

温控气体损伤建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型

路怀志^{1,2}, 杜大勇¹, 柳 杨¹, 李沫言¹, 薛 峰¹, 杨升华¹, 张雁斌^{1,2}, 李运田^{1,2}

(1. 中国人民解放军第305医院心脏中心, 北京市 100017; 2. 南方医科大学第二临床医学院, 广东省广州市 510515)

[关键词] 易损斑块; 动物模型; 内皮损伤; 恒温气体

[摘要] **目的** 利用持续恒定低温气体损伤血管内皮, 结合高脂饮食, 建立兔颈动脉粥样硬化易损斑块动物模型。**方法** 新西兰雄性白兔 24 只, 3 月龄, 随机分为空白对照组、假手术组和温控气体损伤组, 每组 8 只。高脂饮食喂养 1 周后对温控气体损伤组利用低温气体给予血管内膜损伤处理, 假手术组单纯给予有创手术操作, 术后两组均继续给予高脂饮食 12 周; 空白对照组给予持续普通饮食。术后 13 周处死动物, 取血管行 HE、Masson、弹力纤维、油红 O 染色, 观察血管形态, 并做小鼠抗兔巨噬细胞抗体 11 免疫组织化学染色。**结果** 温控气体损伤组可见薄的纤维帽、大脂质核心, 内膜有巨噬细胞及泡沫细胞浸润, 部分内皮脱落, 斑块出现裂隙, 局部小血栓形成, 形成典型的易损斑块; 假手术组多表现为内膜增生, 部分存在小斑块, 内皮下见泡沫细胞浸润, 符合脂纹期改变, 为初级斑块; 空白对照组未见斑块形成。**结论** 利用恒定低温气体损伤兔颈动脉内膜结合高脂饮食可建立典型的易损斑块模型, 且方便易行。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A Rabbit Model of Vulnerable Atherosclerotic Plaque Induced by Temperature-controlling Gas

LU Huai-Zhi^{1,2}, DU Da-Yong¹, LIU Yang¹, LI Mo-Yan¹, XUE Feng¹, YANG Sheng-Hua¹, ZHANG Yan-Bin^{1,2}, and LI Yun-Tian^{1,2}

(1. Heart Center, The 305 Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100017, China; 2. Second Clinical Medical College, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] Vulnerable Plaques; Animal Model; Endothelial Injury; Constant Temperature Gas

[ABSTRACT] **Aim** To develop a rabbit model of vulnerable atherosclerotic plaque by cryogenic gas-induced endothelial injury combined with high-fat diet. **Methods** 24 healthy male New Zealand rabbits (3 months) were randomly divided into three groups: control blank group (group A), sham-operated group (group B) and temperature control gas injury group (group C) with 8 in each group. After one week high-fat diet, the rabbits in group C were underwent carotid artery intima injury using cryogenic gas. The rabbits in group B suffered surgical operations without cryogenic gas. After the operation, the rabbits in group B and group C were kept feeding on high-fat diet for 12 weeks, whereas the ones in group A were kept on normal diet. All rabbits were killed after 13 weeks. Then paraffin-embedded and frozen sections were used for HE staining, Masson trichrome staining and elastic fiber staining and oil red O staining to analyze the changes of vascular morphology. Additionally, rat anti-rabbit macrophage antibody 11 (RAM11) monoclonal antibody was applied for animal immunohistochemistry staining. **Results** The rabbit carotid atherosclerosis established in our study was in line with the progress characteristics of vulnerable plaque, involving thin fibrous cap, large lipid core and macrophages and foam cells in the intima as well as endothelial cells shedding or local small scattered thrombosis. The rabbit carotid in sham-operated group showed intimal hyperplasia and partly showed small primary plaques infiltrated by macrophages, which was in line with the change of fatty streaks phase. There is no plaque visible in the control blank group. **Conclusion** It is viable and easy to develop a rabbit model of typical vulnerable atherosclerotic plaque by injuring carotid intima with

[收稿日期] 2014-04-02

[修回日期] 2014-07-04

[基金项目] 全军“十一五”医药卫生科研基金项目(06G145)

[作者简介] 路怀志, 硕士, 医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 luhuaizhi0825@163.com。通讯作者李运田, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 lyt305@126.com。杜大勇, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 sxyddy305@sina.cn。

temperature control gas combined with high-fat diet.

目前研究表明,动脉粥样硬化斑块破裂损伤继发急性血栓形成是导致急性冠状动脉综合征发生的重要原因。此类斑块被称作易损斑块,通常具有大的脂质核心、薄纤维帽及巨噬细胞浸润^[1],有血栓形成倾向或极有可能快速进展为“罪犯斑块”。建立良好的易损斑块动物模型可为我们研究其发生发展机制提供有力的平台,能够使我们更深入地探索降低临床急性冠状动脉综合征发生的方法。传统的造模方法主要包含机械损伤内皮和高脂饮食两大手段,或者几种损伤方式之联合使用^[2-4],但均不同程度地存在操作复杂、成本高等缺陷。本研究旨在应用一种操作简便、内皮损伤程度可控的方式建立兔颈动脉易损斑块模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康纯种雄性新西兰白兔 24 只,3 月龄,按简单随机方法平均分为空白对照组、假手术组、温控气体损伤组,每组 8 只。高脂饲料喂养 7 天后,利用低温气体输出装置对温控气体损伤组进行右颈动脉内膜损伤,假手术组给予单纯手术操作,不损伤血管内膜,术后两组继续给予高脂饲料喂养 12 周;空白对照组不进行任何处理,以普通饲料喂养。

1.2 主要试剂

高脂饲料(含 1% 胆固醇、8% 猪油、10% 蛋黄粉、兔基础饲料);北京华阜康生物科技股份有限公司;医用液氮:解放军 305 医院中心实验室;Masson 三色染色液、弹力纤维染色液、HE 染色液:北京东方日创生物科技有限公司;油红 O 染色液:武汉谷歌生物科技有限公司;联苯二胺(diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒、磷酸盐缓冲液:北京中杉生物技术开发有限公司;辣根过氧化物酶标记磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体:美国 Sigma 公司;戊巴比妥钠:北京大学第一医院;小鼠抗兔巨噬细胞抗体 11(rat anti-rabbit macrophage antibody 11, RAM11):丹麦 Dako 公司。

1.3 低温气体输出装置

由 L-200 型液氮治疗仪(河南天驰公司)、一次性使用静脉输液针构成。如图 1 所示,当阻塞 A 口时,B 腔内压力升高,液氮由中间通气管道导出,在管道中气化成低温气体,由 C 处输液针针头处喷出。D 处为输液针与液氮治疗仪连接处。C 处输液

针喷出气体的温度可通过输液针的长度调节,当完整长度时气体温度为 -55°C 到 -65°C 之间,为本研究所采用温度。

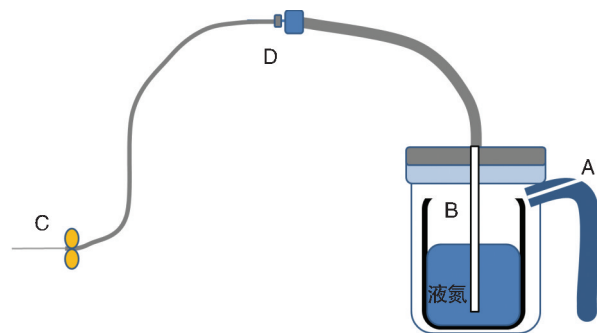


图 1. 低温气体输出装置示意图

Figure 1. Schematic diagram of low temperature gas output device

1.4 内膜损伤操作步骤

①麻醉及备皮:温控气体损伤组实验动物术前 12 h 禁食,自由饮水。经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后固定,备皮(推荐使用脱毛膏)。②暴露右侧颈总动脉:消毒手术区,铺巾,行颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉。③阻断血流、留置装置:利用动脉夹先后阻断远心端、近心端血流。以 1 mL 注射器针头于分离动脉的远心端平行于血管纵轴方向刺入血管,抽出血管内血液,生理盐水冲洗管腔后抽干。从近心端用 5 号静脉输液针平行于血管纵轴方向刺入血管并留置。④低温气体损伤:于液氮治疗仪中注入液氮 200 mL,封闭后快速连接静脉输液针。封闭液氮治疗仪 A 孔后液氮由枪头喷出并气化为低温气体,气体经静脉输液针导入血管,颈动脉被低温气体充盈膨胀,并由远心端穿刺孔喷出,持续 5 s 后放开液氮治疗仪后端 A 孔,10 s 后再次封闭 A 孔,如此过程反复进行 3 次。⑤损伤后处理:将低温气体输出装置撤出,用生理盐水冲洗动脉管腔后,先放开远心端动脉夹,以湿润纱布压迫穿刺点 3 min 止血,观察无出血后再放开近心端动脉夹,湿润纱布继续压迫穿刺点 5 min 止血(如仍有出血或出血量较大,给予继续按压,直至止血成功)。假手术组不给予颈总动脉低温气体损伤,其余操作同温控气体损伤组。

1.5 标本留取及处理

于术后 13 周处死 3 组实验动物,分别剥离留取右颈总动脉约 4 cm,每组各取血管一部分,常规石

蜡包埋,分别作 HE 染色、Masson 三色染色、弹力纤维染色、免疫组织化学染色;另一部分作冰冻切片行油红 O 染色。光镜下观察斑块的组织形态。

2 结 果

2.1 一般情况

兔总体生长良好。温控气体损伤组 1 只新西兰白兔因麻醉过量死亡,假手术组 1 只因腹泻死亡,其余动物全部完成实验,所得 22 只动物数据参与分析。

2.2 肉眼大体观察

空白对照组兔右侧颈总动脉血管管壁光滑,柔

软而有弹性。假手术组兔右颈总动脉部分可见散在的脂纹点,针头大小,微隆起。温控气体损伤组兔右侧颈总动脉管壁明显增厚、僵硬,内膜面见大量黄白色脂样物质向管腔凸出,并连接成片,形成典型的动脉粥样硬化斑块,部分斑块表面存在细小出血点,附着有细小血栓。

2.3 病理形态学观察

2.3.1 空白对照组 可见内皮细胞完整,排列整齐,内弹力膜清晰完好,中层平滑肌细胞排列整齐,形态规则,未见斑块形成,内膜中可见散在巨噬细胞(图 2)。

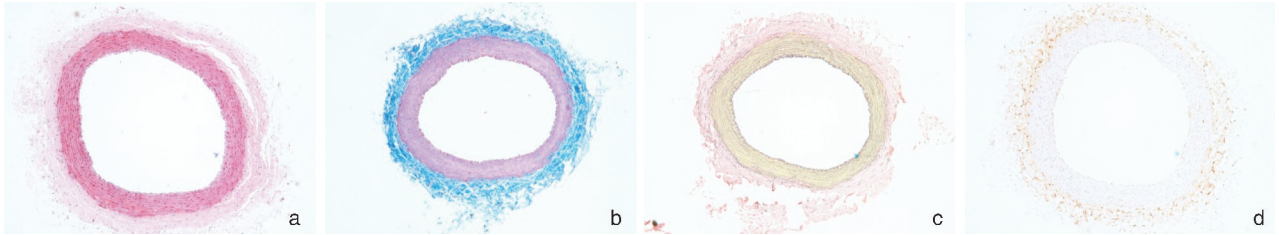


图 2. 空白对照组病理形态学观察(4 ×) a 为 HE 染色,b 为 Masson 三色染色,c 为弹力纤维染色,d 为 RAM11 标记的巨噬细胞。
Figure 2. Pathological observation of control group (4 ×)

2.3.2 假手术组 多显示为内膜增生,部分血管存在小斑块,内皮细胞下见圆形泡沫细胞浸润,免疫组织化学染色显示为巨噬细胞源性泡沫细胞;Masson 三色染色可见小斑块内蓝染的胶原纤维丰

富,中膜平滑肌细胞与弹力纤维规律分层排列;弹力纤维染色未见有弹力板破损,中层弹力纤维呈现规律的弯曲改变,无牵拉变直等血管重构表现。其特征符合脂纹期改变,为初级斑块(图 3)。

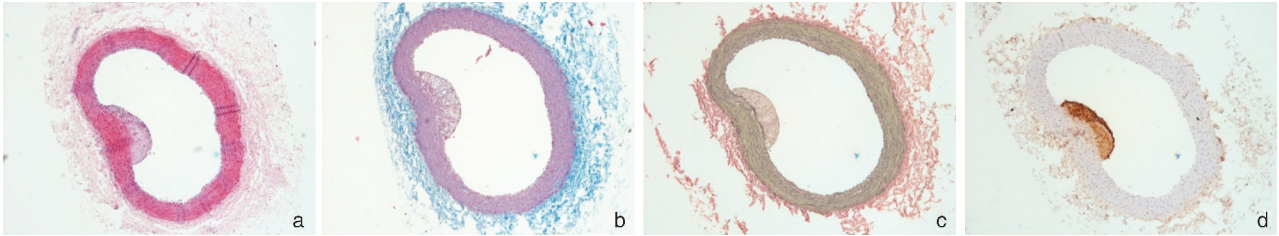


图 3. 假手术组病理形态学观察(4 ×) a 为 HE 染色,b 为 Masson 三色染色,c 为弹力纤维染色,d 为 RAM11 标记的巨噬细胞。
Figure 3. Pathological observation of sham operation group (4 ×)

2.3.3 温控气体损伤组 油红 O 染色可见典型的不稳定斑块,斑块表现为薄的纤维帽、大的脂质核心(图 4a)。HE 染色示内膜为巨噬细胞及各种来源的泡沫细胞浸润,局部存在粘液样变性,部分斑块局部存在细小的裂隙,裂隙局部有小血栓形成(图 4b、图 4c)。Masson 三色染色可见纤维帽中平滑肌细胞明显减少,散在一些蓝染的胶原纤维(图

4d),斑块内巨噬细胞丰富,部分存在片状的粘液聚集,弹力纤维与平滑肌细胞呈层状排列,部分内弹力板破损,平滑肌细胞经破损弹力板大量迁移入内膜,胞核呈清晰的蓝黑色(图 4e)。部分血管中膜弹力纤维被牵拉变直,血管中膜变薄(图 4f),甚至中膜消失,内膜与外膜相接(图 4g)。部分切片显示滋养血管丰富(图 4h)。

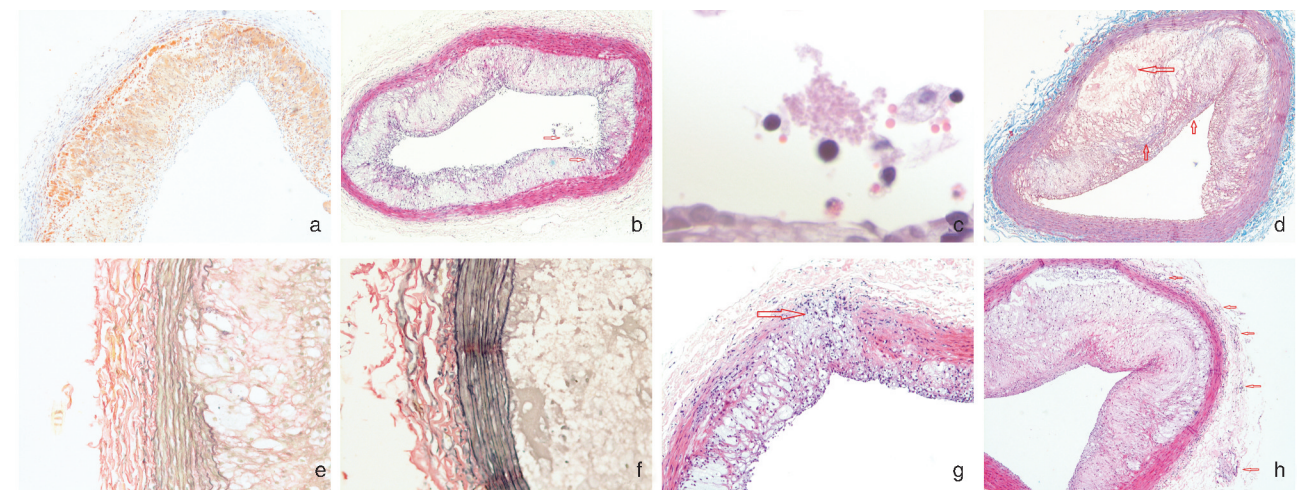


图 4. 温控气体损伤组病理形态学观察 a 为油红 O 染色(4 ×), 红染颗粒为脂质; b 为 HE 染色(4 ×), 显示细小裂隙及局部血栓; c 为 HE 染色(100 ×), 为 b 局部血栓放大图; d 为 Masson 三色染色(4 ×), 横向箭头所指为脂质核心, 竖向箭头所指为纤维帽; e 为弹力纤维染色(20 ×), 显示内弹力板被侵蚀; f 为弹力纤维染色(20 ×), 弹力纤维牵拉变直, 失去城墙状改变, 显示血管中膜变薄; g 为 HE 染色(20 ×), 箭头所指为中膜消失处; h 为 HE 染色(4 ×), 箭头所指为滋养血管。

Figure 4. Pathological observation of temperature control gas injury group

3 讨论

Naghavi 等^[5]于 2003 年进一步完善了易损斑块的定义, 指出其具有血栓形成倾向或极有可能快速进展为“罪犯斑块”的特点。这一概念涵盖了多种病理组织学特征的斑块, 主要标准: 斑块内活动性炎症; 薄纤维帽及大脂质核心; 内皮细胞脱落伴表层血小板聚集; 裂隙斑块与受损斑块; 严重狭窄。虽然现存的一些动物模型为研究动脉粥样硬化斑块的病理生理机制提供了可用的平台, 但目前尚无能够完美复制人类动脉粥样硬化斑块各个时期的动物模型^[6]。

本课题利用恒定低温气体损伤 + 高脂饮食方式建立兔颈动脉粥样硬化斑块模型。首先, 从 HE 染色及 RAM11 标记的巨噬细胞免疫组织化学分析中就可以看到斑块内存在大量巨噬细胞, 是炎症活跃的主要标志。斑块内炎症细胞浸润特别是巨噬细胞可通过吞噬或释放纤溶酶激活物及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)降解细胞外基质, 削弱纤维帽, 是斑块具有破裂倾向的特征之一。与假手术组及空白对照组相比, 本模型组(温控气体损伤组)外膜中可见较多的滋养血管, 滋养血管可促进动脉粥样硬化的发展^[7], 并且为炎症细胞进入斑块提供了一条重要途径。其次, 纤维帽较薄, 为单层内皮细胞及少量平滑肌细胞构成, Masson 三色染色显示纤维帽内胶原纤维缺乏, 特别是正常血管壁组织和斑块交界处、斑块转角处纤维帽最

薄, 心脏收缩舒张和冠状动脉血流的剪切力均易导致纤维帽的受压变化而发生破裂^[8]。油红 O 染色可见斑块内大量脂质沉积, 斑块的脂质核心是由大量低密度脂蛋白、富含粘稠状粥样脂质物质的泡沫细胞、坏死组织、胆固醇结晶及退化的血液成分等组成, 在本模型组中并未看到胆固醇结晶的出现, 考虑与饲养周期短有关。大的脂质核心被认为是易损斑块的一个主要特征, 此类斑块易于破裂导致血栓形成^[9]。且斑块内存在较严重的粘液样变, 使斑块膨胀, 增加了斑块的不稳定性。第三, 部分内皮细胞脱落, 表层糜烂, 可见散在的纤维蛋白聚集, 包裹有红细胞、血小板, 内皮损伤后, 其形态和结构没有明显的改变, 但其扩血管、抗凝血、抗白细胞与血小板黏附、抗炎症及抗平滑肌细胞增殖等转变为相反表现, 致使冠状动脉对多种物质产生收缩反应, 从而诱发斑块破裂, 是形成血栓的基础。Virmani 等^[10]尸检发现因侵蚀斑块导致急性冠状动脉综合征的患者, 其侵蚀斑块表面内皮缺失或缺少, 而平滑肌及蛋白多糖基质丰富, 这就提示内皮在预防易损斑块中的重要性。第四, 从 HE 染色即可看到部分斑块存在裂隙, 延伸到斑块深处, 局部纤维帽缺损, 聚集小量血小板、红细胞、纤维蛋白, 纤维帽中平滑肌细胞少而含有大量的炎症细胞。第五, 严重狭窄病变, 此类模型我们考虑为低温气体不单损伤到了内皮, 还包括血管中膜平滑肌等深层组织, 这一现象向我们提示内膜损伤程度可影响斑块病变范围和程度这一线索。

本研究首次运用低温可控气体损伤血管内膜结合高脂饮食,快速有效地创建了动脉粥样硬化易损斑块动物模型。此造模方法能建立与人类尸体解剖组织学相似的易损斑块,整个操作过程简便,成本低,且可以通过输液针长度调整实验所需温度,使损伤可控,为我们研究易损斑块提供了一个更好的平台。但也存在着一些不足,比如实验操作过程虽然简便,但液氮这种介质温度过低,危险性较高,操作过程难免忙乱,如若采用一种普通低温(−55℃左右)的液体作为损伤介质,将会更加理想。

[参考文献]

- [1] Cardoso L, Weinbaum S. Changing views of the biomechanics of vulnerable plaque rupture: a review[J]. *Ann Biomed Eng*, 2014, 42(2): 415-431.
- [2] Zhang G, Li M, Li L, et al. The immunologic injury composite with balloon injury leads to dyslipidemia: a robust rabbit model of human atherosclerosis and vulnerable plaque[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 249-259.
- [3] Shi ZS, Feng L, He X, et al. Vulnerable plaque in a swine model of carotid atherosclerosis[J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2009, 30(3): 469-472.
- [4] Fang SM, Zhang QH, Jiang ZX. Developing a novel rabbit model of atherosclerotic plaque rupture and thrombosis by

cold-induced endothelial injury[J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16(4): 39.

- [5] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I[J]. *Circulation*, 2003, 108(14): 1664-1672.
- [6] Xiangdong L, Yuanwu L, Hua Z, et al. Animal models for the atherosclerosis research: a review[J]. *Protein Cell*, 2011, 2(3): 189-201.
- [7] 张金保, 张艳军, 崔广智, 等. 动脉粥样硬化斑块内新生血管与斑块稳定性的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2011, (7): 901-903.
- [8] Ohayon J, Mesnier N, Broisat A, et al. Elucidating atherosclerotic vulnerable plaque rupture by modeling cross substitution of ApoE^{-/-} mouse and human plaque components stiffnesses[J]. *Biomech Model Mechanobiol*, 2012, 11(6): 801-813.
- [9] Phinikaridou A, Ruberg FL, Hallock KJ, et al. In vivo detection of vulnerable atherosclerotic plaque by MRI in a rabbit model[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2010, 3(3): 323-332.
- [10] Virmani R, Burke AP, Farb A, et al. Pathology of the vulnerable plaque[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(8 Suppl): C13-C18.

(此文编辑 曾学清)