

苯并芘 (BaP) 联合血管紧张素 II (Ang II) 微泵释放法建立实验性小鼠腹主动脉瘤模型

吴少泽 陶潞渊 薛杨静 王娇妮 徐志强 汪 洁 唐疾飞 季亢挺

摘 要 **目的** 探讨苯并芘 (BaP) 腹腔注射联合血管紧张素 II (Ang II) 皮下微泵释放法建立实验性小鼠腹主动脉瘤模型的可行性。**方法** 48 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组:对照组、低剂量 4 周组、低剂量 6 周组、高剂量 6 周组。各实验组小鼠经处理后,取腹主动脉瘤、观察其大体形态;切片行 HE 染色、Masson 染色,进行统计学及组织学的评估;采用免疫组织化学法检测各组腹主动脉 MMP-12 表达水平。**结果** 高剂量 6 周组小鼠腹主动脉瘤形成率 (83.3%) 较其他 3 组 (50.0%、41.7%、0) 显著升高 ($P < 0.05$),高剂量 6 周组平均血管周长与其他 3 组比较也显著增大 ($1607 \pm 225 \mu\text{m}$ vs $1408 \pm 246 \mu\text{m}$ 、 $1394 \pm 230 \mu\text{m}$ 、 $935 \pm 109 \mu\text{m}$, $P < 0.05$)。免疫组织化学法检测提示高剂量 6 周组小鼠腹主动脉壁 MMP-12 表达 (0.62 ± 0.11) 较其他 3 组 (0.51 ± 0.10 、 0.48 ± 0.09 、 0.11 ± 0.04) 显著增多 ($P < 0.05$)。**结论** 高剂量血管紧张素: [0.90mg/(kg·d)] 皮下微泵释放 6 周联合苯并芘 (BaP) 腹腔注射能够高效地建立腹主动脉瘤模型。

关键词 腹主动脉瘤 血管紧张素 II 苯并芘

中图分类号 R543.1+6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.009

Establishment of Mice Experimental Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) Models by Benzo[a]Pyrene (BaP) Intraperitoneal Injection with Ang II Infusion. Wu Shaoze, Tao Luyuan, Xue Yangjing, et al. The Second Hospital Affiliated to Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate a method of benzo[a]pyrene (BaP) intraperitoneal injection with Ang II infusion using a osmotic pump for establishment of mice experimental abdominal aortic aneurysm models. **Methods** C57BL/6J mice (10 to 12 months old male) were divided into four groups. Mice in the control group received weekly intraperitoneal injection of medium-chain triglycerides. Mice in low dose 4 weeks group received daily Ang II infusion (0.72mg/kg) and weekly intraperitoneal BaP injection (10mg/kg, dissolved in medium-chain triglycerides). Mice in low dose 6 weeks group received daily Ang II infusion (0.72mg/kg) and weekly intraperitoneal BaP injection. Mice in high dose 6 weeks group received daily Ang II infusion (0.90mg/kg) and weekly intraperitoneal BaP injection. At the end abdominal aortic were taken. Aortic tissues were subject to HE, Masson for evaluation of vascular wall structure, collagen. The immunochemistry staining for evaluation the expression of matrix metalloproteinase-12. **Results** Compared with the other three groups, the incidence of AAA in the high dose 6 weeks group were significantly improved (83.3% vs 50.0%, 41.7%, 0, $P < 0.05$). Average circumference of aortic rings increased ($1607 \pm 225 \mu\text{m}$ vs $1408 \pm 246 \mu\text{m}$, $1394 \pm 230 \mu\text{m}$, $935 \pm 109 \mu\text{m}$, $P < 0.05$). Immunohistochemistry staining showed the expression of MMP-12 were increased compared with the other three groups (0.62 ± 0.11 vs 0.51 ± 0.10 , 0.48 ± 0.09 , 0.11 ± 0.04 , $P < 0.05$). **Conclusion** The mice experimental abdominal aortic aneurysm models can be efficiently established by benzo[a]pyrene (BaP) intraperitoneal injection with Ang II infusion [0.90mg/(kg·d)] for 6 weeks.

Key words Abdominal aortic aneurysm; Angiotensin II; Benzo[a]pyrene

腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA) 是由于腹主动脉中层弹性纤维断裂引起血管壁薄弱,动脉无法承受血流冲击的压力后出现的病理性扩张使

得动脉壁膨出而形成的。瘤体一旦破裂会造成内外科均无法及时处理的大出血,病死率可达 90%。因此鉴于其潜在的致命性,AAA 一直是研究热点。AAA 的主要病理特征是弹性纤维和胶原蛋白退变、主动脉壁上血管平滑肌细胞减少^[1,2]。在 AAA 的启动、扩张乃至最终的破裂过程中,弹性纤维和胶原蛋白网络的瓦解和退变发挥着重要的作用,而基质金属蛋白酶 (MMP) 的活性增加是动脉壁上弹性纤维和胶原蛋白退变的主要原因^[3,4]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81573185);浙江省科技厅基金资助项目 (2014C33163);温州科技局基金资助项目 (Y20140678)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院心血管内科

通讯作者:季亢挺,硕士生导师,电子信箱:jikt@wzmc.edu.cn

Zhang 等^[5]和笔者课题组前期研究发现血管紧张素 II (Ang II) 联合苯并芘 (Bap) 处理 C57BL/6N 小鼠 AAA 的形成率要高于单用 Ang II 处理, 但其形成率和大体形态尚不理想^[6]。因此建立一种高效的、更加符合人群腹主动脉瘤的实验性小鼠腹主动脉瘤模型是十分有必要的。本研究通过 Bap 腹腔注射联合不同浓度的 Ang II 微泵释放法, 旨在建立高效的、稳定的实验性小鼠 AAA 模型。

材料与方法

1. 实验动物: SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雄性, 10 ~ 12 月龄, 30 ~ 35g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。单笼饲养于温州医学院附属第二医院科研中心 SPF 级实验动物房。饮用纯净水, 标准饲料喂养, 自由饮食。生活节律为昼夜 12h, 保持恒温恒湿。

2. 试验药物与试剂: 药物微量渗透泵 (Osmotic Pump, Model 2004; 0.25 μ l/h, 4 周; Osmotic Pump, Model 2006; 0.15 μ l/h, 6 周; 购自美国 Alzet 公司); Ang II (A9525, 购自美国 Sigma 公司); Bap (B1760, 购自美国 Sigma 公司); 中链甘油三酯 (W1349, 购自法国嘉法狮公司), 在实验中作为 BaP 的溶剂。单克隆抗小鼠 CD68 抗体、单克隆抗 MMP-9 抗体、单克隆抗 MMP-12 抗体购于 Abcam 公司, DAB 试剂盒及免疫组织化学试剂盒购北京中杉金桥生物技术有限公司。

3. 模型建立: 2% 戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉后, 俯卧位固定。背部肩胛处备皮、消毒, 作长约 1cm 切口, 皮下埋置 Ang II 微量缓释泵^[7]。Ang II 溶于无菌生理盐水, 每只泵注满 Ang II 溶液, 放于 37℃ 水浴箱中 12h, 备用。Bap 溶于中链甘油三酯中配置成 2mg/ml 的溶液, 5ml/kg 行腹腔注射, 每周 1 次。

4. 实验分组: SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雄性, 10 ~ 12 月龄, 30 ~ 35g) 共分 4 组, 对照组、低剂量 4 周组、低剂量 6 周组和高剂量 6 周组, 每组 12 只。对照组: 腹腔注射中链甘油三酯 5ml/kg 体重, 每周 1 次。低剂量 4 周组: 背部植入 Ang II 微量渗透泵, 持续释放 Ang II 0.72mg/(kg · d), 持续 4 周, 同时腹腔注射 Bap 10mg/kg, 每周 1 次。低剂量 6 周组: 背部植入 Ang II 微量渗透泵, Ang II 0.72mg/(kg · d), 同时腹腔注射 Bap 10mg/kg, 每周 1 次, 持续 6 周。高剂量 6 周组: 背部植入 Ang II 微量渗透泵, Ang II 0.90mg/(kg · d), 同时腹腔注射 Bap 10mg/kg, 每周 1 次, 持续 6 周。

5. 血管标本的制备: 小鼠处理后第 7 周, 以 2% 戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉。仰卧位固定, 打开胸腹腔, 暴露心脏行生理盐水心脏灌注, 待肺组织呈白色后继续 4% 多聚甲醛灌注 15min, 在解剖显微镜下分离腹主动脉, 取出腹主动脉后拍照。

6. 组织包埋、切片: 靶血管 4% 多聚甲醛固定后常规脱水、透明及浸蜡, 将血管横截面平行于模具底部, 垂直包埋于石蜡块中。以 4 μ m 的厚度进行切片, 45℃ 水面展片, 将组织黏附于防脱载玻片上。65℃ 烤片 30min, 备用。

7. HE 染色: 常规脱蜡至水。苏木素染色 2 ~ 3min, 蒸馏水水洗 1min; 分化液分化 30s; PBS 浸泡 15min; 置伊红染液 1min; 蒸馏水稍洗 5s; 常规脱水、透明; 中性树胶封片。

8. Masson 染色: 常规脱蜡至水。浸泡于 Weigert 铁苏木素 A、B 等比混合液中染 3min, 蒸馏水水洗 1min; 酸性乙醇分化液分化 30s, 蒸馏水水洗 1min; Masson 蓝化液返蓝 30s, 蒸馏水水洗 1min; 浸泡于丽春红酸性品红液中染 4min; 蒸馏水水洗 1min; 磷钼酸溶液染 2min; 蒸馏水水洗 1min; 直接浸入苯胺蓝染液复染 7min, 蒸馏水水洗 1min; 95% 乙醇快速脱水; 无水乙醇脱水 2 次, 每次 15s; 二甲苯透明 2 次, 每次 5min; 使用中性树胶封片。

9. 免疫组织化学染色: 石蜡组织切片厚约 4 μ m, 常规脱蜡水合, 采用 SP 法, 具体操作步骤按照试剂盒说明书。

10. 动脉瘤形成的判定: 取小鼠腹主动脉间断切片, 在光镜下每张切片均以相同倍数和相同的曝光设置拍照。应用 Image pro plus 6.0 图像分析仪分析测量各组腹主动脉周长, 取每只小鼠腹主动脉 12 个不同横截面进行测量, 测得单只小鼠腹主动脉平均周长, 并以此计算各组小鼠腹主动脉平均周长; 以对照组小鼠腹主动脉平均周长为基准, 当处理组小鼠腹主动脉最大周长大于对照组平均血管周长的 50%, 即为腹主动脉瘤形成^[8]。

11. 统计学方法: 所有统计资料采用 SPSS 22.0 软件处理, 采用 Graph Pad Prism 6 做图。实验数据经定量或半定量处理后均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述。组间资料采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 高剂量 6 周组形成的实验性小鼠动脉瘤模型符合动脉瘤形态学特征: 术后 7 周, 通过小鼠腹主动

脉瘤标本的获取测量,对照组无动脉瘤形成,高剂量 6 周组 12 只小鼠中有 10 只达到了动脉瘤形成的标

准,成瘤率为 83.3%,且高剂量 6 周组肉眼观察下的瘤体形态明显膨隆,增大(图 1)。

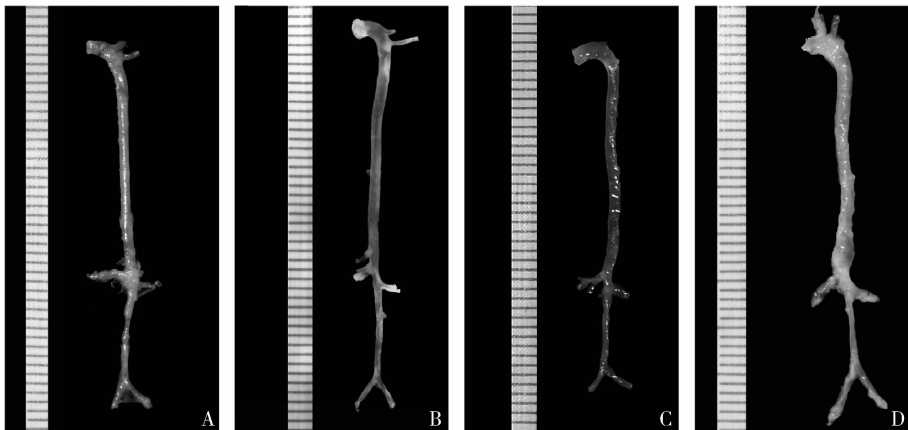


图 1 各组腹主动脉瘤形态学特征
A. 对照组;B. 低剂量 4 周组;C. 低剂量 6 周组;D. 高剂量 6 周组

2. 高剂量 6 周组与其他各组比较成瘤率明显增加;通过 Image Pro Plus(IPP)图像分析软件测量各小鼠腹主动脉平均周长,并计算得各组小鼠腹主动脉平均周长,并以对照组平均血管周长($935 \pm 109\mu\text{m}$)为基准,各实验组中有小鼠靶血管最大周长大于对照组平均血管周长 50%,视为腹主动脉瘤形成。笔者发

现高剂量 6 周组中 10 只(10/12, 83.3%)成瘤,低剂量 6 周组中 6 只(6/12, 50.0%)成瘤,而低剂量 4 周组中 5 只(5/12, 41.7%)成瘤(图 2)。与其他 3 组相比,高剂量 6 周的血管周长也明显增加,为 $1607 \pm 225\mu\text{m}$,低剂量 6 周组周长为 $1408 \pm 246\mu\text{m}$,低剂量 4 周组周长为 $1394 \pm 230\mu\text{m}$,对照组为 $935 \pm 109\mu\text{m}$ 。

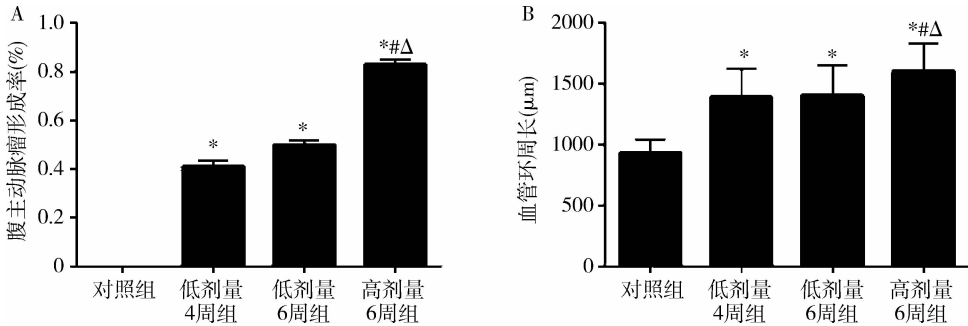


图 2 不同时间药物剂量组的血管周长和腹主动脉瘤形成率
A. 不同时间药物剂量动脉瘤形成率比较;B. 不同时间药物剂量腹主动脉周长比较;与对照组比较,* $P < 0.05$;
与低剂量 4 周组比较,# $P < 0.05$;与低剂量 6 周组比较, $\Delta P < 0.05$

3. 高剂量 6 周组形成的实验性小鼠动脉瘤模型符合动脉瘤的组织病理学特征:造模结束后,笔者将小鼠腹主动脉瘤标本进行了石蜡包埋切片,并进行了 HE 染色、Masson 染色。与对照组比较,可以看到高剂量 6 周组腹主动脉壁中膜弹力纤维有明显的降解、断裂;胶原纤维溶解、丢失,血管中膜弹力层断裂,血管正常结构破坏,符合典型的动脉瘤组织病理学特征(图 3)。

4. 高剂量 6 周组 MMP-12 表达增加:笔者对小鼠腹主动脉切片进行免疫组化染色,各 MMP-12 的表达量如下,高剂量 6 周组为 0.62 ± 0.11 ;低剂量 6 周组为 0.51 ± 0.10 ;低剂量 4 周组为 0.48 ± 0.09 ;对照组为 0.11 ± 0.04 。与其他 3 组相比,高剂量 6 周组 MMP-12 表达量明显升高($P < 0.05$, 图 4 和图 5)。

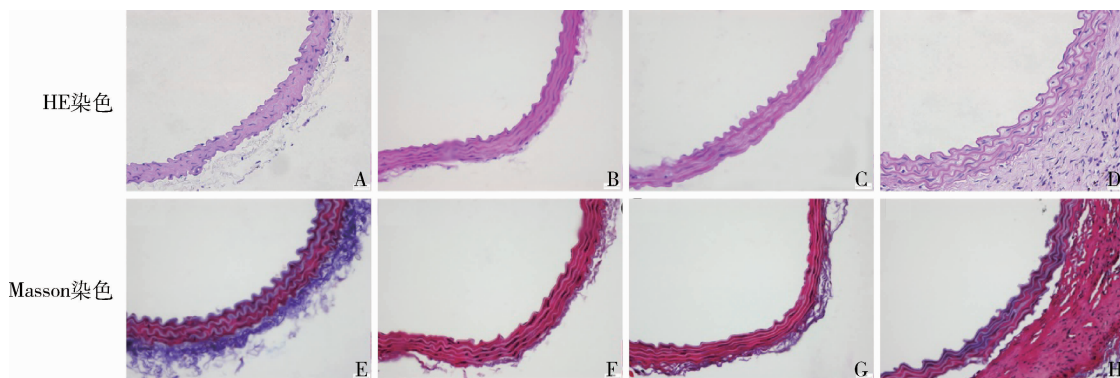


图3 腹主动脉切片 HE 染色和 Masson 染色

AE. 对照组;BF. 低剂量 4 周组;CG. 低剂量 6 周组;DH. 高剂量 6 周组

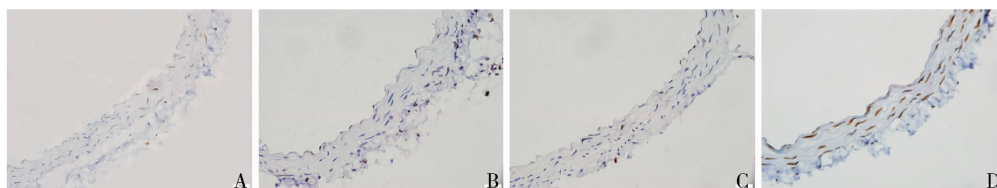


图4 不同时间药物剂量组 MMP-12 的表达

A. 对照组;B. 低剂量 4 周组;C. 低剂量 6 周组;D. 高剂量 6 周组

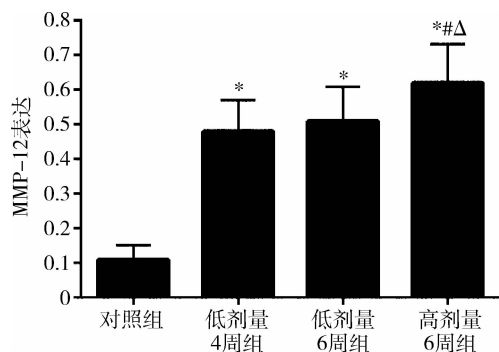


图5 不同时间药物剂量组 MMP-12 表达比较

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量 4 周组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与低剂量 6 周组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

4. 高剂量 6 周组的小鼠病死率无明显增加:高剂量 6 周组在观察期内有 1 只出现伤口破裂后死亡。而低剂量 6 周组有 2 只死亡;低剂量 4 周组有 1 只死亡。各组间小鼠死亡率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

AAA 是由于腹主动脉中层弹性纤维断裂引起血管壁薄弱使得动脉壁膨出而形成的。瘤体一旦破裂会造成内外科无法及时处理的大出血,病死率可达 90%。因此鉴于其潜在的致命性,AAA 一直是研究热点。目前主要有 3 种小鼠 AAA 脉瘤造模方法,小

鼠血管紧张素 II 诱导法、弹性蛋白酶灌注法和 CaCl_2 血管周围浸润法^[9-11]。在这 3 种方法中, CaCl_2 血管周围浸润法因其造模成功率低,且不稳定,目前应用逐渐减少。弹性蛋白酶灌注法因操作复杂,且操作难度大,也很少应用于小型动物的腹主动脉瘤的建模中。而常规血管紧张素 II 诱导法一般选用 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠,因其成本较大,且瘤体破裂病死率较高,在一定程度上限制了该方法造模的广泛应用。

在笔者课题组的前期研究中,通过采用血管紧张素 II 联合苯并芘腹腔注射,成功的造出了腹主动脉瘤,但相比于 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠血管紧张素 II 诱导法(造模成功率最高达 90%),其成功率并不是很理想,且瘤体形态与 $\text{ApoE}^{-/-}$ 小鼠血管紧张素 II 诱导法也有一定差距^[12]。针对前期造模中成功率低,瘤体形态不理想的问题,在笔者前期研究中造模方法的基础上,笔者适当延长了造模的时间,增加了药物浓度,选用了年龄更大的小鼠,为了避免出现过高的死亡率。并在延长造模时间的基础上,设计了两个药物浓度组。本研究中笔者发现,高剂量 6 周组小鼠成瘤率高达 83.3%,且死亡率低(8.3%)。同时形态学、组织病理学提示高剂量 6 周组能够成功地建立实验性小鼠腹主动脉瘤模型。

吸烟是腹主动脉瘤的高危因素,与不吸烟者相

比,吸烟者平均有 8 倍的风险患 AAA,而戒烟者得这种疾病的风险降为 4 倍^[13]。而本实验中所用的 BaP 是一种烟草和煤焦油燃烧的副产物,是香烟烟雾的重要组成部分^[14]。

研究表明,BaP 和它的代谢产物可引起血管壁的病理学改变,并导致其他组织和细胞中诸如 MMP-12 等金属蛋白酶表达的上升、巨噬细胞浸润、核转录因子(NF- κ B)的激活等生物学反应^[15]。Curfs 等^[16]研究发现长期暴露于 BaP 导致 ApoE 基因缺陷小鼠血管组织中巨噬细胞的浸润,且 BaP 活化 NF- κ B 的能力已经在血管平滑肌细胞、A549 细胞、NIH 3T3 细胞、表皮 CI41 细胞和星形胶质细胞中出现^[17]。

临床研究结果表明,AAA 患者主动脉壁内基质金属蛋白酶 MMP-12 等的活性增高,该酶主要负责血管壁中基质成分的降解,而动脉壁的正常基质成分的破坏,将导致动脉壁的薄弱,形成动脉瘤。所有由 BaP 诱导的病理学改变与所观察到的在 AAA 的发展中的改变非常相似。这也使得笔者应用的模型更符合吸烟人群 AAA 形成过程,有利于研究吸烟人群 AAA 的发生、发展机制,并进一步探讨吸烟与腹主动脉瘤的关系。

参考文献

- Grytsan A, Watton PN, Holzapfel GA. A thick-walled fluid-solid-growth model of abdominal aortic aneurysm evolution: application to a patient-specific geometry [J]. J Biomech Eng, 2015, 137(3): 374-381
- Wang KC, Li YH, Shi GY, et al. Membrane-bound thrombomodulin regulates macrophage inflammation in abdominal aortic aneurysm [J]. Arterioscl Thromb Vasc Biol, 2015, 35(11): 2412-2422
- Dai X, Shen J, Annam NP, et al. SMAD3 deficiency promotes vessel wall remodeling, collagen fiber reorganization and leukocyte infiltration in an inflammatory abdominal aortic aneurysm mouse model [J]. Sci Rep, 2015, 5(10): 180
- Nosoudi N, Nahar-Gohad P, Sinha A, et al. Prevention of abdominal aortic aneurysm progression by targeted inhibition of matrix metalloproteinase activity with batimastat-loaded nanoparticles [J]. Circ Res, 2015, 117(11): e80-89
- Zhang Y, Ramos KS. The development of abdominal aortic aneurysms in mice is enhanced by benzo(a)pyrene [J]. Vasc Health Risk manage, 2008, 4(5): 1095-1102
- Ji K, Zhang Y, Jiang F, et al. Exploration of the mechanisms by

which 3,4-benzopyrene promotes angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice [J]. J Vasc Surg, 2014, 59(2): 489-492

- Chen X, Rateri DL, Howatt DA, et al. Amlodipine reduces AngII-induced aortic aneurysms and atherosclerosis in hypercholesterolemic mice [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e81743
- Yamanouchi D, Morgan S, Stair C, et al. Accelerated aneurysmal dilation associated with apoptosis and inflammation in a newly developed calcium phosphate rodent abdominal aortic aneurysm model [J]. J Vasc Surg, 2012, 56(2): 455-461
- Zhang X, Thatcher S, Wu C, et al. Castration of male mice prevents the progression of established angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms [J]. J Vasc Surg, 2015, 61(3): 767-776
- Wei Z, Wang Y, Zhang K, et al. Inhibiting the Th17/IL-17A-related inflammatory responses with digoxin confers protection against experimental abdominal aortic aneurysm [J]. Arterioscl, Thromb Vasc Biol, 2014, 34(11): 2429-2438
- Wang L, Cheng X, Li H, et al. Quercetin reduces oxidative stress and inhibits activation of cJun N-terminal kinase/activator protein1 signaling in an experimental mouse model of abdominal aortic aneurysm [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(2): 435-442
- Halpern VJ, Nackman GB, Gandhi RH, et al. The elastase infusion model of experimental aortic aneurysms: synchrony of induction of endogenous proteinases with matrix destruction and inflammatory cell response [J]. Journal of vascular surgery, 1994, 20(1): 51-60
- Goldstein MR, Mascitelli L, Pezzetta F. Letter by Goldstein et al regarding article, "Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromso study" [J]. Circulation, 2010, 121(1): e7; author reply e8
- Guo X, Luo L, Ma Y, et al. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on particulate organic matters [J]. J Hazard Mater, 2010, 173(1-3): 130-136
- Sharma A, Neekhra A, Gramajo AL, et al. Effects of Benzo(e)Pyrene, a toxic component of cigarette smoke, on human retinal pigment epithelial cells in vitro [J]. Invest Ophthalmol Visual Sci, 2008, 49(11): 5111-5117
- Curfs DM, Lutgens E, Gijbels MJ, et al. Chronic exposure to the carcinogenic compound benzo[a]pyrene induces larger and phenotypically different atherosclerotic plaques in ApoE-knockout mice [J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 101-108
- Hockley SL, Arlt VM, Jahnke G, et al. Identification through microarray gene expression analysis of cellular responses to benzo(a)pyrene and its diol-epoxide that are dependent or independent of p53 [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(1): 202-210

(收稿日期:2016-05-31)

(修回日期:2016-06-23)