

## 基于静脉造影的静脉栓塞分级评价体系在溶栓药物治疗大鼠静脉血栓的应用研究

王 健<sup>1</sup>, 孙 瑜<sup>2\*</sup>, 徐向伟<sup>3</sup>, 孙双勇<sup>3</sup>, 王维亭<sup>3</sup>

1. 天津医科大学肿瘤医院 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市“肿瘤防治”重点实验室 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060
2. 天津中医药大学, 天津 300193
3. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

**摘要:**目的 建立一种用于大鼠静脉血栓模型的静脉栓塞分级评价体系,为溶栓药物用于临床的适应症提供参考。方法 雄性 Wistar 大鼠制备静脉血栓。在血栓形成后 30 min 开始给药,采用尿激酶局部输注 41、82、164 kU/kg 及阿替普酶 2.05、4.10、8.20 mg/kg 静脉血栓进行治疗,给药后 3 h 采用血管造影法拍摄静脉栓塞部位的 X 光片,对静脉栓塞进行分级研究。结果 尿激酶、阿替普酶均产生剂量相关性溶栓作用,5 级研究体系的研究结果与血管再通率,血管通过率、血栓质量的结果一致。5 级评分标准,级距设计合理,在血栓残留量、血管通过率方面显示出明显的级间差别。结论 基于静脉造影的静脉栓塞分级评价体系可客观表现静脉栓塞程度,可用于评估溶栓药物静脉溶栓效果。

**关键词:** 尿激酶; 阿替普酶; 静脉血栓; 静脉栓塞分级评价体系; 溶栓效果

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)02-0212-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.02.004

## Application of grading evaluation system on thrombolytic drugs in treatment of venous thrombosis in rats based on venography

WANG Jian<sup>1</sup>, SUN Yu<sup>2</sup>, XU Xiang-Wei<sup>3</sup>, SUN Shuang-Yong<sup>3</sup>, WANG Wei-Ting<sup>3</sup>

1. Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China
2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China
3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** To establish a system for grading evaluation system for venous thrombosis in rats, and to provide a reference for clinical indications of thrombolytic drugs. **Methods** Venous thrombosis models were made in male Wistar rats. Urokinase local infusion of 41, 82, 164 kU/kg, and alteplase of 2.05, 4.10, and 8.20 mg/kg at 30 min after thrombosis were used to treat venous thrombosis. After be treated for 3 h, the X-ray film of the site of venous embolism was taken by angiography to study the grade of venous embolism. **Results** Urokinase and alteplase produced a dose-dependent thrombolytic effect. Grade 5 system was consistent with those of recanalization rate, vascular throughput rate, and thrombus weight. The design of grade 5 was reasonable, and there were significant differences in thrombus residue and vascular throughput rate between each grade. **Conclusion** The grading evaluation system of venous embolism based on venography can objectively show the degree of venous embolism, and can be used to evaluate the thrombolytic effect of thrombolytic drugs.

**Key words:** urokinase; alteplase; venous thrombosis; grading evaluation system; thrombolytic effect

深静脉血栓发生的主要原因是静脉壁损伤、血流缓慢和血液高凝状态,临床常高发于大手术和严重创伤后、长期卧床、肢体制动、肿瘤患者等。多

发于下肢,如不及时诊治,可导致患肢青肿直至溃疡坏死,而且一旦血栓脱落会导致肺栓塞,危及生命。确诊深静脉血栓的辅助性检查包括 D-二聚体测

收稿日期: 2019-09-20

基金项目: 天津市科技支撑重点项目 (19YFZCSY00620)

作者简介: 王 健 (1981—), 男, 副主任药师, 硕士, 研究方向为临床药学。E-mail: wwbzzl@sina.com

\*通信作者 孙 瑜 (1979—), 女, 主管药师, 博士, 研究方向为药理学。E-mail: sunrain806@163.com

定、彩色多普勒超声、CT、磁共振和静脉造影。虽然临床上已经主要采用彩色多普勒超声检查，但静脉造影仍用来研究其他辅助检查方法的临床价值，是深静脉血栓检查的“金标准”<sup>[1]</sup>。X 线顺行静脉造影检查对于明确深静脉血管病变，包括深静脉主干畅通情况、瓣膜的分布和形态、侧枝形成等都具有诊断意义<sup>[2]</sup>。溶栓治疗是治疗深静脉血栓重要手段，为了研究溶栓药的治疗效果，建立了基于静脉造影的静脉栓塞研究方法<sup>[3]</sup>，但该方法主要研究标准是血管通过率，与临床溶栓治疗效果研究没有很好的对接。因此在先前研究的基础上，本研究重新建立了一套更接近临床研究标准的体系，以期溶栓药物用于深静脉血栓提供更好的实验平台。

## 1 材料

X-12 高频 X 射线机，郑州凯普机电有限责任公司制造。Pump11 Pico Plus Elite 微量注射泵，Harvard Apparatus 生产。

注射用阿替普酶，德国勃林格殷格翰药业有限公司生产，规格 20 mg/瓶，产品批号 607009。注射用尿激酶，丽珠集团丽珠制药厂生产，规格 10 万 U/瓶，批号 160702B。碘普罗胺注射液，拜耳公司生产，规格 100 mL/瓶，批号 kt026kv。牛凝血酶，中国医学科学院血液研究所科技公司生产，规格 500 IU/瓶，批号 201201，用生理盐水溶解并稀释至所需浓度，分装后-20℃保存。

Wistar 大鼠，雄性，体质量 350~400 g，北京维通利华实验动物技术有限公司，动物使用合格证号 SCXK(京)2016-0011。

## 2 方法

### 2.1 大鼠静脉血栓的制备<sup>[4]</sup>

Wistar 大鼠 ip 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后，仰卧位固定，在腹股沟处切开皮肤，分离大隐静脉、腹壁浅静脉，取大隐静脉主干约 1 cm，两端穿线(以腹壁浅静脉与大隐静脉交汇处为一端，其近心端距交汇处 1 cm 处为另一端)用于形成血栓，腹壁浅静脉插管至大隐静脉，备用，并结扎其他大隐静脉拟形成血栓段的所有分支。依次结扎血管段的近心端、远心端，制成充满全血长约 10 mm 的血管段，从大隐静脉插管向血管段内推注 5 μL 牛凝血酶(约 0.5 IU)，轻轻反复抽吸推注 2 次，使其与血管内血液充分混匀，形成静脉血栓。30 min 后，松开血栓近心端、远心端的结扎线。从插管内注射血管造影剂碘普罗胺，并拍摄 X 光片，确定其血栓形

成后开始给药。

### 2.2 分组和给药

Wistar 大鼠分成 7 组，分别为模型组，阿替普酶 2.05、4.10、8.20 mg/kg(相当于人 20、40、80 mg/d)组，尿激酶 41、82、164 kU/kg(相当于人 40、80、160 万 U/d)组，每组各 10 只。各组均在血栓形成后 30 min 开始给药。模型组给予生理盐水，各组给药体积均为 1 mL，先静脉推注总量的 1/10，体积为 0.1 mL，余量 0.9 mL 随后用微量注射泵恒速静脉输注，2 h 给完。模型组和尿激酶组在手术侧股静脉局部注射，阿替普酶组在手术对侧股静脉注射。

### 2.3 血管再通率

参照文献报道<sup>[5]</sup>标准对 X 光片进行静脉血栓评分。0 分(完全栓塞):造影剂有明显滞留，近心端血管无成像;1 分(部分栓塞):造影剂有明显滞留，近心端血管部分成像;2 分(部分畅通):造影剂有轻度滞留，近心端血管明显成像;3 分(完全畅通):造影剂无明显滞留，近心端血管明显成像;实验后血栓残留表明，按上述标准评分为 3 分的部分动物血管内仍有血栓残留，为了加以区别，对血管内无血栓残留的作为 4 分进行结果统计。根据评分研究血栓的溶解情况;以评分 2 分以上(含)作为血管再通的标准，计数每组再通的个体数目，计算血管再通率，以此研究血管的再通情况。

### 2.4 血管通过率

给药后 3 h 注射血管造影剂，并拍摄 X 光片。X 光片转换为数字图像存储在电脑中，用 Image-Pro Plus v6.0 测量血栓远心端血管直径( $D_n$ )和血栓部位最狭窄处血管直径( $D_m$ )，计算血管通过率。完全栓塞记为 0，完全开放记为 100%。

$$\text{血管通过率} = D_m/D_n$$

### 2.5 血栓残留量

X 光片拍摄完成后，从形成血栓的静脉血管中取出残留血栓，称定质量。

### 2.6 研究标准的考察

为了每项评分获得足够多的样本，实验设计了不同药物多个给药剂量，共 70 只动物按上述体系对静脉造影图像进行评分，录得 0 分 24 例，1 分 10 例，2 分 7 例，3 分 11 例，4 分 18 例。将所得实验资料按血管再通评分进行重新分组统计，考察每级标准之间的差异，并最终确定研究标准的描述。

### 2.7 统计学处理

所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。计量资料采用

ANOVA 单因素方差分析比较不同评分组间均数差异显著性；计数资料采用  $\chi^2$  检验进行统计学处理。

### 3 结果

#### 3.1 血管再通率

10 只模型组大鼠股静脉均形成血栓，血栓形成后血流呈中止状态，3 h 后残存血栓堵塞整个血管。尿激酶 40、80、160 kU/kg 组 10 只大鼠中分别有 4 只 ( $P < 0.05$ )、7 只 ( $P < 0.01$ )、10 只 ( $P < 0.001$ )，阿替普酶 2.05、4.1、8.2 mg/kg 组分别有 2 只、6 只 ( $P < 0.05$ )、7 只 ( $P < 0.01$ ) 大鼠给药后 3 h 血管再通，提示尿激酶、阿替普酶均剂量相关性增加血管再通率。见表 1。

#### 3.2 静脉血栓评分

尿激酶、阿替普酶均剂量相关性增加血管再通评分，尿激酶 82、164 kU/kg 组、阿替普酶 4.10、

8.20 mg/kg 组与模型组比较，均有显著差异 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )，呈现明显的溶栓效果。与再通率结果基本一致。见表 1。

#### 3.3 血管通过率

尿激酶局部给药和静脉输注阿替普酶血管通过率呈剂量相关性增加。尿激酶 82、164 kU/kg 组与模型组有显著差异；静脉输注阿替普酶各组与模型组均无显著差异，与再通率、评分结果基本一致。见表 1。

#### 3.4 血栓残留量

尿激酶 82、164 kU/kg 组、阿替普酶 4.10、8.20 mg/kg 组与模型组比较均有显著差异，残留量呈现剂量相关性降低，表现出明显的溶栓效果。与血管再通率、静脉血栓评分、血管通过率呈现负相关。结果见表 1。

表 1 溶栓治疗对大鼠静脉栓塞的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effect of thrombolysis on venous embolism in rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量	血管再通率/%	静脉血栓评分	血管通过率/%	血栓残留量/mg
模型	—	0	0.1±0.3	1.0±3.2	3.5±0.9
尿激酶	41 kU·kg <sup>-1</sup>	40*	1.3±1.6	23.8±10.7	2.3±1.4
	82 kU·kg <sup>-1</sup>	70**	2.5±1.6*	54.1±12.0*	1.4±1.0**
	164 kU·kg <sup>-1</sup>	100***	3.5±0.8***	81.6±9.0***	0.5±0.8***
阿替普酶	2.05 mg·kg <sup>-1</sup>	20	1.3±1.3	21.4±36.6	2.2±1.2
	4.10 mg·kg <sup>-1</sup>	60**	1.9±1.6*	33.7±35.7	1.6±1.4*
	8.20 mg·kg <sup>-1</sup>	70**	2.3±1.8*	49.5±43.8	1.4±1.4*

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

#### 3.5 不同评分对应的血管再通情况

5 级研究体系中，血栓残留量、血管通过率相邻两级间均呈现显著差异，显示出明显的级间差别。说明该分级体系级距设计具有合理性。结果见表 2。

表 2 不同评分组对应的溶栓研究指标 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Corresponding evaluation index of thrombolysis to different scores ( $\bar{x} \pm s$ )

评分	动物数	血栓残留量/mg	血管通过率/%
0	24	3.2±0.8	0.0±0.0
1	10	2.5±0.6	8.7±6.8*
2	7	1.9±1.0	27.4±8.8**
3	11	1.3±0.7	57.1±10.3***
4	18	0.0±0.0***	96.8±6.1***

与相邻下一级评分比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs the scores of the next lower level

#### 3.6 研究标准的描述

参照文献报道<sup>[5]</sup>架构并结合本实验情况，从成像特点、血管通过率、成栓血管的残留血栓对评分标准进行全面描述。完全栓塞 (0 分): 造影剂有明显滞留，近心端血管无成像，可见大量侧枝血管成像；部分栓塞 (1 分): 造影剂有明显滞留，近心端血管部分成像，可见大量侧枝血管成像，血管最狭窄处不到血管直径的 1/5；部分畅通 (2 分): 造影剂有轻度滞留，近心端血管明显成像，可见少量侧枝血管成像，血管最狭窄处约为血管直径的 1/5~1/2；完全畅通 (3 分): 造影剂无明显滞留，近心端血管明显成像，无侧枝血管成像，血管最狭窄处大于血管直径的 1/2，成栓血管内仍有血栓残留；完全溶解 (4 分): 完全符合 3 分标准且成栓血管内无血栓残留。各分数成像标准见图 1。

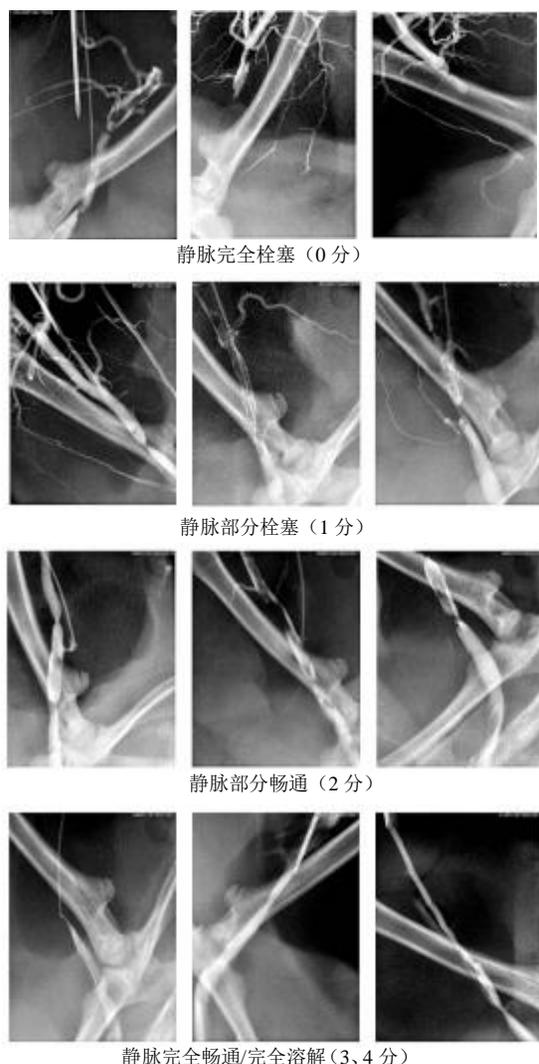


图1 静脉栓塞评分标准示意图

Fig. 1 Diagram of scoring standard of venous embolism

#### 4 讨论

对于静脉血栓溶解效果，通常称取模型动物治疗后残留血栓质量，分析残留血栓成分，并辅助一些血液生化指标和抗凝指标进行综合研究。在日常实践中，发现这些指标与临床研究指标有很大差异。因此设想了通过临床的手段血管造影术进行药效研究，通过前期的摸索<sup>[6]</sup>，利用与本研究相同的深静脉血栓动物模型进行了溶栓研究，确定了造影剂的注射量、拍照时间等操作细节，增加了血管通过率的指标，但是作为与临床研究标准对接还远远不够。

临床实践中，血栓性疾病如心梗、脑梗死、肺栓塞、下肢深静脉血栓等大多数都是急性或危重疾

病，诊断后用药的疗效研究是实时的、在体的，而下肢深静脉血栓为了迅速做出诊断或研究疗效往往采用分级研究体系，如优、良、中、差<sup>[5-6]</sup>或由此引申出来的评分体系<sup>[7]</sup>。

借鉴临床实践，本实验引入了静脉栓塞分级研究体系，对静脉造影的X光片进行了静脉栓塞评分。评分结果表明，所用药物的疗效与临床应用的效果的评价基本一致<sup>[7-9]</sup>，说明该体系对同一药物的研究结果与临床评价基本一致。除此之外，实验还分析了不同评分对应血管再通情况，结果表明该分级研究体系每个分级之间在残留血栓量和血管通过率上有明显差别。据此在标准描述中加入了这两部分内容，使各级评分的描述更全面、更具有可操作性，为溶栓新药临床用于静脉栓塞提供更接近临床的、直观的评价体系。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会外科学分会血管外科学组. 深静脉血栓形成的诊断和治疗指南 [J]. 中国血管外科杂志: 电子版, 2017, 3(4): 250-257.
- [2] 辛艳芬, 蒲英梅, 陈玉祥, 等. 彩色多普勒超声与 X 线顺行静脉造影诊断下肢穿静脉瓣膜功能不全的对比研究 [J]. 华西医学, 2017, 32(11): 1744-1748.
- [3] 徐向伟, 赵专友. 血管造影法研究大鼠静脉血栓模型 [C]. 天津市生物医学工程学会第 39 届学术年会论文集. 天津: 《生物医学工程与临床》编辑部, 2019.
- [4] 季颖群, 张中和, 陆慰萱, 等. 建立静脉血栓栓塞症大鼠模型的研究 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(4): 271-275.
- [5] 中华医学会放射学分会介入学组. 下肢深静脉血栓形成介入治疗规范的专家共识 [J]. 中华放射学杂志, 2011, 45(3): 293-296.
- [6] 中国医师协会介入医师分会, 中华医学会放射学分会介入专业委员会, 中国静脉介入联盟. 下肢深静脉血栓形成介入治疗规范的专家共识 (第 2 版) [J]. 中华介入放射学电子杂志, 2018, 6(4): 283-288.
- [7] 刘国平, 葛美叶, 李琳, 等. 经导管直接溶栓治疗下肢深静脉血栓形成的尿激酶量效分析 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2013, 10(1): 11-14.
- [8] 严冬华, 顾建平, 苏浩波, 等. 阿替普酶与尿激酶置管溶栓治疗急性髂股静脉血栓的比较 [J]. 中国临床研究, 2017, 30(11): 1468-1472.
- [9] 陈翔, 曹俊雄, 朱志军, 等. 尿激酶与阿替普酶在置管溶栓治疗急性下肢深静脉血栓的疗效观察 [J]. 浙江临床医学, 2017, 19(8): 1426-1427.