

· 临床论著 ·

慢性阻塞性肺疾病急性加重期血小板活化与感染性炎症的关系

邬伟明 叶礼红 谭劼 黄瑾 彭晓

【摘要】 目的 探讨慢性阻塞性肺疾病急性加重期(acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, AECOPD)患者血小板活化膜糖蛋白 GP II b/III a、GMP-140 的变化及其与感染性炎症的关系。**方法** 用三色全血流式细胞术测定 44 例 AECOPD 患者及 44 例缓解期患者外周血中血小板 GP II b/III a、GMP-140 的表达水平,并检测患者高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)水平,与 40 例健康对照组比较。**结果** AECOPD 组 GP II b/III a、GMP-140、hs-CRP 分别为 $(68.73 \pm 7.87)\%$ 、 $(43.36 \pm 7.92)\%$ 、 $(8.52 \pm 5.71) \text{ mg/L}$,均明显高于缓解期组 $[(51.86 \pm 7.59)\%$ 、 $(33.63 \pm 7.63)\%$ 、 $(4.85 \pm 2.39) \text{ mg/L}]$ 及健康对照组 $[(48.73 \pm 5.55)\%$ 、 $(30.63 \pm 4.09)\%$ 、 $(4.38 \pm 2.41) \text{ mg/L}]$ (P 均 < 0.001)。AECOPD 组 GP II b/III a 与 hs-CRP 呈正相关($r = 0.55, P < 0.005$),GMP-140 与 hs-CRP 呈正相关($r = 0.49, P < 0.005$)。**结论** AECOPD 患者血小板明显活化,血小板活化与感染性炎症反应之间关系密切,活化血小板对 AECOPD 患者炎症反应起一定作用。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病;血小板活化;流式细胞术;高敏 C 反应蛋白

The relationship between platelet activation and infective inflammation in patients with COPD WU Wei-ming, YE Li-hong, TAN Jie, HUANG Jin, PENG Xiao. Department of Respiratory Medicine the Fifth Affiliated Hospital of Zhong Shan University, Zhuhai 519000, China

Corresponding author: HUANG Jin, Email: huangjin1960@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship among platelet activation markers (GP II b/III a and GMP-140) and high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Subjects were divided into three groups: 44 patients with AECOPD, 44 patients with remission, 40 cases of healthy controls. Positive rates of GP II b/III a and GMP-140 were measured with tricolor flow cytometry. Hs-CRP in patients with COPD and healthy controls were also determined. **Results** The levels of GP II b/III a,

作者单位:519000 中山大学附属第五医院呼吸内科(邬伟明、黄瑾);内分泌科(叶礼红);心内科(谭劼);中心实验室(彭晓)

通讯作者:黄瑾,Email: huangjin1960@163.com

GMP-140 and hs-CRP in AECOPD group were $(68.73 \pm 7.87)\%$, $(43.36 \pm 7.92)\%$ and (8.52 ± 5.71) mg/L, respectively, which increased significantly (P all <0.001), compared with COPD remission group with GP II b/III a $(51.86 \pm 7.59)\%$, GMP-140 $(33.63 \pm 7.63)\%$ and hs-CRP (4.85 ± 2.39) mg/L, while healthy group with GP II b/III a $(48.73 \pm 5.55)\%$, GMP-140 $(30.63 \pm 4.09)\%$, hs-CRP (4.38 ± 2.41) mg/L. Hs-CRP levels in AECOPD group were positive to GP II b/III a ($r=0.55$, $P<0.005$) and GMP-140 ($r=0.49$, $P<0.005$). **Conclusions**

The platelet in patients with AECOPD is at the overactivated state. There is a relation between platelet activation and infective inflammation in patients with AECOPD and activated platelet might play a role in infective inflammation associated with AECOPD.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; Platelet activation; Flow cytometry; High-sensitivity C-reactive protein

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见病,其发病率、致残率和病死率均很高,严重危害人类健康。COPD 急性加重的病因中,感染是主要原因,高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 是急性时相反应蛋白,是反映感染、炎症的灵敏指标^[1]。血小板在 COPD、肺心病血栓形成过程中起着重要作用已成共识,但有关血小板与 COPD 炎症关系的研究报道较少。本试验应用三色全血流式细胞术检测 AECOPD 患者血小板活化分子标志物 GP II b/III a、GMP-140,并检测 hs-CRP,探讨上述参数之间的相关性及 COPD 患者血小板活化的临床意义,指导临床治疗。

资料与方法

一、研究对象

COPD 急性加重期组患者 44 例,男性 22 例,女性 22 例,年龄 51~76 岁,平均年龄 (61.92 ± 7.52) 岁;COPD 缓解期组 44 例,男性 22 例,女性 22 例,年龄 50~73 岁,平均年龄 (62.23 ± 6.85) 岁,为我院呼吸科住院患者,诊断符合 2002 年中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病诊治指南制订的标准^[2],未合并肺心病。所有入选患者入院前无近期(2 周内)服用抗血小板药物史,并排除其他致 hs-CRP 升高的相关疾病,如慢性肝病、结缔组织病、心脑血管疾病、恶性肿瘤、活动性肺结核及肺部以外的细菌感染等。健康对照组 40 例,男性 20 例,女性 20 例,年龄 49~75 岁,平均年龄 (63.3 ± 7.2) 岁,为同期我院健康体检者,COPD 组的年龄及性别差异无统计学意义。

二、试剂

FITC 标记抗人 Gp II b/III a 抗体、Percp 标记抗人 CD61、PE 标记抗人 GMP-140 抗体、FITC 标记、PE 标记的同型大鼠 IgG (FITC 标记、PE 标记及 Percp 标记抗人抗体及相应的同型大鼠免疫球蛋白均为美国 BD 公司产品)

三、实验方法

1. 检测活化血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 和 GMP-140: 所有受试者(包括患者与健康对照)均于晨起采静脉血,用一次性采血针于肘静脉顺利采血,弃去前 2 ml,留取后 2 ml。置于 1:9 枸橼酸钠抗凝管中,迅速送检。标记 2 支 12 × 75 mm 上样管(对照管和实验管),加 20 μ l CD61 PerCP 抗体到每一支上样管中,对照管中加入同型对照抗体各 20 μ l,实验管中加入 GP II b/III a 和 GMP-140 抗体各 20 μ l,每管中加入待测全血 5 μ l 和 200 μ l PBS,轻轻摇动混匀,室温避光孵育 15 ~ 20 分钟,加 1 ml 冷的含 1% 多聚甲醛的 PBS,4℃ 放置至少 2 ~ 24 小时,美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪,Cell Quest 软件采集和分析数据,血小板 GP II b/III a 及 GMP-140 含量以其阳性血小板百分率表示。

2. 血清高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)测定: COPD 患者与健康对照者均于清晨空腹抽取肘正中静脉血,用 EDTA 抗凝后送实验室离心分取血清,采用免疫比浊法测定,试剂盒由北京利德曼生物技术有限公司提供,操作过程严格按照说明书进行。

四、统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件处理数据,所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,多个样本均数之间两两比较采用 LSD-*t* 检验,两个变量间的关系采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 表示有显著差异。

结 果

一、血小板 GP II b/III a 和 GMP-140 检测结果

AECOPD 组 GP II b/III a 阳性表达率高于缓解期组及健康对照组(P 均 < 0.001),缓解期组 GP II b/III a 阳性表达率亦高于健康对照组($P < 0.05$); AECOPD 组 GMP-140 阳性表达率明显高于缓解期组及健康对照组(P 均 < 0.001),缓解期组 GMP-140 阳性表达率亦高于健康对照组($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 AECOPD 组和对照组血小板分子标记物表达率及 hs-CRP ($\bar{x} \pm s$)

组别	GP II b/III a (%)	GMP-140 (%)	hs-CRP (mg/L)
急性期组	68.73 \pm 7.87 ^{*#}	43.36 \pm 7.92 ^{*#}	8.52 \pm 5.71 ^{*#}
缓解期组	51.86 \pm 7.59 [△]	33.63 \pm 7.63 [△]	4.85 \pm 2.39 [▼]
健康对照组	48.73 \pm 5.55	30.63 \pm 4.09	4.38 \pm 2.41
<i>F</i> 值	97.94	40.45	14.78
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注: * 与缓解组对比, $P < 0.001$; # 与健康对照组对比, $P < 0.001$; △ 与健康对照组对比, $P < 0.05$; ▼ 与健康对照组对比, $P > 0.05$

二、hs-CRP 检测结果

AECOPD 组 hs-CRP 明显高于缓解期组及健康对照组(P 均 < 0.001),缓解期组与健康对照组对比 hs-CRP 差异无统计学意义($P > 0.05$)。

三、AECOPD 患者血小板 GP II b/III a、GMP-140 的变化与 hs-CRP 变化的相关

性分析

相关性分析发现 AECOPD 组 GP II b/III a 与 hs-CRP 之间呈显著的正相关 ($r = 0.55, P < 0.005$); AECOPD 组 GMP-140 与 hs-CRP 之间呈显著的正相关 ($r = 0.49, P < 0.005$)。

讨 论

近年来研究发现,血小板在 COPD 发生、发展及其转归中可能起着重要作用,因此,有必要深入了解血小板与 COPD 的关系。GP II b/III a 在血小板聚集过程中起重要作用,血小板活化时 GP II b/III a 分子上的纤维蛋白原受体暴露,使血小板能与血浆中的纤维蛋白原结合、聚集,GP II b/III a 是早期血小板活化的标志物^[3]。GMP-140 存在于血小板 α -颗粒内,同时存在于内皮细胞的 Weibel-Palade 小体膜上。GMP-140 在未活化的内皮细胞膜上有一定数量的基础表达,在血小板活化时与血小板表面的质膜融合,并在血小板膜上表达或出现在血浆中。在静息血小板 GMP-140 选择素极少,因此, GMP-140 可作为血小板活化的分子标志物之一,是后期血小板活化的标志物^[4]。本实验通过三色流式分析方法检测 COPD 患者全血,结果发现 AECOPD 组患者的 GP II b/III a、GMP-140 表达明显高于缓解期组,两组 GP II b/III a、GMP-140 均高于健康对照组,曾有学者采用传统流式细胞术和特异性抗体分析 COPD 患者经离心后制备的多血小板血浆中血小板表面 GMP-140 的表达^[5],发现 AECOPD 组患者的 GMP-140 表达明显高于健康对照组,目前对这一方法尚存争议,由于血小板极易激惹活化,样本经离心、洗涤等步骤,容易人为地导致体外血小板激活,影响临床诊断价值。三色流式分析法是在常规流式分析法检测基础上发展起来的一种多参数分析,同时在全血标本中加入三色荧光标记的单克隆抗体,直接观察全血中血小板膜上血小板 GP II b/III a、GMP-140,该技术能采用全血样本测定循环中血小板的活化状态,避免了离心过程人为激活血小板,结果更客观可靠。COPD 患者由于气道阻塞导致缺氧和二氧化碳潴留,血管内皮细胞受损,慢性缺氧产生继发性红细胞增多,血液黏稠增加、血流减慢从而刺激血小板活化,COPD 患者肺泡内压增高可引起肺泡破裂,肺泡破裂的损伤可激发血小板活化。感染因素中,内毒素可以激活凝血酶,使单核吞噬细胞释放血小板活化因子(PAF),更加重血小板活化。本研究发现 COPD 缓解期组 GP II b/III a、GMP-140 也高于健康组,这可能是由于缓解期患者也存在一定程度的缺氧及二氧化碳潴留。

本研究结果显示 AECOPD 组 hs-CRP 明显高于缓解期组并与 GP II b/III a、GMP-140 之间呈正相关,CRP 是急性时相反应蛋白中重要的蛋白之一,正常血浆中其含量极低。随着分子生物学和免疫学的发展,临床上可用新的方法检出低浓度的 CRP 称为 hs-CRP。Hurst 等^[12]研究发现 AECOPD 患者的全身性炎症反应程度与下呼吸道的炎症程度成比例,因而认为 CRP 水平能反应下呼吸道局部的炎症情况。尚未有文献报道 AECOPD 患者 GP II b/III a、GMP-140 与 hs-CRP 之间的相关性,活化血小板可释放血小板激活因子(PAF)、血栓素 A₂、血小板因子 4

(PF4)、血小板源性生长因子(PDGF)、氧自由基等多种炎性介质参与 COPD 炎症反应:①PAF 是重要炎性介质,可由血小板、多种白细胞及内皮细胞合成,可引起急性和持久性炎症反应,诱导粒细胞和单核细胞聚集和黏附,增加细胞的趋化性和释放炎性介质,使血管通透性增加,支气管平滑肌和血管平滑肌收缩,黏液分泌增加及黏液中蛋白含量增加,抑制黏液-纤毛运动^[7,8];②血栓素 A2 能促进粒细胞溶酶体释放,收缩血管和支气管平滑肌,抑制内皮细胞合成 PGI₂;③PF4 可由血小板 GMP-140 介导沉积于微血管系统、主动脉内皮系统和单核细胞上,引起嗜碱性粒细胞、肥大细胞释放组织胺,促进粒细胞释放弹性蛋白酶和组织蛋白酶 G,加强白细胞蛋白酶对肺泡壁的破坏,抑制胶原酶,诱导单核细胞整合素活化,使之抵抗血流切应力而趋向炎症部位,并能诱导单核细胞产生促炎症细胞素 MCP-1 和 IL-8;④PDGF 可诱导磷酸酰肌醇循环和花生四烯酸的释放,促进多种前列腺素物质的产生,促进成纤维细胞、血管平滑肌细胞等增生,趋化并激活单核细胞、粒细胞、血小板和内皮细胞,促使炎性介质的进一步释放,加重组织损伤,与肺动脉高压、动脉硬化及肺间质纤维化的发生关系密切;⑤氧自由基与细胞膜磷脂中不饱和脂肪酸反应,脂质发生过氧化反应并产生新的自由基,导致肺泡上皮细胞、内皮细胞等损伤,破坏 α 1-抗胰蛋白酶的结构及活性,加强肺内弹性蛋白酶的损害,促进 COPD 的发展。综上所述, AECOPD 患者血小板明显活化,血小板活化与感染性炎症反应之间关系密切,活化血小板对 AECOPD 患者急性炎症反应起一定作用,对 AECOPD 患者抗感染治疗并配合应用血小板活化抑制剂及适当抗凝治疗,可能有助于提高疗效、促进康复。

参 考 文 献

- 1 Gambino R. C-reactive protein-undervalued, underutilized. Clin Chem, 1997,43:2017-2018.
- 2 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南. 中华结核和呼吸杂志, 2002,25:453-460.
- 3 Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. Thromb Haemost, 1994,72:1-15.
- 4 Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, et al. Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin. Circulation, 1998,98:873-882.
- 5 李苹, 陈子威. COPD 病人血小板活化状态检测的意义. 福建医药杂志, 2001,23:36-37.
- 6 Hurst JR, Perera WR, Wilkinson TM, et al. Systemic and upper and lower airway inflammation at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med, 2006,173:71-78.
- 7 Yamada Y, Yokota M. Roles of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in allergic, inflammatory, and atherosclerotic diseases. Jpn Circ J, 1998,62:328-335.
- 8 Van de Weerd ML, Desmecht D, Lekeux P. Effect of platelet-activating factor on bovine pulmonary function. Vet Rec, 1997,141:168-172.

(收稿日期:2009-04-28)

(本文编辑:温少芳)

郭伟明,叶礼红,谭劼,等. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期血小板活化与感染性炎症的关系[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2009,3(3):265-269.