

[文章编号] 1007-3949(2010)18-06-0421-04

• 实验研究 •

不同形态低切应力对小鼠腹主动脉重构及内皮 P 选择素表达的影响

刘莹¹, 李美瑜¹, 宾建国¹, 陈东东¹, 肖云彬¹, 吴爵非¹, 廖禹林², 宾建平¹

(南方医科大学 1. 南方医院心内科, 2. 病理生理教研室, 广东省广州市 510515)

[关键词] 低切应力; 血管重构; 内皮; P 选择素

[摘要] **目的** 制备小鼠腹主动脉狭窄的实验模型, 探讨短期不同形态的低剪切应力对动脉重建及内皮 P 选择素表达的影响。**方法** 24 只小鼠随机平均分为 3 个实验组 (1 h 组、4 h 组、24 h 组) 和 1 个正常对照组, 实验组用动脉银夹建立腹主动脉局部狭窄模型, 彩色多普勒超声检测狭窄近心端和远心端血流动力学参数, 计算切应力值; 血管标本行 HE 染色和内皮 P 选择素免疫组织化学染色, 定量分析动脉病理形态学的改变和半定量分析内皮 P 选择素表达的强度。**结果** 狭窄动脉近心端和远心端血流分别形成低切应力区和振荡性低切应力涡流区, 并且在所有观察点狭窄动脉近心端和远心端血管发生不同程度的动脉重建与内皮 P 选择素表达, 但近心端较远心端更明显 ($P < 0.05$)。**结论** 血流动力学改变在较短的时间内可引起动脉重构及内皮 P 选择素的表达, 而且不同形态低切应力导致的病变程度是不同的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Variant Patterns of Fluid Shear Stress on Vascular Remodeling and Endothelial P-Selectin Expression of Mice Abdominal Aorta

LU Ying¹, LIMeiYu¹, BIN Jian-Guo¹, CHEN Dong-Dong¹, XIAO Yun-Bin¹, WU Jue-Fei¹, LIAO Yu-Lin², and BIN Jian-Ping¹

(1 Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University; 2 Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] Low Shear Stress; Vascular Remodeling; Endothelium; P-Selectin

[ABSTRACT] **Aim** To create an animal model for local change of shear stress to analyze the arterial wall response at different patterns of fluid shear stress. **Methods** 24 mice were equally randomized into three groups (1 h group, 4 h group and 24 h group) and one normal control group. A stenosis was set up with a cast attached to the wall of the abdominal aorta to change flow condition in test group. The parameters of hemodynamics and the internal diameter of blood vessel were measured by color Doppler flow imaging. The wall shear stress was calculated by Poiseuille hydrodynamics formula ($\tau_w = 4 \times \eta \times V_m / D$). Pathological examination and immunohistochemistry were performed to observe the arterial morphological changes and the endothelial P-selectin expression. The intima-media thickness and adventitia thickness of the aorta were measured and endothelial P-selectin expression intensity was analyzed qualitatively. **Results** Regions of low shear stress and oscillatory shear stress were created upstream and downstream of the cast respectively. Vascular remodeling and P-selectin expression in the upstream arterial wall were much more severe than those in the downstream in all observed time-points ($P < 0.05$). **Conclusion** Vascular remodeling and endothelial P-selectin expression could happen in a relative short time when it exposed under low shear stress, meanwhile the variant patterns of fluid shear stress may play different roles in the pathological process of artery.

血流动力学与心血管疾病关系极为密切, 局部的切应力改变会导致相应部位的结构和功能变化, 特别是在某些低剪切应力区域 (如动脉分支外壁、

弯曲内壁、颈动脉窦及腹主动脉等部位) 血管性疾病更易形成。血管壁切应力的增大或减低, 血流形态异常如非层流、湍流及边界层血流分离等血流动力学因素均可能与动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 病变密切相关^[1-4], 但由于血流动力学的复杂性和切应力形态的多样性, 目前研究多只模拟简单流动条件下切应力对动脉粥样斑块形成和发展的影响^[5-6], 而有关血流动力学变化早期不同形态的流体切应力对动脉结构和功能的影响研究相对较少。为此, 我们拟通过建立腹主动脉局部狭窄动物模型,

[收稿日期] 2010-04-23 [修回日期] 2010-06-15

[基金项目] 国家“863”科技项目 (2006AA02Z478); 国家自然科学基金 (30870722)

[作者简介] 刘莹, 硕士, 医师, E-mail 为 liuying20021009@163.com。廖禹林, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心力衰竭, E-mail 为 liaoyulin@yahoo.com。通讯作者宾建平, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为超声分子影像, E-mail 为 jianpingbin@126.com。

导致同一段平直血管上形成近似层流低切应力区和振荡性低切应力涡流区,以探讨血流动力学改变早期不同形态的低剪切应力对动脉重建及内皮 P 选择素表达的影响,来进一步阐明血流动力学在血管病变中引起的生物学效应。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性昆明小白鼠(购自南方医科大学实验动物中心)24只,体重 18.0 ± 2.0 g 随机平分为正常对照组及狭窄 1 h、4 h 和 24 h 组。内径 0.1 mm 的动脉银夹(上海奥尔科特);大鼠抗小鼠 CD62P 一抗(BD 公司);HE 染液、山羊血清封闭液、PBS 粉和大鼠二步法二抗工作液等(北京中杉金桥)。

1.2 动物模型制备

参考 Cheng 等^[7]方法建立腹主动脉局部狭窄模型,形成不同形态的低切应力血流区。小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,医用胶布仰卧位固定四肢,腹部皮肤去毛,取正中中线剪开皮肤及腹壁,移开肠腔并用盐水纱布保湿,充分显露腹腔后壁分离肾动脉分支与髂动脉分叉之间的腹主动脉,并在中间放置内径 0.1 mm、宽 0.3 mm 的动脉银夹(对照组无),小心回置肠腔,丝线缝合切口关闭腹腔。术后动物注意保暖观察,分别于狭窄后 1 h、4 h 和 24 h 后行彩超检查,再从原切口开腹,从心脏采血 1 mL 置抗凝管待测血黏度,暴露腹主动脉,用冰丙酮灌注固定后取下动脉银夹,小心取出分离好的腹主动脉,即刻液氮速冻,待冰冻切片染色观察。

1.3 血流动力学参数测定

采用德国西门子 Sequoia512 超声诊断仪, CPS 成像模式, 17L5HD 线型探头,探头发射和接收频率分别为 7.0 和 14.0 MHz,机械指数为 0.18,超声图像保存设定为 125 ms/帧。将探头置于小鼠腹部,行二维彩色血流分布特征检测腹主动脉确定血管走向,保持探头与血流方向垂直,分别测量狭窄上游和狭窄下游 5 mm 内血流动力学参数如舒张期末血管内径(D)、最大血流速度(V_m),每只小鼠测 10 次最后取平均值。抗凝血 4 h 内用毛细血管黏度计测量血液黏稠度(η)(低切)。根据公式^[8]($\tau_m = \eta \times 4 \times V_m / D$)计算血流剪切应力(τ_m)。

1.4 动脉病理形态学观察

采用冰冻切片常规 HE 染色方法。5 μ m 不连续切片,4℃冰丙酮固定 30 s 稍水洗,苏木素液染色 40~60 s 后水洗 5~10 s(必要时 1% 盐酸酒精分化

温水返蓝),伊红滴上后速洗,梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,每个组织狭窄近心端和远心端分别随机抽取 4 张切片样本光镜下观察拍片,并测量内膜中膜厚度(MT)及外膜厚度。

1.5 免疫组织化学染色检测内皮 P 选择素的表达

采用二步法^[9],各组均在同一条件下检测 P 选择素表达。5 μ m 冰冻切片置室温 30 min,4℃冰丙酮固定 10 min(PBS 洗 5 min \times 3 次),加 H_2O_2 室温 10 min 阻断内源性过氧化物酶活性(PBS 洗 5 min \times 3 次),5%~10% 山羊血清封闭 10 min 倾去勿洗,滴加大鼠抗小鼠 CD62P 一抗或 PBS 置 4℃冰箱过夜后室温复温 30 min(PBS 洗 5 min \times 3 次),加大鼠二步法二抗工作液室温 30 min, DAB 显色,苏木素复染,脱水透明后封片观察拍片。每个标本狭窄近心端和远心端分别随机抽取 4 张不连续的切片进行半定量分析,根据内皮 P 选择素的表达情况分为 4 个等级强度(范围用 AutoCad 2004 软件测量):肉眼观察内皮无明显黄棕色沉积为阴性(-);有微弱黄棕色沉积,和/或范围小于内皮的 25% 为弱阳性(+);黄棕色沉积明显,范围为内皮的 25%~50% 为阳性(+);黄棕色沉积明显,范围大于内皮的 50% 为强阳性(+++)。

1.6 统计学方法

使用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较使用 ONE-WAY ANOVA,差异若有统计学意义,再用 LSD 检验进行两两比较;多组等级资料(内皮 P 选择素免疫组织化学染色积分)的比较使用 Kruskal-Wallis H 检验,总体有差异后用 Mann-Whitney U 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血流动力学参数测定值

本文只测量到腹主动脉狭窄近心端血流动力学参数值,狭窄远心端因形成了振荡性涡流区,血流速度极低,超声的分辨率未能检测到其具体波形,切应力趋向于 0 各狭窄组近心端腹主动脉血流速度较正常对照组减小,切应力显著降低($P < 0.001$),而不同时间点狭窄组间差异无显著性(表 1)。

2.2 腹主动脉病理形态学观察

正常对照组血管内皮光滑完整,中膜含 3~4 层排列均匀的长梭形平滑肌细胞;而各狭窄组动脉均出现了形态学改变,管壁不均匀增厚,内膜-中膜凸向管腔,内皮及平滑肌细胞排列随血流发生适应性

改变, 内皮皱缩, 偶见胞核脱落, 平滑肌细胞增殖明显, 胞核由长梭状变为多层多形状, 排列逐渐紊乱 (图 1)。狭窄组近心端的 MT 及外膜均明显增厚, 而狭窄远心端以 MT 增厚为主, 各组管壁的形态学变化均以近心端为甚 ($P < 0.05$), 而各时间点近心端间或远心端间无明显差异 (表 2)。

表 1 腹主动脉狭窄近心端血流动力学参数 ($n=6$)

分 组	η (mPa·s)	V_m (mm/s)	D (mm)	τ_m (dyn/cm ²)
正常对照组	6.98 ± 0.43	49.87 ± 7.43	0.95 ± 0.08	14.68 ± 1.86
狭窄 1 h 组	7.28 ± 0.41	24.00 ± 3.99 ^a	0.92 ± 0.08	7.64 ± 1.19 ^a
狭窄 4 h 组	7.27 ± 0.47	25.37 ± 3.73 ^a	0.95 ± 0.06	7.86 ± 1.55 ^a
狭窄 24 h 组	7.33 ± 0.43	26.11 ± 4.38 ^a	0.95 ± 0.07	8.08 ± 1.60 ^a

a 为 $P < 0.001$ 与正常对照组比较。

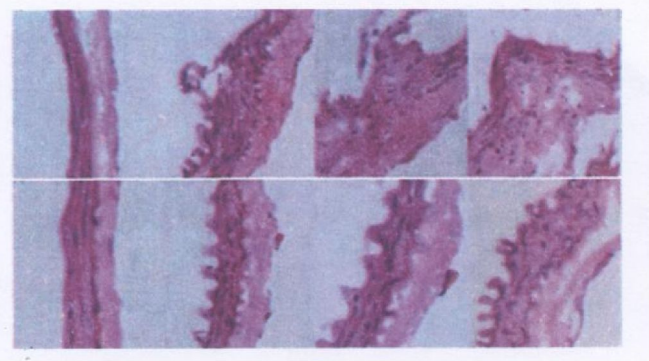


图 1 腹主动脉 HE 染色镜下观 ($\times 200$) 上图为狭窄近心端照片, 下图为狭窄远心端照片; 从左到右依次为正常对照组、狭窄 1 h 组、狭窄 4 h 组和狭窄 24 h 组。

表 2 腹主动脉狭窄近心端和远心端管壁厚度 (μm)

管壁厚	正常对照组	狭窄 1 h 组		狭窄 4 h 组		狭窄 24 h 组	
		近心端	远心端	近心端	远心端	近心端	远心端
MT	22.00 ± 3.54	81.91 ± 22.19 ^a	42.70 ± 7.37 ^{ab}	82.71 ± 24.39 ^a	46.36 ± 5.10 ^{ab}	82.55 ± 25.85 ^a	47.47 ± 4.75 ^{ab}
外膜厚度	28.75 ± 5.16	40.62 ± 9.61 ^a	24.84 ± 4.97 ^b	36.64 ± 9.24 ^a	27.39 ± 3.33 ^b	37.51 ± 9.58 ^a	29.47 ± 3.98 ^b

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.001$ 与同组近心端比较。

2.3 低切应力诱导动脉内皮 P 选择素的表达

免疫组织化学染色结果表明, 正常血管内皮无 P 选择素的表达, 但在狭窄动脉内皮有大量的 P 选择素表达, 而且主要表达于增厚的内膜, 并随形态学

改变程度的增加, 内膜中 P 选择素的表达增强 (图 2)。狭窄组近心端内皮 P 选择素免疫组织化学染色积分明显高于远心端 ($P < 0.05$), 而各狭窄时间点之间则差异无显著性 (表 3)。

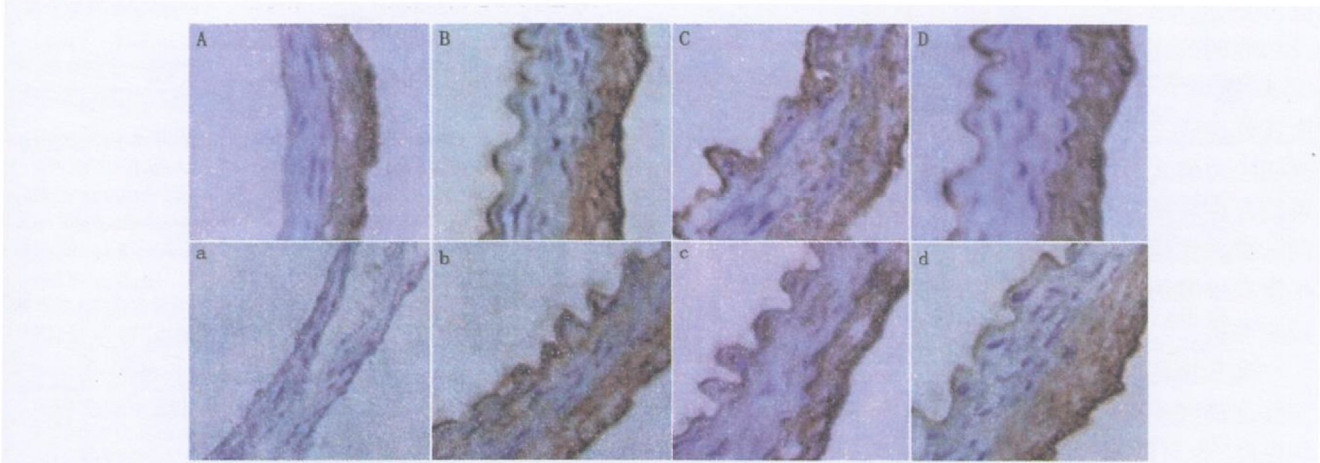


图 2 免疫组织化学染色检测内皮 P 选择素表达 ($\times 400$) A 为正常对照组, B、C、D 分别为狭窄 1 h、4 h 和 24 h 组近心端; a 为 PBS 阴性对照, b、c、d 分别为狭窄 1 h、4 h 和 24 h 组远心端。

3 讨论

由于超声分辨率的局限性, 本实验只能测得狭窄近心端层流的切应力值, 而远心端形成的振荡流区域在危当恒等^[10]对局部狭窄血管流畅分布的数

值模拟中已有证实, 狭窄远心端切应力先迅速下降接近于零, 尔后缓慢回升, 涡流强度随着狭窄出口流速的增加而增大。

有关研究发现低切应力作用 12 h 即可观察到

表 3 各组内皮 P 选择素免疫组织化学染色积分 (例)

分 组	—	±	+	++	平均秩次
正常对照组	24	0	0	0	21.00
狭窄 1 h 组 近心端	3	4	7	10	104.56 ^a
远心端	5	9	7	3	75.75 ^{ab}
狭窄 4 h 组 近心端	2	3	9	11	111.65 ^a
远心端	3	10	6	5	84.54 ^{ab}
狭窄 24 h 组 近心端	0	5	11	8	109.38 ^a
远心端	4	7	9	4	84.63 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比; b 为 $P < 0.05$ 与同组近心端比。

内皮形态的改变^[11], 作用 1 天后体外培养的动脉就发生了显著的结构重建。为进一步了解低切应力下动脉的早期病变, 本研究选择了 1 h、4 h 和 24 h 作为观察时间点, 结果发现流体切应力改变 1 h 狭窄近心端和远心端血管壁不均匀增厚, 内皮和平滑肌细胞的排列及形态也开始发生变化, 平滑肌细胞增殖明显, 胞核由长梭状变为多形状; 狭窄 4 h 重构继续发生, MT 增厚凸向管腔, 细胞不规则排列; 24 h 后观察结果相似, 细胞形态和排列更加紊乱; 病理图片分析显示, 狭窄近心端 MT 增厚远较狭窄远心端明显。可见, 血流动力学改变可较早地引起血管发生主动适应性重构, 不同流体形态的低切应力导致的病变程度也是不同的, 低切应力作用 1 h 动脉即发生形态学变化是一个主动代偿性重排的急性反应, 如果流场长期改变, 导致内皮细胞劳损引起形态及功能的改变和局部脂质沉积增加, 动脉终会发展成 As 斑块^[11]。Cheng 等^[12]研究也发现不同形态的血流低切应力导致的斑块组成与特性是不同的, 血流切应力的大小与方向对不同部位动脉内皮的影响可能存在着某种量化关系, 可能与血液流动通过不同的机械作用力激活相应信号通路调节血管内皮和平滑肌细胞的结构和功能使其与所处的力学环境相适应有关^[13], 潜在的分子机制还有待进一步研究。

低和振荡性剪切应力作用可使血管内皮细胞中某些促炎因子表达上调^[14], 从而激活相应的信号转导通路, 参与诱导炎症进展, 导致血管重构和 As 的形成。P 选择素在动脉病变早期对活化的血小板、白细胞与内皮细胞的黏附起决定性作用, 是启动动脉炎症反应并维持炎症状态的关键成分。本实验中, 低切应力作用 1 h、4 h 和 24 h 均有内皮 P 选择素的表达, 且重构较明显的狭窄近心端较远心端表达更强, 可能与内皮黏附分子对不同形态切应力的敏感性不同有关。但在增厚的内膜中膜内并没有发

现炎症细胞的浸润, 可能是该时期内皮表达的 P 选择素尚未具有介导白细胞的活性, 在低切应力持续作用下, 通过进一步的脂质堆积、内皮功能改变等引起炎症刺激内皮, 内皮才表达具有介导炎症细胞活性的 P 选择素。所以, 如果低切应力是 As 发生的始动因素, 内皮表达的 P 选择素则可能是 As 形成的枢纽之一。

总之, 血流动力学与动脉病变的发生具有时间和强度的选择性, 深入研究切应力引起的血管重建生物学效应和血流动力学变化的规律及其评价手段, 对了解和掌握心脑血管疾病的发病机制和早期预防有重要意义。

[参考文献]

- [1] Miyashiro JK, Poppa V, Berk BC. Flow-induced vascular remodeling in the rat carotid artery diminishes with age [J]. *Circ Res* 1997; **81** (3): 311-319
- [2] Boyd J, Buick J, Cosgrove JA, et al. Application of the lattice Boltzmann model to simulated stenosis growth in a two-dimensional carotid artery [J]. *Phys Med Biol* 2005; **50** (20): 4783-796
- [3] Cicha I, Yilmaz A, Suzuki Y, et al. Connective tissue growth factor is released from platelets under high shear stress and is differentially expressed in endothelium along atherosclerotic plaques [J]. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; **35** (1-2): 203-206
- [4] Chen J, Lu XY. Numerical investigation of the non-Newtonian pulsatile blood flow in a bifurcation model with a non-planar branch [J]. *J Biomech* 2006; **39** (5): 818-832
- [5] 程云鹏, 姜一农, 钱雪, 等. 罗格列酮对血流阻断 BALB/c 小鼠模型血管重构及内皮功能的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009; **25** (2): 383-385
- [6] 刘华, 王贵学, 叶林奇, 等. 一种可控的切应力及 LDL 浓度极化动物模型的建立及对动脉粥样硬化的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2009; **31** (20): 1981-985
- [7] Cheng C, van Haperen R, de Waard M, et al. Shear stress affects the intracellular distribution of eNOS: direct demonstration by a novel in vivo technique [J]. *Blood* 2005; **106** (12): 3691-698
- [8] 庄磊, 王伟娟, 刘涛, 等. 血流剪切力对动脉粥样硬化影响的临床研究 [J]. *中国医学影像技术*, 2006; **22** (6): 889-891
- [9] Eguchi H, Ikeda H, Murohara T, et al. Endothelial injuries of coronary arteries distal to thrombotic sites: role of adhesive interaction between endothelial P-selectin and leukocyte sialyl Lewis X [J]. *Circ Res* 1999; **84** (5): 525-535
- [10] 危当恒, 王贵学, 王佐, 等. 剪切应力对家兔血管内膜增生及动脉粥样硬化斑块形成的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (06): 410-414
- [11] Nichol JW, Petko M, Myung R J, et al. Hemodynamic conditions alter axial and circumferential remodeling of arteries engineered ex vivo [J]. *Ann Biom Eng* 2005; **33** (6): 721-732
- [12] Cheng C, Tempel D, van Haperen R, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress [J]. *Circulation* 2006; **113** (23): 2744-753
- [13] Chiu JJ, Chen L J, Chen CN, et al. A model for studying the effect of shear stress on interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells [J]. *J Biomech* 2004; **37** (4): 531-539
- [14] Siasos G, Tousoulis D, Siasos Z, et al. Shear stress, protein kinases and atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem* 2007; **14** (14): 1567-572

(此文编辑 许雪梅)