

ox-LDL 对血小板基质金属蛋白酶诱导剂释放的影响

杨升华¹, 杜大勇¹, 柳杨¹, 薛峰², 路怀志², 张雁斌², 王双双², 李运田¹

(1. 南方医科大学附属解放军第 305 医院心脏中心, 北京市 100017; 2. 南方医科大学研究生院, 广东省广州市 510515)

[关键词] CD147; 氧化型低密度脂蛋白; 血小板

[摘要] **目的** 探讨氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)对血小板基质金属蛋白酶诱导剂(EMMPRIN, 又名 CD147)释放的影响。**方法** 分别以终浓度 25 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L ox-LDL, 对照组(磷酸盐, PBS)和 100 mg/L 天然 LDL 体外刺激洗涤血小板, 以流式细胞仪检测血小板上 CD147、 α 颗粒膜糖蛋白(CD62P)的表达, 酶联免疫吸附法检测血小板上清液中可溶性 CD147(sCD147)含量, 共聚焦显微镜、透射电子显微镜观察血小板形态改变及颗粒释放。同时, 阻断 LOX-1 受体后, 再以流式细胞仪检测 ox-LDL(50 mg/L 和 100 mg/L)刺激的血小板 CD147 表达。**结果** 25 mg/L、50 mg/L 和 100 mg/L ox-LDL 处理组血小板 CD147 相对平均荧光强度(rMFI)(1.01 ± 0.06 、 1.18 ± 0.07 、 1.24 ± 0.08)均高于对照组(0.86 ± 0.10 , $P < 0.01$)和天然 LDL 组(0.89 ± 0.11 , $P < 0.01$)。LOX-1 阻断后, ox-LDL(50 mg/L 和 100 mg/L)处理组血小板 CD147 rMFI(0.96 ± 0.08 、 1.05 ± 0.07)均下降($P < 0.001$)。ox-LDL 处理后, 血小板形态明显改变, 并伴随颗粒释放。**结论** ox-LDL 通过与 LOX-1 结合诱导了血小板 CD147 的释放。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein on the Release of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer on Platelets

YANG Sheng-Hua¹, DU Da-Yong¹, LIU Yang¹, XUE Feng², LU Huai-Zhi², ZHANG Yan-Bin², WANG Shuang-Shuang², and LI Yun-Tian¹

(1. Department of Cardiology, 305th Hospital of PLA Affiliated to Southern Medical University, Beijing 100017, China; 2. Department of Postgraduation, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] CD147; Oxidized Low Density Lipoprotein; Platelet

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of ox-LDL on platelet extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN, CD147) release. **Methods** Washed platelets were incubated with ox-LDL (final concentrations of 25 mg/L, 50 mg/L or 100 mg/L ox-LDL, respectively), PBS (as control) or 100 mg/L native LDL in vitro, and the expressions of CD147 and alpha-granule membrane glycoprotein (CD62P) on platelets were detected by flow cytometry. Soluble CD147 from the platelets was assessed by an enzyme-linked immunosorbent assay. Laser scanning microscopy (LSM) and transmission electron microscopy (TEM) were used to visualize the morphological changes and granule release, respectively, from the platelets. In parallel, the expression of CD147 on the platelets pre-incubated with anti-LOX-1 antibody was detected by flow cytometry. **Results** The CD147 relative mean fluorescence intensity (rMFI) from the groups of 25 mg/L, 50 mg/L or 100 mg/L ox-LDL (1.01 ± 0.06 , 1.18 ± 0.07 , 1.24 ± 0.08 , respectively) were higher than that from the control group (0.86 ± 0.10 , both $P < 0.01$) or native LDL group (0.89 ± 0.11 , both $P < 0.01$). The CD147 rMFI (0.96 ± 0.08 , 1.05 ± 0.07) from the platelets incubated with ox-LDL (50 mg/L or 100 mg/L) prior to pre-incubation with anti-LOX-1 antibody decreased compared with the 50 mg/L or 100 mg/L ox-LDL-treated platelets, respectively (both $P < 0.001$). After exposure to ox-LDL, morphological changes and granule release in the platelets were visualized by LSM and TEM. **Conclusion** ox-LDL induces the release of platelet CD147 via binding to LOX-1.

[收稿日期] 2013-10-14

[基金项目] 全军保健科研基金项目(12BJZ29)

[作者简介] 杨升华, 硕士, 研究方向为冠心病的发病机制, E-mail 为 yangshenghua2005@126.com。杜大勇, 硕士, 副主任医师, 研究方向为斑块易损机制, E-mail 为 sxydyd@yahoo.com.cn。通讯作者李运田, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 Liyt305@126.com。

基质金属蛋白酶诱导剂 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN, 又名 CD147), 可诱导参与动脉粥样硬化的多种细胞 (平滑肌细胞、内皮细胞、单核细胞及泡沫细胞) 分泌基质金属蛋白酶 (MMP), 而基质金属蛋白酶又可降解构成斑块的纤维帽主要成分细胞外基质, 从而导致斑块不稳定, 进而引发急性心血管事件^[1,2]。最近, CD147 被发现也存在于血小板 α 颗粒和开放管道系统 (OCS) 中, 并且可活化血小板, 促进单核细胞表达 MMP-9^[3]。ox-LDL 促进了冠状动脉血管平滑肌细胞及单核细胞分泌 CD147^[4]。然而, ox-LDL 是否可促进血小板 CD147 释放目前尚不清楚。LOX-1 是活化血小板表面的重要受体之一, 可以介导 ox-LDL 与血小板的相互作用。因此, 本实验体外以 ox-LDL 干预血小板, 并且进一步以 LOX-1 抗体阻断 LOX-1 受体, 检测了血小板表面 CD147 的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

ox-LDL (10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 氧化 LDL)、天然 LDL (native LDL) (北京协生生物科技有限责任公司); PGE1 (大连美仑生物科技有限责任公司); 抗人 CD61-FITC、抗人 CD147-PE、抗人 CD62P-PE、PE 标记鼠 IgG1, k 同型对照 (eBioscience 公司, 美国); HEPES 粉末 (Amresco 公司, 美国); BSA 粉末 (西班牙); Tyrode's salts (北京迈晨生物科技有限责任公司); 人 CD147 ELISA 试剂盒 (Abcam, Cambridge, UK); 抗 LOX-1 抗体 (anti-LOX-1 抗体) (eBioscience 公司, 美国)。

1.2 人新鲜血采集

选取近 2 周末服用任何药物的健康成年人, 清晨空腹状态下, 以 21G 采血针及 20 mL 注射器由本院心脏中心护士于肘中静脉采血 28 mL, 弃去前 4 mL。采血过程中不使用压脉带, 注射器抽吸均匀。所采血液立即轻轻贴壁注入盛有 ACD 抗凝剂 (acid-citrate-dextrose, ACD, 2.5% 柠檬酸钠, 1.4% 柠檬酸, 2% 葡萄糖) 的离心管 (corning, 15 mL, 美国) 中, 上下轻柔颠倒 4 次混匀, ACD 抗凝剂与全血体积比为 1:6。本研究经中国人民解放军第 305 医院伦理委员会批准, 供血者已签署知情同意书。

1.3 洗涤血小板的制备

ACD 抗凝血混匀后, 以相对离心力 $100 \times g$ 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 $\mu\text{mol/L}$ PGE1 后以 $500 \times g$ 相对离心力离心 8 min, 弃上液, 以改良 Tyrode's 液 (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO_3 , 0.4 mmol/L NaH_2PO_4 , 5 mmol/L HEPES, 0.1% 葡萄糖, 0.35% BSA, pH 7.4) 轻轻悬起沉淀血小板, $500 \times g$ 离心力再离心 8 min, 弃上液, 以 Tyrode's 液轻轻悬起, 由自动血细胞计数仪 (Beckman Coulter, 美国) 计数, 并调整其浓度为 $3 \times 10^{11}/\text{L}$ 备用。

1.4 流式细胞仪检测

以终浓度 25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L ox-LDL 和 100 mg/L 天然 LDL 分别于 37°C 下孵育洗涤血小板 25 min, 以无钙磷酸盐 (PBS) 代替 ox-LDL 同条件下孵育血小板作为对照组。同时另外两组血小板预先以抗 LOX-1 抗体 (50 mg/L) 孵育 15 min, 然后加入 50 mg/L 和 100 mg/L 的 ox-LDL 于 37°C 下孵育 25 min。各组均同时加入相应抗体暗箱孵育 20 min, 立即流式细胞仪 (Beckman Coulter Epics XL, 美国) 检测。以 CD61-SSLOG 圈门, 保证血小板阳性率 >98%。各组均设同型对照以排除非特异性荧光干扰。以 CD147 相对平均荧光强度 (rMFI, 单克隆抗体/同型对照)、CD62P 阳性表达率作为结果, 用 FCS Express 4 De Novo Software (美国, 2012) 分析软件分析。

1.5 可溶性 CD147 检测

经 ox-LDL (50 mg/L 和 100 mg/L ox-LDL) 刺激后的血小板及对照组, 同时以 $700 \times g$ 离心 20 min, 收集上清, 按 ELISA 操作手册检测可溶性 CD147 含量。

1.6 共聚焦显微镜及透射电镜观察

经 ox-LDL (50 mg/L 和 100 mg/L ox-LDL) 处理后的血小板及对照组以 CD61-FITC 标记后立即共聚焦显微镜 (CarlZeiss, Jena, Germany) 下观察。处理组与对照组经前固定 (用 2% 的多聚甲醛 + 2.5% 的戊二醛), 后固定 (锇酸), 逐级脱水, 环氧丙烷树脂包埋, 超薄切片及染色 (1% 醋酸双氧铀, 柠檬酸铅) 后, 于透射电镜 (Hitachi, H-7650, Japan) 下观察血小板内部颗粒。

1.7 统计学分析

对来自不同人的血小板进行上述实验均至少 5 次。以 Kolmogorov-Smirnov test 检验正态性, 正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组比较采用单因素方差分析 (LSD, S-N-K, Dunnet); 两配对组间行配对 t 检验, 不服从正态分布的数据采用 Kruskal-Wallis H test 或 Wilcoxon's matched pairs signed-ranks test。以 SPSS 13.0 作为分析软件。

2 结果

2.1 ox-LDL 诱导了血小板 CD147 释放

流式细胞检测提示,经终浓度为 25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 的 ox-LDL 刺激后,血小板 CD147 相对平均荧光强度(rMFI)分别为 1.01 ± 0.06 、 1.18 ± 0.07 、 1.24 ± 0.08 ,均明显高于对照组(0.86 ± 0.10)和天然 LDL 处理组(0.89 ± 0.11 ; $P < 0.01$);并且 50 mg/L、100 mg/L ox-LDL 处理组血小板 CD147 rMFI 均高于 25 mg/L ox-LDL 处理组($P < 0.01$),而 50 mg/L、100 mg/L ox-LDL 处理组血小板 CD147 rMFI 未见统计学差异($P = 0.09$);天然 LDL 组(0.89 ± 0.11)与对照组(0.86 ± 0.10)相比,同样未见统计学差异($P > 0.05$;图 1)。

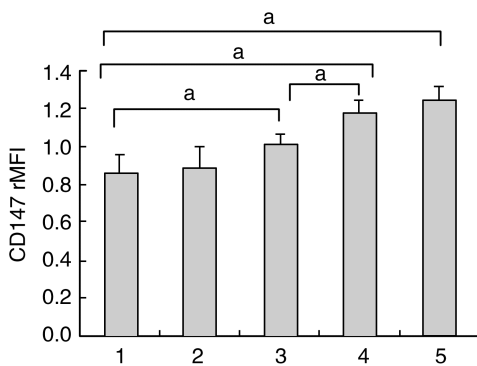


图 1. 不同浓度的 ox-LDL、天然 LDL 对血小板 CD147 相对荧光强度(rMFI)的影响。横坐标 1 代表对照组,2 代表天然 LDL(100 mg/L)组,3、4、5 分别代表 25 mg/L、50 mg/L、100 mg/L ox-LDL 组。a 为 $P < 0.01$ 。

Figure 1. Influences of ox-LDL or native LDL (100 mg/L) on platelet CD147 rMFI

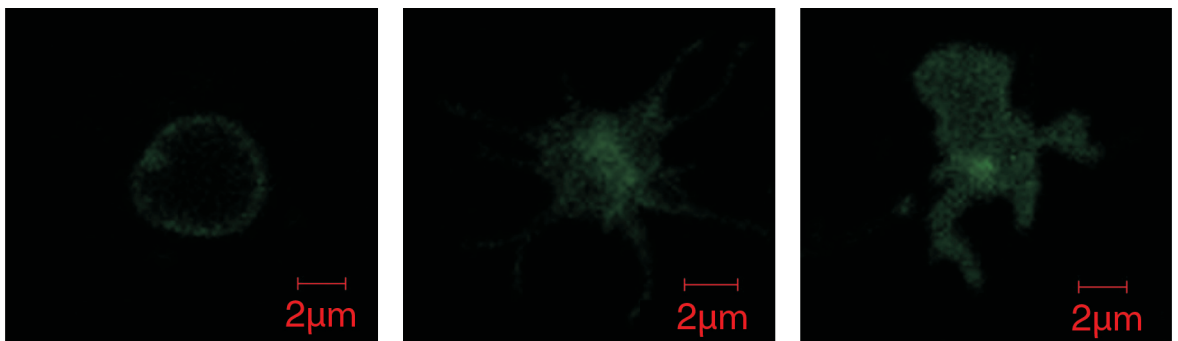


图 3. 共聚焦显微镜下 ox-LDL 对血小板形态的影响 左图为正常血小板,中图为 50 mg/L ox-LDL 刺激后的血小板,右图为 100 mg/L ox-LDL 刺激后的血小板。

Figure 3. Effect of ox-LDL on platelet morphology using laser scanning microscopy

2.3 ox-LDL 上调了血小板表面 CD62P 表达

50 mg/L 与 100 mg/L ox-LDL 组 CD62P 表达均

sCD147 含量检测显示,100 mg/L ox-LDL 组高于对照组($P = 0.040$),而 50 mg/L ox-LDL 组与对照组未见统计学差异($P = 0.612$;图 2)。共聚焦显微镜显示,ox-LDL(50 mg/L 和 100 mg/L)干预后的血小板形态发生改变并且发生聚集(图 3)。由于 CD147 存在于 α 颗粒及 OCS 中,我们通过透射电镜发现,ox-LDL 刺激后的血小板发生了明显的脱颗粒现象(图 4),更加直观表明,ox-LDL 刺激了 CD147 转移到血小板表面,从而导致血小板表面 CD147 增加。

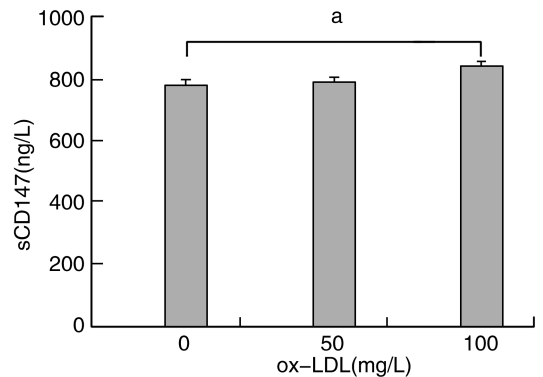


图 2. ox-LDL(50 mg/L、100 mg/L)刺激血小板后可溶性 CD147(sCD147)水平 a 为 $P < 0.05$ 。

Figure 2. ox-LDL (50 mg/L, 100 mg/L) stimulates soluble CD147 levels

2.2 阻断 LOX-1 降低了 ox-LDL 诱导的血小板表面 CD147 表达

洗涤血小板预先以 LOX-1 抗体孵育后,然后以 ox-LDL(50 mg/L 和 100 mg/L)刺激后,血小板 CD147 rMFI 分别为 0.96 ± 0.08 、 1.05 ± 0.07 ,均低于相对应的单独 ox-LDL 处理组($P < 0.001$;图 5)。

显著高于对照组($P = 0.004$),而这两个不同浓度组未见统计学差异($P > 0.05$;图 6)。然而随着 ox-

LDL 增加 CD62P 表达率似乎有下降趋势,然未见统

计学差异($P > 0.05$)。

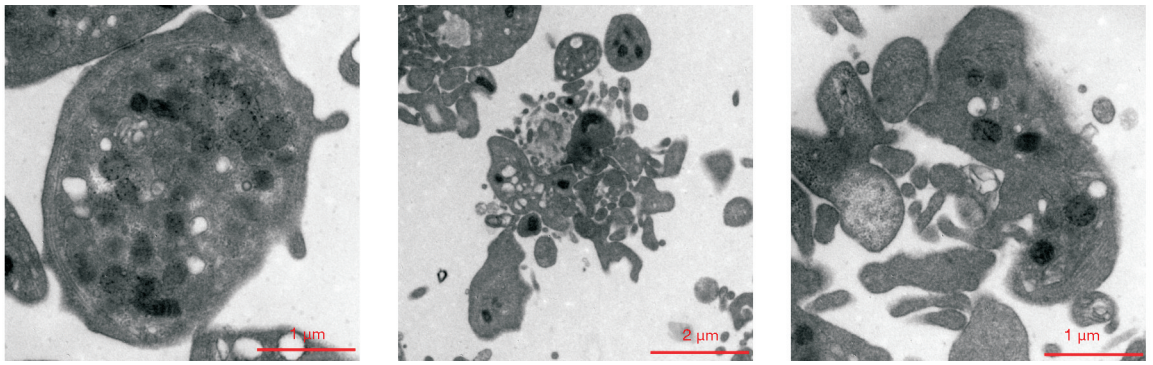


图 4. 电镜下 ox-LDL 对血小板形态的改变 左图为正常血小板(标尺为 1 μm),中图为 50 mg/L ox-LDL 刺激后的血小板(标尺为 2 μm),右图为 100 mg/L ox-LDL 刺激后的血小板(标尺为 1 μm)。

Figure 4. Morphological changes in the platelets induced by ox-LDL visualized under transmission electron microscopy

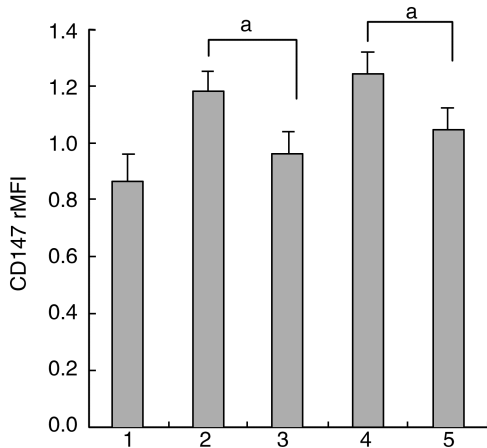


图 5. LOX-1 受体阻断对 ox-LDL (50、100 mg/L) 诱导血小板 CD147 表达的影响 1 为对照组,2 为 50 mg/L ox-LDL 组,3 为 50 mg/L ox-LDL + 抗 LOX-1 抗体组,4 为 100 mg/L ox-LDL 组,5 为 100 mg/L ox-LDL + 抗 LOX-1 抗体组。a 为 $P < 0.001$ 。

Figure 5. Influence of blocking LOX-1 receptor on ox-LDL-induced CD147 expression on platelet

3 讨论

ox-LDL 在冠心病患者循环血液中广泛存在^[5],并且可与血小板相互作用,而 CD147 可促进动脉粥样斑块不稳定^[2],因此,研究 ox-LDL 对血小板释放 CD147 的影响显得很有必要。

实验结果显示,在体外,ox-LDL 诱导了血小板 CD147 释放。流式细胞仪数据表明,分别以 50 mg/L 与 100 mg/L ox-LDL 孵育的洗涤血小板表面 CD147 表达均较对照组有明显增加,而 100 mg/L ox-LDL 组较 50 mg/L ox-LDL 组并未见显著增加,这

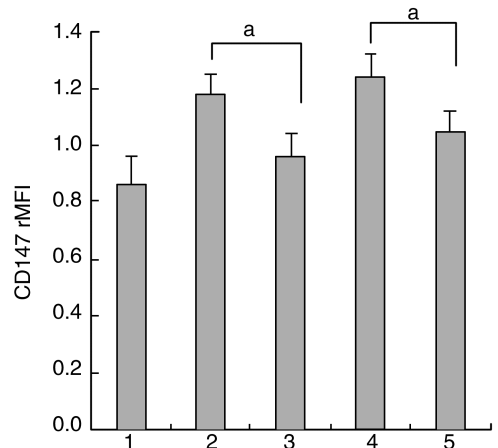


图 6. ox-LDL 对血小板 CD62P 阳性率的影响 a 为 $P < 0.001$ 。

Figure 6. Influence of ox-LDL on the platelet positive expression

种现象可能是由于随着 ox-LDL 刺激强度的增加,CD147 从血小板表面脱落进入溶液,从而使较高浓度组(100 mg/L ox-LDL)可溶性 CD147 (sCD147)含量高于低浓度组含量。实验发现,100 mg/L ox-LDL 组 sCD147 高于对照组,而 50 mg/L ox-LDL 组 sCD147 并未高于对照组,这可能说明,较高的 ox-LDL 才可使血小板 CD147 从表面脱落。ox-LDL 可导致血小板聚集^[6],通过共聚焦显微镜也清晰观察到。同时,实验也发现,ox-LDL 明显刺激了血小板 α 颗粒释放,表现为血小板 α -颗粒膜糖蛋白 CD62P 阳性率明显增加,这与以往发现一致^[7,8]。随着 ox-LDL 的浓度,CD62P 阳性率并未继续增加,这可能与表达于血小板表面的 CD62P 脱落到溶液中有关。

尽管血小板内不含 DNA,但研究表明,血小板

内含有多种 mRNA, 在外界刺激作用下, 血小板可以通过翻译使合成蛋白增加^[9], 因此本实验虽发现 ox-LDL 刺激了血小板表面表达 CD147 增加, 但 ox-LDL 是刺激了血小板 CD147 合成还是刺激了储存于 α 颗粒、开放管道系统中的 CD147 的释放尚需进一步研究。Schmidt 等^[3]认为, CD147 存在于静置的血小板 α 颗粒、开放管道系统, 在凝血酶、胶原、ADP 作用下会释放于血小板表面, 然而血小板体内是否含有合成 CD147 的 mRNA 尚不清楚。

ox-LDL 可与血小板上多个受体结合, 如: SRA、CD36、PAF-R^[10]、LOX-1、SR-PSOX/CXCL16^[11], 通过与这些受体结合, 启动血小板活化。CD147 是血小板上一种受体, 并且在血小板活化时, 从 OCS 或 α 颗粒释放表达于血小板表面^[3]。实验以 LOX-1 抗体阻断 LOX-1 与 ox-LDL 结合, 发现 ox-LDL 诱导的血小板 CD147 表达明显下降, 表明 ox-LDL 诱导血小板 CD147 的上调与 LOX-1 绑定结合 ox-LDL 密切相关。随年龄增长, 体内 ox-LDL 会相应增高^[12]。最近有文献表明, 冠心病患者循环中血小板 CD147 明显上调且与年龄强有关^[13], 体外研究实验表明, 或许可部分解释血小板 CD147 与年龄强相关的原因, 即随年龄增加而升高的体内 ox-LDL 水平或许上调了血小板 CD147, 然而, 需要进一步体内研究来证实。越来越多的证据表明, 循环中 ox-LDL 的增高与急性冠状动脉综合征 (ACS) 发生及冠心病的严重程度相关, 并且支架术后体内 ox-LDL 增高提示支架内再狭窄^[14, 15], 这提示, 循环中 ox-LDL 的升高与斑块破裂处释放有关, 然而, 无论来自斑块处释放的 ox-LDL 还是由于体内氧化与抗氧化失衡所导致的升高的 ox-LDL, 均可能与血小板接触, 从而可能导致 CD147 表达增加, 进而加快斑块的不稳定。已有研究证实, ox-LDL 与血小板之间的绑定在 ACS 患者中明显升高^[16]。

以往研究认为 ox-LDL 可通过增加斑块脂质核心进而使斑块易损, 本研究揭示了新的视角——ox-LDL 可能通过上调血小板 CD147 并且逐级放大产生更多基质金属蛋白, 进而严重降解斑块纤维帽, 从而导致斑块易损。同时 ox-LDL 与血小板相互作用上调 CD147 途径可能成为潜在的新药物干预靶点。然而, 在体内是否存在 ox-LDL 可上调血小板 CD147 尚不清楚, 期待进一步研究。

[参考文献]

[1] Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implica-

- tions for therapy [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(21): 2 004-013.
- [2] Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells implications in acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 834-841.
- [3] Schmidt R, Bültmann A, Fischel S, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets, and augments nuclear factor κ B-dependent inflammation in monocytes [J]. *Circ Res*, 2008, 102(3): 302-309.
- [4] Haug C, Lenz C, Díaz F, et al. Oxidized low-density lipoproteins stimulate extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) release by coronary smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(10): 1 823-829.
- [5] 张妍, 孟英杰, 李永军, 等. 血清铁蛋白、同型半胱氨酸及血浆氧化型低密度脂蛋白与冠状动脉病变程度的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(6): 533-535.
- [6] 任涛, 李枚娟, 王焱. 动脉粥样硬化与炎症反应关系的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(10): 1 464-467.
- [7] Chen K, Febbraio M, Li W, et al. A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein [J]. *Circ Res*, 2008, 102(12): 1 512-519.
- [8] 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(3): 363-371.
- [9] Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, et al. Protein synthesis by platelets: Historical and new perspectives [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(2): 241-246.
- [10] Blache D, Gautier T, Tietge UJF, et al. Activated platelets contribute to oxidized low-density lipoproteins and dysfunctional high-density lipoproteins through a phospholipase A2-dependent mechanism [J]. *FASEB J*, 2012, 26(2): 927-937.
- [11] 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): 1 112-114.
- [12] 黄敏, 周洪莲, 姚汉华, 等. 氧化低密度脂蛋白抗体危险性的临床评估 [J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(10): 1 284-286.
- [13] Pennings GJ, Yong ASC, Kritharides L. Expression of EMMPRIN (CD147) on circulating platelets in vivo [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(3): 472-481.
- [14] 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(4): 877-883.
- [15] 杨蕾, 王丽娟. 冠状动脉支架内再狭窄的相关因素分析 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(5): 449-453.
- [16] 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): 2 017-020.

(此文编辑 李小玲)