

## 球囊损伤大鼠主动脉内皮后血小板活化及凝血酶受体表达的变化

李永红<sup>1</sup>, 葛志明<sup>1</sup>, 李志强<sup>2</sup>, 郭明磊<sup>3</sup>, 董果雄<sup>3</sup>, 李 琰<sup>4</sup>, 张 运<sup>1</sup>

(1. 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012; 2. 青岛市中级法院技术处, 山东省青岛市 266071; 3. 青岛大学医学院附属医院, 山东省青岛市 266003; 4. 青岛市崂山区疾病预防控制中心, 山东省青岛市 266101)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内皮损伤对血小板活化及凝血酶受体的影响; 逆转录-聚合酶链反应; 球囊损伤; 凝血酶受体; 血小板活化; 再狭窄

[摘要] 目的 探讨经皮冠状动脉腔内成形术后再狭窄的发生机制。方法 建立大鼠主动脉内皮球囊损伤模型, 分别于术后 3 天、7 天、14 天和 28 天, 通过组织学检查、放射免疫法和逆转录-聚合酶链反应技术检测主动脉球囊损伤后内膜增生的情况、血小板表面 GMP-140 数目和凝血酶受体 mRNA 表达的变化。结果 凝血酶受体 mRNA 在正常血管组织的表达较弱, 球囊损伤术后第 3 天已显著增加, 术后第 14 天达峰值, 术后第 28 天开始下降。GMP-140 于术后第 3 天明显升高, 术后第 7 天开始下降。内皮损伤术后第 3 天已有增生的血管平滑肌细胞移行至内膜层; 术后第 7 天内膜开始增生; 术后第 14 天血管平滑肌细胞的增殖及内膜增生更为明显; 术后第 28 天血管平滑肌细胞的增殖明显减弱, 细胞外基质增加, 内膜继续增生。结论 血管内皮损伤内膜增生的过程中血小板活化, 凝血酶受体 mRNA 表达增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Alteration of Platelet Activation and Expression of Thrombin Receptor mRNA after Aortic Balloon Injury in Rats

LI Yong-Hong, GE Zhi-Ming, LI Zhi-Qiang, GUO Ming-Lei, DONG Guo-Xiong, LI Yan, and ZHANG Yun

(Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Restenosis; Balloon Injury; Thrombin Receptor; Platelet Activation; mRNA; Intimal Thickening; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the process of neointimal formation, level of platelet activation and thrombin receptor mRNA by means of a rat aortic balloon injury model in order to study the mechanism of acute and late restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). **Methods** Forty eight male Wistar rats were divided into two groups randomly. Group 1 ( $n=24$ ) served as controls, group 2 ( $n=24$ ) were given aortic balloon injury by self-made 2F balloon catheters. The process of intimal thickening, number of platelet GMP-140 and level of thrombin receptor mRNA were investigated at day 3, 7, 14 and 28 after balloon injury by histological method, radioimmunological method and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, respectively. Six rats were examined at each group. **Results** The expression of thrombin receptor mRNA was at a low level in endothelium and smooth muscle cell of normal arteries, but increased significantly at day 3 after balloon injury, reached its peak at day 14 and decreased at day 28. The number of platelet GMP-140 was higher at day 3 and began to decrease at day 7 after injury. The migration and proliferation of vascular smooth muscle cell had existed at day 3 after balloon injury. The intimal thickening began at day 7 after injury, and it was more significant at day 14. The proliferation of VSMC decreased at day 28, but extracellular matrix increased and the intimal thickening continued. **Conclusions** The expression of TR mRNA and the number of platelet GMP-140 increase in the process of intimal thickening after balloon injury.

经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 由于术后存在早期

急性血管闭塞和晚期再狭窄的并发症, 使其疗效受到严重影响。急性血管闭塞的发生率为 2% ~ 11%, 术后半年的再狭窄率为 30% ~ 50%, 即使行支架置入术后仍达 17% ~ 32%。药物涂层支架 (drug eluting stent, DES) 虽可使相对简单病变的再狭窄率降至 0% ~ 10%<sup>[1]</sup>, 但对复杂病变的疗效及安全性尚需进一步研究。研究表明, PTCA 术后血小板活化和血栓形成不仅是急性血管闭塞的主要原因,

[收稿日期] 2004-08-22

[修回日期] 2005-01-24

[作者简介] 李永红, 博士研究生, 副主任医师, 主要从事冠心病及心力衰竭的研究, 联系电话为 13356869316, E-mail 为 liyonghong66@163.com。葛志明, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病及心力衰竭的研究, 联系电话为 05316803916, E-mail 为 gezhiming@sdu.edu.cn。李志强, 医学硕士, 副教授, 主要从事亲子鉴定研究, 联系电话为 05323098510, E-mail 为 lizhiqiang35@163.com。

而且是再狭窄的重要启动因素,血管中层平滑肌细胞的移行和增殖是支架内再狭窄发生的主要机制。现已证实凝血酶不仅通过凝血过程,而且通过激活血管壁细胞的凝血酶受体(thrombin receptor, TR)参与了PTCA后血管病变的形成过程<sup>[2]</sup>,但对球囊损伤主动脉内皮后内膜增生过程中血小板活化程度及TR mRNA变化的影响,国内尚未见有报道,本文就此进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型的建立与分组

将体重300 g~400 g的雄性Wistar大鼠(购自青岛市实验动物中心)随机分为对照组( $n=24$ )和手术组( $n=24$ ),各组再分别分为3天、7天、14天和28天亚组( $n=6$ )。手术组自左颈总动脉插入自制的2F球囊导管剥脱主动脉内皮。对照组除不插入球囊导管外,其余操作同手术组。

### 1.2 血小板表面膜蛋白GMP-140的测定

大鼠麻醉后,眶静脉取血,置于2%EDTA- $\text{Na}_2$ 试管中。取0.4 mL EDTA- $\text{Na}_2$ 抗凝血与等量全血固定剂混合,室温作用30 min后,4℃冰箱保存,24 h内放射免疫法测定血小板表面膜蛋白GMP-140的数目(试剂盒购自苏州医学院血栓与止血研究室)。操作严格按照试剂盒的要求进行,结果以分子数/血小板表示。

### 1.3 组织学检查

眶静脉取血后的大鼠,无菌条件下取主动脉段约4~5 cm,在腹主动脉近主动脉弓端取约5 mm制作常规HE切片,在光镜下观察各组血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖及内膜增生的情况,并采用图像分析仪测量内膜厚度和中膜厚度。

### 1.4 逆转录—聚合酶链反应

将以上取出的剩余主动脉剪碎,0.2%胶原酶消化,D-Hank's液清洗,制成单细胞沉淀。单细胞沉淀加入Trizol试剂(美国,GIBCO公司)1 mL,再经氯仿、异丙醇提取总RNA。紫外分光光度计测定RNA的 $A_{260}/A_{280}$ ,确定其纯度。逆转录反应根据逆转录试剂盒(美国,Promega公司)要求的标准进行。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)中TR和内参照GAPDH的引物参照文献[3]设计,由北京赛百盛生物工程公司合成。TR和GAPDH扩增片段的长度分别为455 bp和320 bp。TR的反应条件为94℃ 30 s→50℃ 30 s→72℃ 1 min,共35个循环,最后72℃延伸5 min。1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像

分析仪对结果进行分析。将每份标本的TR扩增条带与内参照GAPDH扩增条带的平均光密度比作为TR mRNA含量的相对值。

### 1.5 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析法进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 凝血酶受体mRNA水平的变化

如表1(Table 1)和图1(Figure 1),对照组大鼠TR mRNA表达量极低,手术组术后各时间点TR mRNA表达均较高,28天时开始降低。

表1. 球囊损伤后大鼠主动脉凝血酶受体mRNA表达及血小板表面GMP-140水平的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 1. Expression of TR mRNA and level of platelet GMP-140 before and after aortic balloon injury in rats

分 组	TR mRNA	GMP-140(分子数/血小板)
对照组 3天	0.022±0.049	792±126
7天	0.016±0.028	757±128
14天	0.023±0.039	768±120
28天	0.013±0.028	758±186
手术组 3天	0.451±0.054 <sup>a</sup>	1615±190 <sup>b</sup>
7天	0.609±0.032 <sup>a</sup>	1345±230 <sup>b</sup>
14天	0.840±0.049 <sup>b</sup>	887±265
28天	0.789±0.051 <sup>b</sup>	835±227

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

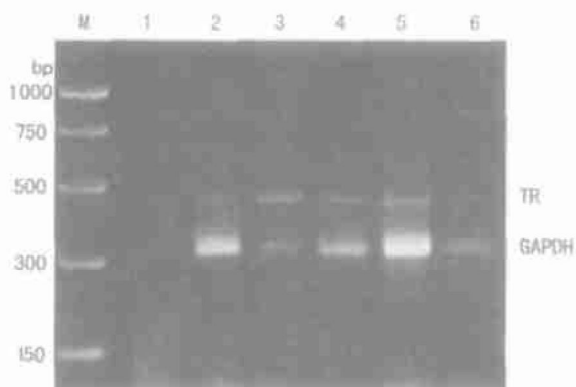


图1. 球囊损伤大鼠主动脉内皮后凝血酶受体mRNA表达的变化 M为marker, 1为阴性对照, 2、3、4、5和6分别为术后第28天、14天、7天、3天亚组和对照组。

Figure 1. Expression of TR mRNA before and after aortic balloon injury in rats by RT-PCR

### 2.2 血小板表面GMP-140的测定

球囊损伤主动脉内皮3天后手术组血小板表面

GMP-140 较对照组明显升高 ( $P < 0.01$ ), 7 天开始下降 ( $P < 0.01$ ), 14 天和 28 天恢复至术前水平 ( $P > 0.05$ ) (表 1, Table 1)。

### 2.3 组织学检查

球囊损伤大鼠主动脉内皮后 3 天内膜中已可见增殖的 VSMC, 但无内膜和中膜增厚; 术后 7 天已有内皮细胞新生, 内膜、中膜中有较多增殖的 VSMC, 并开始增生; 术后 14 天内皮细胞已覆盖大部分损伤面, 内膜中有大量 VSMC 增殖, 内膜和中膜增生, 内弹力层迂曲, 但以内膜增生为主; 术后 28 天内皮细胞几乎覆盖全部损伤面, 细胞外基质成份增加, VSMC 的增殖减弱, 而内膜继续增生 (图 2 和表 2, Figure 2 和 Table 2)。

表 2. 主动脉球囊损伤后内膜和中膜厚度的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Change of intima and media after aortic balloon injury in rats

分 组	内膜 (Hm)	中膜 (Hm)
对照组 3 天	25 ± 6	200 ± 9
7 天	26 ± 8	208 ± 16
14 天	29 ± 10	205 ± 13
28 天	28 ± 9	211 ± 17
手术组 3 天	29 ± 4	211 ± 12
7 天	58 ± 7 <sup>b</sup>	250 ± 18 <sup>b</sup>
14 天	92 ± 8 <sup>b</sup>	291 ± 14 <sup>b</sup>
28 天	107 ± 13 <sup>b</sup>	252 ± 15 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

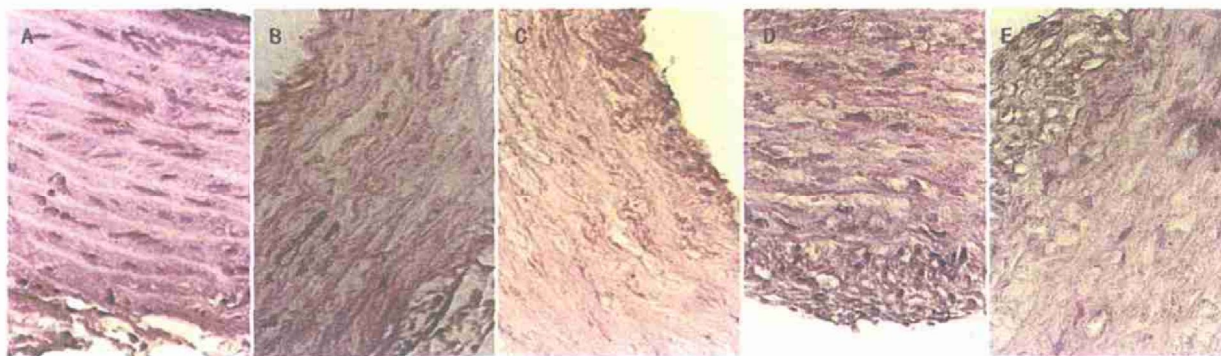


图 2. 大鼠胸主动脉管壁的 HE 切片 ( $\times 400$ ) A 为正常对照组, B 为损伤后 3 天亚组, C 为损伤后 7 天亚组, D 为损伤后 14 天亚组, E 为损伤后 28 天亚组。

Figure 2. Rat thoracic aorta section by HE staining

### 3 讨论

经皮冠状动脉腔内成形术后急性血管闭塞主要是由于在球囊损伤部位形成血小板血栓引起, 而再狭窄主要为血管局部对球囊损伤的过度愈合反应, 其发生机制主要包括 VSMC 的增殖、血管内凝血及血栓形成、血管重构等几个方面<sup>[4]</sup>, 其中 VSMC 的增殖和血管重构被认为是再狭窄发生的主要机制。

球囊损伤血管内皮后, 动脉内皮剥脱, 内皮下组织暴露, 血小板活化、粘附, 并聚集于损伤处, 导致血栓形成, 引起急性血管闭塞。同时活化的血小板可释放、激活多种生长因子和丝裂原等物质, 如血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、血小板因子 4 (platelet factor-4, PF4)、表皮生长因子、转移生长因子  $\beta$  (transforming growth factor-beta, TGF- $\beta$ ) 等, 刺激 VSMC 的移行、增殖及表型转变, 引起一系

列血管损伤后的修复反应, 导致再狭窄的发生。最近有报道, 西立伐他汀等降脂药物对预防血管成形术后狭窄有效, 且其疗效除与降脂作用相关外还与减少 PDGF-B 和增加 TGF- $\beta$ 1 的释放有关<sup>[5]</sup>。

GMP-140 是血小板表面  $\alpha$  颗粒膜蛋白, 当血小板活化时, 迅速分布并持久表达于血小板表面, 并释放入血浆中。血小板表面及血浆中 GMP-140 含量的变化是体内血小板功能变化的特异性指标, 是目前反映血小板活化状态最敏感的指标之一, 并在血栓形成的过程中起始动作用。本文对球囊损伤血管内皮后血浆 GMP-140 水平的变化进行了研究。结果表明, 大鼠主动脉内皮损伤后 3 天血小板膜表面 GMP-140 较对照组明显升高, 7 天后开始下降, 术后 14 天恢复至术前水平。说明血管内皮损伤后体内血小板即开始活化, 且至少 1 周内处于活化状态, 有血栓形成导致血管闭塞的可能性。因而, 抑制血小

板活化对预防 PTCA 后的并发症可能有益。凝血酶是血管壁及内皮细胞损伤后局部大量产生的一种丝氨酸蛋白酶。体内外的研究均表明,PTCA 术中对血管壁及内皮细胞的损伤,致使促凝物质如胶原及组织因子等暴露,造成局部凝血酶产生增加。凝血酶不仅可激活血小板的粘附及聚集过程,促进术后局部血小板性血栓生成,而且还能促进 VSMC 的增殖,增强其它生长因子的促 VSMC 增殖作用。

凝血酶在血管病变形成过程中的各种作用,是通过激活不同类型细胞上的 TR 实现的。正常动脉 TR mRNA 主要存在于外膜,内膜较少,中层则无。血管内皮损伤后,VSMC 由收缩型变为增殖型,并向内膜中迁移。研究表明,增殖的 VSMC 有 TR 表达,而静止期的 VSMC 则无 TR 表达<sup>[6]</sup>。本研究发现球囊损伤血管内皮后 VSMC 移行、增殖,细胞外基质增加,导致新生内膜增生,同时 TR mRNA 表达增加。这主要与球囊损伤血管内皮后局部凝血酶产生增加,从而激活了血小板、内皮细胞及增殖的 VSMC 上的 TR,引起 TR mRNA 的表达上调,进而导致 TR 蛋白表达增加。同时由于损伤局部产生的血管紧张素Ⅱ的协同作用,进一步增加了 VSMC 的 TR 表达<sup>[3]</sup>。

凝血酶与激活的 TR 结合,通过其跨膜信号转导,旁分泌 PDGF、成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF),诱导原癌基因  $c-fos$ 、 $c-myc$  和

$c-sis$  表达,激活促有丝分裂蛋白激酶(MAPK)和促进活性氧(ROS)的生成,启动、促进 VSMC 的分裂和增殖,并调节许多凝血后的细胞内反应,影响内皮细胞和白细胞的功能及血管周围细胞的功能,从而导致再狭窄<sup>[7]</sup>。

由于血小板和 TR 均参与了血管内皮损伤后再狭窄的形成,因此及早应用抑制血小板活化药物,阻断、下调或反义抑制 TR,以抑制血栓形成和 VSMC 增殖,可作为防治支架内再狭窄的研究方向。

#### [参考文献]

- [1] Grube E, Gerckens U, Buellesfeld L. Drug-eluting stents: clinical experiences and perspectives. *Minerva Cardioangiol*, 2002, **50** (5): 469-473
  - [2] 任国锋,王宗立,李拥军,杨菁,刘佩毛,余铭鹏. 反义凝血酶受体基因表达抑制大鼠动脉内膜损伤后内膜增生. *中华病理学杂志*, 2002, **31** (3): 231-235
  - [3] Fisslthaler B, Schinzel-Kerth VB, Fleming I, Busse R. Thrombin receptor expression is increased by angiotensin Ⅱ in cultured and native vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res*, 1998, **38** (1): 263-271
  - [4] 韦立新. 经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的病理学机制. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 1-3
  - [5] Zhou Y, Liu X, She M. Molecular basis for the effect of lipid lowering drugs on growth factors after de-endothelialization. *Chin Med J (Engl)*, 2001, **114** (9): 976-982
  - [6] Zhong C, Hayzer DJ, Corson MA, Runge MS. Molecular cloning of the rat vascular smooth muscle thrombin receptor. Evidence for in vitro regulation by basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 1992, **267** (24): 16 975-979
  - [7] Wang Z, Castresana MR, Newman WH. Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cell. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, **36** (1): 49-56
- (此文编辑 朱雯霞)

• 征稿征订 •

## 征 稿 启 事

《中华现代外科学杂志》从 2004 年被中华首席医学网([www.shouxi.net](http://www.shouxi.net))全文收录,国内外读者可以在首席医学网上免费查阅及下载《中华现代外科学杂志》全文。中华首席医学网同时收录中外各类医学期刊近百种,可免费查阅基础医学、临床医学、护理、医院管理、公共卫生等医学论文资料。欢迎登陆首席医学网查阅《中华现代外科学杂志》,欢迎投稿!

联系电话: 010-62245829

网址: <http://www.shouxi.net/journal>

投稿邮箱: 北京 100035-55

电子邮件: [waikexue@sohu.com](mailto:waikexue@sohu.com)