

人血浆组织激肽释放酶结合蛋白与冠状动脉病变程度相关性研究

刘 畅,姚玉宇*,马根山,傅 聪,李 冰,瞿洋洋,孙国鑫,李 爽,杨 群,阿衣其来克·木合达尔

(东南大学医学院心血管病研究所,东南大学附属中大医院心血管内科,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:分析组织激肽释放酶结合蛋白(kallistatin,KS)在冠心病患者血浆中水平的差异以及与 Gensini 评分的相关性,揭示血浆 KS 水平与冠状动脉病变严重程度的相关性。**方法:**选取 151 例行冠脉造影检查的患者作为研究对象,统计其临床数据及造影结果。①根据冠脉病变分支结果分成 4 组:正常对照组、单支病变组、双支病变组、三支病变组,应用 ELISA 法测定患者血浆中 KS 含量;②根据 Gensini 评分评估其冠脉病变程度,将患者分为 4 组:A 组(0 分)、B 组(>0~≤20 分)、C 组(>20~≤40 分)、D 组(>40~≤160 分),两两比较各组间患者血中 KS 含量的差异,并探究 KS 水平与 Gensini 评分间的相关性。**结果:**①根据冠脉病变分支结果分的 4 组中,血浆 KS 量分别为:对照组(95.35 ± 32.00) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、单支病变组(78.19 ± 25.27) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、双支病变组(66.19 ± 25.93) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、三支病变组(51.84 ± 23.26) $\mu\text{g}/\text{mL}$,各组间均具有统计学差异($P < 0.01$),KS 水平与冠脉病变支数呈负相关;②根据 Gensini 评分分的 A、B、C、D 4 组中,KS 含量分别为 (101.66 ± 36.50) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(77.73 ± 25.13) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(61.58 ± 23.06) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(53.80 ± 23.92) $\mu\text{g}/\text{mL}$,KS 含量在各组间的差异有统计学意义($P < 0.01$);③KS 含量与 Gensini 评分存在统计学上有显著的相关性($r = -0.371, P < 0.001$)。**结论:**冠心病患者血浆 KS 含量明显低于正常人群,且 KS 含量与 Gensini 评分存在显著的相关性。提示 KS 可能作为一个潜在的血管保护因子参与动脉粥样硬化性心脏病的发生发展过程。

[关键词] kallistatin;冠状动脉;粥样硬化;Gensini 评分

[中图分类号] R541.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)10-1208-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20161012

Relation of plasma tissue kallikrein binding protein levels to severity of coronary artery disease

Liu Chang, Yao Yuyu*, Ma Genshan, Fu Cong, Li Bing, Qu Yangyang, Sun Guoxin, Li Shuang, Yang Qun, Ayiqilaike Muhedaer

(Department of Cardiology, Institute of Cardiovascular, Medical School of Southeast University, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the differences of the levels of human tissue kallikrein(KS)-binding protein in plasma of coronary heart disease(CAD)patients, and evaluate the correlation between KS and the severity of coronary artery stenosis. **Methods:** A total of 151 patients with coronary angiography were enrolled in this study. Their clinical data and results of coronary angiography were collected. Plasma KS were measured by ELISA. Patients were stratified into four groups according to the results of coronary angiography (single coronary artery stenosis, double coronary artery stenosis, triple coronary artery stenosis and controls) and four groups according to Gensini score [A group(0), B group(>0~≤20), C group (>20~≤40), and D group (>40~≤160)] at the second step. KS levels were compared between different groups and correlation analysis was made between KS and Gensini score. **Results:** ① In the four groups which were stratified according to the results of coronary angiography, the levels of KS in control (95.35 ± 32) $\mu\text{g}/\text{mL}$ were significantly higher compared with single coronary artery stenosis (78.19 ± 25.27) $\mu\text{g}/\text{mL}$, double coronary artery stenosis (66.19 ± 25.93) $\mu\text{g}/\text{mL}$, and triple coronary artery stenosis (51.84 ± 23.26) $\mu\text{g}/\text{mL}$. There were statistically significant differences among the four groups ($P < 0.001$). ② In the four groups which were stratified according to Gensini score, the levels of KS were (101.66 ± 36.50) $\mu\text{g}/\text{mL}$, (77.73 ± 25.13) $\mu\text{g}/\text{mL}$, (61.58 ± 23.06) $\mu\text{g}/\text{mL}$, and (53.80 ± 23.92) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. There were statistically significant differences among the four groups ($P < 0.001$). ③ Furthermore, there was a significant negative correlation

[基金项目] 国家自然科学基金(81470401, 81271637)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yaoyuyun@hotmail.com

between plasma KS levels and the Gensini score($r=-0.371, P < 0.001$). **Conclusions:** The plasma KS levels were remarkable lower in the groups of CAD compared with controls. It indicates a novel role of KS in the progress of coronary atherosclerosis and the development of CAD.

[**Key words**] kallistatin; coronary artery; atherosclerosis; Gensini score

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(10): 1208-1212]

冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病, coronary artery disease, CAD)是一种常见多发的慢性病,且近年来随着人们生活水平的提高,冠心病的发病率明显上升,对人类健康造成严重危害。目前确诊冠心病的金标准是冠状动脉血管造影,为一项有创性检查,具有一定的风险性,且费用较高,而目前现有的与冠心病严重程度相关的生物学标志物,其特异性及敏感性不能令人满意,找寻新的相关标志物一直是学者们关注的热点。Gensini 评分是评估冠状动脉病变程度的一种有效方法,也是探究冠脉病变严重程度与生化指标相关性最常用的指标,已广泛应用于临床试验,冠状动脉病变越严重,Gensini 评分也就越高。

人组织激肽释放酶结合蛋白(kallistatin, KS)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂(SERPIN A4)。研究证实,KS 可发挥抗炎、抗氧化应激及抗血管生成等生物学作用,在脓毒症、高血压、肿瘤、糖尿病视网膜病变、缺血再灌注损伤、肝纤维化等疾病中有着重要作用^[1-6]。但是 KS 与冠心病严重程度相关性的研究尚无报道。

本文通过对 151 例冠心病患者血浆中 KS 含量的测定以及同冠脉狭窄严重程度的关系来探究 KS 与冠脉病变严重程度的相关性以及潜在的诊断和治疗价值。

1 对象和方法

1.1 对象

选取 2014 年 10 月至 2015 年 5 月期间,东南大学附属中大医院心内科已行冠状动脉造影检查的患者,排除急性冠脉综合征[ST 段抬高心肌梗死(ST-elevation myocardial infarction, STEMI)、非 ST 段抬高心肌梗死(non-ST-elevation myocardial infarction, NSTEMI)、不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UA)],确诊糖尿病、恶性肿瘤、急性慢性感染、急性脑血管疾病、自身免疫性疾病、急性心衰及严重肝肾功能不全患者,年龄 40~90 岁,且资料完备。共筛选出 151 例患者,其中男 77 例,年龄(63.61 ± 13.37)岁,女 74 例,年龄(65.47 ± 11.98)

岁;冠心病的诊断依据为冠脉造影检查结果,左前降支、左回旋支、右冠状动脉及其主要分支中至少有 1 支血管腔狭窄程度 $\geq 50\%$ 即诊断为冠心病^[7],而已行冠脉造影,符合纳入排除标准但不符合冠心病诊断标准的患者,设为对照组。其中,左前降支、左回旋支、右冠状动脉及二级分支中仅有 1 条血管符合血管腔狭窄程度 $\geq 50\%$ 为单支病变;2 支血管符合血管腔狭窄程度 $\geq 50\%$,或者单纯左主干血管腔狭窄程度 $\geq 50\%$,为双支病变;3 支血管符合血管腔狭窄程度 $\geq 50\%$,以及存在左主干与右冠状动脉血管腔狭窄程度均 $\geq 50\%$,为三支病变。151 例患者中正常对照组 41 例,单支病变组 46 例,双支病变组 41 例,三支病变组 23 例。

1.2 方法

1.2.1 一般资料统计

详细统计患者性别、年龄、合并症、冠脉造影结果、冠脉介入治疗及支架植入情况、用药情况、血常规、血生化、凝血功能、肌钙蛋白、脑钠素(BNP)等主要指标。

1.2.2 Gensini 评分

根据 Gensini 制定的方法^[8],通过冠状动脉造影结果,对冠状动脉病变狭窄程度进行评分,将冠脉分为 8 个主要节段,每节段中最重的狭窄病变计入评分系统,并对其中病变的冠脉血管狭窄程度进行定量评分:无明显病变为 0 分,狭窄在 1%~25%记为 1 分,狭窄在 26%~50%记为 2 分,狭窄在 51%~75%记为 4 分,狭窄在 76%~90%记为 8 分,狭窄在 91%~99%记为 16 分,完全闭塞记为 32 分,Gensini 评分最高为 160 分。根据 Gensini 评分将患者分为 4 组:A 组(0 分)、B 组($>0 \sim \leq 20$ 分)、C 组($>20 \sim \leq 40$ 分)、D 组($>40 \sim \leq 160$ 分)。

1.2.3 应用 ELISA 测定 KS 含量

选择 96 孔酶标板,用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 HTK IgG (PBS 液稀释)100 μL /孔包被,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 12 h(过夜);每孔加入 200 μL 1%牛血清白蛋白(BSA, PBS 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h;PBST 冲洗 3 次;将待测样品稀释 16 000 倍,每孔加入 100 μL 标准品(0.4~25 ng/mL)及待测样品;37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h;PBST 冲洗 3 次;每孔

加 100 μL , 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素-HTK IgG (稀释液稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBST 冲洗 3 次; 每孔加入 100 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AV-P (稀释液稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min; PBST 冲洗 5 次; PBS 冲洗 1 次; 显色液显色, 分光光度计测定吸光度 (SOFT max OD405); 做标准曲线, 计算待测标本 KS 浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行数据统计。对一般资料进行正态性检验, 符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著差法; 因素间

相关分析采用线性相关回归分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料统计

根据冠脉病变分支结果分组的 4 组间比较, 胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇及尿酸间差异有统计学意义; 年龄、甘油三酯、肌酐、尿素氮、天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、胆红素、中性粒细胞数间差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 不同冠脉病变的 4 组间一般资料比较

观察指标	正常对照组 (n=41)	单支病变组 (n=46)	双支病变组 (n=41)	三支病变组 (n=23)	P 值
年龄(岁)	59.63 \pm 12.21	65.67 \pm 13.76	66.34 \pm 10.79	71.04 \pm 11.36	> 0.05
中性粒细胞数($\times 10^9$ 个)	4.29 \pm 1.71	4.60 \pm 1.76	4.62 \pm 1.90	7.12 \pm 2.50	> 0.05
胆固醇(mmol/L)	3.13 \pm 1.65	4.13 \pm 1.62	4.47 \pm 0.98	5.05 \pm 0.77	< 0.01
甘油三酯(mmol/L)	1.59 \pm 0.68	1.55 \pm 0.88	1.65 \pm 1.03	1.58 \pm 1.11	> 0.05
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	2.06 \pm 1.02	2.55 \pm 0.99	2.70 \pm 0.78	3.00 \pm 0.67	< 0.01
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.30 \pm 0.39	1.20 \pm 0.16	1.19 \pm 0.22	0.94 \pm 0.18	< 0.01
肌酐($\mu\text{mol}/\text{L}$)	89.62 \pm 15.95	98.71 \pm 25.37	82.96 \pm 46.12	73.18 \pm 34.67	> 0.05
尿素氮(mmol/L)	5.29 \pm 1.23	5.60 \pm 1.97	7.95 \pm 6.69	9.45 \pm 7.34	> 0.05
天门冬氨酸氨基转移酶(U/L)	20.00 \pm 5.82	20.21 \pm 12.61	20.91 \pm 15.74	15.00 \pm 8.26	> 0.05
丙氨酸氨基转移酶(U/L)	20.04 \pm 10.58	27.05 \pm 27.4	20.28 \pm 9.21	15.91 \pm 8.06	> 0.05
总胆红素($\mu\text{mol}/\text{L}$)	13.04 \pm 5.67	13.81 \pm 6.25	12.27 \pm 5.07	13.59 \pm 7.12	> 0.05
直接胆红素($\mu\text{mol}/\text{L}$)	2.95 \pm 2.27	3.32 \pm 1.97	3.08 \pm 1.59	3.67 \pm 1.91	> 0.05
尿酸(mmol/L)	342.60 \pm 99.22	318.60 \pm 81.71	342.80 \pm 109.30	406.5 \pm 125.30	< 0.05

2.2 根据冠脉病变分组的各组 KS 含量

对照组、单支病变组、双支病变组及三支病变组 KS 的水平分别为 (95.35 \pm 32.00) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(78.19 \pm 25.27) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(66.19 \pm 25.93) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(51.84 \pm 23.26) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 组间差异显著 ($P < 0.01$)。KS 随病变支数的增加而呈现降低的趋势 (图 1)。

2.3 根据 Gensini 评分分组的各组 KS 含量

根据 Gensini 评分分组的 A、B、C、D 4 组中, KS 含量分别为 (101.66 \pm 36.50) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(77.73 \pm 25.13) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(61.58 \pm 23.06) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、(53.80 \pm 23.92) $\mu\text{g}/\text{mL}$, KS 含量在各组间的差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且呈现 KS 含量随 Gensini 评分的增加而减少的趋势 (图 2)。

2.4 KS 水平与 Gensini 评分的相关性

在所有样本中, 排除 Gensini 评分为 0 的样本后, 以 KS 水平 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 以绘制 Gensini 评分为纵坐标绘制点状图 (图 3), 采用相关分析, KS 水

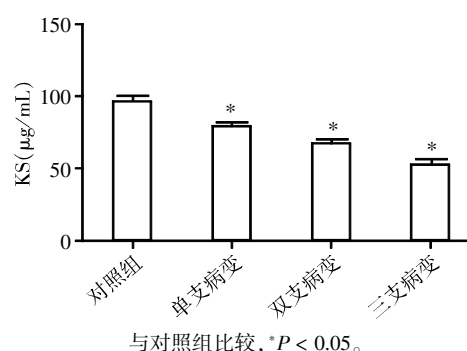
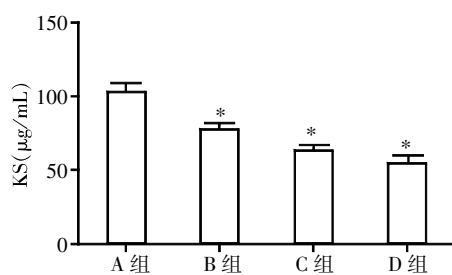


图 1 不同冠脉病变分支情况的 4 组间 KS 含量比较

Figure 1 Comparison of contents of KS in the different four groups

平与 Gensini 评分存在统计学上有显著负相关性 ($r = -0.371, P < 0.001$); 且 KS 水平与 Gensini 评分存在线性回归关系 ($B = -77.402, P < 0.001$)。KS 诊断冠心病的 ROC 曲线, KS 的含量为 79.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 具有最高的诊断特异性和敏感性 (图 4)。



与 A 组(对照组)比较,* $P < 0.05$ 。

图 2 根据 Gensini 评分分组的各组间 KS 含量比较

Figure 2 Comparison of contents of KS in the different four groups (according to Gensini score)

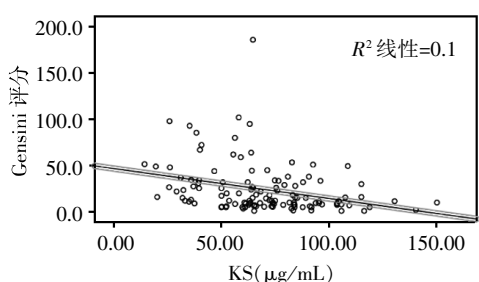


图 3 Gensini 评分和 KS 含量的散点分布图

Figure 3 Scatter diagram of Gensini score and KS

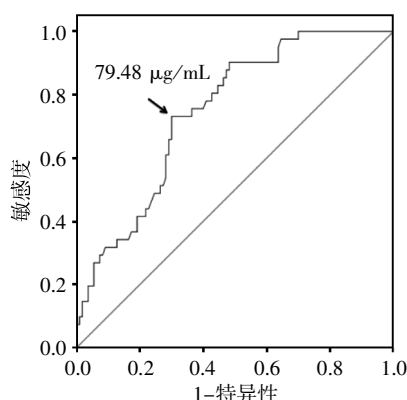


图 4 KS 诊断心脏病的 ROC 曲线

Figure 4 ROC curve analysis for the predictive value of KS for CAD

3 讨论

KS 最初是以组织激肽释放酶结合蛋白的形式,首次被 Chao 等^[9]从人血浆及人肺成纤维细胞(wi-38)和嗜齿类神经胶质瘤细胞(NG-108)的无血浆培养基中分离出来。KS 蛋白二级结构中有 2 个重要的功能区:中心反应环和肝素结合结构域。KS 通过中央反应环,与组织型激肽释放酶(TK)结合,参与血压调节及内皮细胞增殖^[10],还可以通过其肝素结构域在人体内发挥多种生物学作用。KS 可以与血管内皮细胞表面的肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 竞争性结合,从而阻断肿

瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的 NF- κ B 及 p38MARK 的激活,通过抑制 TNF- α 诱导的细胞凋亡信号通路,发挥抗炎及抑制内皮细胞凋亡的作用^[11];KS 还可以通过参与多条细胞通路的调控,增加内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性,可以发挥其抗氧化应激作用^[2],以及通过提高 NO 及血管内皮生长因子水平防止血管损伤,提高内皮祖细胞的血管生成能力^[12]。这些生物学功能都提示了 KS 具有潜在的冠状动脉粥样硬化及血管损伤修复的作用。KS 是 Serpin 家族的一员 (Serpin A4), 同样作为丝氨酸抑制剂的 Serp-1,已有相关二期临床实验表明^[13]可能通过减少炎症细胞浸润,降低急性冠脉综合症及经皮冠脉支架置入术后患者的血管损伤指标 (肌钙蛋白 I 及 CK-MB),改善患者预后。

血浆 KS 的水平在多种疾病中都被证实有明显的差异性,在肿瘤^[3]、社区获得性肺炎合并脓毒血症^[14]、高血压^[12]的患者中,KS 的水平是明显降低的;已有研究证实,餐后 2 h 血糖,糖基化血红蛋白与 Gensini 评分存在正相关关系^[15],而在 1 型糖尿病合并血管并发症的患者中,KS 的水平反而是升高的^[16],但是并没有明确的实验可以说明在 1 型糖尿病合并血管并发症的患者中 KS 水平升高的原因,研究者推测可能为高糖可导致炎症反应加重、内皮功能降低和血管生成紊乱,而这些都会反应性地增加 KS 的释放,代偿性地对抗 1 型糖尿病中的血管生成以及炎症反应^[16],但这样的推测并不能很好地解释为什么在合并血管并发症的 1 型糖尿病患者中 KS 较对照组及 1 型糖尿病不合并血管并发症的患者反而是增加的。由于急性冠脉综合症(ACS)患者中,不稳定斑块的形成和破裂都伴有复杂的炎症反应过程,但目前尚无文献报道 ACS 对于 KS 水平影响的实验研究,ACS 的患者并没有被纳入本次实验的研究对象。本实验通过回顾性研究也证实了,在冠心病患者血浆中 KS 的水平明显较正常对照组人群明显下降,且与冠脉病变的弥散性及严重程度密切相关;将 KS 作为冠心病诊断指标的 ROC 曲线中,曲线下面积 (AUC)=0.75,KS 的含量为 79.48 μ g/mL 时,具有最高的诊断特异性和敏感性。提示 KS 作为生物学标记物,对冠脉病变严重程度的诊断具有较好的敏感性与特异性。

动脉壁内皮损伤及脂质的沉积是目前公认的动脉粥样硬化的始动因素。而动脉壁内皮损伤中,炎症及氧化应激作为内皮损伤的因素,一直是近年来研究的热点。KS 与冠脉病变严重性呈负相关,揭

示了其可能存在抗冠状动脉粥样硬化的作用,其最主要的机制推测是KS通过自身肝素结构域,抑制TNF- α -NF- κ B通路,抑制炎症因子TNF- α 的表达,同时能抑制TNF- α 诱导的I κ B磷酸化以及下游血管细胞黏附分子、细胞间黏附因子和单核细胞趋化蛋白1的表达,从而防止血管内皮损伤,抑制动脉粥样硬化的起始过程^[11-12]。但是人为地提高或下调KS的表达水平会对冠状动脉粥样硬化的发展和结局有何种影响,通过什么样的机制起到怎样的作用,目前尚不明确,需要更多的实验研究进一步论证和说明。

[参考文献]

- [1] Li P, Bledsoe G, Yang ZR, et al. Human kallistatin administration reduces organ injury and improves survival in a mouse model of polymicrobial sepsis[J]. *Immunology*, 2014, 142(2):216-226
- [2] Shen B, Hagiwara M, Yao YY, et al. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress[J]. *Hypertension*, 2008, 51(5):1358-1365
- [3] Yao Y, Li L, Huang X, et al. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway[J]. *FEBS J*, 2013, 280(14):3244-3255
- [4] Zhao L, Patel SH, Pei J, et al. Antagonizing Wnt pathway in diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2013, 62(12):3993-3995
- [5] 张靖岩, 张峰, 佟立权, 等. Kallistatin对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护及机制研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2013, 16(3):173-177
- [6] Cheng Z, Lv Y, Pang S, et al. Kallistatin, a new and reliable biomarker for the diagnosis of liver cirrhosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(3):194-200
- [7] Austen WG, Edwards JE, Frye RL, et al. A reporting system on patients evaluated for coronary artery disease: I Report of the Ad Hoc Committee for Grading of Coronary Artery Disease, Council on Cardiovascular Surgery, American Heart Association [J]. *Circulation*, 1975, 51(4):5-40
- [8] Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary of coronary heart disease (letter)[J]. *Am J Cardio*, 1983, 51(3):606
- [9] Chao J, Tillman DM, Wang MY, et al. Identification of a new tissue kallikrein-binding protein [J]. *Biochem J*, 1986, 239(2):325-331
- [10] Zhan LJ, Qing GZ. Advances in the biological effects and mechanism of kallistatin [J]. *J Clin Pathol Res*, 2015, 35(2):319-323
- [11] Yin H, Gao L, Shen B, et al. Kallistatin inhibits vascular inflammation by antagonizing tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor kappaB activation [J]. *Hypertension*, 2010, 56(2):260-267
- [12] Gao L, Li P, Zhang J, et al. Novel role of kallistatin in vascular repair by promoting mobility, viability, and function of endothelial progenitor cells [J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(5):e001194
- [13] Tardif JC, L'allier PL, Grégoire J, et al. A randomized controlled, phase 2 trial of the viral serpin Serp-1 in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010, 3(6):543-548
- [14] Lin WC, Lu SL, Lin CF, et al. Plasma kallistatin levels in patients with severe community-acquired pneumonia[J]. *Crit Care*, 2013, 17(1):R27
- [15] 郭纪群, 葛均波. 常用血糖监测指标与冠状动脉粥样硬化程度的相关性研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(2):201-203
- [16] El-Asrar MA, Andrawes NG, Ismail EA. Kallistatin as a marker of microvascular complications in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: Relation to carotid intima media thickness [J]. *Vasc Med*, 2015, 20(6):509-517

[收稿日期] 2016-04-20