

• 实验研究 Experimental research •

国产弹性蛋白酶浸泡法构建兔腹主动脉瘤
及其随访

毕永华, 伊梦飞, 陈红梅, 韩新巍, 任建庄, 尉泽鹏

【摘要】目的 采用国产猪胰弹性蛋白酶溶液主动脉周浸泡法构建兔腹主动脉瘤(AAA)模型,并随访其长期稳定性。方法 24 只新西兰兔随机分成两组,实验组($n=12$)用 10 μL 浓度为 10 U/ μL 国产猪胰弹性蛋白酶溶液浸润主动脉近分叉处血管段 30 min,对照组用 10 μL 0.9% 氯化钠溶液浸润 30 min。术前和术后 5、15、40、100、150 d 分别经耳缘静脉造影测量主动脉内径。术后 5、15、150 d 造影后每组分别处死 4 只兔作苏木精-伊红(HE)、弹力纤维 EVG 染色和免疫组化染色。结果 实验组术后 5 d 均形成 AAA,主动脉直径 100 d 内基本稳定,150 d 时明显缩小;组织学上术后 5 d 血管壁严重破坏、结构紊乱,可见红细胞渗出和炎性细胞浸润,弹力纤维和平滑肌细胞明显减少甚至消失,15 d 时血管结构规整,可见部分残留弹力纤维,未见炎性细胞,150 d 时管腔变窄,内膜过度增生,可见大量平滑肌细胞增生和紊乱的新生弹力纤维。对照组均未见 AAA 形成,病理学无明显变化。结论 国产猪胰弹性蛋白酶溶液浸泡法可诱导兔 AAA 形成,操作简单、安全、有效。该模型有自愈倾向,但 100 d 内基本稳定,有助于 AAA 机制研究。

【关键词】 国产猪胰弹性蛋白酶;兔;腹主动脉瘤;实验模型;基质金属蛋白酶

中图分类号: R543.15 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2020)-04-0376-04

Establishment of abdominal aortic aneurysm induced by domestic elastase in experimental rabbit and follow-up observation BI Yonghua, YI Mengfei, CHEN Hongmei, HAN Xinwei, REN Jianzhuang, WEI Zepeng. Department of Interventional Radiology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province 450052, China

Corresponding author: HAN Xinwei, E-mail: hanxinwei2006@163.com

【Abstract】Objective To establish a rabbit model of abdominal aortic aneurysm(AAA) by using periaortic immersion method with domestic porcine pancreatic elastase solution, and to observe its long-term stability. Methods Twenty-four New Zealand rabbits were randomly and equally divided into study group($n=12$) and control group($n=12$). For the rabbits of the study group the vascular segment near aortic bifurcation was immersed in 10 U/ μL domestic porcine pancreatic elastase solution for 30 minutes, while for the rabbits of the control group the vascular segment near aortic bifurcation was immersed in 10 U/ μL of saline for 30 minutes. The aortic diameter of immersed segment was measured by angiography through auricular vein injection of contrast, which was carried out before treatment as well as at 5, 15, 40, 100 and 150 days after treatment. Every 4 rabbits from each group were sacrificed each time at postoperative 5, 15, and 150 days after angiography, and hematoxylin-eosin(HE) staining, elastic fibre EVG staining and immunohistochemical staining were made for laboratory examination. Results In the study group, the formation of AAA was demonstrated in all experimental rabbits five days after treatment, and the aortic diameter became basically stable within 100 days, which was significantly reduced in 150 days. Histologically, serious destruction of vascular wall with structural disorder, erythrocyte exudation, inflammatory cell infiltration, and significant reduction or even disappearance of elastic fibers and smooth muscle cells were

DOI: 10.3969/j.issn. 1008-794X. 2020.04.009

基金项目: 国家自然科学基金(81501569)

作者单位: 450052 郑州大学第一附属医院放射介入科(毕永华、伊梦飞、韩新巍、任建庄、尉泽鹏); 郑州大学附属郑州中心医院超声科(陈红梅)

通信作者: 韩新巍 E-mail: hanxinwei2006@163.com

observed in 5 days after treatment. At 15 days after treatment, the vascular structure was regularity, some residual elastic fibers with no inflammatory cells were demonstrated. At 150 days after treatment, the lumen became narrowed, the intima was remarkably hypertrophied, and the proliferation of large amount of smooth muscle cells and the disordered new elastic fibers were seen. In the control group, neither AAA formation nor obvious pathological changes were observed. **Conclusion** The periaortic immersion method with domestic porcine pancreatic elastase solution can reliably induce the formation of AAA in experimental rabbits. The method is simple, safe and effective. This AAA model has the tendency of self-healing, but it is basically stable within 100 days. This model can be reliably used in the study of the mechanism of AAA. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 376-379)

【Key words】 domestic porcine elastase; rabbit; abdominal aortic aneurysm; experimental model; matrix metalloproteinase

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)常发生于肾下腹主动脉,特征性表现为血管壁慢性炎性浸润、弹力纤维降解及中膜变薄,但确切发病机制尚不清楚。采用弹性蛋白酶腔内灌注或氯化钙浸泡等化学损伤法构建小型动物模型,常用于病因学和干预治疗的基础研究^[1-8]。弹性蛋白酶血管腔内灌注法多见于构建啮齿类动物模型,但建模方法操作复杂,需要经髂总动脉插管,且灌注过程中需阻断腹主动脉血流并防止溶液渗漏。相比之下,主动脉周氯化钙浸泡法较为简单、易行。通过在主动脉周浸泡弹性蛋白酶溶液也可诱导 AAA 形成^[8-10]。White 等^[9]将肾下腹主动脉段浸泡于 20 U/ μ L 弹性蛋白酶溶液 70 min,成功构建 AAA 模型。然而 Origuchi 等^[10]研究发现,主动脉周弹性蛋白酶浸泡法诱导的兔 AAA 存在自愈现象,术后 6 周瘤体逐渐缩小,3 个月时主动脉直径几乎恢复正常,这与人类 AAA 临床表现不相符。此外,以往弹性蛋白酶一般浸泡 2~3 h,建模时间较长,影响手术成功率。采用国产猪胰弹性蛋白酶浸泡法建模鲜见报道,我国学者也往往采用美国 Sigma 公司和 Calbiochem 公司弹性蛋白酶灌注法建模,价格较昂贵。本研究尝试采用国产猪胰弹性蛋白酶并缩短浸泡时间快速构建兔 AAA 模型,并随访长期稳定性,观察是否也存在自愈现象,以评价其应用价值。

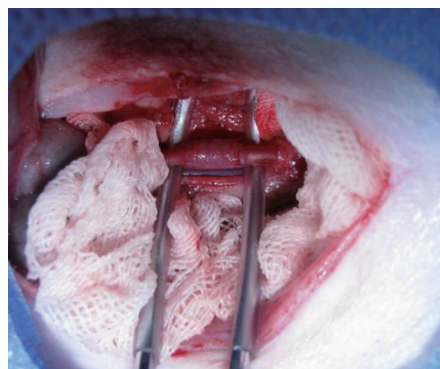
1 材料与方法

1.1 实验分组

本研究遵循实验动物保护条例和使用标准,并获得郑州大学动物保护和使用委员会批准。24 只雄性新西兰白兔,平均体重(3.0 ± 1.1) kg,随机分成实验组、对照组,每组各 12 只。实验组采用 10 μ L 浓度为 10 U/ μ L 国产猪胰弹性蛋白酶溶液浸润主动脉近分叉处血管段 30 min,对照组采用 0.9% 氯化钠溶液 10 μ L 浸润 30 min。

1.2 AAA 模型构建

分别按 0.3 mL/kg 和 0.7 mL/kg 体重肌肉注射速眠新 II 和 3% 戊巴比妥溶液麻醉,兔仰卧位固定于手术台上,腹部备皮;聚维酮碘消毒、铺巾,沿腹白线剖腹,充分暴露腹主动脉,距分叉 0.5 cm 处开始向近心端游离出长约 1 cm 腹主动脉段;以套有塑料软管弯镊支撑,使腹主动脉游离段悬空,无需阻断动脉血流;将大小约 3 mm \times 4 mm 面巾纸贴于外壁上,实验组以微量移液器滴加 10 μ L 弹性蛋白酶溶液(M0139,活力 ≥ 30 U/mg,上海楷洋生物技术公司),首滴为 4 μ L,随后每 5 min 滴注 2 μ L,避免溶液渗漏(图 1),对照组同法滴注 0.9% 氯化钠溶液 10 μ L;浸泡 30 min 后移去纸片,用 0.9% 氯化钠溶液冲洗 2 次,避免溶液残留;逐层缝合,将兔送回笼子。



游离腹主动脉近分叉段,以套有塑料软管弯镊支撑,使腹主动脉游离段悬空,表面覆盖一层 3 mm \times 4 mm 面巾纸,用于浸泡弹性蛋白酶溶液

图 1 动物模型构建

1.3 观察指标

①主动脉直径:术前和术后 5、15、40、100、150 d,分别经耳缘静脉造影,测量主动脉内径。留置 24 G 静脉输液针,快速推注约 6 mL 对比剂。主动脉内径较术前增大 50% 以上视为 AAA 形成。②病理学改变:术后 5、15、150 d 造影完毕两组分别处死 4 只兔,对浸

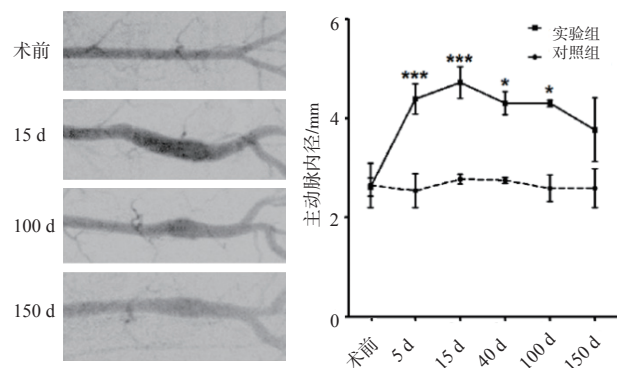
泡段主动脉取材,固定于4%多聚甲醛溶液,作苏木精-伊红(HE)、弹力纤维EVG染色,观察主动脉形态学改变和弹力纤维变化。③免疫组化:同时采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(streptavidin-peroxidase, SP)法染色,观察基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9和鼠抗兔巨噬细胞抗体(rat anti-rabbit macrophage antibody, RAM-11)表达。以1%过氧化氢孵育15 min,10%山羊血清封闭后加一抗4℃过夜。生物素化山羊抗小鼠IgG室温孵育20 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,中性树脂封片。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0软件作统计学分析,数值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,t检验分析两组内径变化, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

2 结果

主动脉直径测量显示,实验组兔术后即刻可见直径明显增大,术后5 d均形成AAA,术后15 d进一步增大,显著大于对照组兔($P < 0.0001$);术后40 d稍缩小,但100 d直径基本稳定,仍大于对照组($P < 0.05$);术后150 d直径明显缩小。对照组未见AAA形成,直径无明显变化(图2)。

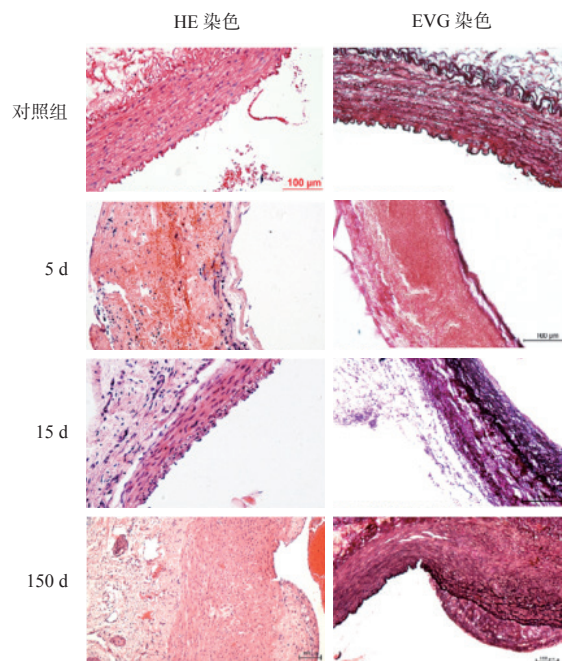


* $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$

实验组术后5 d均形成AAA,100 d直径基本保持稳定,150 d可见缩小,对照组均未成瘤

图2 主动脉直径变化趋势

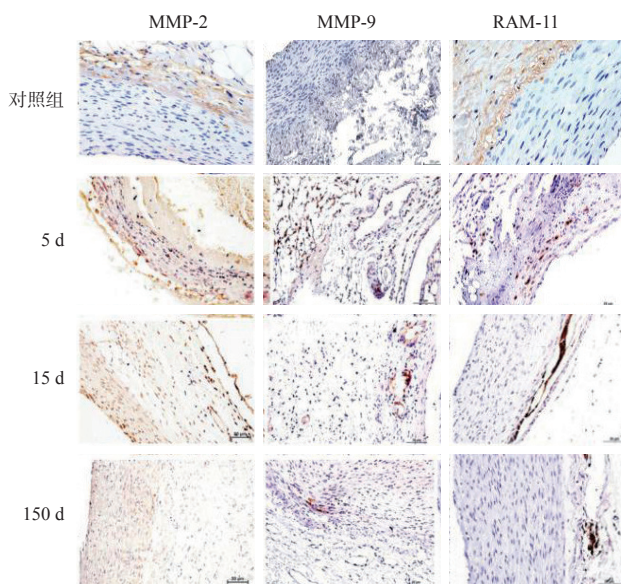
组织学分析显示,实验组术后5 d血管壁结构紊乱,中膜变薄,大量红细胞渗出,伴炎性细胞浸润,弹力纤维几乎消失,仅可见少许残留片段;术后15 d血管壁规则,部分管腔可见少量内膜增生和残留的弹力纤维;术后150 d内膜、中膜明显增厚,形态较规则,可见新生弹力纤维,但纤细、排列紊乱,与对照组规则结构有所不同。对照组动脉内膜、中膜和外膜结构完整,内、外弹力层和中膜弹力纤维层排列规整、连续,呈波浪状,未见断裂、碎裂(图3)。



实验组术后5 d动脉壁严重破坏,弹力纤维减少,150 d内膜和弹力纤维增生明显;对照组无明显变化(均放大40倍,标尺=100 μm)

图3 病理学变化

免疫组化分析显示,实验组术后5 d可见残留的平滑肌细胞表达MMP-2,伴炎性细胞浸润,血管各层可见大量MMP-9和RAM-11阳性表达;术后15 d中膜和外膜可见少量散在MMP-9、RAM-11阳性表达,平滑肌细胞内MMP-2呈强表达;术后150 d几乎未见MMP-9、RAM-11阳性表达,MMP-2呈中度表达。对照组未见阳性细胞表达(图4)。



实验组术后5 d均可见MMP-2、MMP-9和RAM-11表达,此后表达减弱;对照组均为阴性表达(均放大40倍,标尺=20 μm)

图4 免疫组化染色结果

3 讨论

AAA 主要危害在于瘤体持续扩张,最终导致破裂,甚至死亡。其确切发病机制尚未完全明确,需多种 AAA 模型进一步研究^[2,11-12]。弹性蛋白酶腔内灌注法常用于小型动物 AAA 模型构建,但建模时需要经髂总动脉插管,且灌注过程中需阻断腹主动脉血流,并防止溶液渗漏。该建模方法复杂,手术难度大,且死亡率高、并发症多。主动脉周浸泡弹性蛋白酶溶液也可诱导 AAA 形成,但该模型 3 个月时几乎恢复正常,这与人类 AAA 临床表现不相符^[5]。因此,构建一种更简易、稳定的模型十分必要。

White 等^[9]通过弹性蛋白酶浸泡法成功构建兔 AAA 模型,但弹性蛋白酶一般浸泡 2~3 h,建模时间较长,影响手术成功率。我国学者往往采用进口弹性蛋白酶灌注法建模,采用国产猪胰弹性蛋白酶浸泡法建模鲜见报道。本实验采用浓度为 10 U/ μ L 国产猪胰弹性蛋白酶,只需浸润 30 min,术后 5 d 即可形成动脉瘤,浸润时间比以往研究大大缩短。与弹性蛋白酶腔内灌注方法相比,该方法无需穿刺髂动脉、阻断血流,故简单易行,创伤小。

Origuchi 等^[10]研究提示主动脉周弹性蛋白酶诱导的动脉瘤可自行愈合,发现术后 42 d 动脉逐渐缩小,90 d 时主动脉直径几乎恢复正常;认为平滑肌细胞不可逆性损害对动脉瘤形成是必须的。本研究发现,术后 150 d 主动脉直径明显缩小,内膜过度增生,可见大量纤细弹力纤维再生;尽管该模型有自愈倾向,但 100 d 内直径基本保持稳定,有助于 AAA 机制研究,这与 Origuchi 等^[10]报道的观点有所不同。

本实验结果表明,国产猪胰弹性蛋白酶溶液浸泡法可诱导兔 AAA 形成。该方法操作简单、安全、有效。该模型有自愈倾向,但 100 d 内基本稳定,有助于 AAA 机制等进一步研究。

[参考文献]

- [1] 尉泽鹏, 毕永华, 陈红梅, 等. 国产猪胰弹性蛋白酶联合氯化钙浸泡法构建兔腹主动脉瘤模型[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28: 54-59.
- [2] 陈 锋, 朱鲜花, 张振东, 等. 钙盐浸润法制备腹主动脉瘤模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20: 103-106.
- [3] 聂毛晓, 赵全明, 闫云峰, 等. 不同浓度弹力蛋白酶对建立兔腹主动脉瘤模型成瘤率的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18: 1191-1194.
- [4] Bi Y, Chen H, Li Y, et al. Rabbit aortic aneurysm model with enlarging diameter capable of better mimicking human aortic aneurysm disease[J]. PLoS One, 2018, 13: e0198818.
- [5] Bi Y, Zhong H, Xu K, et al. Novel experimental model of enlarging abdominal aortic aneurysm in rabbits[J]. J Vasc Surg, 2015, 62: 1054-1063.
- [6] Bi Y, Zhong H, Xu K, et al. Development of a novel rabbit model of abdominal aortic aneurysm via a combination of periaortic Calcium chloride and elastase incubation[J]. PLoS One, 2013, 8: e68476.
- [7] 毕永华, 陈红梅, 尉泽鹏, 等. 兔新型腹主动脉瘤模型的建立及其病理学、血流动力学分析[J]. 中华血管外科杂志, 2018, 3: 237-242.
- [8] Bi Y, Zhong H, Xu K, et al. Performance of a modified rabbit model of abdominal aortic aneurysm induced by topical application of porcine elastase: 5-month follow-up study[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2013, 45: 145-152.
- [9] White JV, Mazzacco SL. Formation and growth of aortic aneurysms induced by adventitial elastolysis[J]. Ann N Y Acad Sci, 1996, 800: 97-120.
- [10] Origuchi N, Shigematsu H, Izumiyama N, et al. Aneurysm induced by periarterial application of elastase heals spontaneously[J]. Int Angiol, 1998, 17: 113-119.
- [11] 符 洋, 李孝成, 张 祁, 等. 贝那普利抑制家兔腹主动脉瘤形成的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19: 616-620.
- [12] 张学慧, 赵全明, 聂毛晓, 等. 低浓度弹力蛋白酶不同腔内灌注压力对建立兔腹主动脉瘤模型的影响[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10: 1175-1178.

(收稿日期: 2019-06-28)

(本文编辑: 边 倩)