

## 两种实验性腹主动脉瘤大鼠模型的比较

吴建秋, 景在平

(第二军医大学附属长海医院血管外科, 上海 200433)

[主题词] 主动脉瘤, 腹; 疾病模型, 动物; 金属蛋白酶, 基质

[摘要] 为探讨和比较两种腹主动脉瘤大鼠模型特征, 以便进一步为腹主动脉瘤体内研究提供基础, 选取 SD 大鼠肾下腹主动脉猪胰腺弹力蛋白酶恒压灌注, 或使用豚鼠肾下腹主动脉正位替换。利用特殊染色和免疫组化技术, 分别于术后 2 周和 4 周, 观察腹主动脉形成率、形态学变化及基质金属蛋白酶水平。结果发现, 64% 酶灌注大鼠和 88% 异种移植大鼠形成腹主动脉瘤, 均无出血或腔内血栓形成。与灌注型腹主动脉瘤相比, 移植型腹主动脉瘤壁损伤更为严重, 基质金属蛋白酶 2 及基质金属蛋白酶 9 表达也显著增高。证明两种方法均能诱导腹主动脉瘤形成, 但以移植模型更为稳定可靠。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

### Comparison on the Two Experimental Models of Abdominal Aortic Aneurysm in Rats

WU Jianqiu, JING Zai-Ping

(Department of Vascular Surgery, Changhai Hospital, Secend Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[MeSH] Aortic Aneurysm, Abdominal; Disease Model, Animal; Metalloproteinase, Matrix

[ABSTRACT] **Aim** To compare and contrast two kinds of abdominal aortic aneurysm(AAA) model of rats, and thus to establish the foundation for the further study of AAA in vivo. **Methods** Commercially available porcine pancreatic elastase was infused into the SD rat abdominal aorta, or orthotopic engraftment of guinea pig aorta was transplanted into the SD rat abdominal aorta. The patency, and macroscopic, microscopic morphologic and matrix metalloproteinase(MMP) changes that occurred in xenografts and the controls were compared postoperative 2 weeks or 4 weeks. **Results** There were AAA formation in 64 percent infused rats and 88 percent transplanted rats, without haemorrhage and intraluminal thrombus. In comparison to the AAA induced by elastase, the lesions of AAA walls after xenograft were more serious and the expression of MMP-2 and MMP-9 were remarkably increased. **Conclusions** Both of the methods may induce AAA, but xenograft model has higher stability and reliability.

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)发病机理及化学或生物学治疗的实验研究通常使用弹力蛋白酶灌注的大鼠模型, 其诱发机制主要是通过弹力蛋白降解作用, 削弱腹主动脉的抗压性, 导致局部扩张<sup>[1]</sup>。然而该模型存在弹力蛋白酶灌注压力、灌注量与时间以及继发性炎症反应等多因素影响, 并且腹主动脉扩张率也存在较大差异。为寻找诱发因素单一且有理想拟人性的 AAA 模型, 本实验利用显微血管吻合技术, 成功地制作了一种新型 AAA 大鼠异种移植模型供研究用<sup>[2]</sup>, 并与上述传统模型进行了比较研究, 现予报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 建立异种移植大鼠腹主动脉瘤模型

[收稿日期] 2002-01-22 [修回日期] 2002-06-25

[基金项目] 国家自然科学基金(39770721)资助。

[作者简介] 吴建秋, 女, 1970 年出生, 医学博士, 主要从事主动脉瘤发病机制的研究; E-mail: jianqiu\_wu@yahoo.com。

1.1.1 动物与分组 供体与受体分别为豚鼠和 SD 大鼠, 雄性, 350~400 g, 购自上海必凯实验动物公司, 无特殊病原体级饲养于本校东方肝胆医院动物中心, 移植前后普通饮食, 未用免疫抑制剂及抗生素等治疗。按移植类型分组: ①异种移植组: 豚鼠—SD 大鼠腹主动脉移植; ②对照组: SD 大鼠自体腹主动脉离断后复位。每组 10 只, 共 2 批。

1.1.2 移植物制备与移植 切取供体豚鼠肾下腹主动脉 1 cm, 25 ku/L 无菌肝素钠生理盐水灌注漂洗 2 次, 4℃保存 30 min 内备用。受体 SD 大鼠肾下腹主动脉暴露后, 在肾动脉下与主动脉分叉以上阻断血流, 切除 1 cm 主动脉, 移植物以正位放置, 手术显微镜下以 10/0 锦纶单丝缝线进行两断端间断缝合, 无扭曲。腹主动脉阻断时间控制在 50 min 内, 最短为 30 min。复通后移植物及远端吻合口以下主动脉血流通畅, 充盈度好。

### 1.2 建立弹力蛋白酶大鼠腹主动脉瘤模型<sup>[1]</sup>

SD 大鼠分组: 实验组: 2 mL 猪胰腺弹力蛋白酶(Sigma 公司产品, 生理盐水稀释为 25 ku/L), 以微

量注射泵恒压灌注腹主动脉 2 h; ④对照组: 2 mL 生理盐水腹主动脉恒压灌注 2 h。每组 10 只, 共 2 批。

### 1.3 形态学研究

分别于术后 2 周(灌注组)或 4 周(移植组), 剖腹用游标卡尺观测移植物外径及通畅情况, 以腹主动脉直径扩张 100% 以上为腹主动脉瘤诊断标准。然后用 10% 福尔马林 11.97 kPa 灌注 30 min, 切取腹主动脉(瘤)石蜡包埋备用。④组织切片与染色: 连续纵向切片(5  $\mu$ m), HE 染色观测中膜厚度、管腔面积、炎性细胞浸润以及中膜有核细胞密度(nuclear cell density, NCD;  $n/\times 400$ )及排列等; VG 染色观察弹力、胶原蛋白变化。④炎性细胞浸润分级: 0 级, 无炎性细胞浸润; 1 级, 炎性细胞 200 个以下; 2 级, 炎性细胞 200~400 个; 3 级, 炎性细胞 400~600 个; 4 级, 炎性细胞 600 以上。所有切片双人计数和分析。

### 1.4 免疫组织化学染色

采用小鼠抗大鼠基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 2 和 MMP-9 单克隆抗体(Dako 公司产品), 利用常规亲合素-生物素-过氧化物酶技术, 进行 MMP-2 和 MMP-9 定性定位。进一步利用计算机图像分析系统(CA6300 彩色图像采集卡、通用颗粒图像分析系统软件及德国莱卡 QWin 彩色图像分析软件), 检测阳性蛋白相对面积(S%)。HE 切片

随机测量移植物内外径、管壁中膜厚度以及腔面积, 单一特殊染色切片测量弹力纤维相对面积(Aa%)。

### 1.5 统计学方法

各计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 利用 SPSS 10.0 软件行方差分析, 两组变量的关系用直线相关回归分析。

## 2 结果

### 2.1 腹主动脉瘤形成率及大体形态变化

异种移植术后 4 周存活 17 只, 术后 1 d 死于动脉栓塞 1 只, 术后 26、28 d 因扩张移植物破裂出血死亡各 1 只。存活受体 15 只形成 AAA, 2 只移植物栓塞。弹力蛋白酶灌注组术后 2 周存活 16 只, 术后 2~4 d 死亡 4 只, 均为腹主动脉及以下各分支动脉闭塞所致, 无动脉破裂。因此, 异种移植组 AAA 形成率(88%) 高于酶灌注组(62%)。同时在移植组, 可见移植物与下腔静脉粘连严重, 主动脉表面不平, 纤维化不明显, 直径为移植前的 4~7 倍; 半数以上瘤颈扭曲, 瘤体成角。剖视腔内无血栓, 吻合口无狭窄。而在蛋白酶灌注组, 实验段腹主动脉表面炎症反应亦比较明显, 其外径较各对照组均有明显降低( $P < 0.01$ ), 两实验组间比较又以移植性 AAA 显著( $P < 0.05$ )。各对照组腹主动脉周围粘连较轻, 直径增大不明显或不增大(表 1, Table 1)。

表 1. 大鼠腹主动脉(瘤)形态定量特征.

Table 1. Morphologic characteristics of abdominal aortic (aneurysm) in two rat models ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ ).

Groups	Extra diameter (mm)	Thickness of media ( $\mu$ m)	Cross sectional area of lumen ( $\text{mm}^2$ )	Content of elastin (Aa%)	NCD ( $n/\times 400$ )
Xenografted AAA	8.14 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	83.4 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup>	27.32 $\pm$ 5.31 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>
Infused AAA	4.62 $\pm$ 2.23 <sup>ab</sup>	72.3 $\pm$ 37.6 <sup>a</sup>	9.87 $\pm$ 3.90 <sup>ab</sup>	6.1 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>
Xenografted control	1.61 $\pm$ 0.44	193.5 $\pm$ 58.1	1.06 $\pm$ 0.15	28.9 $\pm$ 2.7	27.5 $\pm$ 2.8 <sup>c</sup>
Infused control	1.52 $\pm$ 0.64	177.8 $\pm$ 75.4	0.89 $\pm$ 0.32	31.5 $\pm$ 7.8	28.4 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>
Normal control	1.30 $\pm$ 0.52	207.9 $\pm$ 28.5	1.28 $\pm$ 0.21	34.2 $\pm$ 3.5	31.7 $\pm$ 2.7

a:  $P < 0.01$ , compared with each of three control groups; b:  $P < 0.05$ , compared with xenografted AAA group; c:  $P < 0.05$ , compared with normal group.

### 2.2 弹力蛋白降解、中膜有核细胞密度及炎性细胞浸润程度

两实验组腹主动脉横切面上, 中膜厚度及弹性纤维前、后及两侧 4 个周相上显著不均匀, 腹主动脉前壁损伤性变化最大, 后壁最小。在移植组, 弹力蛋白明显变细、僵直, 蛋白层间距离明显增大, 层次清楚, 几乎无蛋白连接, 以前周相断裂最为严重。而在酶灌注组, 弹力蛋白自然曲度尚存, 残存层次间距离与对照组相似, 尚有细蛋白连接成网络, 但层次明显

不清, 大部分断裂、碎片或缺如(图 1, Figure 1)。半定量分析(表 1)灌注组、移植组与各对照组相比均有显著差异, 但组间差异不显著; 并且两实验组弹力蛋白降解与各自诱导的主动脉直径呈现明显负相关(移植组  $r = -0.83$ , 灌注组  $r = -0.92$ )。另外, 与各对照组相比, 中膜有核细胞密度明显降低(表 1), 尤其以移植组 AAA 为甚, 有核细胞排列紊乱, 部分为核碎片残留, 严重者整个平滑肌层完全消失, 被消化的中膜由一种均质红染的无定形物质替代。

两实验组炎性细胞浸润均以内外膜为主, 严重者在内膜的内外膜侧有部分炎性细胞渗入, 甚或贯穿全层主动脉壁; 但炎性细胞浸润程度在移植组为 2~3 级, 而在酶灌注组为 1~2 级; 两对照组仅少量

存在于外膜或内膜腔侧, 浸润程度在 0~1 级; 正常对照组为 0 级。另外, 在上述炎性细胞浸润区有不同程度血管增生, 以外膜为主, 两实验组相比又以移植 AAA 更为明显(图 1, Figure 1)。

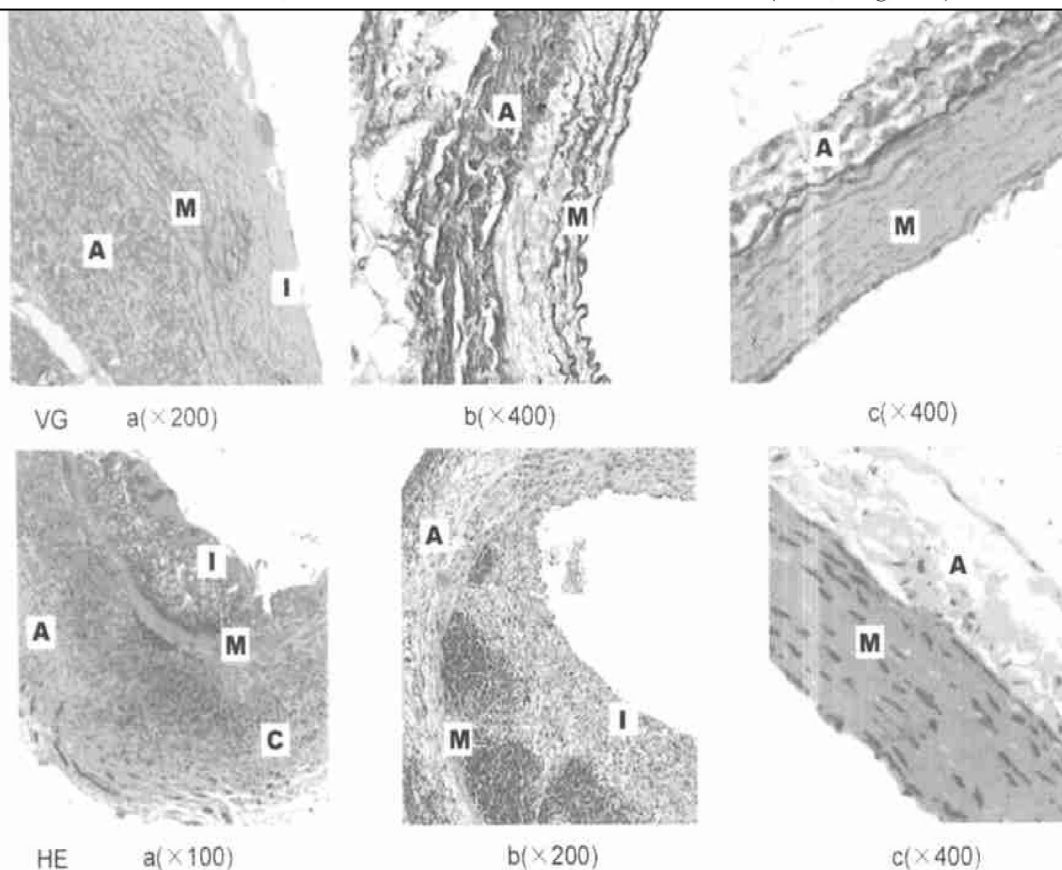


图 1. 大鼠腹主动脉(瘤)组织形态学变化.

Figure 1. Histologic microscopic change of abdominal aortic (aneurysm) in two rat models after HE and VG staining. a: xenograft

AAA, b: infused AAA, c: normal control; A: adventitia, M: media, I: intima, C: capillary vessel.

表 2. 大鼠腹主动脉(瘤)基质金属蛋白酶 2 和 9 蛋白表达水平.

Table 2. Levels of MMP-2 and MMP-9 of abdominal aortic (aneurysm) in two rat models ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ ).

Groups	MMP-2	MMP-9
Xenografted AAA	21.10 $\pm$ 7.12 <sup>a</sup>	28.38 $\pm$ 5.66 <sup>a</sup>
Infused AAA	24.10 $\pm$ 4.68 <sup>b</sup>	29.82 $\pm$ 5.04 <sup>a</sup>
Xenografted control	3.01 $\pm$ 1.34	1.98 $\pm$ 0.66
Infused control	3.55 $\pm$ 1.52	2.14 $\pm$ 1.09
Normal control	1.82 $\pm$ 0.55	0.41 $\pm$ 0.26

a:  $P < 0.01$ , compared with each of three controls; b:  $P > 0.05$ , compared with xenografted AAA group.

### 2.3 基质金属蛋白酶的蛋白表达

通过免疫组化染色计数与计算机图像半定量分析相结合的方法, 分别测定腹主动脉(瘤)壁 MMP-2、MMP-9 含量。结果发现正常腹主动脉含有极少量的

MMP-2 而无 MMP-9 表达, 两实验对照组 MMP-2、MMP-9 均有轻度增高, 但与正常腹主动脉无显著差异。在移植组 AAA, MMP-2、MMP-9 呈局灶性、片状或较弥漫的细胞质内染色, 以内外膜分布为主, 增生小血管周围阳性细胞表达增强。而在酶灌注组 AAA, MMP-9 以外膜分布为主, MMP-2 则以中膜分布为主, 高于移植组 AAA ( $P > 0.05$ ); MMP-2 和 MMP-9 在 AAA 壁全层含量无显著差异 ( $P > 0.05$ , 表 2, Table 2)。

### 3 讨论

弹力蛋白酶诱导大鼠 AAA 形成是目前应用最为广泛的模型, 用来研究 AAA 病理生理机制和体内治疗对策。我科自 1997 年以来建立和使用该模型进行了弹力蛋白与胶原蛋白定量、MMP 表达及其抑制剂作用以及血管平滑肌细胞凋亡等方面的研究,

证明该模型具有良好的拟人性和较高的成瘤率,一定程度上促进了对该疾病发病机制的理解<sup>[1]</sup>。然而随着实验不断开展,我们也发现弹力蛋白酶来源与批号不同,成瘤率存在较大差异;并且随着灌注时间、药物浓度、灌注压力改变以及术后观察时间的不同,除了导致腹主动脉扩张率明显差异外,还存在弹力蛋白酶直接降解、灌注压力以及继发炎症反应等因素的交叉影响。最新研究也证实<sup>[3]</sup>,尽管弹力蛋白酶能降解弹力蛋白,但单纯灌注并不能有效地诱导实验性 AAA 的形成。除了上述因素外,所诱导的腹主动脉局部扩张与弹力蛋白溶解活性不相关;并且模型大鼠腹主动脉瘤短期内可自愈,而在大动物体内难以形成。因而,该模型形成因素不单一,一定程度上影响了内源性病因学研究;寻求更为稳定、理想并可用于本病发病机理研究的新型动物模型迫在眉睫。

豚鼠一大鼠间心脏、肾脏等实质器官移植以及血管同种异体移植都表明,免疫炎症反应是移植排斥的主要原因,它可引起移植血管壁慢性损伤与重构。移植供—受体间种系发生距离能加速炎症细胞聚集到内外膜,促进单核巨噬细胞穿透入中膜,从而可能加速中膜弹力蛋白降解<sup>[4]</sup>。人体 AAA 体外研究也证实慢性炎症的普遍存在<sup>[5]</sup>。因此我们选用豚鼠(兔科)和 SD 大鼠(鼠科)作为移植供、受体,两种系发生距离较大,供体腹主动脉壁的细胞及细胞外基质免疫原性较强,在受体内诱发这样的病理过程:一方面,免疫炎症细胞浸润产生大量 MMP,构成对弹力蛋白的直接破坏;另一方面,随着大量炎症细胞的涌入,产生的炎症介质和细胞因子等对平滑肌细

胞有细胞毒作用,导致平滑肌细胞严重损伤以致凋亡或坏死<sup>[2]</sup>,并且损伤的平滑肌细胞也是 MMP 又一重要来源,加重中膜结构破坏。另外,以外膜为主的大量小血管增生,新生内膜粥样硬化及斑块破裂等损伤,都为炎症细胞大量涌入提供可能;并且弹力蛋白降解产物又能诱导外膜新血管形成,加重免疫炎症反应,进而降低了主动脉粘弹性和抗压性,诱导移植主动脉的扩张与破裂、中膜平滑肌细胞密度降低及弹力蛋白降解等人体 AAA 主要病理学改变。

上述两模型均能较高程度地诱发 AAA,然而以移植模型占优势,主要在于炎症细胞浸润、中膜弹力蛋白与平滑肌细胞减少、MMP-2 与 MMP-9 表达增高以及小血管增生等程度均明显高于弹力蛋白酶灌注组,使主动脉壁的损伤尤为突出。另外,移植模型仅为免疫炎症诱发,这种单纯性避免了传统灌注模型的多因素干扰,也保证了该模型的稳定可靠性,有利于更好地开展 AAA 体内研究。

#### [参考文献]

- [1] 冯翔,赵君,景在平. 腹主动脉瘤动物模型的建立. 第二军医大学学报, 1999, 20 (11): 913
- [2] 吴建秋,景在平. 腹主动脉瘤发病中平滑肌细胞增殖与凋亡的关系. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (4): 281-284
- [3] Carsten CG, Calton WC, Johanning JM, et al. Elastase is not sufficient to induce experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*, 2001, 33 (6): 1255-262
- [4] Lorber MI, Wilson JH, Robert ME, et al. Human allogeneic vascular rejection after arterial transplantation and peripheral lymphoid reconstitution in severe combined immunodeficient mice. *Transplantation*, 1999, 67 (6): 897-903
- [5] Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, et al. Human abdominal aortic aneurysms, immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*, 1990, 137 (6): 1199-213

(此文编辑 曾学清)