



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.012  
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3920.shtml

· 基础研究 ·

# 白细胞介素6水平在大鼠深静脉血栓形成中的变化

屈碧辉, 何涛, 胡敏, 王迪乐

(湖北省武汉市中心医院 血管外科, 湖北 武汉 430014)

## 摘要

**目的:** 探讨白细胞介素6 (IL-6) 在深静脉血栓形成 (DVT) 中的变化与作用。

**方法:** 60只雄性SD大鼠随机分为假手术组 ( $n=10$ ) 与模型组 ( $n=50$ ), 模型组大鼠采用双侧股静脉钳夹联合后肢石膏制动诱导后肢DVT, 并分别在造模后2、5、10、15、25 h各处死10只大鼠取材, 观察股静脉血栓形成情况; 用real-time PCR检测股静脉内皮组织IL-6 mRNA含量; ELISA法检测血清IL-6、纤溶酶原激活物抑制物 (PAI) 和纤溶酶原激活物 (tPA) 水平。

**结果:** 模型组大鼠造模后2 h未见血栓形成, 但从5 h开始出现血栓形成, 并随着时间的延长, 血栓形成逐渐增多。模型组大鼠股静脉内皮组织中的IL-6 mRNA水平在造模后逐渐升高, 于15 h达高峰; 模型组大鼠血清IL-6、PAI含量变化情况与IL-6 mRNA变化一致, 但血清tPA浓度变化则与前两者相反。模型组以上各指标在各时间点与假手术组间的差异均有统计学意义 (均  $P<0.05$ )。

**结论:** 在大鼠DVT过程中IL-6水平升高, 其可能通过促进PAI的产生、抑制tPA的活化来促进血栓的形成。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(6):765-768]

## 关键词

静脉血栓形成; 白细胞介素6; 纤溶酶原激活物抑制物; 组织型纤溶酶原激活物; 大鼠

中图分类号: R654.3

## Alteration of interleukin 6 level in development of deep vein thrombosis in rats

QU Bihui, HE Tao, HU Min, WANG Dile

(Department of Vascular Surgery, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, China)

Corresponding author: HE Tao, Email: 13607186847@163.com

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the alteration of the interleukin 6 (IL-6) level in the development of deep vein thrombosis (DVT) in rats and its actions.

**Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into sham operation group ( $n=10$ ) and model group ( $n=50$ ). Rats in model group underwent bilateral femoral vein clamping plus plaster cast immobilization of the hind legs to induce hind limb DVT, and were sacrificed at 2, 5, 10, 15 and 25 h after operation respectively, with 10 rats in each time point, to obtain the vein samples. Then, the incidence of thrombus formation in the femoral vein specimens was observed, IL-6 mRNA level in the endothelial tissue of the femoral vein was measured by real-time PCR, and the serum levels of IL-6, plasminogen activator inhibitor (PAI) and tissue plasminogen activator (tPA) were determined by ELISA assay.

**Results:** No thrombus formation was observed in rats in model group 2 h after operation, but thrombosis

收稿日期: 2014-04-06; 修订日期: 2014-05-15。

作者简介: 屈碧辉, 湖北省武汉市中心医院主治医师, 主要从事血管外科方面的研究。

通信作者: 何涛, Email: 13607186847@163.com

began to occur 5 h after operation and was increased with time. In rats of model group, the IL-6 mRNA level in the endothelial tissue of the femoral vein was gradually increased after operation, and reached the peak at postoperative 15 h; the alterations of both the serum IL-6 and PAI levels showed the same pattern of the alteration of the IL-6 mRNA level, while the serum tPA level presented the completely opposite changing pattern of the serum IL-6 and PAI levels. All the differences in above parameters at each observed time point in model group reached statistical significance in comparison with those in sham operation group (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** IL-6 level is increased during the process of development of DVT in rats, and this may promote thrombosis through increasing PAI production and inhibiting tPA activation.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(6):765-768]

## KEYWORDS

Venous Thrombosis; Interleukin-6; Plasminogen Activator Inhibitor; Tissue Plasminogen Activator; Rats

**CLC number:** R654.3

静脉血栓栓塞 (venous thromboembolism, VTE) 是临床三大血栓性疾病 (心肌梗死, 缺血性脑卒中和静脉血栓) 之一, 也是临床上最常见的静脉疾病之一<sup>[1]</sup>。深静脉血栓 (deep vein thrombosis, DVT) 是常见的静脉血栓栓塞之一, 是常见的创伤或骨科手术术后并发症, 尤其对于严重创伤和恢复缓慢的老年患者而言, 长期卧床容易导致下肢深静脉瘀滞, 形成 DVT<sup>[2-4]</sup>。深静脉血栓的早期预防和治疗非常重要。有研究<sup>[5-7]</sup>表明, 炎症与血栓形成之间存在着密切的联系, 一方面炎症促进高凝状态, 另一方面血栓形成中的物质也可引起炎症。白细胞介素 6 (IL-6) 具有多种生物学活性, 是炎症反应的重要因子<sup>[8-9]</sup>。本研究利用大鼠后肢深静脉血栓模型, 利用 real-time PCR 和 ELISA 检测静脉内皮组织和血清中 IL-6 及相关因子的含量变化, 探讨 IL-6 在血栓形成中的作用, 为其临床预防和早期诊断奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物: 雄性清洁级 SD 大鼠, 8~12 周龄、体质量 (235 ± 35) g, 60 只; 主要试剂: 反转录试剂盒购自 TAKATA 公司; Real-time 试剂盒购自全式金生物技术有限公司; IL-6、纤溶酶原激活物抑制物 (PAI)、纤溶酶原激活物 (tPA) ELISA 试剂盒购自上海恒远生物技术发展有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠创伤性 DVT 模型的建立和分组 将 50 只清洁级雄性 SD 大鼠采用蚊式钳钳夹双侧股静

脉联合石膏制动双下肢构建大鼠 DVT 模型 (模型组), 10 只 SD 大鼠切开大腿皮肤后缝合创口作假手术处理 (假手术组)。模型组分别在造模后 2、5、10、15、25 h 各处死 10 只大鼠取材, 用于各指标的检测。

1.2.2 RNA 提取和 real-time PCR 检测组织中 IL-6 含量 将钳夹部位的股静脉 (约 2 cm 长) 连同周围组织一同取下, 用生理盐水漂洗, 去除血管内的血栓和杂质, 显微镜下分离静脉内皮组织, 裂解组织, 一步法提取大鼠深静脉内皮组织总 RNA, 测定浓度与质量。取 1 μg 作为模板, 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书反转录得到细胞 cDNA。使用 TransStart® Top Green qPCR SuperMix 试剂盒进行实时定量 PCR 实验, 所用仪器为 ABI StepOne Real time PCR system。用于 IL-6 实时定量 PCR 的引物序列为: 5'-GAG AAA AGA GTT GTG CAA TGG C-3' 和 5'-ACT AGG TTT GCC GAG TAG ACC-3'。

1.2.3 大鼠血清制备 大鼠腹腔内注射 1% 戊巴比妥钠麻醉, 摘取眼球法取血 8 mL。3 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移至新的无 RNA 酶的 EP 管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清, -80 °C 保存待用。

1.2.4 ELISA 检测血清中 IL-6、PAI、tPA 含量 按照 ELISA 试剂盒说明书所述, 制成标准曲线, 将血清用标本稀释液按照 1:1 稀释后加入反应孔内, 震荡混匀, 37 °C 温育 1 h, 洗涤液洗涤, 加入生物素化抗体工作液, 37 °C 温育 1 h 后洗涤, 分别加入底物 A、B 液, 震荡混匀, 37 °C 避光显色 15 min, 迅速加入终止液, 450 nm 波长处测定 OD 值。

### 1.3 统计学处理

全部结果均采用 SPSS 13.0 软件分析。数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用  $q$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 造模结果

在不同时间点(造模后 2、5、10、15、25 h)处死大鼠, 解剖股静脉, 2 h 时无血栓形成, 为血栓形成前期, 从 5 h 开始有血栓形成, 随着时间推移, 血栓形成逐渐增多, 为血栓形成期。

### 2.2 大鼠深静脉内皮组织中 IL-6 的含量

real-time PCR 结果显示, 与假手术组比较, 从血栓形成前期(2 h)起, 深静脉内皮组织中的 IL-6 含量开始升高, 5、10、15 h 后, 逐渐增高, 且差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 但 15 h 与 25 h 时间点差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(图 1)。

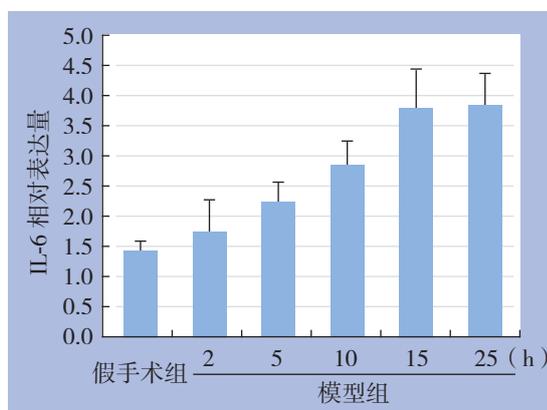


图 1 大鼠股静脉内皮组织中 IL-6 mRNA 的相对表达量  
Figure 1 IL-6 relative expression level in the endothelial tissue of the femoral vein in rats

### 2.3 大鼠血清中 IL-6、PAI、tPA 的含量

ELISA 结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6 含量逐渐增多, 在 15 h 时达到最大(均  $P < 0.05$ ), 25 h 与 15 h 时间点差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); PAI 水平变化趋势与 IL-6 一致, 大鼠形成血栓后, 随着时间的增加逐渐升高(均  $P < 0.05$ ), 15 h 达到高峰, 25 h 与 15 h 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); tPA 的变化趋势则与前两者相反, 与假手术组比较, 模型组大鼠术后 tPA 的含量逐渐降低, 且 15 h 达最低(均  $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 大鼠血清 IL-6、PAI、tPA 含量

组别	IL-6 (ng/mL)	PAI (ng/mL)	tPA (ng/mL)
假手术组	0.10 ± 0.02	27.63 ± 4.02	7.38 ± 1.01
模型组			
2 h	0.13 ± 0.07 <sup>1)</sup>	34.53 ± 4.88 <sup>1)</sup>	5.98 ± 0.94 <sup>1)</sup>
5 h	0.14 ± 0.04 <sup>1)</sup>	38.51 ± 3.95 <sup>1)</sup>	3.76 ± 0.78 <sup>1)</sup>
10 h	0.16 ± 0.05 <sup>1)</sup>	53.88 ± 7.48 <sup>1)</sup>	3.05 ± 0.33 <sup>1)</sup>
15 h	0.19 ± 0.08 <sup>1)</sup>	62.74 ± 5.99 <sup>1)</sup>	2.27 ± 0.31 <sup>1)</sup>
25 h	0.19 ± 0.03 <sup>1)</sup>	63.27 ± 9.06 <sup>1)</sup>	2.38 ± 0.23 <sup>1)</sup>

注: 与假手术组比较,  $P < 0.05$

Note:  $P < 0.05$  vs. sham operation group

## 3 讨论

静脉血栓栓塞作为常见的血栓疾病之一, 其发病率近年来有逐渐上升的趋势。据统计, 未进行血栓早期诊断和预防的住院患者在外科手术中发生 VTE 的比例可达 15%~40%, 其中, 下肢 DVT 约占 90%<sup>[10-12]</sup>。因此, 对 DVT 的分子标记和形成机制的研究至关重要。越来越多的研究显示, 炎症与血栓形成之间有着密切的关系, 一方面炎症促进高度凝集状态, 另一方面血栓形成过程中的物质也可以引起炎症<sup>[13-15]</sup>。炎症介质对血管内皮细胞的作用除了直接损伤, 启动凝血反应外, 还可能诱导细胞表达细胞因子, 从而合成释放一系列黏附分子、炎症介质和趋化因子, 如 ROS、NF- $\kappa$ B、IL-6、TNF 等, 扩大炎症反应, 促进血栓形成<sup>[16]</sup>。在血管细胞中, 这些炎症因子可以导致静脉内皮细胞老化和凋亡, 功能紊乱, 促进凝血形成血栓<sup>[17]</sup>。有研究<sup>[18]</sup>表明炎症反应过程中存在凝血系统的激活, 且炎症反应越重, 凝血活化越明显, 预后越差。

IL-6 是由体内很多细胞包括免疫和非免疫细胞等多种细胞分泌而来的, 可以作用于血管细胞, 在应激和免疫反应中起着重要作用, 是炎症反应的重要介质, 又称为前炎症细胞因子。有研究<sup>[19]</sup>表明血浆中 IL-6 的水平升高与静脉血栓危险度成正比, 但也有部分研究者抱有相反观点。对于 IL-6 影响静脉血栓形成的机制尚不清楚, 可能是 IL-6 发挥作用后, 中性粒细胞 (PMN) 大量表达 CD11b/CD18 并导致其活化<sup>[20]</sup>。另外, IL-6 也可能通过直接降低 PMN 上 CD62L 的转录与翻译起作用, 从而影响白细胞的黏附和迁移, 最终影响血栓的量<sup>[21]</sup>。

本研究利用股静脉钳夹联合下肢石膏制动狗

建大鼠 DVT 模型, 并发现形成血栓的模型组大鼠静脉内皮组织和血清中 IL-6 水平均高于假手术组, 并且随着血栓形成不断上升, 在 15 h 时达到最大。同时 DVT 大鼠 PAI 的含量也升高, 对应的, tPA 的含量则发生了降低。以上的结果表明, 在深静脉血栓形成前期, 血管内皮细胞损伤, 释放炎症因子, 诱导血清中 IL-6 水平升高, 刺激 PAI 产生, 并抑制 tPA 的活性, 促进血小板聚集和血栓形成。

综上所述, IL-6 在深静脉血栓形成过程中发挥着重要作用, 然而其涉及到的信号通路和内在机制却十分复杂。本研究为深入研究深静脉血栓形成机制奠定了一定的基础, 同时, 为临床诊断和预后判定研究提供了可能的理论依据。

### 参考文献

- [1] 党晓卫, 姚振涛, 乔师师, 等. 兔下腔静脉球囊损伤后血管重塑相关因子的变化及 G-CSF 的干预作用 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(6):721-725.
- [2] Calton M, Seddighzadeh A, Piazza G, et al. Deep vein thrombosis in orthopedic surgery[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2009, 15(5):512-516.
- [3] 曲洪雪, 刘云鹏. 骨科深静脉血栓形成危险因素及发病机制的研究进展 [J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(2):110-112.
- [4] 徐永波, 祝筱姬, 褚海波, 等. 曲张大隐静脉管壁细胞凋亡水平的变化 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(6):736-741.
- [5] Blix K, Jensvoll H, Brækkan SK, et al. White blood cell count measured prior to cancer development is associated with future risk of venous thromboembolism--the Tromsø study[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e73447. doi: 10.1371/journal.pone.0073447.
- [6] Boyle S, White RH, Brunson A, et al. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia[J]. Blood, 2013, 121(23):4782-4790.
- [7] Malgor RD, Labropoulos N. Re-modelling of venous thrombosis[J]. Phlebology, 2013, 28(Suppl 1):25-28.
- [8] Jezovnik MK, Poredos P. Factors influencing the recanalisation rate of deep venous thrombosis[J]. Int Angiol, 2012, 31(2):169-175.
- [9] Malaponte G, Polesel J, Candido S, et al. IL-6-174 G > C and MMP-9-1562 C > T polymorphisms are associated with increased risk of deep vein thrombosis in cancer patients[J]. Cytokine, 2013, 62(1):64-69.
- [10] Hogg K, Wells PS, Gandara E. The diagnosis of venous thromboembolism[J]. Semin Thromb Hemost, 2012, 38(7):691-701.
- [11] Nielsen JD. The incidence of pulmonary embolism during deep vein thrombosis[J]. Phlebology, 2013, 28(Suppl 1):29-33.
- [12] Vazquez SR, Kahn SR. Advances in the diagnosis and management of postthrombotic syndrome[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2012, 25(3):391-402.
- [13] Rodriguez AL, Wojcik BM, Wroblewski SK, et al. Statins, inflammation and deep vein thrombosis: a systematic review[J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 33(4):371-382.
- [14] Ripplinger CM, Kessinger CW, Li C, et al. Inflammation modulates murine venous thrombosis resolution in vivo: assessment by multimodal fluorescence molecular imaging[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(11):2616-2624.
- [15] Deatrck KB, Obi A, Luke CE, et al. Matrix metalloproteinase-9 deletion is associated with decreased mid-term vein wall fibrosis in experimental stasis DVT[J]. Thromb Res, 2013, 132(3):360-366.
- [16] Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies[J]. Thromb Haemost, 2005, 94(2):362-365.
- [17] Biondi A, Strano G, Ruggeri L, et al. Clinical biomarkers and management of post thrombotic syndrome[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2010, 2:771-778.
- [18] Roumen-Klappe EM, Janssen MC, Van Rossum J, et al. Inflammation in deep vein thrombosis and the development of post-thrombotic syndrome: a prospective study[J]. J Thromb Haemost, 2009, 7(4):582-587.
- [19] Shbaklo H, Holcroft CA, Kahn SR. Levels of inflammatory markers and the development of the post-thrombotic syndrome[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(3):505-512.
- [20] Wojcik BM, Wroblewski SK, Hawley AE, et al. Interleukin-6: a potential target for post-thrombotic syndrome[J]. Ann Vasc Surg, 2011, 25(2):229-239.
- [21] Mo J, Bai B, Li Y, et al. Expression of interleukin-18 in a rat model of deep vein thrombosis[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2012, 53(5):625-630.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 屈碧辉, 何涛, 胡敏, 等. 白细胞介素 6 水平在大鼠深静脉血栓形成中的变化[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(6):765-768. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.012  
 Cite this article as: QU BH, HE T, HU M, et al. Alteration of interleukin 6 level in development of deep vein thrombosis in rats[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(6):765-768. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.06.012