

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.13.010

HDL 影响冠心病患者血小板 ox-LDL 诱导活化的体外分析*

李运田,杜大勇,杨升华,柳 杨

(中国人民解放军第三〇五医院心脏中心,北京 100017)

[摘要] 目的 探讨高密度脂蛋白(HDL)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的人血小板活化的影响。方法 将洗涤血小板按照等体积分为 3 组, I 组加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HDL; II、III 组均加入 PBS, 3 组均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下孵育 15 min。I、II 组加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL; III 组加入 PBS, 3 组均在 37 $^{\circ}\text{C}$ 再孵育 15 min。应用流式细胞仪检测 3 组 CD62P 表达水平, 应用透射电镜观察 3 组血小板的形态结构。结果 3 组的血小板 CD62P 表达率差异有统计学意义($P < 0.05$), 且 II 组(29.26 ± 5.91)% > I 组(15.37 ± 1.49)% > III 组(2.05 ± 0.85)%; 3 组的血小板 CD62P 平均荧光强度(MFI)存在差异($P < 0.05$), 且 II 组(3.97 ± 0.64) > I 组(2.51 ± 0.53) > III 组(1.50 ± 0.10)。II 组血小板脱颗粒比 I 组更明显, III 组未发生脱颗粒。结论 HDL 能显著抑制 ox-LDL 体外诱导的血小板活化。

[关键词] 冠心病; 脂蛋白类, HDL; 血小板; 氧化低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)13-1756-03

Analysis in vitro of high-density lipoprotein affecting platelet activation induced by oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary heart disease*

Li Yuntian, Du Dayong, Yang Shenghua, Liu Yang

(Heart Center, 305 Hospital of PLA, Beijing 100017, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of high-density lipoprotein (HDL) on platelet activation induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) in vitro. **Methods** Washed platelets separated from the patients with coronary heart disease were divided into three groups, the group I (adding HDL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the group II and group III (adding PBS). The platelets of three groups were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min. Then, the group I and II were added with ox-LDL 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the group III was added with PBS. The three groups were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min again. The expression levels of CD62P were assessed by flow cytometry and compared among three groups. The structures of platelets were observed by transmission electron microscope (TEM) and compared among three groups. **Results** The CD62P expression rates were statistically different among three groups ($P < 0.05$) and the sequence was the group II (29.26 ± 5.91)% > the group I (15.37 ± 1.49)% > the group III (2.05 ± 0.85)% ($P < 0.05$). The mean fluorescence intensities (MFI) of CD62P were also statistically different among three groups ($P < 0.05$) and the sequence was the group II (3.97 ± 0.64) > the group I (2.51 ± 0.53) > the group III (1.50 ± 0.10) ($P < 0.05$). The degranulation degree in the group II was significantly more than that in the group I ($P < 0.05$), whereas the group III had no degranulation. **Conclusion** HDL inhibits can significantly the platelet activation induced by ox-LDL in vitro.

[Key words] coronary disease; lipoprotein, HDL; platelet; oxidized low-density lipoprotein; atherosclerosis

冠心病患者的病理基础是动脉粥样硬化, 而研究已证实循环氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)水平与动脉粥样硬化程度呈正相关^[1]。病理生理学研究证实 ox-LDL 可以通过多种途径激活血小板, 进而导致冠状动脉的急性或亚急性血栓栓塞。最近临床研究也证实, 在急性冠脉综合征患者体内 ox-LDL 与血小板相互作用形成的复合体水平明显增加^[2]。由于高密度脂蛋白(HDL)能够作用于血小板上清道夫受体 BI(SRBI), 从而抑制其活化^[3]。但是目前基础研究对于 HDL 是否具有抑制 ox-LDL 诱导血小板活化的功能尚缺乏, 因此本研究对 HDL 体外抑制 ox-LDL 诱导的血小板活化能力进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 高密度脂蛋白(密度 1.06~1.21 g/mL)、氧化低密度脂蛋白(北京协生生物科技有限责任公司); 无钙磷酸盐缓冲液(PBS); 抗人 CD61-FITC、抗人 CD62P-PE、PE 标记

鼠 IgG1, k 同型对照(eBioscience 公司, 美国); 前列腺素 E1 (PGE1, 大连美仑生物科技有限公司); HEPES 粉末(Amresco 公司, 美国); Tyrode's 液(北京迈晨生物科技有限公司); 离心机(Heraeus Labofuge400R, 德国); 自动血细胞计数仪(Beckman Coulter, 美国); 流式细胞分析仪(Beckman Coulter Epics XL, 美国)。超薄切片机(Leicaemuc7, 德国); 透射电镜(Hitachi, H-7650, 日本)。

1.2 标本采集及血小板分离 选取本院就诊的冠心病患者作为本研究血小板的提供者, 所有患者均符合 WHO 的冠心病临床诊断标准, 入选标准: (1) 无高血压、血液病、糖尿病、肾病等影响血小板功能的疾病; (2) 无吸烟嗜好及近 1 个月未大量饮酒; (3) 近 2 周内未服用任何影响血小板功能的药物; (4) 所有供血者均签署知情同意书。本研究经本院伦理委员会批准。所有患者均在清晨空腹状态下, 从肘正中静脉采血 28 mL, 弃

* 基金项目: 全军保健科研基金项目(12BJZ29)。 作者简介: 李运田(1965—), 博士, 主治医师, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

去前 2 mL,采血过程中注意不使用压脉带,注射器抽吸应均匀迅速。血液样本立即贴壁轻轻注入盛有 ACD 抗凝剂的离心管中,抗凝剂 ACD 与全血体积比为 1:6,颠倒混匀。

1.3 洗涤血小板制备 ACD 抗凝血 100 g 于室温下离心 15 min,获得富含血小板血浆(platelet-rich plasma,PRP),PRP 中加入 0.5 μM PGE 后 500 g 离心 10 min,弃上清液,以改良台式液(137 mM NaCl,2.7 mM KCl,12 mM NaHCO₃,0.4 mM NaH₂PO₄,5 mM HEPES,0.1%葡萄糖,0.35%BSA,pH7.4)轻轻悬起沉淀血小板,500 g 再离心 10 min,弃上清液,以 Tyrode's 液轻轻悬起,由自动血细胞计数仪计数,并调整其浓度为(3~5)×10⁸/mL。

1.4 洗涤血小板的分组 将洗涤血小板按照等体积分为 3 组,分别为: I 组加入 100 μg/mL HDL; II 组与 III 组均加入 PBS。3 组均置于 37 °C 环境下孵育 15 min。I 组与 II 组均加入 50 μg/mL ox-LDL; III 组加入 PBS,3 组均在 37 °C 环境下再孵育 15 min。

1.5 流式细胞仪检测 孵育后的样品分别加入抗人 CD61-FITC 及抗人 CD62P-PE 暗箱孵育 20 min,加入等量 Tyrode's 液后上机检测。以 CD61-FITC-SSLOG 圈门,保证血小板阳性率达 98%以上,各组均设同型对照以排除非特异性荧光干扰。以 CD62P 阳性表达率及平均荧光强度作为结果,用 FCS Express 4 De Novo Software(美国,2012)分析软件分析。来自不同供血者的实验重复至少 5 次。

1.6 透射电镜观察 将 3 组血小板分别经 2%的多聚甲醛加 2.5%的戊二醛前固定,新锇酸后固定,洗涤,乙醇逐级脱水,环氧丙烷树脂包埋,切片及醋酸双氧铀与柠檬酸铅染色等程序后,于透射电镜下观察各组的形态改变。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 15.0 分析软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间参数比较采用 One-Way ANOVA 分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

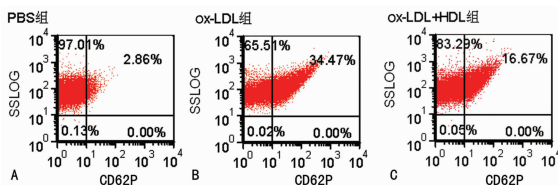
2.1 各组血小板 CD62P 表达的比较 3 组的血小板 CD62P 表达率存在差异($P < 0.05$),且 II 组(29.26±5.91)% > I 组(15.37±1.49)% > III 组(2.05±0.85)%;3 组的小血小板

CD62P 平均荧光强度(MFI)存在差异($P < 0.05$),且 II 组(3.97±0.64) > I 组(2.51±0.53) > III 组(1.50±0.10),见表 1,图 1、2。

表 1 3 组间 CD62P 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

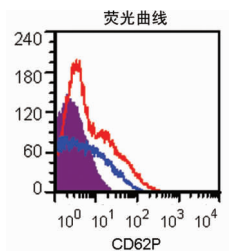
组别	CD62P(%)	CD62P(MFI)
I 组	2.05±0.85 ^a	1.50±0.10 ^b
II 组	29.26±5.91 ^a	3.97±0.64 ^c
III 组	15.37±1.49	2.51±0.53

^a: $P < 0.05$,^b: $P = 0.016$,^c: $P = 0.002$,与 I 组比较。



A: III 组(PBS 孵育); B: II 组(ox-LDL 孵育); C: I 组(ox-LDL+HDL 孵育)。

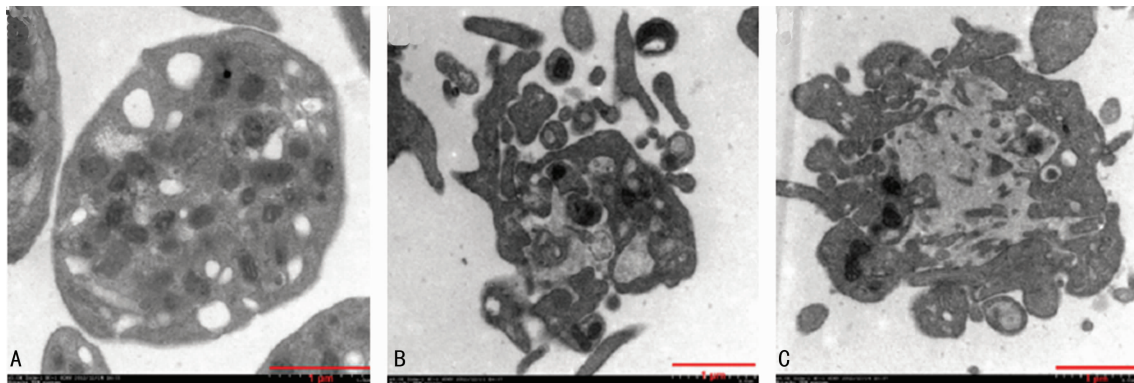
图 1 血小板 CD62P 阳性表达率



紫色: I 组; 红色: II 组; 蓝色: III 组。

图 2 3 组血小板 CD62P 表达荧光强度

2.2 各组透射电镜下血小板形态的比较 在透射电镜下,III 组的小血小板呈圆饼状,有完整包膜及环形管状系统,内部颗粒(α 颗粒、致密体等)清晰可见;II 组血小板包膜破裂,α 颗粒大量释放,I 组血小板较 III 组表现为包膜不完整,有释放现象发生,而较 II 组的小血小板脱颗粒现象明显受到抑制(图 3)。



A: III 组; B: II 组; C: I 组。

图 3 3 组血小板透射电镜下形态(×40 000)

3 讨 论

越来越多的研究表明循环中的 ox-LDL 水平与心血管疾

病具有密切关系,ox-LDL 不仅是冠心病的独立危险因素,也是动脉粥样硬化发生、发展的重要危险因素。已有基础研究发现

ox-LDL 不仅参与泡沫细胞的形成,损伤内皮功能,而且也是血小板的独立活化剂^[4]。ox-LDL 主要通过与其血小板表面多种受体相作用,如:SR-A^[5]、CD36^[6]、Lox-1^[4]、PAF-receptor^[7]和 SR-PSOX/CXCL16^[8],进而启动信号转导机制,上调血小板 CD62P 表达^[5],促进血小板聚集^[9],因此 ox-LDL 诱导血小板活化在动脉粥样硬化的发生、发展及急性冠脉综合征(ACS)的发生中起重要作用。临床研究也显示,在 ACS 患者体内及支架急性再狭窄时,循环中的 ox-LDL 的水平均会明显增加^[10]。此外有研究表明,循环血液中突然升高的 ox-LDL 是心血管事件发生的预测因子^[11],并且 ox-LDL 与血小板的相互作用致血小板活化在 ACS 中起重要作用^[2]。HDL 不仅可逆向转运胆固醇、改善内皮功能、抗炎、抗氧化,而且还可抑制血小板活化^[3]。有研究证实,SR-BI 也表达于鼠血小板表面,并且发现 SR-BI 缺乏的鼠体内未酯化的胆固醇升高。利用 SR-BI 基因敲除小鼠研究表明,SRBI 受体缺乏,会导致脂质代谢障碍,重要的是还会导致血小板高反应性及脂质超载^[12]。进一步研究发现,血小板的高反应性与人的 SR-BI 基因的不同密切相关^[13]。最新研究证实,HDL 是通过与血小板上 SR-BI 受体结合从而发挥抑制血小板活化的^[14]。然而冠心病患者血小板受 ox-LDL 诱导活化后能否被 HDL 所抑制目前尚缺乏充足临床研究证实,因此本研究选取血小板 CD62P 为靶点,在体外分析 ox-LDL 刺激血小板后 HDL 的抑制效应。

研究结果显示,HDL(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能够抑制 ox-LDL 诱导的冠心病患者血小板的活化过程,且此效应与 CD62P 受体水平有相关性,表现为 I 组的 CD62P 表达低于 II 组,但是高于 III 组;同时 II 组血小板脱颗粒比 I 组更明显,III 组未发生脱颗粒,这表明 HDL 虽能够明显抑制 ox-LDL 诱导的血小板活化,但血小板活化水平仍较 PBS 对照组高。本研究结果也提示 HDL 抑制 ox-LDL 诱导的血小板活化可能是心血管事件保护作用的重要原因之一。然而由于本研究是体外研究,因此在体内是否也存在 HDL 可抑制 ox-LDL 诱导的活化尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, et al. Circulating oxidized low density lipoprotein levels: a biochemical risk marker for coronary heart disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(10): 2243-2247.
- [2] Stellos K, Sauter R, Fahrleitner M, et al. Binding of oxidized low-density lipoprotein on circulating platelets is increased in patients with acute coronary syndromes and induces platelet adhesion to vascular wall in vivo—brief report [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 2017-2020.
- [3] Brodde MF, Korporaal SJ, Herminghaus G, et al. Native high-density lipoproteins inhibit platelet activation via scavenger receptor BI [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215(2): 374-382.
- [4] Korporaal SJA, Gorter G, van Rijn HJM, et al. Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low density lipoprotein [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1): 1-7.
- [5] Collot-Teixeira S, Delorenzo F, McGregor JL. Scavenger receptor A and CD36 are implicated in mediating platelet activation induced by oxidized low-density lipoproteins [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(12): 2491-2492.
- [6] Chen K, Febbraio M, Li W. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein [J]. *Circ Res*, 2008, 102(12): 1512-1519.
- [7] Chen R, Chen X, Salomon RG, et al. Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2): 363-371.
- [8] Seizer P, Stellos K, Selhorst G, et al. CXCL16 is a novel scavenger receptor on platelets and is associated with acute coronary syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 105(6): 1112-1114.
- [9] Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(5): 844-848.
- [10] Naruko T, Ueda M, Ehara S, et al. Persistent high levels of plasma oxidized low-density lipoprotein after acute myocardial infarction predict stent restenosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 877-883.
- [11] Tsimikas S, Bergmark C, Beyer RW, et al. Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(3): 360-370.
- [12] Korporaal SJ, Meurs I, Hauer AD, et al. Deletion of the high-density lipoprotein receptor scavenger receptor BI in mice modulates thrombosis susceptibility and indirectly affects platelet function by elevation of plasma free cholesterol [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 34-42.
- [13] Vergeer M, Korporaal SJ, Franssen R, et al. Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(1): 136-145.
- [14] Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study) [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(7): 1162-1631.