

## 血小板环氧化酶及 P-选择素的检测及其在冠心病患者中的表达

龚晓璇<sup>1</sup>, 张锦英<sup>2</sup>, 张秋<sup>1</sup>, 朱甜甜<sup>1</sup>, 王晓伟<sup>3</sup>, 王学忠<sup>4</sup>, 殷咏梅<sup>2</sup>, 李春坚<sup>1\*</sup>, 杨志健<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院心脏科, <sup>2</sup>肿瘤科, <sup>3</sup>胸外科, 江苏 南京 210029; <sup>4</sup>安徽马鞍山市人民医院心脏科, 安徽 马鞍山 214300)

**[摘要]** 目的: 建立用流式细胞术测定富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)中血小板环氧化酶-1(cyclooxygenase-1, COX-1)和环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)及 P-选择素表达的方法; 检测在无抗血小板药物干预的状况下中国汉族冠心病患者血小板 COX-1、COX-2 及 P-选择素的表达情况。方法: 入选拟行冠状动脉搭桥术、停用阿司匹林及氯吡格雷 7 d 以上的冠心病患者 20 例, 采集空腹静脉血, 经预处理及荧光标记抗体孵育后用流式细胞仪检测血小板 COX-1、COX-2 及 P-选择素的表达情况。结果: 在无抗血小板药物干预的状况下, 中国汉族冠心病患者血小板 COX-1、COX-2 阳性表达比例分别为 (39.67 ± 9.20)% 和 (4.11 ± 2.74)%; 生理盐水刺激后血小板膜表面 P-选择素的阳性表达率为 (13.56 ± 8.07)%, 花生四烯酸刺激后的阳性表达率为 (24.08 ± 13.49)%, 血小板膜表面 P-选择素的实际阳性表达率为 (10.27 ± 7.40)%。结论: 流式细胞术可有效测定血小板 COX-1、COX-2 和 P-选择素的表达, 冠心病患者血小板 COX-1、COX-2 和 P-选择素的表达在中国汉族人种与高加索人种间可能存在差异。

**[关键词]** 环氧化酶-1; 环氧化酶-2; P-选择素; 流式细胞术; 冠心病

**[中图分类号]** R541.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)07-948-04

## Determination of platelet cyclooxygenases and P-selectin in patients with coronary artery disease

GONG Xiao-xuan<sup>1</sup>, ZHANG Jin-ying<sup>2</sup>, ZHANG Qiu<sup>1</sup>, ZHU Tian-tian<sup>1</sup>, WANG Xiao-wei<sup>3</sup>, WANG Xue-zhong<sup>4</sup>, YIN Yong-mei<sup>2</sup>, LI Chun-jian<sup>1\*</sup>, YANG Zhi-jian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, <sup>2</sup>Department of Oncology, <sup>3</sup>Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>4</sup>Department of Cardiology, Maanshan People's Hospital, Maanshan 214300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method of detecting cyclooxygenase (COX)-1, COX-2 and P-selectin in platelet-rich plasma (PRP) by flow cytometry (FCM), and to detect the expressions of COX-1, COX-2 and P-selectin in PRP from coronary artery disease (CAD) patients without using anti-platelet agents. **Methods:** Twenty CAD patients were recruited, who were going to receive coronary artery bypass graft (CABG) and had withdrawn aspirin and clopidogrel for at least 7 days. After overnight fasting, the patients' venous blood was drawn and processed, then the PRP was incubated with fluorescence labeled antibody, and COX-1, COX-2 and P-selectin were detected by FCM. **Results:** The positive percent of COX-1, COX-2 in PRP of the enrolled 20 patients were (39.67 ± 9.20)% and (4.11 ± 2.74)%, respectively, and the positive percent of P-selectin in platelet was (13.56 ± 8.07)% after incubated with saline and (24.08 ± 13.49)% after incubated with arachidonic acid, the real positive percent of P-selectin in platelet was (10.27 ± 7.40)%. **Conclusion:** FCM can effectively detect the platelet expressions of COX-1, COX-2 and P-selectin. There would be ethnic differences between Chinese Han and Caucasian regarding the platelet expressions of COX-1, COX-2 and P-selectin in CAD patients.

**[Key words]** cyclooxygenase-1; cyclooxygenase-2; P-selectin; flow cytometry; coronary artery disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 948-951]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170181); 江苏省人民医院创新团队基金(2011)

\*通讯作者, E-mail: lijay@njmu.edu.cn; zhijianyangnj@yahoo.com.cn

阿司匹林是在血栓栓塞性疾病中应用最为广泛的抗血小板药物,它不可逆地使成熟或新生血小板环氧化酶-1(cyclooxygenase-1, COX-1)乙酰化,导致花生四烯酸(arachidonic acid, AA)的代谢产物血栓素 A<sub>2</sub>(thromboxane A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>)生成减少,从而抑制血小板聚集<sup>[1]</sup>。与成熟血小板不同的是,新生血小板还可表达环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2),小剂量阿司匹林因不能有效抑制 COX-2 通路而导致阿司匹林的疗效下降<sup>[2]</sup>。P-选择素(CD62p)是血小板活化后期的标志物。非活化血小板胞质内 $\alpha$ 颗粒含有 CD62p,血小板活化时, $\alpha$ 颗粒迅速与血小板膜融合并释放 CD62p,使后者显露于血小板表面<sup>[3-4]</sup>。因此,血小板表面的 P-选择素可反映血小板的活化状态,被认为是血小板活化的特异性标志物。

本研究拟通过流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测冠心病患者富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)中 COX-1、COX-2 及 P-选择素的表达,为进一步研究阿司匹林的临床疗效,指导个体化抗血小板治疗奠定基础。

## 1 对象和方法

### 1.1 对象

采用队列研究设计,连续入选拟接受冠状动脉搭桥(coronary artery bypass graft, CABG)的冠心病患者 20 例为研究对象。入选标准:①中国汉族人;②经冠状动脉造影确诊、拟行 CABG 的冠心病患者;③停用阿司匹林、氯吡格雷 7 d 以上;④未服用其他抗血小板药物或非甾体类消炎镇痛药;⑤签署知情同意书。排除标准:①正在参加其他临床试验;②有血液系统疾病史;③肝、肾功能异常(血丙氨酸氨基转移酶、肌酐高于正常值 1 倍以上)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血样采集与处理

患者入选后次日晨 7:00 采集空腹静脉血 3 ml 置 3.2%枸橼酸钠抗凝管内,1 h 内于常温离心机 200 r/min 离心 4 min,获取 PRP。

#### 1.2.2 COX-1、COX-2 的标记

将 PRP 分装至 3 个 EP 管中,每管 25  $\mu$ l,其中两管用 100  $\mu$ l Isoton III (美国 Beckman Coulter 公司)稀释后加入 PE-CD42b 抗体(美国 Becton Dickinson 公司),避光孵育 20 min 后用 1%多聚甲醛固定 10 min,随后用 0.1%TritonX-100 破膜 10 min,分别加入 5  $\mu$ l FITC-COX-1 抗体、FITC-COX-2 抗体(美国 Cayman Chemical 公司),避光孵育 20 min 后

用 1%多聚甲醛固定 10 min,另一未加抗体的 EP 管作为阴性对照。

#### 1.2.3 P-选择素的标记

分装 50  $\mu$ l 及 25  $\mu$ l PRP 至 2 个 EP 管中,分别加入 450  $\mu$ l 和 225  $\mu$ l Isoton III,随后分别加入 1  $\mu$ l 5 mmol/L AA(终浓度 100  $\mu$ mol/L)及 1  $\mu$ l 生理盐水,37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后将前者分装 250  $\mu$ l 至另一 EP 管中,后两管加入 PE-CD62p 抗体(美国 Becton Dickinson 公司)。避光孵育 20 min 后用 1%多聚甲醛固定 10 min。用未加入抗体的 EP 管作为阴性对照。本研究以生理盐水对照,采用 AA 刺激血小板表达 P-选择素,后者与前者相减的差值反映活化血小板的百分比。

#### 1.2.4 流式细胞仪检测

经处理后的血标本于 2 h 内在流式细胞仪 Coulter Epics XL MCL flow cytometer(美国 Beckman Coulter 公司)上进行分析。根据前群及侧群的分布确定血小板的位置(门)并调整好门、电压及补偿后,计数  $1 \times 10^4$  个血小板,记录其荧光标记抗体的阳性百分比。

## 2 结果

### 2.1 患者基本特征

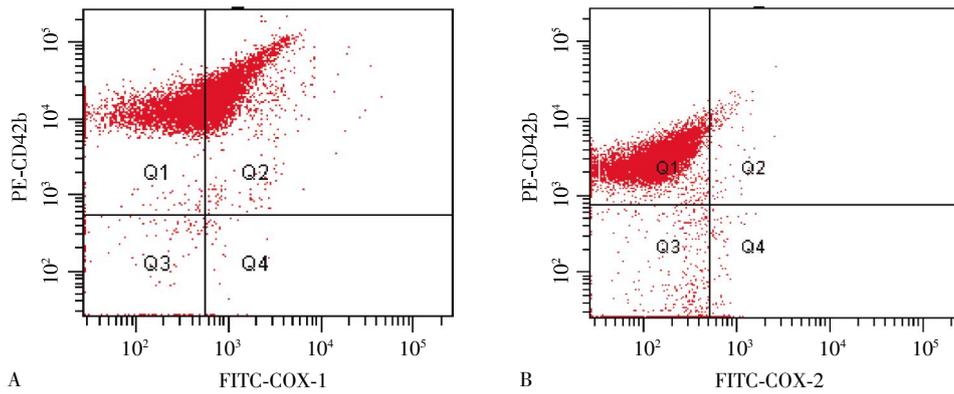
自 2011 年 9 月~2012 年 1 月入选经冠状动脉造影确诊、拟行 CABG 的冠心病患者 20 例;男 13 例(65%),女 7 例(35%),平均年龄( $63.4 \pm 7.7$ )岁;其中不稳定心绞痛 8 例(40%),高血压病 16 例(80%),高血脂症 7 例(35%),糖尿病 5 例(25%),吸烟 7 例(35%)。

### 2.2 COX-1 与 COX-2 的表达

入选患者血小板内 COX-1 阳性百分比为( $39.67 \pm 9.20$ )%,COX-2 阳性百分比为( $4.11 \pm 2.74$ )%。图 1A、B 分别显示用阴性对照设门后的 FITC-COX-1 与 PE-CD42b 双阳性、FITC-COX-2 与 PE-CD42b 双阳性的血小板百分比(Q<sub>2</sub>)。因 PE-CD42b 能特异性识别血小板膜糖蛋白,故双阳性检测结果可特异性地反映血小板内 COX-1 与 COX-2 的表达。

### 2.3 P-选择素的表达

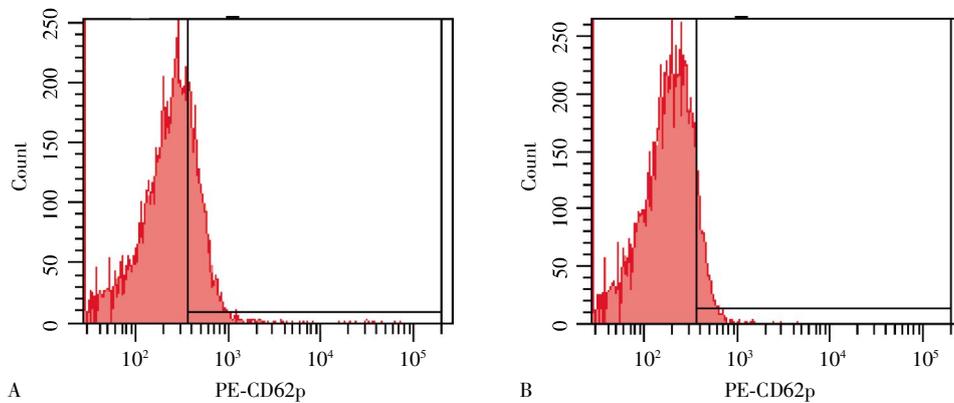
在 1  $\mu$ l 5 mmol/L AA(终浓度 100  $\mu$ mol/L)刺激后,入选患者血小板表面 P-选择素阳性百分比为( $24.08 \pm 13.49$ )%,等量生理盐水刺激后,P-选择素阳性百分比为( $13.56 \pm 8.07$ )%,两者差值为( $10.27 \pm 7.40$ )%,此差值反映真实的血小板表面 P-选择素表达阳性率(图 2)。



A. FITC-COX-1、PE-CD42b 双阳性细胞在 Q2 区;B: FITC-COX-2、PE-CD42b 双阳性细胞在 Q2 区。

图 1 流式细胞术检测血小板内 COX-1 及 COX-2 的表达

Figure 1 Expressions of COX-1 and COX-2 in platelets detected by flow cytometry



A. AA 诱导的 CD62p 表达;B. 生理盐水对照的 CD62p 表达。

图 2 流式细胞术检测血小板 CD62p 的表达

Figure 2 CD62p expression in platelets detected by flow cytometry

### 3 讨论

本研究首次在国内建立了用流式细胞术测定血小板 COX-1、COX-2 表达的方法,并测定了在无抗血小板药物干预的情况下,中国汉族冠心病患者血小板 COX-1、COX-2 及 P-选择素的表达情况,为进一步探讨阿司匹林的临床疗效、实现个体化抗血小板治疗,以及进一步研究“阿司匹林抵抗”的机制提供了有效的参照。

目前,血小板 COX-1、COX-2 蛋白水平的检测有流式细胞术和蛋白免疫印迹法(Western blot)两种方法<sup>[5-6,18]</sup>。采用 FCM 检测时,因 PE-CD42b 抗体能特异性识别血小板膜糖蛋白,故在 FITC-COX-1、FITC-COX-2 抗体与 COX-1、COX-2 结合的基础上,再用 PE-CD42b 标记识别血小板,避免了源于血样中的其他成份如白细胞等外源性 COX-1、COX-2 的干扰。因此,流式细胞术较 Western blot 等方法具有更高的特异性。与之相似,在 P-选择素的检测中,

PE-CD62p 能与活化血小板表面的 CD62p 特异性地结合<sup>[3-4]</sup>,因而,采用流式细胞术检测血小板 P-选择素同样具有较高的特异性和准确性。

与国外研究结果相比,中国汉族冠心病患者 COX-1、COX-2 和 P-选择素的基础表达量存在一定差异。Weber 等<sup>[5]</sup>报道高加索人冠心病患者 CABG 术前血小板 COX-1、COX-2 的平均荧光强度(mean fluorescence index, MFI)分别是  $12.38 \pm 1.41$  和  $9.15 \pm 0.88 (n = 7)$ ,Guthikonda 等<sup>[6]</sup>报道健康志愿者血小板 COX-2 阳性百分比在网织血小板(reticulated platelets, RPs)偏高组为  $(12 \pm 7)\% (n = 10)$ ,RP 偏低组为  $(7 \pm 3)\% (n = 12)$ 。Hübl 等<sup>[7]</sup>报道在高加索人未接受抗血小板药物治疗的冠心病患者中,80  $\mu\text{mol/L}$  AA 诱导的 P-选择素阳性血小板比例为 50%(29%~68%)。本研究 P-选择素阳性血小板比例低于上述结果(24% vs 50%),这可能与种族差异、AA 浓度、流式细胞仪条件等因素有关。

本研究结果具有以下两点实际价值:①为检测

阿司匹林的个体差异提供参照。阿司匹林是血栓栓塞性疾病的基础性治疗药物,它降低冠心病、脑卒中等死亡风险约为 23%<sup>[8]</sup>。但在常规服用阿司匹林和氯吡格雷的冠心病患者中,血栓性事件的发生率仍高达 10%<sup>[9]</sup>。研究发现在部分冠心病患者中,阿司匹林不能有效地抑制血小板聚集功能,即存在“阿司匹林抵抗”<sup>[10-14]</sup>。通过检测患者服用阿司匹林前后 AA 诱导的血小板 P-选择素表达的变化,可反映阿司匹林对血小板活性的抑制情况。②为研究“阿司匹林抵抗”的机制提供了有效的方法。研究发现“阿司匹林抵抗”多出现在糖尿病患者或外科手术后,目前相关机制尚不明确,推测可能与糖尿病患者血小板 COX-1 对阿司匹林敏感性降低,或外科术后新生网织血小板 COX-2 表达增加等因素有关<sup>[15-18]</sup>。本研究采用流式细胞术成功进行了血小板 COX-1、COX-2 及 P-选择素的检测,为进一步研究“阿司匹林抵抗”的机制提供了有效的方法。

#### [参考文献]

- [1] Undas A, Brummel-Ziedins KE, Mann KG. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions [J]. *Blood*, 2007, 109 (6): 2285-2292
- [2] Rao AK. The tale of two COXs [J]. *Blood*, 2010, 115(5): 921-922
- [3] Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function [J]. *Blood*, 1996, 87(12): 4925-4936
- [4] Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry [J]. *J Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006, 35 (1-2): 67-82
- [5] Weber AA, Przytulski B, Schumacher M, et al. Flow cytometry analysis of platelet cyclooxygenase-2 expression: induction of platelet cyclooxygenase-2 in patients undergoing coronary artery bypass grafting [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(2): 424-426
- [6] Guthikonda S, Lev EI, Patel R, et al. Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin [J]. *J Thromb Haemost*, 2007, 5(3): 490-496
- [7] Hübl W, Assadian A, Lax J, et al. Assessing aspirin-induced attenuation of platelet reactivity by flow cytometry [J]. *Thromb Res*, 2007, 121(1): 135-143
- [8] Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients [J]. *BMJ*, 2002, 324(7329): 71-86
- [9] Gurbel PA, Antonino MJ, Tantry US. Recent developments in clopidogrel pharmacology and their relation to clinical outcomes [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5 (8): 989-1004
- [10] Zimmermann N, Weber AA, Hohlfeld T, et al. Aspirin "resistance" [J]. *Herz*, 2008, 33(4): 270-278
- [11] Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, et al. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis [J]. *BMJ*, 2008, 336 (7637): 195-198
- [12] Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, et al. Aspirin-resistant platelet aggregation in a cohort of patients with coronary heart disease [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007, 18 (5): 461-465
- [13] Wang Z, Gao F, Men J, et al. Aspirin resistance in off-pump coronary artery bypass grafting [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012, 41(1): 108-112
- [14] 王文工, 马杰. 阿司匹林抵抗的实验观察 [J]. *微循环学杂志*, 2010, 20(3): 62-65
- [15] Dorsch MP, Lee JS, Lynch DR, et al. Aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease with and without a history of myocardial infarction [J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41(5): 737-741
- [16] Cao L, Young N, Liu H, et al. Preoperative aspirin use and outcomes in cardiac surgery patients [J]. *Ann Surg*, 2012, 255(2): 299-404
- [17] Bednar F, Osmancik P, Hlavicka J, et al. Aspirin is insufficient in inhibition of platelet aggregation and thromboxane formation early after coronary artery bypass surgery [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2009, 27(4): 394-399
- [18] Pulcinelli FM, Biasucci LM, Riordino S, et al. COX-1 sensitivity and thromboxane A2 production in type 1 and type 2 diabetic patients under chronic aspirin treatment [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(10): 1279-1286

[收稿日期] 2012-03-27