

高脂血症大鼠血浆 vWF, PAI-1 和 t-PA 变化及意义

蒋海河¹, 刘一¹, 林国强¹, 李迎秋²

(1. 中南大学湘雅医院心胸外科, 长沙 410008; 2. 湖南中医药大学基础课部, 长沙 410007)

[摘要] 目的:通过建立大鼠高脂血症模型以动态观察其在不同时间点上所致大鼠血管内皮细胞损伤后血浆抗血管性假性血友病因子(von Willebrand's factor, vWF)、纤溶酶原活化抑制物-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA)分子标志物的表达。方法:取体质量为(200±20)g健康雄性SD大鼠60只,随机分为6组(10只/组),即高脂合剂灌胃7周组(A7组)、高脂合剂灌胃8周组(A8组)、高脂合剂灌胃9周组(A9组);普通饲料喂养7周组(C7组)、普通饲料喂养8周组(C8组)、普通饲料喂养9周组(C9组)。实验结束时处死各组动物,取血标本,分离血清立即测定血脂;取大鼠主动脉制成病理切片,光镜下观察内皮的病理改变,并另取血浆以酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆vWF, PAI-1和t-PA的含量。结果:(1)7,8,9周高脂合剂灌胃组大鼠血脂TG, TC和LDL均高于其相应对照组,而HDL则先随灌胃时间的增加而升高,后随着灌胃时间的延长再次降低。(2)光镜下检查发现对照组大鼠主动脉内皮细胞形态正常,而各模型组大鼠主动脉内皮细胞有不同程度的损伤。(3)在3个模型组中,血浆中vWF和PAI-1含量随着高脂血症持续时间的延长而增加;t-PA的含量随着高脂血症持续时间的延长而降低;(4)在A7和A8组vWF的表达无明显差别,它不随内皮病变的改变而变化;在模型组中,PAI-1随内皮细胞损伤的加重而逐渐增高;在模型组中,t-PA随内皮细胞损伤的加重而逐渐递减。结论:(1)大鼠主动脉内皮细胞随高脂血症持续时间的延长,病理损伤逐渐加重。(2)血浆中vWF, PAI-1和t-PA的改变可作为判断高脂血症大鼠血管内皮细胞损伤的分子标志物。(3)在高脂血症大鼠血管内皮细胞损伤中,反映血管内皮细胞早期的病变PAI-1和t-PA比vWF更敏感。

[关键词] 高脂血症; 抗血管性假性血友病因子; 组织型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原活化抑制物; 大鼠

[中图分类号] R589.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2008)05-0415-06

Change of vWF, PAI-1 and t-PA in rats with hyperlipemia and its significance

JIANG Hai-he¹, LIU Yi¹, LIN Guo-qiang¹, LI Ying-qiu²

(1. Department of Cardiopulmonary Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Faculty of Basic Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: **Objective** To establish the hyperlipidemia model and observe its effect on the expression of plasma vWF, PAI-1 and t-PA after endothelial cell injury caused by the model at different time in rats. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats weighing (200±20)g were randomly divi-

收稿日期(Date of reception) 2007-10-23

作者简介(Biography) 蒋海河(1962-),男,湖南安化人,教授,主要从事心肺血管的保护研究。

通讯作者(Corresponding author) 林国强, E-mail: lgq186snoopy@126.com

基金项目(Foundation items) 湖南省自然科学基金(02jyy2053)。 The work was supported by Natural Science Foundation of Hunan Province of P. R. China (02jyy2053).

ded into 6 groups ($n = 10$ in each): high fat composition for 7 weeks (Group A7), 8 weeks (Group A8) and 9 weeks (Group A9), common bait vessel feeding for 7 weeks (Group C7), 8 weeks (Group C8) and 9 weeks (Group C9). When it reached the setting time, the rats were put to death and the serum was separated to detect the blood-fat immediately. Meanwhile, the pathological sections of the rat aorta were made to observe the endothelial injury. The blood plasma was separated and the content of the blood plasma PAI-1, t-PA and vWF was detected by ELISA assay. **Results**

(1) TG, TC and LDL of the rats intragastrically administrated high fat composition were higher than those of the control group, and HDL increased with time at first, but lowered when longer than 9 weeks. (2) There were no lesions in the aortic endothelium in all rats of Group C through optical microscope, while different lesions in the aortic endothelium in all rats of Group A were observed. (3) In the 3 groups A, the plasma vWF and PAI-1 were gradually increasing with time while t-PA gradually decreased. (4) There was no significant difference of vWF between Group A7 and Group A8. PAI-1 increased gradually with the aggravation of endotheliocytes in Group A; and t-PA decreased gradually with the aggravation of endothelium in Group A. **Conclusion** (1) As intragastric administration prolongs, the plasma lipid of rats keeps increasing with the aggravation of the endodermis injury. (2) PAI-1, t-PA and vWF are the molecular markers of vascular endothelial cell injury in rats. (3) PAI-1 and t-PA are more sensitive than vWF in reflecting the endothelial cell injury in hyperlipemia early metaphase.

Key words: hyperlipemia; von Willebrand's factor; tissue-type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor; rats

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2008, 33(5):0415-06]

随着经济的发展及人民生活水平的提高,血管内皮功能障碍涉及的病变所导致的心、脑血管意外成为主要死亡原因^[1]。vWF, PAI 和 t-PA 均在有关研究中被证明是内皮细胞受损的标志物^[2-4]。本研究拟通过建立大鼠高脂血症模型,动态观察其在不同时间点上所致大鼠血管内皮细胞损伤后血浆 vWF, PAI 和 t-PA 分子标志物的表达,并比较其异同点,以找出一个或几个敏感性、特异性较高的反映内皮细胞损伤的分子标志物,为临床早期诊断和治疗提供指导。

1 材料与方法

1.1 动物及饲养方法 取体质量(200 ± 20) g 健康雄性大鼠 60 只(SPF 级,购自湖南农业大学动物学部),将大鼠称重并以苦味酸标记,适应性饲养 7 d 后,随机分为 6 组(10 只/组),即普通饲料喂养对照组 3 组,分为 7 周、8 周、9 周喂养组(C7 组、C8 组、C9 组),并分别与各高脂合剂灌胃组对照;高脂合剂灌胃组分别为 7 周、8 周、

9 周灌胃组(A7 组、A8 组、A9 组)。对照组用普通饲料(购自中南大学动物学部)+清洁水,自由进食饮水,不限定进食量。实验组(高脂合剂灌胃组)按 1 mL/100 g 体质量的量予以高脂合剂灌胃,每天 1 次;每周称重 1 次,再以此调整灌胃剂量;高脂合剂配方^[5]:胆固醇 25 g,去氧胆酸钠 2 g,甲基硫氧嘧啶 0.8 g,丙三醇 20 mL,20 mL 吐温-80,猪油 25 g,最后用蒸馏水定至 100 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 标本制取

1.2.1.1 血浆标本制备 大鼠以 20% 乌拉坦按 2 mL/100 g 腹腔注射麻醉后,备皮,于胸骨柄上一横指、正中线向右旁开 1 cm 处做切口,于触及动脉搏动处分离肌肉可见右侧颈动脉,以 5 号头皮针穿刺血管取血,血液标本以 3.8% 枸橼酸钠 1:9 抗凝,取血 5 mL 以 3000 r/min 离心 10 min,取血浆分装置于 -70°C 冰箱保存;同时另取血清立即作血脂测定。

1.2.1.2 主动脉标本制备 处死后的大鼠,以组织剪纵行剪开胸骨,暴露心脏及大血管,游

离主动脉至头颈部三大分支, 予以切断, 游离各肋间动脉、逐一切断, 于主动脉根部及主动脉穿过膈肌水平分别切断主动脉, 以眼科剪纵行剪开, 平铺在滤纸上, 保持内膜面朝上, 用 10% 甲醛液固定后, 经梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋。以滑动式石蜡切片机切片, 片厚 5 μm 。

1.2.2 血脂测定方法 采用酶法测定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 浓度。采用化学遮蔽法测定血清高密度脂蛋白 (high density lipoprotein cholesterol, HDL) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。

1.2.3 vWF, PAI-1 和 t-PA 测定 将冷冻血浆于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴解冰, 用 ELISA 试剂盒根据说明进行稀释, 加样、洗涤, 加酶标抗体, 进行显色、比色等。在酶标仪上以空白对照孔调零, 测定各孔 A 值。根据所绘标准曲线计算各待测标本含量。

1.2.4 主动脉石蜡切片的 HE 染色 二甲苯 I, II 各顺序处理 10 min 按 100%, 95%, 80%, 70%, 50% 各 15 min 梯度酒精清洁脱水各 2~5 min, 流水将酒精冲洗干净, 苏木素染色 3 min, 流水冲洗 1 min, 1% 盐酸酒精分化 20 s, 流水冲洗 1 min, 稀氨水 (1%) 返蓝 30 s, 蒸馏水洗 1 min, 伊红染色 3 min, 流水冲洗 1 min, 80%, 95% 梯度酒精脱水中 1 min; 酒精 100%, 二甲苯 I, II 透明各 15 min, 中性树胶封片。

1.2.5 主动脉内膜苏丹 III 染色 在室温下将主动脉置于苏丹 III 染液 (含 0.5% 苏丹 III, 35% 乙醇和 50% 丙酮的饱和溶液) 中 15 min, 用 80% 的乙醇洗脱去背景颜色, 和双蒸水充分水洗后, 于 4% 多聚甲醛中固定。将标本照相后, 由病理科医师进行检测。

1.3 统计学处理 统计学分析采用 SPSS11.5 软件处理。计量资料结果全部采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和两两比较 (LSD 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠高脂血症判断标准 大鼠正常血脂 TC 含量为 1~2 mmol/L, 模型组大鼠血脂高于此值 2 倍, 且 TG 和 LDL 与正常对照组比较升高

($P < 0.05$), 则判定为高脂血症。各模型组 TC 均高于正常对照 2 倍, 且 TG 和 LDL 与正常对照组比较升高 ($P < 0.05$), 认为高脂血症诊断成立。

2.2 高脂饲料喂养对大鼠血清 TG 的影响 C7, C8 和 C9 组大鼠血清 TG 之间比较, 均无统计学意义 ($P > 0.05$)。A7, A8 和 A9 组大鼠血清 TG 均显著高于相应普通饲料喂养组 ($P < 0.01$)。A7 组、A8 组大鼠血清 TG 比较无统计学意义 ($P > 0.05$), A9 组大鼠血清 TG 显著高于 A7 组、A8 组 ($P > 0.01$)。

2.3 高脂饲料喂养对大鼠血清 TC 的影响 C7, C8 和 C9 组大鼠血清 TC 之间比较, 均无统计学意义 ($P > 0.05$)。A7, A8 和 A9 组大鼠血清 TC 均显著高于相应普通饲料喂养组 ($P < 0.01$)。随灌胃时间的延长, 高脂饲料喂养组大鼠血清 TC 呈逐渐升高趋势 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.4 高脂饲料喂养对大鼠血清 HDL 的影响 普通饲料各组大鼠血清 HDL 之间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。A7 组、A8 组大鼠血清 HDL 均显著高于相应普通饲料喂养组 ($P < 0.01$), A9 组大鼠血清 HDL 与各普通饲料喂养组比较均无统计学意义 ($P > 0.05$)。高脂饲料喂养大鼠血清 HDL 至第 7 周时最高, 至第 8 周、第 9 周逐渐下降, 呈先升高后降低的趋势 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.5 高脂饲料喂养对大鼠血清 LDL 的影响 普通饲料各组大鼠血清 LDL 之间比较均无统计学意义 ($P > 0.05$)。高脂饲料喂养各组大鼠血清 LDL 均显著高于相应普通饲料喂养组 ($P < 0.01$)。A7 组、A8 组大鼠血清 LDL 比较无统计学意义, A9 组大鼠血清 LDL 显著高于 A7 和 A8 组 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.6 高脂饲料喂养对大鼠血浆内皮细胞损伤分子标志物的影响 高脂饲料喂养对大鼠血浆 vWFR, PAI-1 和 t-PA 的影响如下: C7, C8 和 C9 组大鼠血浆 vWF, PAI-1 和 t-PA 值之间比较, 无统计学意义 ($P > 0.05$)。A7 组、A8 组和 A9 组大鼠血浆 vWF, PAI-1 和 t-PA 值与普通饲料喂养组比较, 有统计学意义 ($P > 0.05$)。不同时间高脂饲料喂养对大鼠 vWF, PAI-1 和 t-PA 值之间比较, 随灌胃时间的延长, 高脂饲料喂养各组大鼠血浆的上述检测值均有不同程度的改变 (表 2)。

表1 高脂饲料喂养对大鼠血脂水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$)Tab.1 Influences of high fat diet on plasma lipid of rats($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

分组	TG	TC	HDL	LDL
C7组	0.61 ± 0.02	1.57 ± 0.04	0.78 ± 0.10	0.56 ± 0.17
A7组	1.04 ± 0.27**	3.25 ± 0.27**	1.31 ± 0.19**	1.39 ± 0.18**
C8组	0.58 ± 0.01	1.55 ± 0.02	0.75 ± 0.09	0.55 ± 0.17
A8组	1.17 ± 0.17**△△	3.56 ± 0.42**△△	1.17 ± 0.11**△△	1.44 ± 0.22**
C9组	0.63 ± 0.32	1.65 ± 0.13	0.82 ± 0.11	0.56 ± 0.15
A9组	2.81 ± 0.29**△△▲▲	4.11 ± 0.62**△△▲▲	0.74 ± 0.11	1.96 ± 0.30**△△▲▲

与相应的对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 A7 组比较, △△ $P < 0.01$; 与 A8 组比较, ▲▲ $P < 0.01$

表2 高脂饲料喂养对大鼠血浆 vWF, PAI-1 和 t-PA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab.2 Influences of high fat diet on plasma vWF, PAI-1 and t-PA of rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	vWF(%)	PAI-1(U/L)	t-PA(U/L)
C7组	0.133 ± 0.010	0.347 ± 0.018	0.994 ± 0.047
A7组	0.144 ± 0.009**	0.689 ± 0.027**	0.537 ± 0.052**
C8组	0.134 ± 0.017	0.349 ± 0.017	1.00 ± 0.060
A8组	0.149 ± 0.006**	0.800 ± 0.035**△△	0.267 ± 0.016**△△
C9组	0.136 ± 0.014	0.353 ± 0.013	0.997 ± 0.133
A9组	0.175 ± 0.006**△△▲▲	0.931 ± 0.041**△△▲▲	0.189 ± 0.011**△△▲▲

与相应的对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 A7 比较, △△ $P < 0.01$; 与 A8 比较, ▲▲ $P < 0.01$

2.7 高脂饲料喂养对大鼠主动脉内膜的影响

肉眼观察: 各组大鼠主动脉内膜光滑、平整未见明显异常。A7组、A8组和A9组大鼠主动脉内膜 HE 染色: 光镜下见血管内皮细胞清晰可见, 结构完整, 均未见明显异常。苏丹 III 染色: 未见黄褐色着色细胞(图 1A, 图 2A)。A7组大鼠主动脉内膜 HE 染色: 光镜下见血管内皮细胞结构完整, 血管内皮层未见泡沫细胞, 其他结构未见

明显异常。苏丹 III 染色: 未见黄褐色着色细胞(图 1B, 图 2B)。A8组大鼠主动脉内膜 HE 染色: 光镜下部分血管内皮细胞损伤、脱落, 血管内皮层未见明显泡沫细胞。脂肪染色: 未见黄褐色着色细胞(图 1C, 图 2C)。A9组 HE 染色: 光镜下血管壁增厚, 纤维增生, 内膜增厚, 内皮细胞脱落, 部分区域见蓝色钙盐沉积。脂肪染色: 可见内膜下黄褐色着色细胞(图 1D, 图 2D)。

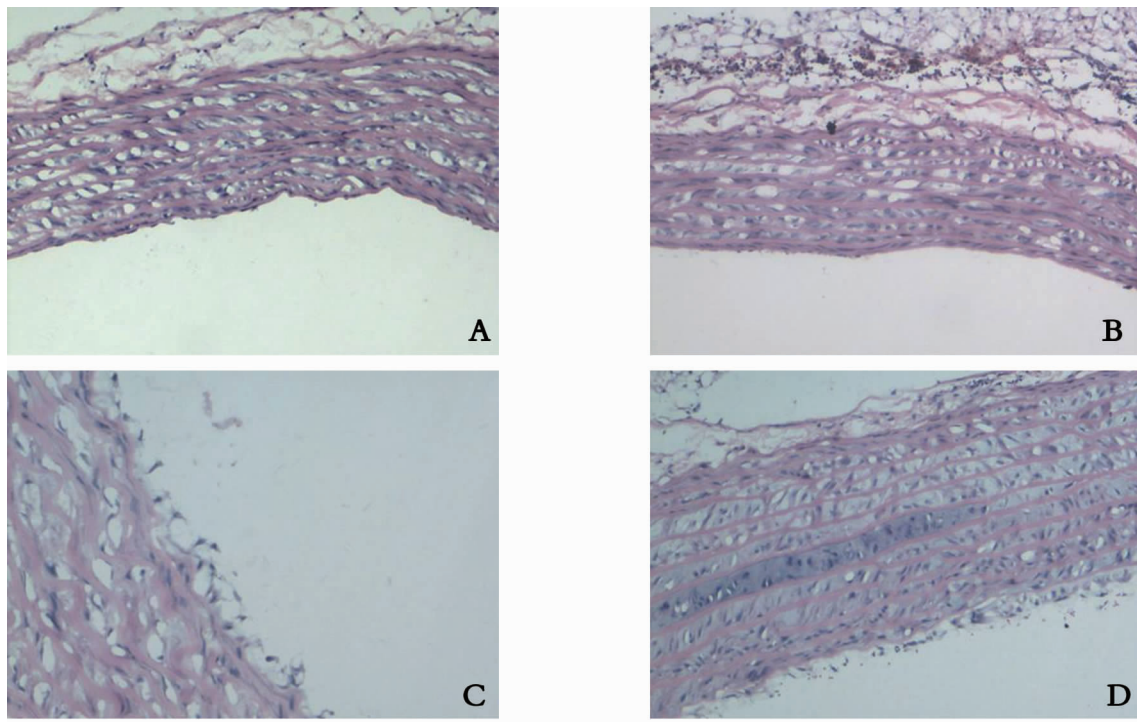


图1 大鼠主动脉 HE 染色(HE, ×100)。A: 对照组; B: A7组; C: A8组; D: A9组。

Fig.1 Hematoxylin-eosin staining of the aorta of the rats(HE, ×100). A: Control group; B: Group A7; C: Group A8; D: Group A9.

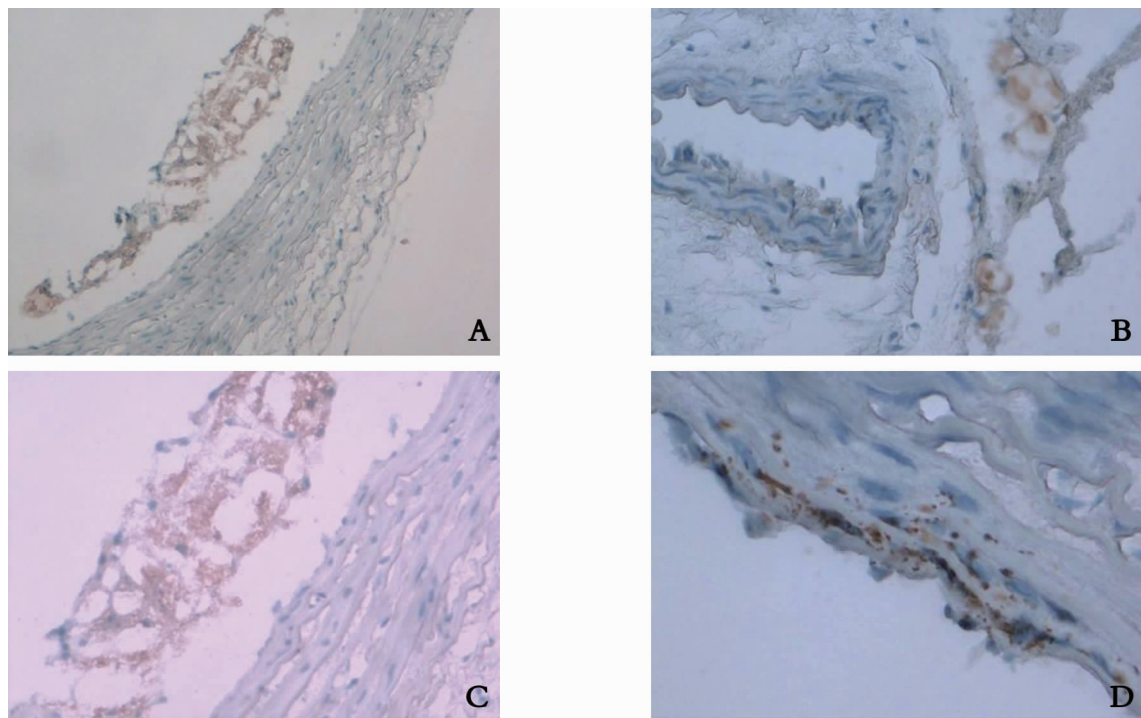


图2 大鼠主动脉苏丹 III 染色 ($\times 100$)。A: 对照组; B: A7 组; C: A8 组; D: A9 组。

Fig. 2 Sudan III staining of the aorta of the rats ($\times 100$). A: Control group; B: Group A7; C: Group A8; D: Group A9.

3 讨论

血管内皮细胞是循环血液与血管平滑肌间的机械屏障,同时具有接受、传递信息和分泌血管活性物质等功能,维持血管内皮的完整和功能正常对于确保血管壁的光滑和血流的通畅具有重要意义。但在许多病理情况下,如高脂血症、高血压等均可导致内皮细胞结构和功能的改变,并在相应病理过程的发生发展中起着重要的作用^[6]。在本实验中,通过高脂合剂灌胃,大鼠血浆中 TG, TC 和 LDL 出现了不同程度的升高,证实了大鼠存在高脂血症,并经病理切片光镜下检查,发现血管内皮出现了不同程度的损伤,说明高脂血症可以导致血管内皮细胞损伤或功能障碍,这与已有的研究结果一致。

血管内皮细胞分泌的多种物质如 vWF, PAI 和 t-PA 等被视为内皮细胞功能的标志物。当内皮细胞损伤或功能障碍时,上述物质释放量改变,测定其循环血中的浓度可反映内皮细胞的功能状态。

vWF 主要由血管内皮细胞的内质网合成并存储于 Weibel Palade 小体中的一种多聚糖蛋白,它是初期止血中支持血小板黏附的重要因素。当

内皮受损时, vWF 合成释放增加,血浆中的 vWF 水平与内皮受损程度呈正相关,是反映血管内皮受损的特异指标^[2]。在本实验中,3 个模型组大鼠血浆中 vWF 与对照组比较均明显升高,说明模型组大鼠存在血管内皮细胞损伤或功能障碍, A7 和 A8 组大鼠血浆中 vWF 之间比较无统计学意义,而病理检查表明 A7 和 A8 组大鼠动脉内皮病变逐渐加重,故可认为在高血脂所造成的内皮细胞损伤中, vWF 可以作为反映其病变的标志物,但对反映内皮细胞早期损伤或功能障碍尚不够敏感。

t-PA 是由 527 个氨基酸组成的单链丝氨酸蛋白酶,为纤溶系统的生理性激活剂,由血管内皮细胞合成贮存释放入血。PAI-1 是由 379 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,它主要由内皮细胞合成和分泌,大部分储存于血小板 α 颗粒中,是 t-PA 的抑制物。当血管内皮细胞受损后, PAI 活性增高而使 t-PA 纤溶活性降低。当血管内皮细胞损伤或功能障碍时, t-PA 合成减少,同时血浆中 PAI-1 大量增加,因此 t-PA 和 PAI-1 可被认为是内皮细胞受损的标志物^[3,4]。本实验结果表明,各对照组间大鼠 t-PA 和 PAI-1 含量无明显差别;各模型组大鼠血浆 t-PA 和 PAI-1 含量与相应的

对照组相比均有显著性的改变,这也说明大鼠高脂血症可导致其血管内皮细胞损伤或功能障碍。进一步分析发现,随着高脂喂养时间的延长、血脂的升高,内皮的病变逐渐加重,血浆 PAI-1 含量也逐渐升高,而 t-PA 含量则逐渐下降,提示血浆 t-PA 和 PAI-1 含量在内皮细胞病变的不同阶段,随内皮细胞损伤程度的变化而变化。因此,血浆 t-PA 和 PAI-1 不仅可以作为血管内皮细胞的损伤的标志物,而且还可以作为判断内皮细胞功能障碍或损伤程度的指标。

虽然本实验的主动脉内皮光镜检查结果表明,C7组与高脂饲料喂养A7组大鼠主动脉内皮都没有明显的病理改变,但此两组间的血浆 vWF,t-PA 和 PAI-1 水平已经有显著性的差别,表明血管内皮的功能损伤要早于其结构的损伤,在动脉形态学损害或斑块出现之前,就发生了内皮细胞功能障碍,这与国外相关的研究结果一致^[7]。提示上述3个指标可以作为血管内皮损伤的较敏感的指标,能反映高脂血症大鼠血管内皮早期的损害情况。A7和A8组的大鼠血浆中 vWF 之间比较无统计学意义,而 t-PA 和 PAI-1 则有显著性改变,说明与 vWF 相比,t-PA 和 PAI-1 能更敏感地反映出早期血管内皮受损程度的变化。

参考文献:

- [1] Lowe G. Coagulation, fibrinolysis and cardiovascular disease [J]. *Fibrinolysis*, 1999, 13(3): 91-92.
- [2] Lip GY, Blann A. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 34(2): 255-265.
- [3] Binder B R, Christ G, Gruber F, et al. Plasminogen activator inhibitor physiological and pathophysiological roles [J]. *News Physiol Sci*, 2002, 17(2): 56-61.
- [4] Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B, et al. The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24): 10853-10862.
- [5] 刘明,董超仁,苏静怡. 一种简便实用的大鼠高脂血症模型[J]. *中国药理学通报*, 1989, 5(2): 119-121.
LIU Ming, DONG Chao-ren, SU Jing-yi. A convenient and useful hyperlipidemia model of rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 1989, 5(2): 119-121.
- [6] Blann A D, McCollum C N. von willebrand factor, endothelial damage and atherosclerosis [J]. *Eur J Vasc Surg*, 1994, 8(1): 10-15.
- [7] Moncada S, Vane J R. Prostacyclin and its clinical applications [J]. *Ann Clin Res*, 1984, 16(1): 241-252.
- [8] Arcaro G, Zenere B M, Travia D, et al. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects [J]. *Atherosclerosis*, 1995, 114(2): 247-254.

(本文编辑 傅希文)