

凝血酶法致大鼠血液高凝态模型的建立

王立文¹, 沈晓洁^{1*}, 吴倩^{2*}, 嵇莹莹², 龚国清²

(1. 无锡卫生高等职业技术学校护理系, 江苏 无锡 214028; 2. 中国药科大学药学院药理学系, 南京 210009)

【摘要】 目的 探索静脉注射凝血酶造成大鼠高凝态模型, 为高凝态的研究提供合适动物模型。**方法** SD大鼠分为六组, 分别于股静脉恒速注射生理盐水和2.5、5、10、20、40 U/kg凝血酶溶液, 5 min内采血测活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB), 并观察大鼠死亡情况以确定最佳凝血酶剂量。在此基础上, 以最佳剂量凝血酶溶液股静脉注射给予大鼠, 分别于0、10、30、60、120、180、300 s采血测APTT、PT、FIB以确定最佳采血时间。最后将大鼠分为生理盐水组与凝血酶组(最佳凝血酶剂量和采血时间), 采集血样测定APTT、PT、FIB以及全血粘度。**结果** 10 U/kg凝血酶组大鼠血浆APTT、PT明显缩短, FIB明显升高, 且大鼠死亡率低。注射凝血酶后60 s大鼠血浆APTT、PT缩短最多, FIB含量升至最高。同生理盐水组相比, 凝血酶组大鼠血浆PT、APTT显著缩短, FIB、全血粘度显著增大, 且差异有显著性($P < 0.05$)。**结论** 注射凝血酶溶液可复制大鼠血液高凝态模型, 最佳凝血酶剂量为10 U/kg, 凝血酶浓度为2 U/mL, 最佳采血测试时间为60 s。

【关键词】 大鼠; 高凝态; 凝血酶; 静脉注射; 股静脉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0639-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.016

Establishment of a rat model of blood hypercoagulable state caused by intravenous injection of thrombin

WANG Li-wen¹, SHEN Xiao-jie^{1*}, WU Qian^{2*}, JI Ying-ying², GONG Guo-qing²

(1. Department of Nursing, Wuxi Healthcare Vocational Technology School, Wuxi, Jiangsu 214028, China;

2. Faculty of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to establish a rat model of blood hypercoagulable state by intravenous injection of thrombin and to provide a model for researches on hypercoagulable state. **Methods** Rats were divided into six groups and were injected with normal saline and 2.5, 5, 10, 20, 40 U/kg thrombin solution through the femoral vein, respectively. Then, blood was drawn to test the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT) and fibrinogen (FIB), and to observe the death rate of rats in these groups to verify the optimal dosage. On this basis, rats were injected thrombin of the best dose through the femoral vein, and blood samples were collected at 0, 10, 30, 60, 120, 180, 300 (s) to test APTT and PT and FIB for determining the best time for blood sampling. At last, the rats were divided into control group and thrombin group to inject normal saline or thrombin solution in the best dose via the femoral vein, and blood was taken at the best time to test APTT, PT, FIB and whole blood viscosity. **Results** APTT and PT values of the 10 U/kg thrombin group were the shortest, and FIB value of this group was the highest among these groups. APTT and PT values of blood sample collected at about 60 s after thrombin injection were the shortest, and FIB value was the highest. Compared with the control group, PT and APTT values of the thrombin group were shorter ($P < 0.05$), and blood viscosity and FIB were higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Injecting thrombin solution into the femoral vein can be used to establish a rat model of hypercoagulable state. The best dose of thrombin solution is 10 U/kg in a concentration of 2 U/mL. The best time to collect blood sample is 60 s.

[基金项目] 无锡市医院管理中心科研项目(YGZXM1533)。

[作者简介] 王立文(1968-), 男, 副教授, 研究方向: 外科学。

[通讯作者] 沈晓洁, wxwxsxj@sina.com; 吴倩, wuqianepu2011@163.com

【Key words】 Rat; Hypercoagulable state; Thrombin; Intravenous injection; Femoral vein

Corresponding author: SHEN Xiao-jie, Email: wxwxsxj@sina.com; WU Qian, Email: wuqiancpu2011@163.com.

高凝状态(hypercoagulation state)是指多种因素引起的凝血与抗凝系统失调的病理过程,血液凝固性提高,具有血栓形成的趋势^[1],其特征有血液流变学异常、微循环障碍、血液凝固性升高等^[2]。凝血酶作用于凝血过程的最后环节,不需其他凝血因子参与,使纤维蛋白原向纤维蛋白转化,网状的纤维蛋白中沉积着其他血液成分,形成胶体状态的纤维蛋白凝块,从而形成血栓^[3]。在以往研究中发现,大剂量凝血酶可致家兔血小板计数降低^[4],血小板聚集、纤维蛋白大量生成而形成血液高凝状态,但未见在大鼠上用此复制高凝态的报道。本研究以凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)及全血粘度为评价指标,通过股静脉注射不同剂量的凝血酶,确定最佳剂量及采血样时间,从而建立大鼠血液高凝态模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重(220 ± 20)g,由浙江省实验动物中心提供[SCXK(浙)2014-0001]。所有动物于实验开始一周前开始适应新环境,昼夜明暗交替时间 12 h/12 h,自由饮水取食,温度 20 ~ 26℃,相对湿度 45% ~ 75%。

1.1.2 试剂及主要仪器

凝血酶冻干粉(规格:500 U/瓶,湖南一格制药有限公司,批号 130722-2)。凝血酶溶液配制:凝血酶冻干粉溶于 62.5 mL 生理盐水配制成 8 U/mL 凝血酶溶液;取 8 U/mL 凝血酶溶液 10 mL 加入 10 mL 生理盐水得 4 U/mL 凝血酶溶液,同法配制 2、1、0.5 U/mL 凝血酶溶液。

水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20150303),氯化钠(南京化学试剂一厂,批号:02081625),二水合柠檬酸三钠(南京化学试剂有限公司,批号:1406111286),FIB 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20140103),APTT 试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,批号:118120),PT 试剂盒(上海太阳生物技术有限公司,批号:105272);分析天平(上海民桥精密仪器公司),台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),AYW8003 全自动凝血分析仪(南京瑞麦科技开发有限公司),WZ-50C6 微量注射泵

(浙江史密斯医学仪器有限公司),SA-5600 自动血流变测试仪(北京赛科希德科技发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 凝血酶剂量的确定

大鼠 48 只随机分为 6 组,雌雄各半,麻醉后分离股静脉和颈总动脉插管,股静脉插管通过注射器与微量注射泵相连。将 0.5、1、2、4、8 U/mL 凝血酶溶液分别按 2.5、5、10、20、40 U/kg 剂量通过微量注射泵自股静脉注射入大鼠体内,注射速度为 6 mL/min,生理盐水组大鼠以相同速度注射生理盐水。于注射凝血酶(生理盐水)后 5 min 内自颈总动脉采集血样,置于枸橼酸钠抗凝处理的离心管内制备血浆样品,用于测定 PT、APTT 以及 FIB。

1.2.2 采血时间的确定

大鼠 8 只,雌雄各半,分离股静脉以最佳剂量注射相应浓度凝血酶溶液,于颈总动脉采集血样,采血时间点为注射后 0、10、30、60、120、180、300 s。血样用枸橼酸钠抗凝处理,离心得血浆样品,分别测定 APTT、PT 以及 FIB 指标,确定最佳采血时间点。

1.2.3 高凝态模型建立

大鼠 16 只,雌雄各半,随机分为生理盐水组和凝血酶组,分别于股静脉注射生理盐水和最适浓度凝血酶溶液。于最佳采血时间取血,血样分为两份,分别置于含枸橼酸钠离心管制备血浆样品以及含 EDTA 离心管内制备全血样品。血浆样品用于测定 PT、APTT 及 FIB,全血样品用于血液流变学的测定。

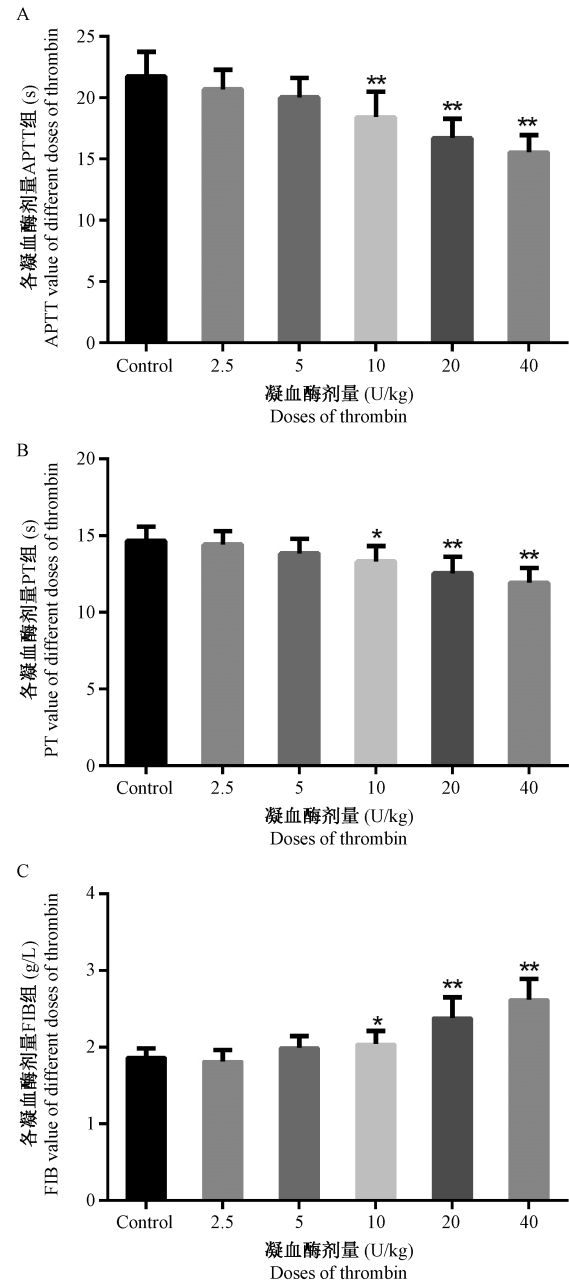
1.3 统计学处理

数据采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 凝血酶剂量

各剂量凝血酶处理后大鼠血浆 APTT、PT、FIB 变化如图 1(A、B、C)所示,随凝血酶剂量升高,APTT、PT 值随之缩短,FIB 含量随之升高,且凝血酶 10、20、40 U/kg 剂量组的 APTT、PT 较生理盐水组显著缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、FIB 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表 1 为注射各剂量凝血酶后大鼠的死亡情况,当凝血酶剂量升至 10 U/kg 时,采血过程中大鼠出现死亡现象,在 20 与 40 U/kg 剂量组死亡率较高。



注:A:APTT;B:PT;C:FIB。同生理盐水组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图1 注射不同剂量凝血酶后大鼠血浆 APTT、PT、FIB 值

Note. A: APTT; B: PT; C: FIB. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Values of plasma APTT, PT and FIB in the rats after injecting different doses of thrombin

表1 注射不同剂量凝血酶后大鼠死亡情况 ($n = 8$)

Tab.1 The death rates of rats after injection of different doses of thrombin

凝血酶剂量/U/kg Dose of thrombin	死亡数/只 Number of dead rats	死亡率/% Death rate
生理盐水 Saline	0	0
2.5	0	0
5	0	0
10	1	12.5
20	3	37.5
40	4	50

2.2 采血时间

图2为注射10 U/kg凝血酶后各时间点大鼠血浆APTT、PT和FIB值,在注射凝血酶后60 s内,APTT、PT逐渐缩短,FIB含量逐渐升高;在60 s后,APTT、PT逐渐延长,FIB含量逐渐降低。且在60 s时APTT、PT值降至最低,FIB含量升至最高。

2.3 模型建立

表2为注射生理盐水及10 U/kg凝血酶后60 s时采血所测得的血浆PT、APTT及FIB结果,表3为全血粘度结果。同生理盐水组相比,凝血酶组PT、APTT降低且均有统计学差异($P < 0.05$),FIB升高、全血粘度增大且亦有统计学差异($P < 0.05$)。

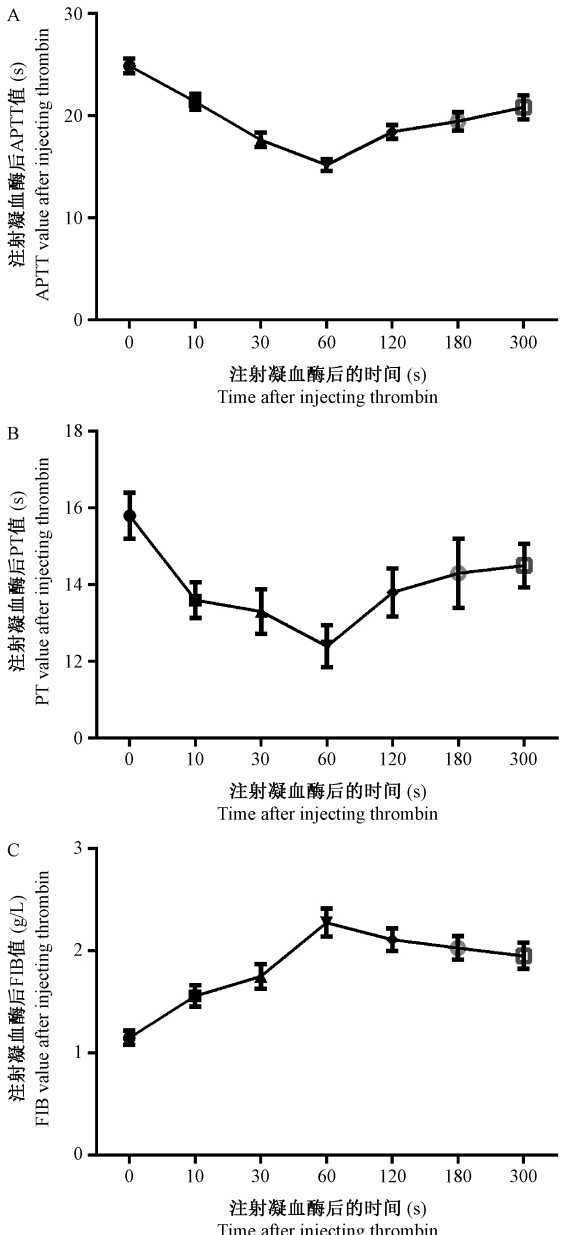


图2 注射10 U/kg凝血酶后各时间点大鼠血浆 APTT(A)、PT(B)、FIB(C)值

Fig. 2 Values of plasma APTT, PT and FIB in the rats at different time points after 10 U/kg thrombin injection

表 2 注射 10 U/kg 凝血酶或生理盐水后大鼠血浆 PT、APTT、FIB($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 2 The values of plasma PT, APTT and FIB in the rats after injection of 10 U/kg thrombin solution and normal saline

组别 Group	PT/s	APTT/s	FIB/g/L
生理盐水组 Control group	15.13 $\pm$ 0.83	24.73 $\pm$ 2.45	1.14 $\pm$ 0.25
凝血酶组 (10 U/kg) Thrombin group	14.07 $\pm$ 0.65 *	17.60 $\pm$ 1.95 **	2.02 $\pm$ 0.14 *

注:与生理盐水组对比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 注射 10 U/kg 凝血酶或生理盐水后大鼠全血粘度($\bar{x} \pm s, n = 8, s$)

Tab. 3 Whole blood viscosity of blood in the rats after injection of 10 U/kg thrombin solution and normal saline

组别 Groups	200	100	30	5
生理盐水组 Control group	5.64 $\pm$ 0.34	6.01 $\pm$ 0.64	7.26 $\pm$ 0.82	15.60 $\pm$ 2.03
凝血酶组 (10U/kg) Thrombin group	5.69 $\pm$ 0.69	7.03 $\pm$ 0.67 **	8.73 $\pm$ 1.27 *	18.53 $\pm$ 1.27 **

注:与生理盐水组对比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

凝血是生理性止血的重要环节,对人体健康和生命至关重要。凝血可以有助于伤口的愈合以及防止过度出血,但在某些病理状态下的凝血则加重疾病风险^[5],与此同时高凝态和血栓常常伴随疾病产生。临床研究发现,在儿童川崎病中,高脂血症既可加重心脏病的发病风险,又会促进血液高凝态的形成^[6];在糖尿病肾病中,血浆 VWF 升高、ADAMTS13 酶水平降低所致的血液高凝状态会加重糖尿病肾病的心血管疾病风险^[7];在肿瘤疾病中,癌症易继发血液高凝态甚至血栓形成,而血小板激活、凝血和纤溶功能紊乱对于肿瘤的生长、分化、血管生成和转移亦有促进作用^[8]。在临床前研究中,建立动物高凝态模型,既有助于筛选抗凝药物以预防血栓疾病及其他疾病的辅助治疗,又有利于对高凝态形成机制的深入研究。

凝血酶(凝血因子 IIa)是一种由基因编码的丝氨酸蛋白酶,它是凝血酶原裂解的产物,通过凝血级联反应抑制血液的流失^[9]。凝血酶作为强效血小板活化物质,通过作用于血小板膜上糖蛋白 IIb α (GPIIb α)及蛋白酶活化受体(PAR)1 和 PAR4 将信号传递给血小板,从而诱导血小板聚集反应^[10]。因此,凝血酶在凝血过程中起着至关重要的作用,它通过激活血小板、促进纤维蛋白原向纤维蛋白的转化过程发挥其促凝作用。过往研究当中发现,大剂量凝血酶可使家兔血小板计数降低^[4]、血小板聚集、纤维蛋白大量生成而促使血液转变为高凝状态,由此提示凝血酶可作为动物高凝态模型的造模工具。

目前高凝态模型如急性血瘀模型、气虚血瘀模型、高脂寒凝模型等^[11],虽能复制高凝态模型,但造模时间较长、对动物损伤极大,动物耐受性差,所以制作方法简单、对动物损伤小的实验模型很有必要。研究发现,快速静脉注射大剂量凝血酶可使血小板计数在 5 min 之内显著降低^[4]。通过注射凝血酶,可以使血小板高度聚集、纤维蛋白原转化为纤维蛋

白,促进血液高凝态的形成,以此构建动物模型。

本研究表明,大鼠股静脉快速注射 10 U/kg 凝血酶后,血液在 60 s 左右时处于高凝状态,其血浆 APTT、PT 显著缩短,FIB 含量显著升高,全血粘度增大。与目前现有的其他模型比较,该方法简单易行,耗时短,较好地复制大鼠高凝状态,可作为研究抗凝药物、高凝态机制的理想模型。

参 考 文 献

- [1] 游莉,冷平,邓富贵. 血栓前状态实验室检查的国内研究现状[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2003, 22(1): 36-38.
- [2] 孙丽清,林玉仙,林信恒. 凝血酶应用于鼻科止血 65 例[J]. 医药导报, 1998, 18(4): 247.
- [3] 李学荣,李荣亨,徐丹. 复元胶囊对气虚血瘀证模型大鼠血液高凝状态的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(1): 140-141.
- [4] Davis RB, Palmer MJ. Thrombocytopenia and release of platelet amines induced by thrombin and bacterial lipopolysaccharide. Observations after infusion of low molecular weight dextran [J]. Br J Exp Pathol, 1965, 46(5): 554-63.
- [5] 史健硕,谭伟强,崔欢,等. 凝血酶受体拮抗剂在抗血栓方面的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2014, 24(2): 129-137.
- [6] Chen X, Zhao ZW, Li L, et al. Hypercoagulation and elevation of blood triglycerides are characteristics of Kawasaki disease [J]. Lipids Health Dis, 2015, 14: 166.
- [7] Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, et al. Hypercoagulability and cardiovascular disease in diabetic nephropathy [J]. Clin Chim Acta. 2013, 415: 279-285.
- [8] Ventura JS, Faria F, Batista IF, et al. A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis [J]. Biomed Pharmacother, 2013, 67: 192-196.
- [9] Sato N, Ichikawa J, Wako M, et al. Thrombin induced by the extrinsic pathway and PAR-1 regulated inflammation at the site of fracture repair [J]. Bone, 2016, 83: 23-34.
- [10] Carrim N, Arthur JF, Hamilton JR, et al. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIIb α [J]. Redox Biol, 2015, 6: 640-647.
- [11] 宋程程,王志斌,苏斌,等. 常用大鼠血瘀证模型的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(2): 94-98.

[收稿日期] 2016-05-30