临床研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0243-03

抗凝溶栓后大鼠腔静脉内皮扫描电镜变化

杨 冰[1],赵庆华[1],赵 渝[2],代远斌[2],王学虎[2],向东洲[2]
(1. 重庆医科大学附属第一医院护理部,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察肝素、尿激酶及肝素加尿激酶治疗急性大鼠下腔深静脉血栓(Deep vein thrombosis,DVT)形成后不同时相腔静脉内皮扫描电镜变化。方法:SD 大鼠 135 只,105 只建立大鼠急性下腔静脉血栓模型后随机分为肝素 A 组、尿激酶 B 组、肝素加尿激酶 C 组各 35 只;另 30 只为假手术组。各组给药后分别于血栓形成后第 1、4、7、14、28 d 获取病变段血管,通过扫描电镜观察静脉内皮层变化。结果:7 d 时扫描电镜结果显示 B 及 C 组内皮损伤较轻,内皮损伤分级主要为Ⅱ~Ⅲ级,而 C 组为Ⅲ~Ⅳ级($P<0.05$);28 d 时 C 组内皮损伤较 A、B 组轻($P<0.05$),内皮损伤分级主要为Ⅱ级,而 B、C 组为Ⅲ~Ⅳ级($P<0.05$)。结论:肝素联合尿激酶治疗大鼠急性下腔静脉血栓形成较其单独使用有更好的内皮结构保护作用。

【关键词】静脉血栓形成;抗凝溶栓;血管内皮
【中国图书分类法分类号】R654.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-18

Scanning electron microscopic changes of inferior venous wall after anticoagulation and thrombolysis in rats

YANG Bing, et al
(*Department of Nursing, , the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the scanning electron microscopic changes of venous endothelium after acute inferior vein thrombosis in rats. *Methods*: The inferior caval venous thrombosis models were treated with heparin(n = 35, group A), urokinase(n =35, group B), and combination of heparin and urokinase(n =35, group C), respectively. Sham group(n =30)was also established. The thrombosed caval veins were taken 1, 4, 7, 14, and 28 days after thrombosis. Scanning electron microscopy was used to observe the damage of endothelial cells. *Results*: The Results showed that the endotheliurn injury degree was mainly Ⅱ to Ⅲ grade in group B and C whereas it was Ⅲ to Ⅳ grade in group A on day7 ($P<0.05$); endotheliurn injury degree was mainly Ⅱ grade in group C whereas it was Ⅲ to Ⅳ grade in group A and B on day 28 ($P<0.05$). *Conclusion*: Combination of heparin and urokinase for the treatment of acute inferior caval venous thrombosis has good short or intermediate term effect on the protection of endothelial structure.

【Key words】 Venous thrombosis; Anticoagulation/thrombolysis; Blood vessel endothelium

抗凝、溶栓(Thrombolysis,TL)是治疗深静脉血栓(Deep vein thrombosis,DVT)形成的重要方法之一。DVT 后其再通静脉多表现为内膜增生、附壁血栓纤维化等征象,并产生明显的血流动力学改变,导致遗留血栓后综合征。本实验通过分别应用肝素、尿激酶及联合肝素加尿激酶治疗急性大鼠下腔静脉血栓形成后,病变血管段静脉壁内皮扫描电镜变化的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组

154 雄性 SD 大鼠(体重 180~200 g,重庆医科大学动物实验中心提供),随机分为肝素 A 组、尿激酶 B 组、肝素加尿激酶 C 组各 35 只,30 只为假手术(sham,SH)组作为对照。其中 A、B、C 组再分为术后 1、4、7、14、28 d 5 个时相,每个时相段 7 只大鼠。

1.2 急性下腔静脉血栓形成模型的制作[1]

2%苯巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉,游离左肾静脉与下腔静脉汇合处和髂总静脉分叉处之间的下腔静脉段。分别在左肾静脉汇合下腔静脉处下方用 1# 丝线结扎下腔静脉,在髂总静脉分叉处上方用显微血管夹暂时阻断下腔静脉 2 h,经 25 G 细针穿刺无血液流出,证实该段静脉内血栓已形成。只显露腔静脉但不结扎之。血栓形成模型制作成功率为 98%。

1.3 给药

成功建模后,A、B、C 组分别给予尾静脉注入肝素钠 200 U/kg,尿激酶 20 000 U/kg 以及肝素 200 U/kg 加尿激酶 20 000 U/kg。SH 组给予相同容量的生理盐水,每天 1 次,共 10 d。

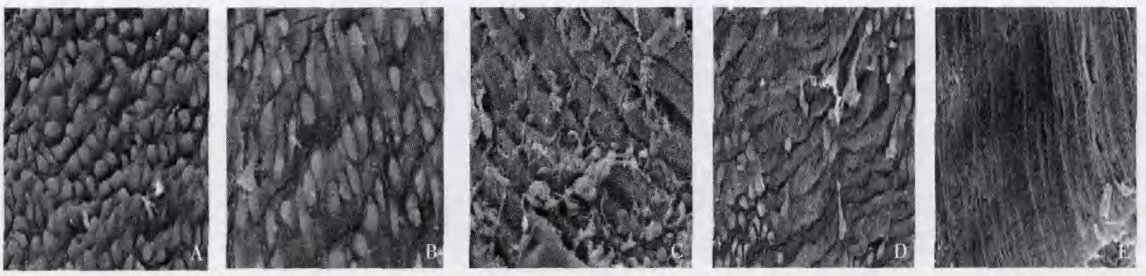
作者介绍:杨 冰(1984-),女,硕士,
研究方向:深静脉血栓。
通讯作者:赵庆华,女,教授,E-mail:qh20063@163.com。

1.4　观察指标

分别于术后的第 1、4、7、14、28 d，切除血栓形成的股静脉段，纵行剪开管壁，去除血栓，分别固定于 10%甲醛溶液和 25%戊二醛中。HE 染色观察血栓的结构演变与机化程度（10 × 40 倍）；通过扫描电镜评估静脉壁的解剖学变化。扫描电镜（HITACHI，S520，日本）下内皮损伤分级见图 1A ~ 1E。

1.5　统计学处理

内皮层损伤分级以等级资料表示，采用多个样本两两比较的秩和检验。



A. Ⅰ级：内皮细胞脱落 0 ~ 10%，内皮层完整；B. Ⅱ级：内皮细胞脱落 11%~25%，内皮层轻微断裂伴白细胞及血小板沉积；C. Ⅲ级：内皮细胞脱落 26% ~ 50%，片状内皮脱落，明显的内皮下基质显露；D. Ⅳ级：内皮细胞脱落 51% ~ 75%，内皮肿胀伴明显组织坏死；E. Ⅴ级：内皮细胞脱落 76% ~ 100%，严重的内皮脱落伴明显的内皮下基质暴露

图 1　电镜下内皮损伤各级表现（电镜× 1000）

2　结　果

2.1　光镜下病理检查结果

2.1.1　血栓的结构演变与机化程度　栓后第 7 d：A 组血栓与静脉壁的大部分粘连，中央区血栓崩解，呈脱落趋势，形成腔隙，腔隙表面内皮细胞可见；B 组血栓崩解消失，血管结构清晰，腔内红细胞密集成团；C 组管腔内血栓消失，管腔壁完整，层次清晰。栓后第 14 d：A 组血栓与静脉内壁粘连，部分机化；B 组静脉横断面显示血栓机化再通，血栓与静脉内壁局限性粘连；C 组血管腔内血栓基本溶解消失，血管壁完整，结构清晰。栓后第 28 d：A、B 组血栓与静脉壁呈局限性粘连，血栓中央区崩解、分离、收缩，形成的空腔扩大，腔壁表面有内皮细胞。C 组极少量血栓与静脉壁呈局限性粘连，血栓崩解，已机化再通。

2.2　腔静脉内皮细胞扫描电镜检查结果

根据 Cho 等[2]内皮损伤分级标准，各组、各时相点内皮损伤程度见表 2。所有血栓形成的内皮细胞（Endothelialcell，EC）形态均与正常对照存在明显差异。A 组 EC 损伤程度随血栓形成病程进行性增大，多为Ⅰ~Ⅱ级；4、7 d 损伤加重，由 1 d 时的Ⅰ~Ⅱ级逐步变化为 28 d 时的Ⅳ~Ⅴ级；B 组溶栓治疗后 1 d 内皮层基本完整，但取栓后 EC 形态变为长条形，细胞间隙略 EC 脱落，细胞间隙增大，内皮下基质暴露，有血小板和白细胞粘附，损伤多为Ⅲ~Ⅳ级；溶栓后 14、28 d，EC 修复再生，内皮形态渐趋规则，但修复不完全，仍可见内皮下基质暴露，内皮损伤多为Ⅱ~Ⅲ级。C 组 28 d 时，内皮修复较好损伤多为Ⅰ~Ⅱ级。组间不同时相内皮损伤比较见表 3：A 组与 C 组比较，在取栓术后 7、14、28 d 差异有显著性（$P<0.05$）；B 组与 C 组比较，在取栓术后 28 d 差异有显著性（$P<0.05$）；A、B、C 组与 SH 组比较，在取栓术后 4、7、14、28 d，差异均有显著性（$P<0.05$）。

3　讨　论

急性下肢深静脉血栓形成多用抗凝、溶栓及外科取栓来治疗。据文献报道，抗凝、溶栓较之外科取栓有更好的内皮结构保护作用。而 EC 在血栓形成、复发的过程中具有重要作用[3,4]：内皮细胞能释放大批量一氧化氮（Nitric oxide，NO）、内皮素（Endorhelin，ET）、前列环素（Prostacyclin，PGI）及血小板合成的血栓素（ThromboxaneAz，TXA）等血管活性物质来调节血管的舒缩和血管壁的结构及保护抗血栓的内膜表面；内皮还是炎症和免疫反应的介导者及调节者。内皮通过产生促生长及抑制生长因子和调整细胞外基质的成分来调节血管壁的结构。内皮细胞在抑制平滑肌细胞（Smooth muscle cell，SMC）生长及从中膜到内膜的移行中起着重要作用；内皮细胞能够合成抑制 SMC 生长的类肝素样物质[5]。当内皮细胞受损将会失去其抗血栓作用而导致炎症反应等。因此在血栓形成的治疗中，保护血管 EC 便成为治疗成功与否的焦点。

急性静脉血栓时，血栓中纤维蛋白和纤维蛋白原结合了大量被激活的凝血酶，这种凝血酶不易被肝素所灭活，而在血栓局部发挥持久的生物活性作用，刺激其特异性结合受体在静脉内皮细胞上表达[6,7] 本实验扫描电镜结果显示 EC 损伤程度随血栓形成病程进行性增大，也说明在只予抗凝治疗无法阻止静

表 2 各组内皮损伤比较(n)

损伤分级	1 d				4 d				7 d				14 d				28 d			
	A	B	C	SH	A	B	C	SH	A	B	C	SH	A	B	C	SH	A	B	C	SH
Ⅰ	3	4	4	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	1	6	0	0	2	6
Ⅱ	4	3	2	0	3	4	3	0	1	2	3	0	0	4	3	0	0	2	4	0
Ⅲ	0	0	1	0	2	2	3	0	3	4	3	0	2	2	3	0	1	3	1	0
Ⅳ	0	0	0	0	2	1	1	0	1	1	1	0	3	1	0	0	2	1	0	0
Ⅴ	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	4	1	0	0
Hc	4.559				14.939				16.114				19.337				20.999			
P	0.207				0.002				0.001				0.000 1				0.000 1			

表 3 组间不同时相内皮损伤比较

		1 d	4 d	7 d	14 d	28 d
A 组 vs B 组	Uab	−0.515	−0.625	−1.237	−2.515	−2.770
	P	0.606	0.532	0.216	0.012	0.006
A 组 vs C 组	Uac	−0.214	−0.274	−1.484	−2.839	−3.089
	P	0.830	0.784	0.038	0.005	0.002
A 组 vs SHD 组	Uad	−2.138	−3.185	−3.180	−3.185	−3.210
	P	0.101	0.001	0.001	0.001	0.001
B 组 vs C 组	Ubc	−0.218	−0.421	−0.421	−0.490	−2.291
	P	0.827	0.674	0.674	0.624	0.022
B 组 vs SHD 组	Ubd	−1.757	−3.210	−3.210	−3.210	−3.180
	P	0.234	0.001	0.001	0.001	0.001
C 组 vs SHD 组	Ucd	−1.743	−3.195	−3.195	−2.832	−2.488
	P	0.081	0.001	0.001	0.005	0.013

脉内皮及平滑肌细胞遭到进一步的损伤。

急性血栓所引起的血管壁急性炎性反应迅速而强烈。大剂量尿激酶迅速溶解血栓防止其局部发挥持久作用,可以减轻内膜损伤和血栓机化这种内膜增生的途径。在平滑肌细胞增生上明显轻于肝素组。这种差异不仅因尿激酶的溶栓作用,而且是因为它能减轻血栓引起的血管壁急性炎症反应[8,9]。尿激酶联合肝素治疗急性腔静脉血栓形成一方面溶解现有血栓,减轻血管壁急性炎症反应;同时通过肝素的抗凝作用,控制血栓向周边蔓延的可能,因此对血管内皮细胞破坏较小,用于治疗大鼠下腔静脉血栓形成后 28 d, 内皮修复较好, 损伤多为Ⅰ~Ⅱ级,血管壁结构基本完整。B 组溶栓治疗后 1 天内皮层基本完整, 但取栓后 EC 形态变为长条形,EC 脱落,细胞间隙增大,内皮下基质暴露,有血小板和白细胞粘附,损伤多为Ⅲ~Ⅳ级;溶栓后 14、28 d, EC 修复再生,内皮形态渐趋规则,但修复不完全,仍可见内皮下基质暴露,内皮损伤多为Ⅱ~Ⅲ级。可能与后期血栓复发、机化以及附壁残余血栓导致的血管壁慢性炎性改变有关。本实验证实:(1)尿激酶联合肝素治疗大鼠急性下腔静脉血栓形成具有良好的近、中期效果;(2)具有较好的内皮结构保护作用。

参 考 文 献

[1] 顾 毅,时 德,赵 渝,等.不同时相球囊导管取栓的实验研究[J]. 中华普通外科杂志,2003,18(6):370-372.

[2] Cho J S,Martelli E,Mozes G,et al. Effect of thrombolysis and venous thrombectomy on valvular competence,thrombogenicity, morphology,and function[J]. J Vsc Surg,1998,28(5): 787-799.

[3] Bautissta L E.Inflammation,endothelial dysfunction,and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence[J]. J Hum Hypertens,2003,17(4):223-230.

[4] Anferson T L.Nitric oxide,atherosc1erosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction[J]. Heart Fail Rev,2003,8(1):71-86.

[5] Davis M R,Ortegon D P,Kerby J D,et al. Endothelial dysfunction after arterial thrombosis is ameliorated by L-arginine in combination with thrombolysis[J]. Vasc Interv Radiol,2003,14(2):233-239.

[6] Buller H R,Agnelli G,Hull R D. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy[J]. Chest,2004,126(3):401-428.

[7] David O,Josh T,Hanako M,et al. Duration of Anticoagulation Following Venous Thromboembolism[J]. JAMA,2005,294(6):706-715.

[8] Patel V P,Bong M,Di Cesare P E.Heparin-Induced Thrombocytopenia and Thrombosis[J]. Am J Orthop,2007,36(5):255-260.

[9] Thomas W W,Robert M S,Carol A W,et al. Venous thrombosis associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhension molecules[J]. Arteriosclerosis,thrombosis,and vascular biology,1995,15(2): 258-268.

(责任编辑:冉明会)