

## 氧化型低密度脂蛋白对急性冠状动脉综合征患者血小板聚集率的影响

章春艳, 曹 政

(湖北省十堰市太和医院心血管内科, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 氧化型低密度脂蛋白; 急性冠状动脉综合征; 血小板聚集率

[摘要] **目的** 检测急性冠状动脉综合征(ACS)患者血浆氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)和血小板聚集率的变化并探讨 ox-LDL 对 ACS 患者血小板聚集率的影响。**方法** 收集经冠状动脉造影确诊的 48 例稳定型心绞痛(SA)患者, 59 例不稳定型心绞痛(UA)患者以及 51 例急性心肌梗死(AMI)患者外周血标本, 同时收集同期住院且冠状动脉造影正常的 60 例患者外周血标本作为对照组, 通过 ELISA 检测血浆 ox-LDL 的表达水平, 通过血小板聚集仪检测血小板聚集率的变化, 通过体外实验加入 ox-LDL 检测 ox-LDL 对 ACS 患者血小板聚集率的影响。**结果** 与对照组相比, UA 组和 AMI 组血浆 ox-LDL 和血小板聚集率显著升高( $P < 0.05$ ), 而 SA 组与对照组及 UA 组与 AMI 组相比血浆 ox-LDL 和血小板聚集率并无显著性变化( $P > 0.05$ ), 同时 ACS 患者(UA 和 AMI)血浆 ox-LDL 水平与血小板聚集率呈明显正相关( $r = 0.651, P < 0.01$ ), 体外实验进一步证实 ox-LDL 可明显提高生理激动剂二磷酸腺苷(ADP)诱导的 ACS 患者血小板聚集率( $P < 0.01$ )。**结论** ACS 患者血浆 ox-LDL 水平升高与血小板高聚集状态密切相关, 高水平的 ox-LDL 可能是 ACS 患者血栓形成的重要危险因素, 因此检测 ox-LDL 水平对 ACS 患者预后判断有重要价值。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein on the Platelet Aggregation Rate in Patients with Acute Coronary Syndrome

ZHANG Chun-Yan, and CAO Zheng

(Department of Cardiology, Taihe Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Acute Coronary Syndrome; Platelet Aggregation Rate

[ABSTRACT] **Aim** To detect the levels of plasma oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and platelet aggregation in patients with acute coronary syndrome (ACS), and explore the effects of ox-LDL on the levels of platelet aggregation in patients with ACS. **Methods** A total of 158 patients with coronary heart disease (CHD) diagnosed by coronary angiography were enrolled in this study, including 48 patients with stable angina (SA), 59 patients with unstable angina (UA) and 51 patients with acute myocardial infarction (AMI). In addition, 60 hospital patients, chest pain without coronary artery stenosis, served as a control group. The levels of plasma ox-LDL were determined by ELISA, the levels of platelet aggregation were detected by turbidimetric aggregation monitoring device. **Results** Compared with control group, the levels of plasma ox-LDL and platelet aggregation were significantly increased in patients with UA and AMI, and there was no obvious change between control group and SA group, UA and AMI groups. In addition, the levels of plasma ox-LDL were positively correlated with the levels of platelet aggregation. Moreover, in vitro, ox-LDL could markedly promote ADP-induced platelet aggregation in patients with ACS. **Conclusions** Increased levels of plasma ox-LDL were associated with elevated levels of platelet aggregation in patients with ACS. Increased levels of plasma ox-LDL played a key factor role in the formation of atherothrombosis in patients with ACS, therefore, it was crucially important to detect the levels of ox-LDL in patients with ACS.

[收稿日期] 2015-10-26

[修回日期] 2016-01-13

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2013CFB470)

[作者简介] 章春艳, 主管护师, E-mail 为 hbszyzy@163.com。通讯作者曹政, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为炎症与动脉粥样硬化, E-mail 为 caozheng908@163.com。

冠心病是一种复杂的慢性进展性炎性疾病,包括纤维斑块形成及后期的斑块破裂、血栓形成等多个阶段,其中不稳定斑块的破裂进而继发血栓形成是引起急性冠状动脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)的主要原因<sup>[1]</sup>。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)是目前公认的冠心病危险因素之一,它在冠心病的起始阶段以及斑块形成阶段中起着重要作用,但其是否也参与后期血栓形成目前尚不完全清楚,尽管有研究报道外周血中升高的 ox-LDL 和 ACS 的严重程度呈明显的正相关<sup>[2]</sup>,但其具体机制不清,因此本研究检测了冠心病患者外周血 ox-LDL 和血小板聚集率,并探讨了 ox-LDL 对血小板聚集的影响,旨在研究 ox-LDL 在 ACS 血栓形成中的作用机制。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

选择 2014 年 1 月至 2014 年 7 月我院心血管内科住院的经冠状动脉造影证实为冠心病的 158 例患者作为研究对象,男 90 例,女 68 例,年龄  $62.25 \pm 5.49$  岁,其中稳定型心绞痛(stable angina, SA)患者 48 例,不稳定型心绞痛(unstable angina, UA)患者 59 例,急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者 51 例,诊断标准:①AMI:有典型的胸痛症状,典型的心电图改变,肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白显著升高;②UA:休息时自发性心绞痛,无心肌酶谱改变,心电图有 ST 段压低或 T 波改变;③SA:典型的劳力型心绞痛,无心肌酶谱改变。另选同期在本科室住院而冠状动脉造影检测阴性的非冠心病患者 60 例作为对照组,年龄  $59.34 \pm 5.01$  岁。排除标准:有严重的系统感染、肿瘤、血液系统疾病、自身免疫性疾病、免疫缺陷病以及近期一周内服用过抗血小板、抗凝和非甾体类抗炎药物者。同时本研究征得本院伦理委员会的同意。

### 1.2 样本的采集与处理

入院后 24 h 内于清晨空腹肘静脉采血,高速离心机 2500 g 离心 10 min,收集上层血浆置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

### 1.3 生物化学指标检测

甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)的测定均在全自动生化分析仪上进行,每次测定用高低值两种质控品进行质控,其质控均符合

英国 RIQAS 质控标准。

### 1.4 血浆 ox-LDL 水平检测

常规禁食 12 h 后,抽取空腹静脉血。取静脉血 4 mL,30 min 内高速离心机 2500 g 离心 10 min,分离血浆至  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存,收齐样本,检测时将血浆标本从冰箱取出并放置室温平衡,按照 ELISA 试剂盒(Usclife 公司)说明书进行操作。

### 1.5 血小板聚集率检测

将静脉血置于水平离心机中于 100 g 离心 10 min,小心取出上层富含血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP),将取出 PRP 后剩下的静脉血于水平离心机中于 1000 g 离心 10 min,小心取出上层血浆即为乏血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP)。采用 PACKS-4 型四通道的血小板测试仪(美国 Helena 公司)利用比浊法测定,预热血小板聚集仪器并用双蒸水校正四个通道的透光度,进行实验前将 PRP 和 PPP 在静息状态下预热至  $37^{\circ}\text{C}$ ,分别取 225  $\mu\text{L}$  的 PRP 和 PPP 于 AggRAM-四通道血小板聚集仪的专用玻璃比色管中,于 PRP 中分别加入终浓度为 5 mg/L 的 LDL 和 ox-LDL 预孵育 3 min,然后加入激动剂二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)使其终浓度为 3  $\mu\text{mol/L}$ ,孵育 5 min,用 PPP 对每个通道进行调零,然后将 PRP 放入通道中进行测定,5 min 后读取实验结果。血小板聚集率以血小板聚集的最大百分比表示,同一份标本重复检测 3 次,取最大血小板聚集率的平均值。

### 1.6 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差齐性检验和  $t$  检验,多组间两两比较采用  $q$  检验,指标间的相关性分析采用 Pearson 相关性检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般临床资料比较

各组在年龄、性别以及吸烟等方面均无显著性差异( $P > 0.05$ )。与对照组相比,ACS 组(包括 UA 组和 AMI 组)TC、TG 和 LDL 显著升高( $P < 0.05$ );而 TC、TG 和 LDL 在 SA 与对照组相比以及 AMI 组与 UA 组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ;表 1)。

### 2.2 外周血 ox-LDL 和血小板聚集率比较

与对照组 ox-LDL 和血小板聚集率( $318.64 \pm 35.21 \mu\text{g/L}$  和  $54.90\% \pm 6.56\%$ )相比,UA 组( $469.67 \pm 47.78 \mu\text{g/L}$  和  $77.30\% \pm 8.25\%$ )和 AMI

组 ( $511.49 \pm 54.31 \mu\text{g/L}$  和  $83.10\% \pm 10.71\%$ ) 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 SA 组 ( $341.77 \pm 40.41 \mu\text{g/L}$  和  $60.10\% \pm 7.13\%$ ) 与对照组相比以及 AMI 组与 UA 组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ ; 图 1)。

表 1. 各组患者一般临床资料

Table 1. The general clinical data in each group

项目	对照组 (n=60)	SA 组 (n=48)	UA 组 (n=59)	AMI 组 (n=51)
年龄 (岁)	59.34±5.21	60.17±5.07	62.12±5.89	63.72±6.17
男/女 (例)	35/25	26/22	34/25	30/21
TC (mmol/L)	4.11±0.62	4.28±0.77	4.81±1.11 <sup>a</sup>	4.94±1.21 <sup>a</sup>
TG (mmol/L)	1.31±0.57	1.42±0.69	1.89±0.64 <sup>a</sup>	1.83±0.55 <sup>a</sup>
LDL (mmol/L)	2.30±0.49	2.34±0.55	2.79±0.63 <sup>a</sup>	2.89±0.74 <sup>a</sup>
HDL (mmol/L)	1.46±0.41	1.43±0.39	1.35±0.55	1.34±0.47
高血压 (例)	18 (30.00%)	16 (33.33%)	25 (42.37%)	23 (45.10%)
糖尿病 (例)	10 (16.67%)	14 (29.17%)	15 (25.42%)	16 (31.37%)
吸烟 (例)	9 (15.00%)	9 (18.75%)	12 (20.34%)	10 (19.61%)

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

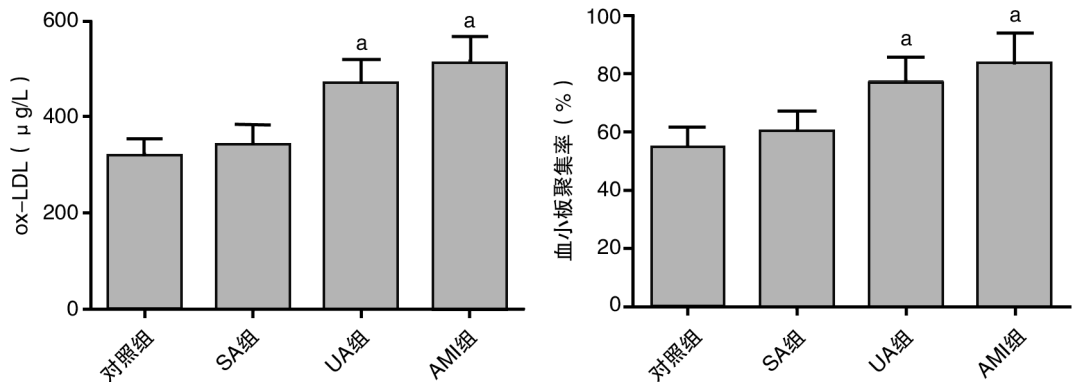


图 1. 各组外周血 ox-LDL 和血小板聚集率比较 a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

Figure 1. The levels of plasma ox-LDL and platelet aggregation in each group

2.3 ACS 患者外周血 ox-LDL 水平与血小板聚集率的相关性分析

经 Pearson 相关性分析发现, ACS 患者外周血 ox-LDL 水平与血小板聚集率呈明显正相关 ( $r = 0.651, P < 0.01$ ; 图 2)。

2.4 ox-LDL 对 ACS 患者血小板聚集率的影响

ox-LDL 单独作用于血小板时, 并不能促进血小板聚集。与 ox-LDL 单独作用于血小板相比, ADP、ADP+LDL 和 ADP+ox-LDL 显著提高血小板聚集率; 与 ADP 单独作用于血小板相比, ADP+ox-LDL 明显提高血小板聚集率 ( $P < 0.01$ ), 而 ADP+LDL 并不能提高血小板聚集率 (图 3A 和 3B); 与 ADP 单独作用于对照组血小板相比, ADP+ox-LDL 显著提高对照组血小板聚集率 ( $P < 0.01$ ; 图 3C); 而与 ADP+ox-LDL 作用于对照组血小板相比, ADP+ox-LDL 显著

提高 UA 组和 AMI 组血小板聚集率 ( $P < 0.01$ ), 而 ADP+ox-LDL 对 UA 组和 AMI 组血小板聚集率之间并无显著性差异 ( $P > 0.05$ ; 图 3D)。

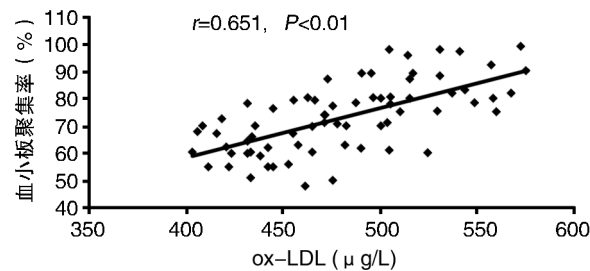
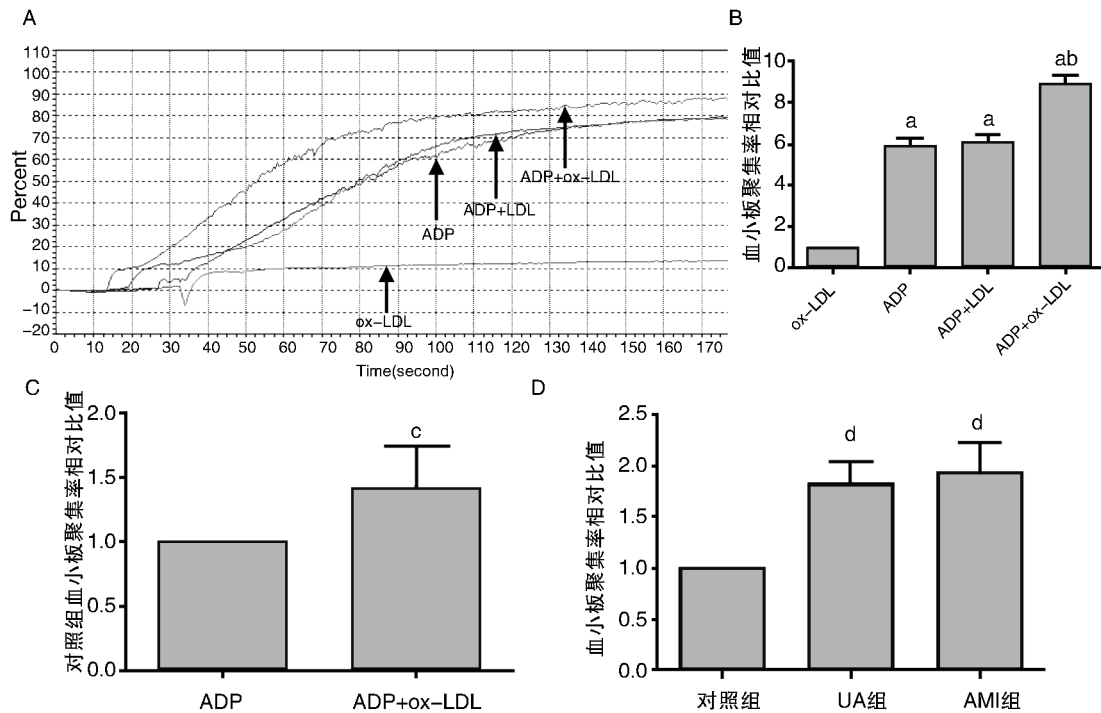


图 2. ACS 患者外周血 ox-LDL 水平与血小板聚集率的相关性分析

Figure 2. The correlation analysis of plasma ox-LDL and platelet aggregation in patients with ACS



**图 3. ox-LDL、ADP、ADP+LDL、ADP+ox-LDL 对血小板聚集率的影响** A 图代表 ox-LDL、ADP、ADP+LDL、ADP+ox-LDL 分别作用于 ACS 患者血小板时的血小板聚集率。B 图为统计分析四个干预组对 ACS 患者血小板聚集率的影响,结果以与 ox-LDL 单独作用于血小板的血小板聚集率比值表示,a 为  $P < 0.05$ ,与 ox-LDL 组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 ADP 组比较。C 图为 ADP、ADP+ox-LDL 分别作用于对照组血小板时的血小板聚集率,c 为  $P < 0.05$ ,与 ADP 组比较。D 图为 ADP+ox-LDL 分别作用于对照组、UA 组和 AMI 组血小板时的血小板聚集率,d 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较。

**Figure 3. The effects of ox-LDL, ADP, ADP+LDL and ADP+ox-LDL on the levels of platelet aggregation**

### 3 讨论

血小板聚集作为血小板的一个重要生理特征,在机体止血和血栓形成过程中发挥重要作用,但在病理条件下,如在急性冠状动脉事件中,血小板过度活化和聚集是严重威胁人类生命安全的主要原因,因此针对冠心病患者血小板聚集机制的研究也成为人们关注的焦点。有研究报道称家族性高脂血症患者血小板更易被活化和聚集<sup>[3]</sup>,但其具体机制仍然不明确,因此本研究进一步探讨并验证 LDL 和 ox-LDL 对血小板聚集功能的影响。

ox-LDL 是动脉粥样硬化起始和进展过程中重要的危险因素,它是导致泡沫细胞形成和内皮细胞功能紊乱的主要原因,ACS 患者破裂的斑块中富含大量脂质,其占到斑块体积的 40% 以上,ox-LDL 不仅存在于这些脂质斑块中,也循环于外周血中,我们的研究显示,与对照组和 SA 组相比,ACS 组患者外周血 LDL 和 ox-LDL 水平显著升高,这一结果也与 Tsimikas 等<sup>[4]</sup>研究相一致,其研究证实,ACS 患者外周血 ox-LDL 特异性标志物 ox-LDL 和抗 ox-

LDL 自身抗体均显著升高,而 SA 组和健康对照组外周血 ox-LDL 特异性标志物并无显著变化,这说明冠心病患者尤其是 AMI 患者外周血 ox-LDL 的急剧升高可强烈预示斑块的破裂和 ACS 的发生。

血小板聚集是 ACS 患者血栓形成的重要病理过程,激活和聚集的血小板最终可导致冠状动脉腔不完全性狭窄甚至完全性闭塞,进一步引起 ACS 患者心肌缺血缺氧,然而到目前为止,引起血小板聚集的机制尚未完全清楚。我们的研究结果显示,与对照组和 SA 组患者相比,ACS 患者血小板聚集水平显著升高,这一结果提示 ACS 患者外周血血小板被明显激活,为了进一步探讨 ACS 患者外周血血小板聚集的机制,我们对 ACS 患者外周血 ox-LDL 和血小板聚集水平进行相关性分析,结果显示 ACS 患者外周血 ox-LDL 水平与血小板聚集水平呈明显的正相关,这一结果提示 ox-LDL 可能促进 ACS 患者血小板聚集。为了进一步验证我们的猜想,我们采用 5 mg/L ox-LDL 孵育 ACS 患者血小板悬液,结果发现,单独的 ox-LDL 并不能促进血小板聚集,但 ox-LDL 可显著提高生理激动剂 ADP 诱导的血小板



聚集,这可能与该实验中 ox-LDL 用量较小有关,而相关文献报道中 ox-LDL 用量均较大<sup>[5]</sup>,其可能机制是激动剂 ADP 通过血小板表面的 P2Y1 和 P2Y12 受体激活血小板下游的 MAPK 信号通路引起 TXA2 释放,从而促使血小板聚集<sup>[6]</sup>,同时 ox-LDL 也可以通过血小板表面的受体 CD36 和 SR-A 从而激活血小板下游的 MAPK 信号通路<sup>[7]</sup>,因此低剂量的 ox-LDL 可以增强 ADP 诱导的血小板聚集作用。同时我们用 5 mg/L LDL 孵育血小板悬液,发现低剂量的 LDL 并不能提高 ADP 诱导的血小板聚集,这一结果证实,与 LDL 相比,不同程度氧化的 LDL 可明显提高血小板活化,随着 LDL 被氧化的程度越高,血小板下游的 p38 MAPK 信号通路更易促进血小板聚集<sup>[8]</sup>,进一步说明 ox-LDL 而非 LDL 是影响 ACS 发生的直接独立危险因素。

在体内,ox-LDL 促进血小板聚集的机制更为复杂,除了与血小板直接接触外,ox-LDL 还可以间接通过促进内皮、单核等细胞分泌炎症因子促进血小板聚集,因此其具体机制还有待进一步研究。总之,本研究证实了 ox-LDL 作为独立的危险因素可以直接促进 ACS 患者血小板聚集,这为我们判断血栓前状态以及进行积极有效的治疗有一定的指导作用。

#### [参考文献]

- [1] 胡章乐. 冠状动脉栓塞[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2014, 34 (2): 216-221.
- [2] Niccoli G, Bacà M, De Spirito M, et al. Impact of electro-

negative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 223 (1): 166-170.

- [3] Kumar S, Vikram A, Kim YR, et al. P66Shc mediates increased platelet activation and aggregation in hypercholesterolemia[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 449 (4): 496-501.
- [4] 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.
- [5] Magwenzi S, Woodward C, Wraith KS, et al. Oxidized LDL activates blood platelets through CD36/NOX2-mediated inhibition of the cGMP/protein kinase G signaling cascade[J]. *Blood*, 2015, 125 (17): 2 693-703.
- [6] Khan N, Farooq AD, Sadek B. Investigation of cyclooxygenase and signaling pathways involved in human platelet aggregation mediated by synergistic interaction of various agonists[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 6 (9): 3 497-506.
- [7] Korporeal SJ, Van Eck M, Adelmeijer J, et al. Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (11): 2 476-483.
- [8] Korporeal SJ, Gorter G, van Rijn HJ, et al. Effect of oxidation on the platelet-activating properties of low-density lipoprotein[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (4): 867-872.

(此文编辑 文玉珊)