

小鼠血管内膜增生模型的建立

杨旭¹ 颜新¹ 刘震泽² 李俊² 吴文婷² 王维刚^{2*}

(¹同济大学中医研究所, 上海 200092; ²上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 该文主要介绍一种可以在小鼠中有效地诱导血管内膜增生的方法。该方法使用硅胶管嵌套小鼠股动脉, 造成股动脉血管内膜增生。病理切片观察表明, 实验组小鼠股动脉与假手术组相比出现了内膜层和中膜层不规则增厚, 管腔狭窄, 细胞排列紊乱, 内膜炎症细胞浸润等。免疫组织化学染色显示内膜增生部分是由于血管平滑肌细胞(VSMCs)增生和基质积聚所致。该模型的建立对动脉粥样硬化病理机制研究和治疗药物的研发具有重要意义。

关键词 小鼠疾病模型; 内膜增生; 外膜炎; 套管

血管内膜增生是动脉粥样硬化、冠心病、慢性器官移植排斥反应、糖尿病等非感染性血管内膜炎症疾病的共同特征^[1-4]。血源性有害因素如高血脂、高血糖、促炎因子等激活和损害血管内皮细胞, 引起局部炎症, 出现大量炎细胞浸润和平滑肌细胞增生, 使血管内膜增厚, 血管腔狭窄甚至完全闭塞, 导致下游组织缺血、缺氧以及血管新生和修复障碍, 最终使器官失去功能, 如果诱发血栓形成或者斑块脱落则引起心肌梗塞或者脑卒中^[5]。本文主要介绍一种在股动脉上嵌套硅胶管产生血管内膜增生的小鼠模型, 该模型通过异物刺激, 引发血管外周炎症反应, 从而产生血管内膜灶性纤维性增厚, 影响血管收缩功能。这种血管内膜增生的动物模型对于血管内膜增生性疾病的发生机制与防治研究是十分有意义的。

1 材料与方 法

1.1 动物

11周龄雄性C57/BL6小鼠10只(上海斯莱克公司提供), 体重25~30 g。该研究经过上海南方模式生物研究中心实验动物管理与使用委员会(IACUC)的批准, IACUC号: 20120002。小鼠饲养在恒温(21~22 °C)房间, 每隔12 h光暗循环, 每日小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。实验动物在诱导模型前, 先适应饲养环境1周。

1.2 试剂和仪器

戊巴比妥钠(Sigma公司); 体视显微镜(Olympus公司); 眼科剪、显微剪、显微镊(上海申丁实业有限公司); 带针缝合线(型号分别为4-0、8-0, 上海浦东金环医疗用品有限公司); 小动物复温板(Kim

Laube & Co., Inc. ASIA); 单克隆anti- α -smooth muscle actin(α -SM actin) antibody(1:400; Sigma-Aldrich); 单层硅胶管(内径0.40 mm, 外径0.80 mm)为澳大利亚悉尼大学病理系包士三教授所赠。

1.3 模型诱导

小鼠腹腔注射戊巴比妥钠(80 mg/Kg)麻醉, 双股内侧备皮, 小鼠麻醉成功后, 仰卧位, 常规消毒。选取髌关节与膝关节连线的中点处, 垂直股骨长轴方向切开约1 cm长切口(如图1A)。在体视显微镜下, 游离右侧股动脉鞘, 钝性撕开股动脉鞘, 分离股动脉。剪取一段长1.5 mm的硅胶管(内径为0.40 mm, 外径为0.80 mm), 沿纵向剖开, 套在股动脉上, 使用8-0的缝线间断打结固定套管(如图1C和图1D)。用4-0缝线间断缝合皮肤, 切口常规消毒。左侧股动脉行假手术, 同上法游离股动脉, 不进行套管, 间断缝合皮肤。术后复温, 待小鼠苏醒后, 将小鼠放回笼中。

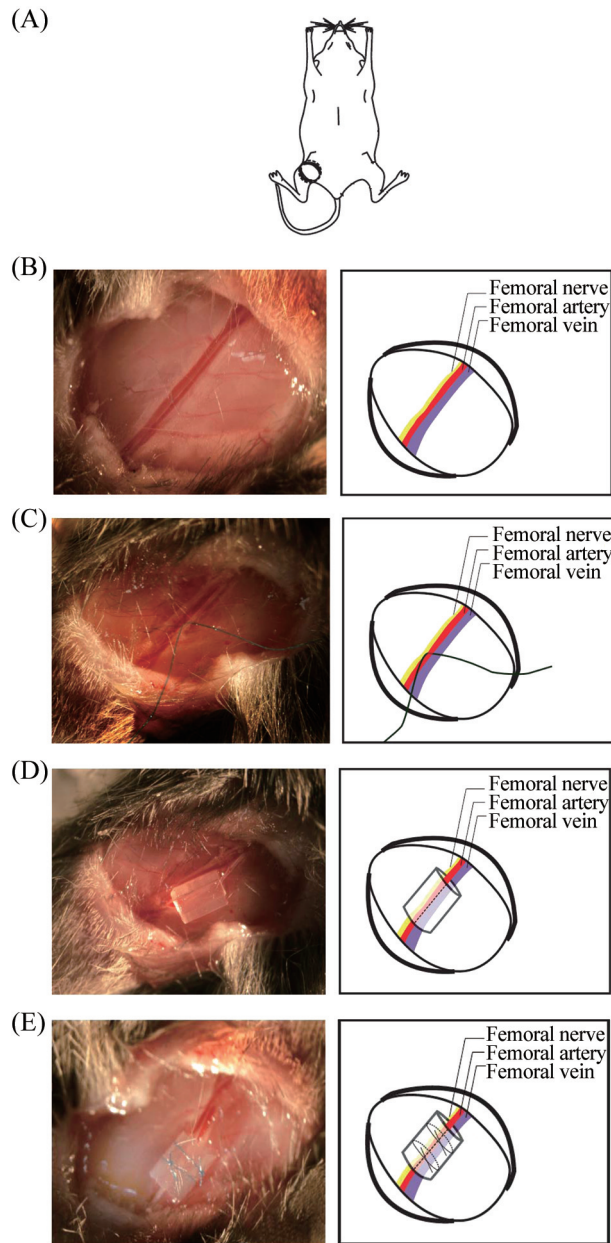
1.4 组织样本采集与免疫组化染色法

造模术后第14 d处死小鼠, 解剖镜下取出股动脉套管, 剪取套管部位血管, 浸泡于4%多聚甲醛固定液中固定24 h, 石蜡包埋, 5 μ m厚度切片, 然后进行常规H&E染色及免疫组化染色。采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合体(SABC)法检测血管壁VSMCs的表达。石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶, 微波抗原修复10 min, 以

收稿日期: 2012-07-06 接受日期: 2012-09-24

国家高技术研究发展计划(836计划, No.2008AA02Z126)、上海市科委科技创新行动计划(No.10140901400)和上海市科学技术委员会科研计划项目课题(No.10DZ1975600)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-50793648-82008, E-mail: weagonwong@gmail.com



A: 手术切口示意; B: 暴露股动脉鞘; C: 分离股动脉(穿线处); D: 股动脉套管; E: 固定套管。

A: the place of operation; B: neurovascular bundles are exposed; C: femoral artery is separated; D: the collar is positioned; E: the collar is fixed.

图1 小鼠股动脉套管手术操作示意图

Fig.1 Schematic representation of femoral artery collar positioning operation

10%正常山羊血清封闭, 之后相继与I抗和II抗反应, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 封片后镜下观察相关抗原的表达变化。

1.5 形态学分析

形态学分析采用图形软件Image Pro 6.0, 主要

分析参数为内膜层厚度、内膜层横截面面积、中膜层厚度、中膜层横截面面积以及内膜/中膜层横截面面积比。其中内膜层定义为管腔至弹性内膜层区域, 而中膜层定义为弹性内膜层至弹性外膜层区域。

1.6 统计学处理

用Graphpad Prism软件进行统计学分析, 数据以 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ 表示, 数据比较采用双样品 *t* 检验。 $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 体重变化

观察小鼠造模前1周到动物处死, 共21 d的体重变化情况, 结果表明: 整个观察期间, 小鼠体重缓慢上升, 只有在动脉套管手术2 d后, 体重出现少许下降, 但很快恢复正常(图2)。且日常观察显示, 小鼠毛色光亮, 精神状态良好, 活动能力正常, 未出现体重降低或精神萎靡。

2.2 股动脉组织切片

造模手术后第14 d处死小鼠, 解剖镜下取出造模以及对照假手术股动脉血管, 置于4%多聚甲醛固定液中固定并进行常规H&E染色。切片结果显示: 对照组股动脉结构完整, 血管壁厚度正常, 弹性内膜层和弹性外膜层清晰可见; 动脉内膜位于弹性内膜与管腔之间, 厚度极薄, 几乎不可见(图3A); 动脉中膜位于弹性内膜和弹性外膜层之间, 由4~5层平滑肌构成, 其结构致密完整, 没有炎性细胞浸润; 外膜层位于弹性外膜层之外, 主要由结缔组织构成, 其厚度基本同中膜层一样, 且基本没有炎性细胞浸润。

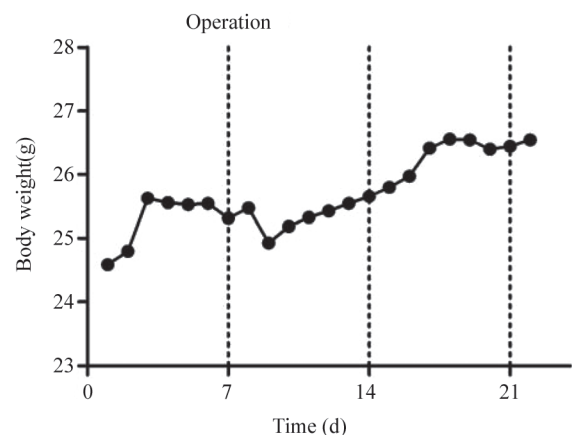
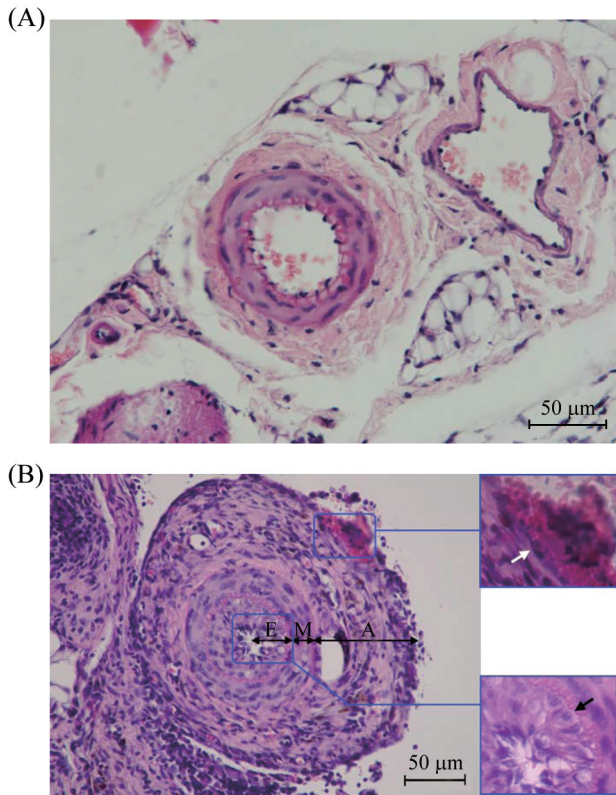


图2 造模前后小鼠体重情况

Fig.2 Mice bodyweight before and after operation



A: 对照组; B: 实验组(E=内膜, M=中膜, A=外膜; 黑色箭头: 细胞体积较大, 单核, 形态不规则, 可能为单核巨噬细胞; 白色箭头: 炎性细胞聚集)。

A: the sham-operated side; B: the collar-treated side(E=endothelium, M=media, A=adventitia. Cells indicated with a black arrow are large, mononuclear and of irregular shape, with a strong possibility of being mononuclear macrophages; and inflammatory cells are indicated with a white arrow).

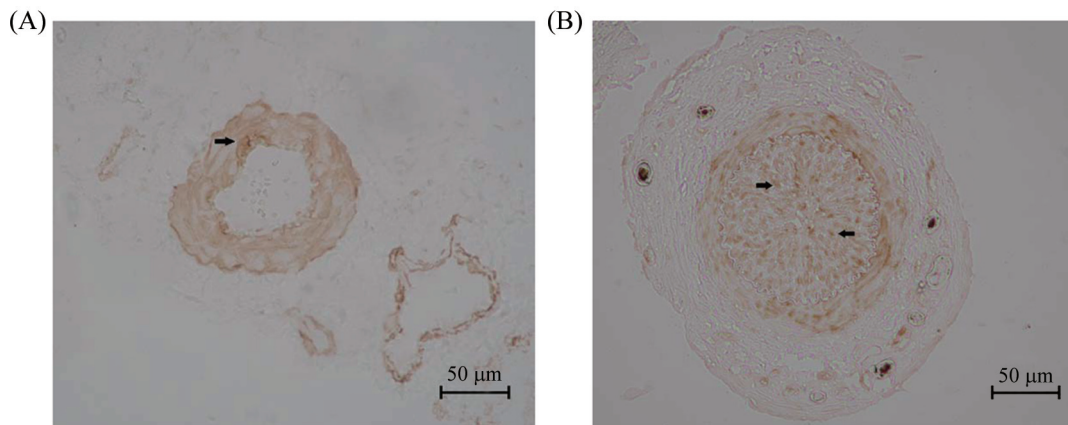
图3 股动脉横截面切片H&E染色

Fig.3 H&E stained cross sections of femoral arteries

与对照组相比, 实验组股动脉内膜增生严重(图3B), 管腔狭窄, 细胞排列紊乱, 增生部位可见大量炎性细胞浸润, 细胞体积较大, 单核, 形态不规则, 细胞间可有部分融合, 细胞周边或两极可见板状伪足和突起, 从形态学上观察推测可能为单核巨噬细胞(图3B, 黑色箭头); 同时, 血管中膜层增厚, 平滑肌结构紊乱, 且与血管外膜之间的分界变模糊, 并伴有炎性细胞浸润; 血管外膜除有大量增生外, 还在外周新生许多小血管, 并在血管周围出现大量炎性细胞聚集(图3B, 白色箭头)。免疫组化结果显示, 血管内膜和中膜处均可见分布的VSMCs的阳性染色表达颗粒, 与对照组相比, 实验组主要在新生内膜中表达, 胞浆和基质内出现大量特异性的阳性颗粒(图4)。

2.3 形态学分析

采用图形软件Image Pro 6.0, 对动脉组织切片的内膜层厚度、内膜层面积、中膜层厚度、中膜层面积以及内膜/中膜层面积比进行分析。结果表明: 与对照组相比, 模型组动脉的内膜层厚度为 $(32.96 \pm 8.55) \mu\text{m}$, 比正常股动脉明显增厚($P=0.0006$), 内膜层面积为 $(1.12 \pm 0.31) \times 10^4 \mu\text{m}^2$, 远远大于对照组($P=0.011$, 图5A和图5B); 而中膜层厚度与中膜层面积也分别达到了 $(25.38 \pm 2.25) \mu\text{m}$ 和 $(1.52 \pm 0.18) \times 10^4 \mu\text{m}^2$, 比对照组增加了10.7%($P=0.0277$)和107.8%($P=0.0002$, 图5C和图5D); 比较内膜/中膜层面积比例, 模型组明显增大, 具有统计学意义($P=0.002$, 图5E)。

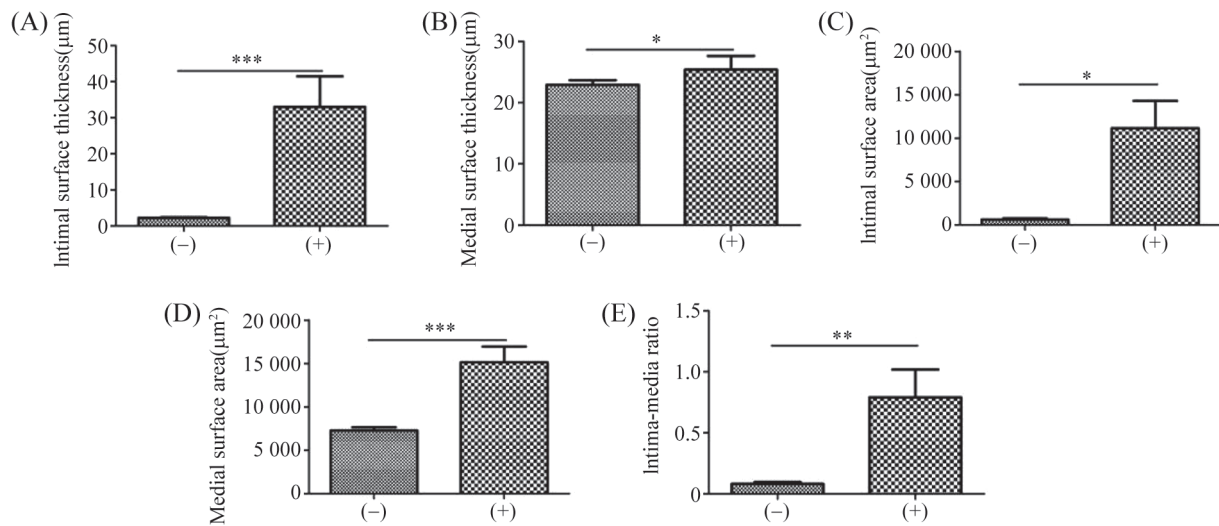


A: 对照组; B: 实验组; 箭头为阳性染色表达颗粒。

A: the sham-operated side; B: the collar-treated side. Positive granules are indicated with arrows.

图4 股动脉横截面切片α-SM actin免疫组化染色

Fig.4 Femoral artery α-SM actin immunohistochemistry staining



A: 内膜层厚度; B: 中膜层厚度; C: 内膜层面积; D: 中膜层面积; E: 内膜/中膜层面积比。(+) : 实验组; (-) : 对照组(*t*检验, $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。

A: cross-sectional intimal surface thickness; B: medial surface thickness; C: intimal surface area; D: medial surface area; E: intima-media area ratio. ‘(-)’ denotes the sham-operated side, while ‘(+)’ denotes the collar-treated side(*t* test, $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

图5 股动脉横截面形态学分析结果

Fig.5 Morphological analysis results of femoral arteries

3 讨论

本文介绍了一种可以有效诱导小鼠产生血管内皮增生模型的方法,该方法主要通过股动脉嵌套硅胶管,诱发血管外周异物排斥反应,引起血管炎性损伤,进而产生内膜增生。诱导血管内膜增生模型的手段主要包括血管内膜损伤和外周手术,目前内膜损伤手术主要是球囊损伤术,在颈外动脉向近心端插入球囊导管至颈总动脉起始部,慢速回拉球囊至颈内外动脉分叉处反复数次,完成后结扎颈外动脉,但该模型主要针对家兔^[6-7]、大鼠^[7-8]等体型较大的动物,对于小鼠不易造模,有一定死亡率。血管外周套管手术,最早源自家兔颈动脉套管模型, Moroi 等^[9]将该方法经过改进后首次应用于小鼠,在正常饮食的C57/BL6和SV129小鼠股动脉外周套管两周后内皮明显增生。该模型相较于其他模型,创伤小、操作简便,发病时间和症状强度可控,避免了由基因背景和饮食习惯而引起的潜在的差异性,采用左右两侧股动脉分别进行套管和假手术,可以减少实验样本量和个体间差异。实验结果表明股动脉套管手术创伤小,小鼠术后未出现行动能力受损,也未见消瘦、精神萎靡等症状。病理观察显示造模动脉各层结构均出现病理症状,包括新内膜生成,厚度增加,

管腔狭窄,并伴随炎性细胞浸润;中膜层平滑肌结构紊乱;血管外膜增生,大量炎性细胞浸润,同时出现新生小血管,免疫组化结果表明内膜增生部分是由于血管平滑肌细胞(VSMCs)增生和基质积聚所致。此外,利用图形分析软件对血管各结构层统计表明,模型组血管内膜的厚度和面积较正常组明显增加,内膜/中膜面积比亦有明显升高。

在造模过程中,要注意使用生理盐水保持术野湿润,以免造成人为的血管损伤。股静脉上游有很多小的分枝,分离股动脉时要仔细,一旦出现损伤,立即用干棉球压迫止血。

选择宽松非闭合性的套管,以免对手术部位造成压迫缺血和坏死。放套管时,因为股动脉上面也有分枝,套管应放置在两个分枝之间,以便于起到固定作用,最适宜的长度为1.5 mm左右,从组织中分离出来的股动脉长度应与套管长度大致相同,否则会减弱套管的固定作用,反而增加其他部位的损伤。取材时,我们应切取股动脉套管两端至肌层,取下套管,将整块组织浸在固定液中,切片时可以整块组织切片,保持组织结构完整性,便于定位参考。

本模型的病理机制主要是由外膜炎导致内膜增生引起^[10]。长期以来,人们一直非常重视血管

内膜层的内皮细胞(endothelium)及中膜层的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)对血管损伤形成的作用^[11-12], 而忽视了血管外膜(adventitial)的潜在作用, 认为外膜层仅仅是包裹血管的疏松结缔组织, 除了对大血管的支持作用以外, 几乎没有其他特殊的作用。事实上, 最近越来越多的证据表明, 血管外膜炎症与血管外科重建^[3]、血管腔内治疗术后及动脉粥样硬化等发生狭窄或闭塞息息相关。然而, 有关血管外膜炎症对内膜增生影响的机制的研究尚不明确, 目前发现外膜炎症对内膜的影响可能与趋化因子、血管紧张素II、白细胞介素-6、Toll样受体、血管中性肽链内切酶等因素的参与有关^[4,13-14]。然而, 现有研究对于外膜炎症对内膜增生及再狭窄形成的分子机制、信号转导过程仍尚不清楚, 有待于进一步的研究。同时因为此模型的炎症随时间的推进而逐渐加重^[15-16], 本文选取炎性反应较为典型时间点。在药理机制研究方面, 该模型主要应用于研究药物的抗炎作用^[17-18], 可以根据研究需要通过控制套管时间的长短以获得炎性反应合适的模型来进行药物研究, 这也有待于下一步的研究归纳总结。

综上所述, 本实验成功建立了一种快速有效地通过血管外膜炎症诱导C57/BL6小鼠股动脉内膜增生的模型, 这种模型对动脉粥样硬化及血管内膜增生的机制研究具有重要意义。

特别感谢——

澳大利亚悉尼大学医学院病理系包士三教授(Prof. Shisan Bao)在技术上的指导。

参考文献 (References)

- 1 Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473(7347): 317-25.
- 2 Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, *et al.* Heart disease and stroke statistics—2012 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125(1): e2-e220.
- 3 Kaufman CL, Ouseph R, Blair B, Kutz JE, Tsai TM, Scheker LR, *et al.* Graft vasculopathy in clinical hand transplantation. *Am J Transplant* 2012; 12(4): 1004-16.
- 4 Kruger D. Neo-intimal hyperplasia, diabetes and endovascular injury. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23: 1-5.
- 5 Shenoy S. A clinical commentary on the article “an early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hyperplasia”. *J Cardiovasc Transl* 2011; 4(5): 683-4.
- 6 Liu MW, Roubin GS, King SB 3rd. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. *Circulation* 1989; 79(6): 1374-87.
- 7 Vilahur G, Padro T, Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: Insights from large animal models. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 907575.
- 8 Prichard HL, Manson RJ, DiBernardo L, Niklason LE, Lawson JH, Dahl SL. An early study on the mechanisms that allow tissue-engineered vascular grafts to resist intimal hyperplasia. *J Cardiovasc Transl* 2011; 4(5): 674-82.
- 9 Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, *et al.* Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* 1998; 101(6): 1225-32.
- 10 Maiellaro K, Taylor WR. The role of the adventitia in vascular inflammation. *Cardiovasc Res* 2007; 75(4): 640-8.
- 11 Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(4): 605-16.
- 12 Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 2002; 8(11): 1235-42.
- 13 Majesky MW, Dong XR, Högglund V, Daum G, Mahoney WM Jr. The adventitia: A progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs* 2012; 195(1/2): 73-81.
- 14 Song GJ, Barrick S, Leslie KL, Bauer PM, Alonso V, Friedman PA, *et al.* The scaffolding protein EBP50 promotes vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation by regulating Skp2 and p21(cip1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(1): 33-41.
- 15 Lardenoye JH, Delsing DJ, de Vries MR, Deckers MM, Princen HM, Havekes LM, *et al.* Accelerated atherosclerosis by placement of a perivascular cuff and a cholesterol-rich diet in ApoE*3Leiden transgenic mice. *Circ Res* 2000; 87(3): 248-53.
- 16 Sasaki T, Kuzuya M, Nakamura K, Cheng XW, Shibata T, Sato K, *et al.* A simple method of plaque rupture induction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(6): 1304-9.
- 17 Weakley SM, Wang X, Mu H, Lu J, Lin PH, Yao Q, *et al.* Ginkgolide A-gold nanoparticles inhibit vascular smooth muscle proliferation and migration *in vitro* and reduce neointimal hyperplasia in a mouse model. *J Surg Res* 2011; 171(1): 31-9.
- 18 Niida T, Isoda K, Kitagaki M, Ishigami N, Adachi T, Matsubara O, *et al.* IkappaBNS regulates interleukin-6 production and inhibits neointimal formation after vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 2012; 93(2): 371-9.

Induction of Rapid Intimal Hyperplasia in Mice

Yang Xu¹, Yan Xin¹, Liu Zhengzhe², Li Jun², Wu Wenting², Wang Weigang^{2*}

(¹Traditional Chinese Medicine Institute, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²Shanghai Research Center For Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract An approach to induce neointimal growth in mice is presented. A silicone tube collar is placed around the femoral artery of the mouse. After 2 weeks, significant changes such as irregular growth of intima, media thickness and luminal stenosis, increasing of endothelial cell permeability, disturbance of cell alignment and infiltration of inflammatory cells towards intima in collar-treated groups in comparison to sham-operated groups, can be observed in histological sections. It is indicated by immunostaining that the observed neointimal growth is caused by hyperplasia of VSMCs and deposition of matrixes. The present model is therefore of great importance in investigating the pathological mechanisms of atherosclerosis and developing therapeutic drugs.

Key words mouse model; intimal hyperplasia; adventitial inflammation; collar

Received: July 6, 2012 Accepted: September 24, 2012

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No.2008AA02Z126), the Program of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (No.10140901400) and the Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No.10DZ1975600)

*Corresponding author. Tel: 86-21-50793648-82008, E-mail: weagongwong@gmail.com

简讯

广东省细胞生物学大会暨2012学术研讨会在广州举行

广东省细胞生物学大会暨2012细胞模型构建与应用学术研讨会, 于2012年11月24日在广州南方医科大学大礼堂召开, 出席大会的本会会员代表、学术会专家、嘉宾、科技工作者和研究生共五百余人。

广东省细胞生物学学会第三届理事会任期已满, 按章正常换届。大会首先由应届理事长张积仁教授主持, 选举通过产生新一届理事、常务理事及领导班子成员。夏建川教授任理事长, 常务副理事长郑利民、汪森明教授以及副理事长、秘书长组成新一届理事会、常务理事。诚聘陈尊器教授、张积仁教授任名誉理事长及顾问。新任理事长夏建川教授代表新一届理事会讲话, 衷心感谢上届领导、理事和全体会员对学会做出的卓有成效的贡献, 表示要恪尽职守, 努力工作, 发扬学会优良传统, 团结广大会员, 积极努力把广东省细胞生物学学会不断推向前进。

学术研讨会就细胞模型的构建与临床应用为主题, 邀请了本会和广州的多位知名专家学者作专题学术报告, 展示新成果和新进展, 并进行热烈讨论。学术氛围十分活跃, 为学科基础与临床理论研究与应用转化对接提供平台, 深受与会者好评和欢迎。

大会圆满结束。