

网络出版时间: 2023-09-20 09:30:48 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230918.1410.008>

高脂饮食联合血管紧张素-II 和 β -氨基丙腈 构建小鼠主动脉夹层模型

耿平美惠^{1,2}, 钟 萍¹, 何志凯¹, 胡长清^{1,2}, 黄 龙^{1,2}, 张璟璇^{1,2}

摘要 目的 探索应用高脂饮食联合血管紧张素-II (Ang-II) 和 β -氨基丙腈 (BAPN) 构建小鼠主动脉夹层模型的方法。方法 24 只 C57BL/6J 小鼠(4 周龄, 雄性) 分为对照组 [(腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液 10 ml/(kg·d)], Ang-II 4 mg/(kg·d) 组和 Ang-II 4 mg/(kg·d) + BAPN 0.33 g/(kg·d) 组, 每组 8 只; 每只小鼠均给予高脂饮食, 同一时间点测量小鼠体质量并按体质量标准给药, 实验过程中死亡小鼠立即解剖, 取出主动脉行病理切片并在显微镜下观察。给药期间采用小动物超声观察主动脉形态, 对有明显夹层形成的小鼠直接处死并解剖。结果 给药后, 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组小鼠活动量、食欲下降最为明显, 且比高脂饮食联合 Ang-II 组小鼠主动脉夹层破裂病死率和建模成功率高, 对照组小鼠未见明显变化。在小动物超声下, 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组对比其他两组小鼠可见腹主动脉血管假腔形成, 血管膨大。将实验组小鼠给药过程中死亡的小鼠立即解剖, 可见腹腔及血管周围大量的血凝块; 小动物超声下见主动脉夹层或主动脉瘤形成的小鼠, 解剖可见血管壁与周围组织粘连严重, 而对照组小鼠血管未见明显异常。HE 染色结果显示, 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组小鼠有血管壁假腔形成, 弹力蛋白和胶原蛋白排列紊乱。统计每组血管壁厚度, 分析发现两个实验组均比对照组的血管增厚, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。Ang-II + BAPN 联合高脂饮食组小鼠的血管壁出现了严重的弹性蛋白分解。结论 通过高脂饮食联合 Ang-II 4 mg/(kg·d) + BAPN 0.33 g/(kg·d) 可以建立高效的小鼠主动脉夹层模型。

关键词 高脂饮食; 血管紧张素 II; β -氨基丙腈; 小鼠主动脉夹层模型

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1657-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.008

2023-05-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 82000285、82100432); 湖北省教育厅重点项目(编号: D20202102); 十堰市科学技术研究与开发项目(编号: 2021K63); 湖北医药学院研究生科技创新项目(编号: YC2021007)

作者单位: 湖北医药学院¹ 基础医学院、² 胚胎干细胞研究湖北省重点实验室, 十堰 442000

作者简介: 耿平美惠, 女, 硕士研究生;

张璟璇, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhangjx@hbm. edu. cn

主动脉夹层(aortic dissection, AD) 是一种发病突然、进展极快且病死率非常高的心血管危重症, 它不仅对患者的生命安全产生极大危害, 还严重影响患者的生存质量^[1-2]。目前, 其发病原因与机制尚未完全明确。临床上, 虽然有动脉支架植入术及药物等用以治疗血管重构类疾病, 但住院患者的出院后病死率和再入院率高, 临床治疗效果不理想^[3]。揭示血管内皮损伤再修复的本质和寻找新的治疗靶点和防治策略一直都是血管重构领域研究的难点和热点。为此, 建立一个符合人体病理学特征且稳定的 AD 动物模型, 对深入了解 AD 的发病机制并寻求有效的预防和治疗方案, 显得尤为重要。AD 最常见的原因是高血压, 其次为动脉粥样硬化^[4]。虽然构建小鼠 AD 模型的方法有很多, 但是以往建立的 AD 模型不够稳定、夹层发生率低或是不能很好地模拟人体 AD 发生的病理生理过程。因此, 该研究首次拟采用高脂饮食造成高脂血症加重血管负担的同时, 联合血管紧张素-II (angiotensin-II, Ang-II) 和 β -氨基丙腈(β -aminopropionitrile, BAPN) 混合后腹腔给药, 模拟人体 AD 病理生理发生发展的过程, 通过观察小鼠 AD 的发生率以及血管组织形态学改变, 探索一种构建小鼠 AD 模型更为简便、可靠、高效、经济的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 24 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 4 周龄, 体质量 16~18 g, 购自湖北医药学院动物实验中心, 饲养于湖北医药学院动物实验中心屏障环境中。小鼠饲料、垫料均经高压蒸汽灭菌处理, 小鼠饮食规律, 无限制饮水, 每天 12 h 光照, 室内温度 24~26℃。实验动物的处置均符合国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》, 本研究经湖北医药学院动物福利伦理委员会批准[批准号: 湖北医药学院动(福)第 2021-实 055 号]。

1.1.2 主要试剂与仪器 人 Ang-II 购自美国 Tar-

get Mol 公司(货号: T7040); BAPN 购自美国 Alfa Aesar 公司(货号: A13043); 0.9% 氯化钠注射液、高脂饲料(60% 脂肪、20% 碳水化合物和 20% 蛋白质)购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司; 动物解剖器械、一次性注射器、HE 染色液购自武汉塞维尔生物科技有限公司; Verhoeff 弹力纤维染色液购自南京森贝伽生物科技有限公司; 光学显微镜购自日本 Olympus 公司; vevo2100 超高分辨率小动物超声影像仪购自加拿大 Visualsonics 公司; 石蜡切片机购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与造模 将 24 只 C57BL/6J 小鼠(4 周龄, 雄性)分为对照组、Ang-II 组和 Ang-II + BAPN 组, 每组 8 只。对照组给予 0.9% 氯化钠注射液 10 ml/(kg · d) 腹腔注射, Ang-II 组给予 Ang-II 4 mg/(kg · d) 腹腔注射, Ang-II + BAPN 组在 Ang-II 4 mg/(kg · d) 腹腔注射的基础上再给予 BAPN 0.33 g/(kg · d) 腹腔注射。所有小鼠均在开始给药的前 1 d 高脂饮食喂养, 饮食充足。小鼠腹腔注射部位用 75% 乙醇溶液严格消毒, 进针动作轻柔, 注意回抽, 防止药物注入血管, 抽离注射器时注意是否有药物漏出。

1.2.2 小动物超声 给药过程中, 每只小鼠要在小动物超声仪器下观察胸主动脉和腹主动脉。采用美国 Visualsonics 公司小动物超声影像系统, MS550S 探头(中心频率 40 MHz), 焦距为 6 mm, 固定聚焦深度为 10 mm, 宽度为 12 mm。检查前使用 1.5% ~ 2.0% 的异氟烷麻醉小鼠, 确定小鼠完全麻醉后使用脱毛膏褪去小鼠胸部至腹部的毛发, 然后使用温热纸巾将脱毛后的皮肤擦干净。将小鼠仰卧位固定于检查台上, 四肢固定, 其后将超声耦合剂涂抹于小鼠胸部至腹部皮肤, 当心率每分钟 450 ~ 600 次、体温 35 ~ 37 °C 时开始进行超声检查。

1.2.3 组织病理切片 实验过程中死亡的小鼠直接解剖, 取出主动脉弓部至髂动脉分支段的血管置于 4% 多聚甲醛固定 72 h 后常规石蜡包埋。45 d 后所有小鼠统一麻醉后用含肝素的磷酸缓冲液灌注冲洗, 待肝肾等实质性器官变白再灌注 2% 多聚甲醛充分固定血管, 最后置入 4% 多聚甲醛固定 72 h, 常规石蜡包埋, 均匀切成 5 μm 厚度的切片, HE 染色, 光学显微镜观察血管的形态学变化。发现血管壁有明显夹层或破裂, 则判定为 AD 形成。

1.3 统计学处理 本研究数据应用 Image J 进行测量, 采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行分析作图,

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用非配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基本情况 给药前, 各组小鼠一般情况较好, 体质量随日龄增长而增加。4 周龄开始, 高脂饲料喂养伴腹腔给药, 各组小鼠随着喂养时间延长体质量增加、毛发愈加油腻。对照组小鼠活动量较前下降, 食欲不变; 高脂饮食联合 Ang-II 组小鼠活动量和食欲均下降; 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组小鼠活动量和食欲远不及对照组和高脂饮食联合 Ang-II 组小鼠, 在动脉瘤破裂前还可见小鼠体质量稍有下降且极少活动。小鼠体质量随饲养时间的变化见图 1。

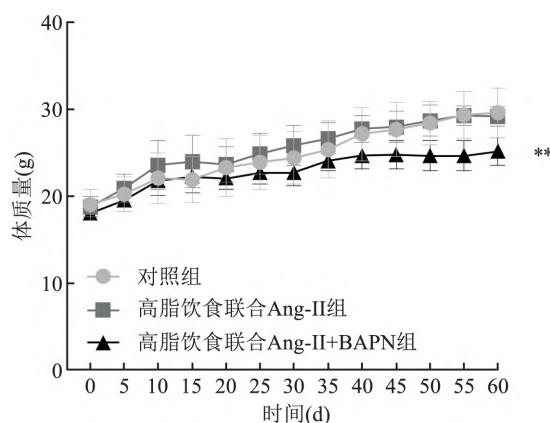


图1 小鼠体质量随饲养时间的变化
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.2 小鼠病死率与 AD 发生率 对照组小鼠在实验过程中未出现死亡, 且解剖后也未见 AD 形成; 高脂饮食联合 Ang-II 组在给药过程中有 3 只小鼠死亡, 经解剖发现死亡原因为 AD 破裂, 病死率为 37.5%, 其他小鼠经解剖发现成模率为 60.0%; 而在高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组给药过程中有 5 只小鼠死亡, 死亡原因同样是 AD 破裂, 病死率 62.5%, 剩下 3 只小鼠夹层发生率 100.0%。小鼠给药过程中病死率见图 2。

2.3 小动物超声结果 在给药的第 30 天, 将小鼠放在小动物超声仪器下观察主动脉血管形态并统计。对照组小鼠腹主动脉血管壁光滑、结构完整, 未见明显异常, 小鼠超声见图 3A、B; 高脂饮食联合 Ang-II 组小鼠可见血管壁粗糙增厚, 血管壁剥离, 横截面同样可见, 符合 AD 形象, 小鼠超声见图 3C、D; 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组小鼠可见腹主动脉

血管壁假腔形成,血管膨大,横截面可见管壁增厚,符合主动脉瘤形象,小鼠超声见图3E、F。

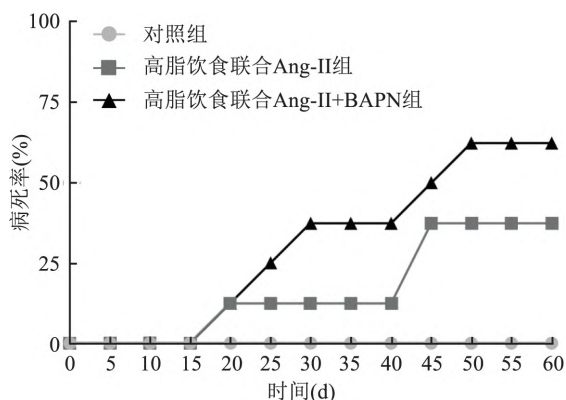


图2 小鼠实验过程中病死率

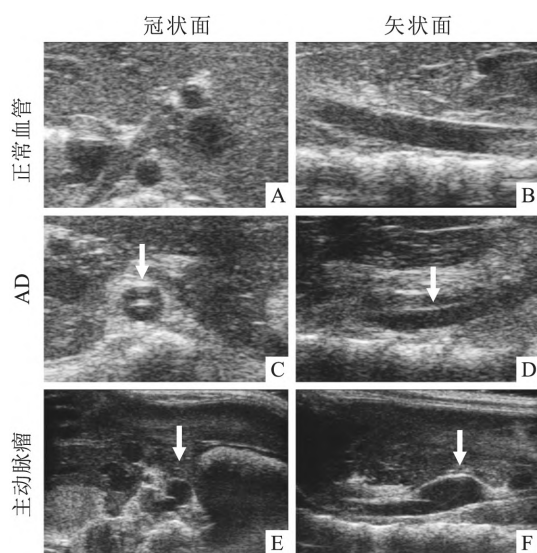


图3 小动物超声下小鼠主动脉形态变化

A、B: 对照组; C、D: 高脂饮食联合 Ang-II 组; E、F: 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组; 箭头标识处为 AD 和主动脉瘤形成的部位

2.4 小鼠解剖主动脉形态 处死小鼠后充分暴露小鼠主动脉,仔细剥离血管周围组织。对照组血管清晰可见,与周围组织无明显粘连;B超下见AD的小鼠剖开可见血管壁与周围组织粘连严重,有血肿形成;主动脉瘤形成的小鼠可见动脉血管管壁增厚、管径增粗;实验进展中死亡的小鼠解剖后可见腹腔及血管周围大量的血凝块,去除周围血凝块,可见血管破裂,小鼠主动脉解剖见图4。

2.5 HE 染色结果 取小鼠主动脉组织切片做 HE 染色,光学显微镜下可见对照组小鼠血管壁结构光滑完整,平滑肌细胞排列整齐,管壁无增厚,无假腔形成,小鼠主动脉组织切片 HE 染色见图5A;而高脂饮食联合 Ang-II 组小鼠血管壁在移行膨大出略

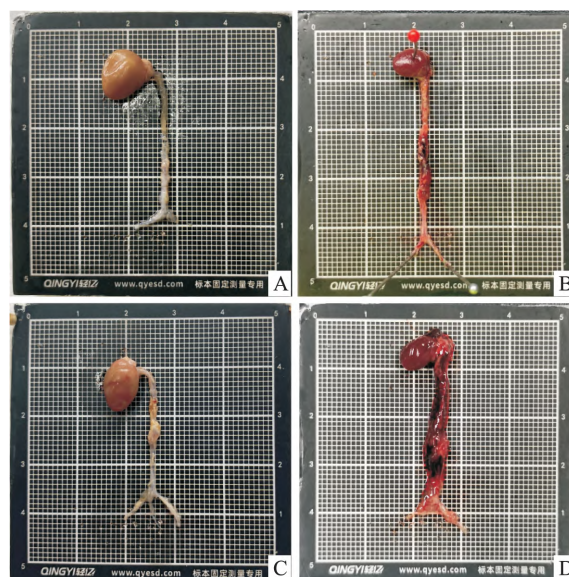


图4 小鼠主动脉解剖结果

A: 对照组; B: 高脂饮食联合 Ang-II 组; C: 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组; D: 实验过程中死亡的小鼠

增厚,弹力纤维和胶原蛋白紊乱断裂,小鼠主动脉组织切片 HE 染色见图5B;高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组小鼠,血管内膜撕裂可见夹层,弹力纤维和胶原蛋白紊乱不连续,管壁增厚可见假腔形成,腔内充满红细胞及大量炎性细胞浸润,小鼠主动脉组织切片 HE 染色见图5C。用 Image J 分别测量每组切片血管壁厚度并量化,分析发现与对照组小鼠血管壁厚度(101.7 ± 6.9 μm)比较,高脂饮食联合 Ang-II 组(118.1 ± 18.4 μm)和高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组(153.7 ± 6.5 μm)小鼠血管壁厚度均增加,差异有统计学意义($F = 9.0, 1.2$, 均 $P < 0.001$),见图6。

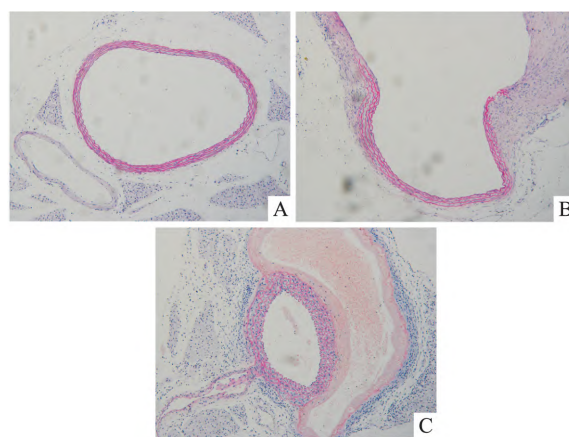


图5 小鼠主动脉组织切片的 HE 染色 $\times 10$

A: 对照组; B: 高脂饮食联合 Ang-II 组; C: 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组

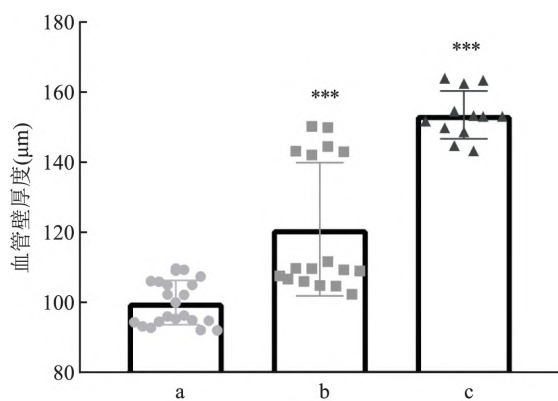


图6 血管壁厚度测量

a: 对照组; b: 高脂饮食联合 Ang-II 组; c: 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组; 与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.6 弹力纤维染色结果 同样的方法取小鼠主动脉组织切片用 Verhoff 氏酒精苏木精技术做弹性纤维染色,光学显微镜下可见对照组小鼠血管壁无弹性蛋白降解,为结构良好的弹性蛋白层,血管弹力纤维染色见图 7A;高脂饮食联合 Ang-II 组小鼠可见部分弹性蛋白卷曲增厚,甚至有部分层状破裂,血管弹力纤维染色见图 7B;而高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组小鼠的血管壁出现了严重的弹性蛋白分解或丢失甚至发生主动脉破裂,血管弹力纤维染色见图 7C。



图7 血管组织 Verhoff 弹力纤维染色 ×20

A: 对照组; B: 高脂饮食联合 Ang-II 组; C: 高脂饮食联合 Ang-II + BAPN 组

3 讨论

AD 是一种极其凶险的血管扩张型疾病,遗传因素、基因突变、高血压、血脂水平、炎症机制、Ang-II 等因素均参与 AD 的形成^[5],但其机制尚未明确,目前还缺乏有效的药物治疗手段。因此,建立一个稳定可靠、模拟人体 AD 病理生理过程的小动物模型不可或缺,这将会为 AD 的机制研究和治疗靶点提供有效的基础。

AD 的发生发展与血管壁结构的改变、高血压和高血脂相关。因此,本研究采用腹腔注射赖氨酸氧化酶抑制剂——BAPN, BAPN 可以有效抑制未成

年动物的弹性蛋白和胶原的交联,破坏细胞外基质微环境^[6],当动脉壁结构的完整性受到破坏时,小鼠的主动脉处于夹层发病前的病理损伤状态,与易发生 AD 的结缔组织病和老年人动脉粥样硬化的血管状态相似。主动脉处于这种病理状态对血压、血脂的升高刺激会更加敏感,更容易导致夹层的发生。然而 BAPN 通过抑制赖氨酸氧化酶造成主动脉管壁薄弱,只是 AD 发生发展的重要因素之一,大多数 AD 的发生还同时存在血流动力学的改变,如高血压。Ang-II 是一种有效的血管活性肽,除了可以引起血管收缩,进而影响血压,还有其他非血流动力学作用^[7]。主动脉处于这种病理状态对血压升高刺激会更加敏感,容易导致夹层的发生。在动物模型中 Ang-II 能够导致血管系统中基质金属蛋白酶活性增加,进而引起血管平滑肌细胞凋亡^[8]。因此,本研究首次试图利用高脂饮食^[9],联合腹腔注射 Ang-II 和 BAPN,诱导模拟高脂血症加重血管负担,快速升高血压和促进炎症反应,加重小鼠血管损伤以促进 AD 的形成。除此之外,构建小鼠 AD 模型的方法有很多,但是建立的 AD 模型不够稳定、夹层发生率低或不能很好地模拟人体 AD 发生的病理生理过程。

考虑到年龄也是 AD 疾病发生的重要因素^[10],且也有研究使用 25 ~ 28 周龄小鼠构建 AD 模型^[5],因此本研究认为高龄小鼠配合高脂饲料联合 Ang-II 和 BAPN,能更好模拟老年人高血脂基础上出现肾素-血管紧张素系统激活后引起血压升高,血管内膜损伤,弹性纤维破坏等人体 AD 形成的病理生理过程。也有研究选用其它的药物剂量^[11],但本研究选用了一种较温和的给药浓度,目的是为了能够更好地观察小鼠血管破坏的病理生理过程,因此在本研究的剂量基础上可适量加大给药浓度能更快构建出 AD 的模型。

参考文献

- [1] Luo W, Wang Y, Zhang L, et al. Critical role of cytosolic DNA and its sensing adaptor STING in aortic degeneration, dissection, and rupture [J]. Circulation 2020, 141(1): 42-66.
- [2] Jassar A S, Sundt T M. How should we manage type A aortic dissection? [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg 2019, 67(1): 137-45.
- [3] Sen I, Erben Y M, Franco-Mesa C, et al. Epidemiology of aortic dissection [J]. Semin Vasc Surg 2021, 34(1): 10-7.
- [4] 葛余浩, 严光, 刘丽萍, 等. 高尿酸血症与 H 型高血压早期动脉粥样硬化的相关性 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(6): 900-3.

- [5] Smith L B ,Hadoke P W ,Dyer E ,et al. Haploinsufficiency of the murine Col3a1 locus causes aortic dissection: a novel model of the vascular type of Ehlers-Danlos syndrome [J]. *Cardiovasc Res* , 2011 ,90(1) : 182 – 90.
- [6] Xia L ,Sun C ,Zhu H ,et al. Melatonin protects against thoracic aortic aneurysm and dissection through SIRT1-dependent regulation of oxidative stress and vascular smooth muscle cell loss [J]. *J Pineal Res* 2020 ,69(1) : e12661.
- [7] Forrester S J ,Booz G W ,Sigmund C D ,et al. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology [J]. *Physiol Rev* 2018 ,98(3) : 1627 – 738.
- [8] Fan L M ,Douglas G ,Bendall J K ,et al. Endothelial cell-specific reactive oxygen species production increases susceptibility to aortic dissection [J]. *Circulation* 2014 ,129(25) : 2661 – 72.
- [9] Le Maire S A ,Zhang L ,Luo W ,et al. Effect of ciprofloxacin on susceptibility to aortic dissection and rupture in mice [J]. *JAMA Surg* 2018 ,153(9) : e181804.
- [10] Trachet B ,Piersigilli A ,Fraga-Silva R A ,et al. Ascending aortic aneurysm in angiotensin II-infused mice: formation ,progression , and the role of focal dissections [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016 ,36(4) : 673 – 81.
- [11] Nishida N ,Aoki H ,Ohno-Urabe S ,et al. High salt intake worsens aortic dissection in mice: involvement of IL (interleukin)-17A-dependent ECM (extracellular matrix) metabolism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020 ,40(1) : 189 – 205.

Establishment of aortic dissection model in mice by high-fat diet combined with angiotensin-II and β -aminopropionitrile

Geng Pingmeihui^{1,2} ,Zhong Ping¹ ,He Zhikai¹ ,Hu Changqing^{1,2} ,Huang Long^{1,2} ,Zhang Jingxuan^{1,2}

(¹*School of Basic Medical Sciences* ,²*Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research in Hubei Province* ,Hubei University of Medical ,Shiyan 442000)

Abstract Objective To explore the method of using high-fat diet combined with angiotensin-II (Ang-II) and β -aminopropionitrile (BAPN) to establish the model of aortic dissection in mice. **Methods** 24 C57BL/6J mice (4 weeks old ,male) were randomly divided into control group [intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride solution 10 ml/(kg • d)] and experimental groups [Ang-II 4 mg/(kg • d) group ,Ang-II 4 mg/(kg • d) + BAPN 0.33 g/(kg • d) group] ,each group with 8 mice; all mice were given a high-fat diet and the mice weights were measured at the same time point and administered according to the weight standard. The dead mice were dissected immediately and the aorta was taken out for pathological section ,then observed under the microscope. The morphology of aorta was detected by small animal ultrasound and the mice with obvious dissection were killed and dissected directly. **Results** After administration ,the activity and appetite of mice in the high-fat diet combined with Ang-II + BAPN group decreased most significantly ,and the mortality rate of aortic dissection rupture and the success rate of modeling in this group were higher than those in the high-fat diet combined with Ang-II group ,while there was no significant change in the control group. Under the ultrasound of small animals ,compared with the other two groups ,the mice in the high-fat diet combined with Ang-II + BAPN group showed the formation of abdominal aortic vascular false lumen and vascular enlargement. The mice that died during the administration were dissected immediately ,and a large number of blood clots in the abdominal cavity and around the blood vessels could be seen. The mice with aortic dissection or aortic aneurysm could be seen under ultrasound in small animals ,and severe adhesion between the vascular wall and the surrounding tissues could be found when dissected ,while no obvious abnormalities were found in the blood vessels of the control group. The results of the staining showed that the false lumen of blood vessel wall was formed and the arrangement of elastin and collagen was disordered in the mice of high fat diet combined with Ang-II + BAPN group. The thickness of blood vessel wall in each group was statistically analyzed ,and it was found that the blood vessels in the two experimental groups were thicker than those in the control group ,which was statistically significant ($P < 0.001$) . The vascular wall of Ang-II + BAPN + high-fat diet group showed severe elastin degradation. **Conclusion** High-fat diet combined with Ang-II 4 mg/(kg • d) and BAPN 0.33 g/(kg • d) can establish an efficient model of aortic dissection in mice.

Key words high-fat diet; angiotensin II ; β -aminopropionitrile; mouse aortic coarctation model