

•临床研究•

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0060-04

高胆固醇血症治疗前后血小板立体计量学参数的变化

马丽萍, 徐立卓, 杨玉芳¹, 尹松梅, 聂大年, 李志雄, 谢双峰, 冯坚红

(中山大学孙逸仙纪念医院内科, 广东省广州市 510120; 1. 广州市第一人民医院, 510180)

[关键词] 高胆固醇血症; 动脉粥样硬化; 血小板; 普伐他汀

[摘要] 为研究高胆固醇血症对血小板超微结构及立体计量学参数的影响及调脂药普伐他汀干预后的变化, 选择高胆固醇血症患者 20 例, 口服普伐他汀 10~20 mg/d, 疗程 4~8 周, 治疗前后在透射电镜下观察血小板的超微结构并进行立体计量分析。结果发现, 治疗后高胆固醇血症患者血清总胆固醇和低密度脂蛋白水平及血小板聚集功能均明显下降, 同时血小板形态结构的立体计量学参数得以改善。结果提示, 高胆固醇血症患者血小板功能及立体计量学参数的可逆性变化可能与普伐他汀促进动脉粥样斑块消退的机制有关。

[中图分类号] R 589.2

[文献标识码] A

Changes of Platelet Quantitative Stereologic Analysis after Treatment in Patients with Hypercholesterolemia

MA Li-Ping, XU Li-Zhuo, YIN Song-Mei, YANG Yu-Fang, LI Zhi-Xun, NIE Da-Nian, XIE Shang-Fen, FEN Jian-Hong

(Sun Yat-sen Memorial Hospital, The Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

MeSH Hypercholesterolemia; Atherosclerosis; Blood Platelets; Pravastatin

ABSTRACT **Aim** To study the effect of hypercholesterolemia (HC) on platelet quantitative stereologic parameters and its change after treatment by pravastatin. **Methods** 20 patients with HC were selected and treated with pravastatin 10~20 mg/d for 4~8 weeks. The changes of platelet ultrastructure were observed by electron microscopic and analysed with quantitative stereologic method. **Results** After 4~8 weeks treatments, the levels of serum total cholesterol (TC) and platelet aggregation function were lowered and most of platelet quantitative stereologic parameters were improved. **Conclusion** Altered platelet function and quantitative stereologic parameters with pravastatin therapy in patients with HC can be corrective with its mechanism of enhancing atherosclerosis regression.

在血栓性疾病或血栓前状态, 血小板常常被激活, 且在血小板活化过程中, 尚伴有血小板形态的改变。本文应用立体计量学方法分析高胆固醇血症 (hypercholesterolemia, HC) 患者血小板超微结构变化并进行动态观察。

1 对象和方法

1.1 病例选择

[基金项目] 广东省卫生厅科研基金(96068)资助

[作者简介] 马丽萍, 女, 1962 年 2 月出生, 山西长治人, 内科学硕士研究生, 主治医师, 现从事内科血液专业, 主要研究方向为“血栓病”, 目前获卫生部基金资助, 承担“血小板与动脉粥样硬化”有关方面的研究, 已发表相关论文多篇。徐立卓, 女, 1940 年 12 月出生, 上海人, 教授, 硕士生研究生导师, 从事内科血液专业 20 余年, 主要研究方向为“血栓病”, 已承担卫生部、广东省卫生厅等多项课题研究, 发表相关论文多篇。

高胆固醇血症 (HC) 患者 60 例, 均为本院门诊病人, 其中男性 27 例, 女性 33 例, 平均年龄 54.5 岁。其中 20 例完成普伐他汀治疗 8 周。入选病例符合 1997 年 6 月中华心血管病杂志^[1]血脂异常防治建议规定的 HC 标准, 血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) ≥ 6.24 mmol/L (240 mg/dl) 和/或低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoproteins cholesterol, LDLC) ≥ 4.16 mmol/L (160 mg/dl), 临床上排除糖尿病、甲状腺功能低下、肝肾功能不全等引起的继发性 HC。

正常体检者 10 例, 男性 5 例, 女性 5 例, 平均年龄 46 岁。

1.2 观察方法

高胆固醇血症 (HC) 患者口服普伐他汀 (中美上海施贵宝制药有限公司产品) 10~20 mg/d, 晚饭后一次顿服, 期间注意避免高脂饮食, 分别在服药前、服药后第 4 周及第 8 周时各采血一次。

1.3 观察项目

血脂水平测定采用酶法,由本院生物化学研究室完成。按透射电镜要求制备血小板标本^[2],在电镜(电子显微镜 H-60 型,日本)下观察拍片(彩色摄像机:JVC KY-F30B3-CCD,日本)。应用图像分析仪(全自动图象分析系统:KONTRONIBAS 2.5,德国)测量血小板三维结构参数,即立体计量学^[3]。

1.4 统计学方法

应用“SPSS/PC+”软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$),两样本比较用 t 检验界限。 $P \leq 0.05$ 为显著性差异界限, $P \leq 0.01$ 为非常显著性差异界限。

2 结果

2.1 血脂水平变化

由表 1 (Table 1) 可知,治疗前 HC 患者 TC、LDLC 较正常人显著升高($P < 0.01$), HDLC 亦较正常人升高,但无统计学差异。服用普伐他汀 4 周后, TC、LDLC 下降,与治疗前比较有显著性差异($P < 0.01$);治疗 8 周后 TC、LDLC 也下降,与治疗前相比亦有显著性差异($P < 0.05$)。治疗后 8 周与治疗前 4 周各指标比较无显著性差异($P > 0.05$)。治疗 4 周

和 8 周后 HDLC 水平与治疗前相比均有不同程度的下降,但无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 HC 患者经普伐他汀治疗后血脂水平的改变

Table 1 Changes of serum lipid in HC group after treatment with pravastatin ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Index	Normal group (n= 10)	HC group		
		before treatment (n= 60)	after 4 weeks (n= 20)	after 8 weeks (n= 20)
TC	5.04 ± 0.70	7.40 ± 0.81 ^b	5.88 ± 0.73 ^d	5.72 ± 0.66 ^d
TG	0.58 ± 0.06	1.19 ± 0.44 ^b	0.99 ± 0.40	1.09 ± 0.30
LDLC	3.32 ± 0.50	5.07 ± 0.65 ^b	3.95 ± 0.62 ^d	3.76 ± 0.55 ^d
HDLC	1.56 ± 0.20	1.76 ± 0.20 ^a	1.53 ± 0.16 ^c	1.48 ± 0.19

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with normal group, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with HC group (before treatment).

2.2 血小板透射电镜的变化

治疗前 HC 患者血小板形态不规则,聚集成团,有伪足形成,并可见气球样血小板(图 1A, Figure 1A); α 颗粒分布于血小板四周,数目减少(图 1B, Figure 1B)。经普伐他汀治疗后血小板伪足减少,气球样血小板消失(图 2A, Figure 2A); α 颗粒密度增多,散在分布(图 2B, Figure 2B)。

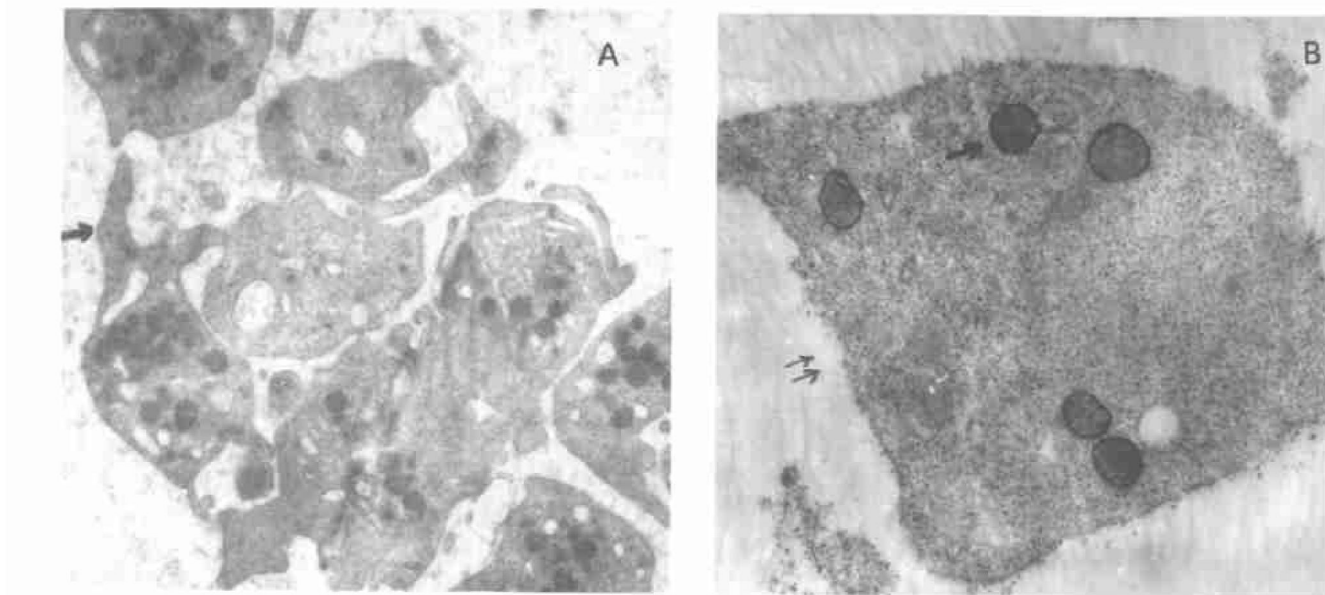


图 1 HC 患者治疗前血小板形态。A: $1 \times 8\,000$; B: $1 \times 20\,000$

Figure 1 Morphosis of the platelet before treatment in patients with hypercholesterolemia

2.3 血小板立体计量学参数的变化

选择 5 例 HC 患者血标本,每例取 2 张超薄切片,在低倍镜下选取一张清晰的切片,低倍($1 \times 8\,000$)随机拍摄 8 张血小板照片,总计血小板照片张

数为 40 ($n = 40$);高倍镜($1 \times 20\,000$)随机拍摄 15 照片,每张含有一个血小板完整截面,总计照片张数为 75,计算 α 颗粒在 75 个完整血小板中所占量。结果发现,血小板平均直径、 α 颗粒的平均直径、平均体

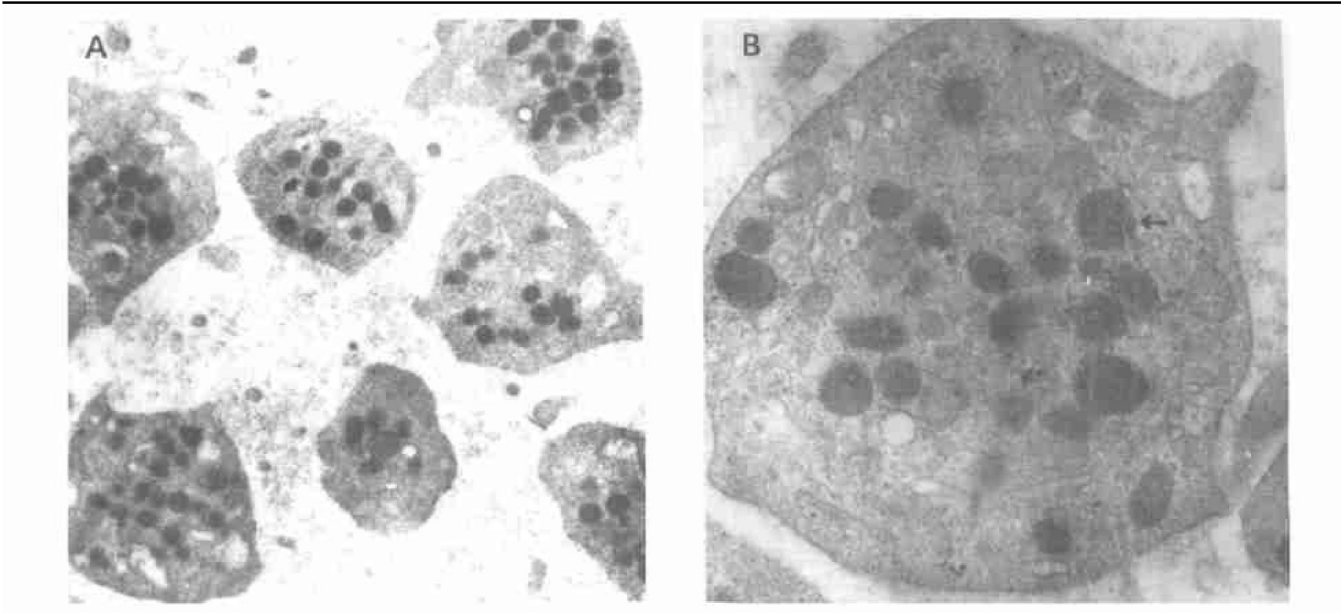


图2 HC患者治疗后血小板形态。A: 1×8 000; B: 1×20 000
Figure 2 Morphosis of the platelet after treatment in patients with hypercholesterolemia

积、平均表面积较正常组显著增加($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 其余指标与正常组无显著性差异($P > 0.05$)。但数密度较正常组偏低, 说明其有降低趋势。

经普伐他汀治疗后, 血小板大小及 α 颗粒的平均直径、平均体积、平均表面积较治疗前显著下降, α 颗粒数密度显著增加(表2, Table 2)。

表2 HC患者经普伐他汀治疗后血小板立体计量学参数的变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 2 Changs of platelet quantitative stereologic parameters in HC group after treatment with pravastatin

Groups	Platelet (n= 40)			α granulation (n= 75)				
	D (μm)	V (μm^3)	S (μm^2)	Nv (μm^3)	Vv	D ($\mu\text{m} \times 10^{-3}$)	V ($\mu\text{m}^3 \times 10^{-3}$)	S ($\mu\text{m}^2 \times 10^{-2}$)
Normal	1.24 \pm 0.21	1.40 \pm 0.39	5.52 \pm 0.90	2.46 \pm 0.51	0.13 \pm 0.04	2.16 \pm 0.20	6.25 \pm 1.24	15.86 \pm 3.47
HC								
before treatment	1.44 \pm 0.28 ^a	1.49 \pm 0.12	5.60 \pm 0.92	2.13 \pm 0.45	0.15 \pm 0.04	2.54 \pm 0.23 ^b	8.86 \pm 1.42 ^b	21.86 \pm 4.97 ^b
the 4th week	1.24 \pm 0.22 ^c	1.43 \pm 0.34	5.20 \pm 0.90 ^c	3.00 \pm 0.59 ^c	0.14 \pm 0.04	2.12 \pm 0.27 ^d	5.51 \pm 1.14 ^d	14.68 \pm 4.70 ^d
the 8th week	1.20 \pm 0.15 ^c	1.30 \pm 0.31 ^c	5.30 \pm 0.78	3.59 \pm 0.69 ^c	0.16 \pm 0.03 ^c	2.15 \pm 0.22 ^d	5.13 \pm 1.64 ^d	14.24 \pm 3.56 ^d

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with normal group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with before treatment. D: mean diameter, V: mean volume, S: mean Nv: numerical density, Vv: volume density

3 讨论

血胆固醇升高是形成动脉粥样硬化和血栓的危险因素。升高的胆固醇使血管内皮细胞损伤、胶原暴露, 激活了循环中相对静止的血小板, 活化的血小板通过其表面膜糖蛋白受体和血浆蛋白、血管壁粘附蛋白的相互作用, 粘附、聚集于血管损伤处, 从而导致血栓形成。本文观察了高胆固醇血症对血小板超微结构及立体计量学参数的影响以及胆固醇降低后的相应变化, 探讨调脂药普伐他汀降脂以外的其它有益功效。

血小板形态改变是血小板活化的标志之一。在

透射电镜下 HC 患者血小板的形态改变为大量空泡变性的血小板、聚集性的血小板, 血小板胞浆内颗粒大部分或全部释放。但这种采用切片的方法在电镜下对血小板某一部分的形态结构进行定性分析, 具有片面性和局限性^[3]。近二十年来采用细胞计量即立体计量学的方法^[4], 克服了上述缺点, 它是取大量的二维图像(反映细胞不同的截面), 在图像上进行面积、长度、数目等的测量及计数, 然后根据二维图像与三维结构的数学关系进行计算, 最后得出细胞三维结构的参数。本文平均体积、平均直径、平均表面积是描述血小板大小的参数; 数密度是反映单位

体积血小板中 α 颗粒的数目; 体密度是表示 α 颗粒的体积在单位体积血小板中占有的相对大小或比例。综合分析这几个参数, 能够更准确全面地了解血小板的形态结构变化, 从而推断出血小板是否发生了生理或病理变化。本文是从 60 例 HC 患者中选择 5 例 HC 患者治疗前后的血标本进行立体计量学分析, 所需例数已在预实验中经过计算, 相对标准误差 $< 5\%$ 。统计结果表明, HC 患者血小板平均直径、平均体积、平均表面积较正常对照组升高, 随着血胆固醇水平的降低, 血小板平均直径亦随之下降, 说明 HC 患者血小板增大, 处于高敏状态, 并因此具有与正常血小板不同的形态特征。 α 颗粒是血小板十几种活性物质的主要贮存器之一, 血小板的释放应早期表现为 α 颗粒的增大、肿胀失去圆球形结构, 最终颗粒减少以至消失, 与本研究 HC 患者治疗前所见血小板胞浆内颗粒释放以及 α 颗粒数密度减少相符。尹松梅等^[5]曾观察到 HC 时血小板膜表面颗粒膜糖蛋白(CD62P) 表达量增高, 后者存在于血小板 α 颗粒中, 普伐他汀治疗后其表达量下降, 表明 HC 患者 α 颗粒数密度减少可能和 α 颗粒释放增多有关, 从而证明血小板形态改变和血小板功能密切相关。

大规模的临床实验证明, HMG-COA 还原酶抑制剂能促进动脉粥样硬化斑块消退、降低心血管事件的发生^[6]。本实验 HC 患者服用普伐他汀后血小板及 α 颗粒的立体计量学参数均有不同程度的恢复, 表明普伐他汀具有逆转血小板超微结构和功能的作用, 可能与调脂药物促进动脉粥样硬化斑块消退的机理有关。

参考文献

- [1] 中华心血管病杂志编委会. 血脂异常防治建议. 中华心血管病杂志, 1997, 25(3): 169- 172
- [2] 扬 果. 血小板电镜标本的制备. 中华物理医学杂志, 1985, 7(1): 39
- [3] 徐根兴. 细胞形态计量学[M]. 见徐根兴. 定量细胞学和细胞化学技术. 吉林科学技术出版社, 1993, 35- 68
- [4] 申 洪. 密度参数测算方法、尺寸参数测算方法、形状参数测算方法[M]. 见: 申 洪, 沈忠英. 实用生物体视学技术. 中山医科大学出版社, 1997, 64- 141
- [5] 松 梅, 马丽萍, 徐立卓, 等. 普伐他汀调脂过程中 P- 选择素表达的变化[J]. 中华血液学杂志, 1998, 19: 461- 463
- [6] Robert S, Rosenson MD, Christine C, et al. Antiatherothrombotic properties of statins[J]. JAMA, 1998, 279: 1 643- 650

(此文 2000- 05- 03 收到, 2000- 11- 23 修回)

(此文编辑 文玉珊, 胡必利)