

血管外膜剥离致内膜增生病变的动物模型

汤月霞, 刘永, 王华, 梁春, 陈金明, 吴宗贵

(中国人民解放军第二军医大学附属长征医院心内科, 上海市 200003)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管外膜剥离; 内膜; 内膜增生病变; 动物模型

[摘要] 目的 建立颈动脉外膜剥离引起内膜增生的动物模型, 为研究血管外膜在动脉粥样硬化发生中的作用奠定基础。方法 2 g/L 的 Ⅲ型胶原酶消化颈动脉外膜后, 眼科镊钝性剥离外膜, HE 染色明确外膜剥离效果; 免疫组织化学染色观察外膜剥离对内膜的影响。结果 酶化学消化+ 眼科镊钝性剥离可有效剥离血管外膜; 外膜剥离 2 周后可见相应内膜处出现增生性病变, 病变成分为分泌型平滑肌细胞; 而外膜保留侧正常。结论 胶原酶消化+ 眼科镊钝性剥离的方法可有效剥离血管外膜, 促进血管内膜增生性病变形成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A New Animal Model: Removal of Adventitia Induced Neointimal Development

TANG Yue-Xia, LIU Yong, WANG Hua, LIANG Chun, CHEN Jin-ming, and WU Zong-Gui

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] Adventitia Removal; Intima; Intimal Hyperplasia Lesion; Animal Model

[ABSTRACT] Aim To develop a new animal model for the investigation of adventitial function in atherosclerosis.

Methods One carotid artery adventitia of rabbit with 2 mg/mL typeⅢ collagenase was digested, then adventitia with microforceps was removed, and the contralateral carotid artery was used as control. HE staining and immunohistochemistry were performed to assure adventitia was removed, and to assess intimal change after adventitial removal.

Results It is feasible to remove vascular adventitia with collagenase digestion and mechanical dissection. Removal of adventitia of rabbit carotid artery induced neointima development in 2 weeks. Cells in neointima were secreting smooth muscle cells. The other sides were normal.

Conclusions The method we used to remove artery adventitia is effective. Normal adventitia is necessary for normal vessel structure.

随着动脉粥样硬化(atherosclerosis As)研究的深入, 血管外膜在 As 发生中的作用日益受到重视。大量研究结果提示, 在 As 形成的过程中外膜被激活并参与了 As 的发生发展^[1-3]。但以往的研究都只局限于对外膜的某一点与 As 的关系, 血管外膜作为一个整体在血管病变形成中究竟发挥了怎样的作用, 其作用机制如何, 目前研究较少。本实验尝试应用胶原酶消化+ 眼科镊钝性剥离的方法建立外膜剥离引起血管内膜增生的动物模型, 为外膜功能进行深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性新西兰大白兔 10 只, 购自上海第二军医大学动物中心, 体重 2.5~3.0 kg。Ⅲ型胶原酶

(sigma, 美国); 石蜡切片机、冰冻切片机、油红 O、小鼠抗兔 actin 一抗(武汉博士德生物工程有限公司)、羊抗兔胶原蛋白抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 动物模型的建立

实验动物单笼常规喂养, 自由饮水, 活动不受限制。实验在室温下进行。3% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 兔耳缘静脉静推麻醉动物。动物仰卧, 头部及四肢固定于手术台上。颈前脱毛后常规碘酒、酒精消毒铺孔巾。纵形切开皮肤, 逐层钝性分离颈部筋膜及肌肉, 暴露双侧颈动脉鞘, 仔细游离出双侧颈动脉, 长约 3 cm, 用 2 g/L 的 Ⅲ型胶原酶浸湿的棉纱外敷左侧颈总动脉, 共 30 min, 生理盐水冲洗、中止消化, 用眼科镊剥离外膜白色疏松组织, 直至血管外膜白色疏松组织消失。另一侧不予处理, 作为阴性对照。术后逐层缝合, 注射青霉素每天 40 万单位, 连用 3 d。其中 3 只于眼科镊剥离完毕后即刻处死, 取双侧目标动脉, 盐水冲洗后 4% 多聚甲醛固定, 行石蜡切片、HE 染色确定外膜剥离效果。其余动物普通饮食饲养 2 周后处死, 取目标血管(外膜剥离段及对侧对照血管)各约 2.5 cm, 每段血管分成 2 段, 盐水冲洗

[收稿日期] 2007-01-31

[修回日期] 2007-12-10

[作者简介] 汤月霞, 博士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化防治, 联系电话为 13636640306, E-mail 为 penglaitang@163.com。通讯作者吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病防治, 联系电话为 021-63610109-73201, E-mail 为 zgwu@medmail.com.cn。

后 4% 多聚甲醛固定, 分别留做石蜡切片和冰冻切片。

1.3 组织形态学观察

石蜡包埋标本进行切片, 按常规方法进行 HE 染色, 高倍显微镜下观察外膜剥离效果及内膜的病理变化; 采用 BioSens Digital Imaging System 病理图像分析系统分别进行动脉粥样硬化斑块面积测定, 用斑块面积/中膜面积 (neointima area/media area, IMR) $\times 100\%$ 表示; 血管内弹性膜周长、外弹性膜周长测定, 了解血管重塑情况。

1.4 病变成分鉴定

石蜡切片行 α -actin、iv 型及 III 型胶原蛋白免疫组织化学染色, 冰冻切片行油红 O 染色, 了解病变主要细胞成分、脂质沉积情况。

1.5 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学方法采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 外膜剥离动脉模型的建立

胶原酶消化+ 眼科镊剥离可达到外膜剥离的效果。HE 染色可见血管外膜结缔组织基本剥离, 平滑肌层暴露于最外层(图 1)。

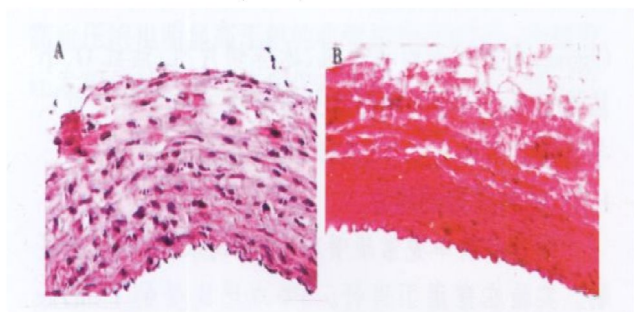


图 1. 外膜剥离术后即刻 HE 染色 A 为外膜剥离血管 ($\times 400$), B 为对照血管 ($\times 200$)。

2.2 外膜剥离致内膜增生性病变形成

外膜剥离后 2 周, 相应内膜处出现增生性病变, 平均 IMR 为 $23.14\% \pm 3.45\%$ 。与术后即刻比较, 血管外膜再生明显。对照侧血管内、中、外膜三层结构完整, 内皮连续, 无增生病变形成(图 2)。提示外膜剥离可导致内膜增生性病变形成, 而外膜的正常存在可维持血管结构及形态的正常。

2.3 病变成分鉴定

α -actin 免疫组织化学染色提示外膜剥离导致的内膜增生性病变的成分是平滑肌细胞(图 3)。胶原蛋白免疫组织化学染色发现, 在正常血管组织, iv 型

及 III 型胶原主要分布在血管外膜, 中膜和内膜基本未见, 在病变血管中, 除外膜外, 内膜增生性病变中存在 iv 型及 III 型胶原成分, 且以病变的表层量最大, 提示病变中的平滑肌细胞表型不同于中膜的收缩型平滑肌细胞, 以分泌型为主, 分泌胶原蛋白, 在病变的管腔面形成纤维帽(图 4), 利于病变的稳定性。油红 O 染色未见桔红色脂质染色, 提示病变内无脂质成分(图 5)。

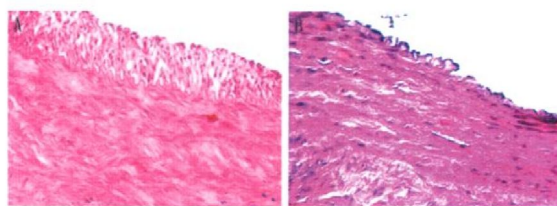


图 2. 外膜剥离后 2 周 HE 染色 ($\times 40$) A 为血管内膜增生性病变形成, B 为正常对照血管。

2.4 外膜剥离对血管重塑的影响

外膜剥离侧颈动脉内弹性膜平均周长为 8.20 ± 0.49 mm, 外弹性膜平均周长为 9.20 ± 0.49 mm, 而对照侧内弹性膜平均周长为 5.11 ± 0.42 mm, 外弹性膜平均周长为 6.24 ± 0.43 mm, 外膜剥离侧内外弹性膜均较对照侧明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$, 表 1), 提示外膜剥离导致内膜增生性病变形成的同时, 也导致了血管的扩张性重塑。

表 1. 外膜剥离对血管重塑的影响 ($\bar{x} \pm s$, mm)

分 组	n	内弹性膜周长	外弹性膜周长
外膜剥离侧	7	8.20 ± 0.49^a	9.20 ± 0.49^a
外膜完整侧	7	5.11 ± 0.42	6.24 ± 0.43

a 为 $P < 0.01$, 与外膜完整侧比较。

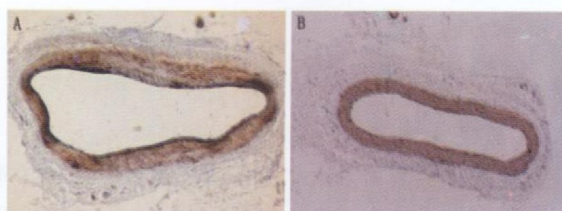


图 3. 外膜剥离后 2 周新生内膜和中膜平滑肌免疫组织化学染色 ($\times 40$) A 为外膜剥离导致的内膜增生性病变, B 为正常对照血管。

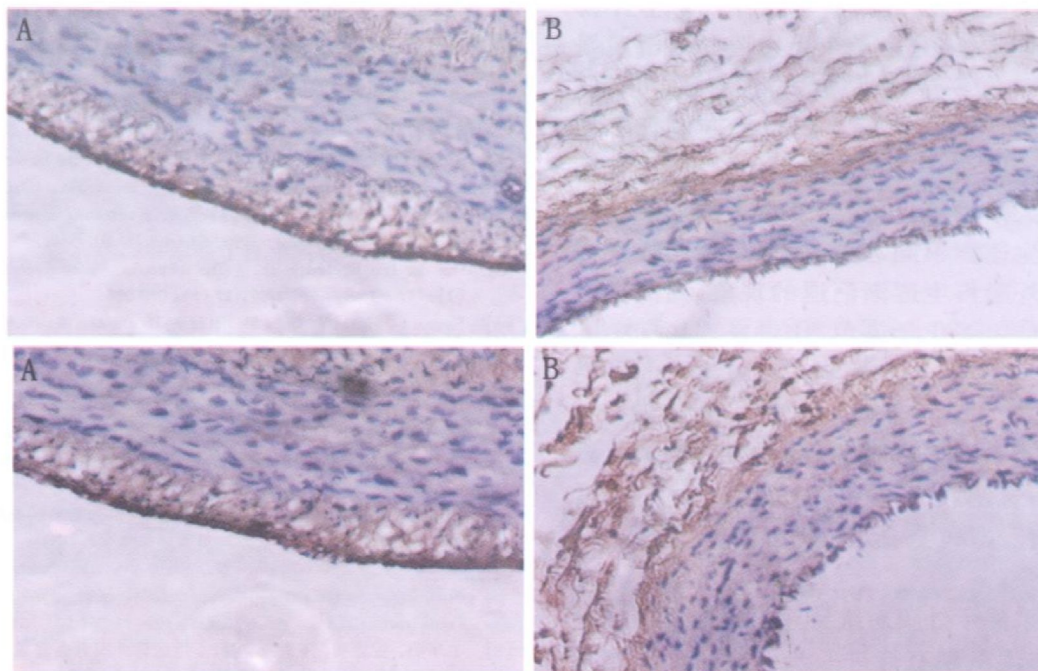


图 4. iv型、Ⅲ型胶原免疫组织化学染色(×200) 上图为 I 型胶原, 下图为 Ⅲ型胶原。A 为病变血管, B 为正常血管。

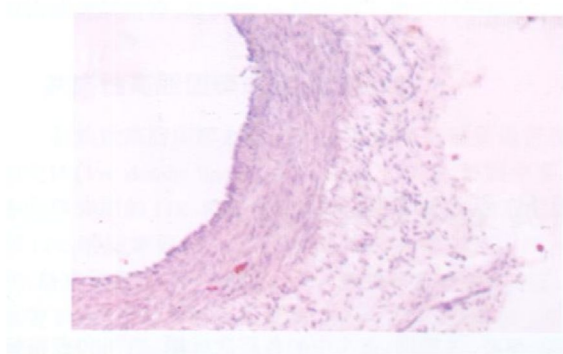


图 5. 病变血管油红 O 染色阴性(×100)

3 讨论

血管外膜主要由成纤维细胞、胶原构成, 富含末梢神经纤维。以往认为其在血管功能中主要提供支持作用, 而在血管病变形成的作用则被忽视。随着对 As 发病机制研究的深入, 越来越多的证据表明外膜参与了 As 的发生发展。例如在 As 发生之前, 外膜先出现炎症细胞聚集^[2,4], 而外膜炎症在已发生 As 的动脉中也广泛存在, 且与 As 的严重程度呈正相关^[5]。通过动脉套管、内毒素或脂多糖^[6]刺激外膜诱导外膜炎症, 则可导致内膜增生性病变形成。这些研究提示, 动脉外膜炎症与 As 的发生相关, 外

膜炎症在 As 发生的早期即被激活, 且外膜炎症程度与血管病变的严重程度之间呈正相关。国外 Barker^[7]、国内牟华明^[8]、王安才等^[9,10] 分别通过兔和高血压大鼠的在体实验, 采用手术方法剥离血管外膜, 证实血管外膜参与了内膜病变的形成。但动脉外膜在 As 的发生发展中究竟发挥了怎样的作用, 仍有待进一步研究。而进行这一研究的重要前提是成功建立一种简便易行的外膜剥离的动物模型, 通过比较外膜存在和不存在两种情况对 As 病变形成的影响, 明确外膜的作用。

早在 1994 年 Barker 等^[7] 观察了外科手术锐性剥离兔颈动脉外膜后内膜的变化, 发现 1 周后出现内膜增生性病变, 2 周时病变达峰值 (IMR 0.456), 随着时间的延长、血管外膜的再生, 内膜病变逐渐消退。但该手术方法难度较大, 需要显微外科设备, 且操作过程中易造成血管破裂、动脉瘤形成。国内牟华明等^[8] 曾采用刀片刮除的方法去除血管外膜, 对血管外膜在血管重构中的作用进行研究, 但由于刀片刮除外膜对血管牵张作用强, 存在易刮伤血管壁造成机械损伤、出血等缺点。这两种方法的缺陷限制了其普及使用, 为此作者尝试使用胶原酶消化+钝性机械分离的方法剥离血管外膜。结果发现, 胶原酶消化外膜 30 min 后, 外膜变为白色, 较消化前

明显疏松,容易用眼科镊钝性剥离。剥离至外膜白色疏松组织消失的程度,外膜基本剥离干净,且不易出现以上不利影响。HE染色可见中膜的平滑肌暴露于最外层,证实这一剥离外膜的方法有效、可行。

本实验中外膜剥离术后2周时病变血管平均IMR(23.14%)明显低于Barker等^[7]的结果,与其术后1周的结果大致相等,可能与外膜剥离方法及术后血管外膜再生速度不同有关,而且是否同样存在内膜病变随着外膜再生逐渐消退的现象,尚需进一步观察。经免疫组织化学染色,作者发现病变中的主要细胞成分为平滑肌细胞,与Barker等^[7]的结果一致,且有较多的iv型及③型胶原蛋白,提示病变中平滑肌细胞可能不同于中膜的收缩型平滑肌,主要是分泌表型,可分泌胶原蛋白。冰冻切片油红O染色未见阳性染色,即病变中无脂质沉积,可能与未给予高脂饮食有关。

本研究结果提示外膜对维持正常的血管结构是必要的,但其作用机制有待进一步研究。动脉外膜成分复杂,富含成纤维细胞、末梢神经纤维、滋养血管,而且具有内分泌及旁分泌功能,所以外膜可能从不同的方面对血管的结构、功能产生影响。以往有许多学者采用多种方法,如封闭外膜滋养血管、外膜局部用药等对外膜在As病变形成中的作用进行了研究。但通过比较一个组织结构存在与不存在两种

情况的不同,对其功能进行研究应是最好的方法,而这一模型的建立为血管外膜功能,特别是其在As形成中的作用的研究提供了新的工具。

[参考文献]

- [1] Schwartz CJ, Mitchell JRA. Cellular infiltration of the human arterial adventitia associated with atheromatous plaques [J]. *Circulation*, 1962, **26**: 73-78.
- [2] Wilcox JN, Scott NA. Potential role of the adventitia in arteritis and atherosclerosis [J]. *Int J Cardiol*, 1996, **54** (suppl): S21-S35.
- [3] van der Loo B, Martin JF. The adventitia, endothelium and atherosclerosis [J]. *Int J Microcirc*, 1997, **17** (5): 280-288.
- [4] Rayner K, Ersel SV, Groot PH, et al. Localization of mRNA for JF/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of ApoE knockout mouse [J]. *J Vasc Res*, 2000, **37** (2): 93-102.
- [5] Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster VO, et al. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implication for plaque vulnerability [J]. *Circulation*, 2002, **105** (21): 2504-511.
- [6] 胡鹏, 李建军, 陈莉, 等. 脂多糖诱导的血管外膜炎症对兔股动脉内膜增生的影响及机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 330-332.
- [7] Barker SGE, Tilling LC, Miller GC, et al. The adventitia and atherogenesis: removal initiates intimal proliferation in the rabbit which regresses on generation of a 'neoadventitia' [J]. *Atherosclerosis*, 1994, **105** (2): 131-144.
- [8] 牟华明, 祝之明, 王海燕, 等. 兔血管外膜对血管重构及收缩功能影响的初步观察[J]. *生理学报*, 2003, **55** (3): 290-295.
- [9] 王安才, 曹衡, 汪俊元, 等. 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠去外膜颈动脉内膜增生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (10): 862-866.
- [10] 王安才, 李俊, 曹衡, 等. 血管紧张素2对自发性高血压大鼠去外膜颈动脉血管结构和功能的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, **11** (12): 1389-394.

(此文编辑 陈临溪)

读者·作者·编者

关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写词的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,我刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题:同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;④缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein)缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;⑤用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,我刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请遵照执行。

1 名词术语在3个(含3个)汉字内,一律使用汉文;多于3个汉字的,才可使用英文缩写词;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用汉字;但冠心病、肺心病

等例外。

2 文题、摘要、关键词、正文中的各层次标题、插图和表格标题中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 段首的名词术语需用缩写词时,为了阅读方便,可在缩写词左右加圆括号,左半圆括号之前写出汉字名词术语全称。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:汉文全称(英文全称,缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等。

5 英文缩写词在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

7 名词术语的英文缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英文缩写词,我刊规定文献综述可用4~6个,其它文稿限4个内。

以上规定请共同遵照执行。

(胡必利起草、修订)