

# 糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者血小板表面 PAC-1 和 CD62P 表达水平

柳晓娜<sup>1</sup>, 朱宁<sup>2</sup>, 魏国峰<sup>2</sup>, 王纪文<sup>2</sup>, 李忠艳<sup>2</sup>

(1. 荆门市第二人民医院心血管内科, 湖北省荆门市 448000;

2. 大连医科大学附属第二医院心血管内科, 辽宁省大连市 116023)

[关键词] PAC-1; CD62P; 急性冠状动脉综合征; 糖尿病

[摘要] **目的** 探讨糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者血小板表面血小板膜糖蛋白 II b/III a 纤维蛋白原受体(PAC-1)和 P 选择素(CD62P)的表达水平及其与血浆同型半胱氨酸(Hcy)的关系。**方法** 选择单纯急性冠状动脉综合征患者 40 例、糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者 24 例及对照组 30 例,采用全血流式细胞术结合三色荧光技术检测血小板表面 PAC-1 和 CD62P 的表达水平,并与血浆 Hcy 作相关性分析。**结果** 糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者的血小板 PAC-1、CD62P 和血浆 Hcy 水平较对照组明显升高( $P < 0.05$ ),同时血小板 CD62P 表达水平较单纯急性冠状动脉综合征患者明显升高( $P < 0.05$ );血小板 PAC-1、CD62P 与血浆 Hcy 水平呈正相关( $r$  分别为 0.441 和 0.408,均  $P < 0.05$ )。**结论** 糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者血小板表面 PAC-1、CD62P 表达水平明显升高,并与血浆 Hcy 呈明显正相关。血小板表面 PAC-1 和 CD62P 的表达水平可能对预示糖尿病患者发生血栓事件具有重要的意义。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Analysis of Platelet Surface Expression PAC-1 and CD62P Levels in Diabetes Mellitus Patients with Coronary Heart Disease

LIU Xiao-Na<sup>1</sup>, ZHU Ning<sup>2</sup>, WEI Guo-Feng<sup>2</sup>, WANG Ji-Wen<sup>2</sup>, and LI Zhong-Yan<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, the Second People's Hospital of Jingmen, Jingmen, Hubei 448000, China; 2. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116023, China)

[KEY WORDS] PAC-1; CD62P; Acute Coronary Syndrome; Diabetes Mellitus

[ABSTRACT] **Aim** To determine the platelet surface expression of glycoprotein II b/III a fibrinogen receptor (PAC-1) and P-selectin (CD62P) in diabetes mellitus (DM) patients with acute coronary syndrome (ACS) and to explore the relationship between them and plasma homocysteine (Hcy) level. **Methods** The platelet surface expression of PAC-1 and CD62P were measured by flow cytometry in 94 patients, including 40 ACS patients, 24 DM with ACS patients and 30 patients in control group. The correlation between platelet PAC-1, CD62P and plasma level of Hcy were investigated.

**Results** Platelet PAC-1, CD62P levels and plasma level of Hcy in the DM with ACS patients were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), meanwhile platelet level of CD62P was obviously higher in DM patients with ACS than that in ACS patients ( $P < 0.05$ ). The levels of platelet PAC-1 and CD62P were positively correlated with level of Hcy ( $r = 0.441, 0.408, P < 0.05$ ).

**Conclusion** Platelet surface expression PAC-1 and CD62P levels, which were significantly higher in the DM patients with ACS and were positively correlated with plasma level of Hcy, may have important clinical significance for predicting the presence of thrombotic events in DM patients.

急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)是冠心病(coronary heart disease, CHD)的急性

[收稿日期] 2014-08-02

[修回日期] 2014-10-26

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(2013023031)

[作者简介] 柳晓娜, 硕士, 住院医师, 研究方向为高血压及冠心病的基础及临床, E-mail 为 463662015@qq.com。通讯作者 李忠艳, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压及冠心病的基础及临床, E-mail 为 lzyheart@aliyun.com。朱宁, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压病、心脏病、心力衰竭的基础与临床。

事件,也是严重危害人类生命健康的主要疾病。目前研究表明,ACS 是在冠状动脉粥样硬化的基础上,发生易损斑块破裂,血小板活化、聚集,继发血栓形成,导致心肌缺血、缺氧甚至坏死的一系列临床综合征。糖尿病(diabetes mellitus, DM)是 CHD 的等危症,DM 患者 10 年内发生心血管事件的风险较非 DM 患者高 5~10 倍,在 DM 患者中 ACS 的发病率为正常人中的 2~6 倍。近年来有研究显示,血小板活性改变、炎症反应、氧化应激在 DM 患者合并血管并发症的发生中起着重要的作用。本研究对单纯急性冠状动脉综合征及糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者血小板表面血小板膜糖蛋白 II b/IIIa 纤维蛋白原受体(fibrinogen receptor, PAC-1)和 P 选择素(P-selectin, CD62P)的表达水平及血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)水平进行检测,并作相关性分析。

# 1 对象和方法

## 1.1 研究对象

研究对象共 94 例,为 2012 年 3 月至 2013 年 4 月收住大连医科大学附属第二医院心内科患者,根据是否患有 DM(空腹血糖水平 >7.0 mmol/L 或餐后 2 h 血糖水平 >11.1 mmol/L 或服用降糖药物或接受胰岛素治疗,排除继发性糖尿病及 1 型糖尿病)将患者分为:(1)单纯 ACS 患者 40 例(ACS 组),其空腹血糖水平 ≤5.6 mmol/L;(2)DM 合并 ACS 患者 24 例(DM 并 ACS 组)。对照组 30 例,心电图或动态心电图正常,心肌标志物未见异常,经冠状动脉 CT 血管成像(computed tomography angiography, CTA)或冠状动脉造影检查排除冠心病,同时确诊无糖尿病。采集所有患者的有关临床资料,排除严重心力衰竭、慢性肺脏疾病、急慢性病毒或细菌感染、血液系统疾病、免疫性疾病、严重肝肾功能不全的患者。

## 1.2 血小板表面 PAC-1 和 CD62P 表达水平测定

所有患者空腹采集肘静脉血抗凝,分别与 PAC-1-FITC、CD62P-PE、CD61-PerCP(特异的泛血小板表面标记,既与活化的血小板结合,也与未活化的血小板结合)3 种抗体室温暗处孵育 15~20 min 后,加入固定液 1 mL,在 2~8℃ 阴暗处放置 30 min;采用美国 BD 公司 FACS Calibur 型流式细胞仪检测血小板表面 PAC-1、CD62P 阳性的血小板百分率,用 CELL Quest 软件获取结果。

## 1.3 血浆 Hcy 测定

所有患者均清晨空腹采集肘静脉血,采用 RL7600 自动分析仪经酶循环法测定血浆 Hcy 水平。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析。计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,符合正态分布的两组数据采用 *t* 检验,不符合正态分布的两组数据采用 Mann-Whitney U 检验,3 组正态分布资料两两比较采用单因素方差分析;以 Spearman 相关分析分析变量间的相关性。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 一般资料比较

各组间年龄、性别比较没有显著差异,各组间吸烟、高血压病、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)等主要危险因素亦没有明显差异(表 1)。

表 1. 一般临床资料

Table 1. General clinical data

项 目	对照组 ( <i>n</i> = 30)	ACS 组 ( <i>n</i> = 40)	DM 并 ACS 组 ( <i>n</i> = 24)
年龄(岁)	60.03 ± 10.07	63.45 ± 7.20	59.79 ± 8.06
男/女(例)	16/14	29/11	18/6
吸烟(例)	10(33.33%)	25(62.50%)	16(66.67%)
高血压病(例)	10(33.33%)	26(65.00%)	14(58.33%)
TC(mmol/L)	4.78 ± 1.12	44.61 ± 1.15	4.69 ± 1.42
LDLC(mmol/L)	2.82 ± 0.89	2.90 ± 0.93	2.80 ± 0.93

## 2.2 血小板表面 PAC-1、CD62P 的表达水平及血浆 Hcy 水平

DM 并 ACS 组血小板表面 PAC-1 和 CD62P 的表达水平及血浆 Hcy 水平显著高于对照组(*P* < 0.05),DM 并 ACS 组血小板表面 CD62P 的表达水平明显高于 ACS 组(*P* < 0.05),而血小板表面 PAC-1 表达水平及血浆 Hcy 水平在 ACS 组与 DM 并 ACS 组之间未见明显差异(*P* > 0.05),ACS 组中以上指标明显高于对照组(*P* < 0.05)(表 2)。

## 2.3 相关性分析

相关性分析显示,血小板表面 PAC-1 表达水平与血浆 Hcy 水平呈正相关关系(*r* = 0.441, *P* < 0.05);血小板 CD62P 表达水平与血浆 Hcy 亦呈正

相关关系( $r=0.408,P<0.05$ )。

表 2. 血小板表面 PAC-1 和 CD62P 的表达水平及血浆 Hcy 水平

Table 2. Expression levels of PAC-1 and CD62P on the surface of platelet and plasma level of Hcy

项 目	对照组 ( $n=30$ )	ACS 组 ( $n=40$ )	DM 并 ACS 组 ( $n=24$ )
PAC-1	5.00% $\pm$ 7.62%	12.05% $\pm$ 15.63% <sup>a</sup>	15.96% $\pm$ 16.19% <sup>a</sup>
CD62P	24.51% $\pm$ 19.73%	35.88% $\pm$ 20.82% <sup>a</sup>	47.33% $\pm$ 19.04% <sup>ab</sup>
Hcy ( $\mu\text{mol/L}$ )	11.74 $\pm$ 3.10	14.34 $\pm$ 4.72 <sup>a</sup>	16.90 $\pm$ 7.83 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 ACS 组比较。

### 3 讨 论

糖尿病是危害人类健康的慢性代谢性疾病,主要引起血管病变,其中大血管病变易导致急性冠状动脉事件如 ACS 的发生。ACS 的发生源于不稳定斑块破裂和血栓的形成,而血栓的形成和进展源于血小板活化和聚集,因此,血小板被用于冠心病一级和二级预防的药物作用靶点。大量研究表明,炎症反应在 ACS 的发生、发展过程中也起了重要作用。冠状动脉粥样硬化使血管壁受损,白细胞在血管壁损伤处聚集,血小板活化,活化的血小板与白细胞、内皮细胞之间以及血管内皮基质间相互作用导致炎症反应和血栓形成,终至急性冠状动脉事件的发生。

血小板 PAC-1 是血小板膜糖蛋白 II b/III a (glycoprotein II b/III a,GP II b/III a)纤维蛋白原受体,即活化的 GP II b/III a 复合物。在正常循环血液中,血小板上的 GP II b/III a 复合物处于无活性状态,并不结合纤维蛋白原,不引起血小板的黏附、聚集。在缺血性血管疾病中,血小板处于活跃状态且循环中血小板被激活<sup>[1-6]</sup>。当血小板活化时,无活性的 GP II b/III a 复合物转化为活化的 GP II b/III a 复合物即 PAC-1,与纤维蛋白原结合,二者结合是各种因素引起血小板发生聚集和血栓形成的关键步骤。血小板 PAC-1 不仅可以作为血小板活化标志物用于血小板活化状态的检测<sup>[7]</sup>,而且在受损血管的血小板黏附和血栓形成过程中起着重要作用<sup>[8,9]</sup>。

CD62P 又称颗粒膜蛋白 140 (granule membrane protein 140,GMP-140)或 P 选择素,存在于血小板  $\alpha$  颗粒,是血小板激活的检测指标<sup>[10]</sup>,参与血小板的黏附和聚集过程。CD62P 在静息血小板上极少表达。当血小板活化时,CD62P 随  $\alpha$  颗粒释放并与血小板膜融合,大量表达于血小板表面,成为血小板活化的标志物,通过介导炎症反应,启动血栓形成过程,是血小板活化的“金标准”<sup>[11]</sup>。大量研究表

明,血小板 CD62P 不仅是血小板活化的标志物,而且与炎症反应密切相关,参与了动脉粥样硬化斑块的形成过程,并导致斑块的稳定性下降<sup>[12]</sup>。目前认为血小板 CD62P 参与了从白细胞黏附、不稳定斑块破裂到血栓形成的整个过程。

本研究结果显示,ACS 患者的血小板表面 PAC-1 和 CD62P 明显高于对照组,与既往报道一致,说明 ACS 患者体内存在血小板活化。DM 患者由于长期慢性高血糖,在糖基化终产物形成过程中氧自由基生成增多,损伤血小板和血管内皮,导致血小板活化。本研究结果显示 DM 合并 ACS 患者的血小板表面 PAC-1 和 CD62P 明显高于对照组,同时血小板表面 CD62P 明显高于 ACS 患者,说明 DM 患者体内更易发生血小板活化,增加了急性血栓事件如 ACS 发生的风险,提示血小板表面 PAC-1、CD62P 可能参与了 DM 患者血管并发症的发生。其机制可能为 DM 患者血小板活化时,一方面血小板 CD62P 随  $\alpha$  脱颗粒与血小板膜融合,并在血小板表面高度表达,介导炎症反应的早期过程,使活化的血小板与白细胞、内皮细胞发生聚集反应;另一方面 GPIIb/IIIa 分子全部表达于血小板表面,形成 PAC-1,与纤维蛋白原结合,促进血小板的黏附聚集,导致血栓形成,二者可能共同导致 DM 患者一系列并发症的发生。因此,针对 DM 患者应早期给予抗血小板治疗,而针对 DM 合并 ACS 患者应给予强化抗血小板治疗。

同型半胱氨酸是一种含硫氨基酸。有研究表明,Hcy 通过引起氧化应激反应,导致冠状动脉粥样硬化,形成不稳定斑块,引起血管内血栓形成,导致血栓性疾病的发生。另外有研究显示,Hcy 可以通过形成泡沫细胞,使泡沫细胞增加,脂肪核增大,增加斑块的易破裂性<sup>[13,14]</sup>。因此,血浆 Hcy 对预测粥样硬化斑块稳定性及易损性等方面有实用价值。

本研究结果显示:ACS 患者的血浆 Hcy 水平明显高于对照组,提示 Hcy 可能在 ACS 的发生中起了一定的作用。糖尿病患者的胰岛素抵抗可能影响

血浆 Hcy 的分解代谢,使体内 Hcy 水平升高。本研究结果显示 DM 合并 ACS 患者的血浆 Hcy 水平明显高于对照组,提示 Hcy 可能在 DM 及其血管并发症的发生、发展中发挥了重要作用。DM 患者体内的 Hcy 可能通过产生氧自由基引起氧化应激反应,促进动脉粥样硬化的发生,导致血栓形成,引起冠状动脉血管完全或不完全闭塞,促进 ACS 的发生发展。因此,降低 DM 患者血浆 Hcy 水平,可能有助于预防急性血管并发症的发生。

本研究中,血小板 PAC-1、CD62P 分别与血浆 Hcy 呈明显正相关( $r=0.441, P<0.05; r=0.408, P<0.05$ ),推测血小板活化、炎症反应与氧化应激可能相互促进,共同参与了 DM 患者血栓事件的发生。血小板表面 PAC-1、CD62P 的表达水平可能对糖尿病患者发生血栓事件具有重要的临床意义,对糖尿病患者未来风险预测具有一定的实用价值。

#### [参考文献]

- [1] Joseph R, Riddle JM, Welch KM, et al. Platelet ultra-structure and secretion in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 1989, 20(10): 1 316-319.
- [2] Uchiyama S, Takeuchi M, Osawa M, et al. Platelet function tests in thrombotic cerebrovascular disorders [J]. Stroke, 1983, 14(4): 511-517.
- [3] Zeller JA, Tschöpe D, Kessler C. Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia[J]. Thromb Haemost, 1999, 81(3): 373-377.
- [4] Iwamoto T, Kubo H, Takasaki M. Platelet activation in the cerebral circulation in different subtypes of ischemic stroke and Binswanger's disease [J]. Stroke, 1995, 26(1): 52-56.
- [5] Yamazaki M, Uchiyama S, Iwata M. Measurement of

platelet fibrinogen binding and P-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction [J]. Thromb Res, 2001, 104(3): 197-205.

- [6] Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, et al. Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients[J]. Thromb Haemost, 1995, 74(5): 1 329-334.
- [7] Tomer A. Platelet activation as a marker for in vivo pro-thrombotic activity: detection by flow cytometry[J]. J Biol Regul Homeost, 2004, 18(2): 172-177.
- [8] Li JM, Podolsky RS, Rohrer MJ, et al. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GP II b/III a[J]. J Surg Res, 1996, 61(2): 543-548.
- [9] Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, et al. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: A scientific statement from the Stroke Council of the American Stroke Association[J]. Stroke, 2003, 34(4): 1 056-083.
- [10] 廖驰林, 黄梦照, 刘华勇, 等. P-选择素的基因型及血清水平与急性心肌梗死的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(2): 151-154.
- [11] Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation [J]. Circ Res, 2001, 89(9): 763-771.
- [12] Yip HK, Sun CK, Chang LT, et al. Strong correlation between serum levels of inflammatory mediators and their distribution in infarct-related coronary artery[J]. Circ J, 2006, 70(7): 838-845.
- [13] Jialal I, Devaraj S. The role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis[J]. J Nutr, 1996, 126(4 Suppl): S1 053-057.
- [14] Itabe H. Oxidized low-density lipoproteins: what is understood and what remains to be clarified[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(1): 1-9.

(此文编辑 曾学清)