

腹主动脉瘤动物模型研究进展

吴建秋 综述, 景在平 审校

(第二军医大学附属长海医院血管外科, 上海 200433)

[主题词] 动脉瘤; 腹主动脉; 动物模型

[摘要] 为更好地了解腹主动脉瘤的形成发展机制, 有利于微创腔内技术及药物防治腹主动脉瘤的发展, 人们建立了多种实验性腹主动脉瘤动物模型, 但现有动物模型尚不能具备人体腹主动脉瘤所有病理生理特征。本文就动物模型的建立方法及其应用进行综述。

[中图分类号] R732.2

[文献标识码] A

许多实验技术已经逐步阐述了腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)的发病机制, 但本病的触发因素以及持续扩张直至破裂的控制因素仍未澄清, 因此动物模型建立为

本病的体内研究提供了重要基础。随着实验技术发展和不同研究目的需要, 这些模型的建立方法大致可分为三类^[1]: 遗传倾向性动物模型、中外膜损伤性动物模型和血流动力学诱导性动物模型。其中基因打靶技术拓展了本病遗传领域的研究, 弹力蛋白酶模型使主动脉扩张因素的研究更加深入, 并且所有形态上与人体相似的大动物人工动脉瘤是腔内技术的有

[作者简介] 吴建秋, 女, 1970 年出生, 博士研究生, 主要从事主动脉瘤发病机制的研究。

用模型。本文就此方面的研究进展作一综述。

1 遗传倾向性动物模型

基因打靶技术已给动脉瘤扩张研究提供了一个新视野。载脂蛋白 E 等位基因缺失 ($\text{ApoE}^{-/-}$) 小鼠饲以高胆固醇饮食可使主动脉产生硬化斑块, 继而中膜弹力层碎片 (通常中膜溃疡产生) 及假性动脉瘤形成, 但这种继发率只有 10% ~ 20%; 同时有大量巨噬细胞出现在中膜损伤区, 这与人体动脉瘤中外膜炎性细胞浸润相似^[21]。又通过尿激酶型纤溶酶原激活物 (uPA) 等位基因缺失 ($\text{Plat}^{-/-}$) 及组织型纤溶酶原激活物 (tPA) 等位基因缺失 ($\text{Plau}^{-/-}$) 小鼠分别与 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠杂交, 其子代 $\text{ApoE}^{-/-} \text{Plat}^{-/-}$ 小鼠腹主动脉直径较 $\text{ApoE}^{-/-} \text{Plau}^{-/-}$ 的大 50%, 表明 $\text{ApoE}^{-/-} \text{Plat}^{-/-}$ 小鼠有某种程度的真性动脉瘤形成; 其病理学改变包括主动脉壁变薄、中膜弹力蛋白破裂形成碎片、 α 平滑肌细胞肌动蛋白 (α -actin) 丢失和大量 Mac3 阳性巨噬细胞浸润等。而 $\text{ApoE}^{-/-} \text{Plau}^{-/-}$ 主动脉仅有轻微的中膜破坏, 可见多层弹力纤维中间散布着 α -actin 阳性细胞, 并缺乏 Mac3 阳性巨噬细胞。这种模型能决定动脉壁硬化斑块周围纤维溶解及基质金属蛋白酶 (MMP) 对结构蛋白的破坏作用, 但不具备人体腹主动脉瘤的主要形态学特征——渐进性动脉全层扩张直至破裂。Moons 等^[3] 用纤溶酶原缺陷型 ($\text{Plg}^{-/-}$) 小鼠与其野生型 ($\text{Plg}^{+/+}$) 小鼠腹主动脉进行移植, 15 天后发现, tPA 和 uPA 以及 MMP3、9、12、13 均有明显增高, 并伴有中层坏死、弹力膜片段形成、外膜重塑及腔内血栓形成, 却未见动脉瘤形成。而 $\text{Plg}^{-/-}$ 小鼠间移植时未发生上述动脉硬化的明显改变, 也无动脉瘤形成。

近年来, 人们逐步认识到免疫损伤在腹主动脉瘤发病中的作用, 于是摸索出一种移植动物模型^[4], 通过豚鼠- Fischer344 大鼠肾下腹主动脉移植, 较理想地模拟人体腹主动脉瘤主要病理特征: 主动脉的扩张与破裂、弹力蛋白降解、中膜炎性细胞浸润、MMP 表达增高等, 这种模型大约在移植后 4~ 14 天形成, 其机制主要是由于遗传性异种排斥, 并伴随着单核巨噬细胞及 T 淋巴细胞浸润移植体, 这些细胞是各种细胞因子和 MMP 的主要来源, 例如 α 肿瘤坏死因子、白细胞介素-1 β 、MMP2、MMP9、MMP3、MMP12 及 PA 等高水平表达, 促使基质的降解和动脉瘤的形成。这种模型已被用于以下两方面的研究: 基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 对 MMP 的抑制作用, TIMP-1 的过多表达抑制了 MMP2、9 及 28 kDa MMP 等活性, 从而阻止了动脉瘤形成与破裂^[5]; ④纤溶酶原激活抑制剂-1 (PAI-1) 对 PA 的抑制作用^[6], PA 可直接降解纤维连接蛋白、纤维蛋白, 但不可溶的胶原蛋白和弹性蛋白更主要是通过激活 MMP3、MMP9、MMP12、MMP13, 导致结构蛋白降解而加重对动脉壁的破坏作用, 进一步的证实需对此小鼠模型未激活的 MMP 基因进行研究。这种模型有利于内源性蛋白酶及其抑制剂的研究, 当然这种移植排斥与人体动脉瘤性疾病有多大相似性尚不肯定。

另有人通过转基因动物建立了 Tsukuba 高血压鼠 (THM) 模型^[7], 这种小鼠 6 周龄时开始以 1% NaCl 作为饮水, 即盐负荷 THM。死亡率逐日增加, 7 天后为 23%, 28 天后升高为

64%, 死因为主动脉弓及腹腔干与左肾动脉间动脉瘤形成并破裂所致的胸腹腔出血, 电镜检查表明血管重构过程中血管平滑肌细胞具有发达的细胞器和增多的细胞外基质。推测这种高血压鼠盐负荷后加重了血管肥大和结构破坏, 包括血管平滑肌细胞坏死具有的胞浆过度肿胀与发达的细胞器以及血管壁各层间出血, 导致动脉瘤形成以及最后的破裂。因此在动脉瘤伴有高血压发病机理的研究中, 盐负荷 THM 可作为一个有用的动物模型。

动脉硬化与动脉瘤关系的重要性也进一步得到下述模型的支持。猕猴给以致动脉硬化饮食, 一定时间后停止这种高脂饮食, 有一定比例的猕猴形成动脉瘤, 这种动脉瘤性扩张可能为动脉硬化性斑块退化所致^[8]。另有一种斑点小鼠能自发性形成动脉瘤, 雄性发病率逐年增加, 6 月时达 19.9%。该小鼠存在一种 X 染色体突变而影响铜代谢并引起结缔组织中胶原及弹性纤维变弱, 导致主动脉弓、胸降主动脉、腹主动脉及肺弹力纤维破坏丢失, 目前这种遗传性小鼠主要用于抗高血压治疗方面的研究。然而没有证据表明在人体存在相同的基因突变, 斑点鼠与人腹主动脉瘤发病机理显然很少有直接相关性^[9]。

2 中外膜损伤性动物模型

已有一些实验技术已经能够模拟人体腹主动脉瘤的主要特征: 弹性破坏、炎性细胞浸润和蛋白溶解, 包括外源性蛋白酶或 CaCl_2 等对主动脉直接破坏或激活内源性蛋白酶间接破坏作用, 另外还有主动脉中膜切除以及球囊扩张等方法。

通过腔内导管主动脉弹力蛋白酶灌注模型最初是由 A-didjar 和 Dobrin 1989 年首创, 后来逐步得到广泛应用。小鼠主动脉灌注胰腺弹力蛋白酶后, 能破坏中膜弹力层并产生晚期炎性细胞浸润, 潜伏期过后激活的巨噬细胞主动脉壁内源性纤维蛋白酶激活从而协同外源性蛋白酶作用; 而当单独灌注弹力蛋白溶解产物而无弹力蛋白溶解酶时, 也能引起一些主动脉扩张和外膜血管新形成^[10]。然而这种腔内灌注模型在大动物体内并未产生上述满意的结果。有人用 Yucatan 小型猪肾下腹主动脉灌注猪弹力蛋白酶, 1 周后组织学检查表明, 迁移的平滑肌细胞集中于中膜最内层及内膜, 且与腔内闭塞性血栓相邻, 基质弹力纤维间出现炎性细胞浸润。持续灌注 3 周后, 一些区域出现平滑肌细胞减少、坏死损伤伴钙盐沉积, 其中第 19、21 天内膜明显增生, 却无动脉瘤形成; 有动脉闭塞性并发症却没有腔内血栓形成^[11]。另有报道主动脉弹力蛋白酶诱导的腹主动脉瘤动物模型能够自愈^[12], 新西兰白兔腹主动脉外膜持续 3 h 应用弹力蛋白酶, 数小时后发现主动脉直径扩大为原来的 1.62 ± 0.14 倍, 监测至 42 天时, 动脉瘤并不发展而是呈渐进性收缩状态, 90 天时腹主动脉直径接近实验前水平; 同时, 病理学等检查发现, 早期扩张的瘤壁均存在中膜弹力纤维溶解、平滑肌细胞变性和内皮细胞的损伤, 90 天时主动脉厚度恢复正常, 中膜一些成熟的弹力层已发生再生、平滑肌细胞由早期的合成型转化为收缩型为主。还有作者认为, 应用中外膜损伤诱发动脉瘤形成扩张避免了主动脉插管。主动脉外表面应用弹力蛋白酶造成的外膜损伤可引起

一些主动脉扩张、延长和增厚,并不形成真性的动脉瘤;而在主动脉注射这种酶时,可在2周内形成动脉瘤,并伴有MMP2、9表达增高^[13]。因此弹力蛋白酶损伤模型有待进一步研究。

兔颈总动脉周围应用CaCl₂可形成动脉瘤,而在腹主动脉只引起动脉壁增厚却几乎不形成扩张。但如果在腹主动脉应用CaCl₂同时辅以高胆固醇混合一种巨噬细胞激动剂的饮食,可使动脉瘤形成;并发现瘤壁外膜泡沫样巨噬细胞、T淋巴细胞浸润以及中膜的破坏。这些变化与人体腹主动脉瘤有一定相似性,但兔高脂血症所致的主动脉壁脂肪积累并不一定产生真正的动脉硬化,高脂血症也并不是人腹主动脉瘤的高危因素^[14]。

3 供腔内支架移植研究的动物模型

动脉瘤腔内隔绝技术最初在1991年由Parodi及其合作者报道,与传统手术相比以其微创特色降低了发病率和死亡率。早期的支架移植在设计上已经有较大改进,并且将来也需进一步改进。新的腔内支架移植设计和放置的实验研究大部分应用犬或猪模型,因为这些腹主动脉瘤的形状和大小与人体相似。

上述动脉瘤模型的建立可通过在腹主动脉植入一移植或在腹主动脉前壁植入移植补片,腔内支架移植可同时或以后放置使用^[15]。这种人工模型中使用的修补材料有许多,Dacron移植植入形成的动脉瘤在形状和大小上有一定优势,但腰动脉及肠系膜结肠动脉血运受到影响,前壁植入移植补片可避开这些动脉开口。使用空肠和静脉进行前壁补植形成的动脉瘤能持续扩张但容易破裂。筋膜补片可由直肠鞘等塑成并且很少有破裂的倾向。

通过腔内技术建立的动脉瘤模型避免了腹腔和主动脉切开。单纯气囊血管成形术甚至在很高的压力下并不产生动脉瘤,但能模拟急性动脉破裂时支架移植物的展开与放置。如果气囊扩张后放置一气囊扩张过的支架,动脉瘤可形成并保持,瘤体内衬以内皮化的金属支架而不是原来主动脉壁,这对后来的支架移植释放和固定的影响尚不清楚^[16]。

4 血流动力学诱导性动物模型

血流改变和梗塞后动脉扩张是一种常见现象。这种特征提示人们采用肾动脉间主动脉部分结扎的方法建立一种腹主动脉瘤动物模型,结果产生主动脉扩张和肾动脉高压;结扎时使用棉线来诱导炎症反应对动脉瘤形成明显重要。

猕猴胸主动脉梗塞后扩张也被用来研究蛋白酶活性变化。该模型先行胸主动脉中部梗塞,3个月内随着动脉扩张胶原蛋白酶活性增强。因而推测在腹主动脉瘤形成中蛋白酶活性增高是扩张的结果而不是扩张的原因,血流动力学诱导的动物模型并不代表典型的梭形腹主动脉瘤,因为这种瘤体邻近的梗塞在人体极少发生^[8]。

另有人对犬肾下腹主动脉进行近端结扎,腔内灌注弹力蛋白酶,同时比较髂动脉单、双侧结扎主动脉扩张情况,并利

用磁共振技术,从动脉压、切应力及湍流三者结合的角度观测腔内血流动力学改变。但是这种模型明显缺陷在于受蛋白酶和血流改变双重因素的干扰,因而不能单纯地进行腹主动脉瘤的病因学研究,但它仍然适合腔内支架移植及血管镜技术的研究与开发。

5 现有模型存在的不足

人体腹主动脉瘤的一个主要特征就是腔内血栓形成,而几乎所有小动物动脉瘤模型不能模拟人体所具备的这一重要病理改变。人体标本的体外研究表明,这种血栓占据了腹主动脉瘤大部分囊腔,结构相当异常,因为它具有典型的纤维蛋白网眼与小管以及许多炎性细胞,近腔侧血栓通常形成许多层有组织的结构,其典型表现为少量细胞、纤维蛋白性细胞外基质、脂肪积累和偶然钙化^[17,18]。虽然在某些小动物模型中能出现某种程度的腔内血栓,但似乎仅由于内膜损伤区纤维蛋白沉积所致,而不具备人体的复杂的病理组织特征。至于这种腔内血栓在腹主动脉瘤形成发展中的作用,有人认为它能降低瘤壁的张力而具有明显的保护作用^[19];亦有人认为它可能作为纤维蛋白溶解活性物质的储存池或者妨碍动脉壁的氧化作用,从而影响动脉壁的扩张^[20]。

遗传倾向性动物模型中,Apoe^{-/-}小鼠可形成动脉硬化及假性动脉瘤,但不能形成典型的腹主动脉瘤;而Apoe^{-/-}Plat^{-/-}腹主动脉直径为Apoe^{-/-}Plat^{+/+}的一倍,但这种增大并不象人体腹主动脉瘤呈渐进性扩张直至破裂。因此该模型尚不够成熟,且技术要求特别高而缺乏可行性。通过弹力蛋白酶或CaCl₂破坏性作用诱导腹主动脉局部扩张,在一定程度上影响了内源性病因学研究,因此该模型主要用于物理学病因及腔内技术开发的研究;并且这种方法在某些大动物如猪体内并不能形成动脉瘤。血流动力学诱导性动物模型,通过肾动脉间主动脉结扎,形成狭窄后的扩张,但这种扩张临近处并存狭窄在人体腹主动脉瘤中很少存在。

供腔内支架移植研究的动物模型利用移植或腔内技术在大动物体内建立,它们侧重于动脉瘤形态上与人体的相似性,并且对人体动脉瘤腔内修补早期技术并发症的降低有意义,如支架展开失败、不成功的放射学隔绝等,其中某一种失败可预测一些晚期并发症,但该模型病理过程与人体腹主动脉瘤有较大差距,不能复制出人体这种疾病的许多特征,例如动脉硬化、中膜破坏、外膜炎及腔内血栓形成。并且在评价腹主动脉瘤腔内隔绝术长期疗效及并发症(如内瘘)的处理中尚有不足,如用牛的颈内静脉或人工血管间置形成的腹主动脉瘤动物模型,腰动脉及肠系膜下动脉被结扎,不存在腰动脉或肠系膜下动脉返流造成内瘘的可能性。用Dacron补片或气囊扩张形成的腹主动脉瘤动物模型较少具有破裂的可能性,并且仅能通过瘤腔内测压评价腔内隔绝术治疗效果。而相比之下,全层空肠壁补片建立的腹主动脉瘤模型能满足形态学上的要求,但又有趋于破裂的倾向。因此,这些模型在评价腔内技术的远期疗效及并发症的处理上仍有不足。

6 小 结

目前现有模型尚不能完全复制人体腹主动脉瘤的病理改变,但适当的动物模型发展将大大推动对腹主动脉瘤的了解与防治。通过上述模型的研究,动脉壁炎症和蛋白溶解的重要病因学作用已得到充分肯定,但是动脉硬化和腔内血栓在动脉瘤发展中的作用还未得到完全证实。人体腹主动脉瘤几乎总是伴随动脉硬化发生,而只有 $Apoe^{-/-}$ 等位基因缺陷小鼠和猕猴粥样斑块退化模型能复制出真正的动脉硬化伴随主动脉扩张。腔内血栓是人体腹主动脉瘤另一个主要特征,但这种复杂的病理组织表现不能在动物模型上形成,因而限制了我们对血栓与血管壁之间相互作用的理解。另外,利用适当的大动物模型测试腔内血管设置与装备目前是可行的,然而这些模型仍然有待于进一步改进和提高。

参考文献

- [1] Carrel TW, Smith A, Burnand KG. Experimental techniques and models in the study of the development and treatment of abdominal aortic aneurysm [J]. *Br J Surg*, 1999, **86**: 305- 312
- [2] Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, et al. Urokinase- generated plasmin activated matrix metalloproteinases during aneurysm formation [J]. *Nat Genet*, 1997, **17**: 439- 444
- [3] Moons L, Shi C, Ploplis V, et al. Reduced transplant arteriosclerosis in plasminogen- deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 1998, **102**: 1 788- 797
- [4] Allaire E, Bruneval P, Mandet C, et al. The immunogenicity of the arterial extracellular matrix in arterial xenografts [J]. *Surgery*, 1997, **122**: 73- 81
- [5] Allaire E, Hasenstab D, Kenagy RD, et al. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor- 1 [J]. *Circulation*, 1998, **98**: 249- 255
- [6] Allaire E, Forough R, Clowes M, et al. Local overexpression of TIMP- 1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model [J]. *J Clin Invest*, 1998, **102**: 1 413- 420
- [7] Nishijo N, Sugiyama F, Kimoto K, et al. Salt- sensitive aortic aneurysm and rupture in hypertensive transgenic mice that overproduce angiotensin II [J]. *Lab Invest*, 1998, **78**: 1 059- 066
- [8] Zarins CK, Glagov S, Vesselinovitch D, et al. Aneurysm formation in experimental atherosclerosis: relationship to plaque evolution [J]. *J Vasc Surg*, 1990, **12**: 246- 256
- [9] Laarhoven CJ, Borstlap AC, Henegouwen DP, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysm [J]. *Eur J Vasc Surg*, 1993, **7**: 386- 390
- [10] Anidjer S, Salzmänn JL, Gentric D, et al. Elastase- induced experimental aneurysms in rats [J]. *Circulation*, 1990, **82**: 973- 981
- [11] Marinov GR, Marois Y, Paris E, et al. Can the infusion of elastase in the abdominal aorta of the Yucatan miniature swine consistently produce experimental aneurysm [J]? *J Invest Surg*, 1997, **10**: 129- 150
- [12] Origuchi N, Shigematsu H, Izumiyama N, et al. Aneurysm induced by periarterial application of elastase heals spontaneously [J]. *Int Angiol*, 1998, **17**: 113- 119
- [13] White JV. Aneurysm formation in vivo by the topical degradation of adventitial elastin [J]. *J Vasc Surg*, 1994, **20**: 153- 155
- [14] Freetone T, Turner RJ, Higman DJ, et al. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 10- 17
- [15] Ruiz CE, Zhang HP, Butt AI, et al. Percutaneous treatment of abdominal aortic aneurysm in a swine model: understanding the behavior of aortic aneurysm closure through a serial histopathological analysis [J]. *Circulation*, 1997, **96**: 2 438- 448
- [16] Hallisey MJ. A transluminally created abdominal aortic aneurysm model [J]. *J Vasc Interv Radiol*, 1997, **8**: 305- 312
- [17] Stehbins WE. Observation on the development of mural thrombi in chronic experimental aneurysms in sheep [J]. *Thromb Haemost*, 1997, **78**: 952- 957
- [18] Adolph R, Vorp DA, Steed DL, et al. Cellular content and permeability of intraaluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm [J]. *J Vasc Surg*, 1997, **25**: 916- 926
- [19] Inzoli F, Boschetti F, Zappa M, et al. Biomechanical factors in abdominal aortic aneurysm rupture [J]. *Eur J Vasc Surg*, 1993, **7**: 667- 674
- [20] Vorp DA, Federspiel WJ, Webster MW. Dose laminated intraluminal thrombus within abdominal aortic aneurysm cause anoxia of the aortic wall [J]? *J Vasc Surg*, 1996, **23**: 540- 541

(此文 2000- 08- 14 收到, 2001- 07- 01 修回)

(此文编辑 朱雯霞)