

[文章编号] 1007-3949(2009)17-12-0971-04

• 实验研究 •

雌激素缺乏引起雌性 SD大鼠血小板激活

韩艺¹, 张文², 李晓珍², 王卓瓔², 谢利平², 刘振², 季勇², 刘乃丰¹

(1. 东南大学临床医学院心内科, 江苏省南京市 210009; 2. 南京医科大学动脉粥样硬化中心, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 雌激素; 血小板; 聚集; 环磷酸鸟苷

[摘要] 目的 研究雌激素缺乏对雌性 SD大鼠血小板聚集功能的影响及其与一氧化氮相关的作用机制。方法 雌性 SD大鼠随机分为假手术组、卵巢切除组以及卵巢切除补充雌激素组, 分别施行假手术、卵巢切除术以及在卵巢切除术后第3天开始皮下注射补充雌激素, 药物补充4周后处死动物, 提取血清检测血清雌激素水平, 提取富血小板血浆测定血小板聚集功能, 并用ELISA方法测定血浆中一氧化氮生物活性指标环磷酸鸟苷的水平。结果 卵巢切除组雌性SD大鼠血清雌激素水平明显降低, 雌激素补充使卵巢切除补充雌激素组动物的雌激素水平恢复到假手术组状态。卵巢切除组雌性SD大鼠血小板聚集率显著升高; 卵巢切除补充雌激素后血小板聚集率较前者明显回落, 但仍高于假手术组聚集水平; 血浆中环磷酸鸟苷水平在卵巢切除组显著下降, 补充雌激素后血浆中环磷酸鸟苷水平与假手术组差异无显著性。结论 雌激素缺乏会促进雌性SD大鼠的血小板聚集, 其机制可能与血浆中一氧化氮/环磷酸鸟苷水平下降有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Platelet Activation Due to Estrogen Depletion in Female SD Rats

HAN Yi¹, ZHANG Wen², LI Xiao-Zhen², WANG Zhuo-Ying², XIE Li-Ping², LIU Zhen², JI Yong², and LIU Nai-Feng¹

(1. Department of Cardiology, School of Clinical Medicine, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009 China; 2. Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210009 China)

[KEY WORDS] Estrogen; Platelet Aggregation; Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether estrogen deficiency may impact the platelet aggregation function in female SD rats and the underlying mechanisms relative to nitric oxide (NO). **Methods** Female SD rats were randomly divided into three groups: sham, ovariectomy, and ovariectomy supplemented with estrogen group. Each of them received sham operation, ovariectomy or ovariectomy followed by estrogen supplementation respectively. Estrogen supplementation started 3 days after the ovariectomy and continued for the following 4 weeks, then the animals were sacrificed. The serum was obtained to perform the estrogen assay. The platelet-rich plasma was collected to measure its platelet aggregation ability and to detect plasma cGMP (Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate), the NO bioactive index via the method of ELISA. **Results** The serum estrogen level in ovariectomized female SD rats was much lower than that in shamed animals, estrogen supplementation effectively restored the ovariectomized animals' serum estrogen. The platelets aggregation in ovariectomized rats was remarkably higher than that in shamed animals, estrogen supplementation could lower the platelets aggregation ability, though not to the sham level. The plasma cGMP level in the ovariectomized rats was significantly lower than that of shamed animals, estrogen supplementation may remarkably enhance the plasma cGMP, to a level in keeping with the sham group. **Conclusion** Lack of estrogen may boost the platelets aggregation in female SD rats, the mechanism might be relative to the down-regulation of NO/cGMP by estrogen depletion.

既往的流行病学研究和动物实验均表明雌激素具有抑制动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成和发展的作用, 它对心血管系统的保护作用是多样

的, 如降低血管张力和血脂水平, 抗氧化和保护内皮功能, 抑制血小板的黏附和聚集, 抑制血管平滑肌细胞的增殖迁移以及细胞外基质的合成等等^[1], 但雌激素的这类保护作用的详细机制仍不十分明确。目前认为, 雌激素保护心血管的功能只有极少部分是通过其对脂蛋白代谢的影响实现的, 而大多数功能是雌激素对血管的直接作用, 包括保护内皮细胞的结构和功能、拮抗钙离子、促进内皮一氧化氮 (NO) 合成等^[2]。血小板的活化在 As 的发生发展过程中具有重要影响, 高脂血症使血管内膜受到损伤, 血小板黏附于暴露的血管内皮下组织和胶原上, 发生血

[收稿日期] 2009-10-12 [修回日期] 2009-12-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (30770891)

[作者简介] 韩艺, 博士研究生, 研究方向为糖尿病心血管并发症的发病机制, 联系电话为 025-86650090, E-mail 为 hanyi0205@hotmail.com。张文, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的机制研究, E-mail 为 zwism@sina.com。李晓珍, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的机制研究, E-mail 为 lixiaozhen@163.com。季勇, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的机制研究, 联系电话为 025-86862688, E-mail 为 yongji@njnu.edu.cn。通讯作者刘乃丰, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为分子细胞心脏病学和心血管影像学, 联系电话为 025-83272001, E-mail 为 liun@seu.edu.cn。

小板聚集和释放反应,继而使血液凝固、血管收缩、动脉平滑肌细胞增生和胆固醇沉着,最后形成As^[3]。NO作为一种生物调节介质,在As的发病机制中产生重要作用。它是一种相对稳定的能通过细胞膜扩散的气体自由基,具有抑制血小板聚集、舒张血管、抑制血管平滑肌增殖等多重抗As作用。血小板产生的NO在血小板黏附于胶原蛋白,和被胶原蛋白、ADP(二磷酸腺苷)、花生四稀酸诱导血小板聚集时被激活,血小板和内皮产生的NO都可以降低血小板活化,抑制血小板黏附以及诱导解聚^[4]。但是雌激素是否可能通过影响NO的调节途径进而对血小板功能产生重要影响,从而发挥其抗As作用,目前仍不十分明确。因此本实验通过建立雌性SD大鼠卵巢切除模型,研究雌激素缺乏对血小板聚集功能的影响,并检测血浆中NO的生物活性指标环磷酸鸟苷(guanosine 3',5'-cyclic monophosphate, cGMP)的水平,以了解雌激素缺乏影响血小板功能的相关机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

清洁级健康雌性SD大鼠购自南京医科大学动物实验中心;苯甲酸雌二醇购自天津金耀氨基酸有限公司;DMN-NX-A型血小板聚集凝血测试仪购自Daino公司;二磷酸腺苷(ADP)购自Biosharp公司;血清雌二醇放免分析试剂盒购自北京北方生物技术研究所;血浆环磷酸鸟苷(cGMP)测定酶联免疫分析(ELISA)试剂盒购自美国R&D systems公司;实验用的器材由南京医科大学动脉粥样硬化中心提供。

1.2 动物分组

清洁级健康雌性SD大鼠,体重220~250g随机分为3组,每组6只,分别为假手术组:只暴露动物卵巢而不行切除;卵巢切除组:对动物施行双侧卵巢切除术;卵巢切除补充雌激素组:对动物施行双侧卵巢切除术,并于术后第3天开始补充雌激素。

1.3 实验方案

雌性SD大鼠按照实验分组分别进行假手术或施行卵巢切除术,术后允许动物恢复3天,待雌激素下降到缺乏状态后,即对卵巢切除补充雌激素组动物采取皮下注射方式给予苯甲酸雌二醇,剂量12 μ g/(kg·d);其它组动物给予注射等体积溶剂对照,给药时间持续4周。之后称取动物体重,用10%水合氯醛进行麻醉,通过颈动脉取新鲜全血,分

别用枸橼酸钠(终浓度为0.38% w/v)和EDTA(终浓度为4.45 mmol/L)抗凝,离心后提取血浆,准备测定血小板聚集率以及血浆cGMP水平;部分新鲜全血不抗凝,离心提取血清,以备检测血清雌激素水平;最后麻醉过量处死动物后,分离子宫,称取子宫重量。

1.4 血清雌激素水平测定

为研究卵巢切除的雌性SD大鼠的雌激素补充是否有效,本实验将各组动物麻醉后分别经颈动脉提取新鲜全血,不加抗凝剂,3 kr/min \times 15 min离心,提取血清,迅速置于-80 $^{\circ}$ C低温保存,2个月内测定血清雌激素水平。测定采用均相竞争原理,即标准或待测血清中的雌二醇(E2)与一定量的¹²⁵I-E2共同与限量的E2抗体在适宜条件下进行竞争性结合反应,检测动物血清中的实际雌激素水平,测定过程按照雌二醇放免分析试剂盒说明书指导的方法进行。

1.5 血小板聚集率的测定

取枸橼酸钠抗凝的动物全血,1 kr/min离心15 min,取上清,得富血小板血浆(platelet rich plasma PRP);取部分该血浆在3 kr/min再次离心15 min,取上清,得贫血小板血浆(platelet poor plasma PPP)。分别静置15 min后,6 h内测定血小板聚集率。PRP和PPP各取300 μ L置于DMN-NX-A型凝血测试仪中,预热60 s,然后用PPP调零,以终浓度为50 μ mol/L的ADP刺激PRP中的血小板,测定血小板的聚集率。

1.6 血浆环磷酸鸟苷水平测定

为研究雌激素缺乏对雌性SD大鼠血小板聚集功能产生影响的作用机制,本实验将各组动物麻醉后分别经颈动脉提取新鲜全血,用EDTA抗凝,3 kr/min \times 15 min于取血后30 min内离心,取上清得血浆,迅速置于-80 $^{\circ}$ C低温保存,2个月内测定血浆cGMP水平。测定原理是采用双抗体夹心ABC-ELISA法,测定过程按照cGMP酶联免疫分析测定试剂盒说明书指导的方法进行。

1.7 统计分析

应用Prism软件进行统计分析,组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌激素缺乏对雌性SD子宫重量的影响以及各组动物的血清雌激素水平

本实验将雌性SD大鼠分别经假手术、卵巢切

除要以及皮下注射雌激素补充 4 周,称取动物体重,并在处死后分离卵巢称取重量,结果发现,假手术组动物子宫无明显改变,卵巢切除组动物子宫显著萎缩,重量减轻,卵巢切除后补充雌激素组动物子宫形态基本正常,重量明显增加,与假手术组动物无明显差异,说明雌激素的补充确实有效;在体重方面,三组动物差异不大(具体数据未列出);各组动物的血清雌激素水平测定结果发现,卵巢切除组动物的雌激素水平显著低于假手术组,卵巢切除补充雌激素组动物的血清雌激素水平显著回升,与假手术组动物差异无显著性(表 1)。

表 1 雌激素缺乏对雌性 SD 子宫重量的影响以及各组动物的血清雌激素水平

分 组	子宫重量 (g)	血清雌二醇 ($\mu\text{g/L}$)
假手术组	0.77 ± 0.12	472.1 ± 105.5
卵巢切除组	0.59 ± 0.06 ^a	210.6 ± 84.6 ^a
卵巢切除补充 E2 组	0.93 ± 0.32 ^b	461.3 ± 116.7 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与卵巢切除组比较。

2.2 雌激素缺乏对雌性 SD 大鼠血小板聚集功能的作用

各组动物麻醉后分别经颈动脉提取新鲜全血,以枸橼酸钠抗凝,用离心法提取血小板后,以终浓度 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 ADP 对血小板进行刺激,在凝血测试仪中检测血小板的聚集反应性,研究结果发现,假手术组动物的血小板聚集率维持在比较稳定的基础水平,卵巢切除组动物血小板聚集率明显高于假手术组,卵巢切除补充雌激素组动物血小板聚集率明显低于卵巢切除组,但尚未降至假手术组水平,聚集率达峰时间则呈现相反的趋势(表 2)。

表 2 雌激素缺乏对雌性 SD 大鼠血小板聚集功能的影响

分 组	血小板聚集率	达峰时间 (s)
假手术组	7.3% ± 2.4%	135 ± 20
卵巢切除组	13.5% ± 2.0% ^a	55 ± 10 ^a
卵巢切除补充 E2 组	10.2% ± 1.4% ^b	93 ± 32

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与卵巢切除组比较。

2.3 雌激素缺乏对雌性 SD 大鼠血浆环磷酸鸟苷水平的影响

为研究雌激素缺乏对雌性 SD 大鼠血小板聚集功能产生影响的作用机制,本实验将各组动物麻醉后分别经颈动脉提取新鲜全血,用 EDTA 抗凝,离心取上清得血浆,采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法,按

照 cGMP 酶联免疫分析测定试剂盒说明书指导的方法,测定各组动物的血浆 cGMP 水平,研究结果发现,将假手术组动物的血浆 cGMP 水平设定为相对基础值 1,则卵巢切除组动物血浆 cGMP 水平明显低于假手术组,卵巢切除后补充雌激素组动物血浆 cGMP 水平明显高于卵巢切除组,且与假手术组 cGMP 水平差异无显著性(表 3)。

表 3 雌激素缺乏对雌性 SD 大鼠血浆 cGMP 水平的影响

分 组	cGMP (与假手术组的百分比)
假手术组	100.0% ± 15.2%
卵巢切除组	74.2% ± 11.1% ^a
卵巢切除补充 E2 组	91.2% ± 6.4% ^b

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与卵巢切除组比较。

3 讨论

血小板激活在各种心血管疾病特别是动脉粥样硬化的发生发展过程中具有重要影响,根据免疫损伤学说,动脉粥样硬化的发生首先是高脂血症使血管内膜受到损伤,血小板黏附于暴露的血管内皮下组织和胶原上,继而发生血小板凝集和释放反应。血小板凝集与释放的结果是血液凝固、血管收缩、动脉平滑肌细胞增生和胆固醇沉着,最后形成动脉粥样硬化;同时血小板还具有维护血管内皮完整性的功能,以及营养和支持毛细血管内皮细胞的作用,使毛细血管的脆性减少^[3]。

血小板上保持着与内皮细胞上相同的功能性的左旋精氨酸(L-arg) 一氧化氮合酶(NOS) / NO / cGMP 通路^[5],研究表明该通路合成的 NO 能抑制聚集后血小板在血液中的再循环,且血小板源性 NO 能增加血小板内 cGMP 的水平并抑制血小板的聚集^[6]。NO 还可通过刺激可溶性鸟苷酸环化酶增加 cGMP 的浓度来抑制血小板聚集,与 PG I₂ 具有协同作用,二者都可抑制细胞内钙离子升高和血小板聚集^[7]。血小板上存在能与其激动剂结合的受体,这是血小板被激活的主要途径之一。细胞外的基质蛋白,例如胶原、可溶的拮抗剂、ADP、肾上腺素等均通过与相应的受体结合而促进血小板的激活与聚集^[8]。本实验选用 ADP $50 \mu\text{mol/L}$ 作为有效的血小板聚集功能刺激浓度^[9],研究雌激素缺乏状态下雌性 SD 大鼠的血小板功能改变。

雌激素能通过基因调控方式影响一氧化氮合酶 NOS-3 的表达。传统认为,雌激素与雌激素受体(ER)的激素结合区域结合后形成二聚体,ER 的核

信号区识别雌激素反应元件 (ERE), ER 的 DNA 结合区域与 ERE 结合, 进行转录调控, 使 NOS-3 的基因表达上调, 继而使 mRNA 和蛋白质水平上调^[10]。另外雌激素也可通过非基因途径迅速调节 NOS-3 的活性。非基因效应由位于内皮细胞膜上微囊内的雌激素受体亚型 ER α 介导, 雌激素结合到微囊内的 ER α 导致 G 蛋白 α 亚单位激活, 进而引起下游的 PI3K/Akt 通路激活, 从而引起 NOS-3 磷酸化水平增加, 同时影响局部的钙环境, 导致磷酸化和钙调蛋白共同介导的 NOS-3 激活^[11]。

本实验在上述研究结果的基础上, 进一步研究雌激素对血小板聚集功能的影响, 以及与 NO 相关的作用机制, 制作雌性 SD 大鼠卵巢切除模型, 发现雌激素缺乏使卵巢切除组的大鼠的血小板聚集功能与假手术组相比明显增加, 在卵巢切除并补充雌激素 4 周以后, 大鼠的血小板聚集率有明显下降趋势, 虽然尚不能降低至与假手术组相同的水平, 说明雌激素缺乏能显著增加血小板的聚集功能, 使血小板活化; 为研究这一现象的相关机制, 我们进一步研究了调节血小板功能的重要因素之一 NO 的生物活性改变, 即检测血浆中 NO 的生物活性指标 cGMP 的水平。研究发现 cGMP 的水平在雌激素缺乏的卵巢切除组大鼠有明显降低的现象, 在卵巢切除并有效补充雌激素 4 周以后, 血浆 cGMP 水平明显回升, 与假手术组水平差异无显著性。该研究结果表明雌激素很可能通过调控 NOS-3/NO/cGMP 途径从而影响血小板的聚集功能, 雌激素的缺乏状态引起 NOS-3 的基因与非基因途径下调, 活性下降, 从而使 NO 合成减少, 生物活性指标血浆 cGMP 水平下降, 继而引起血小板聚集率增加。有效补充雌激素后, 则 NO 生物活性指标血浆 cGMP 水平明显回升, 使血小板聚集率明显回落。

综上所述, 本研究发现雌激素缺乏能够引起雌性 SD 大鼠血小板聚集率明显增加, 有效补充雌激素后其聚集率显著回落, 具体机制可能与雌激素对 NOS-3/NO/cGMP 途径的调控机制有关。但雌激素对 NO 的调控机制在 NOS-3 上游还存在如 PI3K/Akt 等信号分子, 且雌激素还可能通过 MAPK 等重要途径对 NO/cGMP 水平进行调节, 是否这些信号分子和途径同样参与了雌激素对血小板功能的调节作用, 仍有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Anderson HV. Estrogen therapy, atherosclerosis, and clinical cardiovascular events [J]. *Circulation*, 1996, **94** (8): 1809-811
- [2] Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, et al. Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice [J]. *J Lipid Res*, 1999, **40** (5): 893-900
- [3] Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis [J]. *N Engl J Med*, 2007, **357** (24): 2482-494
- [4] Moncada S, Higgins A, Finklin H. Mechanisms of disease: The L-Arginine-nitric oxide pathway [J]. *N Engl J Med*, 1993, **329** (27): 2002-012
- [5] Iwain C, Roberts W, Naseem KM. Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: The potential role for S-nitrosylation [J]. *Platelets*, 2009, **15** (1): 1-9
- [6] Koo YK, Kim JM, Kim SY, et al. Elevated plasma concentration of NO and cGMP may be responsible for the decreased platelet aggregation and platelet-leukocyte conjugation in platelets hypo-responsive to catecholamines [J]. *Platelets*, 2009, **20** (8): 555-565
- [7] Nakano Y, Oshima T, Matsuura H, et al. Effect of 17-beta-estradiol inhibition of platelet aggregation in vitro is mediated by an increase in NO synthesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (6): 961-967
- [8] 邢继军, 丁列明, 苏安英, 等. 一氧化氮阿司匹林对血小板聚集功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 86-89
- [9] 姚康, 刘亚平, 徐标. 急性冠状动脉综合征患者血小板一氧化氮合酶活性及表达改变 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 89-91
- [10] Grasselli A, Nanni S, Colussi C, et al. Estrogen receptor-alpha and endothelial nitric oxide synthase nuclear complex regulates transcription of human telomerase [J]. *Circ Res*, 2008, **103** (1): 34-42
- [11] Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Endo Rev*, 2002, **23** (5): 665-686

(此文编辑 李小玲)