

[文章编号] 1000-4718(2008)04-0712-04

大鼠动脉粥样硬化形成中凝血酶活化的纤溶抑制剂与血脂及凝血的关系研究*

刘利妍, 刘向群[△], 陈焕芹, 陈效安
(山东大学齐鲁医院保健科, 山东 济南 250012)

[摘要] **目的:** 探讨凝血酶活化的纤溶抑制剂(TAFI)活性在大鼠动脉粥样硬化(AS)形成过程中的作用机制。**方法:** 将40只健康雄性Wistar大鼠随机分为4组(每组10只),包括正常对照组、高脂组、高脂维生素D3组和高脂维生素D3+内皮损伤组。分别以普通饲料、高脂饲料、高脂饲料+维生素D3、高脂饲料+维生素D3+内皮球囊损伤处理,复制大鼠动脉粥样硬化形成过程中的3个阶段的模型,即高脂血症、纤维增生性动脉硬化、较成熟的AS斑块病变。用全自动生化仪测定血脂系列,全自动凝血仪测定凝血系列,发色底物法测定血浆TAFI的活性。**结果:** 3组模型鼠的血浆总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、纤维蛋白原(Fib)水平和TAFI活性明显高于正常对照组($P < 0.01$),有递增趋势,以高脂维生素D3+内皮损伤组最为明显;3组模型的血浆高密度脂蛋白(HDL-C)、凝血时间(PT)、白陶土部分凝血活酶时间(APTT)水平明显低于正常对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),以高脂维生素D3+内皮损伤组最为明显。血浆TAFI活性与TC、TG和Fib水平呈正相关。**结论:** 动脉粥样硬化过程中TAFI水平升高,血浆TAFI水平与血脂及凝血相关,提示TAFI可能参与AS的形成过程,TAFI活性升高可能是动脉粥样硬化的致病因素之一。

[关键词] 动脉硬化;凝血酶活化纤维蛋白溶解抑制剂;内皮损伤

[中图分类号] R541.4 **[文献标识码]** A

Correlation between TAFI and blood fat and coagulation in the process of atherosclerosis

LIU Li-yan, LIU Xiang-qun, CHEN Huan-qin, CHEN Xiao-an

(Department of Geriatrics, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China. E-mail: liuliyuan2006@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the relationship between the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) level in plasma and atherosclerosis, the TAFI level in plasma and blood fat and blood clotting index. **METHODS:** Totally 40 healthy male Wistar rats were randomly divided into 4 groups ($n=10$), control group, high lipid group, high lipid + vitamin D3 overload group, and high lipid + vitamin D3 + endothelium injure group by treating the animals with normal diet, high lipid, high lipid + vitamin D overload, and high lipid + vitamin D overload + endothelium injury, respectively, for inducing three stages of AS in rats. Then, the total cholesterol (TC), total triglyceride (TG), high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), and prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen (Fib), the activity of TAFI were measured. **RESULTS:** TC, TG, LDL-C, Fib and the activity level of TAFI in plasma in three model groups increased gradually compared with the control ($P < 0.01$). HDL-C, PT and APTT in plasma of three model groups decreased gradually compared with the control ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The activity of TAFI in plasma had positive correlation with TG, TC and Fib. **CONCLUSION:** The activity of TAFI increases in the progress of atherosclerosis. The activity of TAFI in plasma has a correlation with blood fat and coagulation, which indicates that TAFI might participate in the process of atherosclerosis, and TAFI is one of etiological factors of atherosclerosis.

[KEY WORDS] Arteriosclerosis; Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor; Endothelial injury

[收稿日期] 2006-11-28 [修回日期] 2007-05-22

* [基金项目] 山东省科技攻关计划资助项目(No. 2006GG2202045)

[△]通讯作者 Tel: 0531-885311311; E-mail: liuliyuan2006@yahoo.com.cn

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是缺血性心脑血管疾病(如心绞痛、心肌梗死、脑卒中等)共同的病理生理基础,它的形成是1个长期缓慢的过程,是多因素共同作用的结果。近几年的研究表明,AS的发生、发展与凝血、纤溶调节系统密切相关。凝血酶激活的纤溶抑制物(thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, TAFI)作为凝血和纤溶的联系纽带发挥抑制纤溶的作用,参与AS的发生发展,但TAFI在动脉粥样硬化形成过程中起什么作用,文献报道甚少。本研究通过复制动脉粥样硬化形成过程的大鼠模型,测定AS形成过程中血脂、凝血、纤溶等指标和TAFI活性,旨在探讨TAFI在动脉粥样硬化形成过程中的作用机制。

材 料 和 方 法

1 材料

40只健康雄性的Wistar大鼠(山东大学实验动物中心提供)体重300-350g。球囊导管(2.0F, Boston Scientific),胆固醇(上海新兴化工试剂研究所),胆酸钠(Sigma),维生素D3针剂(上海通用药业股份有限公司),TAFI活性发色底物法试剂盒(American Diagnostica Inc.)。

2 方法

2.1 动脉粥样硬化模型大鼠的建立 40只大鼠随机分成4组,每组10只。(1)正常对照组,给予大鼠基础饲料饲养4个月,于试验开始的第7d行假球囊损伤手术;(2)高脂组,以高脂饲料(3%胆固醇、0.5%胆酸钠、5%白糖、10%猪油、5%蛋黄粉、80.5%标准饲料)饲养4个月;(3)高脂维生素D3组,以高脂饲料喂养4个月,实验开始时右下肢肌肉注射维生素D3针剂(3×10^5 U/kg BW),每隔30d重复1次;(4)高脂维生素D3+内皮损伤组,简称内皮损伤组,在高脂饮食的基础上于第7d行大鼠主动脉内膜球囊损伤术,具体方法见文献^[1]继续高脂喂养4个月。4个月后全部动物先从小腔静脉取血,测定血脂指标、凝血指标、纤溶指标和TAFI活性,处死动物后截取主动脉、髂动脉、股动脉各0.5-1cm,纵行剪开,在10%甲醛溶液中固定。取主动脉弓、胸主动脉、腹主动脉中段纵切面,石蜡包埋,连续切片,做HE染色。

2.2 血清总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)的测定 用全自动生化分析仪测定。

2.3 凝血和纤溶活性指标的测定 分别留取血样2.7mL,立即放入3.2%枸橼酸钠硅化管中(9:1容积抗凝),4℃3000r/min离心15min,分离血浆后

即刻测定血纤维蛋白原(Fib)含量、凝血时间(PT)、白陶土部分凝血活酶时间(APTT),由全自动血凝仪测定。

2.4 TAFI活性的测定 采用发色底物法。分别留取血样2mL,用0.129mmol/L枸橼酸钠与全血1:9混匀,抗凝。4℃1500r/min离心15min,取上层血浆置-80℃保存,待用。测定步骤如下。(1)标准曲线绘制:取50μL血浆标准品加250μL缓冲液,做倍比稀释为1:2、1:4、1:8、1:16。取酶标板1块,每孔加稀释好的血浆150μL,每孔加发色底物50μL,反应板加盖后置微量振荡器上置37℃中孵育30min,取出板后,每孔加2mol/L硫酸溶液50μL,终止反应,酶标仪选择490nm波长进行读数,将标准品取半对数通过回归得出标准曲线。(2)待测样品的检测:待测血浆20μL,加缓冲液480μL(1:25稀释),每份待测血浆加2孔,第1孔依次加入缓冲液90μL,1:25稀释的血浆25μL,TAFI活化诱导剂10μL,TAFI活化剂15μL,第2孔依次加入缓冲液115μL,1:25稀释的血浆25μL,置微量振荡器上室温孵育20min,每孔加入活化终止液10μL。其余同标准曲线绘制操作。于标准曲线上求出待测样品TAFI:A值,乘以25为所测标本的活性值。

3 统计学处理

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析,各组间两两比较采用SNK法,参数间相关性采用直线相关,用SPSS13.0软件完成。

结 果

1 腹主动脉病理改变(HE染色)

(1)正常对照组(图1):大鼠主动脉内膜、中膜和外膜分界清楚。光镜下见内皮细胞完整,内膜光滑。中膜主要由呈同心排列的弹性纤维膜组成,基质内可见有环形的平滑肌细胞。外膜较薄,为疏松结缔组织,内含少量平滑肌细胞。(2)高脂组(图2):为AS发生的初期,大鼠主动脉壁层次尚清晰,内膜内皮细胞仍存在,中膜平滑肌层无明显萎缩及增厚,外膜为疏松结缔组织,内含少量平滑肌细胞。(3)高脂维生素D3组(图3):为纤维增生性斑块期,大鼠主动脉壁内膜增厚,平滑肌细胞增生明显,细胞排列紊乱,弹性纤维层结构不清,纤维组织增生,中膜萎缩,局部管壁向管腔突出,形成纤维增生性动脉硬化斑块。(4)内皮损伤组(图4):为斑块成熟期,大鼠主动脉壁内皮细胞脱落,内膜明显增厚,斑块表面为纤维帽,其下有脂质沉积,平滑肌细胞减少,深部为坏死物质,中膜明显受压萎缩,呈较成熟的AS斑块。

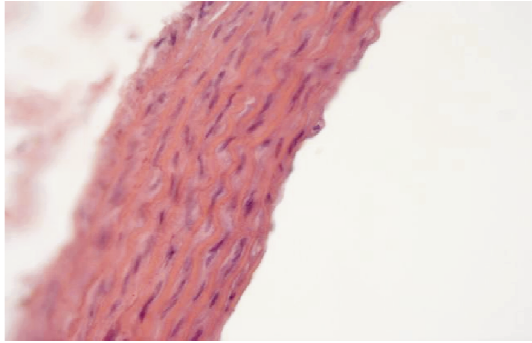


Fig 1 Histology of aorta in control group (HE staining, ×400).
图1 正常大鼠主动脉组织结构

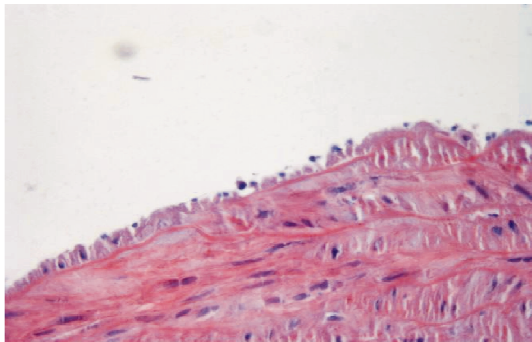


Fig 2 Histology of aorta in high lipid group (HE staining, ×400).
图2 高脂组主动脉组织结构

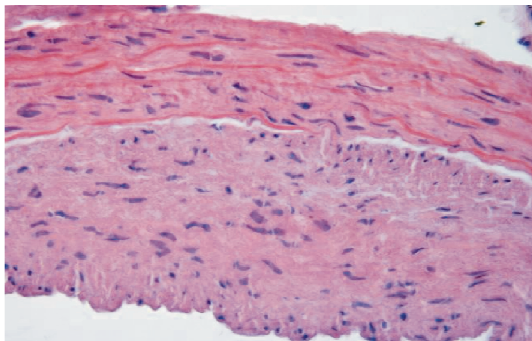


Fig 3 Histology of aorta in high lipid + vitamin D3 group (HE staining, ×400).
图3 高脂维生素 D3 组主动脉组织结构

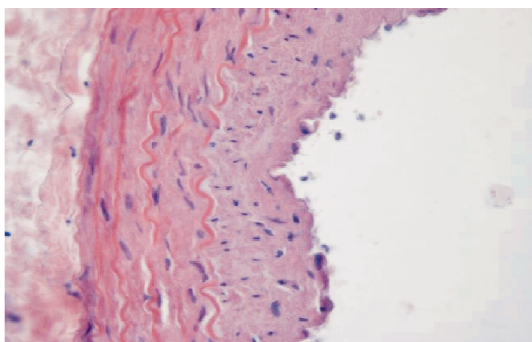


Fig 4 Histology of aorta in high lipid + vitamin D3 + endothelium injury group (HE staining, ×400).
图4 高脂 + 维生素 D3 + 内皮损伤组主动脉组织结构

2 不同组间凝血指标及 TAFI 活性的比较

从表 1 可以看出,与正常对照组相比,凝血指标 PT、APTT 水平在各模型显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Fib 各模型组均显著高于正常对照组 ($P < 0.01$),以内膜损伤组最高。血浆中 TAFI 活性,各模型组均较正常对照组显著升高 ($P < 0.01$),以内膜损伤组 TAFI 活性最高,呈逐渐增高趋势。

3 不同组间血脂指标及 TAFI 活性的比较

从表 2 可以看出,与正常对照组相比,各模型组大鼠的血清 TC、TG、LDL - C 水平均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),从高脂组到高脂 D3 组,而后再到内皮损伤组逐渐增高,以内膜损伤组为最高;而血清 HDL - C 水平均低于正常对照组 ($P < 0.01$)。高脂 D3 组和内皮损伤组的血清 TC、TG、LDL - C 水平均明显高于高脂组,而 HDL - C 水平明显低于高脂组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与正常对照组相比,模型组 TAFI 活性明显升高 ($P < 0.01$),有递增趋势,从高脂组到高脂 D3 组,而后再到内皮损伤组逐渐增高,以内膜损伤组增高最为明显。

表 1 不同组间凝血指标及 TAFI 活性的比较

Tab 1 Blood clotting and TAFI activity in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	TAFI (mg/L)	PT(s)	APTT(s)	Fib(mg/dl)
Control	29.50±1.67	18.20±0.85	27.50±2.18	2.77±0.16
HC	31.16±3.87*	16.88±1.04**	24.89±1.35 [▲] *	2.97±0.09**
HC+D3	33.91±0.94*	15.93±0.90 [◇]	22.79±1.55 [◇]	3.03±0.07**
HC+D3+BI	36.82±4.57** [◆] *	15.75±1.07 [◇]	20.41±3.74 [◆] *	3.33±0.10 [◆] *

[▲] $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control group; [◇] $P < 0.05$, [◆] $P < 0.01$ vs HC group; * $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs HC + D3 group. HC:high lipid; HC + D3:high lipid + vitamin D3 overload. HC + D3 + BI: High Lipid + vitamin D3 overload + endothelium injury.

4 TAFI 活性与血脂、凝血指标的相关性分析

将全部的研究对象作为 1 个整体,对 TAFI 活性与血脂、凝血指标进行直线相关分析,结果显示:在大鼠动脉粥样硬化发展过程中,TAFI 活性与 TC、TG 和 Fib 水平均呈正相关 (r 分别为 0.447、0.369 和 0.508, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),与 LDL - C、PT、APTT 无明显相关性。

讨 论

研究 AS 的发生发展机制,AS 模型的建立尤其重要。郭延松等^[2]根据脂质浸润学说、钙超载学说、内皮损伤学说、血栓形成学说等,用 3 种方法成功地建立大鼠 AS 模型。他们认为,高脂饲料不易形成斑块,只形成高脂血症,高脂饲料 + 维生素 D 负荷可形

表 2 不同组间血脂指标及 TAFI 活性的比较

Tab 2 Blood fat and TAFI activity in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	TAFI (mg/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL - C (mmol/L)	LDL - C (mmol/L)
Control	29.50 ± 1.67	1.23 ± 0.13	1.00 ± 0.12	0.86 ± 0.06	0.28 ± 0.05
HC	31.16 ± 3.87*	2.07 ± 0.28*	1.09 ± 0.20 [△]	0.74 ± 0.06*	0.69 ± 0.11*
HC + D3	33.91 ± 0.94*	2.30 ± 0.32* [◇]	1.67 ± 0.47* [◆]	0.66 ± 0.08* [◆]	0.75 ± 0.18*
HC + D3 + BI	36.82 ± 4.57* ^{◆◆}	2.25 ± 0.18* ^{◆◆}	1.40 ± 0.19* ^{◆◇}	0.62 ± 0.02* ^{◆◇}	0.53 ± 0.17* ^{◆◇}

[△] $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control group; [◇] $P < 0.05$, [◆] $P < 0.01$ vs HC group; * $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs HC + D3 group. HC: high lipid; HC + D3: high lipid + vitamin D3 overload; HC + D3 + BI: high lipid + vitamin D3 overload + endothelium injury.

成以血管平滑肌细胞增生为主的纤维增生性动脉硬化,高脂饲料+维生素D负荷+内皮球囊损伤术,可形成较成熟的斑块。我们认为,AS的成熟模型虽可建立,但要按时间划分AS形成过程中的各阶段比较困难,故使用高脂饲料、高脂饲料+维生素D、高脂饲料+维生素D负荷+内皮球囊损伤3种方法建立大鼠模型,复制了AS发生发展的3个阶段。喂养4个月后腹主动脉HE染色显示,血管内膜、中膜和外膜的结构改变符合模型要求,较好地反映了AS形成过程的不同阶段,说明模型复制成功。

TAFI是近年来新发现的由肝脏合成的羧肽酶样活性蛋白,在体内TAFI可被凝血酶、凝血酶-凝血酶调节蛋白(thrombomodulin, TM)、纤溶酶、胰蛋白酶激活(TAFIa),发挥抗纤溶作用,在凝血和纤溶系统之间平衡的精细调节中起到了重要作用^[3]。本研究发现3组模型鼠的血浆TC、TG、LDL-C、Fib水平和TAFI活性明显高于正常对照组($P < 0.01$),有递增趋势,以内膜损伤组升高最为明显;3组模型的血浆HDL-C、PT和APIT水平明显低于正常对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),有递减趋势,以内膜损伤组降低最为明显。血浆TAFI活性与TC、TG和Fib水平呈正相关。这与Schroeder等^[4]研究的结果基本一致,提示TAFI可能参与AS的发生发展。

AS过程中TAFI水平升高,但是TAFI水平升高的机制尚不清楚。推测首先,甘油三酯、胆固醇、LDL升高,特别是氧化低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白增高,造成内皮功能损伤^[5];维生素D导致血钙升高,破坏动脉管壁内皮的完整性,有利于脂质的侵入和损伤;球囊损伤术破坏血管壁,当血管壁发生损伤时,一方面,释放的大量组织因子与VIIa相结合激活因子X,使凝血酶产生,形成纤维蛋白。另一方面,血管壁损伤,内膜暴露,血小板释放的活性物质从多个环节参与激活内源性凝血反应。血凝块形成后,在斑块内通过内源性激活途径凝血酶继续被激活,其浓度不断升高,高浓度的凝血酶可活化TAFI,其次,血管壁损伤时释放TM,与凝血酶形成凝血酶-凝血酶调节蛋白复合物(T-TM),能使TAFI的激活

效率提高1250倍^[6]。由此说明高脂、维生素D负荷、内膜损伤等方法造成内外源性凝血途径的激活,使凝血酶大量激活,TAFI被活化,浓度升高,这与我们实验研究得出的结论一致。TAFI被激活后切断了纤溶酶活化的正反馈环路,降低纤维蛋白的聚集作用^[7]。用高脂、维生素D负荷、内膜损伤等方法复制大鼠AS,TAFI水平增高与高脂、纤溶下调相关,我们研究结果显示血浆TAFI活性与TC、TG和Fib水平呈正相关,亦与Schroeder等^[4]的结论一致。TAFI水平升高,下调纤溶,促进AS的发展,因此我们认为动脉粥样硬化形成过程中TAFI水平升高,可能是动脉粥样硬化的1个危险因素。

[参 考 文 献]

- [1] Fonseca FA, Paiva TB. Dietary magnesium improves endothelial dependent relaxation of balloon injured arteries in rats[J]. Atherosclerosis, 1998, 139(2): 237-242.
- [2] 郭延松,吴宗贵,杨军柯,等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(5): 465-469.
- [3] Leurs J, Nerme V, Hendriks D, et al. Different mechanisms contribute to the biphasic pattern of carboxypeptidase U (TAFIa) generation during *in vitro* clot lysis in human plasma[J]. Thromb Haemost, 2003, 89(2): 264-271.
- [4] Schroeder V, Chatterjee T, Mehta H, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography[J]. Thromb Haemost, 2002, 88(6): 1020-1025.
- [5] 姚宇玫,胡申江,黄元伟,等. 到卡托普利对氧化型低密度脂蛋白致血管内皮细胞形态和功能改变的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(8): 1549-1553.
- [6] Hendriks D, Leurs J. Carboxypeptidase U (TAFIa): A metallo-carboxypeptidase with a distinct role in haemostasis and a possible risk factor for thrombotic disease[J]. Thromb Haemost, 2005, 94(3): 471-487.
- [7] Schneider M, Brofatto N, Neill E, et al. Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor reduces the ability of high molecular weight fibrin degradation products to protect plasmin from antiplasmin[J]. Biol Chem, 2004, 279(14): 13340-13345.