

# 钙盐浸润法制备腹主动脉瘤模型

陈 锋<sup>1</sup>, 朱鲜花<sup>1</sup>, 张振东<sup>2</sup>, 熊吉信<sup>1</sup>, 周为民<sup>1</sup>, 袁庆文<sup>1</sup>

(南昌大学第二附属医院 1. 血管外科, 2. 病理科, 江西省南昌市 330006)

[关键词] 氯化钙; 腹主动脉瘤; 动物模型

[摘要] **目的** 探讨氯化钙浓度对兔腹主动脉瘤模型建立的影响, 为腹主动脉瘤的实验研究提供基础。**方法** 选取雄性新西兰大白兔 30 只, 随机分成 3 组: 0.5 mol/L 氯化钙组、0.75 mol/L 氯化钙组和对照组, 分别用含 0.5 mol/L 氯化钙、0.75 mol/L 氯化钙和生理盐水海绵包绕浸润腹主动脉, 制备兔腹主动脉瘤模型。术后 6 周观察各组兔腹主动脉扩张率及动脉壁组织学变化。**结果** 0.5 mol/L 氯化钙组、0.75 mol/L 氯化钙组和对照组的腹主动脉扩张率分别为 87.31%、124.12% 和 12.10%, 各组间差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 0.75 mol/L 氯化钙组比 0.5 mol/L 氯化钙组具有更明显的弹性纤维破坏降解、平滑肌细胞减少、腹主动脉扩张。**结论** 0.75 mol/L 氯化钙浸润法是一种简单可行的兔腹主动脉瘤模型制备方法。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Use Calcium Salts Deposition Method to Establish Abdominal Aortic Aneurysm Model

CHEN Feng<sup>1</sup>, ZHU Xian-Hua<sup>1</sup>, ZHANG Zhen-Dong<sup>2</sup>, XIONG Ji-Xin<sup>1</sup>, ZHOU Wei-Min<sup>1</sup>, and YUAN Qing-Wen<sup>1</sup>

(1. Department of Vascular Surgery, 2. Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] Calcium Chloride; Abdominal Aortic Aneurysm; Animal Model

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of the concentration of calcium chloride on the establishment of abdominal aortic aneurysm model, and provide basis for the research on abdominal aortic aneurysm. **Methods** Thirty male New Zealand white rabbits were chosen and randomly divided into three groups, including experimental group one, experimental group two and control group. Their abdominal aorta were respectively underwent infiltration of 0.5 mol/L calcium chloride, 0.75 mol/L calcium chloride, and physiological saline. Six weeks later, the diameter of the aorta was measured, and the aortic tissue was exercised for histological examination. **Results** Dilatation rate of abdominal aorta of experimental group one, experimental group two and control group was 87.31%, 124.12% and 12.10% respectively. Compared with experimental group one, experimental group two had more significant destruction and degradation of elastic fiber, decrease of smooth muscle cell, and dilation of abdominal aorta. **Conclusion** Infiltration method with 0.75 mol/L calcium chloride is a simple, feasible method to establish rabbit abdominal aortic aneurysm model.

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)是一种严重的血管疾病,若发生破裂,死亡率高达50%~80%。随着人口老龄化和饮食结构的改变,AAA的发病逐年增多<sup>[1,2]</sup>。制备AAA动物模型对于研究人类AAA的发病机制和防治方法,具有重要的作用。为了简化模型制作难度、减少副损伤、降低死亡率,本研究采用氯化钙浸润法制备兔AAA模型,并探讨氯化钙浓度对兔AAA模型建立的影响,为AAA的实验研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康雄性新西兰大白兔 30 只(南昌大学医学院动物实验中心),体重 2~2.5 kg,;弹力纤维染色试剂盒和 Masson 氏三色染色试剂盒(福州迈新公司)。

### 1.2 动物分组

将动物随机分成 3 组:0.5 mol/L 氯化钙组、0.75 mol/L 氯化钙组和对照组,分别用含 0.5 mol/L

[收稿日期] 2011-05-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30901464);江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ10062)

[作者简介] 陈锋,主治医师,主要从事血管外科基础及临床研究,E-mail 为 cf970422@126.com。

氯化钙、0.75 mol/L 氯化钙和生理盐水的聚乙烯醇海绵包绕浸润腹主动脉制备兔 AAA 模型。

1.3 腹主动脉瘤模型的制备

雄性新西兰大白兔用 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉内注射麻醉,仰卧固定、备皮、消毒铺巾,取下腹正中切口约 5 cm,进腹后将肠管推向右侧,于腹主动脉前方剪开腹膜,用棉签、显微解剖镊仔细游离出肾动脉水平以下髂动脉水平以上腹主动脉段约 1 cm,分别用含 0.5 mol/L 氯化钙溶液、0.75 mol/L 氯化钙溶液、生理盐水的聚乙烯海绵完全包绕浸润游离的腹主动脉段,海绵外层再用无菌橡皮条包绕。浸润腹主动脉 30 min 后,生理盐水冲洗腹腔,逐层关腹,术后动物独笼饲养。造模 6 周后,实验兔再次麻醉、开腹,再次仔细游离出上述浸润的腹主动脉段,测量其直径,然后将其切取,用 4% 多聚甲醛固定,冰冻切片以备检测。

1.4 形态学观察

用游标卡尺分别于浸润前和取材前测量浸润段腹主动脉直径,计算腹主动脉扩张率。

1.5 病理组织学观察

取每一腹主动脉段直径最大处切片,厚 5 μm,分别行常规苏木素伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、弹力纤维染色 (弹性纤维染成深紫色) 和马逊 (Masson) 氏三色染色 (胶原纤维染成蓝色,弹性纤维染成紫红色,平滑肌细胞染成红色)。

1.6 统计学方法

所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS11. 5 统计软件进行统计分析,应用单因素方差分析进行各组样本均数的比较,组间两两比较应用 Student-New

man-Keuls 检验,两样本均数的比较应用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 腹主动脉大体形态改变

实验组兔腹主动脉周围炎症粘连,管壁增厚、钙化、僵硬粗糙,明显瘤样扩张。对照组兔腹主动脉周围粘连轻,管壁无增厚、无钙化、光滑弹性好,未见明显扩张 (图 1)。

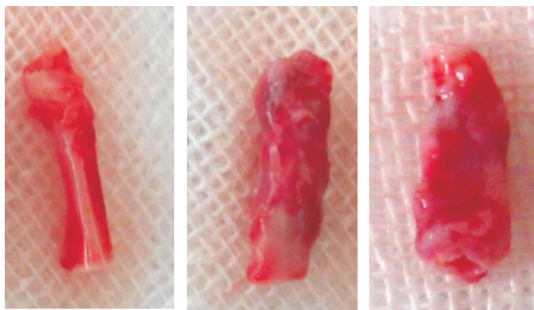


图 1. 腹主动脉大体形态改变 从左到右依次为对照组、0.5 mol/L 氯化钙组和 0.75 mol/L 氯化钙组。

Figure 1. Morphologic changes of abdominal aorta

2.2 腹主动脉扩张率和腹主动脉瘤形成率

造模 6 周后,0.5 mol/L 氯化钙组和 0.75 mol/L 氯化钙组兔腹主动脉均有明显扩张,平均扩张率为 87.31% 和 124.12%,0.75 mol/L 氯化钙组的扩张率明显高于 0.5 mol/L 氯化钙组 ( $P < 0.01$ )。以腹主动脉扩张 100% 以上为 AAA 诊断标准,对照组和 0.5 mol/L 氯化钙组均无 AAA 形成,0.75 mol/L 氯化钙组有 9 只有 AAA 形成,AAA 形成率为 90% (表 1)。

表 1. 兔腹主动脉扩张率和腹主动脉瘤形成率

Table 1. Dilated rate and formation rate of rabbit abdomial aorta

分 组	n	腹主动脉直径 (mm)		腹主动脉 扩张率 (%)	AAA 形成数 (只)	AAA 形成率
		浸润前	浸润后 6 周			
对照组	10	1.97 ± 0.11	2.21 ± 0.09	12.10 ± 1.98	0	0
0.5 mol/L 氯化钙组	10	1.89 ± 0.09	3.54 ± 0.11	87.31 ± 5.47 <sup>a</sup>	0	0
0.75 mol/L 氯化钙组	10	1.95 ± 0.12	4.37 ± 0.10	124.12 ± 8.11 <sup>ab</sup>	9	90%

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 0.5 mol/L 氯化钙组比较。

2.3 病理组织学改变

HE 染色可见,实验组兔腹主动脉管壁正常结构破坏,厚度增加,中膜平滑肌细胞排列紊乱,数量

减少,外膜大量炎性细胞浸润;对照组兔腹主动脉管壁结构正常,平滑肌细胞排列整齐,无明显炎症细胞浸润 (图 2)。

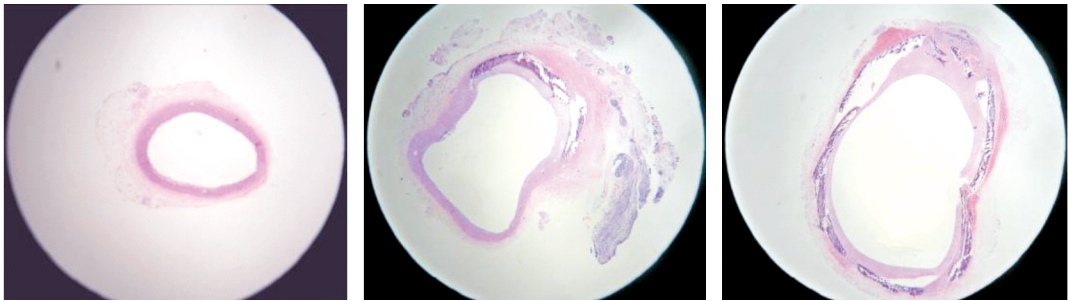


图 2. 腹主动脉的 HE 染色 从左到右依次为对照组、0.5 mol/L 氯化钙组和 0.75 mol/L 氯化钙组。

Figure 2. HE staining of abdominal aorta

弹力纤维染色可见,对照组兔腹主动脉中膜弹力纤维层完整,保持原有的曲度及连续性。与对照组相比,实验组兔腹主动脉中膜弹力纤维严重受损,层次不清或减少,失去原有的曲度及连续性,出现断

裂,甚至碎片、缺如。0.75 mol/L 氯化钙组的弹性纤维层数明显小于 0.5 mol/L 氯化钙组,并且前者弹性纤维的断裂、破碎和降解明显高于后者(图 3)。

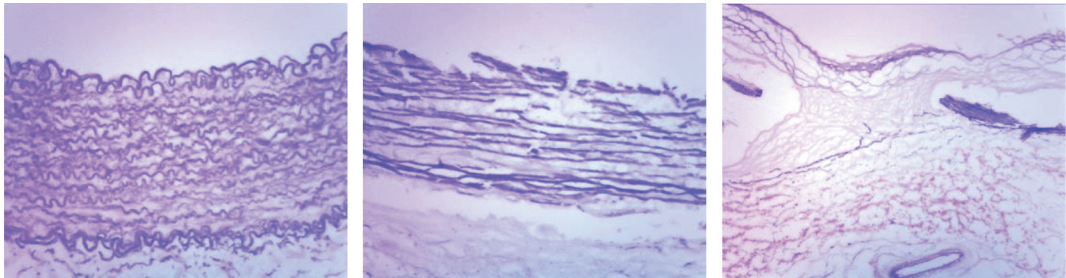


图 3. 腹主动脉的弹力纤维染色 从左到右依次为对照组、0.5 mol/L 氯化钙组和 0.75 mol/L 氯化钙组。

Figure 3. Elastic fibre staining of abdominal aorta

Masson 氏三色染色可见,与对照组相比,实验组兔腹主动脉外膜胶原纤维层增厚;中膜弹性纤维层减少,弹性纤维失去原有的曲度、连续性,出现断裂和破碎;平滑肌细胞数减少,排列紊乱。与 0.5

mol/L 氯化钙组相比,0.75 mol/L 氯化钙组的中膜弹性纤维的断裂和降解以及平滑肌细胞数的减少更明显(图 4)。

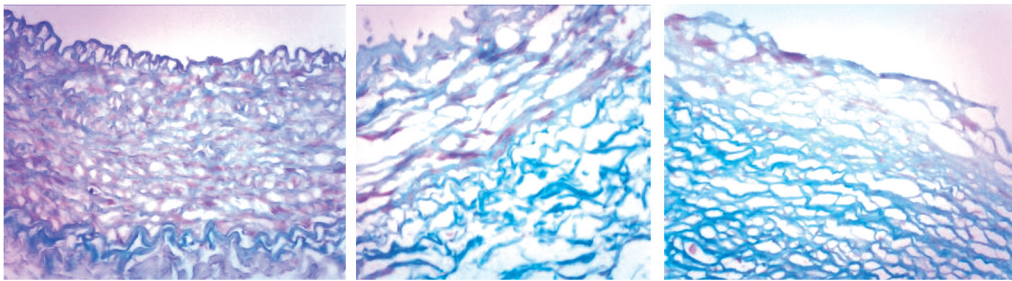


图 4. 腹主动脉的 Masson 三色染色 从左到右依次为对照组、0.5 mol/L 氯化钙组和 0.75 mol/L 氯化钙组。

Figure 4. Masson staining of abdominal aorta

### 3 讨 论

随着人口老龄化、饮食结构的改变和影像诊断技术的飞速发展,AAA 的发病呈逐年增多趋势,为研究其发病机制和治疗方法,必须建立合适的 AAA

动物模型。  
目前 AAA 研究应用最多的是鼠 AAA 模型,本研究制备的是兔 AAA 模型,其优点在于兔腹主动脉管径相对较大,操作要求相对较低,不要求显微技术,对腹主动脉的手术处理相对比较容易。



目前建立 AAA 动物模型应用较多的方法是弹力蛋白酶灌注法,其机制是弹力蛋白降解腹主动脉中膜的弹性纤维,诱导腹主动脉炎症反应,动脉壁结构蛋白破坏,最终导致 AAA 的形成。但该法手术步骤及插管过程复杂,对显微技术要求较高,增加了手术难度及感染率;插管过程增加副损伤;灌注过程如压力、时间、酶浓度掌握不好可能导致腹主动脉及分支动脉破裂;出血较多;死亡率较高<sup>[3-5]</sup>。

本研究采用氯化钙浸润法制备兔 AAA 动物模型,其机制为氯化钙溶液浸润主动脉,沉积的钙盐可以与弹性蛋白结合,直接破坏弹性纤维层;钙盐可以损伤内皮细胞;钙盐可以促进炎性细胞的浸润,它们可以分泌基质金属蛋白酶(MMP)等蛋白酶降解弹性纤维,还可以分泌某些炎性因子促进平滑肌细胞的凋亡。其作用的结果是动脉壁钙化,外膜炎性细胞浸润,中膜弹性纤维降解,平滑肌细胞减少,从而导致腹主动脉扩张,并形成 AAA<sup>[4]</sup>。

该法的优势在于:其病理组织学改变包括外膜炎性细胞浸润、中膜弹性纤维降解、平滑肌细胞减少、血管壁钙化,与人类 AAA 较为相似;不用插管或缝合动脉,操作相对比较简单;副损伤较小;动脉破裂率低;出血很少;死亡率低。

氯化钙浸润法制备鼠 AAA 模型时氯化钙浓度用的是 0.5 mol/L<sup>[6]</sup>。而本研究发现用 0.75 mol/L 的氯化钙浸润腹主动脉 6 周后腹主动脉扩张率和 AAA 形成率较高。其可能机制为氯化钙浸润法制备 AAA 模型的主要机制是钙盐对动脉壁的直接、间接破坏作用,而兔动脉壁弹性纤维层比鼠厚得多,因此要达到足够的破坏作用需要更多的钙盐沉积,这可以通过提高氯化钙浓度的方法来实现。本研究结果也表明,高浓度的氯化钙可以导致更明显的弹性纤维破坏降解、平滑肌细胞减少、腹主动脉扩张。

除氯化钙浓度外,AAA 浸润法造模过程中还要注意预防粘连。氯化钙浸润法很容易使动脉周围组织也被氯化钙浸润,从而发生炎性反应,导致动脉与管周组织严重粘连,或肠粘连。因此,浸润腹主动脉时要用稍宽的橡皮条包裹氯化钙浸润的海绵,这样可以防止氯化钙浸润到管周组织,并且术后要用生理盐水冲洗管周及腹腔,这样可以减少粘连,方便下次取材或手术处理。

总之,氯化钙浸润法是一种简单可行的制备兔 AAA 模型方法,它为 AAA 的防治研究提供另一种合适的动物模型。

#### [参考文献]

- [1] Fleming C, Whitlock EP, Beil TL, et al. Screening for abdominal aortic aneurysm: a best-evidence systematic review for the US Preventive Services Task Force[J]. *Ann Intern Med*, 2005, 142: 203-211.
- [2] Dalman RL, Tedesco MM, Myers J, et al. AAA disease: mechanism, stratification, and treatment[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1085: 92-109.
- [3] Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 429-434.
- [4] 吴建秋, 景在平. 两种实验性腹主动脉瘤大鼠模型的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10: 277-280.
- [5] 郑 曰, 宏 倪, 管 珩. 腹主动脉瘤动物模型的建立及发病机制的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11: 433-435.
- [6] Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periaarterial application of calcium chloride[J]. *J Surg Res*, 2001, 99: 371-376.

(此文编辑 许雪梅)