



## Myocardial Injury and the Release of Troponins I and T in the Blood of Patients

Ivan A. Katrukha<sup>a,b,\*</sup> and Alexey G. Katrukha<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>HyTest Ltd., Turku, Finland; <sup>b</sup>Department of Biochemistry, School of Biology, MV Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

译：王楠 校对：段新伟

\*Address correspondence to this author at: HyTest, Intelligate 1, 6th Fl., Joukahaisenkatu 6, 20520 Turku, Finland. Fax þ358-2-512-0909; e-mail ivan.katrukha@hytest.fi.

Received June 20, 2020; accepted October 28, 2020.

DOI: 10.1093/clinchem/hvaa281

### 心肌损伤与患者血液中肌钙蛋白I和T的释放

#### 导致血液肌钙蛋白升高的情况

##### 健康人群的肌钙蛋白释放

正常人群外周循环中的肌钙蛋白 I (cTnI) 和肌钙蛋白 T (cTnT) 浓度范围为 1 ng/L – 50 ng/L 之间。不同的检测系统所给出的肌钙蛋白基线水平会有所不同。另外，肌钙蛋白基线水平还受性别（男性比女性大约高出 1.2 – 2.4 倍）和年龄（出生后开始下降，18-30 岁之间降至最低水平，之后随年龄逐步升高，60 岁后尤为显著）的影响。据推测，健康个体的肌钙蛋白释放可能是由心肌细胞更新或心肌细胞肌钙蛋白流失所导致的。

##### 心肌梗死

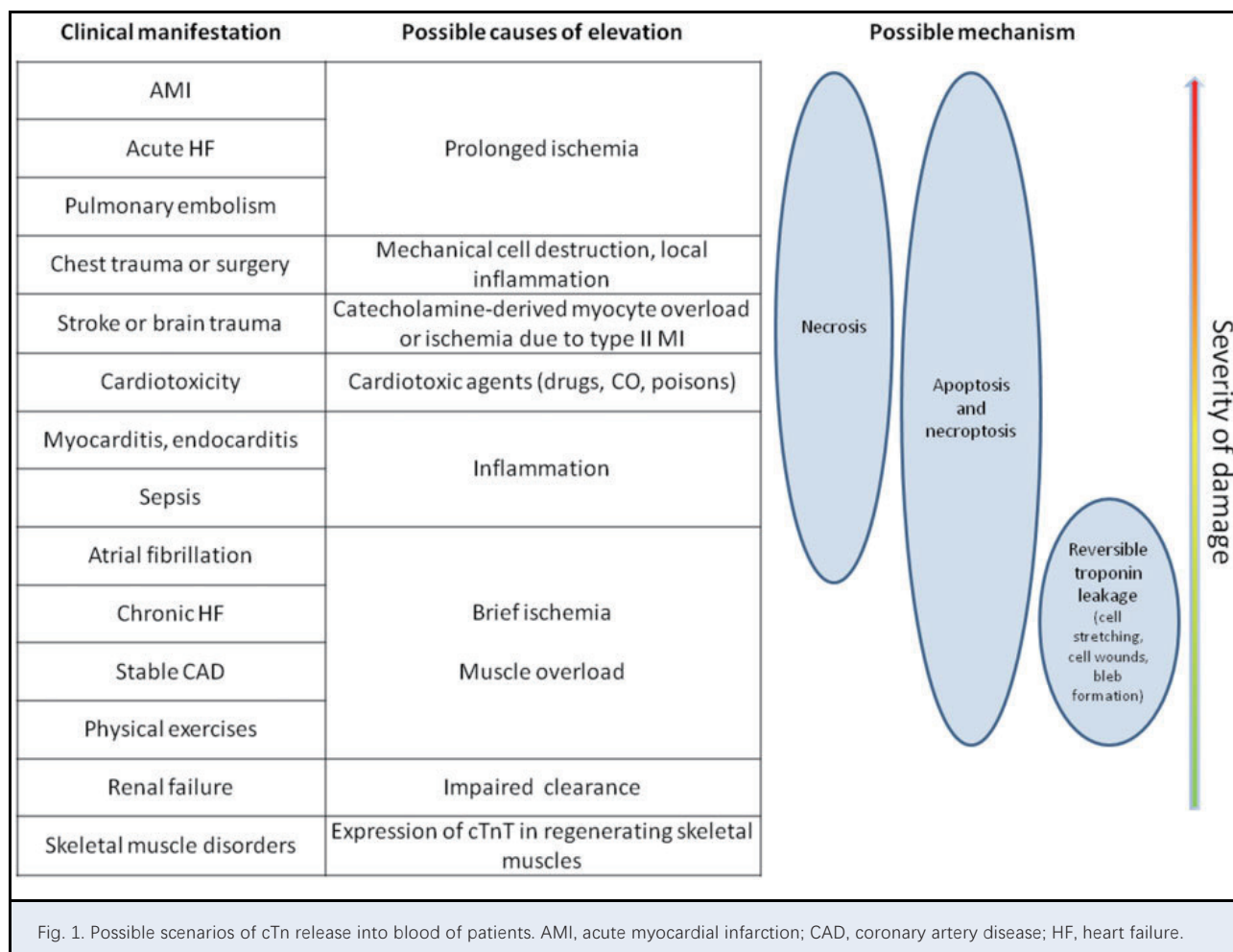
因缺氧引起的心肌组织急性缺血是心梗的主要诱因。急性心肌缺血会导致心肌细胞坏死，进而引发细胞膜和细胞器破裂，随后细胞内的蛋白质被释放进入血液。这导致血液中 cTn 浓度显著升高，通常在患者冠状动脉闭塞再灌注的 10-20 小时或急性缺血后无再灌注的 24-50 小时达到峰值。cTnI 的释放为单一峰值，而 cTnT 的释放则存在双相动力学：cTnT 释放的第一个峰值与 cTnI 一致，而第二个峰值则大约出现在患者胸痛发作的 80 小时之后。cTnI 和 cTnT 浓度水平均与无再灌注患者的梗死面积相关，对于最大面积的梗死病灶，肌钙蛋白浓度水平可超过 50 – 100 µg/L。经由商品化试剂盒测得的同一患者血样的 cTnI 结果可能比 cTnT 高 10 倍以上。该差异可以解释为 cTnI 和 cTnT 代谢动力学的差异或免疫学检测试剂的差异（如试剂中使用的校准品或抗体的差异）。我们最近的研究显示，心梗发作的第一个小时内，肌钙蛋白主要以三元复合物形式释放进入血液，其中 I:T:C 三个亚基的摩尔比约为 1:1:1，质量比约为 1:1.4:0.8。结合这些发现，可以推断由于检测试剂的一些内在特性可能会导致 cTnI 结果的高估或者 cTnT 的低估。因此，肌钙蛋白检测进一步的一致化研究是非常有价值的。

肌钙蛋白的升高可持续至心梗发作后的 10-14 天，这显著长于其他心梗标志物（如 CK-MB 和肌红蛋白）。肌钙蛋白在组织中如此长时间的释放，可能是由肌钙蛋白附着在心肌细胞细肌丝的其他组分上所导致的。

##### 其他引起血液肌钙蛋白升高的情况

除心梗外，cTn 浓度在相当数量具有心血管系统其他疾病的患者血液中也出现升高，如急性或慢性心衰、房颤、肺栓塞、心内膜炎和心肌炎、心脏创伤（手术或事故）以及慢性稳定型冠状动脉疾病（Fig 1）。cTn 浓度的升高也可能与心脏毒性试

剂引起的心肌细胞损伤有关,包括药物类(如蒽环类药物、曲妥珠单抗)、滥用药物(如可卡因)、二氧化碳和某些蜘蛛、蝎子、蛇或水母的毒液等。心肌损伤在脓毒症中很常见,这是一种由感染引起的全身性炎症,甚至在没有冠状动脉病史的患者中也可发生。脓毒症的心肌损伤可能是多因素的,目前有数种理论可用于解释脓毒症导致的心脏损伤,包括供需失衡理论、细菌驱动的心肌炎症、内毒素和细胞因子相关的损伤、自由基的产生和微血管功能障碍等。



急性心肌损伤在新冠患者中也很常见。心肌损伤可由心肌炎、应激性心肌病、心肌缺血或某些用于治疗冠状病毒感染的药物的心脏毒性所引起。这种损伤可能导致心律失常、心力衰竭或心源性休克。冠状病毒感染还有可能导致既往心血管疾病的恶化。新冠患者血液中肌钙蛋白浓度的升高与感染的严重程度和更高的死亡率相关。新冠病毒感染对于心血管系统的长期影响仍有待进一步研究。

缺血性脑卒中或外伤性脑损伤患者的血液肌钙蛋白浓度也会经常性的出现升高。肌钙蛋白浓度升高与更大面积的脑损伤以及全因死亡风险增加相关。脑损伤如何影响心脏功能的病理机制仍没有被研究清楚,目前主要的假设是交感神经系统的过度激活导致儿茶酚胺的释放,从而引发心肌过度负荷或2型心肌梗死。剧烈运动后,血液中cTn的浓度通常会出现升高。该情况下,心肌钙蛋白动力学是异质性的,cTnI不会出现第二个峰值,cTnI和cTnT会小幅度升高后并在24小时内回到基线浓度水平(相比于心梗,时间周期更短)。这种cTn浓度的升高并不伴随可检测到的心肌细胞坏死,有学者认为这种肌钙蛋白的释放是由于细胞的可逆损伤所导致的。

肌钙蛋白释放进入外周循环后,似乎很快就被清除;通过比格犬和大鼠等模型动物的研究发现,肌钙蛋白在外周循环中的半衰期约为2小时。我们认为cTn可通过肝脏、胰腺、网状内皮系统以及肾脏从血液中清除。不同的研究表明,部分终末期肾病患者会出现肌钙蛋白浓度升高。然而,目前尚不清楚这种肌钙蛋白升高是由于肾脏对肌钙蛋白的清除受损所致,还是由伴有高血压和心脏负荷增加所导致的心肌细胞损伤所致。

基于mRNA和免疫学的研究数据表明,cTnT可在不同类型骨骼肌疾病患者的再生骨骼肌中表达。这种表达可导致cTnT在无心肌损伤的情况下出现升高,进而可能引发一些误诊。相反,还有一些研究者质疑这些结果,指出可能没有直接的证据表明mRNA水平升高会导致再生骨骼肌中蛋白质的翻译。骨骼肌疾病患者血液中的非心源性cTnT升高仍需要进一步研究确认。

## 肌钙蛋白释放进入血液的潜在机制

### 心肌细胞的坏死和凋亡

长时间的心肌缺血、创伤、炎症或心脏毒性药物均可导致心肌细胞损伤。这种损伤伴随着细胞膜和细胞器的破坏，进而导致肌钙蛋白和其他蛋白质被释放进入血液。有一种假说认为，心肌细胞释放肌钙蛋白与数种细胞程序性死亡的途径有关，这些途径是细胞对包括缺血、炎症、凋亡和坏死等不同反应所作出的应答。在动物梗死模型中，当细胞凋亡通路受到抑制时，心肌损伤的面积会减小。最近的动物试验显示，在短暂缺血或非缺血性预负荷诱导的心肌细胞损伤的情况下，cTn 从组织中释放是由心肌细胞凋亡而非坏死所导致的。细胞凋亡和坏死对于人心血管疾病临床方面的作用及其对 cTn 释放到血液中的影响仍有待研究。

### 非细胞死亡情况下的肌钙蛋白释放

除了从死亡的细胞中释放，肌钙蛋白也可以从活细胞中释放（可能是由可逆损伤引起的）。有学者认为，肌钙蛋白可由缺血的心肌细胞通过形成含有复合物的膜性泡释放到外周循环中。还有研究认为，这种情况的肌钙蛋白释放是由组织拉伸诱导应答和可逆的细胞膜伤口的形成所导致的。然而，这些假设都仍有待进一步验证，因为目前尚不能可靠地区分活细胞肌钙蛋白的瞬时丢失和细胞可逆微坏死引起的肌钙蛋白释放。

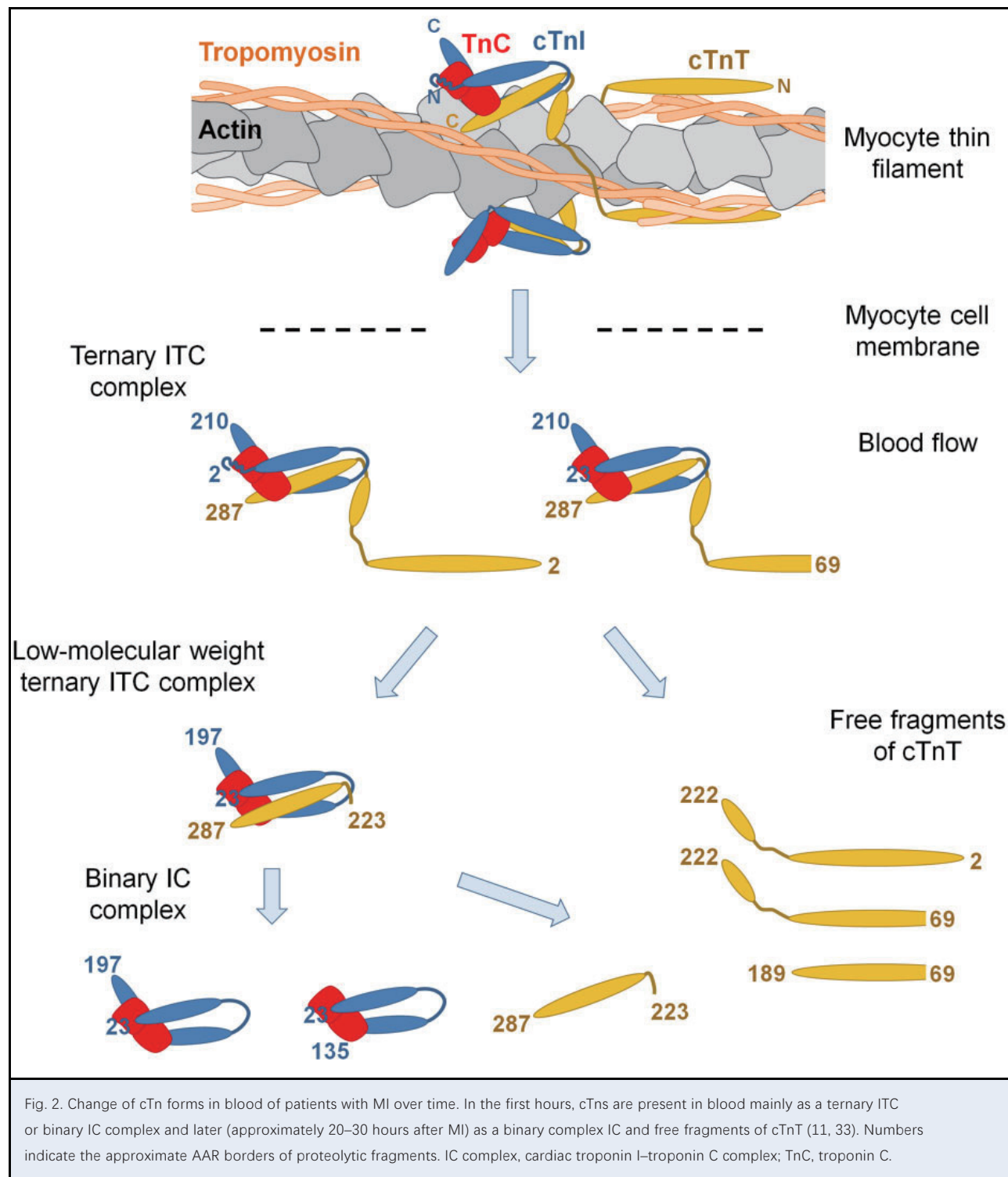
### 血液中不同形式的肌钙蛋白

肌钙蛋白是一种由三种不同亚基通过非共价结合形成的蛋白复合物。心肌细胞发生损伤后，肌钙蛋白复合物释放进入血液，同时伴随复合物的部分解离和亚基的蛋白水解。肌钙蛋白的特异性蛋白水解也可能是心肌细胞适应缺血状态或增加前负荷的一种机制。早期体外研究表明，cTnI 可在 N 端或 C 端的多个位点发生裂解，这使得 cTnI 分子中大约 30-130 氨基酸区域成为分子中最稳定的区域。金属蛋白酶 2、钙蛋白酶 1 和钙蛋白酶 2 均可参与 cTnI 的裂解。最近的体外研究表明，基质金属蛋白酶 2 可作用于 cTnI 重组多肽的 P17/18I 位点、A156/157L 位点和 G199/200M 位点；钙蛋白酶 2 可作用于 25-30, 49-53, 144-174 和 169-174 等区域。这与体内观察到的肌钙蛋白水解片段的免疫化学图谱相一致。尽管在体外研究的分子中发现了大量的蛋白水解位点，但我们最近发现，在心肌梗死患者的血液中，cTnI 的蛋白水解程度远低于之前所认为的。在心梗发作的 30 小时内，外周循环中可检测到的 cTnI 分子约 80% 仍然保留了 23-197 氨基酸的区域。这使得在开发检测试剂时，可以使用识别 23-197 氨基酸区域，尤其是 23-40 区域的抗体，从而避免由于蛋白水解导致的检测结果被严重低估。心肌梗死患者血液中肌钙蛋白 T 的蛋白水解也非常普遍。目前已经被鉴定的水解位点有 R68/69S、164 号位点周围、190-220 氨基酸区域的多个位点以及 W287/288K 位点。钙蛋白酶 1 和凝血酶可作用于 cTnT 的 R68/69S 位点，金属蛋白酶 2 也可水解 cTnT。我们最近的研究发现，在心肌梗死发作的最初几个小时内，cTnT 主要以全长分子和高分子量蛋白水解片段的混合物出现在循环中，并与 cTnI 和 TnC 结合在一起；心肌梗死发作的 30 小时后，cTnT 主要以游离的、低分子量的和中间区域的水解片段形式存在于血液中。我们推测，血液中 cTnT 片段组成的变化可能反映了心肌损伤后 cTnT 释放机制的变化。当心肌细胞受到急性缺血的严重影响时，在前数个小时内 cTnT 即会从坏死的心肌细胞中释放进入血液；在发病后期 cTnT 也会以中间片段的形式被释放进入血液；然而，当有起始炎症出现时，cTnT 也可从轻度损伤（或者凋亡）的心肌细胞中被释放进入血液。如果这种机制真的存在，那么我们就可以基于这种机制去区分早期心梗和晚期心梗，并且可以通过检测不同形式的肌钙蛋白更特异地诊断再梗死的发生。

关于心梗发作后患者血液中肌钙蛋白的存在形式仍然没有形成共识。Wu 等人的研究发现，外周循环中肌钙蛋白以三元 ITC 复合物、二元复合物和游离 cTnT 的形式存在，游离 cTnI 在血液不存在。而 Bates 等人则认为 cTnI 主要以二元复合物的形式存在，此外还有小部分三元 ITC 复合物，而 cTnT 主要以游离形式存在。我们最近对 ST 段抬高型心肌梗死患者的研究表明，在早期（症状出现后约 10 小时内），血液中存在大量由全长或中度蛋白水解的 cTnI 和 cTnT 组成的 ITC 三元复合物；在后期（症状出现后 20-30 小时），肌钙蛋白则主要以二元复合物和 cTnT 游离片段的形式存在于血液中（Fig 2）。Wijk 等人也观察到在心肌梗死患者的血液中，cTnI 主要以三元复合物的形式存在，但全长的三元复合物比例远低于我们的研究结果。

如前所述，大多数研究表明心肌梗死患者血液中的 cTnI 和 cTnT 均以全长和不同长度的蛋白水解片段的形式存在。因此，为了更准确和更灵敏的检出肌钙蛋白，试剂开发人员应尽量不使用针对分子中对于蛋白水解降解敏感区域的抗体。在除心梗外的其他案例和情况中，cTn 以何种类型存在于血液中尚不清楚。由于这些情况下患者体内的肌钙蛋白浓度很低，进行该类研究会非常复杂。因此，该类研究需要有更高灵敏度的肌钙蛋白检测试剂作为支撑。Van Wijk 等人的研究显示，在脓毒症和肺栓塞患者的肝素血浆中，cTnI 主要以三元复合物形式存在。Mingels 等人的数据表明，与心肌梗死不同，在马拉松运动员和肾衰竭患者的血清中，cTnT 以游离而非复合物形式存在。根据这些研究结果的提示，在急性损伤和慢性疾病或由非心肌细胞不可逆损伤引起的肌钙蛋白升高的情况下，肌钙蛋白存在的形式可能有所不同。如果该结论被进一步证实，

并且这些不同形式的肌钙蛋白可以被正确地表征，那么肌钙蛋白免疫检测的策略可能会发生改变。通过开发针对性识别疾病特异性的不同形式的肌钙蛋白检测试剂，可以对心梗释放的肌钙蛋白与其他病况释放的肌钙蛋白进行区分，从而为进一步提升诊断特异性提供了可能。



## 结论与启示

围绕心梗患者血液cTnI和cTnT的免疫生化性质研究已长达30年之久。这期间，各种科研团队围绕肌钙蛋白产出了大量的研究文章。很显然，基于这些对于患者血液肌钙蛋白的表征研究，为开发更精确的定量检测试剂提供了可能。最初，关于心梗患者血液中肌钙蛋白的存在形式没有统一的观点。但是随着研究的深入以及更灵敏特异的检测方法的出现，关于血液中肌钙蛋白存在形式的观点已经逐渐清晰。这些知识的积累对于新一代肌钙蛋白检测试剂的开发是至关重要的。

目前，对于在除心梗外的其他引起血液肌钙蛋白浓度升高的病理状态下，肌钙蛋白以何种形式存在，仍有待进一步研究。在这种情况下，血液中的cTnI和cTnT浓度通常较低且略高于正常水平，这使得对这些患者血液中的cTn分析非常具有挑战性。然而，除心梗外，基于肌钙蛋白在其他疾病中也可出现升高的事实，这也确实给心肌梗死的诊断带来了新的挑战。肌钙蛋白轻微幅度的升高可在心梗发展期或其他如慢性肾脏疾病等病理所导致，这些均与梗死无关。通过使用在第一次肌钙蛋白测定后1-3小时进行第二次肌钙蛋白测定的策略，可以帮助区分鉴别疾病状况。如果cTn浓度增加，患者很可能发生了急性事件，如心肌梗死。然而，如果cTn水平在升高后没有进一步发生变化，那么则可能代表了慢性疾病的发生。另一种策略则是找出心肌梗死和其他病因疾病患者血液中的肌钙蛋白存在形式的差异。

慢性疾病的研究表明，肌钙蛋白在慢性疾病患者血液中存在形式不同于心梗早期阶段，这具有重大的现实意义。特异性识别不同形式（疾病特异型）的肌钙蛋白将有助于区分心肌梗死和其他慢性疾病。相比于传统连续肌钙蛋白检测，使用针对不同形式特异性的肌钙蛋白检测试剂可以帮助我们得到首次检测结果后即可对不同病理进行区分。这种方法可以使得我们在发病初期的最关键的数小时内提升心梗诊断的可靠性。我们认为，对于与心肌梗死无关的疾病患者血液中cTn的生化和免疫化学性质的研究是非常重要的。然而，这方面的研究还有待进一步开拓。