

血管内血栓形成及溶栓后再闭塞的动物模型

熊一力^① 赵华月

(同济医科大学同济医院内科, 武汉 430030)

An Animal Model in Inducing Introarterial Thrombosis with Subsequent Reocclusion after Thrombolysis

XIONG Yi-Li and ZHAO Hua-Yue

(Department of Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Model of the femoral arterial thrombosis was produced in all 20 rabbits by feeding high cholesterol, manipulating with mechanical and electrical damage. Urokinase was then given and reocclusion will be observed subsequently, 2 h after recanalization, 50% of arteries were reoccluded assessed by angiography. Intimal injury, adhered thrombus containing platelet riched mixed cells were confirmed by pathological examination. During the process of thrombosis and reocclusion, platelet aggregation rate content of plasma thromboxane A₂ and activity of plasminogen activator inhibitor were markedly increased. Whereas the level of prostacyclin and activity of plasminogen activator significantly decreased.

Conclusion: rate of thrombus formation is high the ingradient of thrombus and the rate of reocclusion are closed to human coronary disease. The endothelial injury and activation of platelet being the basis of changes of vessel active substance corrspond to the characteristic of formation of coronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis. Since the method of preparation is easy and feasible, it will be

a valuable model for studing some new drug in prenting the reocclusion after thrombolysis.

KEY WORDS Animal model; Thrombosis; Thrombolysis; Reocclusion; Rabbit

摘要 本文采用高脂饲养,机械损伤及电刺激方法,加用尿激酶溶栓,制备了兔股动脉血栓形成及溶栓后再闭塞动物模型。结果表明:所处理血管电刺激2 h内血栓形成达完全闭塞。溶栓再通后2 h,血管再闭塞率达50%。在血栓形成及再闭塞时,血小板聚集率,血栓素A₂含量及纤溶酶原激活物抑制物活性明显增加,而前列环素含量及纤溶酶原激活物活性显著降低。提示,本模型血栓形成率高,再闭塞率及血栓成分近似于冠心病,且方法简便、易行。

关键词 模型;兔;血栓形成;溶栓;再闭塞

血栓形成在冠心病的发生发展中发挥重要作用。溶栓治疗对急性心肌梗塞的疗效已获得公认。但溶栓后血管再闭塞却成为溶栓疗法面临的重大难题。为了探讨血栓形成及溶栓后再闭塞的病因和发病机制,寻求新疗法,动物模型的制备成了不可缺少的工具。近年国外对动脉模型的研究已取得进展^[1],但国内尚未见报道。本实验建立了兔股动脉血栓形成及溶栓后再闭塞的动物模型。从X线造影,病理检查,血管活性物质测定方面探讨了此模型的价值。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及X线造影

日本大耳白家兔20只,雄性,体重2.4~2.8 kg,喂含2%胆固醇,2%猪油的基础饲料8周。实验当天行静脉麻醉(戊巴比妥钠30 mg·kg⁻¹),分离左颈静脉,插管。用以输液,给药,抽血。分离双侧股动脉2~3 cm,从左股动脉小切口插管到降主动脉,

① 现为同济医科大学药理学教研室博士后。

由此注 76% 泛影葡胺造影用。此时拍第一张左股动脉片。拍片后用一钝钳在分离左股动脉外顺序夹捻 5 次。将两个银丝电极弯曲成弧形, 托起夹捻过的股动脉。两电极距离约 1 cm, 接安培计、电位计及电刺激仪(本室自制)。此时开电刺激仪, 以 1.5 mA 的电流刺激血管, 隔 10 min 推少量造影剂并于透视下证实左股动脉完全闭塞 15 min 时停止刺激并拍第二张片。在闭塞 30 min 时, 开始静脉滴注尿激酶(日本 Cree Cross 公司), 6 000 IU · kg⁻¹ 约 60 min 透视证实再通后即拍第三张片。但如静脉滴注达 60 min 仍未通, 则摒除这些兔(4 只)于实验之外。左股动脉溶栓后再通的兔。再静脉滴注生理盐水 2 h, 拍第四张片观察再闭塞。之后让兔继续仰卧于兔板到 24 h, 处死, 取左股动脉行病理检查。

1.2 病理检查

取出的左股动脉段用 10% 甲醛固定后, 按 HE 常规染色, 光镜检查。另一段用 2.5% 戊二醛固定, 常规处理后行扫描电镜观察。

1.3 血液指标测定

在电刺激前, 血栓形成闭塞时及再闭塞时于左颈静脉采血。血小板聚集率(platelet aggregation rate, PAR)测定采用比浊法。血栓素 B₂(thromboxane B₂, TXB₂), 6-酮前列腺素 F_{1α} (6-keto prostaglandin F_{1α}, 6-keto-PGF_{1α}) 含量测定, 采用放射免疫法, 按药盒(苏州医学院血栓与止血研究室)规程进行。血浆纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA), 纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen

activator inhibitor, PAI) 活性测定, 采用发色底物法, 按药盒(上海医科大学分子遗传室)说明书执行。

2 结果

2.1 X 线造影结果

股动脉狭窄程度, 以管腔直径表示, 以正常动脉或狭窄区近心端和远心端的非狭窄区管腔直径为 100% 来判断。狭窄或减少 $\frac{1}{2}$ 为 50% 狭窄, $\frac{3}{4}$ 为 75%, 远端无任何血流称 100% 狭窄。当狭窄 $\geq 75\%$ 时称闭塞, 100% 为完全闭塞, $< 75\%$ 属通畅。本实验在分离出股动脉电刺激前造影, 左股动脉全部通畅, 电刺激后, 20 只兔全部达到闭塞。尿激酶溶栓达 60 min 时 4/20 (20%) 持续闭塞, 未达通畅, 故摒除这 4 只兔于实验外。其余 16/20 (80%) 通畅, 给这 16 只兔静脉滴注生理盐水 2 h 造影, 8/16 (50%) 出现再闭塞, 其中 7/16 (44%) 为完全再闭塞(Figure 1, 2)。

2.2 病检结果

大体观, 80% 左股动脉增粗或狭窄。纵行切开管壁见血栓面积 $\geq$ 管腔横截面积 75% 的有 12/16 (75%) 条。光镜下, 动脉内膜增厚、损伤、失去完整性。多处有大小不一的附壁血栓形成, 血栓为混合性(Figure 3)。扫描电镜下见内膜有大量血小板及红细胞、白细胞、纤维蛋白和泡沫细胞附着(Figure 4)。

Table. The content of PAR, TXB₂, β -keto-PGF_{1α} and activity of PA, PAI in every period ($\bar{x} \pm s$).

Group	n	PAR		TXB ₂ ng · L ⁻¹	6-keto-PGF _{1α} ng · L ⁻¹	PA IU/ml	PAI (AU/ml)
		1 min	5 min				
I	20	38.8 ± 5.5	50.3 ± 4.9	482.5 ± 45.7	42.5 ± 6.4	2.3 ± 0.6	13.0 ± 1.9
II	20	46.5 ± 6.1**	60.8 ± 4.6**	527.2 ± 48.8**	36.6 ± 5.2**	1.6 ± 0.7**	15.1 ± 1.2**
III	16	47.0 ± 5.4**	58.6 ± 5.2**	535.6 ± 50.3**	37.1 ± 5.4**	1.6 ± 0.5**	14.7 ± 1.9*

compared with I group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. I: before electrical damage; II: thrombosis; III: reocclusion

2.3 血液指标测定结果见 Table。

3 讨论

自从对急性心肌梗塞开展溶栓疗法以来, 该病予后大为改观。但溶栓疗法的主要局限是冠脉再闭塞率可达 10%~20%, 近期再闭塞率可达 45% 以上^[2]。目前, 国内关于血栓形成及再闭塞动物模型的实验方法尚未见报道。近年国外有关这方面的研究已取得了长

足的进展, 但常用的血管缩窄法、机械损伤法、高脂饮食法等造成血栓时间长, 难以控制; 金属线圈法、药物促凝法等多形成富含红细胞血栓, 且常不伴内皮损伤^[3], 因而与冠脉血栓有一定差距。此外导管激光法、血管翻转、分流等方法难度较大, 技术条件高, 带来一定困难^[4]。我们的实验权衡利弊, 选择了较为可行的方法, 且将几种基本方法有机结合

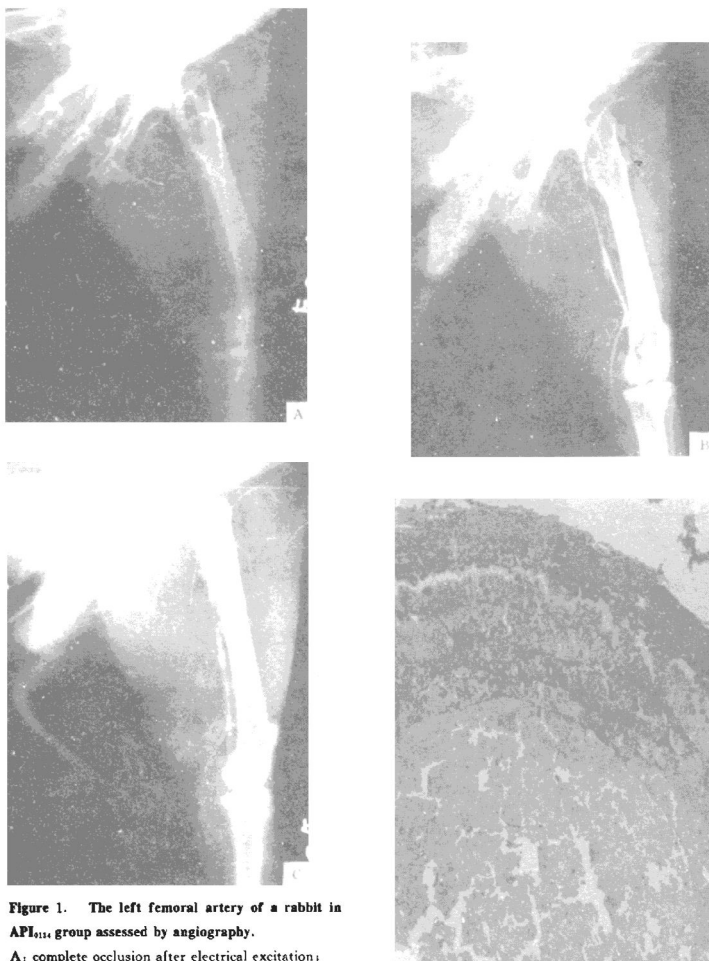


Figure 1. The left femoral artery of a rabbit in API₁₁₄ group assessed by angiography.

A: complete occlusion after electrical excitation;

B: reanalization by urokinase thrombolysis;

C: no reocclusion after intravenous drip with API₁₁₄.

Figure 3. Thrombus occlusion in the femoral artery. $\times 100$ (light microscope).

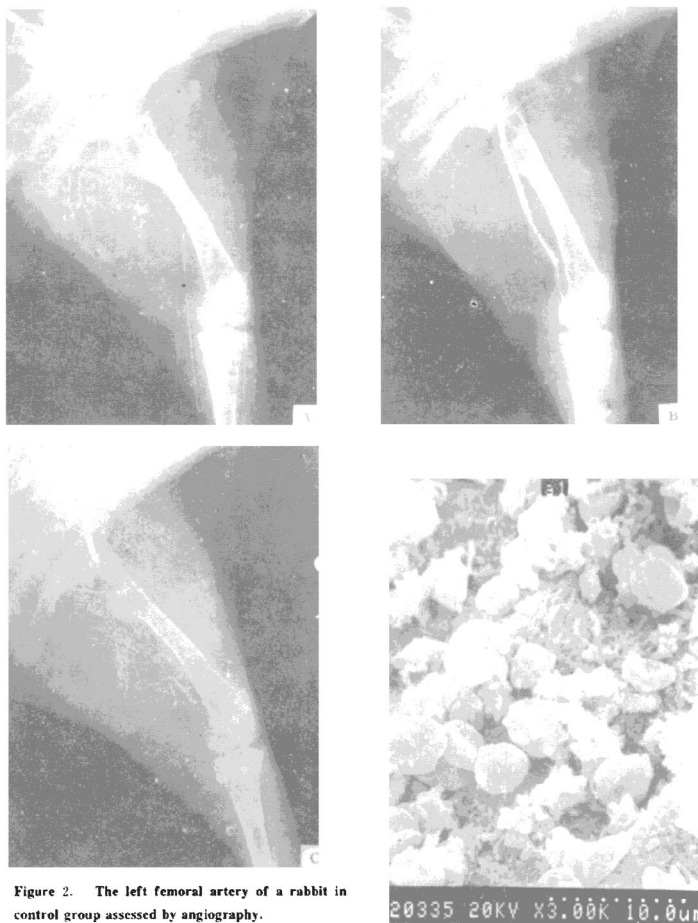


Figure 2. The left femoral artery of a rabbit in control group assessed by angiography.

A: complete occlusion after electrical excitation.

B: recanalization by urokinase thrombolysis.

C: complete reocclusion occurred when APl₀₁₃₁ were not given.

Figure 4. Platelets, red blood cells, white blood cells and foam cells the tunia intima (scanning electron microscope).

起来运用。从 Ross 的“损伤—反应学说”看, 高脂血症等诸因素引起内皮损伤或功能改变是冠心病的始动环节, 对血栓形成及再闭塞有决定作用^[6]。因而我们首先采用高脂饲养兔 8 周, 使血管壁脂质沉积, 分离出血管后又用钳夹的机械损伤法使内皮再受损。然后采用血管外电刺激法使内皮进一步损伤的基础上造成血栓形成。另外电刺激也可造成血管痉挛, 加速血栓形成。电刺激时造影可清楚看到血管逐渐闭塞, 而且从之后使用溶栓药后血管再通及病检结果看, 这种血管闭塞确实为血栓形成所致。在电刺激 2 h 以内, 所有兔左股动脉完全闭塞。说明此法制备的血栓形成率很理想。此外这种电刺激法通过调整电流来控制血栓形成时间为其优点。从结果看, 内皮损伤处附着含血小板较多的混合血栓, 这种血栓成分与人类冠心病的冠脉内血栓相似^[6]。在溶栓使血管再通后 2 h 造影见 50% 血管再闭塞。这也接近于冠心病人的溶栓后近期再闭塞率。再闭塞的机制还未得以肯定。多认为溶栓后受损的血管节段重新暴露于血流中, 并加重内皮损伤使内皮细胞的抗凝、纤溶作用减弱。另外溶解血栓处释放凝血酶、血栓素等加上残留血栓均可活化凝血机制, 造成再次血栓形成而引起再闭塞。由此可见, 前述的模型制作过程, 如高脂—内皮损伤—血栓形成, 与再闭塞的形成过程及机制相仿。

从血样标本看, 在血栓形成及再闭塞时均有 PAR、血栓素 A_2 (thromboxane A_2 TXA_2) 稳定代谢产物 TXB_2 含量、PAI 活性显著增加。而前列环素 (Prostacyclin, PGI_2) 代谢产物 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ 含量及 PA 活性显著降低。 TXA_2 主要由活化血小板产生, 可诱导血小板聚集。 PGI_2 主要由内皮细胞产生, 是最强的血小板聚集抑制剂, 为 TXA_2 的重量拮抗剂。在 TXA_2 增加, PGI_2 减少时有利于血小板聚集, 血栓形成。PA 是纤溶系统主要生理激活物, 可激活纤溶系统, 防止血栓形成或溶解已形成的血栓。PAI 则是 PA 的特异抑制剂, 二者主要由内皮合成。当 PA 活性降

低, PAI 活性升高时, 也有利于血栓形成^[7]。这些结果提示: 本血栓形成或再闭塞时, 均存在血小板激活及内皮损伤、抗凝、纤溶功能减弱, 与冠心病相似。近年来在制备血栓形成模型上, 许多人不再拘泥于冠状动脉了。虽然许多模型主要用来研究冠心病, 但选择冠脉复制血栓模型, 动物及设备要求高, 比较烦琐, 不便于观察, 容易失败。而外周动脉常能弥补这些不足。本模型简便, 经济, 便于观察, 且从造影、病检、血管活性物质检查看, 是以内皮受损、血小板活化为基础, 血栓形成率、再闭塞率及血栓成分均符合冠脉血栓形成及再闭塞特征。我室已用之研究了预防溶栓后再闭塞的药物, 获得了满意结果。

参考文献

- 1 Rung MS. Importance of experimental models in study of thrombosis and thrombolysis. *Circulation*, 1991, 83 (Suppl IV): IV1~2
- 2 John JA, Gold HK, Linbach RC. Prevention of coronary artery reocclusion and reduction in late coronary artery stenosis after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 1988, 78: 546~556.
- 3 Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, et al. Antithrombolysis therapy for deep artery injury by angioplasty. *Circulation*, 1991, 84: 814~820.
- 4 Golino P, Ashton JH, Greenwalt PG, et al. Mediation of reocclusion by thromboxane A_2 and serotonin after thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in a canine preparation of coronary thrombosis. *Circulation*, 1988, 77: 678~684.
- 5 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med*, 1986, 314: 488~452.
- 6 Jang IK, Gold HK, Ziskind AA, et al. Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. *Circulation*, 1989, 79: 920~928.
- 7 Sakamoto T, Yasue H, Ogawa H, et al. Association of patency of the infarct-related coronary artery with plasma levels of plasminogen activator inhibitor activity in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 1992, 70: 280~287.

(本文 1994-10-11 收到, 1994-11-04 修回)