

- dexmedetomidine in critically injured intubated pediatric burned patients: a preliminary study[J]. *Journal of Burn Care & Research*, 2013, 34(3): 311-317
- 8 Yildiz M, Tavlan A, Tuncer S, *et al.* Effect of dexmedetomidine on haemodynamic responses to laryngoscopy and intubation[J]. *Drugs in R & D*, 2006, 7(1): 43-52
- 9 Kurnik D, Muszkat M, Sofowora GG, *et al.* Ethnic and genetic determinants of cardiovascular response to the selective α_2 -adrenoceptor agonist dexmedetomidine[J]. *Hypertension*, 2008, 51(2): 406-411
- 10 沈国容, 陈莺, 赵志斌. 右美托咪定对预防全身麻醉气管插管反应的影响[J]. *中国全科医学*, 2012, 33: 3870-3871
- 11 夏昌兴. 右美托咪定对高血压患者全麻气管插管反应的临床观察[J]. *实用药物与临床*, 2013, 16(9): 801-803
- 12 Grant SA, Breslin DS, MacLeod DB, *et al.* Dexmedetomidine infusion for sedation during fiberoptic intubation: a report of three cases[J]. *Journal of Clinical Anesthesia*, 2004, 16(2): 124-126
- 13 吴新民, 王天龙, 薛张纲, 等. 右美托咪定临床应用指导意见(2013)[J]. *中华麻醉学杂志*, 2013, 33(10): 1165-1167
- (收稿日期:2015-01-12)
- (修回日期:2015-05-25)

绝经对大鼠血栓前状态的影响

高 辉 奚 水 徐 苓

摘 要 **目的** 通过去势建立绝经大鼠模型,观察绝经对大鼠血栓前状态的影响。**方法** 将 32 只 9~10 月龄的健康雌性 SD 大鼠随机分成 4 组,每组 8 只。实验组手术去势,对照组行假手术,分别于术后 1 周或 10 周处死。采用凝血酶比浊法检测各组大鼠血浆纤维蛋白原(FIB)含量;采用发射底物法检测抗凝血酶Ⅲ(ATⅢ)活性;采用 ELISA 双抗体夹心法检测纤溶酶原激活剂抑制剂(PAI-1)、D-二聚体(D-D)、血管性假血友病因子(vWF)含量;采用硝酸还原酶法检测 NO 含量;采用放射性核素放射免疫法检测血浆血栓素 A_2 (TXA₂)、前列环素(PGI₂)含量。**结果** 在绝经早期,血浆 FIB 含量明显升高,血浆 ATⅢ活性无明显变化;血浆 PAI-1 含量呈升高趋势;血浆 vWF 含量显著升高,同时血浆 NO 含量显著下降;随着绝经时间延长,到绝经晚期,与对照组相比,PAI-1 含量显著增加,而血浆 FIB 含量有所回落,血浆 ATⅢ活性显著升高;血浆 vWF 含量仍保持在较高水平,但血浆 NO 含量有所回升。在绝经早期及绝经晚期,血浆 TXA₂ 和 PGI₂ 同步升高,D-D 含量各组间均无明显变化。**结论** 在血栓形成的不同环节,绝经事件发挥了不同的影响,导致绝经早期血栓形成风险增加;随着绝经时间延长,各相关参数达成新的平衡,血栓风险回落。

关键词 血栓前状态 绝经 去势大鼠

中图分类号 R71

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.025

Effects of Menopause on Prothrombotic State in Ovariectomized Rats. Gao Hui, Xi Shui, Xu Ling. *Department of Obstetrics & Gynecology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China*

Abstract **Objective** To observe the effects of menopause on prothrombotic profiles in ovariectomized rats. **Methods** Thirty two healthy female SD rats of 9 to 10 months were divided into 4 groups, the control shamed and the observation groups ovariectomized. Rats in the baseline group and the early menopause group were sacrificed one week later, and the control and late menopause group 10 weeks later. The prothrombotic profiles were detected including plasma FIB, ATⅢ activity, PAI-1 levels, D-D level, vWF levels and NO concentration, TXA₂ and PGI₂ levels. **Results** In early menopause, plasma FIB increased dramatically while ATⅢ activity remained little changed. PAI-1 demonstrated an increasing trend. vWF significantly increased but NO significantly decreased. In later menopausal stage, PAI-1 increased dramatically but FIB somewhat decreased. Plasma ATⅢ activity significantly increased and vWF still remained a high level. NO increased a little. In both early and later stage, TXA₂ and PGI₂ simultaneously increased while D-D showed little change between groups. **Conclusion** Menopause plays different roles in different aspects of thromboembolism, resulting in increased risk in early menopause due to prothrombotic state and decreased risk in later menopause when new balances between profiles were established.

Key words Prothrombotic state; Menopause; Ovariectomized rats

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京天坛医院妇产科(高辉);100037 北京,解放军总医院妇产科(奚水);100730 北京,中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院妇产科(徐苓)(注:高辉和奚水为共同第一作者)

通讯作者:徐苓,电子信箱:xuling@pumch.cn

随着现代医学的发展及人类寿命的延长,女性有1/3的时间在绝经期度过。绝经后卵巢功能衰退,雌激素水平低下。雌激素受体广泛分布于大脑、心血管、骨骼、皮肤、泌尿生殖系统等。因此,绝经后长期低雌激素状态导致一系列衰退性改变及躯体疾病。研究显示,增龄可以改变凝血、抗凝及纤溶系统,影响血管内皮及血小板功能,导致血栓形成风险增加^[1,2]。绝经后妇女同时受年龄增长和雌激素水平下降两大因素影响,绝经事件本身是否会导致血栓前状态,目前还有争议。本研究拟通过手术去势建立绝经大鼠模型,观察绝经对凝血、抗凝、纤溶系统及血管内皮功能、血管舒缩功能的影响。

资料与方法

1. 研究对象:9~10月龄的健康雌性SD大鼠(SPF级)32只,平均体重 370 ± 34 g,饲养于北京协和医院动物中心啮齿类屏障环境(24~28℃,通风良好,湿度60%~80%,自由摄食、水),通过阴道细胞形态判断大鼠动情周期存在。1周后行双侧卵巢切除术,假手术组仅切开腹壁后缝合。术后3天起行阴道细胞学检查,确认去势成功,绝经模型建立。

2. 方法:(1)分组:所有大鼠随机分为4组,每组8只。第1、2组为假手术组:第1组(基线组)假手术1周后处死,第2组(对照组)假手术10周后处死;第3、4组为手术去势组:第3组(绝经早期组)去势1周后处死,第4组(绝经晚期组)去势10周后处死;(2)采集血标本:处死前12h禁食不禁水,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40mg/kg),0.109mol/L枸橼酸钠抗凝,用颈动脉插管法采集血标本。血标本于4℃放置4h后3000r/min离心15min,吸取上清液(血浆),分装成数小管,标记后置于中心实验室-70℃冰箱保存,统一检测。(3)血液生化指标检测:血浆FIB含量采用Clauss法(凝血酶比浊法),血浆ATⅢ活性采用发射底物法,血浆PAI-1含量、D-D含量、vWF抗原含量采用酶联免疫吸附双抗体夹心法,血浆NO含量采用硝酸还原酶法。TXA₂、PGI₂采用放射性核素放射免疫法测定。TXA₂半衰期短难以直接测定,采用平衡法测定其无活性代谢产物TXB₂作为判断浓度的指标。PGI₂极不稳定,采用非平衡法测定其代谢产物6-酮-前列腺素F_{1α}(6-Keto-PGF_{1α})作为判断浓度的指标。

3. 统计学方法:采用SPSS 11.5软件进行统计学分析。各检测数据采用单因素方差分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血浆FIB含量:绝经后血浆FIB含量呈升高趋势。与基线组相比,绝经早期组血浆FIB含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。绝经晚期组与基线组、对照组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2. 血浆ATⅢ活性:绝经后ATⅢ活性升高。绝经晚期组血浆ATⅢ活性显著高于基线组和对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);绝经早期组与基线组和对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3. 血浆PAI-1含量:随着绝经时间延长,血浆PAI-1含量显著升高。绝经晚期组与基线组和对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$);与绝经早期组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。绝经早期组血浆PAI-1含量亦有所升高,但与基线组和对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4. 血浆D-D含量:各组之间差异均无统计学意义。

5. 血浆vWF含量:绝经早期血浆vWF含量即显著升高,并保持在较高水平。绝经早期组、晚期组与基线组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);绝经早期组与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

6. 血浆NO含量:绝经早期组血浆NO含量显著下降,与基线组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。随着绝经时间延长,绝经晚期组血浆NO含量有所回升,绝经晚期与基线组、对照组相比差异均无统计学意义。

7. 血浆6-Keto-PGF_{1α}含量:6-Keto-PGF_{1α}为PGI₂代谢产物,可以反映血浆PGI₂含量。结果显示,绝经后PGI₂含量显著升高。绝经早期组、晚期组与基线组、对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

8. 血浆TXB₂含量:TXB₂为TXA₂代谢产物,可以反映血浆TXA₂含量。绝经早期血浆TXA₂含量显著升高,与基线组、对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$);绝经晚期组与基线组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),但与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组检测结果见表1。

表1 各组血标本检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	FIB (g/L)	ATⅢ (%)	PAI-1 (ng/ml)	D-D (ng/ml)	vWF (%)	NO (μmol/L)	6-Keto-PGF _{1α} (pg/ml)	TXB ₂ (pg/ml)
基线组	1.33 ± 0.11	77.2 ± 10.3	6.49 ± 1.64	0.43 ± 0.13	34.5 ± 5.9	28.5 ± 4.2	275.7 ± 89.7	95.8 ± 21.9
对照组	1.58 ± 0.22	78.8 ± 11.4	5.72 ± 2.31	0.47 ± 0.16	37.9 ± 7.0	23.2 ± 5.4	246.8 ± 98.9	150.1 ± 59.5
绝经早期组	1.74 ± 0.23	88.7 ± 10.2	8.62 ± 2.04	0.51 ± 0.13	45.7 ± 4.5	16.3 ± 3.5	489.3 ± 97.2	222.6 ± 60.8
绝经晚期组	1.62 ± 0.22	90.7 ± 9.50	14.14 ± 2.80	0.40 ± 0.11	43.3 ± 7.0	21.7 ± 5.0	391.1 ± 60.4	166.4 ± 56.9

FIB. 血浆纤维蛋白原;ATⅢ. 抗凝血酶Ⅲ;PAI-1. 纤溶酶原激活剂抑制剂;D-D. D-二聚体;vWF. 血管性假血友病因子;NO. 一氧化氮;6-Keto-PGF_{1α}. 6-酮-前列腺素F_{1α};TXB₂. 血栓素B₂

讨 论

绝经(menopause)是妇女生命进程中必然发生的生理过程。卵巢功能衰退导致性激素水平和中枢神经递质改变,从而引起一系列躯体表现。绝经相关激素治疗(menopause related hormone therapy, MHT)有效改善绝经期综合征,预防和缓解骨质疏松、泌尿生殖道萎缩等绝经相关疾病,是提高绝经后妇女生活质量的重要手段之一。然而临床观察显示,MHT 增加深静脉血栓形成、肺栓塞、脑卒中等血栓性疾病风险,尤其在使用的最初 1 年内^[3]。现有研究显示,MHT 干扰凝血和纤溶过程,可能导致血栓风险增加^[4,5];增龄也是血栓形成的独立危险因素^[6]。然而,绝经事件本身是否会增加血栓形成风险还不清楚。

血栓前状态(prothrombotic state)是指血管内皮细胞受损、血小板和白细胞被激活、凝血因子被活化、抗凝和纤溶系统功能降低以及血液黏滞度增高等一系列病理状态,该病理状态的特点是有利于血栓形成但尚未形成血栓。目前对于血栓前状态没有统一的诊断标准,亦缺乏精确的标志物,主要通过凝血和抗凝系统的相关指标、纤溶系统检查、以及血管内皮功能和血小板功能等多方面综合评价^[7]。纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)是凝血瀑布的底物,含量增高则血栓风险增加^[8]。抗凝血酶Ⅲ(antithrombin - Ⅲ, ATⅢ)是血浆中主要的生理性抗凝物质,占体内抗凝活性的 60% ~ 70%,是防止血栓形成的重要生理物质^[9]。纤溶酶原激活抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor - 1, PAI - 1)是纤溶活性的重要调节因子,其活性升高可以阻碍细胞外基质和纤维蛋白降解,促进血管基膜增厚,与血栓形成相关,是血栓性疾病的危险因素之一,也是动脉粥样硬化的独立危险因素^[10]。

D - 二聚体(D - dimer, D - D)是交联纤维蛋白网的降解产物,是继发纤溶亢进的敏感指标。低水平的 D - D 可以排除体内有血栓存在。血管性假血友病因子(von Willebrand factor, vWF)和一氧化氮(nitric oxide, NO)是公认的反映内皮细胞功能的重要指标,血浆 vWF 水平升高或 NO 水平下降与血栓风险增加有关^[11]。血管舒缩功能亦与血栓形成密切相关。正常状态下,血管内皮产生的舒张因子和收缩因子协同作用,调节血管张力处于正常水平。血栓素 A₂(thromboxane, TXA₂)是体内最强的血管收缩剂和血小板聚集剂,具有致动脉粥样硬化的作用;前列环素(prostacyclin, PGI₂)则是体内最强的血管扩张剂

和血小板聚集抑制剂,可以抑制氧化应激和血小板活化,具有很强的抗血栓作用^[12]。TXA₂ 和 PGI₂ 的动态平衡是调节血小板和血管舒缩功能的重要因素之一, TXA₂ 水平增高或 PGI₂ 水平降低见于血栓前状态。

本研究同时设立了基线组和对照组,通过对照组排除增龄对血栓前状态的影响。笔者的数据显示,在绝经早期,血浆 FIB 含量明显升高,而重要的抗凝物质血浆 ATⅢ活性无明显变化,提示血液凝固能力增强;血浆 PAI - 1 含量呈升高趋势提示血栓风险增加;血浆 vWF 含量显著升高,血浆 NO 含量显著下降,提示血管功能受损、血栓风险增加;TXA₂ 和 PGI₂ 同步升高,说明绝经影响了血管舒缩功能,但尚能处于平衡状态。随着绝经时间延长,到绝经晚期,与对照组相比,PAI - 1 含量显著增加,但血浆 FIB 含量有所回落,血浆 ATⅢ活性显著升高,部分抵消了血栓形成风险;重要的排除指标 D - D 含量无明显变化,说明凝血、抗凝及纤溶系统的改变尚处于平衡状态。血浆 vWF 含量仍保持在较高水平,但血浆 NO 含量有所回升,说明血管内皮功能重新达到相对平衡状态。

从以上数据可以发现,绝经事件本身对于凝血、抗凝及纤溶系统、血管内皮功能及血管舒缩功能均有显著影响,导致绝经早期处于血栓前状态,血栓形成风险增加;随着绝经时间延长,各相关参数达成新的平衡,血栓形成风险回落。由于血栓形成的复杂性,机体对凝血、抗凝、纤溶、血管舒缩状态等方面的变化力图通过复杂的调节维持着动态平衡,只有多种因素同时改变或某一种因素有严重改变时才会导致血栓形成。而且,血栓形成是一个十分复杂的病理过程,除受上述血凝学因素影响外,还与机体单核 - 吞噬细胞系统功能、神经体液和内分泌系统调节等密切相关。局部因素(血管局部狭窄、血管损伤、内皮功能和结构损害、血液淤积和紊乱)亦起着极为重要的作用。由于条件所限,本研究仅选择了与血栓前状态密切相关的几个因子,对于血栓前状态的评价尚不够全面。绝经对大鼠血栓前状态的影响还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Tian XL, Li Y. Endothelial cell senescence and age - related vascular diseases [J]. J Genet Genomics, 2014, 41 (9): 485 - 495
- 2 Tofler GH, Massaro J, Levy D, *et al.* Relation of the prothrombotic state to increasing age (from the Framingham Offspring Study) [J]. Am J Cardiol, 2005, 96 (9): 1280 - 1283
- 3 Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, *et al.* Risks and benefits of

- estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial[J]. JAMA, 2002,288(3):321-333
- 4 Bonduki CE, Lourenço DM, Motta EL, *et al.* Effect of estrogen - progestin hormonal replacement therapy on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women[J]. Clinics;Sao Paulo, 2007,62(5):553-560
- 5 Bushnell CD, Hurn P, Colton C, *et al.* Advancing the study of stroke in women:summary and recommendations for future research from an NINDS - Sponsored Multidisciplinary Working Group[J]. Stroke, 2006,37(9):2387-2399
- 6 ESHRE Capri Workshop Group. Venous thromboembolism in women: a specific reproductive health risk[J]. Hum Reprod Update, 2013, 19(5):471-482
- 7 王振义. 血栓与止血——基础理论与临床[M]. 上海:科学技术出版社, 2004
- 8 Aleman MM, Walton BL, Byrnes JR, *et al.* Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis[J]. Thromb Res, 2014,133:S38-40
- 9 Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y. Diagnosis of thrombosis by hemostatic markers[J]. Nihon Rinsho, 2014,72(7):1232-1236
- 10 Wyseure T, Declercq PJ. Novel or expanding current targets in fibrinolysis[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(9):1476-1482
- 11 Fisher MJ. Brain regulation of thrombosis and hemostasis: from theory to practice[J]. Stroke,2013, 44(11):3275-3285
- 12 Kawabe J, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin in vascular diseases. Recent insights and future perspectives[J]. Circ J, 2010, 74(5):836-843

(收稿日期:2015-05-19)

(修回日期:2015-06-01)

人脐带间充质干细胞对肝癌细胞增殖性及凋亡的影响

廖卫滔 肖佳 郑刚 夏鸿彬 何成宜 周少朋 陈志英

摘要 **目的** 探讨人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchyma cell, MSC)对肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)癌细胞增殖和凋亡的影响,为HCC的治疗提供新的思路。**方法** 取50%覆盖率的MSC培养皿,换上新鲜的DMEM/F-12培养基,待其培养至100%的覆盖率后收集培养基备用,即为MSC条件培养基。用新鲜DMEM/F-12培养基加上等量的MSC条件培养基的混合培养基培养HepG₂人类肝癌细胞株24、48和72h,使用MTT法测定HepG₂细胞的增殖活性、通过Hoechst33342和PI双染色后在荧光倒置显微镜下观察计数以测定HepG₂细胞的凋亡、用Transwell侵袭实验和黏附实验测定HepG₂细胞侵袭能力以及通过Western blot法检测凋亡相关信号通路蛋白的表达。**结果** 混合培养基培养HepG₂细胞24h后,对其生长和凋亡及侵袭黏附能力没有显著影响($P>0.05$)。但是培养延长到48h和72h后,HepG₂细胞的活性、增殖能力、侵袭能力和黏附能力都受到显著的抑制,这些变化伴随着细胞分裂相关因子Ki-67、PCNA和组蛋白H3磷酸化水平下调,以及细胞凋亡执行者caspase-3的激活和抗凋亡蛋白Bcl-2的抑制。**结论** 体外间接共培养实验表明,人脐带间充质干细胞具有抑制肝脏肿瘤细胞增殖及促进其凋亡的作用。

关键词 人脐带间充质干细胞 肝癌 增殖 凋亡 侵袭

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.026

Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell on the Proliferation of Apoptosis of Hepatoma Cells. Liao Weitao, Xiao Jia, Zheng Gang, *et al.* Laboratory for Gene and Cell Therapy, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Guangdong 518055, China

Abstract Objective To examine the effects of human umbilical cord mesenchymal stem cell (MSC) on the proliferation of apoptosis of hepatoma cells and to provide novel therapeutic strategy for liver cancer. **Methods** Culture of MSC with 50% confluence was replaced with fresh DMEM/F-12 medium. When the confluence reached 100%, all culture used DMEM/F-12 was considered as the conditioning medium. This kind of medium was mixed with fresh DMEM/F-12 at 1:1 to treat human hepatoma cell line HepG₂ for 24, 48 and 72 hours. Cellual viability was measured by MTT assay, apoptosis was quantified by Hoechst33342/PI co-staining, cell invasion ability and adhesion ability were measured by transwell assay and in vitro adhesion assay, respectively. Change of key signaling compo-

作者单位:518055 中国科学院深圳先进技术研究院基因和细胞治疗技术研究室(廖卫滔、郑刚、夏鸿彬、何成宜、陈志英);519000 珠海,中山大学附属第五人民医院麻醉科(廖卫滔、周少朋);510632 广州,暨南大学生命科学与技术学院免疫生物学系(肖佳)

通讯作者:周少朋,电子信箱:zsp005@163.com;陈志英,电子信箱:zy.chen1@siat.ac.cn