

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0139-04

• 实验研究 •

17 β 雌二醇和 α 玉米赤霉醇影响大鼠血液凝固和纤维蛋白溶解功能

王 雯, 朱广瑾, 祖淑玉

(中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所病理生理学系, 北京市 100005)

[关键词] 病理学与病理生理学; 雌激素影响凝血和纤溶功能; 大鼠去卵巢模型; 17 β 雌二醇; α 玉米赤霉醇; 凝血活性; 纤溶活性

[摘要] 为探讨 17 β 雌二醇及植物雌激素 α 玉米赤霉醇对去势大鼠凝血及纤溶功能的影响, 并对二者的作用进行比较分析。选用 36 只健康成年雌性 Wistar 大鼠, 随机分为 4 组(每组均为 9 只): 假手术对照组; 去卵巢组; 去卵巢+ 补充 17 β 雌二醇组, 去卵巢 14 天后肌注 17 β 雌二醇(1 mg/kg, 3 天注射一次, 共 35 天); 去卵巢+ 补充 α 玉米赤霉醇组, 去卵巢 14 天后肌注 α 玉米赤霉醇(1 mg/kg, 3 天注射一次, 共 35 天)。实验结束后大鼠经颈总动脉采血, 分离血浆。用凝固法测定血浆凝血酶原时间及活化部分凝血活酶时间。用全自动生物化学分析仪测定血浆纤维蛋白原水平。用酶联免疫吸附法测定血浆组织因子水平。组织型纤溶酶原激活剂及纤溶酶原激活剂抑制物活性测定均采用发色底物法。结果发现, 去卵巢组大鼠与对照组相比, 凝血酶原时间明显缩短, 而纤维蛋白原, 组织因子等均明显升高, 组织型纤溶酶原激活剂活性明显降低, 而纤溶酶原激活剂抑制物活性明显升高; 补充 17 β 雌二醇或 α 玉米赤霉醇后, 除纤溶酶原激活剂抑制物活性下降不明显外, 大鼠的其他上述指标均与对照组接近, 而与单纯去卵巢组有显著性差异。各组间活化部分凝血活酶时间的变化尚无统计学差异。以上结果表明, 大鼠去卵巢后, 内源性雌激素水平下降, 导致凝血活性增高, 纤溶活性下降, 血液处于高凝状态, 易于发生血栓性疾病。补充外源性 17 β 雌二醇或 α 玉米赤霉醇后, 凝血活性均明显降低, 接近于假手术对照组, 同时纤溶活性有所回升, 重新建立起凝血—纤溶的动态平衡, 这可能是雌激素替代治疗降低血栓性疾病的发生, 对心血管系统产生保护效应的重要机制之一。本实验中, α 玉米赤霉醇对凝血和纤溶功能的影响同 17 β 雌二醇相似, 但刺激子宫的副作用明显小于 17 β 雌二醇, 是一种有一定应用前景的雌激素替代药物, 其具体的作用机制值得进一步深入研究。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effects of 17 β -Estradiol and Phytoestrogen α -Zearalanol on Coagulation and Fibrinolysis in Rats

WANG Wen, ZHU Guang-Jin, and ZU Shu-Yu

(Department of Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

[KEY WORDS] 17 β -Estradiol; α -Zearalanol; Coagulation; Fibrinolysis; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of 17 β -estradiol and α -zearalanol on coagulation and fibrinolysis in ovariectomized rats. **Methods** Female Wistar rats were divided into four groups ($n=9$ each group): sham operated (sham), ovariectomized (OVX), ovariectomized and treated with 17 β -estradiol (OVX+ E2), ovariectomized and treated with α -zearalanol (OVX+ ZAL). After administration of 17 β -estradiol or α -zearalanol for 5 weeks, rats were killed and plasma was collected. The following parameters were tested: the prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT), the level of fibrinogen (FG) and tissue factor (TF), the activity of tissue plasminogen activator (t-PA) as well as plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). **Results** Ovariectomy markedly decreased PT and the activity of t-PA, as well as increased the level of FG, TF and the activity of PAI-1 in comparison with sham operated group ($P<0.05$ or $P<0.01$). These changes were reversed by 17 β -estradiol or α -zearalanol replacement. Except for PAI-1, these parameters about coagulation and fibrinolysis were similar among sham, OVX+ E2 and OVX+ ZAL. There was no significant difference on the value of APTT among the four groups ($P>0.05$). **Conclusion** After ovariectomy, as the endogenous estrogen decreases, the blood is hypercoagulable than ever; treating with 17 β -estradiol or α -zearalanol can reverse this change. Both 17 β -estradiol and α -zearalanol have protective effects on cardiovascular system. Prior study has shown that compared with 17 β -estradiol, α -zearalanol has less side effects so more attention should be paid to this natural phytoestrogen.

[收稿日期] 2003-05-12 [修回日期] 2004-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(39730220)资助

[作者简介] 王雯, 讲师, 博士研究生, E-mail 为 wangwen@pumc.edu.cn。朱广瑾, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事心血管病的基础研究, 发表论文 50 余篇, 参加撰写专著 10 部, 本文通讯作者; 联系电话为 010-65296476, E-mail 为 zhugj@pumc.edu.cn。祖淑玉, 主管技师。

在绝经后妇女中,心脑血管疾病是威胁其健康的常见疾病,降低心脑血管疾病的发生对提高妇女晚年生活质量有重要意义。流行病学研究表明^[1],绝经前妇女心脑血管疾病的发生率低于同龄男性,绝经后此差别消失。很多临床报告也支持雌激素对心血管系统有保护作用^[2,3]。但这方面的作用机制尚未完全阐明,关于雌激素对凝血及纤溶功能影响机制的报道不多。目前,雌激素替代治疗(hormone replacement therapy, HRT)的合理运用对于防治心脑血管疾病等老年病已引起广泛重视。但不可忽视,部分临床调查显示应用HRT的患者子宫内膜癌和乳腺癌的发病率升高^[4,5],这就大大限制了它的临床推广。因此,人们将注意力投向了寻找一种安全可靠而副作用小的雌激素替代药物。 α 玉米赤霉醇(α -Zearalanol, ZAL)是一种天然内源性植物雌激素,属于二羟基苯酸内酯类化合物,具有雌激素样效应,与高等植物的发育有关,广泛存在于豆类、谷物等多种植物中。前期的实验研究表明^[6],它具有与雌激素类似的抗动脉粥样硬化作用,同时对子宫和乳腺的增殖作用明显低于雌激素,有一定的应用前景。本研究旨在探讨17 β 雌二醇(17 β -estradiol, E2)及植物雌激素 α 玉米赤霉醇对大鼠凝血及纤溶功能的影响,并对二者的作用进行比较分析。

1 材料与方法

1.1 试剂

17 β 雌二醇购于美国Sigma公司, α 玉米赤霉醇由中国农业大学李季伦教授惠赠。雌二醇测定试剂盒购于天津九鼎医学生物工程有限公司。纤维蛋白原(fibrinogen, FG)测定、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)测定、组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)活性及纤溶酶原激活剂抑制物(plasminogen activator inhibitor type 1, PAI-1)活性测定试剂盒均购于上海太阳生物技术有限公司。组织因子(tissue factor, TF)测定试剂盒购于美国Diagnostica公司。

1.2 实验动物及分组

选用36只健康雌性Wistar大鼠(12周龄,体重 250 ± 10 g),首都医科大学实验动物科学部提供(清洁级,合格证号SCXK 11-00-0012)。动物随机分为4组(每组均为9只):假手术对照(sham)组动物剖开腹腔而不摘除卵巢;去卵巢(ovariectomy, OVX)组动物参照施新猷等^[7]方法在无菌条件下摘除双侧卵

巢;去卵巢+补充17 β 雌二醇(OVX+ E2)组动物在去卵巢14天后肌注17 β 雌二醇,每次1 mg/kg,3天注射一次,共35天;去卵巢+补充 α 玉米赤霉醇(OVX+ ZAL)组动物在去卵巢14天后肌注 α 玉米赤霉醇,每次1 mg/kg,3天注射一次,共35天。实验期间大鼠生长良好,全部存活。

1.3 样品采集及指标测定

实验结束后大鼠经戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉,3.8%柠檬酸钠抗凝,颈总动脉采血,立即以4℃,3 kr/min离心10 min,分离血浆备用。同时分离子宫附近的脂肪组织,将子宫剪下,用美国OHAUS公司AR2130/C型电子天平准确称取子宫重量,计算子宫重/体重的比值。采用典型的双抗体放射免疫学方法测定血浆雌二醇水平,用 γ 计数器测量放射性强度(每分钟计数, cpm)。血浆PT及APTT均用凝固法测定,按照试剂盒说明操作,以出现浑浊的初期凝固为准。用德国Beckman公司CX4PRO型全自动生化分析仪测定血浆纤维蛋白原水平。TF水平测定采用酶联免疫吸附法(ELISA),按照试剂盒说明书操作,美国Biorad公司Microplate EL311s型酶标仪测A450值。tPA及PAI-1活性测定均采用发色底物法,按照试剂盒说明书操作, Microplate EL311s型酶标仪测A405值。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),用Student-Newman-Keuls法进行两两比较,差异显著性界限为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 去势大鼠血浆雌二醇含量的变化

各组大鼠血浆雌二醇含量的变化见表1(Table 1)。同对照组相比,OVX组大鼠血浆雌二醇含量明显下降($P < 0.05$);而OVX+ E2组血浆雌二醇含量则较单纯OVX组明显升高($P < 0.01$),OVX+ ZAL组血浆雌二醇含量与单纯OVX组相比无显著差别,但明显低于OVX+ E2组($P < 0.01$)。

2.2 实验动物凝血参数的变化

实验动物各项凝血参数的变化见表2(Table 2)。OVX组大鼠同对照组相比,PT值明显缩短($P < 0.01$),而FG,TF等均明显升高(P 分别 < 0.01 , < 0.05);OVX+ E2组和OVX+ ZAL组大鼠的上述指标与对照组接近,而与单纯OVX组有显著性差异。APTT值的变化则尚无统计学差异($P > 0.05$)。

表 1. 去势大鼠血浆雌二醇含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 1. Estradiol level of plasma

分 组	E2 (pmol/L)
Sham	149.7 ± 54.6
OVX	100.6 ± 11.5 ^a
OVX+ E2	183.4 ± 49.8 ^b
OVX+ ZAL	115.8 ± 18.3 ^c

a: $P < 0.05$, 与 sham 组比较; b: $P < 0.01$, 与 OVX 组比较; c: $P < 0.01$, 与 OVX+ E2 组比较。

表 2. 大鼠血浆凝血参数的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 2. Change of coagulation parameters in rats

分 组	PT (s)	APTT (s)	FG (g/L)	TF (ng/L)
Sham	16.28 ± 1.09	34.40 ± 2.45	0.95 ± 0.14	58.50 ± 15.05
OVX	13.94 ± 0.68 ^b	31.89 ± 3.60	1.31 ± 0.15 ^b	71.84 ± 6.36 ^a
OVX+ E2	15.61 ± 0.93 ^d	34.78 ± 4.52	1.10 ± 0.13 ^c	52.79 ± 16.99 ^c
OVX+ ZAL	15.17 ± 0.43 ^c	33.17 ± 2.15	1.13 ± 0.09 ^c	46.31 ± 23.12 ^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与 OVX 组比较。

2.3 实验动物纤溶参数的变化

实验动物纤溶参数的变化见表 3 (Table 3)。OVX 组大鼠同对照组相比, tPA 活性明显降低 ($P < 0.01$), 而 PAI-1 活性明显升高 ($P < 0.01$); 补充 17 β 雌二醇和补充 ZAL 后, tPA 活性明显升高, 而 PAI-1 活性虽有下降的趋势, 但尚无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 3. 大鼠血浆纤溶参数的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 3. Change of fibrinolysis parameters in rats

分 组	tPA (IU/L)	PAI-1 (AU/ml)
Sham	240 ± 90	70 ± 20
OVX	20 ± 20 ^a	140 ± 40 ^a
OVX+ E2	110 ± 40 ^c	110 ± 50
OVX+ ZAL	70 ± 50 ^b	120 ± 40

a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与 OVX 组比较。

2.4 17 β 雌二醇和 α 玉米赤霉醇对去势大鼠子宫增生的影响

见表 4 (Table 4)。数据符合正态分布, 方差具有齐性。OVX 组大鼠子宫明显缩小 (子宫重/体重 = 0.45), 不及对照组 (子宫重/体重 = 1.67) 的 30%; 补充 17 β 雌二醇和 ZAL 后, 子宫虽均较 OVX 组明显增大, 但 ZAL 对子宫增生的影响很弱 (子宫重/体重 = 0.66), 明显低于 17 β 雌二醇 (子宫重/体重 = 1.96),

仅为后者的 33% ($P < 0.01$)。

表 4. 大鼠子宫重与体重比值的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Table 4. Chang of uteri weight/body weight

分 组	子宫重/体重 (g/kg)
Sham	1.66 ± 0.31
OVX	0.45 ± 0.15 ^a
OVX+ E2	1.96 ± 0.36 ^c
OVX+ ZAL	0.66 ± 0.09 ^{bd}

a: $P < 0.01$, 与 sham 组比较; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与 OVX 组比较; d: $P < 0.01$, 与 OVX+ E2 组比较。

3 讨 论

本实验通过切除大鼠双侧卵巢复制去卵巢动物模型。根据文献[7]报道, 去卵巢 2 周后, 内源性雌激素水平逐渐降低, 用阴道涂片法确认动物不再发情, 此时开始补充外源性雌激素, 35 天后取血测血浆雌二醇水平。结果发现, OVX 组大鼠血浆雌二醇明显低于对照组, 表明内源性雌激素水平已显著降低; OVX+ E2 组血浆雌二醇水平较 OVX 组明显升高, 表明补充外源性 17 β 雌二醇后提高了血浆雌二醇水平; 补充 ZAL 后血浆雌二醇水平与 OVX 组相比无显著差别, 但明显低于 OVX+ E2 组。以上结果表明本实验动物模型复制成功。

目前关于雌激素对凝血系统的确切影响尚未完全搞清。文献中存在着相互矛盾的报道。有报道 HRT 可降低纤维蛋白原和凝血因子 VII 的水平^[8], 亦有报道 HRT 应用者患静脉血栓的风险大幅升高^[9]。影响凝血活性的因素极多^[10], 包括个体差异如年龄、遗传因素、肥胖及是否患糖尿病等, 另外还涉及雌激素补充治疗中的剂量问题及与孕激素、雄性激素的配比关系等, 下结论需慎重, 尚需进行大量的基础和临床研究证实。本工作在本室前期研究的基础上^[6,11], 观察了中等剂量的植物激素 ZAL 补充疗法对去卵巢大鼠凝血和纤溶功能的影响, 并与同剂量 17 β 雌二醇的作用进行比较。

传统的凝血理论将凝血途径分为二个: 外源性途径和内源性途径。本实验中反映外源性凝血途径活化程度的 PT 值在 OVX 组较对照组明显缩短, 而补充外源性 17 β 雌二醇或 ZAL 后, PT 值均较 OVX 组明显延长, 与对照组无显著差别。反映内源性凝血途径活化程度的 APTT 值的变化虽无统计学差异, 但也存在上述趋势。雌激素水平如何影响凝血活性? 本实验进一步测定了各组大鼠血浆纤维蛋白原和组织因子的含量。纤维蛋白原是冠心病的一个

主要、独立的危险因素^[12]。本实验结果发现, OVX 组大鼠血浆纤维蛋白原水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 补充外源性 17β 雌二醇或 ZAL 后则可使升高的纤维蛋白原有所降低 ($P < 0.05$), 提示雌激素可通过降低纤维蛋白原水平而影响凝血活性。组织因子即第三凝血因子^[13], 又称组织凝血活酶, 作为凝血因子 VII 的辅因子和受体, 在启动外源性及内源性凝血过程中起非常重要的作用。病理情况下血管系统中组织因子异常表达与释放可迅速启动血液凝固过程。许多心血管疾病如动脉粥样硬化、急性冠脉综合征及某些疾病的血栓栓塞性并发症都与之密切相关^[14]。本实验发现, OVX 组大鼠血浆组织因子水平较对照组明显升高, 而 OVX + E2 组和 OVX + ZAL 组的组织因子水平接近对照组, 表明雌激素可以减低血浆组织因子含量, 进而降低血液凝固性。

除凝血因子外, 纤溶因子异常、纤溶活性降低也与心肌梗死等疾病的危险性增高有密切关系。tPA 和 PAI-1 是纤溶系统中重要的生理活性物质。tPA 是纤溶系统的始动因子之一, 其功能是裂解纤维蛋白(原)为降解产物(FDP), 此外也水解诸多凝血因子。PAI-1 是其主要的生理性抑制剂。正常机体中 tPA 和 PAI-1 保持着动态平衡, 二者的平衡对维持血液纤溶系统功能正常非常重要。Gebara 等^[15]报道, 绝经前妇女血浆 PAI-1 水平比同龄男性低, 绝经后此差别消失; 同时绝经后妇女 PAI-1 水平明显低于雌激素替代治疗妇女。本实验观察到大鼠去卵巢后血浆 tPA 活性明显降低, PAI-1 活性明显升高 (P 均 < 0.01); 补充 17β 雌二醇或 α 玉米赤霉醇后, tPA 活性有所升高, 而 PAI-1 活性虽有下降的趋势, 但尚无统计学差异 ($P > 0.05$)。提示雌激素缺乏可引起纤溶能力下降, 可能与纤溶抑制因子表达增加有关; 外源性雌激素对纤溶能力有一定程度的影响。

综上所述, 大鼠去卵巢后, 内源性雌激素水平下降, 导致凝血活性增高, 纤溶活性下降, 血液处于高凝状态, 易于发生血栓性疾病。补充外源性 17β 雌二醇或 ZAL 后, 凝血活性均明显降低, 接近于假手术对照组, 同时纤溶活性有所回升, 重新建立起凝血

-纤溶的动态平衡, 这可能是雌激素替代治疗产生心血管系统保护效应的重要机制之一。本实验中, ZAL 对凝血和纤溶功能的影响同 17β 雌二醇相似, 但对子宫增生的诱导作用仅为 17β 雌二醇的 1/3, 与前期研究结果一致^[6], 副作用明显小于 17β 雌二醇, 是一种有一定应用前景的雌激素替代药物, 其具体的作用机制值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prevent Med*, 1991, **20** (1): 47-63
- [2] Grimes DA, Lobo RA. Perspectives on the Women's Health Initiative trial of hormone replacement therapy. *Obstet Gynecol*, 2002, **100** (6): 1344-353
- [3] Rosano GM, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Beneficial effect of oestrogen on exercise-induced myocardial ischaemia in women with coronary artery disease. *Lancet*, 1993, **342**: 133-136
- [4] Lobo RA. Benefits and risks of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, **173** (3Pt2): 982-990
- [5] Reid RL. Progestins in hormone replacement therapy: Impact on endometrial and breast cancer. *J SOGC (Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada)*, 2000, **22** (9): 677-681
- [6] 戴顺龄, 段金虹, 陆媛, 张仪华, 程锦轩, 赵小元, 等. 新的植物雌激素 α 玉米赤霉醇明显抑制实验性动脉硬化发病进程. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 385-390
- [7] 施新猷. 卵巢摘除术. 见: 施新猷. 医学动物实验技术方法. 北京: 人民军医出版社, 2000; 380-381
- [8] Chae CU, Ridker PM, Manson JE. Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Thromb Haemost*, 1997, **78** (1): 770-780
- [9] Mammen EF. Oral contraceptive pills and hormonal replacement therapy and thromboembolic disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2000, **14** (5): 1045-059
- [10] Koh KK. Effects of hormone replacement therapy on coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. *Int J Hematol*, 2002, **76** (S2): 44-46
- [11] 张莹, 朱广瑾, 段岩平. 雌激素对血液凝固与纤维蛋白溶解的影响及对心血管的保护作用. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 57-61
- [12] Reganon E, Martinez-Sales V, Vila V, Vaya A, Martinez M, Palencia MA, et al. Relationship between fibrinogen protein and fibrinogen function in postmyocardial infarction patients. *Thromb Res*, 2001, **104** (6): 413-419
- [13] Martin DM, Wiiger MT, Prydz H. Tissue factor and biotechnology. *Thromb Res*, 1998, **90** (1): 1-25
- [14] Falciani M, Gori AM, Fedi S, Chiarugi L, Simonetti I, Dabizzi RP, et al. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb Haemost*, 1998, **79** (3): 495-499
- [15] Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheny T, Xu P, et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the framingham offspring study. *Circulation*, 1995, **91** (7): 1952-958

(此文编辑 胡必利)