

Ar⁺ 激光诱导微血栓形成及 阿司匹林作用的研究

王学锋 孙振凤

(上海第二医科大学瑞金医院 上海 200025)

提要 应用氩离子激光建立 Wistar 鼠微动脉、微静脉血栓形成模型, 对不同剂量阿司匹林对血栓形成的影响进行了研究。发现阿司匹林的抗血栓形成作用与所用剂量密切相关, 在超低剂量用药时, 呈现出促进血栓形成的作用。

关键词 氩离子激光, 阿司匹林, 血栓形成

阿司匹林(ASA)在常用剂量(50~500 mg/d)用药时, 呈现出明显的抗血栓形成作用, 被广泛应用于心脑血管血栓性疾病的治疗和预防。然而, 有作者报道了在实验鼠超剂量使用 ASA(10^{-30} mg/kg)时, 出现了相反的作用, 即促进了血栓的形成^[1]。本文利用氩离子激光建立了 Wistar 鼠微血管血栓形成模型, 对不同剂量的 ASA 对血栓形成的影响作了系统研究。

1 材料和方法

1.1 设备

1.1.1 激光发射和观察、记录系统 包括氩离子激光器 (Stabilite 2016, Spectra Physics,

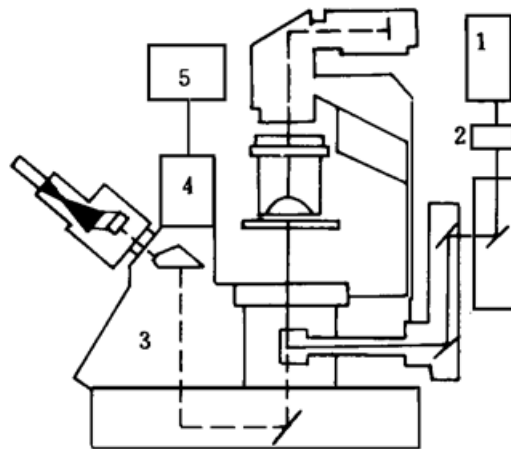


图 1 实验装置模式图

1: Ar⁺ 激光器; 2: 快门; 3: 倒置显微镜; 4: 录像机; 5: 监视器; ——激光束; ——卤素光束

Fig. 1 Scheme of the experimental arrangement

1: Argon laser; 2: obturator; 3: inverted microscope; 4: video camera; 5: monitor; ——laser beam; ——halogen beam

France); 倒置显微镜(Axiovert, Zeiss, Germany); 摄像机(DXL 107, Sony, Japan); 彩色监视器(PVM 1442, QM, Sony, Japan); 磁带录像机(J27, Panasonic, Japan)。

如图 1 所示, 氩离子激光器输出功率为 120 mW, 波长为 514.5 nm, 输出模式为基模, 连续输出的激光由照相机快门控制照射时间为 1/15 s; 激光束在倒置显微镜内聚焦, 光斑直径达 2 μm , 功率密度约为 $3.82 \times 10^6 \text{ W/cm}^2$ 。

1.1.2 血小板聚集仪(Chronolog 500 Vs aggregometer, USA)

用 5 μm ADP 诱导血小板聚集, 观察 1) 血小板聚集潜伏时间, 以秒表示; 2) 最大聚集幅度, 以 Ohms 表示; 3) 聚集速度, 以 Ohms/s 表示。

1.1.3 血红蛋白仪(Cornin 950, USA)

1.1.4 血液凝固仪(ST4, Stago, France)

1.2 实验动物

雄性 Wistar 鼠(200~250 g), 购自中国科学院上海动物中心。

1.3 实验试剂

凝血试验包括活化的部份凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原含量(Fg)试剂及二磷酸腺苷(ADP)均系 Stago 公司产品。

1.4 实验药物

ASA、水杨酸钠为 Boiron Laboratoire 公司产品。

1.5 实验分组

共 12 组, 每组有 10 只 Wistar 鼠。

第 1 组	生理盐水对照	第 7 组	水杨酸钠(100 mg/kg) 组
第 2 组	ASA 100 mg/kg	第 8 组	ASA 1 mg/kg
第 3 组	ASA 10^{-2} mg/kg	第 9 组	ASA 10^{-4} mg/kg
第 4 组	ASA 10^{-6} mg/kg	第 10 组	ASA 10^{-8} mg/kg
第 5 组	ASA 10^{-10} mg/kg	第 11 组	ASA 10^{-18} mg/kg
第 6 组	ASA 10^{-30} mg/kg	第 12 组	ASA 10^{-60} mg/kg

1.6 实验步骤

Wistar 鼠用 250 mg/kg 的硫贲妥钠肌内麻醉后, 进行相应组别的药物注射, 此时定为 T_0 。 $T_0 + 30 \text{ min}$, 进行鼠尾出血时间测定及鼠尾失血量测定, 后者以单位体积蒸馏水中的血红蛋白浓度表示^[2]。随后进行鼠腹部正中解剖, 取出带有肠系膜的小肠襻置于倒置显微镜载物平台上, 选择直径为 15~25 μm 的微动脉及微静脉进行激光照射。观察微动脉及微静脉在激光照射后 10 min 内的变化, 对各种剂量 ASA 作用效果进行研究。观察参数如下: (1) 微动脉或微静脉血栓形成所需的激光刺激数。如果第一次刺激无血栓形成, 同一部位可在首次刺激后的 1 min, 5 min, 8 min 重复以同样的激光强度及时间进行刺激; (2) 从形成血栓上脱落的小血小板栓子的数目; (3) 在 10 min 的观察时间内, 从第一个血栓形成到最后一个血栓脱落的时间——栓塞的持续时间, 以 “min” 表示。每只实验鼠选择四根微血管进行研究, $T_0 + 45 \text{ min}$, $T_0 + 60 \text{ min}$, $T_0 + 90 \text{ min}$ 时分别刺激和观察 3 根微动脉, 在 $T_0 + 75 \text{ min}$ 时刺激和观察微静脉。在 $T_0 + 105 \text{ min}$ 时, 从实验鼠心脏采血, 以 3.8% 枸橼酸钠(1:9, v/v) 抗凝, 全血和乏血小板血浆分别进行血小板聚集^[3]和凝血试验。

2 结 果

2.1 体内研究

2.1.1 ASA 的抗血栓形成效应 表 1 显示 ASA 在 100 mg/kg 时呈现出明显的抗血栓形成效应: 微动脉、微静脉栓子数目及栓塞持续时间均较对照组明显降低 ($P < 0.05$)。

表 1 激光诱导引起的参数变化

Table 1 Change of parameters induced by laser irradiation

Groups	Number of emboli				Duration of embolisation (min)			
	A1	A2	A3	V	A1	A2	A3	V
-	7.37±2.45	7.11±3.76	6.89±2.15	7.11±1.62	3.00±1.20	3.33±2.00	3.00±1.22	2.89±0.78
-	6.60±3.14	7.27±2.41	6.37±1.92	6.80±3.12	3.30±2.26	3.45±2.35	2.87±0.83	3.30±1.57
-	2.90±1.2 ^a	3.9±3.6 ^a	2.0±1.2 ^a	2.7±2.3 ^a	1.4±0.5 ^a	1.9±2.2	1.2±0.4 ^a	1.9±1.7
-	8.73±2.00	6.18±1.99	6.78±2.39	7.64±2.25	3.91±1.22	2.55±0.92	3.00±1.66	3.45±1.57
=	7.20±3.39	6.44±2.92	6.80±2.70	7.20±2.04	3.40±2.41	3.00±2.29	2.90±1.45	3.30±1.42
-	9.38±3.78	11.12±5.4	8.25±4.06	8.14±3.44	4.00±1.77	5.50±3.16	4.12±2.53	3.29±1.38
-	7.67±1.66	7.20±2.35	8.63±3.25	7.67±3.04	3.33±0.87	3.20±1.55	4.00±2.07	3.22±1.39
-	7.67±3.16	7.33±3.28	7.89±2.71	7.89±2.47	3.37±1.19	3.44±1.51	3.67±1.50	3.22±1.39
+	9.45±2.62	9.90±3.51	9.67±3.20	8.33±3.24	4.00±1.48	4.30±2.16	4.00±1.80	3.89±1.69
+	10.6±3.2 ^b	8.75±3.45	12.8±3.6 ^b	9.9±2.50 ^b	4.43±1.90	3.87±2.17	5.4±1.6 ^b	4.75±1.04
+	17.3±5.4 ^b	16.4±3.7 ^b	16.1±1.2 ^b	13.7±1.7 ^b	6.9±1.7 ^b	7.00±2.2 ^b	7.1±1.4 ^b	6.00±1.4 ^b
-	11.9±2.4 ^b	9.83±1.2 ^b	11.0±3.4 ^b	8.86±2.61 ^b	4.7±0.8 ^b	4.2±0.8 ^b	5.0±1.9 ^b	3.9±1.4 ^b

a: Diminution $P < 0.05$; b: Augmentation $P < 0.05$.

2.1.2 ASA 的促进血栓形成效应 表 1 显示超低剂量的 ASA (10^{-18} mg/kg, 10^{-30} mg/kg, 10^{-60} mg/kg) 呈现出明显的促进血栓形成效应: 微动脉、微静脉栓子数目及栓子持续时间较对照组明显升高 ($P < 0.05$)。这种变化在 10^{-30} mg/kg 时最明显。ASA 的这种作用在微动脉比微静脉更显著。各剂量组微动脉或微静脉血栓形成所需要的激光刺激数与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 生物学效应的研究

2.2.1 ASA 诱导鼠尾出血时间测定(图 2) ASA 100 mg/kg 和 1 mg/kg 明显延长了鼠尾出血时间, 与对照组相比, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2.2 鼠尾失血量测定(图 3) 由 ASA 诱导的失血量增加, 与对照组相比仅见 ASA 100 mg/kg 组有显著性差异 ($P < 0.05$), 其它组虽有升高趋势, 但差异无统计学意义。

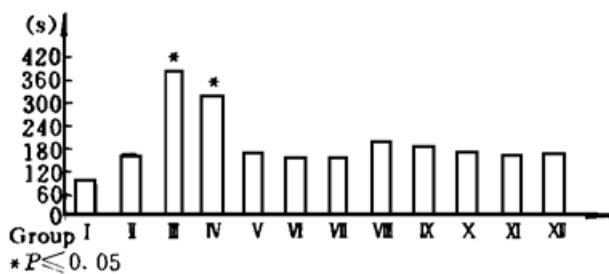


图 2 ASA 对出血时间的影响

Fig. 2 Effect of aspirin on induced hemorrhagic time

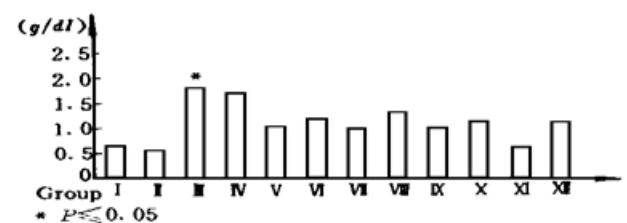


图 3 ASA 对失血量的影响

Fig. 3 Effect of aspirin on lost hemoglobin level

2.2.3 血小板聚集试验(图 4, 5) ASA 100 mg/kg 组和水杨酸钠组均使血小板聚集试验的

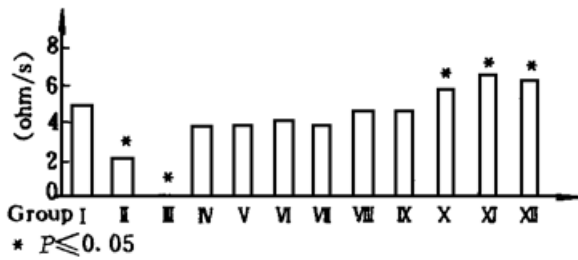


图4 ASA对血小板聚集振幅的影响

Fig. 4 Effect of aspirin on the platelet aggregation amplitude

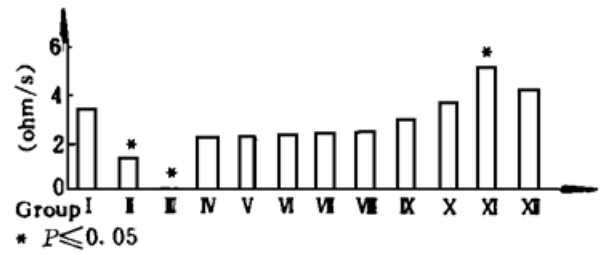


图5 ASA对血小板聚集速率的影响

Fig. 5 Effect of aspirin on the platelet aggregation velocity

振幅和聚集速度降低,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),其中ASA 100 mg/kg组变化更明显,在超低剂量使用ASA (10^{-18} , 10^{-30} , 10^{-60} (mg/kg))时,上述作用发生逆转,表现为血小板聚集试验的振幅和聚集速度增高,与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$)。血小板聚集的潜伏时间各组间无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2.4 凝血试验 APTT、PT、TT、Fg 各组无显著性差异。

3 讨 论

由于激光束与倒置显微镜的卤素光束在同一轴线上,运用显微摄像和观察记录系统,可以对氩离子激光刺激血管损伤所引起的Wistar鼠活体内微动脉、微静脉血栓形成进行连续的观察和记录。由于激光的单色性极佳,能量集中,与血管壁的接触时间短(1/15 s),光束纤细(2 μm),每次可以造成1~2个内皮细胞损伤,在短时间内可重复进行刺激,已被不同学者应用于微血栓模型的建立^[4,5]。

目前,国际上应用激光制造动物微血栓模型主要有Ar⁺激光及He-Ne激光。前者主要的特点在于其波长为514.5 nm,恰与血红蛋白的波长相吻合,激光放出的能量被血红蛋白吸收,加之激光照射后使内皮细胞脱落,内皮下胶原成份暴露,触发血液凝固及血小板聚集反应,导致血栓形成;而He-Ne激光(波长632.8 nm)制造微血栓模型的原理主要靠在血管内注射染料(如伊文氏蓝)后,染料与白蛋白结合,前者将激光的能量转换为热能,通过“微灼热体”效应损伤血管内皮细胞、血小板和红细胞,后者破坏释放ADP诱导血小板聚集并粘附于血管内膜导致血栓形成。

ASA长期以来一直被作为抑制血小板功能药物而在临床广泛应用^[6-8],本文的结果显示在较大剂量时(100 mg/kg),ASA呈现出显著的抗血栓形成作用,表现为血小板聚集反应抑制,鼠尾出血时间延长和失血量增多,诱导血栓形成所需的激光刺激数增多,血栓形成数目减少,血栓阻塞时间缩短等。而在超低剂量使用ASA时,这种作用被完全逆转。一般认为,常规剂量的ASA的药理学机制是不可逆地乙酰化了血小板的环氧化酶,使花生四烯酸(AA)不能被转化为血栓烷A₂(TXA₂),对内皮细胞环氧化酶的乙酰化过程结果是使前列环素(PGI₂)合成受阻。本文水杨酸钠组,因该药物缺少乙酰基团,故对血小板和血管内皮细胞的TXA₂,PGI₂合成几乎没有作用。超低剂量使用ASA时(10^{-18} , 10^{-30} , 10^{-60} (mg/kg))其促进血栓形成作用被认为是ASA在这种浓度时,抑制了血管内皮细胞的环氧化酶,而血小板内的环氧化酶没有受影响,从而使TXA₂与PGI₂的平衡失调,血栓易于形成^[9]。以往的研究证实,体外培养

的血管片段可以释放出 PGI₂, 达到一定浓度量可以抑制血小板聚集, 而超低剂量的 ASA 可以使这种作用逆转^[9]。另一方面, 对体外培养的血管片段的研究还发现, ASA 超低浓度时, 培养基中的血管性血友病因子(vWF), 纤溶酶原激活剂抑制物(PAI) 水平升高, 这也有利于血栓形成; 此外, 有作者认为, 超低剂量的 ASA 对红细胞、白细胞的作用也不可忽视, 药物可以使这些细胞的变形性、粘附能力和与内皮细胞的反应特性改变; 红细胞在超低浓度的 ASA 作用下, 可以引起脆性改变, 导致释放促血小板聚集物质 ADP, 同样有利于血栓形成^[1]。

参 考 文 献

- 1 Dautrempuich C., Aguejof O., Pintigny D. *et al.*. Thrombogenic properties of ultra low dose of acetylsalicylic acid in a vessel model of laser-induced thrombus formation. *Thromb. Res.*, 1994, **76**(2) : 225~ 229
- 2 DeJwa E.. Bleeding time in laboratory animals. Do tail bleeding in rats only measure a platelet defect? *Thromb. Res.*, 1979, **15** : 199~ 207
- 3 Cardinal D., Flower R.. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J. Pharmacological Methods*, 1980, 135~ 138
- 4 Yamashita T., Matsuoka A., Funatsu A. *et al.*. The antithrombotic effect of human activated protein C on He-Ne laser-induced thrombosis in rat mesenteric microvessels. *Thromb. Res.*, 1994, **75**(1) : 33~ 40
- 5 Dautrempuich F., Aguejof O., Azougagh Oualane F. *et al.*. Prevention of laser arterial thrombus formation with unfractionated heparin. *Haemostasis*, 1993, **23** : 244~ 248
- 6 Lewis H., Davis J., Archibald D. *et al.*. Protective effects of aspirin against myocardial infarction and death in men with unstable angina: results of veteran administration cooperative study. *N. Engl. J. Med.*, 1983, **309** : 396~ 403
- 7 Fields W. S.. Aspirin for prevention of stroke: a review. *Am. J. Med.*, 1983, **14** : 61~ 65
- 8 Bucianan M. R., Hirsh J.. Effect of aspirin on haemostasis and thrombosis. *New. Engl. Allergy. Proc.*, 1986, **7** : 26~ 32
- 9 Lalanne M. C., Ramboer I., De Seze O. *et al.*. In vitro platelets/endothelial cells interactions in presence of acetylsalicylic acid at various dosages. *Thromb. Res.*, 1992, **65** : 33~ 43

Establishment of Argon Laser Induced Micro-thrombotic Model and Study on Aspirin's Effects

Wang Xuefeng Sun Zhengfeng

(Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025)

Abstract This paper reports the establishment of a microvessels' thrombotic model of Wistar rats and studies of the different doses of aspirin in the action on thrombosis using an argon laser. We found that the anti-thrombotic action of aspirin was closely related to the doses which were used. However, the prothrombotic action of aspirin was observed in the ultra-low-dose.

Key words Argon laser, Aspirin, thrombosis