒中发现有 Fn 并在血小板被激活后分泌,表明血小板 Fn 在细胞表面的表达可能在血小板聚集和粘附到纤维蛋白血栓和结缔组织中发挥作用。研究表明血小板 Fn 水平与冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD)严重性呈正相关,Ekmekci 等<sup>[17]</sup>发现双支血管病变的病人中,血小板 Fn 水平显著高于无血管病变、单支血管病变和三支血管病变者的水平。此外,单支血管病变的病人血小板 Fn 水平显著高于无血管病变者。Bottan 等<sup>[18]</sup>对 43 例冠心病患者的血小板 Fn 水平进行测定,也发现血小板 Fn 水平在无梗阻性血管病变的病人(有胸痛似心绞痛)显著低于单支、双支、三支血管病变者的水平,血小板 Fn 水平与冠心病严重性呈显著正相关。另外,Ekmekci 等<sup>[19]</sup>还发现与健康对照组相比,CAD 患者血浆 Fn 水平显著增高,具有三支血管病变患者血浆 Fn 水平显著高于对照组。综合以上研究,Fn 可能在 CAD 的发病机制方面起极其重要的作用,或许是 CAD 的一个潜在的致病因子。

## 3.3 纤维连接蛋白与心肌梗死

近年 Fn 与心肌梗死的关系已逐渐成为国内外研究的热点,急性心肌梗死后血小板膜上 Fn 和 pFn 的含量较正常升高<sup>[20,21]</sup>。不少学者用免疫组织化学的方法对因心肌梗死及其它原因死亡的心脏组织进行检测,发现心肌梗死组心肌细胞内 Fn 呈阳性表达,并且高于非心肌梗死死亡组<sup>[22,23]</sup>,提示 Fn 作为心肌梗死后诊断指标具有较好的特异性。Kossm

hl 等<sup>[24]</sup>在猪心肌缺血再灌注实验中发现与远离梗死区域和非梗死心肌相比较,在梗死区域总的 Fn 和骨桥蛋白的含量及其 mRNA 的表达明显增高。此实验还发现与起源于对照心肌的成纤维细胞相比,起源于梗死区域的成纤维细胞样细胞骨桥蛋白和 Fn 的基因和蛋白表达增强。另外,在心肌梗死犬和鼠动物模型实验中<sup>[25]</sup>,用免疫组织化学法检测 Fn 在主要血管周围的定位,发现缺血再灌注 7 d 后,在梭型成纤维母细胞样细胞及新形成的血管壁周围有强烈的 Fn 染色;梗死后 cFn 含量在再灌注 7 d 后开始增高但在 14 d 后开始下降并大部分掺入基质纤维中;Fn 的沉积在 28 d 后进一步下降,在成熟的瘢痕期几乎检测不到 Fn 的存在。van Dijk 等<sup>[26]</sup>的实验中得到相似的结果,免疫组织化学染色发现心肌梗死后 12 h 到 14 d,与非梗死的心肌相比,Fn 在梗死区域和边缘带沉积显著增加。说明心肌梗死后 Fn mRNA 和蛋白表达快速增加,提示 Fn 在机化和调整修复过程方面发挥作用,也许 Fn 对维持坏死心肌的抗拉强度并预防心肌梗死的扩展有着重要的作用。Serebruany 等<sup>[27]</sup>在缺血再灌注动物实验中也发现心肌梗死后 pFn 水平增加,并且发现在整个再灌注期静脉内注射镁盐和地尔硫卓可显著减少血浆 Fn 的水平,但是对无心肌损伤的对照组 pFn 水平无影响。这项实验对今后在临床上应用抑制 pFn 的因子治疗 ACS 患者也许是一个有益的提示,但目前关于此方面的研究尚不多。

#### 4 纤维连接蛋白的临床应用前景

综上所述,Fn 参与 As 的发生和发展过程并与 CAD 的严重性呈正相关;Fn 通过各种机制参与血栓的形成和增长,并与血栓的稳定性有关;心肌细胞内 Fn、血小板 Fn 以及 pFn 的水平在心肌梗死后表达增加。这些都表明 Fn 与 ACS 关系密切,对其具有一定的诊断及预测预后的意义。在治疗方面,目前急性心肌梗死溶栓治疗的靶点主要是针对纤维蛋白原和纤维蛋白,并有一定的时间窗限制,其溶栓治疗的效果往往不理想。因此,弄清 Fn 在血栓形成及血栓陈旧化中的作用机制,对将来应用 Fn 作为干预及治疗 ACS 的靶点,具有一定的临床意义。另外,最新研究<sup>[26]</sup>表明,Fn 在心肌梗死灶及周围区域聚集可增加脂肪起源的干细胞的粘附和增殖,这对心肌梗死后干细胞移植疗法的应用具有一定的指导意义,有待于进一步的临床试验来验证。

#### [参考文献]

- [1] Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, **12** (1): 697-715.
- [2] Wu YP, Vink T, Schiphorst M, et al. Platelet thrombus formation on collagen at high shear rates is mediated by von willebrand factor-Glycoprotein Ib interaction and inhibited by von willebrand factor-glycoprotein  $\beta_3$ / $\alpha_{IIb}$  interaction [J]. *J Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (6): 1 661-667.
- [3] Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis [J]. *Nat Med*, 2002, **8** (11): 1 227-234.
- [4] Cho J, Mosher DF. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, **4** (7): 1 461-469.
- [5] Ni H, Denis CV, Subbarao S, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von willebrand factor and fibrinogen [J]. *J Clin Invest*, 2000, **106** (3): 385-392.

- [6] Yang H, Reheman A, Chen P, et al. Fibrinogen and von willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, **4** (10): 2 230-237.
- [7] Ni H, Yuen PST, Papalia JM, et al. Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (5): 2 415-419.
- [8] Matuskova J, Chauhan AK, Cambien B, et al. Decreased plasma fibronectin leads to delayed thrombus growth in injured arterioles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (6): 1 391-396.
- [9] Zhai Z, Wu J, Xu X, et al. Fibrinogen controls human platelet fibronectin internalization and cell-surface retention [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, **5** (8): 1 740-746.
- [10] Cho J, Mosher DF. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thromb [J]. *Blood*, 2006, **107** (9): 3 555-563.
- [11] Cho J, Mosher DF. Impact of fibronectin assembly on platelet thrombus formation in response to type iv collagen and von willebrand factor [J]. *Blood*, 2006, **108** (7): 2 229-236.
- [12] Denis C, Methia N, Frenette PS, et al. A mouse model of severe von willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (16): 9 524-529.
- [13] Zerneck A, Weber C. Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, **100** (2): 93-101.
- [14] Tan MH, Sun Z, Opitz SL, et al. Deletion of the alternatively spliced fibronectin E $\alpha$  domain in mice reduces atherosclerosis [J]. *Blood*, 2004, **104** (1): 11-18.
- [15] van Keulen JK, de Kleijn DP, Nijhuis MM, et al. Levels of extra domain A containing fibronectin in human atherosclerotic plaques are associated with a stable plaque phenotype [J]. *Atherosclerosis*, 2007, **195** (1): e83-e91.
- [16] Dietrich T, Perlitz C, Licha K, et al. ED-B fibronectin (ED-B) can be targeted using a novel single chain antibody conjugate and is associated with macrophage accumulation in atherosclerotic lesions [J]. *Basic Res Cardiol*, 2007, **102** (4): 298-307.
- [17] Ekmekci H, Iser I, Sonmez H, et al. Comparison of platelet fibronectin, ADP-induced platelet aggregation and serum total nitric oxide (NOx) levels in angiographically determined coronary artery disease [J]. *Thromb Res*, 2006, **117** (3): 249-254.
- [18] Bütün I I, Ekmekci H, Sonmez H, et al. Preliminary study showing the relationship between platelet fibronectin, sialic acid, and ADP-induced aggregation levels in coronary heart disease [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2007, **13** (3): 308-312.
- [19] Ekmekci H, Ekmekci OB, Sonmez H, et al. Evaluation of fibronectin, vitronectin, and leptin levels in coronary artery disease: impacts on thrombosis and thrombolysis [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2005, **11** (1): 63-70.
- [20] 李庆生, 吴竞生, 翟志敏, 等. 急性心肌梗死患者纤维连接蛋白的测定及其临床意义[J]. *血栓与止血学*, 2005, **11** (2): 76-78.
- [21] Orem C, Celik S, Orem A, et al. Increased plasma fibronectin levels in patients with acute myocardial infarction complicated with left ventricular thrombus [J]. *Thromb Res*, 2002, **105** (1): 37-41.
- [22] 孙忠国, 张凡, 成日青, 等. Fn-HSP70 在冠心病猝死心肌中表达的诊断意义[J]. *河北北方学院学报(医学版)*, 2007, **24** (1): 67-70.
- [23] 胡丙杰, 陈玉川, 祝家镇, 等. 纤维连接蛋白在诊断心肌梗死的特异性研究[J]. *中国法医学杂志*, 2001, **16** (1): 23-25.
- [24] Kossmehl P, Schöninger J, Shakibaei M, et al. Increase of fibronectin and osteopontin in porcine hearts following ischemia and reperfusion [J]. *J Mol Med*, 2005, **83** (8): 626-637.
- [25] Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, et al. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts [J]. *Cell Tissue Res*, 2006, **324** (3): 475-488.
- [26] van Dijk A, Niessen HW, Ursem W, et al. Accumulation of fibronectin in the heart after myocardial infarction: a putative stimulator of adhesion and proliferation of adipose-derived stem cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, **332** (2): 289-298.
- [27] Serebruany VL, Solomon SR, Herzog WR, et al. Plasma fibronectin during myocardial ischemia-reperfusion: effects of magnesium, diltiazem, and a novel Mac-1 inhibitor [J]. *Am J Hematol*, 1998, **57** (4): 309-314.

(此文编辑 许雪梅)