

• 论著 •

动脉微栓塞中纤维蛋白成分的组织病理分析

朱海燕 沈洪 刘育英 张维 赵秀梅

【摘要】 目的 观察动脉微栓塞中的纤维蛋白成分,为纤溶治疗微栓塞提供理论依据。方法 取体重(180±10)g的成年雄性SD大鼠30只,按照随机数字表法将动物分为正常对照组及微栓塞形成后5、30、60和90 min组。以大鼠提睾肌动脉为靶血管,先用光化学法造成大血栓,再用葡激酶溶栓,造成微栓塞。用免疫组化法检测动脉微栓塞中纤维蛋白溶解标志物组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制剂(PAI)的阳性指数。结果 微栓塞 Masson 染色病理组织切片上能见到动脉微栓塞中团块状均质、绿染的纤维蛋白结构。同时,免疫组化切片上可见 t-PA、PAI。5、30、60 和 90 min 组 t-PA 免疫组化阳性指数逐渐减少(P 均 <0.01), PAI 免疫组化阳性指数逐渐增多(P 均 <0.01)。结论 纤维蛋白是动脉微栓塞的重要组成部分。随着动脉微栓塞时间的延长,纤维蛋白含量增加。

【关键词】 纤维蛋白; 动脉; 微栓塞

Histopathology analysis of microemboli after thrombolysis ZHU Hai-yan*, SHEN Hong, LIU Yu-ying, ZHANG Wei, ZHAO Xiu-mei. * Emergency Department, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To observe the changes in fibrin of microemboli in micro-embolism soon after thrombolysis, in order to provide a theoretical basis for microthrombolytic therapy. **Methods** Thirty adult male SD rats weighing (180±10)g were randomized into five groups: 5, 30, 60 and 90 minutes groups after microthrombolization and the control group. Rat cremasteric artery was embolized with photochemical method, and microthromboli were produced after thrombolysis by staphylokinase. The levels of tissue plasminogen activator (t-PA) and tissue plasminogen activator inhibitor (PAI) were immunohistochemically determined, and taken as the markers of fibrin dissolution. **Results** Fibrin was observed in pathologic sections as well as fibrinolytic markers t-PA and PAI in immunohistochemical sections. The levels of t-PA were found to be reduced while that of PAI increased gradually with passage of time. **Conclusion** Fibrin is one of the main constituents of microthromboli soon after thrombolysis. The content of fibrous emboli increases after microembolization with the passage of time. Thrombolysis plays an important role in the treatment of "no reflow phenomenon".

【Key words】 fibrin; artery; microemboli

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)、溶栓等血管重建方法在临床上广泛应用,使得大血管开通后形成大量的微栓子,不同程度堵塞下游组织的微血管,造成微栓塞,导致无复流现象,影响了疗效。组织水平的成功再灌注才是血管重建术成功的金指标。为寻求改善微循环,提高缺血患者组织再灌注水平的有效方法,人们对微栓塞的成分进行了许多有益的研究。但以往对微栓子成分的研究多局限于尸检结果,研究结果也仅局限于血小板。纤维蛋白是否为动脉微栓塞的主要成分,纤溶治疗是否能改善微栓塞,都是待解决的问题。本实验中研究了动脉微栓塞中的纤维蛋白成分,以期证实纤维蛋白作为动脉微栓塞

的重要组成部分参与了溶栓后即刻(<90 min)微血栓的形成,为纤溶治疗动脉微栓塞提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:30只成年雄性SD大鼠,平均体重(180±10)g,由解放军总医院动物实验中心提供。

1.2 实验仪器与试剂:Olympus BH-2显微镜(日本Olympus公司生产),落射荧光光源及适配器(日本Olympus公司生产),CCD彩色显微摄像和录像系统(日本JVC公司生产),WMK-04恒温浴器(河北省黄骅仪表厂生产),PC-1微量输液泵(美国IMED公司生产),均由解放军总医院病理生理实验室提供。重组葡激酶粉针剂每支5 mg(中国科学院上海植物生理研究所研制),血卟啉注射液(psd-007)1 g/L(上海张江生物有限公司生产);兔抗鼠多克隆抗体(多抗)组织型纤溶酶原激活物(t-PA, BA1366)、兔抗鼠多抗纤溶酶原激活物抑制剂(PAI, BA1334)、即用型链霉素亲和素生物素复合物-碱性磷酸酶(SABC-AP, SA1055)免疫组

基金项目:国家高技术研究发展“863”计划基金资助项目(2004AAZ3A60)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科(朱海燕,沈洪),病理生理实验室(刘育英,赵秀梅),总后门诊部(张维)

作者简介:朱海燕(1977-),女(汉族),江西赣州人,医学硕士,主治医师(Email: zhuhy301@163.com)。

化试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 动物模型制备:经颈静脉置管,以 0.5 ml/h 速度输注生理盐水维持静脉通道,分离提睾肌固定于恒温浴器观察盒上,选择直而清晰的主干动脉为靶血管,自尾静脉注射血卟啉注射液 0.001 ml/g,遮蔽靶血管伴行静脉,2~5 min 后用落射荧光显微镜 100 W 汞灯光源经紫外滤光片(波长 455 μm)照射靶血管 5~10 min,造成靶血管的完全血栓栓塞(用显微镜摄像系统可观察全过程)。大栓塞稳定 5 min 后,从颈静脉注射葡激酶 1 mg/kg 溶栓,以微量泵控制总液量为 3 ml,前 1/3 量于 5 min 内输入,后 2/3 量于 25 min 内输入。血栓溶解后,大栓子脱落造成下游微血管(30~150 μm)栓塞,微栓塞形成后 5、30、60 和 90 min 分别切除提睾肌组织,于体积分数为 15% 的甲醛中固定,以备病理和免疫组化观察用,最后用放血法处死大鼠。整个血栓形成及溶栓过程均在显微镜摄像系统显示屏上观察并记录。

1.4 实验分组:按照随机数字表法将动物分成正常对照组及微栓塞形成后 5、30、60 和 90 min 组,每组 6 只。

1.5 观察指标

1.5.1 病理:实验后取提睾肌组织,于 15% 甲醛溶液中固定,Masson 染色,寻找纤维蛋白微栓子。丽春红酸性品红液染肌肉纤维,亮绿液染胶原纤维。

1.5.2 免疫组化染色及图像分析:采用卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC),按照试剂说明进行免疫组化染色,以 t-PA、PAI 为一抗,以磷酸盐缓冲液(PBS)取代一抗作空白对照。在 MIAS-300 图像分析系统上分别测定一定面积中的阳性信号面积和阳性信号平均灰度值,每只动物测 4 个高倍视野,计算免疫组化阳性指数(positive index, PI)^[1]。

$PI = \text{阳性信号面积} \times \text{阳性信号平均灰度值} / \text{测定面积}$

1.6 统计学方法:病理和免疫组化结果用组织切片表示。用 STATA 7.0 统计软件包进行分析。计量资料采用均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,免疫组化 PI 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

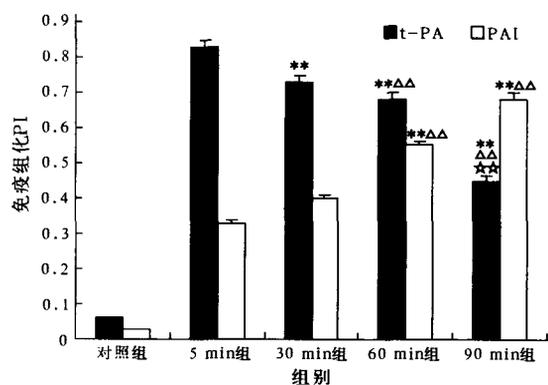
2 结果

2.1 病理组织切片:微栓塞形成后 30 min, Masson 染色动脉微栓塞内,可以见到团块状均质、绿染的纤维蛋白结构,其周边散在红色颗粒状沉积的红细胞(彩色插页图 1)。

2.2 动脉微栓塞中纤维蛋白溶解的标志物 PAI 和 t-PA 的免疫组化切片及 PI

2.2.1 免疫组化切片:正常微血管内仅有少量的 PAI 和 t-PA 表达。当微栓子形成后 5 min, PAI 和 t-PA 表达增多(切片上为棕黄色区域,外周为淡蓝色肌肉);30、60 和 90 min 时微栓子 t-PA 含量逐渐减少, PAI 含量逐渐增多(彩色插页图 2~5)。

2.2.2 免疫组化 PI(图 6):PAI 的免疫组化 PI 随时间延长而逐渐上升,组间比较差异均有显著性(P 均 < 0.01)。t-PA 免疫组化 PI 随时间延长显著性下降,组间比较差异均有显著性(P 均 < 0.01)。



注:与 5 min 组比较: ** $P < 0.01$; 与 30 min 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 60 min 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

图 6 t-PA 与 PAI 免疫组化 PI 的变化趋势

Figure 6 Immunohistochemical PI trends of t-PA and PAI

3 讨论

3.1 纤维蛋白与 t-PA、PAI:t-PA 和 PAI 是纤维蛋白溶解系统激活的标志物。血栓形成、凝血系统的终产物纤维蛋白增多时, t-PA 与血栓中的纤维蛋白特异性结合, 激活纤溶酶原, 使纤维蛋白降解。而 PAI 选择性地抑制 t-PA 活性, 使凝血系统和纤溶系统在新水平上建立平衡。Sakata 等^[2]报道, PAI 在心绞痛、急性心肌梗死(AMI)时明显升高, 且两者比较差异有显著性。唐其柱等^[3]指出, 不稳定型心绞痛患者 PAI 显著增多, t-PA 减少, 60%~70% 冠状动脉内可发现微血栓。从这个意义上说, PAI 和 t-PA 可以间接反映机体纤维蛋白的变化, 是机体血栓前状态的良好标志物。

3.2 纤维蛋白与微栓塞:Moore 等^[4]通过尸检发现, 心脏性猝死、脑血管意外等因缺血事件而死亡的患者微循环中出现大量血小板、纤维蛋白血栓, 即刻血栓为血小板血栓。大型临床试验荟萃研究也证实: 血小板 II b/III a 受体拮抗剂能改善微循环, 减少无复流现象^[5]。但纤维蛋白是否为即刻血栓的有效成分, 至今相关研究甚少。所谓即刻血栓是指 180 min 内形成的血栓, 也就是在溶栓时间窗内的血栓。本实

验发现,大血栓溶解后 30 min,其下游微循环中出现微栓塞,随时间延长,微栓子数目增多。本实验中观察的 5、30、60 和 90 min 微栓塞模型 Masson 染色病理组织切片上,微动脉栓子中含大量均质、绿染的纤维蛋白结构。免疫组化切片上可见纤维蛋白溶解标志物 t-PA 和 PAI。5~90 min t-PA 含量呈逐渐减少,PAI 含量逐渐增加。由此推断,纤维蛋白是即刻微血栓的有效成分。随着微栓塞时间的延长,纤维蛋白含量增多。纤维蛋白参与微栓塞的机制为血栓形成要经历富含血小板的白血栓阶段和富含纤维蛋白的红血栓阶段,红、白血栓的比例主要与血管壁状态、血流动力学状态紧密相关。一般来说,血流缓慢处纤维蛋白容易聚集并网罗红细胞,形成红血栓。微栓塞时,微循环血流淤滞,有利于纤维蛋白的聚合、沉积。在微栓塞形成后 90 min 内,微循环血流障碍渐趋严重,不仅原发性纤维蛋白栓子增多,而且部分血小板栓子也可能转化为纤维蛋白栓子。Frink 等^[6]研究结果也与之相符,经尸检 24 例死于 AMI 的患者发现,因 AMI 而突然死亡的患者中有很多纤维蛋白和血小板微血栓,其中纤维蛋白数量居多。

3.3 纤溶治疗与微栓塞:基于对微栓子成分的研究,我们可以推断,对患有缺血性疾病的患者,在溶栓时间窗内使用纤维蛋白溶解剂,不仅能改善大血管水平的灌注,也能改善微循环水平的灌注,从而在根本上改善组织水平的灌注。这也为易化 PCI 提供了理论依据。至此,我们不妨把对血小板 II b/III a 受体拮抗剂治疗微栓塞的热情部分转移到纤溶治疗上。首先,纤维蛋白溶解剂能溶解血栓外围的纤维蛋白成分,使得血栓核心部分的血小板暴露,进而充分发挥抗血小板药物的作用。其次,血小板 II b/III a 受体拮抗剂价格昂贵,单独使用疗效欠佳。而纤维蛋白溶解剂价格相对低廉,两者结合使用,既节省了医疗费用,又提高了治疗效果,能够在更大程度上减少微栓子,改善微循环,提高机体组织水平的灌注。但必须指出,纤溶药物本身有强大的促凝作用,大剂量使用会激活血小板及凝血因子,加重血栓,即所谓的促血栓形成作用。所以寻找最佳纤溶治疗方案势在必行。TIMI14 实验得出的结论是半量 t-PA+阿昔单抗克隆抗体(单抗)的再通效果优于全量 t-PA^[7]。SPEED 实验同样发现:半量 t-PA+阿昔单抗可获得更满意的冠脉造影血管再通率,降低死亡、梗死和急诊血管重建等终点发生率(半量 t-PA+阿昔单抗为 6.1%,全量 t-PA 为 11.0%)^[8]。GUSTO-4 实验也提出了小剂量溶栓药加血小板 II b/III a 受体

拮抗剂的优化方案^[9]。第 23 届欧洲心脏病年会公布了 ASSENT 3 的实验结果:全量瑞替普酶(TNK) t-PA+肝素组、全量 TNK t-PA+依诺肝素组和半量 TNK t-PA+阿昔单抗+减量依诺肝素组的主要终点发生率分别为 14.5%、11.4%和 11.0% (P 均 <0.01),进而强调了小剂量纤溶剂与抗凝、抗血小板药物、PCI 治疗相结合的方案,为今后缺血事件的治疗指明了方向^[10]。

总之,纤维蛋白作为微栓子的有效成分,参与了溶栓后即刻微血栓的形成。早期使用纤维蛋白溶解剂不仅在大血栓的开通上,而且在微循环水平将继续发挥其战略性的抗血栓作用。

参考文献:

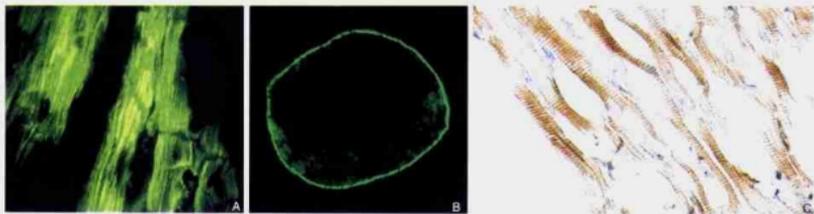
- Rath M, Niendorf A, Reblin T, et al. Detection and quantification of lipoprotein (a) in the arterial wall of 107 coronary bypass patients[J]. *Arteriosclerosis*, 1989, 9: 579-592.
- Sakata K, Miura F, Sugino H, et al. Impaired fibrinolysis early after percutaneous transluminal coronary angioplasty is associated with restenosis[J]. *Am Heart J*, 1996, 131: 1-6.
- 唐其柱, 李庚山, 唐从新, 等. 不稳定性心绞痛患者血小板功能和纤溶活性的改变[J]. *中国急救医学*, 1995, 15: 15-17.
- Moore S, Belbeck L W, Evans G, et al. Effects of complete or partial occlusion of a coronary artery[J]. *Lab Invest*, 1981, 44: 151-157.
- de Lemos J A, Antman E M, Gibson C M, et al. Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction, observations from the TIMI 14 trial[J]. *Circulation*, 2000, 101: 239-243.
- Frink R J, Rooney P A Jr, Trowbridge J O, et al. Coronary thrombosis and platelet/fibrin microemboli in death associated with acute myocardial infarction[J]. *Br Heart J*, 1988, 59: 196-200.
- Antman E M, Giugliano R P, Gibson C M, et al. Abciximab facilitates the rate and extent of thrombolysis, results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 14 trial, the TIMI14 investigators[J]. *Circulation*, 1999, 99: 2702-2732.
- Strategies for Patency Enhancement in the Emergency Department (SPEED) group. Trial of abciximab with and without low-dose reteplase for acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2000, 101: 2788-2794.
- Herrmann H C, Moliterno D J, Ohman E M, et al. Facilitation of early percutaneous coronary intervention after reteplase with or without abciximab in acute myocardial infarction; results from the SPEED(GUSTO-4 Pilot) trial[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36: 1489-1496.
- Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic Regimen (ASSENT) - 3 Investigators. Efficacy and safety of tenecteplase in combination with enoxaparin, abciximab, or unfractionated heparin; the ASSENT-3 randomised trial in acute myocardial infarction[J]. *Lancet*, 2001, 358: 605-613.

(收稿日期: 2005-07-30 修回日期: 2006-03-23)

(本文编辑: 李银平)

结扎大鼠冠状动脉诱发心肌及背根神经节内P物质变化的研究

(正文见201页)



A: 心肌以免疫荧光染色; B: 心外膜血管内皮免疫荧光染色; C: 免疫组化染色

图1 CAO 3 h组心肌组织内P物质的表达 (×400)

Figure 1 Expression of substance P in myocardium 3 hours after CAO (×400)

动脉微栓塞中纤维蛋白成分的组织病理分析

(正文见216页)

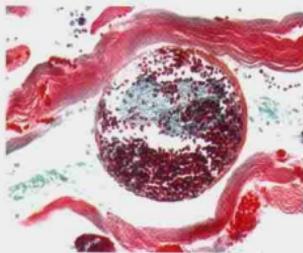


图1 微栓塞形成后30 min动脉微栓塞病理学变化 (Masson, ×400)

Figure 1 Pathological changes of artery microemboli 30 minutes after microemboli formation (Masson, ×400)



图2 正常微血管内t-PA少量表达 (免疫组化, ×400)

Figure 2 Few expression of t-PA in normal microvessel (immunohistochemistry, ×400)

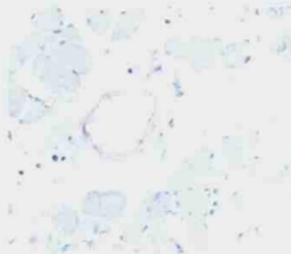


图3 正常微血管内PAI少量表达 (免疫组化, ×400)

Figure 3 Few expression of PAI in normal microvessel (immunohistochemistry, ×400)

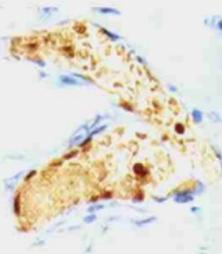


图4 动脉微栓塞60 min微血管t-PA表达 (免疫组化, ×400)

Figure 4 Expression of t-PA in microvessel 60 minutes after artery microemboli formation (immunohistochemistry, ×400)

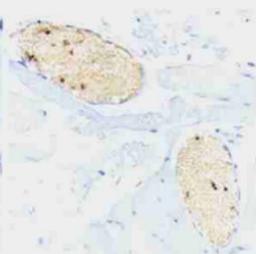


图5 动脉微栓塞90 min微血管PAI表达 (免疫组化, ×400)

Figure 5 Expression of PAI in microvessel 90 minutes after artery microemboli formation (immunohistochemistry, ×400)