

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-02-0112-03

实验性颈动脉粥样硬化模型中血栓素 B₂ 和 6-酮-前列腺素 F_{1α} 与抗凝血酶 Ⅲ和纤溶酶原活性的改变王明山¹, 张磊², 郑荣远², 谢淑萍³, 王拥军³, 高申孟¹

(温州医学院附属第一医院 1. 检验科, 2. 神经内科; 浙江省温州市 325000.

3. 首都医科大学附属宣武医院神经内科, 北京 100053)

[主题词] 动脉粥样硬化; 颈动脉; 疾病模型, 动物; 血栓素 B₂; 前列腺素 F; 纤溶酶原; 抗凝血酶 Ⅲ

[摘要] 为研究高脂饲料加空气干燥术制作的兔颈动脉粥样硬化模型中血栓素 B₂ 和 6-酮-前列腺素 F_{1α} (简称为前列腺素 F) 与抗凝血酶 Ⅲ和纤溶酶原活性改变的关系。采用 54 只日本大耳白兔分为 3 组, 分别给予高脂饲料加空气干燥术 ($n=24$)、单纯高脂饲料 ($n=24$) 和正常饲料 ($n=6$) 喂养。在实施空气干燥术后的第 3 天、第 1 周、第 2 周和第 4 周分别处死动物, 观察颈动脉病理改变和血液中血栓素 B₂ 和前列腺素 F 与抗凝血酶 Ⅲ和纤溶酶原活性改变的关系。结果发现, 高脂饲料加空气干燥术组动物第 4 周时抗凝血酶 Ⅲ活性明显降低, 而纤溶酶原活性明显升高。高脂饲料加空气干燥术组与单纯高脂饲料组的血栓素 B₂ 和血栓素 B₂/前列腺素 F 比值均较正常饲料组升高, 差异有显著性。结果提示, 高脂饲料加空气干燥术法可以形成典型的颈动脉粥样硬化病变, 病变与内皮细胞损害后血栓素和前列腺素改变及抗凝血酶 Ⅲ和纤溶酶原活性改变密切相关。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

The Changes of Thromboxane B₂, 6-ket-prostaglandin F_{1α}, Antithrombin Ⅲand Plasminogen in a Experimental Carotid Atherosclerotic Model of Rabbits

WANG Ming-Shan, ZHANG Lei, ZHENG Rong-Yuan, XIE Shu-Ping, WANG Yong-Jun, and GAO Shen-Meng

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

MeSH Atherosclerosis; Carotid Arteries; Disease Model, Animal; Thromboxane B₂; Antithrombin Ⅲ Plasminogens; Prostaglandins F

ABSTRACT **Aim** To observe the changes of thromboxane B₂ (TXB₂), 6-ket-Prostaglandin F_{1α} (PGF), antithrombin Ⅲ plasminogen in experimental carotid atherosclerosis model using air-drying in the cholesterol-fed rabbits. **Methods**

54 male Japanese White rabbits were randomly divided into 3 groups. The first group was fed by normal diet as empty control ($n=6$), the second group was fed by high-cholesterol diet as cholesterol-fed control groups ($n=24$), the third group was fed by high-cholesterol diet and treated by air-drying as experimental group ($n=24$). Animals were sacrificed at various times (from 3 days to 4 weeks) after surgery in the experimental groups and at the corresponding times in the control groups. The level of the blood lipid, thromboxane B₂, PGF, antithrombin Ⅲand plasminogen were detected. **Results** The typical carotid atherosclerosis was observed in the experimental groups. The activity of antithrombin Ⅲdecreased significantly ($P<0.001$) and the activity of plasminogen increased significantly ($P<0.001$) at 4 week after air-drying in the third group. Thromboxane B₂ and thromboxane B₂/prostaglandin F in cholesterol-fed and experimental groups significantly increased compared with the empty control group ($P<0.05$).

Conclusions The typical carotid atherosclerosis lesion can induced by air-drying in the cholesterol-fed rabbit. the pathology changes and its mechanisms were correlated with the thromboxane B₂, prostaglandin F, antithrombin Ⅲand plasminogen changes after intimal injury.

颈动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)导致的颈

[作者简介] 王明山, 男, 1963 年 3 月出生, 温州人, 1982 年毕业于金华卫校, 主管技师, 现为温州医学院检验系血液教研室副主任, 从事血栓与止血检验与教学。张磊, 男, 1972 年出生, 浙江奉化人, 1999 年获首都医科大学硕士学位, 现为神经内科主治医师。郑荣远, 男, 1949 年出生, 温州人, 神经内科教授, 硕士生导师。

动脉狭窄和脑循环血液中血凝与抗凝机制失衡, 是脑血管疾病的主要原因。研究颈 As, 对于研究脑血管疾病的发病机制与病理过程, 有着十分重要的临床意义。但是, 以往制作的 As 动物模型不适合研究颈 As, 我室参照文献[1], 利用高脂饲料加空气干燥术制作了兔颈 As 模型^[2], 观察了此模型中血栓素

B2 (thromboxane B2, TXB2) 和 6- 酮- 前列腺素 F1 α (6- ket- prostaglandin F1 α , PGF) 与抗凝血酶 ④ antithrombin ④ AT ④ 活性和纤溶酶原(plasminogen) 活性改变的关系。

1 材料与方法

实验参照文献[2] 进行, 现简述。

1.1 实验动物及分组

将动物按抽签法随机分为 3 组: 分别喂普通颗粒兔饲料(对照组)、含 1.5% 胆固醇的颗粒高脂饲料加内膜空气干燥术(空气干燥术组)和单纯高脂饲料(单纯高脂饲料组)。

1.2 内膜空气干燥术的实施

术前 12 h 禁食, 不禁水。在严格无菌条件下, 经 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉, 按 Fishman 等^[1] 方法实行颈动脉内膜空气干燥术。

1.3 标本留取及检测方法

1.3.1 取血方法 于早晨空腹取静脉血 1.8 mL 加入含 0.2 mL 的 2% EDTA-Na₂ 塑料试管中, 混匀后 3 500 r/min 离心, 取上清液于 -40℃ 保存待测。

1.3.2 血栓素 B2 和前列腺素 F 的测定 用放射免疫法测定血浆 TXB2 和 PGF1 α , 试剂盒购自北京北方生物技术研究所。

1.3.3 抗凝血酶 ④ 活性和纤溶酶原活性测定 参照文献[3], 采用发色底物法在 ACL3000plus 自动血凝仪上测定 AT ④ 和纤溶酶原活性, 试剂盒购自美国 ACL 公司。

1.4 统计学方法

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 一般情况

实验第 10 天至 35 天时, 喂饲高脂饲料的两组动物血浆甘油三酯(triglyceride, TG) 升高至 27.7~37.7 mmol/L, 低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein, LDLC) 升高至 21.2~33.1 mmol/L。与正常饲料组相比, 差异显著($P < 0.05$)。病理形态学观察发现, 喂饲高脂饲料加空气干燥术的动物颈动脉(右侧)1 周后出现明显的管壁僵硬、增厚, 2 周及 4 周组上述改变加重并在内膜可见白色条纹状隆起。光镜及电镜下均有典型的动脉粥样硬化改变。

2.2 三组动物血浆血栓素 B2、前列腺 F1 α 及血栓素 B2/6- 酮- 前列腺 F1 α 值的比较

表 1. 三组血浆血栓素 B2、前列腺素 F1 α 及血栓素 B2/前列腺素 F1 α 值的比较

Table 1. The comparison of the level of the thromboxane B2, 6-ket-prostaglandinF1 α and the ratio thromboxane B2/6-ket-prostaglandin F1 α in three groups ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	TXB2	PGF	TXB2/PGF
Control	0.39 \pm 0.22	1.26 \pm 0.91	0.36 \pm 0.14
High cholesterol-fed (HC)			
10 days	2.13 \pm 1.16 ^a	1.39 \pm 0.63	1.65 \pm 0.83 ^b
2 weeks	1.43 \pm 0.36 ^b	1.26 \pm 0.90	1.83 \pm 1.38 ^a
3 weeks	2.94 \pm 1.60 ^a	2.24 \pm 1.03	1.47 \pm 0.61 ^b
5 weeks	1.69 \pm 0.56 ^b	1.54 \pm 0.75	1.33 \pm 0.62 ^b
High cholesterol-fed plus air-drying (HCA)			
3 days	1.82 \pm 0.56 ^b	1.16 \pm 0.69	1.83 \pm 0.64 ^b
1 week	3.36 \pm 1.10 ^b	1.50 \pm 1.08	2.86 \pm 1.72 ^b
2 weeks	1.71 \pm 0.95 ^a	0.83 \pm 0.40	2.28 \pm 1.06 ^b
4 weeks	1.80 \pm 0.76 ^b	0.78 \pm 0.50	2.78 \pm 1.07 ^b

a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$, compared with control group.

如表 1 (Table 1) 所示, 高脂饲料加空气干燥术组和单纯高脂饲料组的 TXB2 和 TXB2/PGF1 α 值均较正常饲料组升高, 统计学上差异有显著性意义($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$)。高脂饲料加空气干燥术组的 TXB2 和 TXB2/PGF 与单纯高脂饲料组比较, 多数时间上的差异在统计学上无显著性意义。

表 2. 各组血浆抗凝血酶 ④ 活性和纤溶酶原活性值

Table 2. The comparison of the level of antithrombin ④ and plasminogen in three groups(%, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Activity of AT ④	Activity of plasminogen
Control	103 \pm 13	25 \pm 7
High cholesterol-fed (HC)		
10 days	106 \pm 7	21 \pm 8
2 weeks	100 \pm 13	23 \pm 11
3 weeks	109 \pm 13	31 \pm 13
5 weeks	105 \pm 13	18 \pm 7
High cholesterol-fed plus air-drying (HCA)		
3 days	102 \pm 6	35 \pm 11
1 week	106 \pm 3	16 \pm 3
2 weeks	100 \pm 11	32 \pm 5
4 weeks	74 \pm 8	68 \pm 18

2.3 三组动物血浆抗凝血酶 ④ 活性和纤溶酶原活

性的比较

如表 2 (Table 2) 所示, 高脂饲料加空气干燥术组第 4 周时 AT 活性明显降低而纤溶酶原活性明显升高, 经单因素方差分析 (AVONA), 正常饲料组与实验各组间的 AT 活性和纤溶酶原活性差异有极显著性意义 ($F = 13.118$ 和 22.115 , $P < 0.001$), 而正常饲料组与高脂对照各组间的 AT 活性和纤溶酶原活性差异则无显著性 ($F = 0.372$ 和 1.523 , P 均大于 0.05)。

3 讨论

在采用高脂饲料加空气干燥术复制家兔颈动脉 As 模型过程中, 观察到实验家兔在高脂饲料后出现 TXB2 和 TXB2/PGF1 α 的升高, 显著高于正常饲料组, 说明 TXB2 升高和 TXB2/PGF1 α 比值失衡是引起 As 发病的重要始因之一。在高脂饲料与内皮损伤的共同作用下, 可引起脂过氧化物大量生成, 促进血小板血栓素 A2 (thromboxane A2, TXA2) 产生, 也可通过激活血管平滑肌的磷脂酶 A, 导致刺激血栓素和前列腺素生成。血管舒张活性的减弱, 一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及内皮素-1 等的失衡均可通过刺激平滑肌细胞增殖在 As 病变过程中起重要作用。

近年来研究表明, 当内皮细胞受损时, 会出现血管张力调节障碍, 如 NO 的释放减少与功能障碍^[4]等。当内皮细胞发生功能障碍时各种粘附分子、趋化因子、生长因子的诱导表达增加, 它们可以使单核细胞和平滑肌细胞粘附和转移至内皮下, 并且吞噬脂质, 转化为泡沫细胞。我们在高脂饲料加空气干燥术组第 4 周观察到 AT 活性明显降低而纤溶酶原活性明显升高。Tanaka 等^[5]提出假说认为 As 是一个多种病因因素引起的病变过程, 其中包括高脂血症可能是引起血栓和 As 的一个重要原因。Ichino 等^[3]通过长期高脂喂饲日本大耳白兔, 发现在 2~6 个月时出现凝血与纤溶系统活性的变化。在临床上也发现有冠心病患者存在不同程度的血栓前状态及纤溶受抑状态^[6]。本研究中发现单纯高脂喂饲 1 个月时 AT 和纤溶酶原值变化尚不明显, 但在高脂饲料加空气干燥术组术后 1 个月时 AT 活性明显降

低和纤溶酶原活性升高, 说明存在凝血活性升高而纤溶系统活性受抑制。这与普遍认为的 As 病变过程中机体处于血栓前状态及纤溶受抑状态的理论是符合的。纤溶系统的活性受抑制可使血中纤维蛋白原 (fibrinogen) 含量增加, 而纤维蛋白原及其产物纤维蛋白 (fibrin) 可直接作用于血管平滑肌, 促进平滑肌细胞迁移与增殖; 也可以破坏血管内皮细胞的结构和功能, 使其通透性增加。而降低纤维蛋白原含量可抑制 As 病变形成^[7]。

我们在实验性颈 As 模型中初步观察到血栓素、前列腺素和抗凝、纤溶系统活性与 As 病灶中细胞增殖间的关系。同时, As 增殖病灶中的各种细胞, 如平滑肌细胞、凝血与纤溶系统活性的变化与颈 As 的关系还有待于更长时程实验的观察, 本研究为这方面的探索作了初步尝试。

参考文献

- [1] Fishman JA, Graeme BR, Morris JK, et al. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening [J]. *Lab Invest*, 1975, **32**(3): 339-351
- [2] 张磊, 陈国荣, 郑荣远, 等. 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9**(2): 155-158
- [3] Ichino K, Okazaki M, Usami S, et al. Involvement of enhanced coagulation and fibrinolysis systems in induction of atherosclerosis in hyperlipidemic rabbit fed on a high cholesterol diet [J]. *In Vivo*, 1997, **11**: 115-124
- [4] Laight DW. Investigation of endogenous nitric oxide vascular function in the carotid artery of cholesterol-fed rabbits [J]. *Br J Pharmacol*, 1996, **117**(7): 1471-474
- [5] Tanaka K, Sueishi K. Biology of disease: the coagulation and fibrinolysis systems and atherosclerosis [J]. *Lab Invest*, 1993, **69**: 5-18
- [6] 魏文宁, 宋善俊, 刘仲萍, 等. 凝血酶-抗凝血酶复合物测定及其临床意义 [J]. *同济医科大学学报*, 1998, **27**(1): 39-41
- [7] 刘京波, 汪丽蕙, 唐朝枢, 等. 纤维蛋白(原)在大鼠胸主动脉球囊成形术后肌内膜增殖中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 1999, **15**(1): 42-44

(此文 2000-06-05 收到, 2000-11-12 修回)

(此文编辑 胡必利)