



Cardiac Troponin Composition Characterization after Non ST-Elevation Myocardial Infarction: Relation with Culprit Artery, Ischemic Time Window, and Severity of Injury

Sander A.J. Damen,^{a,†} Gilbert E. Cramer,^{a,*,†} Hendrik-Jan Dieker,^a Helmut Gehlmann,^a Ton J.M. Oude Ophuis,^b Wim R.M. Aengevaeren,^c Marion Fokkert,^d Freek W.A. Verheugt,^a Harry Suryapranata,^a Alan H. Wu,^e Xander M.R. van Wijk,^{e,f} and Marc A. Brouwer^a

译：马云林 校对：王楠

非ST段抬高心肌梗死患者肌钙蛋白组成的表征鉴定 ——不同的形式的肌钙蛋白与罪犯血管、缺血时间窗口及损伤严重程度之间的关系

心肌肌钙蛋白 (cTn) 是心肌细胞特异性蛋白，由两种心脏特异性异构体 (cTnT 和 cTnI) 和一种非心脏特异性异构体 (TnC) 组成。心梗发作后，外周循环中的肌钙蛋白主要以复合物形式存在。近年来的一些研究认为，外周循环中的肌钙蛋白会由三元复合物 (cTnITC) 逐步转化为较低分子量的 cTn 复合物。作为未来生物标志物诊断的发展方向，对肌钙蛋白存在形式的鉴定将有助于诊断鉴别以及提示潜在的疾病状态。然而，目前还是缺乏直接证据来证明 cTn 组成与心梗患者病变心肌的关联。有研究指出，cTn 组成与缺血时间窗和损伤严重程度有关，这提示 cTn 组成可能与疾病状态存在联系。但由于实验室分析的复杂性、耗时性以及样本数限制，使得这类研究开展起来具有一定难度。目前，该类研究的采样均基于受损心肌远端采样，除了一项研究；而这项研究评估了冠状静脉系统 (CVS) 中的 cTnT 组成，并观察了所有已知 cTnT 片段向外周循环释放的浓度变化。

因此，本研究对 CVS 内多个部位获得的血液 cTn 组成进行了分析。基于两种最近开发的检测系统，可用于在更大队列的非 ST 抬高型 MI (NSTEMI) 患者群体中进行 cTn 组成的分析。运用高灵敏度的平台，这两种试剂可分别检测除总 cTnI 以外的 cTnI 复合物 (即全长、部分截断的以及低分子量 cTnITC [LMW cTnITC] 和二元 cTnIcTnC [cTnIC]) 和 cTnITC 大分子量复合物 (即全长或部分截短的 cTnITC)。本研究还对左前降支 (LAD) 和非 LAD 损伤动脉患者进行比较，加上多部位 CVS 采样，可将 cTn 组成与受损心肌面积相关联。此外，本研究还对持续损伤的严重程度和缺血时间进行了分组比较。

1. 实验材料与方法：

患者人群

样本取自于参加 TRAMICI 研究 (心肌损伤和冠状动脉炎的心动过速评估) 的 NSTEMI 患者。TRAMICI 是一项针对 NSTEMI 患者 (包括多部位 CVS 和外周血样本) 的生物标志物研究，其目的是用于梗死区和非梗死区血样中心肌损伤以及炎症标志物的对比与评价。cTn 升高的 NSTEMI 患者和冠状动脉造影 (CAG) 显示显著冠状动脉疾病的患者符合本研究的入选条件。详细信息见原文。

冠状动脉造影 (CAG) 分析

在进行生物标志物分析之前，将有一组心脏病专家对左心室壁运动异常，病变特征，和冠状动脉血流进行标准化评估，来识别关键病变。在关键病变与心脏病专家决定的病变不同的患者中，另一独立的心脏病专家将对所有数据进行第三次评估，若与之前的两次评估中的任何一项达成一致，则可确定关键病变。若不与任何一项达成一致，则将

患者分类为未知关键病变，且不对其血液进行分析。在本研究中，我们将患者又分为左前降支（LAD）和非 LAD 位置的关键病变（抑扬支或右冠状动脉）。

研究过程

在CAG期间，通过拍摄完全冲洗的造影剂来记录CVS解剖。通过右侧导管进入CVS。将Terumo线（Terumo Europe NV）和CHAMP多功能导管（Medtronic）用于CVS插管和血液采样。具体血液采集步骤等详细信息见原文。

生物标志物检测

针对不同形式的 cTnI 检测试剂详细信息如图 1 所示。

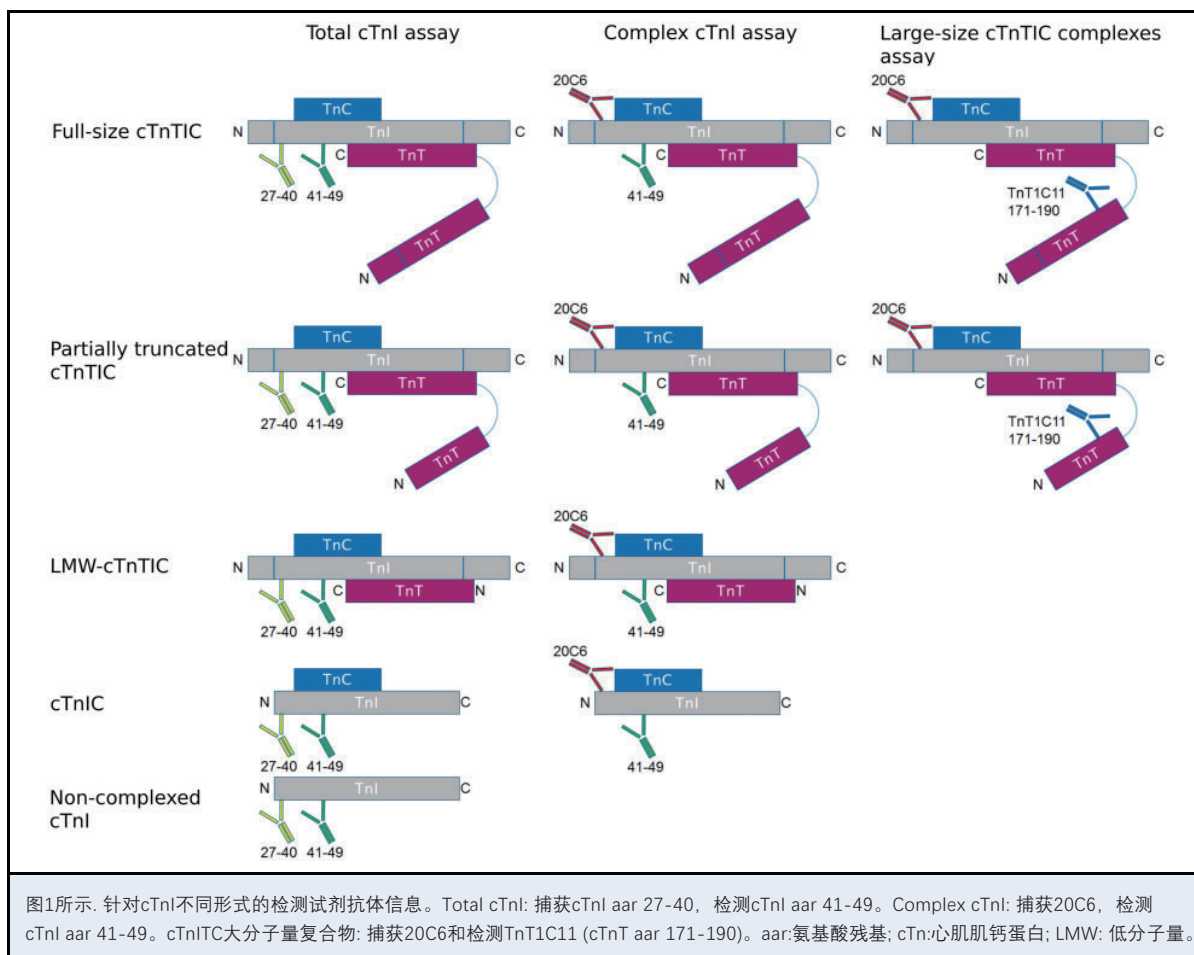
分析方法：使用三种测定方法确定 NSTEMI 患者中 cTn 的不同组成：1) 使用高敏心肌肌钙蛋白 I（Pylon, ET Healthcare）试剂测定总心肌肌钙蛋白 I（复合物形式和非复合物形式）。该测定法使用识别 27-40 位氨基酸残基的捕获抗体，以及识别 41-49 位氨基酸的检测抗体。2) 使用相同的 Pylon 平台，测量 cTnI 复合物（即完整大小的 cTnITC，部分截断的 cTnITC 复合物，以及 LMW cTnITC 和二元 cTnIC），捕获抗体使用特异性识别 cTnI 复合物的抗体（20C6, Hytest）。该抗体只识别 cTnIC 和 cTnITC 复合物，而未复合的 cTnI 不能被检测到。3) 使用 Pylon 平台，检测大 cTnITC 复合物（即全尺寸 cTnITC 和部分截短的 cTnITC），捕获抗体选择为 20C6，检测抗体为识别 171-190 氨基酸位点的 cTnT 抗体（1C11, Hytest）。该 cTnT 抗体的特异性使得该检测方法可以检测到具有完整 cTnT（37 kDa）及其 29 kDa 片段的 cTnITC 复合物，但 14 kDa 的 cTnITC 复合物与称为 LMW cTnITC 的 cTnT 的降解产物不能被检测到。

CK-MB分析

通过 0 小时、6 小时和 12 小时检测的肌酐肌酸激酶（CK-MB）来评估心肌损伤的严重程度。使用罗氏的 Cobas 分析仪（Roche）对其进行检测。CK-MB 的检测下限为 0.1 ng / mL。三次测量值中的最高值为 CK-MB 的峰值。

统计分析

具体详细信息，请参见原文。



2. 结果

在纳入 TRAMICI 研究的 71 例患者中有 45 例符合本研究的生物标志物分析。表 1 所列为这些患者在 0 小时的临床基本表现和血管造影特征。18 例患者的关键病变是 LAD，而另外 27 例患者是非 LAD。从症状发作到研究开始的间隔是 25 小时，从住院治疗到研究开始的间隔是 21 小时。住院期间测得的 CK-MB 峰值为 10.47 [4.19–19.15] ng / mL。

外周cTnI组成

股静脉鞘 0 小时 (PVT0) 的总 cTnI 浓度为 612 [203–1666] ng/L，其中 cTnI 复合物占 87 [78–100]%，大分子量 cTnITC 占 9 [6–15] %。随着时间的推移，与 PVT0 相比，PVT6 (股静脉鞘 6 小时) 的总 cTnI 浓度增加 ($P=0.018$)，而 PVT12 (股静脉鞘 12 小时) 的总 cTnI 浓度，与 PVT6 相比显著降低 ($P=0.013$) (表 2)。

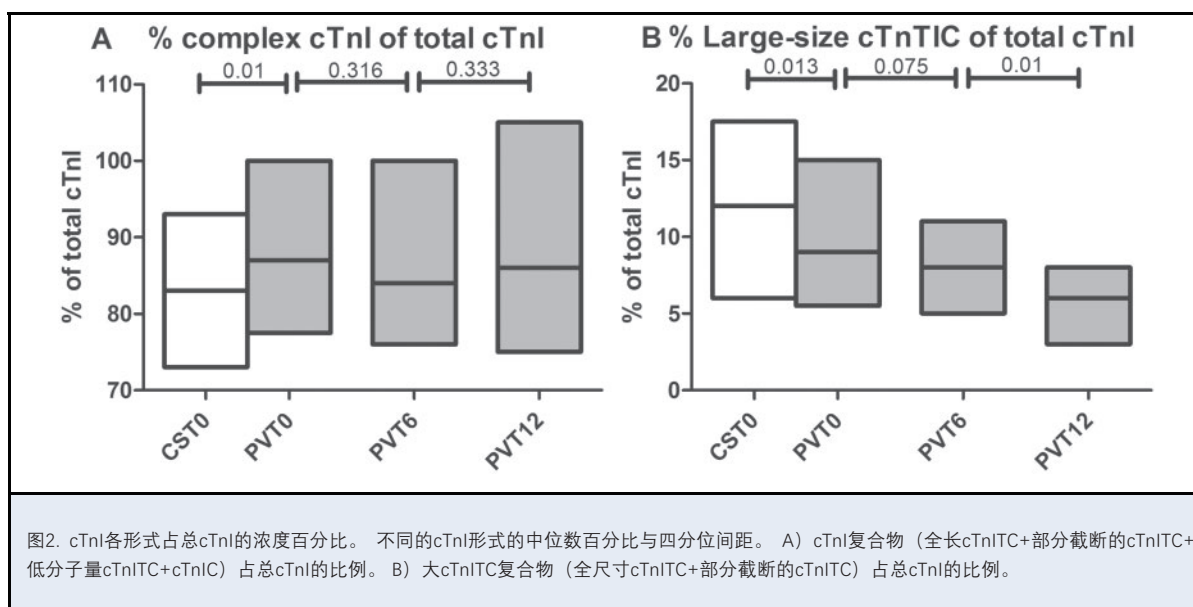
Table1. Baseline clinical and angiographic characteristics.	
	All patients n=45
Age	65 [54–73]
Male gender	32 (71%)
Smoking	21 (47%)
Hypertension	21 (47%)
Diabetes mellitus	4 (9%)
Hypercholesterolemia	16 (36%)
History of MI	9 (20%)
History of coronary revascularization	5 (11%)
eGFR (mL/min/1.73m ²)	93 [66–115]
Number of diseased vessels	
1	13 (29%)
2	22 (49%)
3	10 (22%)
Culprit artery	
RCA	11 (24%)
RCX	16 (36%)
LAD	18 (40%)
Severity of culprit stenosis	
50–70%	0 (0%)
70–90%	17 (38%)
> 90%	28 (62%)

中位数 (四分位间距) 或占比 (百分数)。

Table2. Absolute cTnI concentrations for the total population.						
N=45	CST0	PVT0	PVT6	PVT12	P-value*	P-value†
Total cTnI	1223 [281–2881]	612 [203–1666]	759 [299–2212]	719 [343–1718]	< 0.001	0.02
Complex cTnI	950 [238–2065]	631 [166–1337]	653 [276–1649]	674 [325–1386]	< 0.001	0.05
Large-size cTnITC	127 [38–406]	64 [15–144]	67 [20–195]	37 [16–138]	< 0.001	0.002

cTnI 及其亚型的中位数浓度 (ng / L，四分位间距)。* P 值为 CST0 与 PVT0 的统计学差异；†P 值为 3 个相关组 (PVT0，PVT6 和 PVT12) 之间的差异；总 cTnI 在 PVT0 和 PVT6 间的差异： $P=0.018$ ；在 PVT6 和 PVT12 之间： $P=0.013$ ；cTnI 复合物在 PVT0 和 PVT6 间的差异为 $P=0.024$ ，PVT6 和 PVT12 间的 $P=0.052$ ；大 cTnITC 复合物在 PVT0 和 PVT6 间的 $P=0.518$ ，在 PVT6 和 PVT12 之间 $P=0.001$ 。

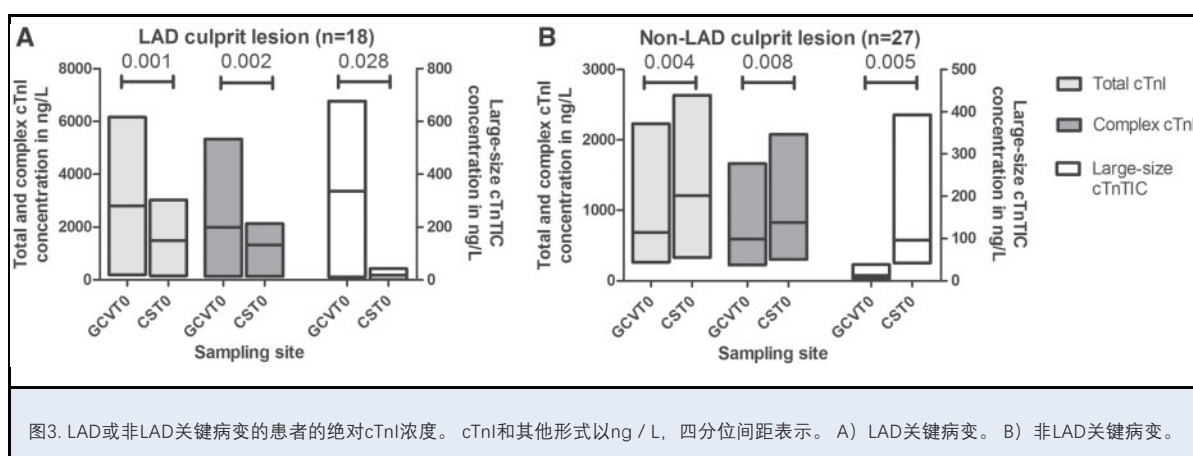
对于 cTnI 复合物，在成组比较中，PVT0 和 PVT6 之间的绝对中位数浓度有所增加 ($P=0.024$)，而 PVT6 和 PVT12 之间的绝对中位数浓度无显著差异 ($P=0.052$) (表 2)。以占总 cTnI 的比例表示，cTnI 复合物在不同时间点之间并没有变化 (图 2A)。大分子量 cTnITC 复合物的中位数绝对浓度在 PVT6 到 PVT12 之间是下降的 ($P=0.001$) (表 2)，其在总 cTnI 中所占的比例，在 PVT6 到 PVT12 之间也是下降的 ($P=0.01$) (图 2B)。



冠状静脉系统与外周静脉

CST0样本的总cTnI，cTnI复合物和大cTnITC复合物的绝对中值浓度明显高于PVT0样本（所有：P < 0.001）（表2）。与CST0样本相比，PVT0样本中cTnI复合物在总cTnI中所占的比例更高（P = 0.01）（图2A）。对于大cTnITC复合物，PVT0中的比例比CST0低（图2B）。

图3显示了根据关键病变的位置，GCVT0（心大静脉）与CST0（冠状静脉）的肌钙蛋白I绝对中值浓度。在患有LAD关键病变的患者中（n = 18，图3A），与CST0中的浓度相比，总cTnI，cTnI复合物和大cTnITC复合物在GCVT0中的绝对浓度更高。在非LAD患者（n = 27，图3B）中，CST0中的绝对浓度高于GCVT0中的绝对浓度（所有：P = 0.01）。LAD关键病变患者中，cTnI复合物占总cTnI的比例，在GCVT0和CST0中分别为81 [74-94]%和82 [76-96]%（P = 0.255）。对于大cTnITC复合物，这些比例分别为11 [6-14]%和13 [9-18]%（P = 0.007）。在非LAD关键病变患者中，cTnI的占比分别为88 [74-97]%和84 [72-92]%（P = 0.06），而大cTnITC复合物则为8 [5-18]%和12 [6-17]%（P = 0.464）。

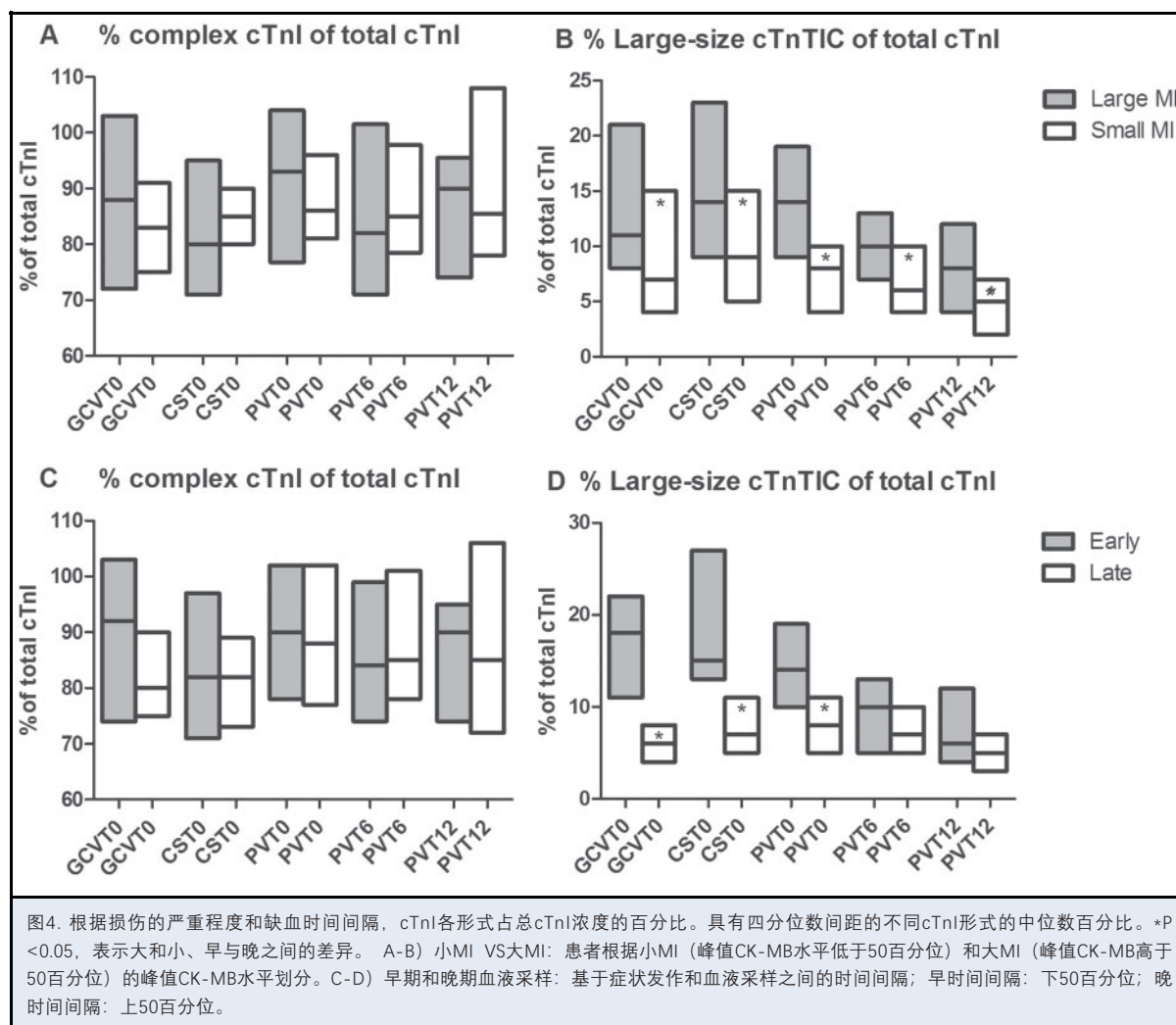


cTnI组成与损伤严重程度及缺血时间的关联

损伤严重程度：CK-MB峰值水平最高（第50百分位上限）的患者的PVT0样本的总cTnI浓度为1666 [886-4004] ng/L，CK-MB峰值最低的患者（第50百分位下限）PVT0样本的总cTnI浓度为278 [147-583] ng/L（P < 0.001）。而cTnI复合物所占比例的中位数在这两组中显示没有差异（图4A）。CK-MB峰值水平最高的病人的PVT0样本中的大分子量cTnITC复合物比例为14 [9-19]%，峰值最低的比例为8 [4-10]%（P = 0.002）（图4B）。大分子量cTnITC复合物的比例在这些分类间的差异也在GCVT0和CST0样品中观察到，并持续存在于PVT6和PVT12（图4B）。

缺血时间窗口：缺血时间窗口最短的18例患者的采血安排于症状发生在15-23小时之间，中位数19小时；缺血时间窗口最长的19例患者的采血安排于症状发生的29-48小时之间，中位数35小时。由于有关症状发作时间的不确定，排除了八名患者。短缺血时间窗口患者PVT0样本中的总cTnI浓度为1118[441-3002]ng/L，长缺血时间窗口患者的PVT0是583 [147-1228] ng/L ($P=0.210$)。cTnI复合物所占比例的中位数在“早期”或“晚期”采样的患者之间没有差异（图4C）。大分子量cTnITC复合物的比例，在最短时间间隔患者的PVT0中占14[10-19]%，在最长时间间隔患者中为8[5-11]% ($P=0.002$)（图4D）。大分子量cTnITC复合物比例在GCVT0和CST0样品中也表现出类似差异（图4D）。

缺血时间较短的组中，PVT0处观察到的大cTnITC复合物比例较高，而与损伤的严重程度无关（较小的MI中为15%，较大的MI中为17%）。在PVT6和PVT12，大分子量cTnITC复合物的比例与缺血时间间隔的差异不再存在。



3. 启示与讨论

本研究对大量 NSTEMI 患者的冠状静脉多个位点和外周血中的 cTn 组成进行了分析。基于高灵敏度免疫分析平台，可单独测量总 cTnI，cTnI 复合物和大分子量 cTnITC 复合物。在冠状静脉引流的梗死区域中，大 cTnITC 复合物和 cTnI 复合物的浓度均高于外周循环。再加上 CVS 内观察到的显著差异，表明外周循环中观察到的降解形式不仅是外周破裂所导致的。此外，缺血时间窗短、CK-MB 峰值高的患者的大 cTnITC 复合物的比例往往较高。

综上所述，这些发现可有助于未来根据 cTn 组成的差异对 NSTEMI 患者疾病状态的表征进行研究。

到目前为止，仍不确定细胞损伤后，cTn 是在哪里发生转化的。少量研究显示，肌钙蛋白转化属于细胞内降解，因为数种细胞内蛋白酶与选择性水解 cTnI 和 cTnT 有关，符合细胞内降解的推测。最近，在对两个 NSTEMI 患者的初步研究中发现，CVS 内的完整 cTnT，29 kDa 片段和较小的 15-18 kDa 片段的浓度高于外周循环。而在更大 TRAMICI 队列的分析中也显示出相似的结果。CVS 中的总 cTnI，cTnI 复合物和大 cTnITC 复合物浓度较高。另外，考虑到 CVS 内部的明显差异，在最靠

近心肌损伤的位置浓度最高。再加上 cTnI 复合物和大分子量 cTnITC 复合物占总 cTnI 比例在 GCVT0 和 CST0 样本中保持相对恒定的事实，支持 cTnITC 复合物是释放前在细胞内进行了分解。在一项心梗后患者的 cTnI 降解研究中，全尺寸 cTnI 及其片段的比例随着时间的推移而保持不变，也得出类似的结论。

但是，cTn 在外周循环中可能也发生了部分降解。凝血酶作为蛋白水解酶，像细胞内 u-钙蛋白酶一样，能够在相同的氨基酸残基处裂解 cTnT (R68 / S69)。随着 NSTEMI 患者中的凝血酶活性增加，外周循环内的 cTn 更有可能降解。而且按比例，本研究中显示外周血比 CVS 含有更多的 cTnI 复合物，更少的大分子量 cTnITC 复合物，这可能是外周血内大分子量 cTnITC 复合物向较低分子量的复合物发生了转化。最后，如前所述，凝血酶的作用也可能在分析前的血清制备过程中发生。

先前发现的 cTn 组成差异性似乎与潜在的心脏状况有关。首先，随着损伤严重程度的增加，cTnI 与 cTnT 的降解似乎更加广泛。其次，根据缺血发作和 cTn 评估之间的时间间隔，更大的 cTn 片段在早期占主导地位，而较小的片段随后在心梗后可见。在两项关注 cTn 与其他亚型复合物的研究中，大 cTn 复合物在早期占比更高，而随着疾病进展，后期则是更多的较低分子量 cTn 复合物占据主导。我们认为，复合物的降解以及 cTnI 和 cTnT 的降解过程是并行发生的。肌钙蛋白在被蛋白酶裂解的同时形成复合物。在持续缺血的情况下，cTn 片段会发生游离，使得更低分子量复合物的产生。当这些步骤与时间相关时，大复合物的形式可能反映了疾病的早期阶段。

根据上述考虑，我们观察到缺血时间窗较短的患者大分子量 cTnITC 复合物的占比更高。

至于损伤的严重程度，我们观察到 CK-MB 峰值越大的患者中 cTnITC 的比例越高。CK-MB 水平升高与缺血时间间隔缩短相关，这可能是损伤越严重，症状负担越重。

尽管缺血时间窗中位数超过一天，我们仍然观察到 cTn 根据缺血时间窗和持续损伤严重程度的释放有差异。在早期取样的情况下，特别是在大面积梗死的情况下，酶的能力可能不足以导致整体降解，因此大分子量 cTnITC 比例变高。本研究提出了 cTn 的组成与心肌梗死面积有关。由于还将 cTn 形式与临床变量（如缺血时间窗和损伤严重程度）联系起来，因此强调 cTn 形式可反映 NSTEMI 患者的潜在疾病状态。目前，肌钙蛋白检测虽然已经达到超敏水平，但不能进行 NSTEMI 患者的鉴别诊断。因此，可开发一种免疫分析方法，根据 cTn 特征及组成进行临床分析，可鉴别 NSTEMI 患者的“早期”或“晚期”损伤，并能及时指导治疗和预后。

同时，一种能够区分 cTn 形式的检测方法可进一步提高特异性。如最近对晚期肾脏疾病患者和健康马拉松运动员的研究所示，他们的 cTnT 由小片段 cTnT 组成。因此，一种以针对 cTn 形式为重点的试剂可能会对区分 I 型 MI 或其他病因方面发挥重要作用。

4. 结论

本研究描述了在 NSTEMI 患者中，cTnI 复合物和大 cTnITC 复合物在 CVS 内部及 CVS 和外周之间的浓度差异，提供了证据证明心肌梗死后 cTn 组成与病变心肌面积之间的联系。此外，观察到 cTnI 组成与症状出现时间和持续损伤程度中显示差异，这表明 cTnI 组成可部分反映 NSTEMI 患者的疾病状况。这一特征可改善生物标志物诊断，并促进 NSTEMI 患者和其他病因（可导致 cTn 释放）之间的区分。