

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0199-04

• 实验研究 •

实验性高甘油三酯血症大鼠凝血和纤溶的变化

沈 涛, 白 怀, 刘秉文, 张祖辉

(华西医科大学基础医学院载脂蛋白研究室, 四川省成都市 610041)

[主题词] 高甘油三酯血症; 血凝; 糖膳食; 脂膳食; 大鼠

[摘要] 观察实验性高甘油三酯血症大鼠凝血和纤溶的变化, 建立大鼠内源性及外源性高甘油三酯血症模型, 测定大鼠空腹 12~14 h 血浆甘油三酯、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇及血糖浓度, 并观察其与凝血时间、血小板计数、纤维蛋白原含量和凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间、组织型纤溶酶原激活物活性及纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性的关系。结果发现, 饲高糖膳食 3 天及 6 天后, 大鼠血浆甘油三酯分别是对照组分别的 2.43 倍及 2.9 倍 ($P < 0.001$), 血糖分别增加 80% 及 39% ($P < 0.01$)。饲高脂膳食 3 天及 6 天后, 大鼠血浆甘油三酯分别是对照组的 2.3 倍及 1.6 倍 ($P < 0.05$)。但两组血浆总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇与对照组均无明显差异。饲高糖膳食与饲高脂膳食 3 天及 6 天后, 凝血酶原时间及活化部分凝血酶原时间均较对照组明显缩短 ($P < 0.05$)。饲高糖膳食 6 天及饲高脂膳食 3 天, 纤维蛋白原分别较对照组增加 84% 及 122% ($P < 0.05$)。两组纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 凝血时间、血小板计数及组织型纤溶酶原激活物活性与对照组无明显差异。相关分析表明, 血浆甘油三酯与纤维蛋白原含量、纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性呈正相关 ($P < 0.01$), 与凝血酶原时间、活化部分凝血酶原时间呈负相关 ($P < 0.05$)。血浆总胆固醇和血糖与纤维蛋白原呈正相关 ($P < 0.01$), 高密度脂蛋白胆固醇与凝血时间、凝血酶原时间呈正相关 ($P < 0.01$)。结果发现, 血浆甘油三酯升高促进凝血系统活性增强, 纤溶系统活性降低。

[中图分类号] R589.21

[文献标识码] A

Changes of Blood Coagulation and Fibrinogen of Experimental Hypertriglyceridemia Rats

SHEN Tao, BAI Huai, LIU Bing-Wen, and ZHANG Zu-Hui

(Apolipoprotein Research Unit, School of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

[MeSH] Hypertriglyceridemia; Blood Coagulation; Dietary Carbohydrates; Dietary Fats; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between hypertriglyceridemia and blood coagulation. **Methods** Establishing experimental animal models of endogenous and exogenous hypertriglyceridemia in rats. Determining the levels of plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL), blood glucose (BG) of the 12~14 h fasting rat, and observing the relationship between plasma lipids and blood platelet (PLT) count, clotting time (CT), fibrinogen (FG), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), activity of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). **Results** Feeding high carbohydrate diet (HCD) to rats for 3 and 6 days, plasma TG were 2.43 and 2.9 times of the normal dietary rats, respectively ($P < 0.001$). BG were also 80% and 39% higher than that of control group ($P < 0.01$). After taking high fat diet (HFD), plasma TG were 2.3 and 1.6 times of the control group, respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.001$). Levels of plasma TC, HDL in both groups were not obviously different compared with the control group. Feeding HCD and HFD for 3 and 6 days, PT and APTT were obviously shorter than that of control group ($P < 0.05$). After taking 6 days of HCD and 3 days of HFD, FG were 84% and 122% higher than that of control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). PAI-1 activity of HCD and HFD were higher than control group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CT, PLT and t-PA activity were not different compared with the control group. The correlation analysis indicated that TG was positively correlated with FG and PAI-1 activity ($P < 0.01$), and negatively correlated with PT and APTT ($P < 0.05$). TC and BG were positively correlated with FG ($P < 0.01$), and HDL was positively correlated with CT and PT ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that increasing in triglycerides enhance the activity of clotting system and inhibit the activity of fibrinolytic system.

临床病理和流行病学研究都证明血浆甘油三酯

水平升高常伴有凝血系统活性的升高和纤溶系统活性的下降。刘秉文等^[1,2]调查研究表明, 摄取高糖膳食能诱发大鼠和人形成高甘油三酯血症。本实验拟从高糖膳食诱导内源性高甘油三酯血症, 同时通过灌喂猪油诱导外源性高甘油三酯血症, 建立大鼠模型, 研究高甘油三酯血症对血凝的影响, 为进一步探

[收稿日期] 2001-12-19 [修回日期] 2002-04-22

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划 973 规划 (项目编号 G2000056900)。

[作者简介] 沈涛, 女, 1973 年出生, 云南昆明人, 1996 年毕业于云南大学化学系, 现为华西医科大学生物化学专业硕士, 主要研究方向为高血脂与血液高凝的关系。白怀, 男, 教授, 硕士研究生导师, 课题负责人。刘秉文, 男, 教授, 博士研究生导师, 本文的通讯联系人。

讨心脑血管疾病的发病机理打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 36 只, 平均体重 244 ± 67 g, 由华西医科大学动物实验中心提供。平衡饮食 1 周后随机分组: 对照组 ($n = 12$) 饲正常膳食 6 天, 大鼠基础一级饲料由华西医大动物实验中心提供, 糖、蛋白质及脂肪各占总热量的 62%、17% 及 21%。

④高糖膳食 (high carbohydrate diet, HCD) 3 天组 ($n = 6$) 和 6 天组 ($n = 6$) 饲高糖膳食^[1], 由基础饲料配置而成, 糖、蛋白质及脂肪各占总热量的 79.2%、16% 及 4.8%。④高脂膳食 (high fat diet, HFD) 3 天组 ($n = 6$) 和 6 天组 ($n = 6$) 除喂基础饲料外, 每天另灌喂猪油 (2 g/100 g) 一次。各组动物自由摄食和饮水。

1.2 样本采集

实验前晚禁食, 饮水不限。次日晨由尾静脉针刺取血用于测定凝血时间 (clotting time, CT) 及血小板 (platelet, PLT) 计数。戊巴比妥钠麻醉, 6.4% 枸橼酸钠抗凝 (抗凝剂与全血比为 1:9), 心脏取血, 立即以 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆备用。

1.3 血浆脂质及血糖的测定

血浆甘油三酯 (triglyceride, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 及高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 用酶法检测 (北京中生物生物工程高技术公司试剂盒)。血浆葡萄糖含量用邻甲苯胺法测定。

1.4 血小板及凝血系统检测

血小板用显微镜计数, 凝血时间测定采用玻片法。凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 及活化部分凝血酶原时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 用凝固法测定 (上海太阳生物技术公司试剂盒), 批内重复 CV 分别为 1.5% 及 2.88%, 批间重复 CV 分别为 2.1% 及 2.32%。纤维蛋白原含量采用亚硫酸钠沉淀法测定, 批内重复 CV 为 7.3%, 批间重复 CV 为 11%。

1.5 组织型纤溶酶原激活物活性及纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性测定

组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, t-PA) 活性、纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1) 活性用发色底物法测定 (上海太阳生物技术公司试剂盒), 批内重复 CV 分别为 3.6% 及 3.9%, 批间重复 CV 分别为 4.38% 及 3.96%, 美国 BioRAD 550 型酶标仪测 A_{405} 值。

1.6 统计学处理

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 差异检验用方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 有意义。相关分析用 Pearson 分析法, 所有统计均在 SPSS 10.0 软件下进行。

2 结果

2.1 血浆脂质及血糖含量

由表 1 (Table 1) 可以看出, 饲 HCD 3 天及 6 天后, 大鼠血浆 TG 分别是对照组的 2.43 倍及 2.9 倍, BG 分别增加 80% 及 39%。饲 HFD 3 天及 6 天后, 大鼠血浆 TG 分别对照组的 2.3 倍及 1.6 倍。两组血浆 TC 和 HDLC 水平与对照组均无明显差异。

表 1. 血脂及血糖水平比较。

Table 1. Comparison plasma lipids and blood glucose levels in rats ($\bar{x} \pm s$, mmol/L).

Index	Control ($n = 12$)	HCD		HFD	
		3 d ($n = 6$)	6 d ($n = 6$)	3 d ($n = 6$)	6 d ($n = 6$)
TG	0.44 ± 0.19	1.07 ± 0.31^c	1.28 ± 0.21^c	1.01 ± 0.30^c	0.70 ± 0.33^a
TC	0.90 ± 0.20	0.90 ± 0.12	1.08 ± 0.32	1.02 ± 0.16	0.91 ± 0.28
HDLC	0.34 ± 0.09	0.29 ± 0.08	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.11	0.25 ± 0.05
BG	8.09 ± 1.61	14.57 ± 5.4^b	11.24 ± 1.7^b		

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, compared with control group.

2.2 血小板及凝血系统检测结果

由表 2 (Table 2) 可见, 饲 HCD 与饲 HFD 3 天及 6 天后, PT 及 APTT 均较对照组明显缩短 ($P < 0.05$)。

饲 HCD 6 天及饲 HFD 3 天后, FG 分别增加 84% 及 122% ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。饲 HFD 6 天后, FG 有所下降。两组 PLT 及 CT 较对照组无显著差异。

表 2. 血小板计数及凝血系统参数测定结果.

Table 2. Platelet counts and other clotting parameters in rats ($\bar{x} \pm s$).

Index	Control (<i>n</i> = 12)	HCD		HFD	
		3 d (<i>n</i> = 6)	6 d (<i>n</i> = 6)	3 d (<i>n</i> = 6)	6 d (<i>n</i> = 6)
PLT (g/L)	165 ± 44	179 ± 78	157 ± 50	168 ± 66	155 ± 46
CT (min)	1.37 ± 0.46	1.09 ± 0.23	1.01 ± 0.20	1.63 ± 0.47	1.36 ± 0.35
PT (s)	16.40 ± 2.60	9.85 ± 0.89 ^c	10.24 ± 1.19 ^c	13.2 ± 0.90 ^a	12.5 ± 2.00 ^b
APTT (s)	27.55 ± 3.78	20.60 ± 4.56 ^b	1.98 ± 3.72 ^b	21.5 ± 4.10 ^b	20.2 ± 3.20 ^c
FG (g/L)	7.41 ± 2.32	9.51 ± 3.77	13.64 ± 8.88 ^a	16.45 ± 8.75 ^b	8.35 ± 2.04

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, compared with control group.

2.3 组织型纤溶酶原激活物活性及纤溶酶原激活物抑制剂 1 活性

由表 3(Table 3) 可见, 饲 HCD 3 天及 6 天后, PAF-1 活性较对照组均有显著升高($P < 0.01$)。饲

HFD 3 天及 6 天后, PAI-1 活性较对照组也均有显著升高($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 但两组 tPA 活性较对照组均无显著性差异。

表 3. 组织型纤溶酶原激活物及纤溶酶原激活物抑制剂-1 活性.

Table 3. PAF-1 activity and tPA activity ($\bar{x} \pm s$).

Index	Control (<i>n</i> = 12)	HCD		HFD	
		3 d (<i>n</i> = 6)	6 d (<i>n</i> = 6)	3 d (<i>n</i> = 6)	6 d (<i>n</i> = 6)
tPA (kIU/L)	0.30 ± 0.03	0.35 ± 0.11	0.32 ± 0.008	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.01
PAF-1 (kAU/L)	0.34 ± 0.07	0.43 ± 0.05 ^b	0.44 ± 0.04 ^b	0.44 ± 0.15 ^a	0.47 ± 0.11 ^b

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

2.4 血脂和血糖与血凝参数的相关性分析

相关分析表明, 血浆 TG 与 FG 及 PAF-1 活性呈正相关($P < 0.01$), TG 与 PT 及 APTT 呈负相关(P

< 0.05)。血浆 TC 及血糖与 FG 呈正相关($P < 0.01$), HDLC 与 CT 及 PT 呈正相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 见表 4(Table 4)。

表 4. 血脂及血糖与血凝参数相关性分析.

Table 4. The correlation coefficient of plasma lipids, blood glucose and blood coagulation related parameters.

Correlation coefficient	CT	PLT	PT	APTT	PAF-1 activity	tPA activity	FG
TG	- 0.248	- 0.006	- 0.500 ^a	- 0.439 ^a	0.611 ^b	- 0.073	0.667 ^b
TC	- 0.02	- 0.052	- 0.141	- 0.067	0.286	- 0.085	0.734 ^b
HDLC	0.449 ^b	- 0.04	0.372 ^a	0.231	- 0.221	- 0.002	- 0.04
BG	- 0.108	- 0.150	- 0.144	0.106	0.125	- 0.024	0.588 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

3 讨论

血浆 TG 主要存在乳糜微粒(chylomicron, CM)及极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)中。外源性(膳食)脂肪在小肠形成 CM, 通过淋巴管进入血循环。而糖类、脂肪酸等可在肝脏转化为内源性 TG, 以 VLDL 形式直接分泌入血。本实验通过给大鼠饲高糖膳食, 使 TG 以 VLDL 形式直接分泌入血, 形成内源性高甘油三酯血症。通过灌喂

猪油, 将外源性 TG 导入大鼠体内, 形成外源性高甘油三酯血症。实验结果显示, 饲高糖 3 天和 6 天后, 血糖与血脂都明显升高, 其中, 3 天时血浆 TG 是对照组的 2.43 倍, 6 天时继续升高, 而血糖水平 3 天时达到峰值, 6 天时已有所回落, 但仍较对照组为高。血浆 TC 及 HDLC 与对照组均无显著差异。这与张林华等^[2]研究结果相似, 即已建立内源性高甘油三酯血症大鼠动物模型。饲高脂 3 天和 6 天后, 3 天

时血浆TG较对照组明显升高,6天时血浆TG有所下降,但仍较对照组有明显增高。血浆TC及HDL-C与对照组均无显著差异。结果表明,已成功建立大鼠外源性高甘油三酯血症模型。

研究表明,血脂、血糖、体重、吸烟、老龄及避孕药的使用等都可使血凝发生改变^[3]。而近来许多研究显示,血浆高甘油三酯是其中的一个重要原因^[3,4]。Kjake等^[5]在研究载脂蛋白,特别是富含甘油三酯的VLDL(HTG-VLDL)时发现,VLDL-TG水平升高可使VII、X、II、V、IX等维生素K依赖的凝血因子活性提高。本实验中反映外源性凝血途径活化程度的PT和反映内源性凝血途径活化程度的APTT在高糖膳食组及高脂膳食组较对照组都明显缩短,且PT和APTT与TG均呈负相关。这可能是HTG-VLDL及CM使凝血因子活性增高,引发大量凝血酶生成而使凝血活性增强,PT和APTT明显缩短。

t-PA和PAI-1是纤溶系统中重要的生理活性物质。t-PA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是其主要的抑制剂,两者的平衡对维持血液纤溶系统功能正常十分重要。Mehta等^[6]研究发现冠心病患者血清TG水平与PAI活性呈正相关。Li等^[7]及Eriksson等^[8]发现在人脐静脉内皮细胞培养基中加入HTG-VLDL使PAI-1 mRNA表达较加入N-VLDL增加约4倍多。进一步发现,PAI-1基因启动子区有VLDL反应元件,当PAI-1基因启动子区为4G/5G型时,VLDL-TG与VLDL反应元件结合,使PAI-1 mRNA高表达,从而抑制纤溶活性^[9,10]。本实验显示,高糖膳食组及高脂膳食组PAI-1活性较对照组显著升高,且PAI-1活性与TG呈正相关,与Mahta等报道相似。这可能是由于HTG-VLDL与PAI-1基因启动子区VLDL反应元件结合,诱导转录,使PAI-1合成和分泌增加所致。Tabengwa等^[11]在培养的人脐静脉内皮细胞时观测到,加入HTG-VLDL较加入N-VLDL能使t-PA基因转录下降约73%。荧光示踪分析发现,t-PA基因5'平端和启动子区2.2 kb片段处有对转录下调的阻遏序列,HTG-VLDL通过与阻遏序列作用而降低启动子的活性从而使纤溶活性降低。但本实验高糖膳食组及高脂膳食组t-PA活性与对照组无显著差异,且t-PA活性与TG无相关性,未观察到随TG增高t-PA活性降低,与有些报道相似^[12],推测可能是由于PAI-1增高,与t-PA结合而使t-PA失活所致。

纤维蛋白原是纤维蛋白形成的物质基础。早在

80年代初期,临床观察已指出FG是心脑血管血栓疾病的高危因素,其浓度升高的原因尚不清楚,可能与肥胖、糖尿病、吸烟、高血压及脂质升高等有关。本实验也证明,FG与TG、TC和BG呈正相关。本实验同时也显示,饲高脂6天后,FG较饲高脂3天组明显下降,这可能由于大鼠自身代谢调节使正常进食量减少,6天时血浆TG比3天有所下降所致,也可能是由于组间个体差异引起。

此外,本实验相关分析表明,HDL-C与CT、PT呈正相关,即HDL-C对凝血系统活性有一定抑制作用,提示HDL-C在防止动脉硬化及预防血栓形成中均具有一定作用。总之,无论是高糖引起的内源性高甘油三酯血症,还是高脂引起的外源性高甘油三酯血症,凝血和纤溶系统之间的平衡都被打破,凝血系统活性增加,纤溶系统活性降低,使血液呈高凝状态进而有血栓形成倾向。所以,控制膳食中糖及脂类的进食量,对维持血脂及凝血纤溶系统功能正常,预防心脑血管疾病有重要意义。

参考文献

- [1] 刘秉文,何毓颖,张荣爵,等. 高糖及高脂膳食对血糖、胰岛素及血脂的影响. 华西医科大学学报, 1990, 21 (2): 145-149
- [2] 张林华,刘秉文,吴兆锋,等. 高糖膳食对血浆胰岛素、cAMP含量及cAMP组织代谢的影响. 生物化学杂志, 1986, 2: 19-25
- [3] Ballesen L, Bailey J, Epping PH, et al. Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-taking, and menopause. *Thrombosis and Haemostasis*, 1985, 54 (2): 475-479
- [4] Simpson HCR, Mann JJ, Meade TW, et al. Hypertriglyceridaemia and hypercoagulability. *The Lancet*, 1983, 786-789
- [5] Kjake M, Silveira A, Hamsten A, et al. Plasma lipoproteins enhance tissue factor independent factor VII activation. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2000, 20: 1835-841
- [6] Mehta J, Mehta P, Lawson D, et al. Plasma tissue plasminogen activator inhibitor levels in coronary artery disease: Correlation with age and serum triglyceride concentrations J. *Am Coll Cardiol*, 1987, 9: 263-268
- [7] Li XN, Grenett HE, Demissie RLBS, et al. Genotype-specific transcriptional regulation of PAI-1 expression by hypertriglyceridemic VLDL and Lp(a) in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 1997, 17: 3215-223
- [8] Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, et al. Very low density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 1998, 18: 20-26
- [9] Chan P, Huang TY, Shieh SM, et al. Thrombophilia in patients with hypertriglyceridemia. *J Thrombosis and Thrombolysis*, 1997, 4: 425-429
- [10] 富路,孔一慧,李佳,等. 纤溶酶原激活物抑制剂基因启动子区4G/5G多态性与血栓性疾病的相关性研究. 中华心血管病杂志, 2001, 29 (1): 144-147
- [11] Tabengwa EM, Benza RL, Grenett HE, et al. Hypertriglyceridemia VLDL downregulates tissue plasminogen activator gene transcription through cis-repressive region(s) in the tissue plasminogen activator promoter in cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2000, 20: 1675-681
- [12] 孙东风,诸骏仁,宋后燕. 动脉粥样硬化患者血浆纤溶活性的变化及血脂的关系. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4 (4): 264-267

(此文编辑 文玉珊)