

脑梗死患者血小板 N - 甲基 - D - 天冬氨酸受体表达与阿司匹林抵抗的相关性研究

冯勋刚, 郑俊萍, 董海新, 杨君

【摘要】 目的 探讨脑梗死患者血小板 N - 甲基 - D - 天冬氨酸 (NMDA) 受体表达与阿司匹林抵抗 (AR) 的相关性。方法 选择 2011 年 8 月—2013 年 7 月在我院神经内科住院的脑梗死患者 45 例为脑梗死组, 同期在我院体检中心体检健康者 40 例为对照组。脑梗死患者确诊后即开始规律服用阿司匹林 (100 mg/d), 检测两组受检者 NMDA 受体表达水平和血小板聚集率。结果 对照组受检者 NMDA 受体相对表达量为 (0.11 ± 0.07), 低于脑梗死组 - 治疗前患者的 (0.32 ± 0.12) ($P < 0.001$), 脑梗死组 - 治疗前患者 NMDA 受体相对表达量低于脑梗死组 - 治疗后患者的 (0.69 ± 0.15) ($P < 0.001$)。对照组受检者血小板聚集率为 (32.38 ± 11.38)%, 脑梗死组 - 治疗后患者为 (43.81 ± 14.40)%, 均低于脑梗死组 - 治疗前患者的 (57.00 ± 18.96)%。Spearman 相关分析结果显示, 对照组受检者、脑梗死组 - 治疗前患者、脑梗死组 - 治疗后患者血小板 NMDA 受体相对表达量与血小板聚集率均无直线相关性 ($P > 0.05$)。结论 脑梗死患者血小板 NMDA 受体表达水平升高, 阿司匹林可上调脑梗死患者血小板 NMDA 受体的表达, NMDA 受体表达增加可能是脑梗死患者发生 AR 的重要原因。

【关键词】 脑梗死; 阿司匹林; 抗药性; 受体, N - 甲基 - D - 天冬氨酸

【中图分类号】 R 743.33 **【文献标识码】** A doi: 10.3969/j.issn.1008-5971.2014.09.006

Correlation between Expression of N - Methyl - D - Aspartate Receptor of Platelets and Aspirin Resistance in Patients with Cerebral Infarction FENG Xun-gang, ZHENG Jun-ping, DONG Hai-xin, et al. The Affiliated Hospital of Jining Medical College, Jining 272000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the correlation between expression of N - Methyl - D - aspartate (NMDA) receptor of platelets and aspirin resistance in patients with cerebral infarction. **Methods** From August 2011 to July 2013, a total of 45 patients with cerebral infarction admitted to Department of Neurology of our hospital were selected as case group, while 40 healthy cases in our hospital were selected as control group. Case group given aspirin (100 mg per day) after diagnosed. Expression of NMDA receptor and rate of platelet aggregation of the two groups were detected. **Results** The relative expression of NMDA receptor of control group was (0.11 ± 0.07), was lower than that of case group of (0.32 ± 0.12) ($P < 0.001$) before treatment, while that of case group before treatment was lower than that of case group of (0.69 ± 0.15) ($P < 0.001$) after treatment. The rate of platelet aggregation of control group was (32.38 ± 11.38)%, that of case group after treatment was (43.81 ± 14.40)%, were both lower than that of case group of (57.00 ± 18.96)% before treatment. Spearman correlation analysis showed that, the relative expression of NMDA receptor of control group, of case group before or after treatment was not correlated with the rate of platelet aggregation ($P > 0.05$). **Conclusion** The expression of NMDA receptor of platelets in patients with cerebral infarction is higher, aspirin can up-regulated its expression, and increasing of NMDA receptor may play an important role in aspirin resistance.

【Key words】 Brain infarction; Aspirin; Drug resistance; Receptors, N - methyl - D - aspartate

脑梗死是神经内科常见病和多发病, 阿司匹林可抑制血小板聚集、减少脑梗死的复发^[1], 但部分规律服用治疗剂量阿司匹林的脑梗死患者仍出现复发, 这种现象称为阿司匹林抵抗 (AR)。目前, AR 的确切发生机制尚不清楚, 阐明其发生机制并制定相应的治疗策略对于脑梗死的防治具有重要意义。

N - 甲基 - D - 天冬氨酸 (NMDA) 受体是离子型谷氨酸

受体的 1 个亚型, 主要分布于中枢神经系统神经元突触后膜, 具有调节神经元轴突发育、突触可塑性等作用。研究表明, 人血小板亦表达 NMDA 受体^[2]; Jamieson 等^[3]采用放射标记法进行研究发现, 血小板具有富集 MK - 801 (1 种合成的 NMDA 受体配体) 的能力; NMDA 受体可使血小板活化并增强其聚集能力^[4]。但目前国内外关于 NMDA 受体与 AR 间的关系报道较为少见, 本研究旨在探讨脑梗死患者 NMDA 受体表达与 AR 的相关性, 为临床提供参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2011年8月—2013年7月在我院神经内科住院的脑梗死患者45例为脑梗死组，均为首次发病且经颅脑MRI检查证实，符合1995年第四届脑血管病会议制定的脑梗死诊断标准；选择同期在我院体检中心体检健康者40例为对照组。两组受检者在入组前2个月内均未使用以下可影响血小板聚集的药物：阿司匹林等抗血小板药物、抗组胺药、非甾体类抗炎药等。脑梗死组中男23例、女22例，平均年龄为(51.8 ± 9.8)岁；对照组中男、女各20例，平均年龄为(50.9 ± 10.1)岁。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 脑梗死患者确诊后即开始规律服用阿司匹林(100 mg/d)，治疗期间避免应用阿司匹林以外的其他可能影响血小板聚集的药物。

1.2.2 标本采集 脑梗死组患者在治疗前及治疗30 d后采集空腹外周静脉血10 ml，对照组受检者常规采血。采用枸橼酸钠抗凝，800 × g离心5 min，收集上层淡黄色液体层，即富含血小板的血浆(PRP)，标本采集过程中动作应轻柔，避免剧烈震荡。取2/3 PRP分离血小板，剩余PRP用于测定血小板聚集率。血小板分离步骤：加入等体积HEP缓冲液(140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3.8 mM HEPES, 5 mM EGTA, pH 7.4)和前列腺素E1(终浓度1 μM)，轻轻混匀后100 × g室温下离心20 min，之后将上清液转移到干净离心管内，800 × g离心15 min后弃去上清，所得沉淀团块即为血小板。

1.3 NMDA受体表达水平 采用蛋白印迹法(Western blot)检测NMDA受体表达水平：采用RIPA裂解液(碧云天生物技术研究所提供)提取血小板总蛋白，BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术研究所提供)检测NMDA受体表达水平，以相对表达量表示；检测步骤：取等量样品电泳、转膜、封闭，依次加入山羊抗人NR3A(NMDAR亚基)一抗(1:200,美国Santa Cruz生产)和HRP标记兔抗山羊二抗(1:8 000,武汉博士德生物公司提供)，以ECL发光试剂盒(美国Pierce公司生产)显色。

1.4 血小板聚集率 所有标本在采集后2 h内完成血小板聚集率测定：取制备好的PRP，600 × g离心10 min得到乏血小板血浆(PPP)，以二磷酸腺苷(ADP)为诱导剂，采用美国Helena公司PACKS-4血小板聚集仪测定血小板聚集率^[5]。血小板聚集率参考范围：23.9%~45.9%。

1.5 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理和分析，计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，采用t检验；NMDA受体相对表达量与血小板聚集率间的相关性采用Spearman相关分析；以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NMDA受体表达水平 对照组受检者NMDA受体相对表达量为(0.11 ± 0.07)，低于脑梗死组-治疗前患者的(0.32 ± 0.12)，脑梗死组-治疗前患者NMDA受体相对表达量低于脑梗死组-治疗后患者的(0.69 ± 0.15)，差异均有统计学意义(P < 0.001，见图1)。

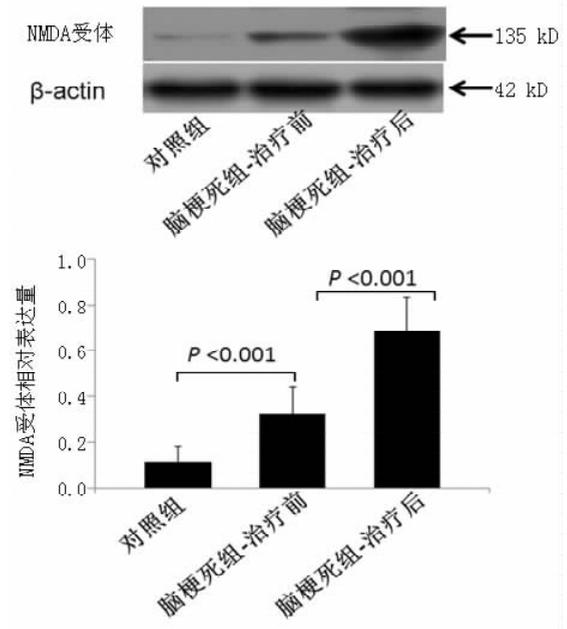


图1 两组受检者血小板NMDA受体表达水平比较

Figure 1 Comparison of NMDA receptor expression levels of blood platelet between the two groups

2.2 血小板聚集率 对照组受检者血小板聚集率为(32.38 ± 11.38)%，脑梗死组-治疗后患者为(43.81 ± 14.40)%，均低于脑梗死组-治疗前患者的(57.00 ± 18.96)%，差异有统计学意义(P < 0.05)。

2.3 相关性分析 Spearman相关分析结果显示，对照组受检者、脑梗死组-治疗前患者、脑梗死组-治疗后患者血小板NMDA受体相对表达量与血小板聚集率均无直线相关性(P > 0.05，见图2)。

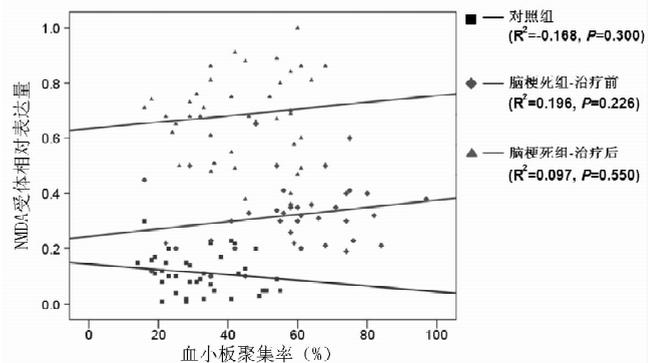


图2 两组受检者血小板NMDA受体表达水平与血小板聚集率的相关性分析

Figure 2 Correlation analysis between NMDA receptor expression levels of blood platelet and platelet aggregation rate of the two groups

3 讨论

血小板黏附、聚集能力增强及释放增加是脑动脉粥样硬化和血栓形成的关键环节，也是脑梗死的发病基础^[6-7]。阿司匹林为临床最为常用的抗血小板聚集药物，在脑梗死的防治中发挥着不可替代的作用。阿司匹林主要通过抑制环氧酶、减少血栓素A₂合成而达到抗血小板聚集的目的，但8%~45%的脑梗死患者存在AR，不能有效地抑制血小板聚集和血栓素形

成^[8]，且增加阿司匹林用量也不能消除 AR，目前 AR 的具体发生机制尚不明确。

既往针对 NMDA 受体的研究多集中于中枢神经系统疾病，如癫痫、认知功能障碍等。2012 年，Senol 等^[9]研究发现，阿司匹林可通过诱导脂质过氧化而上调大鼠海马区 NMDA 受体的表达，进而产生兴奋性损害，提示阿司匹林与 NMDA 受体之间存在相互作用。Kalev - Zylinska 等^[4]最新研究表明，NMDA 受体可在血小板表达，并与血小板的活化和聚集密切相关。本研究结果显示，对照组受检者 NMDA 受体相对表达量低于脑梗死组 - 治疗前患者，而脑梗死组 - 治疗前患者 NMDA 受体相对表达量低于脑梗死组 - 治疗后患者，表明脑梗死患者血小板 NMDA 受体表达水平升高，阿司匹林可上调脑梗死患者血小板 NMDA 受体的表达，因 NMDA 受体可增强血小板活化和聚集，因此推测 NMDA 受体表达增加可能是脑梗死患者发生 AR 的重要原因。但本研究进行的 Spearman 相关分析结果显示，对照组受检者、脑梗死组 - 治疗前患者、脑梗死组 - 治疗后患者血小板 NMDA 受体相对表达量与血小板聚集率均无直线相关性，可能与样本量较小、诱导剂不同有关^[10]，因此，NMDA 受体表达与 AR 间的具体作用机制仍需扩大样本量进一步深入研究，以为临床更有效地应用阿司匹林防治心脑血管疾病提供参考。

参考文献

- Norris JW. Antiplatelet agents in secondary prevention of stroke: a perspective [J]. Stroke, 2005, 36 (9): 2034 - 2036.
- Hitchcock IS, Skerry TM, Howard MR, et al. NMDA receptor - mediated regulation of human megakaryocytopoiesis [J]. Blood, 2003, 102 (4): 1254 - 1259.
- Jamieson GA, Agrawal AK, Greco NJ, et al. Phencyclidine binds to blood platelets with high affinity and specifically inhibits their activation by adrenaline [J]. Biochem J, 1992, 285 (Pt 1): 35 - 39.
- Kalev - Zylinska ML, Green TN, Morel - Kopp MC, et al. N - methyl - D - aspartate receptors amplify activation and aggregation of human platelets [J]. Thromb Res, 2014, 133 (5): 837 - 847.
- 王志义, 张银虎, 阎梅田, 等. 比浊法测定血小板聚集性及其影响因素——117 例正常值报告 [J]. 陕西医学杂志, 1986, 15 (4): 26 - 28.
- 刘斌, 靳振明. 血小板参数与脑梗死患者颈动脉狭窄的相关性研究 [J]. 中国全科医学, 2013, 16 (4): 1386 - 1387, 1390.
- 应萍. 阿司匹林在心脑血管疾病中的应用进展 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2012, 20 (3): 391.
- Chen WH, Cheng X, Lee PY, et al. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease [J]. Am J Med, 2007, 120 (7): 631 - 635.
- Senol N, Ceyhan BM, Ersoy IH, et al. Aspirin increases NMDA receptor subunit 2A concentrations in rat hippocampus [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2012, 32 (1): 17 - 21.
- 石红婷, 周伯荣, 王融, 等. 比浊法血小板聚集试验的影响因素研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33 (7): 774 - 776.

(收稿日期: 2014 - 06 - 10)

· 医讯采撷 ·

2014 卒中领域热点研究中盘点

在 2014 天坛国际脑血管病会议缺血性卒中二级预防论坛上，大会执行主席、北京天坛医院王拥军教授对 2014 年上半年卒中领域的热点研究进行了盘点和解读。对降压、抗栓、再灌注及尿酸治疗领域 4 个方面的 8 项研究做了梳理，简单概述如下。

1 降压治疗

- ★ CATIS 随机试验：立即降压对急性缺血性卒中患者死亡和严重致残的影响
- ★ INTERACT 2 随机对照试验血压变异性亚组分析：血压变异性与急性脑出血的预后

2 抗栓治疗

- ★ 对于卒中伴主动脉弓斑块是抗血小板还是抗凝（氯吡格雷 + 阿司匹林对比华法林）
- ★ 随机对照试验的荟萃分析：心房颤患者新型口服抗凝药和华法林的疗效和安全性比较

3 再灌注治疗

- ★ 临床实践中重组组织型纤溶酶原激活物（rtPA）治疗时间和卒中预后：医院质量改进数据的回顾性分析
- ★ 在质量改进项目前后急性缺血性卒中患者 rtPA 治疗的 DNT
- ★ 急性缺血性卒中救护车上实时溶栓的效果

4 尿酸治疗

- ★ URICO - ICTUS 试验：急性卒中患者尿酸治疗的安全性和疗效 - - 随机双盲 2b/3 期临床试验