

利伐沙班对非瓣膜心房颤动患者 血小板及微粒促凝活性的影响*

汤凤英¹ 薛鹏程¹ 祖磊¹ 竟雪莹¹

[摘要] 目的:研究利伐沙班对非瓣膜心房颤动(NVAF)患者体内血小板及微粒(MPs)促凝活性的影响。方法:选取2016-10-2019-05期间在我院治疗的NVAF患者(口服利伐沙班进行抗凝治疗)47例作为NVAF组;另选取同期在我院门诊进行体检的健康志愿者45例作为对照组。比较各组的血常规指标、磷脂酰丝氨酸(PS)阳性的血小板、MPs水平,并采用凝血实验和纤维蛋白生成实验分析血小板及MPs的促凝活性的变化。结果:NVAF组治疗前的凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)短于对照组,D-D聚体水平高于对照组($P<0.05$),NVAF组治疗后的PT、APTT延长,D-D聚体水平降低($P<0.05$),NVAF组治疗后PT、APTT仍短于对照组,D-D聚体水平仍高于对照组($P<0.05$)。NVAF组治疗前PS⁺血小板、总MPs及血小板释放的微粒(PMPs)水平高于对照组($P<0.05$),NVAF组治疗后PS⁺血小板水平、总MPs水平及PMPs水平降低,但仍高于对照组($P<0.05$)。NVAF组患者在治疗前血小板及MPs促凝血时间短于对照组($P<0.05$),NVAF组治疗后的血小板及MPs促凝血时间明显延长,但仍短于对照组($P<0.05$)。NVAF组患者在治疗前血小板及MPs促纤维蛋白生成能力高于对照组($P<0.05$);NVAF组治疗后血小板及MPs促纤维蛋白生成能力明显降低,但仍高于对照组($P<0.05$)。结论:利伐沙班降低了NVAF患者体内血小板及MPs促凝活性。

[关键词] 非瓣膜性心房颤动;利伐沙班;血小板;微粒;磷脂酰丝氨酸;促凝活性

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2020.01.013

[中图分类号] R541.7 **[文献标志码]** A

Effect of rivaroxaban on procoagulant activity of platelets and microparticles in patients with non-valvular atrial fibrillation

TANG Fengying XUE Pengcheng ZU Lei JING Xueying

(Department of Cardiology, The Third People's Hospital of Bengbu, Bengbu, Anhui, 233000, China)

Corresponding author: TANG Fengying, E-mail: tfy19731101@163.com

Abstract Objective: To study the effect of rivaroxaban on procoagulant activity of platelets and microparticles (MPs) in patients with non-valvular atrial fibrillation (NVAF). **Method:** The 47 patients with NVAF (taking rivaroxaban orally for anticoagulation therapy) who were treated from October 2016 to May 2019 were selected as NVAF group. Another 45 healthy volunteers who underwent physical examination during the same period were selected as the control group. The blood routine indexes, phosphatidylserine (PS) positive platelets, the level of MPs in each group were compared. Coagulation test and fibrinogenesis test were used to analyze the changes of procoagulant activity of platelets and MPs. **Result:** The prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) in NVAF group before treatment were shorter than those of control group, and the level of D-D polymer was higher than that of control group ($P<0.05$). PT and APTT were prolonged and the level of D-D polymer was decreased in NVAF group after treatment ($P<0.05$). PT and APTT in NVAF group after treatment were still shorter than those in control group, and the level of D-D polymer was still higher than that in control group ($P<0.05$). The levels of PS⁺ platelets, total MPs and platelet-released particles (PMPs) in NVAF group before treatment were higher than those in control group ($P<0.05$). The levels of PS⁺ platelet, total MPs and PMPs in NVAF group after treatment were decreased, but they were still higher than those in control group ($P<0.05$). The time of platelet and MPs procoagulation in NVAF group before treatment was shorter than that in control group ($P<0.05$). The time of platelet and MPs procoagulation in NVAF group after treatment was significantly prolonged, but it was still shorter than that in control group ($P<0.05$). The fibrinogenesis of platelets and MPs in NVAF group before treatment was higher than that in control group ($P<0.05$). The fibrinogenesis of platelets and MPs in NVAF group after treatment was significantly decreased, but it was still higher than that in control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Rivaroxaban can reduce the procoagulant activity of platelets and MPs in patients with NVAF.

Key words non-valvular atrial fibrillation; rivaroxaban; platelet; microparticles; phosphatidylserine; procoagulant activity

* 基金项目:安徽省卫生计生委科研计划项目(No:2016QH023)

¹蚌埠市第三人民医院心血管内科(安徽蚌埠,233000)

通信作者:汤凤英, E-mail: tfy19731101@163.com

心房颤动(房颤)能够明显增加血栓事件的发生,患者缺血性脑卒中的发生率是非房颤患者的4~5倍,此外患者体循环动脉栓塞以及心肌梗死发生风险亦较高^[1-2]。房颤患者血栓形成的机制是多方面的,包括内皮细胞损伤、血流异常和高凝状态的形成^[3]。磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)是一种位于细胞内膜带有阴离子电荷的磷脂,当细胞激活或凋亡时,则会外翻到细胞膜表面,与血浆中的凝血因子接触^[4]。在PS外翻的过程中,由于细胞膜表面的磷脂平衡被打破,会释放出一些 $<1\ \mu\text{m}$ 的磷脂囊泡,我们称之为微粒(microparticles, MPs),这些释放的MPs中也含有大量外翻的PS^[5-6]。这些外翻PS能够与FV和FVIII结合,为凝血Xa、IIa的形成提供结合位点,促进凝血的发生^[7]。最近研究显示房颤患者高凝状态的形成与血小板的激活及其释放的MPs水平增加有关,激活的血小板及升高的MPs水平使凝血时间缩短、纤维蛋白生成增加^[8]。

利伐沙班是一种新型口服抗凝药,其可有效的抑制IIa的生成,降低房颤患者血栓事件的发生^[9]。然而,利伐沙班是否可以降低血小板及其释放MPs的促凝活性尚不清楚。因此,本研究主要是分析利伐沙班能否降低非瓣膜性房颤(nonvalvular atrial fibrillation, NVAF)患者体内血小板及其释放MPs的促凝活性。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2016-10—2019-05期间在我院治疗的NVAF患者47例作为NVAF组,其中持续性房颤15例,永久性房颤32例。另选取同期在我院门诊体检的健康志愿者45例作为对照组。本研究经本院医学伦理委员会批准。

纳入标准:①所有患者均符合《2016欧洲房颤管理指南》^[10]中的相关诊断标准,并口服利伐沙班进行抗凝治疗;②用药依从性好,可按医嘱进行用药;③临床资料完整;④患者及其家属对本次研究知情同意。

排除标准:①瓣膜性心肌病;②有卒中病史、冠心病及心力衰竭(心衰)病史、血栓形成史;③近3个月内手术史;④合并有严重肝肾功能紊乱;⑤合并有免疫性疾病及恶性肿瘤;⑥服用其他抗凝药物及抗血小板药物。

1.2 实验仪器

流式细胞仪(FACS Areal, 美国BD公司)、全波长酶标仪(PowerWave XS, 美国BIO-TEK公司)、血凝仪(TS4000, 天津美德太平洋科技公司)、低温离心机(Z 400K, 德国HERMLE公司)、96孔板(Becton Dickinson)、微量加样器(Eppendorf)。

1.3 主要溶剂及配制

主要溶剂:FITC-膜联蛋白V、Alexa fluor 647-CD41a、Alexa fluor 488-CD31。主要配制溶液:Tyrode's buffer:1 L液体中包含Hepes 3.575 g, NaH_2PO_4 0.59 g, NaCl 8.065 g, KCl 0.2 g, MgCl_2 0.42 g, 5% Glucose 1.09 g, BSA 2 g, PH 7.35~7.45; 1:9(v/v) 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 1200 rpm, 5 min离心后取上清,立即分装。

1.4 制备血小板/MPs悬液及健康无微粒血浆(MDP)

对照组于体检当日清晨空腹静脉采血5 ml, NVAF组患者分别于入组后第2日清晨(口服利伐沙班前)及服用利伐沙班3个月后清晨空腹静脉采血5 ml。采用枸橼酸钠抗凝管,充分混合(血液流入抗凝管后,要轻轻颠倒2~3次),不可有凝块。血小板/MPs悬液的制备参考文献中的步骤进行操作^[11]。上述血标本 $200\times g$ 离心13 min。上层获得富血小板血浆。取1000 μl 富血小板血浆留待进一步实验。剩余的富血小板血浆继续离心 $1500\times g$ 20 min,上2/3液体中取250 μl ,离心 $20000\times g$ 45 min(减速停止),弃掉上层225 μl (动作缓慢),余25 μl 即MPs,用Tyrode's buffer洗1次,加225 μl Tyrode's buffer,即得到MPs悬液。MDP制备:健康人的富血小板血浆离心 $20000\times g$ 45 min(减速停止),取上2/3即为MDP。

1.5 流式细胞仪检测血小板PS水平及MPs的水平

取45 μl Tyrode's buffer加入流式管中,加入5 μl 血小板悬液或MPs悬液,加入5 μl 荧光标记的膜联蛋白V避光15 min后加入200 μl Tyrode's buffer。流式细胞仪检测血小板的PS水平及MPs水平。进一步利用Alexa fluor 647-CD41a和Alexa fluor 488-CD31检测 $\text{CD31}^+/\text{CD41a}^+$ 血小板微粒水平。

1.6 凝血时间测定

取100 μl 血小板($10^6/\text{ml}$)或微粒悬液加入凝血仪测试杯。加入100 μl MDP中混匀,37℃孵育3 min。混合液中加入100 μl 25 mmol/L CaCl_2 启动反应。凝血反应结束后读取实验结果(数据以秒表示)。重复3次,取平均值。

1.7 纤维蛋白生成实验

利用浊度实验检测纤维蛋白的生成。血小板悬液或微粒悬液混入正常的MDP(最终浓度为88%),加入10 nmol/L Ca^{2+} 溶液(最终浓度)后启动纤维蛋白的生成。

1.8 统计学处理

应用SPSS19.0进行统计分析。计量资料(均通过正态性检验)采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较为成组t检验,多组间则行单因素方差分析+两两比较

LSD-t 检验。计数资料用例数或百分数表示,比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般资料

两组一般资料比较无统计学差异 ($P>0.05$)。NVAF 组患者左心室舒张末期内径(LVEDD)和左室收缩末期内径(LVESD)、左房内径(LAD)水平高于对照组,左室射血分数(LVEF)低于对照组 ($P<0.05$),两组患者的肝肾功能指标比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 血常规指标比较

NVAF 组治疗前的血小板计数、红细胞计数、白细胞计数与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$),NVAF 组治疗前的凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)短于对照组,D-D 聚体水平高于对照组 ($P<0.05$),NVAF 组治疗后的 PT、APTT 延长,D-D 聚体水平降低 ($P<0.05$),NVAF 组治疗后 PT、APTT 仍短于对照组,D-D 聚体水平仍高于对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

2.3 PS⁺血小板及微粒水平的变化

利用流式细胞仪检测了对照组和 NVAF 组 PS⁺血小板及微粒水平。如图 1 所示,NVAF 组治

疗前 PS⁺血小板、总 MPs 及血小板释放的微粒(PMPs)水平高于对照组 ($P<0.05$);NVAF 组治疗后 PS⁺血小板水平、总 MPs 水平及 PMPs 水平降低,但仍高于对照组 ($P<0.05$)。

2.4 血小板及 MPs 的促凝水平变化

将血小板及 MPs 与健康人 MDP 混合,加入 Ca²⁺ 启动凝血瀑布,检测凝血时间。如图 2 所示,NVAF 组患者在治疗前血小板及 MPs 促凝血时间短于对照组 ($P<0.05$);NVAF 组治疗后的血小板及 MPs 促凝血时间明显延长,但仍短于对照组 ($P<0.05$)。

2.5 血小板及 MPs 的促纤维蛋白生成

利用浊度实验检测血小板及 MPs 在健康 MDP 中促纤维蛋白的生成水平。如图 3 所示,NVAF 组患者在治疗前血小板及 MPs 促纤维蛋白生成能力高于对照组 ($P<0.05$);NVAF 组治疗后血小板及 MPs 促纤维蛋白生成能力明显降低,但仍高于对照组 ($P<0.05$)。

3 讨论

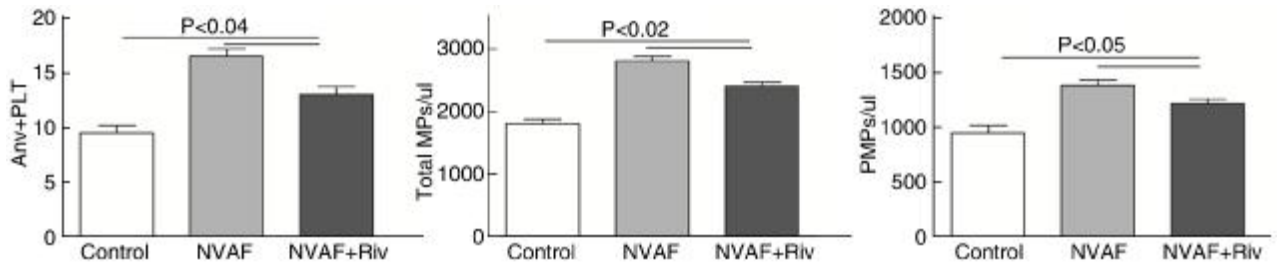
房颤是心内科的常见疾病,我国一项纳入 29 079 例的调查研究显示,房颤患病粗率为 0.77%,且随着我国人口老龄化的现象不断加剧,其患病率

表 1 NVAF 组和对照组的一般资料比较

指标	对照组(45 例)	NVAF 组(47 例)	χ^2/t 值	P 值
年龄/岁	57.63±10.61	60.42±12.35	1.160	0.249
男/例(%)	21(46.7)	26(55.3)	0.689	0.407
糖尿病/例(%)	10(22.2)	14(29.8)	0.682	0.409
高血压/例(%)	13(28.9)	22(46.8)	3.132	0.077
吸烟/例(%)	19(42.2)	29(61.7)	3.496	0.062
血脂异常/例(%)	9(20.0)	17(36.1)	2.965	0.085
心功能指标				
LVEDD/cm	4.43±0.52	5.63±0.53	10.956	0.000
LVESD/cm	3.54±0.47	4.76±0.34	14.311	0.000
LAD/cm	3.18±0.37	3.84±0.48	7.364	0.000
LVEF/%	61.52±6.92	56.90±8.13	2.929	0.004
谷丙转氨酶/(U·L ⁻¹)	26.15±10.21	27.52±9.87	0.654	0.515
谷草转氨酶/(U·L ⁻¹)	22.14±8.62	23.81±7.53	0.991	0.324
BUN/(mmol·L ⁻¹)	4.62±1.51	4.81±1.67	0.572	0.569
SCr/(μmol·L ⁻¹)	63.26±10.39	66.19±12.84	1.200	0.233

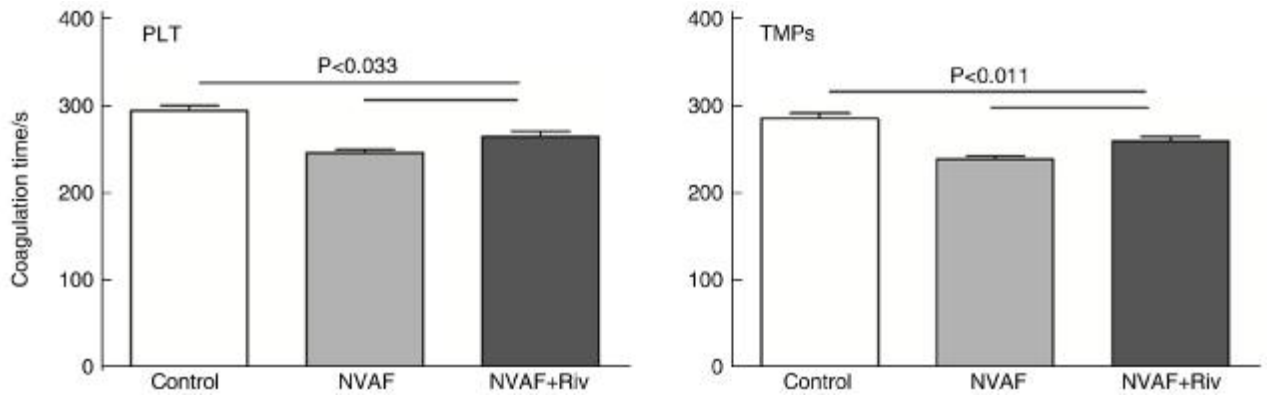
表 2 血常规指标比较

指标	时间	血小板计数 /(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	红细胞计数 /(×10 ¹² ·L ⁻¹)	白细胞计数 /(×10 ⁹ ·L ⁻¹)	PT/s	APTT/s	D-D 聚体 /(mg·L ⁻¹)
对照组(45 例)		185.33±44.52	4.85±0.35	8.34±2.92	12.65±1.43	29.87±3.65	0.26±0.14
NVAF 组(47 例)	治疗前	202.31±54.16	4.71±0.43	9.30±2.56	9.85±1.15	20.84±3.12	0.46±0.17
	治疗 3 个月后	198.42±47.75	4.82±0.39	8.48±2.73	11.72±0.93	28.23±3.54	0.32±0.12
	差值	-3.89±131.36	0.11±0.38	-0.82±5.68	1.87±1.20	7.39±2.58	-0.14±0.17
和治疗前比	(配对 t,P)	0.203,0.840	1.985,0.053	0.990,0.327	10.683,0.000	19.637,0.000	5.646,0.000
和对照组比	治疗前	1.639,0.105	1.708,0.091	1.679,0.097	10.371,0.000	12.774,0.000	6.145,0.000
(成组 t,P)	治疗 3 个月后	1.359,0.178	0.388,0.699	0.238,0.812	3.714,0.000	2.188,0.031	2.210,0.030



Ana,膜联蛋白;MPs,微粒;PMPs,血小板源性微粒。Control,对照组;NVAf,非瓣膜房颤组;NVAf+Riv,非瓣膜房颤患者服用利伐沙班3个月。

图1 膜联蛋白V⁺血小板、总MPs水平及血小板源性MPs水平
Figure 1 Annexin V⁺ platelets, total MPs and platelet-derived MPs



Control,对照组;NVAf,非瓣膜房颤组;NVAf+Riv,NVAf患者服用利伐沙班3个月;TMPs,总微粒。

图2 NVAf患者及对照组血小板及总微粒的促凝血时间
Figure 2 Procoagulant time of platelets and total particles in NVAf patients and control group

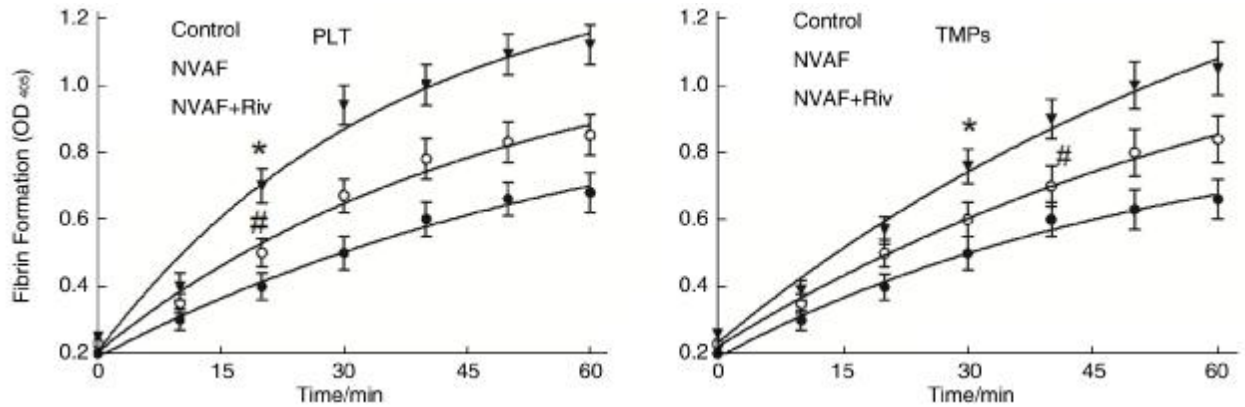


图3 NVAf患者及对照组血小板及总微粒的促纤维蛋白生成
Figure 3 Fibrinogenesis in platelets and total microparticles in NVAf patients and controls

可能会继续升高^[12]。房颤患者存在高凝状态,易形成血栓。据统计,血栓栓塞性并发症是房颤患者致死、致残的主要原因,因此临床非常重视房颤患者的抗凝治疗^[13]。利伐沙班是新型的抗凝药物,与另一抗凝药物华法林相比,其有相近的抗凝效果,但出血的风险更低,同时不需要定期监测凝血功能,这使得近年来利伐沙班广泛应用于房颤患者的抗

凝治疗^[14]。利伐沙班虽然能够有效预防房颤患者血栓事件的发生,但是它对PS⁺血小板及MPs水平的影响尚不得而知,本研究就此展开探讨。

血小板的促凝血作用主要有血小板的激活、聚集、收缩及提供PS表面为Ⅹa和Ⅱa提供场所等途径,多种物质(包括胶原、肾上腺素、ADP、Ⅱa等)以及湍流等都可激活血小板^[15]。激活的血小板不仅

可以释放 ADP 等物质,使更多的血小板激活、聚集,还可以释放大量的 PS⁺ MPs,促进高凝状态的形成。在 NVAf 患者中,房颤形成的局部湍流是血小板激活重要的始发原因,经过长期的正反馈逐渐形成了高水平 PS⁺ 血小板及 MPs,进而导致机体存在明显的高凝状态。本研究中 NVAf 组治疗前的 PT、APTT 短于对照组,D-D 聚体高于对照组,也提示患者存在高凝状态,而经过治疗后,PT、APTT 明显延长,D-D 聚体则明显降低,这说明利伐沙班可改善患者的高凝状态。

升高的 PS⁺ 血小板及 MPs 水平具有很强的促凝活性,其不仅出现于房颤患者中,亦在肾病综合征等其他疾病中出现^[16],参与疾病高凝状态的形成。本研究结果显示,房颤患者的 PS⁺ 血小板及 MPs 水平明显高于对照组,提示房颤患者的高凝状态可能与 PS⁺ 血小板及 MPs 水平较高有关。经过 3 个月口服利伐沙班抗凝治疗后,房颤患者的 PS⁺ 血小板及 MPs 水平降低,这说明利伐沙班降低了血小板的激活水平;此外,房颤患者治疗后的 PS⁺ 血小板及 MPs 促凝血时间有所延长,促纤维蛋白水平有所降低,也进一步地证实了利伐沙班有抑制血小板的激活作用,这可能主要是通过降低 II a 水平,从而部分地抑制了血小板激活的正反馈机制。MPs 的主要来源是激活及调亡的细胞,包括血小板、红细胞、白细胞、内皮细胞等,但是,含量最多是血小板来源的 MPs^[17]。本研究结果显示血小板来源的 MPs 占总 MPs 的 60% 左右。因此,当口服利伐沙班使血小板激活减少时,血小板来源 MPs 及总 MPs 水平也伴随减少。但值得注意的是,房颤患者治疗后的总 MPs 及 PMPs 水平仍高于对照组,其原因一方面可能是由于血小板的激活并没有完全被抑制,另一方面可能是其他细胞来源的 MPs 水平没有明显的变化。

综上所述,本研究初步证明了利伐沙班降低了 NVAf 患者体内血小板及 MPs 的促凝活性,这可能是其抗凝的另一个途径,然而目前对于这一途径的具体作用机制尚不清楚,还有待以后更深入的研究进行探索。

参考文献

[1] 景莉娟,陶海龙,李凌,等. HDL-C 与非瓣膜性房颤左心房血栓形成的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2017,52(2):209-212.

[2] 王秀玉,张虹. 心房颤动性心肌病导管消融治疗[J]. 临床心血管病杂志,2018,34(6):545-548.

[3] 张炜,吕纳强,张云,等. 老年非瓣膜病心房颤动患者左心房血栓的影响因素[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2017,19(10):1048-1051.

[4] Meng H, Kou J, Ma R, et al. Prognostic implications and procoagulant activity of phosphatidylserine exposure of blood cells and microparticles in patients with atrial fibrillation treated with pulmonary vein isolation [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8579-8588.

[5] Nguyen VP, Dixson AC, Barrera FN. The effect of phosphatidylserine on a pH-responsive peptide is defined by its noninserting end[J]. *Biophys J*, 2019, 117(4): 659-667.

[6] 米日巴尼·买吐松,袁玉娟,穆叶赛·尼加提. IL-33 与微粒参与动脉粥样硬化及血栓形成的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2019, 35(10): 954-957.

[7] Verma SK, Leikina E, Melikov K, et al. Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(1): 254-270.

[8] Meng H, Kou JJ, Ma RS, et al. Prognostic implications and procoagulant activity of phosphatidylserine exposure of blood cells and microparticles in patients with atrial fibrillation treated with pulmonary vein isolation [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8579-8588.

[9] Miao B, Alberts MJ, Bunz TJ, et al. Safety and effectiveness of oral factor Xa inhibitors versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation patients at high risk for falls [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2019, 48(3): 366-372.

[10] Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, et al. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(38): 2893-2962.

[11] Yuana Y, Bertina RM, Osanto S. Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(3): 396-408.

[12] 郭豫涛. 中国老年心房颤动临床流行病学和抗栓管理现状及变化[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2017, 19(9): 988-990.

[13] 郭艺芳. 非瓣膜性心房颤动患者血栓栓塞与出血风险评估[J]. *中华全科医师杂志*, 2016, 15(10): 737-738, 739.

[14] 陈志坚,易桂文. 2016 年 ESC 心房颤动管理指南更新解读[J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(11): 1076-1078.

[15] Zhao J, Xu B, Chen G, et al. Cryopreserved platelets augment the inflammatory response: role of phosphatidylserine- and P-selectin-mediated platelet phagocytosis in macrophages [J]. *Transfusion*, 2019, 59(5): 1799-1808.

[16] Gao C, Xie R, Yu C, et al. Procoagulant activity of erythrocytes and platelets through phosphatidylserine exposure and microparticles release in patients with nephrotic syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 2012, 107(4): 681-689.

[17] Zhao L, Wu X, Si Y, et al. Increased blood cell phosphatidylserine exposure and circulating microparticles contribute to procoagulant activity after carotid artery stenting [J]. *J Neurosurg*, 2017, 127(5): 1041-1054.

(收稿日期:2019-09-28)