

文章编号:1005-6947(2008)06-0546-05

· 基础研究 ·

剪切力增高对大鼠腹主动脉管径及管壁 MMP-9 表达的影响

郭媛媛, 舒畅

(中南大学湘雅二医院 血管外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 观察腹主动脉局部剪切力增高对其管径及管壁 MMP-9 表达的影响, 分析剪切力增高在动脉重塑中的作用。方法 SD 大鼠 48 只, 随机分 8 组, 实验组和对照组各 4 组。实验组行肾动脉下腹主动脉-下腔静脉细针穿刺造瘘, 术后 1, 7, 14, 28 d 取标本, 观察动脉管径及管壁结构的变化。对照组除不造瘘外, 操作同实验组。结果 实验组术后 1 d, 瘘口近端动脉管径明显增大 ($P < 0.05$), 管壁变薄 ($P < 0.05$), 随着时间的延长, 管径不断增大, 管壁不断变薄。MMP-9 于术后 1 d 开始表达, 术后 7 d 达高峰 ($P < 0.01$), 并持续高表达 ($P < 0.01$)。结论 剪切力增高可使大鼠腹主动脉出现管径增大, 管壁变薄的正性重塑, 并导致管壁 MMP-9 表达上调; 此正性重塑与 MMP-9 表达密切相关; 剪切力增高, MMP-9 表达增多是导致动静脉瘘形成后瘘口近远端逐渐膨大的重要因素。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(6): 546-550]

关键词: 主动脉, 腹; 动静脉瘘; 剪切力; 动脉重塑; 基质金属蛋白酶-9

中图分类号: R 654.4 文献标识码: A

Effect of elevated shear stress on caliber of abdominal aorta and aortic wall expression of matrix metalloproteinases-9 in rats

GUO Yuanyuan, SHU Chang

(Department of Vascular Surgery, the Second Xiang Ya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

Abstract: Objective To observe the effect of elevated local sheer stress of abdominal aorta on its caliber and wall expression of MMP-9, and analyse the action of high shear stress on arterial remodeling. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into 4 experiment and 4 comparison groups. An infra-renal aortocaval fistula was constructed by needle puncture using a 0.4mm needle in the experiment groups. The aorta proximal to the fistula was harvested after 1 d, 7 d, 14 d and 28 d respectively, while sham operation was done in the comparison groups. The diameter and wall thickness of the aorta were measured after fistula was made and before harvest. The level of change of MMP-9 was observed by immunohistochemistry. **Results**

The diameter of aorta proximal to the fistula was enlarged in the 1d group ($P < 0.05$), and the values increased with time; but wall thickness was decreased. MMP-9 expression reached the peak value at 7d ($P < 0.01$), and remained at a high level of expression at 28 d. **Conclusions** Increased shear stress of abdominal aorta in rats can induce positive remodeling with increase in diameter of arterial wall and decrease in wall thickness, and expression of MMP-9 is upregulated. This positive remodeling is closely related to expression of MMP-9. Increased shear force and increased expression of MMP-9 are important factors in the gradual dilatation of the proximal and distal segments after arteriovenous fistula formation.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6): 546-550]

基金项目: 湖南省科技厅基金资助(03SSY3071)。

收稿日期: 2008-04-08; **修订日期:** 2008-05-18。

作者简介: 郭媛媛, 女, 中南大学湘雅二医院博士研究生, 主要从事大动脉疾病方面的研究。

通讯作者: 舒畅 E-mail: changshu01@yahoo.com

Key words: Aortic Aneurysm, Abdomen; Arteriovenous Fistula; Shear Stress; Arterial Remodeling; Matrix Metalloproteinase 9

CLC number: R 654.4

Document code: A

血管重塑是涉及各种大动脉疾病的共同病理生理过程。在血管重塑的诸多因素中,剪切力直接作用于血管内壁,其改变可导致局部管壁结构发生病变。本研究通过制作大鼠腹主动脉-下腔静脉瘘,以直接造成动脉剪切力的增高,在不同时间点采集标本,检测动脉管径及管壁 MMP-9 的表达,研究剪切力增高作为一种始动因素,在动脉重塑中所起的作用,以探讨大动脉疾病发生发展的机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及分组 SD 大鼠 48 只(由中南大学实验动物部提供),350 ~ 400 g,雌雄不限。随机分 8 组,每组 6 只,实验,对照各 4 组。

1.1.2 试剂与仪器 麻醉剂为 10% 水合氯醛溶液;固定液为 4% 多聚甲醛溶液。MMP-9 多克隆抗体及显色试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 实验方 法

1.2.1 动物模型的建立 实验组制作腹主动脉-下腔静脉造瘘,方法如下:麻醉后开腹显露腹主动脉和下腔静脉,解剖游离左肾动脉下至腹主动脉分叉之间的腹主动脉和下腔静脉。全身肝素化(肝素 1 U/g,静脉注射)3 min 后血管夹置于左肾动脉下方及腹主动脉分叉处的腹主动脉,同时阻断下腔静脉,并计时。从左肾动脉下 1 cm 处下腔静脉侧壁以管径 0.4 mm 头皮针进针,见暗红色血液流出,静脉塌陷后,再经穿静脉内侧壁穿出刺入与之紧密相连的主动脉壁,可有明显的突破感,进入腹主动脉后可见鲜红色血液流出,肝素盐水冲洗,退针;以 11-0 锦纶线 1-2 针缝合静脉穿刺口,松夹,静脉变红并可扪及明显震颤感,表明造瘘成功。腹腔注射青霉素 20 万 U 后关腹。对照组除不造瘘外各项操作同实验组。

1.2.2 标本取材及处理 术后 1,7,14,28 d 再次麻醉开腹,于肾动脉置管灌注 4% 多聚甲醛灌注 30 min(60 滴/min),取瘘口近端 0.5 cm 长的腹主动脉,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋切片行 HE 染色。

1.3 观测项目及方法

1.3.1 大体及病理切片形态学观察 光镜下观察血管壁形态学改变,测量造瘘成功时及取材时瘘口近端动脉直径。

1.3.2 免疫组织化学检测 MMP-9 表达 MMP-9 蛋白检测采用免疫组化 SP 法。实验操作按试剂盒说明书进行,阴性对照为 0.01 mmol/L 的磷酸盐缓冲液代替一抗;阳性对照为人腹主动脉瘤瘤壁组织(已证实 MMP-9 阳性表达)。

1.3.3 图像分析 HE 染色切片 IPP 软件测血管内径周长及管壁厚度;免疫组化切片分析统计腹主动脉壁全层 MMP-9 阳性颗粒相对面积,相对光密度,取平均值。

1.4 统计分 析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。术后即时与取标本时瘘口近端动脉外径比较用前后配对设计 t 检验;内径周长,管壁厚度,免疫组化染色阳性细胞相对面积,相对光密度,与对照组比较用完全随机设计成组 t 检验;组间比较用单因素方差分析。取标本时瘘口近端外径与时间关系行直线相关分析。以上均用 SPSS13.0 软件分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结 果

2.1 腹主动脉 HE 染色组织形态学改变

实验组内皮细胞结构紊乱,内弹力层崩解,管壁大量炎性细胞浸润,中膜平滑肌结构紊乱。对照组管壁厚薄均匀,内皮细胞排列整齐,核突向管腔,内弹力层呈波浪形,中膜平滑肌细胞 5 ~ 7 层,呈长梭形,层次清楚。

2.2 术后不同时点瘘口近端动脉外径的改变情况

从造瘘后第 1 天起,瘘口近端动脉外径明显增大,并随时间推移而逐渐扩大,至 28 d 时,动脉迂曲粗大明显,接近成瘘前的 2 倍。方差分析提示各组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。直线相关分析提示各实验组腹主动脉管径变化与时间之间呈高度正相关($r = 0.96146, P < 0.01$)。(表 1)(图 1)。

表 1 实验组瘘口近端动脉外径数据表(mm, $\bar{x} \pm s$)($n = 6$)

组别	1 d 组	7 d 组	14 d 组	28 d 组
术后即时	1.67 ± 0.17	1.70 ± 0.34	1.71 ± 0.51	1.68 ± 0.40
取标本时	1.86 ± 0.12	2.07 ± 0.22	2.46 ± 0.14	2.95 ± 0.70
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.01

2.3 术后不同时点瘘口近端动脉管壁厚度及内径周长的改变

术后1 d, 实验组瘘口近端动脉内径周长较对照组明显增大 ($P < 0.05$), 但管壁厚度较对照组

明显变薄 ($P < 0.05$); 随着时间的推移, 实验组动脉内径周长进行性增大, 管壁厚度进行性 (表 2-3) (图 2-5)。

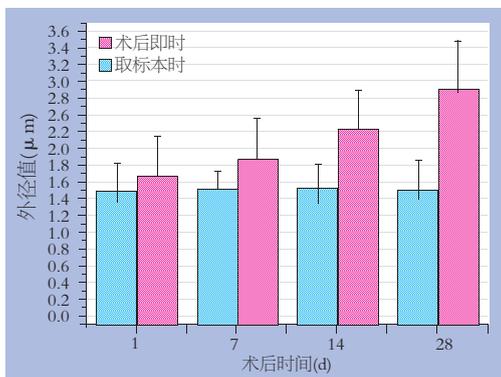


图1 实验组瘘口近端动脉外径

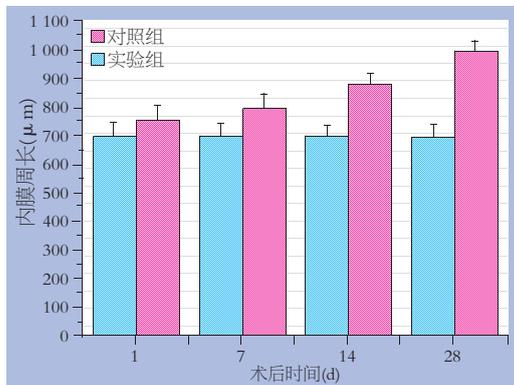
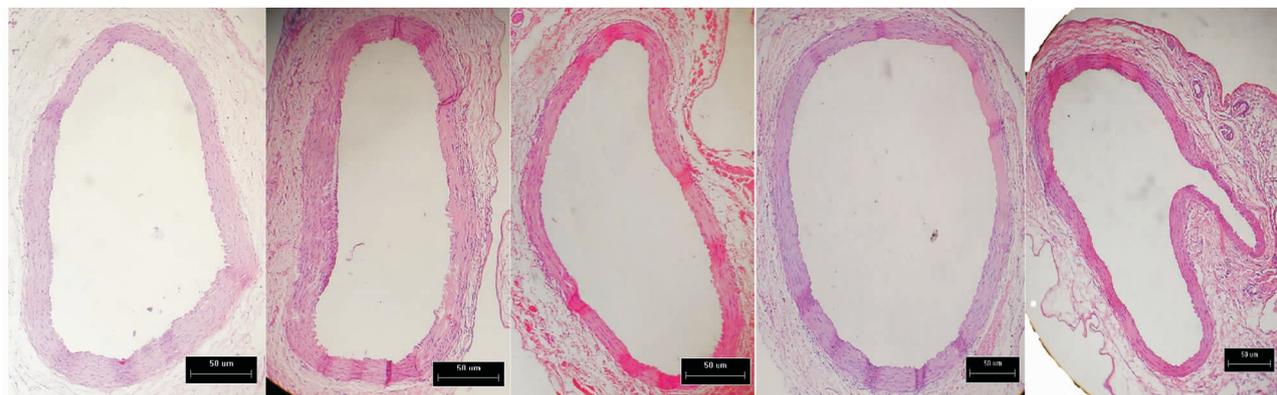


图2 实验组瘘口近端动脉内径周长



对照组

实验组术后 1 d

实验组术后 7 d

实验组术后 14 d

实验组术后 28 d

图3 术后不同时点动脉内径及管壁厚度的改变 (×100)

2.4 MMP-9 的表达

对照组动脉壁 MMP-9 为阴性表达呈浅蓝色。实验组瘘口近端动脉壁 MMP-9 呈阳性表达为黄褐色。IPP 软件分析求得 MMP-9 阳性表达区相对面积, 相对光密度显示: 实验组术后 1 d 即有表达, 7 d 达高峰, 14, 28 d 持续增高, 但较术后 7 d 有所下降 (图 6) (表 4-5)。

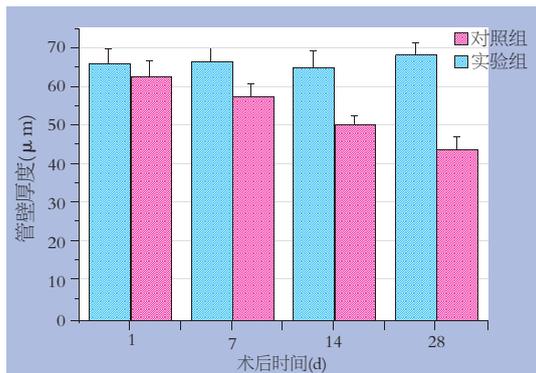


图4 实验组瘘口近端动脉管壁厚度

表2 HE染色(10×10)测瘘口近端动脉内径周长(μm, $\bar{x} \pm s$) (n=6)

组别	1 d 组	7 d 组	14 d 组	28 d 组
对照组	697.93 ± 48.17	698.47 ± 39.55	698.11 ± 37.04	696.48 ± 42.78
实验组	762.43 ± 49.61	799.52 ± 37.89	882.74 ± 39.01	995.54 ± 38.64
P 值	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

表3 HE染色(10×10)测管壁厚度($\mu\text{m}, \bar{x} \pm s$)($n=6$)

组别	1 d组	7 d组	14 d组	28 d组
对照组	63.65 ± 2.99	64.04 ± 3.04	62.95 ± 0.59	65.84 ± 0.73
实验组	59.43 ± 3.21	55.45 ± 3.09	48.70 ± 2.27	42.34 ± 3.54
P值	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

表4 MMP-9阳性表达区域相对面积比(% , $\bar{x} \pm s$)($n=6$)

组别	1 d组	7 d组	14 d组	28 d组
对照组	1.07 ± 0.04	1.32 ± 0.06	1.54 ± 0.08	1.32 ± 0.05
实验组	21.13 ± 2.34	26.34 ± 2.40	23.98 ± 2.12	22.43 ± 2.24
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

表5 MMP-9阳性表达区域相对光密度比(% , $\bar{x} \pm s$)($n=6$)

组别	1 d组	7 d组	14 d组	28 d组
对照组	6.31 ± 0.78	6.43 ± 0.82	6.79 ± 0.91	6.56 ± 0.80
实验组	16.48 ± 2.76	19.03 ± 2.81	17.76 ± 2.90	17.09 ± 2.86
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

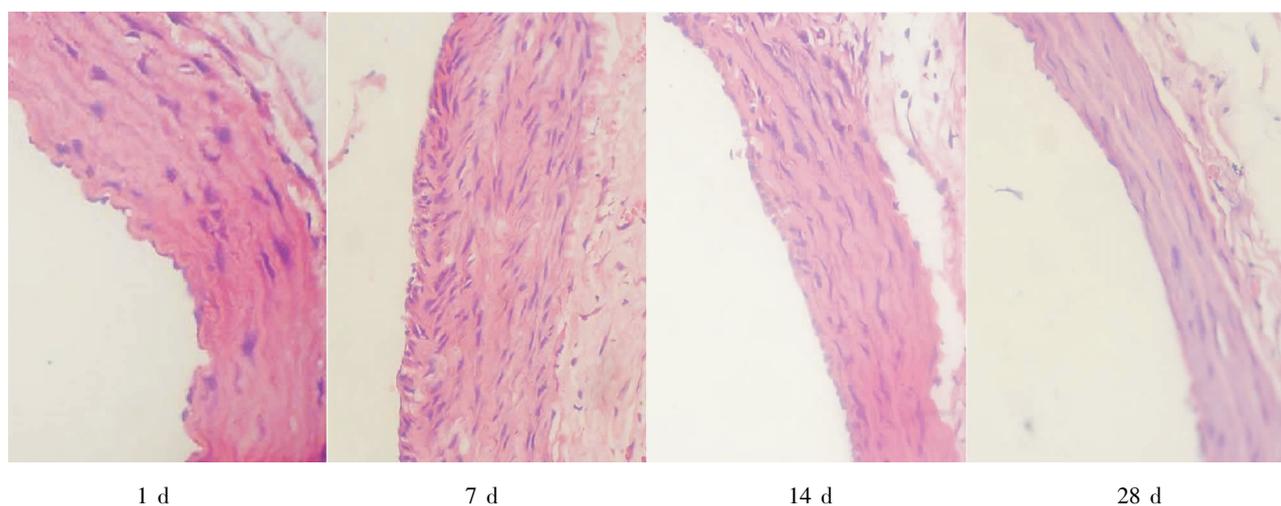


图5 实验组术后不同时点管壁结构改变(×400)

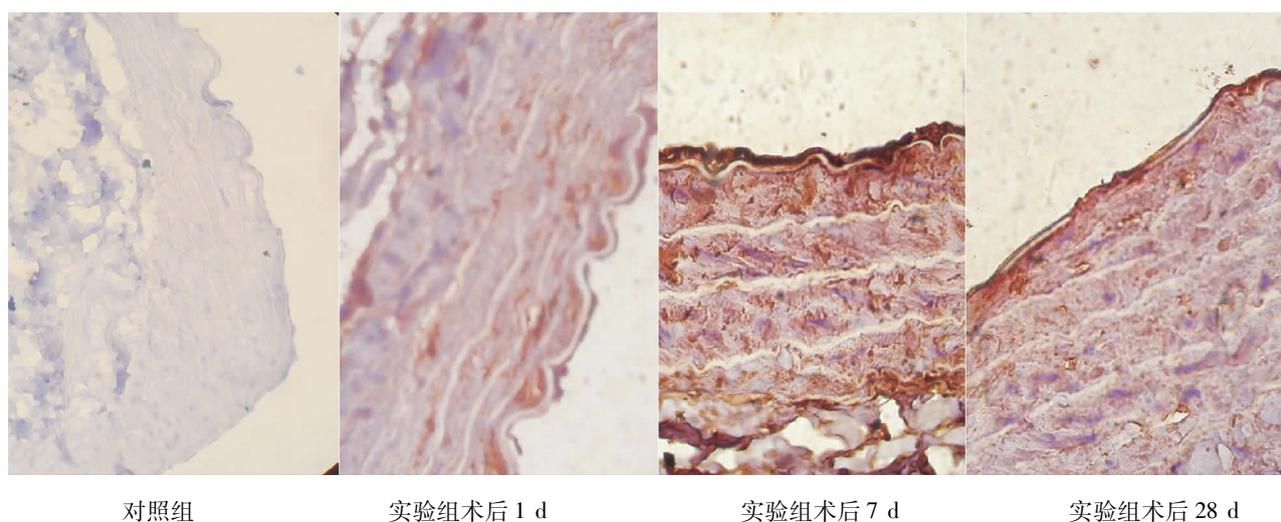


图6 MMP-9免疫组化染色(×400) 棕黄色区域为阳性表达区

3 讨论

实验证实:动静脉瘘形成后,瘘口近端动脉血流量和剪切力上升,而动脉血压不变^[1-3]。本研究采用手术方法造成的主动脉局部剪切力改变与体内肾素/血管紧张素系统无关。穿刺动静脉壁对瘘口近端动脉内膜无明显损伤。故可认为:剪切力增高是本实验血管大体结构及相关分子生物学改变的主要原因。

血管重塑过程可由多种因素启动,剪切力直接作用于血管内壁,其改变参与许多血管疾病的病理生理过程^[4-5]。本实验结果显示,剪切力增高后,随着时间的推移,其内、外径越来越大,管壁越来越薄,表明剪切力增加后,动脉血管发生了正性重塑,以适应改变的血流动力学环境。

研究证实,动脉内皮细胞接受剪切力增加这一机械信号的刺激后,通过不同的信号转导途径将信号传至胞内,启动转录,产生一系列生物效应,可导致平滑肌细胞增殖与凋亡,细胞外基质(ECM)合成与降解平衡失调,最终导致血管壁结构重塑以适应代偿改变的内环境^[6-7]。剪切力增高的机械刺激成为血管壁结构重塑的启动因素。

本实验发现,管壁 MMP-9 表达随时间推移而增多,提示 MMP-9 在剪切力增高所致的血管重塑中起着重要作用。MMP-9 可以降解 ECM 中最主要的两种成分—弹性蛋白和胶原纤维^[8]。造瘘后, MMP-9 在术后 1 d 即在动脉壁全层有阳性表达,术后 7d 是表达的高峰期;之后趋于稳定,虽略有减少,但绝大部分标本仍为强阳性表达。原因可能是由于手术后 MMP-9 基因转录被启动并逐渐增多,达到一定高度后,产生动脉管壁的扩张效应,代偿性地使剪切力略为下降(此时剪切力仍显著高于未造瘘时)。这属于一种负反馈调节机制,虽在此过程中参与转录的 MMP-9 基因随之略为减少,而高剪切力持续作用于管壁,则转录维持在一定高度并持续稳定表达相关蛋白。本文各实验组 MMP-9 表达相对面积和阳性表达颗粒相对光密度的分析提示了 MMP-9 表达的规律性,虽然不能直接反映相关蛋白的量,但仍可提供一种量化指标^[9]。本实验结果显示,术后不同时间点表达均高于对照组,并随时间推移持续高表达。可以推论,高剪切力促进 MMP-9 表达,使

ECM 降解大于合成,动脉发生扩张性重塑。

本实验病理所见及 MMP-9 表达结果均提示,剪切力增高后动脉壁趋于越来越薄弱,并逐渐扩张,可以解释临床上观察到的动静脉瘘形成后瘘口近远端逐渐膨大的现象。动静脉瘘患者如不及时手术处理,瘘口近远端将逐渐膨大,动脉壁将渐趋薄弱;高剪切力所致的 MMP-9 表达上调在其中起重要作用。

概言之,剪切力增高导致管壁 MMP-9 表达的上调使局部动脉出现管径增大,管壁变薄的正性重塑;动脉管径增大及管壁变薄与 MMP-9 表达增高密切相关。提示剪切力增高, MMP-9 表达增多是导致动静脉瘘形成后瘘口近远端逐渐膨大的重要因素。

参考文献:

- [1] Raul JG, Andrew K, Christopher KZ. Early and sustained medial cell activation after aortocaval fistula creation in mice [J]. *J Surg Res*, 2002, 108(1):112-121.
- [2] Sho E, Sho M, Nanjo H, *et al.* Hemodynamic regulation of CD34+ cell localization and differentiation in experimental aneurysms [J]. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(10):1916-1921.
- [3] Takeshi K, Katsuyuki H, Philip ST, *et al.* Flow loading induces macrophage antioxidative gene expression in experimental aneurysms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(12):2017-2022.
- [4] Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling [J]. *New Engl J Med*, 1994, 330(20):1431-1438.
- [5] Castier Y, Brandes RP, Leseche G, *et al.* p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling [J]. *Circ Res*, 2005, 97(6):533-540.
- [6] Silver AE, Vita JA. Shear stress-mediated arterial remodeling in atherosclerosis: too much of a good thing? [J]. *Circulation*, 2006, 113(24):2787-2789.
- [7] Eiketsu S, Hiroshi N, Mien S *et al.* Early activation of endothelial cells in response to high flow regulates carotid arterial Remodeling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(5):7-10.
- [8] Dumont O, Loufrani L, Laurent H, *et al.* Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(2):317-324.
- [9] 刘晟,舒畅.兔动脉壁剪切力改变对 MMP-2 表达及动脉瘤形成的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(6):565-569.