

兔深静脉血栓形成后内皮细胞凋亡变化

司春强

[摘要]目的:探讨兔急性深静脉血栓形成后血管内皮细胞的凋亡及其在病理过程中的意义。方法:55只健康家兔随机分为血栓组 25只、假手术组 25只和正常组 5只。血栓组家兔采用开腹手术结扎肾下段后腔静脉建立血栓模型,假手术组模拟手术和正常组直接取材作对照。3组对照分别于实验后第 12 h及 1、2、4、7天取实验段血管。采用透射电镜观察内皮细胞凋亡情况,应用 TUNEL法和免疫组织化学方法检测血管内皮细胞凋亡和相关基因 bax、bc12蛋白的表达。结果:血栓组 1、2、4天透射电镜下见内皮细胞凋亡。TUNEL法标记阳性表达在术后 1、2天达高峰,两者差异无统计学意义($P>0.05$),并于 4、7天降低,不同时相血栓组与假手术组间差异有统计学意义($P<0.05\sim P<0.01$)。血栓组 bc12的表达进行性升高,术后 2天达到高峰,4、7天有所下降,不同时相血栓组与假手术组间差异有统计学意义($P<0.05\sim P<0.01$)。结论:家兔急性静脉血栓形成后 1~2天内皮细胞凋亡达到高峰,然后进行性下降。bax与 bc12基因参与血栓形成后血管内皮细胞凋亡的调控。

[关键词] 血栓形成; 闭塞性血栓性脉管炎; 内皮细胞; 凋亡; bc12; bax; 动物; 实验; 兔

[中国图书资料分类法分类号] R 654.4 [文献标识码] A

Apoptosis of endothelial cells after deep venous thrombosis in rabbits

SI Chun qiang

(Department of Vascular Surgery Yijishan Hospital Wannan Medical College Wuhu 241001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the apoptosis of endothelial cells after acute deep venous thrombosis in rabbit and its significance in the pathological processes. **Methods** Fifty five adult rabbits were randomly divided into the normal group ($n=5$) in which the samples were gotten directly, the thrombosis group (TB $n=25$) caused by ligating a sect of the posterior vena cava under renal vein to induce thrombosis model, the sham operation group (SH $n=25$) that were simply belly open and close to be used as controls. In different periods after acute deep venous thrombosis, morphological change of the endothelial cell apoptosis on target vessels was observed by means of transmission electron microscopy. In situ end labeling of DNA fragments (TUNEL) was used to detect the endothelial cell apoptosis. Bax and bc12 proteins expressed by endothelial cells were determined with immunohistochemical staining. **Results** Venous thrombosis models were successfully obtained in all cases. Transmission electron microscopy results showed that apoptosis of partial endothelial cells on target vessels on the 1st day, the 2nd day and the 4th day. TUNEL positive cell rate reached the maximum on the first day, the second day and there was no significant difference between the two groups ($P>0.05$), and decreased gradually on the 4th day and the 7th day in TB group. There was significant difference between TB group and SH group respective time ($P<0.05\sim P<0.01$). Expression of bc12 protein in TB group was increased gradually with the days passing by while bax protein reached the peak on 2nd days and decreased gradually 4th day, 7th day, there was marked difference between TB group and SH group at different time ($P<0.05\sim P<0.01$). **Conclusions** The apoptosis of the endothelial cells after acute deep venous thrombosis occurs, reaches the peak on the first and the second day and decreases gradually after 2nd days. The bc12 and bax participate in the regulation and control of the apoptosis of the endothelial cells.

[Key words] thrombosis; deep thromboangitis obliterans; endothelial cell; apoptosis; bc12; bax; animals; laboratory rabbits

深静脉血栓形成 (deep venous thrombosis DVT) 是临床上常见的静脉疾病,血管内皮细胞在血栓形成的机制中具有重要作用^[1]。血管内皮细胞损伤除“坏死”形式出现外,还可发生“凋亡”,长期以来,诱发内皮细胞凋亡促血栓形成已有大量研究。但静脉血栓形成后内皮细胞的凋亡少有研究,本研究通过人工结扎兔后腔静脉诱发血栓形成,观察血栓段血管内皮细胞凋亡的变化规律及在静脉血栓形

成病理过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 普通家兔 55只,体重 2.5~3.0 kg,雌雄不限(蚌埠医学院实验动物中心提供),实验前正常饲养 1周。随机分为血栓组 (thrombosis TB) 25只,假手术组 (sham operation SH) 25只,正常组 5只。

1.2 急性深静脉血栓形成模型的制作 兔耳缘静脉注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,常规无菌手术进腹,暴露后腔静脉,游离左肾静脉下方之后腔静脉长约 6 cm,橡皮筋结扎后腔静脉的近端,以 6.0

[收稿日期] 2006-05-17

[作者单位] 皖南医学院弋矶山医院 血管外科,安徽 芜湖 241001

[作者简介] 司春强 (1971-),男,硕士,主治医师。

单丝尼龙线缝扎沿途各属支,再用橡皮筋结扎后腔静脉的远端,观察 30 min,见静脉腔内已有血栓形成。60 min后先松开后腔静脉远心端的橡皮筋,然后在后腔静脉近心端先前阻断处绕以丝线不完全结扎,使管腔缩窄至原周径的 1/2,然后松开结扎的橡皮筋,关闭后腹膜后缝合切口。假手术组只做后腔静脉游离,结扎相应的属支血管,不结扎后腔静脉。术后动物自由饮水,不用抗凝剂及抗生素,正常饲料饲养。

1.3 取材 血栓组于术后第 12 h及 1、2、4、7天再次进腹,切取血栓段血管,分别距结扎处 1 cm 以上处取材;假手术组也取相应后腔静脉血管壁;正常组直接取材。

1.4 透射电镜观察 透射电镜观察由复旦大学医学院电镜室完成。标本以 2.5%戊二醛和 2.1%锇酸固定液固定,脱水,包埋,固化, LKB-I型超薄切片机切片 50~60 nm, 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色, JEM-1200EX 型透射电镜(日本)观察、拍片。

1.5 苏木精-伊红(HE)染色 4%多聚甲醛固定 4 h以上,常规石蜡包埋,连续切片,厚约 4 μm, HE 染色,光学显微镜观察。

1.6 免疫组化染色 bc12鼠抗单克隆抗体和 bax兔抗多克隆抗体(美国 Neomarkers公司),具体步骤按试剂盒说明书进行, SABC 检测法, DAB 显色,胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.7 原位细胞凋亡检测 TUNEL法(试剂盒购自 Roche公司):切片组织脱腊,水化,室温下蛋白酶 K (20 μg/ml 21~37 °C)消化 30 min,然后于 37 °C 与 TUNEL反应液孵育 60 min, PBS 冲洗 3×3 min 之后加碱性磷酸酶抗体,孵育 30 min, PBS 冲洗 3×3 min。擦干组织周围的水分,每片加 1~2 滴的 BCIP/NBT,室温下孵育 10~30 min, PBS 冲洗 3×3 min;直接用水性封片剂(迈新试剂 AEG-0038)封片, 60 °C 烘干。光镜观察,细胞核蓝黑色为阳性。高倍镜观察时临时放上盖玻片即可。

1.8 数据计数方法 实验组和对照组各例切片均于 400倍高倍光镜下(high power field HPF)由 2 个不同观察者随机取 10 个视野进行阳性细胞计数,并计算阳性细胞总数。

1.9 统计学方法 采用 Poisson 分布资料的 u 检验。

2 结果

2.1 动物模型 所有后腔静脉通过结扎法均成功

建立血栓模型,实验动物无死亡(见图 1)。

2.2 病理切片 正常血管内膜表面平整、光滑,内皮细胞大小均匀、排列整齐,延续性完好。中层以及外膜完好。假手术组血管内膜及中层完好,外膜有水肿, 12 h及 1、2天组水肿严重;4天组水肿较轻,7天组无水肿。血栓组 12 h及 1、2、4天各时相血管内皮部分脱落,血管壁三层均有炎性细胞浸润(见图 2)。尤以 12 h及 1、2天严重,4天组较轻,7天组内皮细胞可见明显的增生,炎性细胞浸润不明显(见图 3)。12 h组外膜高度水肿,1、2天组外膜水肿减轻,4天组外膜无水肿。

2.3 透射电镜 正常内皮细胞为平铺形态,胞质、核质均匀。假手术组静脉内皮细胞连续,细胞核规则,染色质颗粒均匀,并可见线粒体、内质网等细胞器。血栓组内皮细胞出现胞质肿胀,内质网扩张,细胞器溶解,质膜破裂,并出现内皮细胞崩解脱落,基底膜暴露,在 1、2、4天不同时相可见内皮细胞凋亡。凋亡内皮细胞变圆,胞膜完整,胞质空泡化或胞质浓缩,细胞器固缩,染色质凝集或染色质趋边,胞质、核质电子密度增高。未见到典型的凋亡小体。

2.4 免疫组化 bax, bc12 和 TUNEL 表达 见图 4~15。SH 组 bax, bc12 低量表达,正常组无阳性表达,组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); TB 组内 bax, bc12 表达比较具有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。SH 组 TUNEL 染色偶见阳性细胞,正常组未见阳性标记,组间比较具有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); TB 组内 TUNEL 计数比较,1天与 2天组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),其它相比差异有统计学意义 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1~3)。

表 1 两组不同时相 bax, bc12 和 TUNEL 阳性细胞表达结果比较

组别	时相	bax	u^*	P	bc12	u	P	TUNEL	u	P
TB 组	12 h	320	—	—	64	—	—	84	—	—
	1 d	504	6.41	< 0.01	124	4.38	< 0.01	148	4.20	< 0.01
	2 d	688	5.33	< 0.01	244	6.26	< 0.01	132	0.96	> 0.05
	4 d	392	9.01	< 0.01	296	2.24	< 0.05	56	5.54	< 0.01
	7 d	264	5.00	< 0.01	340	1.74	> 0.05	20	4.13	< 0.01
SH 组	12 h	76	—	—	24	—	—	16	—	—
	1 d	84	0.63	> 0.05	32	1.07	> 0.05	16	0.00	> 0.05
	2 d	96	0.89	> 0.05	44	1.38	> 0.05	8	1.63	> 0.05
	4 d	40	4.80	< 0.01	36	0.89	> 0.05	12	0.89	> 0.05
	7 d	64	2.35	< 0.05	48	1.31	> 0.05	4	2.00	< 0.05

*示后一时相与前一时相进行 Poisson 分布的 u 检验

表 2 两组不同时相 bax bcl 2 和 TUNEL 阳性细胞表达结果比较

组别	时相	bax			bcl 2			TUNEL		
		u*	P		u*	P		u*	P	
TB组	12 h	320	—	—	64	—	—	84	—	—
	1 d	504	6.41	<0.01	124	4.38	<0.01	148	4.20	<0.01
	2 d	688	11.59	<0.01	244	10.26	<0.01	132	3.27	<0.01
	4 d	392	2.70	<0.01	296	12.23	<0.01	56	2.37	<0.05
	7 d	264	2.32	<0.05	340	13.73	<0.01	20	6.28	<0.01
SH组	12 h	76	—	—	24	—	—	16	—	—
	1 d	84	0.63	>0.05	32	1.07	>0.05	16	0	>0.05
	2 d	96	1.52	>0.05	44	2.43	<0.05	8	1.63	>0.05
	4 d	40	3.34	<0.01	36	1.55	>0.05	12	0.76	>0.05
	7 d	64	1.01	>0.05	48	2.83	<0.01	4	2.68	<0.01

* 示后面各时相与第一时相进行 Poisson 分布的 u 检验

表 3 不同时相两组 bax bcl 2 和 TUNEL 阳性细胞表达结果比较

时相	bax				bcl-2				TUNEL			
	TB组	SH组	u*	P	TB组	SH组	u*	P	TB组	SH组	u*	P
12 h	320	76	12.26	<0.01	64	24	4.26	<0.01	84	16	6.8	<0.01
1 d	504	84	17.32	<0.01	124	32	7.37	<0.01	148	16	10.31	<0.01
2 d	688	96	21.14	<0.01	244	44	11.79	<0.01	132	8	10.48	<0.01
4 d	392	40	16.94	<0.01	296	36	14.27	<0.01	56	12	5.34	<0.01
7 d	264	64	11.04	<0.01	340	48	14.82	<0.01	20	4	3.27	<0.01

* 示两组同一时相 Poisson 分布的 u 检验

3 讨论

DVT是周围血管系统的常见病和多发病之一,其并发症肺栓塞、血栓后综合征、静脉性坏疽,严重影响人类的生命和生存质量。自 1856年, Virchow 提出血栓形成三大因素:血流滞缓、血液的高凝状态和血管壁的损伤(血管内皮细胞的损伤),一直得到普遍的认可,成为 DVT的病因总则。现在研究认为,血管内皮细胞的损伤,血小板黏附、聚集、释放和血浆中可溶性凝血因子的激活是血栓形成的新三要素^[2]。可见血管内皮细胞在血栓形成的机制中处于关键的中心地位。

早在 1951年 Glucksmann就观察到细胞凋亡现象,直到 1972年, Kerr等^[3]首次提出细胞凋亡的概念,此后许多学者对其进行了系统的研究。近年来,许多实验研究已证实,细胞凋亡与许多重要疾病的发生和发展密切相关,譬如细胞凋亡参与动脉粥样硬化^[4]、腹主动脉瘤的发生和发展^[5],与其发病密切相关。然而细胞凋亡在静脉血栓形成后病理过程中的意义尚少有报道。本实验在透射电镜组织学观察中发现,部分内皮细胞凋亡,但未见到典型的凋亡小体,笔者认为,可能是因为电镜标本取材局限,加

上固定和染色等技术上的原因,未能观察到凋亡小体。

本实验用结扎法使静脉腔内血流滞缓诱发血栓形成,由于血栓形成造成内皮细胞局部低氧,再有血流切应力的改变均可诱发内皮细胞凋亡;后期再加上血栓对血管壁的刺激直接的机械损伤,内皮细胞缺血缺氧、炎症反应的发生,炎症作用导致炎性细胞因子(IL-1, IL-6 TNF等)的释放增加,造成恶性循环,进一步加剧了内皮细胞的损伤。电镜组织学证实内皮细胞凋亡存在,完全可以认为是内皮细胞损伤除炎症坏死以外,还存在凋亡这一种死亡形式。凋亡的调控途径主要有两条,其中一条为 bcl-2家族控制的线粒体途径^[6]。bcl-2为抑制凋亡基因,bax为促凋亡基因,bax和 bcl-2是一对正负凋亡调节基因^[7],因此,bcl-2/bax在细胞内的表达比是决定细胞在体内受到刺激发生凋亡的重要因素。本实验结果显示,血栓实验组 bax bcl-2蛋白的表达均明显高于各自的对照组,bax开始快速升高,2天时达到高峰,然后进行性下降,bcl-2的表达在整个实验过程中呈现进行性升高。本实验通过 TUNEL法检测到内皮细胞凋亡 12~24 h快速升高,然后维持这一高峰,2天后进行性下降,7天凋亡细胞数很少,1、2天时相与其它时相凋亡数相比有差异性,这正是血栓形成炎症反应最剧烈的时相,细胞凋亡通过细胞膜内陷和细胞分割形成凋亡小体,最终被吞噬细胞吞噬,溶酶体降解,其过程没有细胞内容物的释放,不产生炎症反应。这恰恰有利于炎症反应的减轻,有利于减轻内皮细胞的损伤程度,由于血栓再通和血栓后综合征的发生率取决于血管内皮细胞的损伤程度^[8],因此,我们认为这一时间段血管内皮细胞凋亡是机体防御的一面。从实验结果可以看出,TUNEL法阳性的细胞在时相变化上滞后于 bax bcl-2的比值,bax bcl-2比值的变化趋势大体上反应了 TUNEL法所测的凋亡细胞变化的趋势。说明 bax bcl-2基因在静脉血栓形成的过程中参与调控血管内皮细胞凋亡。设想如果通过外界因素或体内调节,来调控内皮细胞的死亡方式,使内皮细胞沿凋亡的方向发展(血栓形成 4天以内),应该可以减轻静脉血栓形成的病情。

目前认为,bcl-2不但与凋亡有关,还与细胞的增殖、再生有密切关系。本实验显示,bcl-2蛋白的表达进行性升高,7天时内皮细胞凋亡很少,病理切片证实有内皮细胞增生,关于 bcl-2与静脉血栓形成后内皮细胞增生、甚至于血栓再通的关系有待于进一步的研究。

(本文图 1~15见封三)

[文章编号] 1000-2200(2007)05-0514-03

· 基础医学 ·

丹参多酚酸对健康人血小板聚集与黏附的影响

高 辉, 李先辉, 李春艳, 吕江明

[摘要]目的: 研究丹参多酚酸对健康人血小板聚集及黏附的影响, 为临床给药方案的制定提供参考。方法: 27名受试者随机分成3组, 分别为丹参多酚酸 200、300、400 mg组。丹参多酚酸静脉滴注给药, 1 h滴完; 分时取血, 高效液相色谱法测定血浆丹酚酸 B 镁的浓度; 检测给药前后血小板聚集及黏附变化率, 以衡量血小板功能。结果: 丹参多酚酸给药后各组血小板聚集及黏附抑制率开始升高, 并呈时间依赖性。各组对血小板的聚集及黏附抑制作用均在 3~5 h 达到高峰, 药效的达峰时间落后于血药浓度达峰时间, 随后逐渐下降, 作用维持约 15 h。结论: 丹参多酚酸可抑制血小板聚集与黏附。

[关键词] 血小板聚集; 血小板黏附; 丹参多酚酸; 高效液相色谱法

[中国图书资料分类法分类号] R 331.143 **[文献标识码]** A

Effect of salvianolate on the platelet aggregation and adhesiveness in healthy volunteers

GAO Hui, LI Xianhui, LI Chunyan, LÜ Jiangming

(Department of Pharmacology, Medical College of Jishou University, Jishou 416000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of salvianolate in platelet aggregation and adhesiveness in healthy volunteers and to provide reference to the administered dose of salvianolate. **Methods** Twenty seven healthy volunteers were randomly divided into three groups: 200 mg salvianolate group, 300 mg group and 400 mg group. The drug was given by intravenous infusion within one hour and the blood was drawn at intervals. The plasma drug concentration was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the platelet aggregation and adhesiveness rates were assayed simultaneously; the inhibition rates of them were used to evaluate the intensity of pharmacological effects. **Results** The inhibition rates of platelet aggregation and adhesiveness of the 3 groups rose gradually after administration of salvianolate which had obvious time effect relationship. The concentration reached peaks at 3-5 hours and the pharmacological effects lagged behind in the 3 groups. **Conclusions** Salvianolate may inhibit the aggregation and adhesiveness of platelet.

[Key words] platelet aggregation; platelet adhesiveness; salvianolate; high performance liquid chromatography

注射用丹参多酚酸 (salvianolate) 盐为淡黄色疏松体, 易溶于水、醇, 难溶于丙酮, 主要成分丹酚酸 B 镁的含量超过 80%, 其余为丹酚酸 B 镁的同系物。本试验主要研究其对健康人血小板聚集及黏附的影响, 从而反映其抗血小板的功能。

[收稿日期] 2007-05-10

[基金项目] 湖南省卫生厅资助项目 [B2006-135]

[作者单位] 湖南吉首大学医学院药理学教研室, 湖南吉首 416000

[作者简介] 高 辉 (1977-), 男, 硕士, 讲师。

1 资料与方法

1.1 药物、仪器与试剂 试验药品: 丹参多酚酸盐注射液, 规格: 每支 50 mg 上海绿谷(集团)有限公司, 批号: 20021101; 色谱仪: HPLC 系统, ESA 公司; 血小板黏附测定管, 日本大阪医学院器械株式会社; BY-NJ2型血小板聚集仪, 北京普利生集团公司。标准对照品: 丹酚酸 B 镁 (magnesium lithospermate B), 中国中医研究院西苑医院基础实验中心, 批号:

[参 考 文 献]

- [1] 李家增, 贺石林, 王鸿利. 血栓病学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 8-33.
- [2] Bann AD, Lip GY. Virchow's triad revisited: The importance of soluble coagulation factors, the endothelium, and platelets [J]. *Thromb Res* 2001; 101(4): 321-327.
- [3] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-257.
- [4] Choy J, Granville DJ, Hunt DW, et al. Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(9): 1673-1690.
- [5] Zhang J, Schmidt J, Ryschich E, et al. Increased apoptosis and

decreased density of medial smooth muscle cells in human abdominal aortic aneurysms [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003; 116(10): 1549-1552.

- [6] Zhang H, Xu Q, Krajewski S, et al. An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl2 family proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(6): 2597-2602.
- [7] Fu BP, Mok SC, Genest DR, et al. C-myc, c-erbB2, c-fos and bcl2 oncoproteins: Expression in normal placenta, partial and complete mole, and chorioepithelioma [J]. *J Reprod Med* 1998; 43(2): 101-110.
- [8] Wagner CR, Vetter RM, Burger R. Expression of H reg ion-associated antigen (Ia) and interleukin 1 by subcultured human endothelial cells [J]. *Cell Immunol* 1995; 93(1): 91-104.

自体骨髓基质细胞立体培养修复关节软骨缺损的实验研究(正文见 508 页)

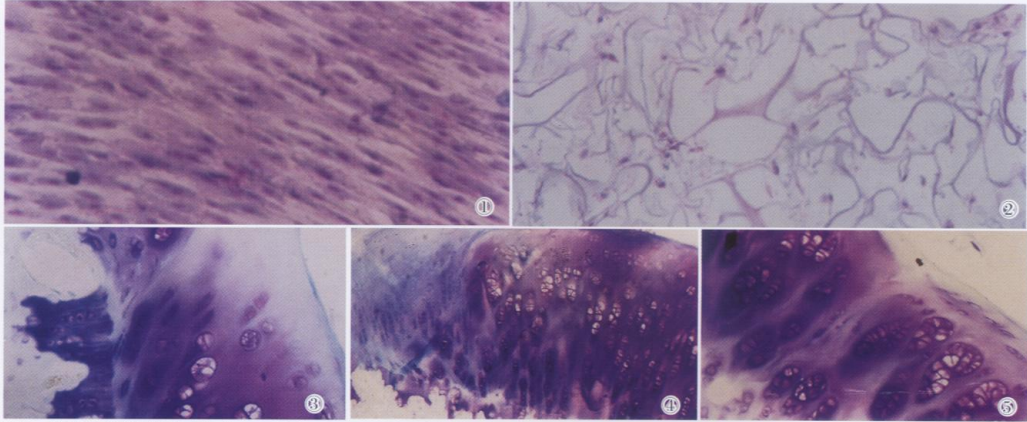


图1 贴壁生长的骨髓基质细胞 (HE 染色 10x40) 图2 骨髓基质细胞在 I 型胶原海绵中生长 (HE 染色 10x20) 图3 第 1 个月修复组织 (右边是修复组织, 可见细胞体积较小, 周围有软骨陷窝和软骨小囊, 基质纤维紊乱, 左上方为分界线及正常组织)(HE 染色 10x20) 图4 第 2 个月修复组织 (左边修复组织, 可见同源软骨细胞, 呈柱状排列, 细胞周围有软骨陷窝, 基质异染明显, 排列较规则, 右边为正常组织)(甲苯胺蓝染色 10x40) 图5 第 3 个月修复组织 (右边是修复组织, 可见细胞体积与正常组织相差不多, 同源软骨细胞多见, 周围有软骨陷窝, 基质纤维稍粗, 交界处可见 3 个柱状同源细胞群, 体积较小, 左侧是正常组织)(甲苯胺蓝染色 10x40)

兔深静脉血栓形成后内皮细胞凋亡的研究(正文见 511 页)

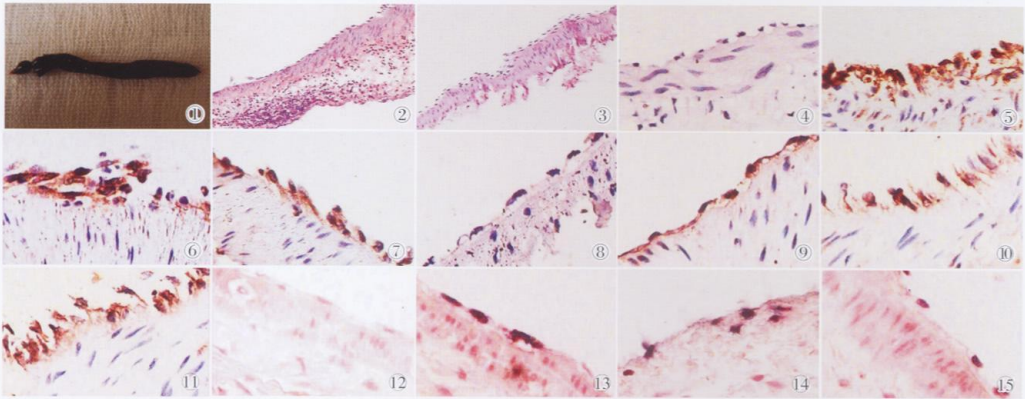


图1 兔后腔静脉血栓模型 x100 图2 血管壁三层炎性细胞浸润 x100 图3 血管内皮细胞单层变多层 x100 图4 bax 染色阴性 x400 图5 2 天时相 bax 表达 x400 图6 4 天时相 bax 表达 x400 图7 7 天时相 bax 表达 x400 图8 bcl-2 染色阴性 x400 图9 1 天时相 bcl-2 表达 x400 图10 4 天时相 bcl-2 表达 x400 图11 7 天时相 bcl-2 表达 x400 图12 tunel 标记阴性 x400 图13 tunel 标记 4 天 x400 图14 tunel 标记 1 天 x400 图15 tunel 标记 12 h x400

以瘢痕疙瘩为首发表现的皮肤转移性(胃)印戒细胞癌 1 例(正文见 630 页)

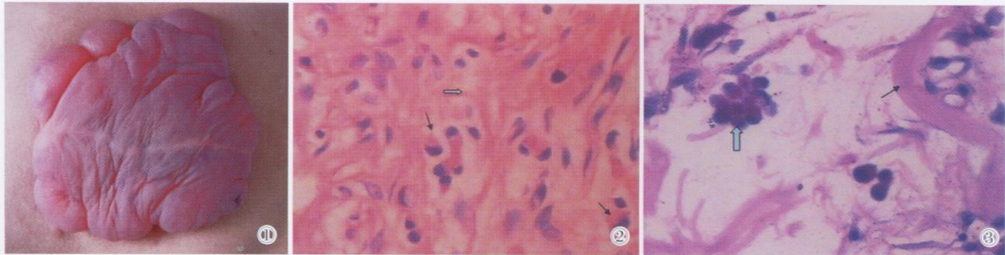


图1 中间见线形瘢痕(背部) 图2 见大量胶原及成簇的印戒细胞(空心箭头所指为胶原, 实心箭头所指为印戒细胞)(HE 染色 x100) 图3 见可印戒细胞和粗大的胶原(空心箭头所指为印戒细胞)[AB/PAS 染色(+) x400]