

P 物质前体与血小板活化及血小板参数的相关性

程浩¹, 真晓雯², 宋年朋³, 李留东³

(1. 滨州医学院; 2. 滨州医学院临床医学院诊断学教研室; 3. 烟台毓璜顶医院心血管内科, 山东省烟台市 264000)

[关键词] P 物质前体; 血小板活化; 血小板-单核细胞聚集体; 急性心肌梗死; 非急性心肌梗死; 血小板分布宽度

[摘要] 目的 探讨 P 物质前体(Pro-SP)与血小板活化及血小板参数的相关性。方法 总共纳入心内科患者 76 例,根据急性心肌梗死诊断标准将患者分为非急性心肌梗死组(39 例)和急性心肌梗死组(38 例)。采用流式细胞仪测定血小板-单核细胞聚集体(PMA)形成率评估血小板活化程度,酶联免疫吸附实验测定 Pro-SP 浓度。比较 Pro-SP 与 PMA 形成率及血小板参数相关性,以及两组间 Pro-SP 差异。结果 Pro-SP 与 PMA 形成率(Pearson 相关系数为 0.407, $P < 0.001$)、血小板分布宽度(Pearson 相关系数为 0.269, $P = 0.018$)呈正相关,与血小板总数、血小板平均容积、血小板比积、大血小板比例不相关($P > 0.05$)。多元线性回归分析显示 Pro-SP 是 PMA 形成率的独立影响因素,急性心肌梗死组 Pro-SP 较非急性心肌梗死组显著升高($P < 0.05$)。结论 Pro-SP 与血小板活化正相关,且与血小板分布宽度呈正相关,与血小板总数、血小板平均容积、血小板比积、大血小板比例不相关($P > 0.05$)。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Correlation between substance P precursors and platelet activation, platelet parameters

CHENG Hao¹, ZHEN Xiaowen², SONG Nianpeng³, LI Liudong³

(1. Binzhou Medical University; 2. Diagnosis Teaching and Research Office, Clinical Medical College, Binzhou Medical University; 3. Department of Cardiovascular Medicine, Yantai Yuhuang Ding Hospital, Yantai, Shandong 264000, China)

[KEY WORDS] substance P precursor; platelet activation; platelet-mononuclear aggregation; acute myocardial infarction; non-acute myocardial infarction; platelet distribution width

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the correlation between substance P precursor (Pro-SP) and platelet activation, platelet parameters. **Methods** A total of 76 patients were enrolled in the department of cardiology. According to the diagnostic criteria of acute myocardial infarction, the patients were divided into non-acute myocardial infarction group ($n = 39$) and acute myocardial infarction group ($n = 38$). Percentage of platelet-mononuclear aggregate (PMA) formation was evaluated for platelet activation by flow cytometry. The concentration of Pro-SP was determined by ELISA. The correlations of Pro-SP, PMA and the parameters of platelets were statistically compared, as well as the differences between the two groups in Pro-SP. **Results** Pro-SP was positively correlated with PMA (Pearson correlation coefficient 0.407, $P < 0.001$) and platelet distribution width (Pearson correlation coefficient 0.269, $P = 0.018$), but not with total platelet count, mean platelet volume, platelet specific volume, and large platelet ratio ($P > 0.05$). Linear regression analysis showed that Pro-SP was an independent influencing factor of PMA, and Pro-SP was significantly higher in the acute myocardial infarction group than that in the non-acute myocardial infarction group ($P < 0.05$). **Conclusion** Pro-SP is positively correlated with platelet activation and platelet distribution width, but not with total platelet count, average platelet volume, platelet specific volume, and large platelet ratio ($P > 0.05$).

P 物质(substance P, SP)是最早发现的神肽之一,在神经系统、心血管系统、多种血细胞中 P 物

[收稿日期] 2019-05-10

[修回日期] 2019-10-28

[基金项目] 烟台市科技计划项目(2016ZH083)

[作者简介] 程浩,硕士研究生,研究方向为心血管病,E-mail 为 897218281@qq.com。通信作者李留东,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为心血管病,E-mail 为 winterlee6@163.com。

质及其受体广泛分布^[1], P 物质可诱导血小板变形^[2], 刺激血小板聚集, 抑制 P 物质及其 NK1 受体活性可明显减少血栓形成^[3-4]。P 物质可激活冠状动脉外膜上的肥大细胞, 参与冠状动脉斑块的形成, 还会增加斑块的不稳定性, 使之破裂^[5-6]。同时, P 物质诱导内皮细胞、血管平滑肌细胞、巨噬细胞发生细胞凋亡及削弱斑块纤维帽, 促进动脉粥样斑块不稳定发生^[7]。然而 P 物质半衰期极短(12 min), 不利于其检测和研究, 最近发现的稳定的前速激肽 A, 即(P precursor, Pro-SP)可作为不稳定 P 物质的替代物。

血小板活化(platelet activation)是指血液循环中处于静止状态的血小板在血管内皮受损或者某些物理、化学刺激因子作用下导致血小板出现释放、变形、黏附、聚集等反应, 即为血小板的活化。血小板的异常活化与多种疾病相关, 如急性心肌梗死、急性脑梗死、弥散性血管内凝血等多种血栓栓塞性疾病。当血小板活化时, 其表面 P 选择素、GP II b/III a 复合物增加, 血小板通过与单核细胞表面 P 选择素糖基蛋白配体等结合, 形成血小板-单核细胞聚集体(platelet-mononuclear aggregate, PMA)^[8-9]。循环血液中 PMA 形成率是反映血小板活化的灵敏标志物^[10]。

本文主要探讨 Pro-SP 与 PMA 形成率及各项血小板参数相关性, 以及在急性心肌梗死与非急性心肌梗死两组间 Pro-SP 的差异。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 12 月至 2018 年 3 月于我院心血管内科住院的患者, 根据急性心肌梗死诊断标准, 将患者分为非急性心肌梗死组(39 例)和急性心肌梗死组(38 例)。其中非急性心肌梗死组包含健康人与稳定型心绞痛, 急性心肌梗死组包含非 ST 段抬高型心肌梗死与 ST 段抬高型心肌梗死。

排除标准: 肺栓塞、主动脉瘤、先天性心脏病、风湿性心脏病、心肌炎、心肌病、感染、炎症性疾病如自身免疫疾病、肿瘤、肝肾功能衰竭、冠状动脉畸形、川崎病、多发性大动脉炎、冠状动脉介入诊疗及手术治疗等非冠状动脉粥样硬化病变所致的急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrom, ACS)。

1.2 Pro-SP 测定

采用酶联免疫吸附实验测定 Pro-SP。采集所有研究对象 4 mL 清晨空腹静脉血, 并放入含柠檬酸

钠抗凝的试管中, 2 h 内离心(4 °C、3 000 r/min、5 min), 取上层血浆, 分装于不同 EP 管中, -80 °C 冰箱保存。严格按照酶联免疫吸附试剂盒操作要求操作, 反应终止后 5 min 内用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔 OD 值, 推算出各标本 Pro-SP 浓度。

1.3 PMA 形成率测定

采集所有研究对象 4 mL 清晨空腹静脉血, 并放入含柠檬酸钠抗凝的试管中, 避免剧烈的摇动而影响对血小板的检测。2 h 内对血小板进行荧光标记、固定、检测。以柠檬酸钠抗凝管取安静状态外周静脉血样 3~5 mL, 按肝素 50 kU/L 抗凝; 取 100 μ L 样血分别加入 20 μ L CD14-FITC、CD61-PE 缓慢充分混匀; 室温下避光孵育 15 min。加入 1% 甲醛 1 000 μ L 避光固定 20 min, 加入红细胞裂解液 3 mL, 室温避光 10 min 裂解红细胞。待充分溶血后, 离心机 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 再加 0.5 mL PBS 重新悬浮细胞, 上流式细胞仪检测; 将获得的图形复制、保存及分析, 得出单核细胞-血小板聚集物形成率(图 1)。

1.4 统计学处理

采用 SPSS Statistics 进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 计数资料的比较采用 χ^2 检验, 应用 Pearson 相关分析评估 Pro-SP 与 PMA 形成率及血小板参数的相关性, 多元线性回归分析 Pro-SP 对血小板活化的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象临床资料及 Pro-SP、PMA 形成率比较

对非急性心肌梗死组与急性心肌梗死组临床资料进行比较, 发现两组性别、年龄、高血压、吸烟、糖尿病、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、肌酐(creatinine, Cr)、血小板总数、血小板平均容积、血小板分布宽度、血小板比积、大血小板比例差异无统计学意义($P > 0.05$), 急性心肌梗死组心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)、肌酸激酶-MB 同工酶

(creatinine kinase MB isoenzyme, CK-MB) 质量测定、肌红蛋白定量、PMA 形成率、Pro-SP 较非急性心肌

梗死组显著升高($P < 0.05$; 表 1)。

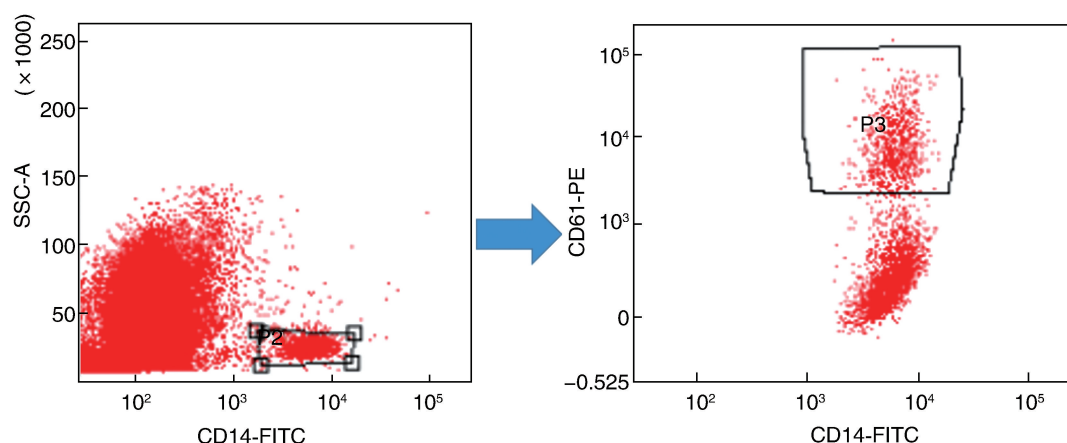


图 1. 流式细胞仪测定 PMA 形成率示意图 左图为单核细胞百分率,右图为 PMA 占有单核细胞百分率。

Figure 1. Schematic diagram of PMA formation rate measured by flow cytometry

表 1. 临床数据及 Pro-SP、PMA 形成率比较

Table 1. Comparison of clinical data and Pro-SP and PMA

项目	非急性心肌梗死组 (n=39)	急性心肌梗死组 (n=38)
男/女(例)	18/21	20/18
年龄(岁)	64.03±6.84	66.63±11.72
高血压[例(%)]	20(51.28)	21(55.26)
吸烟[例(%)]	5(12.82)	8(21.05)
糖尿病[例(%)]	5(12.82)	6(15.79)
cTnI(ng/L)	9.84±27.44	7786.36±13356.61 ^a
CK-MB(μg/L)	1.17±0.60	26.37±45.91 ^a
肌红蛋白定量(μg/L)	34.50±8.83	275.26±352.96 ^a
TC(mmol/L)	4.69±0.89	4.79±1.15
TG(mmol/L)	1.23±0.55	1.50±0.96
HDLC(mmol/L)	1.17±0.27	1.05±0.21
LDLC(mmol/L)	2.71±0.72	2.90±0.92
ALT(U/L)	22.62±22.60	30.81±21.71
AST(U/L)	22.77±16.87	100.28±120.99
FBG(mmol/L)	6.32±2.51	7.43±3.10
Cr(μmol/L)	65.18±11.41	79.86±19.44
血小板总数(×10 ⁹ /L)	215.48±63.83	216.82±58.29
血小板平均容积(fL)	8.82±3.52	9.72±2.52
血小板分布宽度(fL)	12.09±4.76	11.87±2.42
血小板比积(%)	2.02±4.32	0.8121±2.56
大血小板比例(%)	26.68±5.8	26.81±8.52
PMA 形成率(%)	29.58±10.15	46.68±19.73 ^a
Pro-SP(ng/L)	73.80±48.21	136.34±63.59 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与非急性心肌梗死组比较。

2.2 相关性分析

纳入所有研究对象进行相关性分析,发现 Pro-SP 与 PMA 形成率(Pearson 相关系数为 0.407, $P < 0.001$)、血小板分布宽度(Pearson 相关系数为 0.269, $P = 0.018$)呈正相关,与血小板总数、血小板平均容积、血小板比积、大血小板比例不相关($P > 0.05$)。

2.3 多元线性回归分析

纳入所有研究对象进行多元线性回归分析,以 PMA 形成率为因变量,以患者 Pro-SP 水平、血小板总数、血小板平均容积、血小板分布宽度、血小板比积、大血小板比例为自变量进行多元线性回归分析,提示 Pro-SP 是 PMA 形成率的独立影响因素(表 2)。

表 2. 多元线性回归分析

Table 2. Multiple linear regression analysis

项目	B	t	P
Pro-SP	0.407	3.674	<0.001
血小板总数	0.13	0.99	0.325
血小板平均容积	-0.658	-0.593	0.555
血小板分布宽度	0.221	0.948	0.346
血小板比积	-0.801	-0.74	0.462
大血小板比例	0.177	0.592	0.555

3 讨论

血小板是无细胞核、呈不规则形状的血细胞,是从骨髓成熟的巨核细胞胞质解脱落下来的小块

胞质。在止血、血栓形成、愈合伤口、炎症反应等生理病理过程中起重要作用。正常的血小板活化聚集对机体起保护作用,特别是出现出血时,防止大量失血。但是血小板过度活化,往往产生血栓性疾病,如急性心肌梗死、脑血栓等疾病。

早在1996年SP已被提出在血小板的活化或者是失活中起重要作用,并且发现SP及其受体NK1诱导家兔血小板发生形态的变化^[11]。随后Gecse等^[12]根据神经NK1受体是G蛋白偶联受体家族的一员,其细胞内的第二信使系统与磷酸肌肽途径的激活有关这一线索推测SP影响血小板功能,以及它参与花生四烯酸级联反应,并证明了SP促进脂酶氧合途径;对环氧合酶、血栓素途径的作用表现为低浓度抑制,高浓度促进;高浓度的SP对血小板的激活具有促进作用。Graham等人^[3]提出SP通过加强血小板内钙动员和脱颗粒来达到刺激血小板聚集的作用,低浓度的SP不能发挥血小板聚集作用,但与凝血酶和胶原蛋白(浓度均不能产生聚集作用)联用可使血小板发生聚集,同时发现NK1受体拮抗剂抑制了其他促进血小板聚集的激动剂产生的聚集效应。还发现在NK1受体缺陷的大鼠实验中SP仍发挥血小板聚集作用,从而考虑NK3受体为SP在血小板上的候选抗体。SP及其受体不仅参与血栓的形成,而且在白细胞存在的条件下,使血栓质地更硬。NK1受体全长表达与截断表达对血栓的作用具有不同的效果,全长表达的NK1R受体使血栓更大更硬^[13]。本研究中发现人体中Pro-SP与PMA形成率、血小板分布宽度呈正相关,血小板分布宽度是一项反映血小板体积大小离散度的指标,其与血小板活化密切相关。本研究发现Pro-SP与血小板总数、血小板平均容积、血小板比积、大血小板比例不相关,考虑与本研究样本较少或血小板常规参数缺乏特异性相关。PMA形成率是反映血小板活化的灵敏标志物,多元线性回归分析显示Pro-SP是PMA形成率的独立影响因素,表明Pro-SP与血小板活化密切相关,这与既往研究相符。急性心肌梗死多发生在冠状动脉粥样硬化狭窄基础上,某些诱因致使冠状动脉粥样斑块破裂,血中的血小板活化,在破裂的斑块表面聚集,形成血栓,阻塞冠状动脉管腔,导致急性心肌缺血而坏死,因此急性心肌梗死患者血液循环中血小板多呈活化状态,本研究中急性心肌梗死组PMA形成率较非急性心肌梗死组显著升高,与之相符。并且急性心肌梗死组Pro-SP较非急性心肌梗死组显著升高,

血小板呈活化状态与血液中Pro-SP升高并存,验证了Pro-SP与血小板活化呈相关性。

综上所述,本研究表明Pro-SP与血小板活化呈正相关,并与血小板分布宽度呈正相关,与血小板总数、血小板平均容积、血小板比积及大血小板比例不相关。

[参考文献]

- [1] Reinecke M, Weihe E, Forssmann WG. Substance P-immunoreactive nerve fibers in the heart[J]. *Neurosci Lett*, 1980, 20(3): 265-269.
- [2] Savi P, Laplace MC, Fur GL, et al. The NK1 receptor is involved in the neurokinin-induced shape change of rabbit platelets[J]. *FEBS Letters*, 1992, 312(2-3): 200-202.
- [3] Graham GJ, Stevens JM, Page NM, et al. Tachykinins regulate the function of platelets[J]. *Blood*, 2004, 104(4): 1058-1065.
- [4] Jones S, Tucker KL, Sage T, et al. Peripheral tachykinins and the neurokinin receptor NK1 are required for platelet thrombus formation[J]. *Blood*, 2008, 111(2): 605-612.
- [5] Laine P, Naukkarinen A, Heikkilä L, et al. Adventitial mast cells connect with sensory nerve fibers in atherosclerotic coronary arteries[J]. *Circulation*, 2000, 101(14): 1665-1669.
- [6] Gecse A, Kis B, et al. Effects of inflammatory neuropeptides on the arachidonate cascade of platelets[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 118(2-4): 166-170.
- [7] Bot I, De Jager SCA, Bot M, et al. Short communication: the neuropeptide substance P mediates adventitial mast cell activation and induces intraplaque hemorrhage in advanced atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2010, 106(1): 89-92.
- [8] Fernandes LS, Conde ID, Smith CW, et al. Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with α IIb β 3 and α M β 2, in coronary stenting[J]. *Thromb Res*, 2003, 111(3): 171-177.
- [9] Faraday N, Braunstein JB, Heldman AW, et al. Prospective evaluation of the relationship between platelet-leukocyte conjugate formation and recurrent myocardial ischemia in patients with acute coronary syndromes[J]. *Platelets*, 2004, 15(1): 9-14.
- [10] Brambilla M, Camera M, Colnago D, et al. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 947-953.
- [11] Savi P, Laplace MC, Fur GL, et al. The NK1 receptor is involved in the neurokinin-induced shape change of rabbit platelets[J]. *FEBS Lett*, 1992, 312(2-3): 200-202.
- [12] Gecse A, Kis B, Mezei Z, et al. Effects of inflammatory neuropeptides on the arachidonate cascade of platelets[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999, 118(2-4): 166-170.
- [13] Azma T, Sugimoto Y, Kinoshita H, et al. Detection of the full-length transcript variant for neurokinin-1 receptor in human whole blood associated with enhanced reinforcement of clot by substance-P[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2012, 33(4): 329-337.

(此文编辑 许雪梅)