

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0105-004

• 实验研究 •

持续静脉输注替罗非班对动脉硬化兔血浆炎症因子的影响

谢双锋¹, 尹松梅¹, 李益清¹, 聂大年¹, 肖洁¹, 马丽萍¹, 王秀菊¹, 王景峰²

(中山大学附属第二医院, 1 血液内科; 2 心内科, 广东省广州市 510120)

[关键词] 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂; 动脉硬化; 炎症因子

[摘要] 目的 探讨血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂替罗非班在体内持续应用对动脉硬化兔血浆炎症因子的影响, 为动脉硬化时合理应用血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂提供理论依据。方法 高脂饲料喂养新西兰大白兔 12 周形成动脉硬化模型后, 分为 4 组, 每组 8 只, 分别恒速静脉滴注生理盐水、3 125、12.5 mg/L 和 50 mg/L 的替罗非班注射液, 于注射 0、12、24 h 和 48 h 时, 采用比浊法检测血小板最大聚集率和酶联免疫吸附法检测血浆 P 选择素、白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 、肿瘤坏死因子 α 等炎症因子的水平, 比较相关指标的变化。结果 实验 12、24 h 和 48 h 时, 随着替罗非班用药剂量增加, 血小板最大聚集率逐渐减低 ($P_{\text{ANOVA}} < 0.05$), P 选择素、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 逐渐减低 ($P_{\text{ANOVA}} < 0.05$)。对照组和 3 125 mg/L 替罗非班组 12、24 h 和 48 h 的血小板最大聚集率和 0 h 比较无改变 ($P > 0.05$); ≥ 12.5 mg/L 替罗非班用药后的血小板最大聚集率较用药 0 h 明显减低 ($P < 0.05$), P 选择素、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 较 0 h 明显减低 ($P < 0.05$)。结论 小剂量替罗非班并不改变血小板聚集, 中剂量至大剂量静脉滴注时, 血小板聚集和血清炎症因子明显抑制。

[中图分类号] R311

[文献标识码] A

The Effect of Continuous Intravenous Drip Tirofiban on the Plasma Inflammatory Factors of Rabbit with Atherosclerosis

XIE Shuang-Feng¹, YIN Song-Mei¹, LI Yiqing¹, NIE Dainian¹, XIAO Jie¹, MA Liping¹, WANG Xiujie¹, and WANG Jing-Feng²

(1 Department of Hematology, 2 Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120 China)

[KEY WORDS] Platelet Glycoprotein GPIIb/IIIa Receptor Antagonist Atherosclerosis Inflammatory Factor

[ABSTRACT] **Aim** To explore the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor antagonist tirofiban on the plasma inflammatory factors of rabbits in vivo and find some theoretical basis for appropriately using the glycoprotein GPIIb/IIIa receptor antagonists in atherosclerosis. **Methods** New Zealand rabbits were fed with hyper-cholesterol forage for 12 weeks to form atherosclerosis. The rabbits were divided to 4 groups ($n=8$), and had intravenous drip natural saline, 3 125 mg/L, 12.5 mg/L or 50 mg/L tirofiban in different group respectively. After the intravenous drip started for 0 h, 12 h, 24 h and 48 h, the platelet maximal aggregating rates [PAG(M)] were detected using turbidity method, the interleukin-6, interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) level in the plasma were detected using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Parameters differences among 4 groups were compared. **Results** After intravenous dripping started for 12 h, 24 h and 48 h, PAG(M) was reduced ($P_{\text{ANOVA}} < 0.05$), P-selectin, interleukin-6, interleukin-1 β and TNF- α were reduced ($P_{\text{ANOVA}} < 0.05$) along with the tirofiban concentration increase. In control group and 3 125 mg/L tirofiban group, PAG(M) had no difference after intravenous dripping started for 12 h, 24 h and 48 h ($P > 0.05$). PAG(M), P-selectin, interleukin-6, interleukin-1 β and TNF- α were reduced significantly ($P < 0.05$) when ≥ 12.5 mg/L tirofiban was intravenously dripped. **Conclusion** The PAG(M) and inflammatory factors were not affected when tirofiban was intravenously dripped in small dosage. When the tirofiban was intravenously dripped in medium or large dosage, the PAG(M) and inflammatory factors were inhibited significantly.

动脉硬化及继发的血栓性疾病在我国与西方国家都已成为人口死亡与致残的第 1 位原因, 抗血

小板药物在此类疾病的预防和治疗中起到重要作用。血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂虽然有强大的抗血小板作用, 但急性冠状动脉综合征的患者用药后临床预后没有明显改善^[1]; 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂抗血小板聚集以外的作用目前仍未明确, 从而限制了此类药物的应用。本研究建立兔动脉硬化模型, 观察不同浓度的血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂替罗非班持续静脉输注对血

[收稿日期] 2009-12-06 [修回日期] 2010-02-09

[基金项目] 广东省医学科研基金项目 (B2007056)

[作者简介] 谢双锋, 博士, 主治医师, 研究方向为血小板功能与血栓性疾病发生机制, Email 为 xies@163.com。通讯作者尹松梅, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为出血性疾病及恶性血液病的防治, 联系电话为 020-81332284, Email 为 yinsonme@gmail.com。李益清, 博士, 主治医师, 研究方向为出血性疾病的防治, Email 为 sunliyiqing@163.com。

小板聚集率和血浆炎症因子的影响,探讨替罗非班抗血小板聚集以外的效应,为此类药物的合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药品

血小板诱聚剂二磷酸腺苷 (adenosine 5'-diphosphate sodium, ADP)和凝血酶购于美国 Sigma-Aldrich公司;盐酸替罗非班氯化钠注射液是武汉远大制药集团股份有限公司产品;兔P选择素、白细胞介素6、白细胞介素1 β 、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子酶联免疫吸附法测定试剂盒购自美国 RapidBio Lab公司。LG-PABER血小板聚集凝血因子分析仪为北京世帝科学仪器公司产品。Surefuser SFS-1002D一次性恒速注入泵为比利时 Nipro公司产品。

1.2 兔高脂血症动脉硬化模型的建立

健康新西兰大白兔32只,雌雄相当,体重2.6~3.2 kg,月龄2~3月,购自中山大学动物实验中心,单笼饲养,适应性喂养一周后每天每只兔给予含猪油5%,胆固醇1%的高脂饲料100 g共12周,饮水不限^[2]。高脂饲料应用12周后大动脉可见明显动脉硬化斑块,开始体内实验。

1.3 实验步骤和分组

为避免实验中兔进食、饮水时破坏留置针,兔放入特制兔笼内,禁食不禁水,采用0.45 mm \times 15 mm头皮针穿刺一侧耳缘静脉后胶布固定,5 min内推注初始负荷剂量1 mL后接注入泵SFS-1002D以1.7 mL/h持续静脉输注。实验开始0、12、24 h和48 h另一侧耳缘静脉采血标本,检测相应指标。研究分为4组,每组8只:对照组输注生理盐水,3.125 mg/L、12.5 mg/L和50 mg/L替罗非班组分别输注液体为3.125 mg/L、12.5 mg/L和50 mg/L替罗非班。

1.4 检测指标

(1) 体重(0 h、48 h);血常规(0、12、24 h和48 h):在本院检验科采用SYSMEX K-21全自动血细胞分析仪完成。(2) 血小板最大聚集率(platelet maximum aggregation, PAG)(0、12、24 h和48 h):采兔耳缘静脉血1.5 mL,置于0.13 mol/L柠檬酸钠抗凝的试管中,血液与抗凝液的体积之比为9:1,120 r/min离心8 min,吸取上层富含血小板血浆(platelet rich plasma, PRP),剩余标本1.5 kr/min离心10 min,上清为贫血小板血浆(platelet poor plasma, PPP),以PPP调整PRP至血小板计数为(300~

400) $\times 10^9$ /L,在LG-PABER血小板聚集凝血因子分析仪上用PPP调零,每次测量加样本190 μ L,加诱聚剂ADP 10 μ L(反应终浓度10 μ mol/L),血小板聚集测量时间为5 min。(3) 血浆P选择素、白细胞介素6、白细胞介素1 β 、TNF- α (0、12、24 h和48 h):兔耳缘静脉采血1 mL,采用1 g/L肝素生理盐水溶液按1:9抗凝,采血30 min内于4 $^{\circ}$ C,15 kr/min离心10 min,取血浆,采用双抗体夹心法ELISA试剂盒进行测定,严格按照说明书操作。

1.5 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。同一实验组不同时间的结果比较采用配对资料均数t检验,多组样本均数的比较采用方差分析方法。所有数据采用SPSS 11.0统计软件处理,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况

各组实验兔实验48 h后,体重明显减轻($P < 0.05$),实验前各组间体重差异无显著性($P_{ANOVA} > 0.05$)。实验48 h后,白细胞计数,血小板计数较用药前明显升高($P < 0.05$)。Hb于实验前后比较差异无显著性($P > 0.05$);实验前后各组之间白细胞、血红蛋白、血小板等指标比较差异无显著性($P_{ANOVA} > 0.05$)。

2.1 血小板最大聚集率的改变

实验12、24 h和48 h时,随着替罗非班用药剂量增加,PAG逐渐减低($P_{ANOVA} < 0.05$)。对照组和3.125 mg/L替罗非班组实验12、24 h和48 h的PAG和0 h组比较无统计学意义;12.5 mg/L替罗非班组和50 mg/L替罗非班组用药后12、24 h和48 h的PAG较用药0 h明显减低($P < 0.05$,表1)。

2.2 P选择素、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 的改变

实验12、24 h和48 h时随着替罗非班用药剂量增加,P选择素、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、TNF- α 逐渐减低($P_{ANOVA} < 0.05$)。对照组使用生理盐水12 h后P选择素、白细胞介素1 β 、白细胞介素6、TNF- α 与0 h比较明显升高($P < 0.05$);3.125 mg/L替罗非班组用药24 h后白细胞介素1 β 、白细胞介素6较0 h明显升高($P < 0.05$);12.5 mg/L替罗非班组用药12 h后P选择素较0 h明显减低($P < 0.05$),24 h后P选择素、白细胞介素6、TNF- α 较0 h明显减低($P < 0.05$),48 h后P选择素、白细胞介素

1β、白细胞介素 6、TNF-α 较 0 h 明显减低 ($P < 0.05$); 50 mg/L 替罗非班组用药 12 h 后白细胞介素 6 较 0 h 明显减低 ($P < 0.05$), 24 h 及 48 h 后 P 选择素、白细胞介素 1β、白细胞介素 6、TNF-α 较 0 h 明显减低 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 1 静脉滴注替罗非班不同时间血小板最大聚集率改变 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	0 h	12 h	24 h	48 h
对照组	62.9% ±10.4%	60.4% ±8.7%	63.7% ±4.7%	59.3% ±9.9%
3 125 mg/L 替罗非班	60.8% ±5.9%	56.7% ±3.4%	58.0% ±7.7%	56.1% ±7.1%
12 5 mg/L 替罗非班组	63.1% ±10.7%	28.0% ±5.0% ^a	25.6% ±6.9% ^a	25.8% ±6.9% ^a
50 mg/L 替罗非班组	63.0% ±10.0%	10.3% ±4.0% ^a	9.6% ±2.8% ^a	9.9% ±3.6% ^a
P_{ANOVA}	0.97	0.00	0.00	0.00

a为 $P < 0.05$ 与相同用药组 0 h 组比较。

表 2 静脉滴注替罗非班不同时间 P 选择素、白细胞介素 1β、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子 α 的改变 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

指 标	0 h	12 h	24 h	48 h
P 选择素 (μg/L)				
对照组	126.1 ±10.3	291.8 ±54.3 ^a	151.8 ±22.5	140.7 ±17.5
3 125 mg/L 替罗非班组	123.1 ±10.8	118.2 ±17.1	146.3 ±51.9	123.4 ±12.2
12 5 mg/L 替罗非班组	122.6 ±13.9	89.1 ±11.1 ^a	77.3 ±18.8 ^a	52.3 ±11.7 ^a
50 mg/L 替罗非班组	117.8 ±12.3	95.0 ±34.8	84.0 ±14.0 ^a	30.8 ±9.1 ^a
P_{ANOVA}	0.75	0.00	0.00	0.00
白细胞介素 1β (ng/L)				
对照组	111.5 ±13.8	296.4 ±23.6 ^a	147.8 ±42.6	122.9 ±38.8
3 125 mg/L 替罗非班组	107.9 ±9.8	100.6 ±19.3	178.4 ±31.9 ^a	108.5 ±12.6
12 5 mg/L 替罗非班组	109.1 ±11.4	98.3 ±27.3	85.5 ±34.6	63.5 ±12.0 ^a
50 mg/L 替罗非班组	111.2 ±12.1	92.0 ±16.8	59.9 ±8.1 ^a	18.73 ±6.1 ^a
P_{ANOVA}	0.95	0.00	0.00	0.00
白细胞介素 6 (ng/L)				
对照组	104.7 ±8.3	210.8 ±20.3 ^a	119.3 ±27.8	104.3 ±25.0
3 125 mg/L 替罗非班组	101.4 ±11.3	97.1 ±14.4	155.5 ±27.3 ^a	91.3 ±9.4
12 5 mg/L 替罗非班组	103.1 ±13.9	102.0 ±25.0	70.5 ±7.4 ^a	63.4 ±8.3 ^a
50 mg/L 替罗非班组	105.3 ±9.2	74.8 ±11.9 ^a	66.7 ±12.8 ^a	22.9 ±8.0 ^a
P_{ANOVA}	0.94	0.00	0.00	0.00
TNF-α (ng/L)				
对照组	22.2 ±3.7	45.9 ±7.6 ^a	25.8 ±9.3	18.5 ±6.2
3 125 mg/L 替罗非班组	21.0 ±2.8	19.0 ±3.0	20.6 ±6.6	19.4 ±2.9
12 5 mg/L 替罗非班组	20.4 ±3.3	16.9 ±5.4	11.0 ±3.2 ^a	10.3 ±2.6 ^a
50 mg/L 替罗非班组	20.8 ±4.0	14.8 ±4.4	11.9 ±4.3 ^a	6.0 ±3.8 ^a
P_{ANOVA}	0.86	0.00	0.01	0.00

a为 $P < 0.05$ 与相同用药组 0 h 组比较。

3 讨论

替罗非班是合成的小分子非肽类血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂。既往临床试验中, RE-

STORE 试验^[3]替罗非班的剂量为 10 μg/kg 静脉注射后 0.15 μg/(kg·min) 静脉滴注。PRISM-PLUS 试验^[4]采用的剂量为 0.4 μg/(kg·min) 静脉滴注

30 min后 0.1 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 持续静脉滴注,治疗通常持续 24~48 h。本研究参考替罗非班在成人患者介入治疗前后的用法^[5]:负荷剂量 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 随后维持剂量 0.15 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$,兔按体重计算等效剂量为成人的 3倍,本实验中 50 mg/L替罗非班组负荷量为 50 μg 维持速率为 0.472 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ (实验兔体重约 3 kg),在此条件下得到理想抑制血小板聚集效应,虽然负荷剂量有所提高,但 32只实验兔未出现大出血或死亡,表明兔体内实验足量应用替罗非班比较安全。实验对照组和应用各浓度替罗非班组兔在 48 h实验结束后,体重平均减轻 0.2 kg 原因为实验中兔活动受限,进食、饮水减少致体重减轻。不同用药剂量组间体重比较无明显差异,表明替罗非班药物本身无导致实验兔体重改变。实验 48 h时白细胞、血小板轻度增加,各组之间比较则无明显差异,白细胞、血小板的增加是持续静脉输液后轻度应激反应结果,与静脉输注的药物种类、浓度无关。

血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体属于整合素家族,主要功能是介导血小板的聚集与黏附。血小板黏附于内皮后,分泌化学激动因子及凝血因子,加速炎症的进程和细胞的聚集^[6]。激活的血小板通过分泌白细胞介素 1 β 可使内皮细胞分泌白细胞介素 6和白细胞介素 8增加,内皮细胞表面细胞间黏附分子和 $\alpha\text{V}\beta 3$ 整合素表达上调^[7]。本研究 12.5 mg/L替罗非班组和 50 mg/L替罗非班组用药 48 h后 P选择素、白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、TNF- α 较用药前明显减低;血小板聚集率明显受抑,表明静脉应用替罗非班充分抑制血小板聚集时,抑制了血小板活化的标志—P选择素,且使高脂血症动脉硬化时处于高水平的血浆炎症因子白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、TNF- α 降低,阻断了高脂血症动脉硬化的进展。但 3.125 mg/L替罗非班组应用 48 h后血小板聚集抑制不明显,也没有观察到 P选择素和白细胞介素 1 β 、白细胞介素 6、TNF- α 等炎症因子的减少。替罗非班通过抑制血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体从而显著降低了 PAG,其抑制炎症因子的作用与抑制 PAG的趋势相一致。血小板活化是动脉硬化形成发展的中心,替罗非班在充分抑制血小板活化的同时,减少了炎症反应。

血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂并没有达到预期的治疗效果,原因目前还没有完全明确。

Chew等^[8]报告,冠心病病人口服血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂出血和血栓的发生率增加,死亡率增高 30%。Danzon等^[9]的研究表明血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体拮抗剂血药浓度波动较大时,可能激活血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体;与上述报道中血药浓度大幅度波动不同,本研究采用专用静脉输液泵恒速静脉注射,血药浓度较稳定;3.125 mg/L替罗非班组在 48 h内均未出现 PAG增高的现象,未观察到小剂量替罗非班激活血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体,其他各浓度替罗非班也未出现血小板激活效应。替罗非班小剂量时不能阻断血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体,也无激活血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体的效应,即替罗非班无内在血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 受体激动剂的活性。综上所述,中到大剂量的替罗非班静脉滴注时,抑制血小板活化同时,抑制了促炎介质白细胞介素 6、白细胞介素 1 β 及 TNF- α 的释放,减少了血浆炎症因子,继而减少了白细胞对血管及心肌的粘附与浸润。

[参考文献]

- [1] Berger JS, Slater JN, Sheman W, et al. Impact of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor therapy on in-hospital outcomes and long-term survival following percutaneous coronary rotational atherectomy [J]. *J Thromb Thrombolysis* 2005; **19** (1): 47-54.
- [2] 金海燕, 冬毕华, 彭 旷, 等. 动脉粥样硬化发生中高脂血症与动脉狭窄的作用比较 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (12): 1020-1024.
- [3] Gibson CM, Dotani M, Murphy SA, et al. Correlates of coronary blood flow before and after percutaneous coronary intervention and their relationship to angiographic and clinical outcomes in the RESTORE trial Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and Restenosis [J]. *Am Heart J* 2002; **144** (1): 130-135.
- [4] Servoss SJ, Wan Y, Snapinn SM, et al. Tirofiban therapy for patients with acute coronary syndromes and prior coronary artery bypass grafting in the PRISM-PLUS trial [J]. *Am J Cardiol* 2004; **93** (7): 843-847.
- [5] 李媛媛, 来庆友, 商德亚, 等. 替罗非班对急性心肌梗死急诊冠状动脉介入治疗冠状动脉血流和微循环的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (12): 913-916.
- [6] Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium [J]. *Cardiovasc Res* 2004; **61** (3): 498-511.
- [7] Cheng W, Shivshankar P, Zhong Y, et al. Intracellular interleukin-1 α mediates interleukin-8 production induced by *Chlamydia trachomatis* infection via a mechanism independent of type I interleukin-1 receptor [J]. *Infect Immun* 2008; **76** (3): 942-951.
- [8] Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, et al. Increased mortality with oral platelet glycoprotein GPIIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials [J]. *Circulation* 2001; **103** (2): 201-206.
- [9] Danzi GR, Capuano C, Sesana M, et al. Variability in extent of platelet function inhibition after administration of optimal dose of glycoprotein GPIIb/IIIa receptor blockers in patients undergoing a high-risk percutaneous coronary intervention [J]. *Am J Cardiol* 2006; **97** (4): 489-493.

(此文编辑 李玲玲)