

## 早期动脉瘤模型大鼠形成过程中血管壁基质结构蛋白的表达

王增亮, 李绍山, 赛力克·对山拜, 汪永新, 成晓江, 周庆九, 周凯, 杜郭佳, 王鑫, 更·党木仁加甫(新疆医科大学第一附属医院神经外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

### 文章亮点:

实验创新性采用选择性血管结扎法建立动脉瘤大鼠模型, 检测早期脑动脉瘤诱导形成过程中脑动脉标本纤维连接蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白和III型胶原蛋白的动态变化, 发现基质结构蛋白的表达水平的降低, 表明动脉瘤形成过程伴随着结构蛋白的降解, 从而破坏血管壁的完整, 而导致动脉瘤形成和生长。

### 关键词:

实验动物; 心脏及血管损伤模型; 颅内动脉瘤; 修复重建; 结构蛋白; 纤维连接蛋白;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; III型胶原蛋白; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

### 主题词:

动脉瘤; 颅内动脉瘤; 连接蛋白类; 肌动蛋白类; 胶原III型

### 基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金(2011211A076)

### 摘要

**背景:** 基质蛋白是构成血管壁的必不可少的重要成分, 为血管壁的完整性和血管壁细胞发挥生理功能提供了必要的框架, 并参与对细胞和平滑肌的调控。

**目的:** 构建早期动脉瘤模型大鼠评价基质结构蛋白在形成过程中的表达差异性。

**方法:** 将 28 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 2 组: 对照组( $n=8$ )和模型组( $n=20$ )。模型组大鼠以结扎左侧颈总动脉和右侧肾动脉致高血压方法建立脑动脉瘤模型; 对照组大鼠仅暴露左侧颈动脉分叉和双侧颈动脉。模型组大鼠分别于造模后 15, 30 d 处死, 取大鼠右侧大脑前动脉和嗅动脉的分叉处部分组织进行免疫组化染色, 分析纤维连接蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白和III型胶原蛋白的表达。

**结果与结论:** 与对照组相比, 造模后 30 d 时模型组大鼠右侧大脑前动脉和嗅动脉的分叉处部分中纤维连接蛋白表达水平差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 而III型胶原和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达明显减少( $P < 0.05$ )。提示大鼠早期脑动脉瘤形成过程中的结构蛋白表达存在差异性并发生动态变化, 血管壁基质结构蛋白降解是动脉瘤形成主要机制之一。

王增亮, 李绍山, 赛力克·对山拜, 汪永新, 成晓江, 周庆九, 周凯, 杜郭佳, 王鑫, 更·党木仁加甫. 早期动脉瘤模型大鼠形成过程中血管壁基质结构蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(5):745-751.

## Expression of matrix structural proteins in the vessel wall of rat models during the early aneurysm formation

Wang Zeng-liang, Li Shao-shan, Sailike Duishanbai, Wang Yong-xin, Cheng Xiao-jiang, Zhou Qing-jiu, Zhou Kai, Du Guo-jia, Wang Xin, Geng Dangmurenjiafu (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Matrix protein is an essential component of the vascular wall, provides a necessary frame for the integrity of the vessel wall and physiological function of vascular wall cells, and regulates cells and smooth muscle.

**OBJECTIVE:** To construct rat model of early aneurysm, and to evaluate differences in the expression of matrix structural proteins during cerebral aneurysm formation.

**METHODS:** Twenty-eight healthy male Sprague-Dawley rats were randomized into control group ( $n=8$ ) and model group ( $n=20$ ). Aneurysm model was established by ligation of the left common carotid artery and right renal artery-induced hypertension in the model group. In the control group, only the left carotid artery bifurcation and bilateral carotid were exposed in rats. Rats in the model group were sacrificed at 15 and 30 days after model establishment. Right anterior cerebral artery in rats and olfactory artery bifurcation received immunohistochemical staining. The expressions of fibronectin,  $\alpha$ -smooth muscle actin and collagen III were analyzed.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the control group, no significant difference in fibronectin expression was detected in right anterior cerebral artery and olfactory artery bifurcation in rats of the model group at 30 days after model establishment ( $P > 0.05$ ). However,  $\alpha$ -smooth muscle actin and collagen III expressions were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). These data confirmed that expression of structural proteins had differences and dynamic changes during early aneurysm formation in rats. Degradation of matrix structural protein in cerebral artery may be one of the key mechanism of aneurysm formation.

王增亮, 男, 1983 年生, 山东省潍坊市人, 汉族, 新疆医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事脑血管病及颅脑创伤的研究。

通讯作者: 赛力克·对山拜, 博士, 主任医师, 副教授, 新疆医科大学第一附属医院神经外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.05.016  
[http://www.crter.org]

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2015)05-00745-07  
稿件接受: 2014-12-19

Wang Zeng-liang, Studying for doctorate, Attending physician, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Sailike Duishanbai, M.D., Chief physician, Associate professor, Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-12-19

**Subject headings:** Aneurysm; Intracranial Aneurysm; Connexins; Actins; Collagen Type III

**Funding:** the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2011211A076

Wang ZL, Li SS, Sailike Duishanbai, Wang YX, Cheng XJ, Zhou QJ, Zhou K, Du GJ, Wang X, Geng Dangmurenjiafu. Expression of matrix structural proteins in the vessel wall of rat models during the early aneurysm formation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(5):745-751.

## 0 引言 Introduction

颅内动脉瘤是一种常见的脑血管疾病<sup>[1-5]</sup>。在一般人群中发病率高, 可达到1%~5%<sup>[4, 6-8]</sup>, 一旦出血可造成灾难性后果, 导致死亡或残废<sup>[4, 9-13]</sup>。随着显微外科技术和血管内介入治疗技术的不断发展, 动脉瘤治疗的疗效得到明显的提高<sup>[14-15]</sup>, 但动脉瘤发病机制仍不清楚。目前多数学者认为血管壁基质结构蛋白的降解是动脉瘤形成, 增大和破裂的主要机制之一<sup>[14, 16-20]</sup>。有研究表明, 颅内动脉瘤手术标本中血管壁结构的基质蛋白的降解<sup>[14, 21-23]</sup>, 但仍缺乏颅内动脉瘤早期形成过程中血管壁基质结构蛋白的动态变化的资料。实验使用选择性血管结扎法建立大鼠脑动脉瘤模型<sup>[4, 24-25]</sup>, 对大鼠早期脑动脉瘤诱导形成过程中的不同时间点的脑动脉标本进行3种结构蛋白(纤维连接蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白和III型胶原蛋白)的免疫组织化学染色, 试图了解结构蛋白是否参与脑动脉瘤形成过程及动态变化。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照动物模型构建实验。

**时间及地点:** 实验于2012年6月至2013年9月在新疆医科大学动物实验室完成。

**材料:**

**动物:** 健康雄性SD大鼠28只, 清洁级, 雌雄各半, 鼠龄6~8周, 体质量180~250 g, 购自新疆医科大学动物实验室, 实验动物许可证号SCXK-(新)2012-0003。饲养环境: 室温(25±2) °C, 湿度为(71±8)%, 自由摄食或饮水。实验过程中对动物的处置符合伦理学要求。

脑动脉瘤模型大鼠检测使用的主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
3%戊巴比妥钠, OCT冰冻切片包埋剂以及染色剂	日本东京东方生物实验室
一抗工作液, CM1850冰冻切片机, ASP-200S自动组织脱水机	莱卡公司
显微镜	蔡司公司
高倍光镜	奥林巴斯公司

**方法:**

**实验动物造模及分组:** 将28只大鼠随机分为2组: 对照组( $n=8$ )和模型组( $n=20$ )。

**脑动脉瘤大鼠模型的制备:** 参考文献[26-29], 利用肾性高血压致脑动脉瘤的发生。这种方法导致的脑动脉瘤多发生在颈总动脉非结扎侧颅底脑动脉环及其主要分支的分叉部, 特别是大脑前动脉-嗅动脉分叉部。模型组大鼠首先

以3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔内注射麻醉, 于腹部和颈部备皮, 术区消毒并铺无菌治疗巾后, 在显微镜下取经左侧下颌角下横切口, 依次切开皮肤、皮下组织及颈前筋膜。然后沿着左侧胸锁乳突肌内侧缘进行钝性分离, 将胸锁乳突肌向右侧外方牵引, 暴露左侧颈总动脉, 仔细分离颈总动脉与迷走神经, 避免损伤迷走神经。沿着颈总动脉逆行分离, 暴露颈总动脉分叉部, 游离出颈内动脉和颈外动脉的起始部, 用丝线结扎左侧颈总动脉; 另于大鼠右侧背肋缘下横切口, 依次切开皮肤、皮下组织、肌肉及其筋膜, 暴露右侧肾脏, 剔去肾周脂肪组织, 分离出肾动脉及其分支, 注意避免损伤下腔静脉, 用丝线结扎右侧肾动脉后支。同样方法结扎左侧肾动脉后支。对照组大鼠仅暴露左侧颈总动脉分叉和双侧肾动脉, 不结扎。

**取材:** 对照组大鼠于当天处死。模型组大鼠分别于造模后15, 30 d处死。显微镜下取大脑, 在体积分数4%甲醛溶液中浸泡12~24 h后, 再在20%蔗糖中浸泡两三天, 当漂浮的大脑下沉至瓶底后即可取出观察。在手术显微镜下, 剪下包含双侧颈内动脉床突上段、大脑后动脉、大脑中动脉、大脑前动脉、嗅动脉和前交通动脉在内的脑底动脉环。高倍光镜(奥林巴斯公司产品)下观察并确认其他部位无动脉瘤后, 取出右侧大脑前动脉和嗅动脉的分叉部或发生动脉瘤的血管, 将样本直接包埋在OCT冰冻切片包埋剂内, 在-80 °C冰柜内冰冻过夜后, 采用冰冻切片机切成2  $\mu$ m厚的切片, 固定在载薄片上。采用Elastica van Gieson染色方法染色, 在高倍光镜下观察动脉瘤壁的结构变化。

**免疫组化染色:** 将标本置入Leica ASP-200S自动组织脱水机, 进行脱水, 浸蜡, 包埋, 石蜡 60 °C。将蜡块进行连续切片(8~10张)。每个标本切片进行3种结构蛋白(纤维连接蛋白, III型胶原蛋白,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白)染色。将切片固定到防脱载玻片上, 在37 °C脱蜡12 h。蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min。抗原修复(胃酸消化, 15 min, 37 °C)。体积分数3%过氧化氢室温孵育5~10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, PBS冲洗, 每次2 min×3次。每个切片都再水化并进行适当的预处理。III型胶原蛋白免疫组化染色前采用胃蛋白酶来消化蛋白, 50 min, 37 °C。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的免疫组化染色无需特殊的预处理。滴加适当比例稀释的一抗工作液37 °C孵育1.0~2.0 h或4 °C孵育过夜。PBS冲洗, 每次2 min×3次。滴加试剂室温或37 °C孵育30 min, PBS冲洗3次。DAB显色, 苏木精复染, 脱水透明, 封固。每张切片随机取5个高倍视野, 综合染色强度及阳性细胞数两方面进行半定量分析。

表1 在诱导大鼠早期脑动脉瘤形成过程中结构蛋白的免疫组化平均染色分级 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Average rating of immunohistochemical staining of structural proteins during early stage of cerebral aneurysm formation in rats

项目	对照组(n=8)	模型组	
		造模后 15 d(n=10)	造模后 30 d(n=10)
纤维连接蛋白	1.0±0.3	1.1±0.2	1.5±0.2
α-平滑肌肌动蛋白	2.4±0.5	2.3±0.4	1.6±0.3 <sup>a</sup>
III型胶原蛋白	2.2±0.3	2.1±0.1	1.5±0.3 <sup>a</sup>

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

染色强度: 0分: 阴性; 1分: 染色弱但明显高于阴性对照; 2分: 染色清晰; 3分: 染色强。

阳性细胞数: 0分: 阳性面积占总面积的10%以下; 1分: 阳性面积占总面积的11%–25%; 2分: 阳性面积占总面积26%–50%; 3分: 阳性面积占总面积51%以上。

根据 2项指标相加分数, 划分为4级: 0–1分为–; 2分为+; 3至4分为++; 5至6分为+++。采用Start-view software package软件进行平均染色分级的计算<sup>[30]</sup>。

**主要观察指标:** 免疫组化测定SD大鼠右侧大脑前动脉和嗅动脉的分叉处的纤维连接蛋白、α-平滑肌肌动蛋白及III型胶原蛋白的表达情况。

**统计学分析:** 平均染色分级数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间免疫染色平均分级的比较采用方差分析, 所有统计数据均应用统计软件Pemps 3.1处理。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 实验动物数量分析** 所有28只大鼠均造模成功, 无死亡, 均进入结果分析。早期动脉瘤模型大鼠的造模流程图见图1。

**2.2 实验性诱导大鼠早期动脉瘤形成的位置** 采用Elastica van Gieson染色方法染色, 在高倍光镜下观察动脉瘤壁的结构变化, 对照组大鼠双侧大脑前动脉和嗅动脉分叉处未见有动脉瘤。

模型组大鼠中发现在右侧大脑前嗅动脉分叉处1个囊性动脉瘤和5个早期动脉瘤样改变, 其中囊性动脉瘤为进展期动脉瘤(图2A), 可见动脉瘤位于大脑前动脉-嗅动脉分叉部(图2B), 在高倍光镜下都可见到内弹力层的断裂、肌肉层的变薄及动脉壁的往外膨出, 早期动脉瘤性改变表现为内弹力层的不连续性, 没有明显的动脉壁的往外膨出(图2C)。

**2.3 脑动脉瘤模型大鼠动脉瘤形成部位中相关基质蛋白的表达**

**2.3.1 纤维连接蛋白** 纤维连接蛋白在正常血管壁和动脉瘤形成动脉诱导15 d时血管壁上有表达, 其中在1个正常脑动脉标本中染色强, 另外6个中较明显染色, 而在诱导动

脉瘤形成15 d时, 10个脑动脉标本中7个中染色清晰, 另外3个中染色弱。到30 d时在检测的10个脑动脉标本中表达阳性率为100%, 2个标本中染色弱, 8个标本中呈染色清晰, 模型组大鼠脑动脉标本中纤维连接蛋白平均染色级别与对照组相比差异无显著性意义( $P > 0.05$ ; 图3, 表1)。

**2.3.2 α-平滑肌肌动蛋白** 在检测的8个正常标本中α-平滑肌肌动蛋白呈全阳性, 其中在6个正常脑动脉标本中呈强染色, 另外2个中为染色清晰, 而在诱导动脉瘤形成15 d时的10个脑动脉标本中8个中染色清晰, 另外2个中染色弱, 到30 d时在检测的10个脑动脉标本中α-平滑肌肌动蛋白的阳性表达率为100%, 在7个标本中染色弱, 3个标本中染色清晰, 模型组大鼠脑动脉标本中α-平滑肌肌动蛋白平均染色级别与对照组相比差异有显著性意义( $P = 0.005$ ; 图4, 表1)。

**2.3.3 III型胶原蛋白** 在检测的8个正常标本和诱导动脉瘤形成第15天时的10个脑动脉标本中III型胶原蛋白呈阳性, 主要分布于外膜。其中在5个正常脑动脉标本中染色强, 另外3个中为染色清晰, 而在诱导动脉瘤形成第15天时的10个脑动脉标本中8个中染色清晰, 另外2个染色弱。

到诱导动脉瘤形成30 d时在检测的10个脑动脉标本中III型胶原蛋白的阳性表达率为100%, 在7个标本中染色清晰, 3个标本中染色弱。模型组大鼠脑动脉标本中III型胶原蛋白平均染色级别与对照组相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ ; 图5, 表1)。

## 3 讨论 Discussion

动脉瘤性蛛网膜下腔出血是一种急症, 具有高死亡率及致残率的特点<sup>[19, 31]</sup>。动脉瘤性蛛网膜下腔出血的最主要原因是颅内囊性动脉瘤破裂, 占全部病例的80%–90%<sup>[32–33]</sup>。动脉瘤性蛛网膜下腔出血多见于女性, 高发年龄为55–60岁。颅内动脉瘤性蛛网膜下腔出血后30 d死亡率为45%, 大约30%的幸存者遗留有中度至严重的功能障碍<sup>[34–36]</sup>, 大约1/3的幸存者需要终身治疗。虽然随着显微外科技术和血管内介入治疗技术的不断发展, 动脉瘤治疗的疗效得到明显的提高, 但脑动脉瘤发生发展的机制仍待深入的研究。因无法在人类活体身上得到各期发展阶段的动脉瘤标本, 所以也无法获得关于人类脑动脉瘤形成早期在组织结构和分子水平上发生的变化。分子生物学指标有可能成为一种快捷而准确的预测脑动脉瘤增大和破裂可能性的方法。

细胞外基质是构成血管壁的必不可少的重要成分, 由细胞外基质分子如III型胶原蛋白、VI型胶原蛋白、层粘蛋白和纤维维连接蛋白构成<sup>[37–38]</sup>。动脉壁细胞外基质为血管壁的完整性和血管壁细胞发挥生理功能提供了必要的框架, 其存在不仅保证了血管壁的弹性和对牵拉的抵抗性, 而且还通过与血管壁细胞的相互作用参与对细胞和平滑肌的调控<sup>[20, 39–40]</sup>。

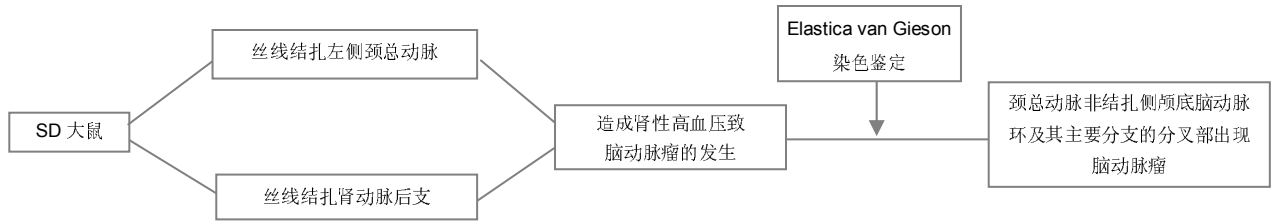


图1 早期动脉瘤模型大鼠的造模流程图  
Figure 1 Modeling flow chart of rat models of early aneurysm



图2 脑动脉瘤模型大鼠组织病理学形态及动脉瘤的位置  
Figure 2 Histopathological morphology and location of the aneurysm in rat models of cerebral aneurysm  
图注: 图中 A 为进展期动脉瘤期动脉瘤, 表现为内弹力层的断裂、肌肉层的变薄及动脉壁的往外膨出(Elastica van Gieson 染色, ×100); B 为动脉瘤位于大脑前动脉-嗅动脉分叉部(×400); C 为早期动脉瘤样改变, 表现为内弹力层的不连续性, 没有明显的动脉壁的往外膨出(Elastica van Gieson 染色, ×100)

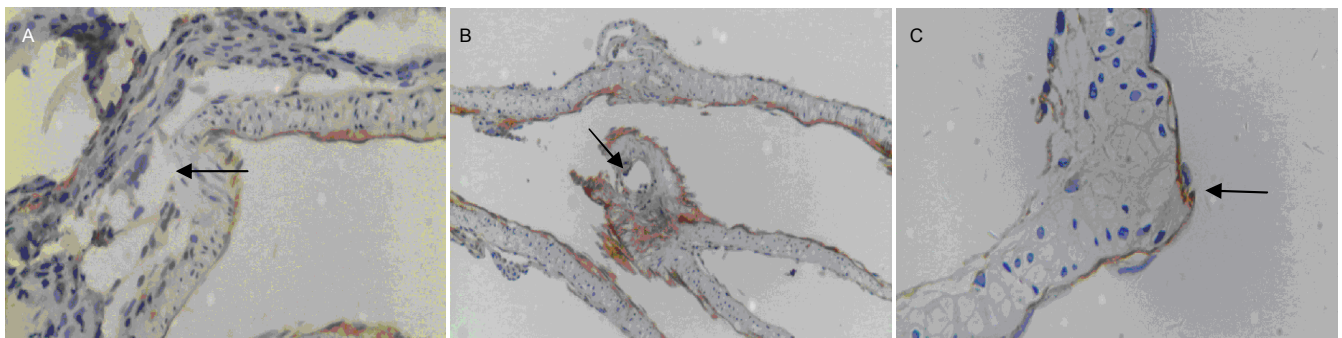


图3 纤维连接蛋白在大鼠动脉壁上的表达(免疫组化染色, ×200)  
Figure 3 Fibronectin expression in the rat arterial wall (immunohistochemical staining, ×200)  
图注: 图中 A 为纤维连接蛋白在大鼠正常动脉壁上的染色清晰(++); B 为诱导 15 d 时的动脉壁上染色清晰(++), 主要分布于血管内、外膜; C 为诱导 30 d 后局部染色无明显变化(++), 主分布于血管内、外膜。箭头指示纤维连接蛋白阳性表达。

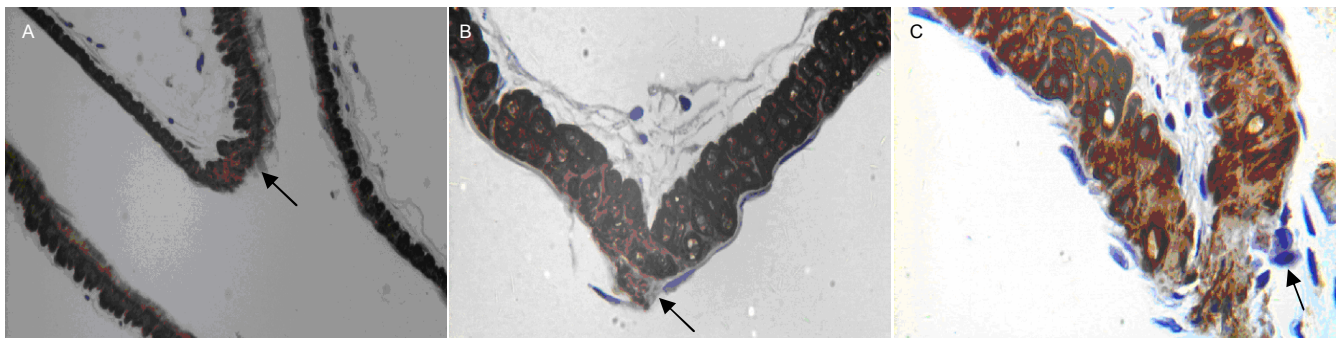


图4 大鼠血管壁 α-平滑肌肌动蛋白表达(免疫组化染色)  
Figure 4 α-smooth muscle actin expression in the rat arterial wall (immunohistochemical staining)  
图注: 图中 A(×100)和 B(×200)为小鼠正常动脉和诱导后 15 d 时大鼠动脉壁中局部 α-平滑肌肌动蛋白染色, 表现为染色清晰(+++); C(×400)为诱导 30 d 后的大鼠脑动脉 α-平滑肌肌动蛋白染色, 局部染色减少(+). 箭头指示 α-平滑肌肌动蛋白阳性表达。

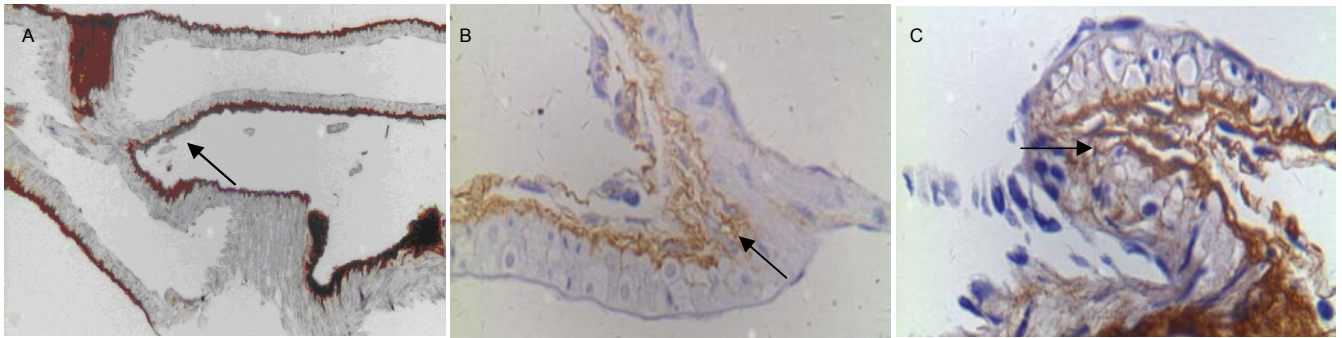


图5 III型胶原蛋白在大鼠动脉壁上的表达(免疫组织化学染色)

Figure 5 Collagen III expression in the rat arterial wall (immunohistochemical staining)

图注: 图中 A 为正常大鼠动脉壁, III型胶原蛋白主要分布于外膜( $\times 100$ ); B 为诱导 15 d 后可见 III 型胶原蛋白局部染色清晰见箭头( $\times 200$ ); 而 C 为诱导后 30 d 时 III 型胶原蛋白局部染色弱(+)( $\times 400$ )。箭头指示 III 型胶原蛋白阳性表达。

细胞外基质包括胶原纤维、弹性纤维、网状纤维以及多种非胶原糖蛋白, 使动脉壁保持一定的弹性和抗扩张性, 在血流冲击下仍能维持一定的形状。胶原和弹性蛋白是最主要的细胞外基质成分, 迄今已发现了 19 种胶原, 其中 I 型和 III 型胶原占全部胶原的 90%, IV 型主要分布于基底膜上。弹性蛋白占弹性纤维的 90%, 除赋予血管舒缩所需要的弹性外, 还直接或间接调节平滑肌细胞的表型和增殖活性。其他一些非胶原糖蛋白, 如纤连蛋白和层粘连蛋白等虽然所占比例较小, 但在维持血管稳定性方面也起着重要作用。

最近的一些研究表明, 动脉瘤患者的血管细胞外基质的重塑在脑动脉瘤的形成机制中起重要作用<sup>[41]</sup>。实验采用选择性血管结扎法建立大鼠脑动脉瘤模型<sup>[42]</sup>, 对大鼠早期脑动脉瘤诱导形成过程中的不同时间点的脑动脉标本进行 3 种基质结构蛋白的免疫组织化学染色, 并对纤维连接蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白和 III 型胶原蛋白 3 种基质结构蛋白进行动态了解。

纤维连接蛋白是一种多功能的黏附蛋白, 其主要作用是能使细胞与各种基质成分发生粘连。纤维连接蛋白与细胞粘附、细胞伸展和细胞迁移直接相关<sup>[43]</sup>。另外, 纤维连接蛋白还可增强某些细胞如毛细血管内皮细胞对生长因子增值作用的敏感性。不同血管床基底膜含有不同数量的纤维连接蛋白。纤维连接蛋白可以连接内皮细胞及其下方的内弹力层和平滑肌层, 刺激内皮细胞形成毛细血管样结构通过引入细胞间黏附分子引起内皮细胞的装配和多细胞性毛细血管形成。因此, 纤维连接蛋白被认为是血管未成熟的标志。Futami 等<sup>[44]</sup>报道在 25 只实验性诱导的大鼠脑动脉瘤模型的脑标本中早期纤维连接蛋白表达较明显, 而且动脉瘤形成晚期也没有表达水平的改变, 认为纤维连接蛋白的稳定表达与动脉壁修复机制启动相关。实验发现在正常大鼠脑动脉中纤维连接蛋白有表达, 在检测的 8 例标本中平均染色分级为  $1.0 \pm 0.3$ , 主要分布于内皮下层, 与人类相似<sup>[45]</sup>。到诱导动脉瘤形成 15 d 和 1 个月染色强度未发生明显的变化, 平均染色分级分别为  $1.1 \pm 0.2$ , 提示纤维连接蛋白可能

不参与早期动脉瘤的形成过程。

$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白是细胞内 6 种肌动蛋白亚类之一, 公认是血管平滑肌细胞表型转化的标志。关于  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的细胞生物学意义尚不清楚。有学者认为,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达可诱导基质的合成和血小板衍生因子等活性物质的释放。 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的表达是血管平滑肌细胞受损激活的标志, 使系膜细胞具有了肌纤维细胞样特性<sup>[43]</sup>。在实验中平滑肌肌动蛋白的表达结果与以前的研究结果是一致的<sup>[30]</sup>。实验通过免疫组织化学的方法在诱导形成早期大鼠动脉瘤过程中的不同时间点所获得的脑动脉标本进行  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达的检测, 发现在正常大鼠脑动脉中  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白有表达, 在检测的 8 例标本中平均染色分级为  $2.4 \pm 0.5$ , 主要分布于中层, 与人类相似<sup>[46]</sup>。到诱导大鼠动脉瘤形成 15 d 时染色强度未发生明显的变化, 平均染色分级为  $2.3 \pm 0.4$ , 而到 30 d 时在动脉瘤形成局部染色强度减少, 平均染色分级为  $1.6 \pm 0.3$ , 提示  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白在动脉瘤形成晚期被破坏或发生降解。正常动脉和实验性诱导动脉瘤 15 d 时的脑动脉标本中表达明显, 到实验性诱导动脉瘤 1 个月时免疫染色强度减低。而且  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的表达形式也在不正常的组织中发生了变化, 反映血管构筑的破坏。这标志着动脉瘤发展过程中伴随着  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的逐步破坏。

胶原蛋白作为细胞外基质的主要成分, 在动物体内最常见的一种蛋白, 为所有多细胞生物提供细胞外支架。在正常人类脑动脉中 III 型胶原蛋白主要分布于外膜和中膜, 而在颅内动脉瘤的瘤壁上则失去了原有的正常结构, 表达趋于弥散, 而且免疫荧光染色强度变弱<sup>[30, 43]</sup>。实验采用免疫组织化学染色检测 III 型胶原蛋白在诱导形成大鼠早期脑动脉瘤不同时间点的表达, 发现在正常大鼠脑动脉中 III 型胶原蛋白有表达, 在检测的 8 例标本中平均染色分级为  $2.2 \pm 0.3$ , 主要分布于血管外膜, 与人类相似<sup>[30, 47]</sup>。诱导早期动脉瘤形成第 15 天时, III 型胶原蛋白仍有表达, 平均染色分级为  $2.1 \pm 0.1$ , 而到 1 个月时 III 型胶原蛋白在动脉瘤形成局部染色减少, 在检测的 8 例标本中平均染色分级为

1.5±0.3, 提示III型胶原蛋白在动脉瘤形早期就会发生破坏或发生降解。作者认为高血压、血液流体力学压力的改变等导致血管壁III型胶原蛋白的后天性破坏或降解, 从而促使动脉瘤形成<sup>[12, 48-55]</sup>。有报道提示颅内动脉瘤患者存在有全身性的非载瘤动脉的III型胶原蛋白的减少<sup>[56-60]</sup>, 由此认为III型胶原蛋白表达减少是一种先天性缺陷。通过实验结果可推测长期血流应力的作用可以导致动脉壁上III型胶原蛋白的降解, 通过实验模型证明了囊性动脉瘤的生长源于血液流体力学压力既剪应力, 并非来源于胶原蛋白的先天缺陷, 但是目前对血液流体力学剪应力导致胶原蛋白降解的机制并不清楚, 待进一步研究。III型胶原蛋白的降解可能会导致动脉瘤瘤壁的力学性能降低, 动脉瘤无法抵抗血流应力, 进而逐渐外塑形。

实验发现大鼠脑动脉瘤形成过程中结构蛋白的表达差异性 & 动脉瘤早期形成过程中血管壁上的基质结构蛋白发生动态变化。基质结构蛋白(纤维连接蛋白、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白、III型胶原蛋白)表达水平的降低表明动脉瘤形成过程伴随着结构蛋白的降解, 从而破坏血管壁的完整, 而导致动脉瘤形成和生长, 但其降解的机制仍然不清楚。

**作者贡献:** 赛力克·对山拜进行实验设计, 实验实施为王增亮, 李绍山, 赛力克·对山拜, 实验评估为更·觉木仁加甫, 资料收集为汪永新, 成晓江, 周庆九, 杜郭佳, 王鑫; 王增亮成文, 赛力克·对山拜对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 实验通过新疆医科大学第一附属医院伦理审查后符合动物实验要求。

**学术术语:** 动脉瘤-是由于动脉壁的病变或损伤, 形成动脉壁局限性或弥漫性扩张或膨出的表现, 以膨胀性、搏动性肿块为主要表现, 可以发生在动脉系统的任何部位, 而以肢体主干动脉、主动脉和颈动脉较为常见。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Vlak MH, Algra A, Brandenburg R, et al. Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2011;10(7):626-636.
- [2] Juvela S, Poussa K, Lehto H, et al. Natural history of unruptured intracranial aneurysms: a long-term follow-up study. *Stroke.* 2013;44(9):2414-2421.
- [3] Xiang J, Natarajan SK, Tremmel M, et al. Hemodynamic-morphologic discriminants for intracranial aneurysm rupture. *Stroke.* 2011;42(1):144-152.
- [4] 沈建康. 颅内动脉瘤手术治疗的现状和前景[J]. *中华神经外科杂志*, 2005, 21(11):641-642.
- [5] Frösen J, Tulamo R, Paetau A, et al. Saccular intracranial aneurysm: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2012;123(6):773-786.
- [6] 袁陆涛. 颅内动脉瘤的流行病学研究现状[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2011, 38(6):587-590.
- [7] Brown RD Jr, Broderick JP. Unruptured intracranial aneurysms: epidemiology, natural history, management options, and familial screening. *Lancet Neurol.* 2014;13(4):393-404.
- [8] Caranci F, Briganti F, Cirillo L, et al. Epidemiology and genetics of intracranial aneurysms. *Eur J Radiol.* 2013;82(10):1598-1605.
- [9] 张万宏, 吴恒浩, 田卫平, 等. 颅内动脉瘤性蛛网膜下腔出血患者不同时间点GCS评分与预后相关性研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2013, 15(22):36-39.
- [10] 黄清海, 杨鹏飞. 颅内动脉瘤血管内介入治疗中国专家共识(2013)[J]. *中国脑血管病杂志*, 2013, 10(11):12.
- [11] 秦尚振, 马廉亨, 徐国政, 等. 颅内动脉瘤治疗十年回顾(附1372例治疗及随访)[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012, 17(1):1-4.
- [12] 康慧斌, 彭汤明, 钱增辉, 等. 颅内动脉瘤破裂风险因素分析[J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 13(4).
- [13] 马宏伟, 许百男. 未破裂颅内动脉瘤的破裂风险评估与治疗决策[J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2014(7).
- [14] 赛力克·对山拜, 周凯, 阿尔达克·胡那匹亚, 等. 血管生长因子和结构蛋白在新疆哈萨克族破裂和未破裂颅内动脉瘤中的表达[J]. *中华神经外科杂志*, 2011, 27(11):1157-1159.
- [15] Yasargil MG. *Microneurosurgery.* Stuttgart: Thieme Medical Publishers, 2013.
- [16] Kole MK, Pelz DM, Kalapos P, et al. Endovascular coil embolization of intracranial aneurysms: important factors related to rates and outcomes of incomplete occlusion. *J Neurosurg.* 2005;102(4):607-615.
- [17] Deniz ML, Kiliç T, Almaata I, et al. Expression of growth factors and structural proteins in chordomas: basic fibroblast growth factor, transforming growth factor alpha, and fibronectin are correlated with recurrence. *Neurosurgery.* 2002;51(3):753-760.
- [18] Kuivaniemi H, Prockop DJ, Wu Y, et al. Exclusion of mutations in the gene for type III collagen (COL3A1) as a common cause of intracranial aneurysms or cervical artery dissections: results from sequence analysis of the coding sequences of type III collagen from 55 unrelated patients. *Neurology.* 1993; 43(12):2652-2658.
- [19] Bor AS, Rinkel GJ, van Norden J, et al. Long-term, serial screening for intracranial aneurysms in individuals with a family history of aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a cohort study. *Lancet Neurol.* 2014;13(4):385-392.
- [20] Lebland R. De novo formation of familial cerebral aneurysms: case report. *Neurosurgery.* 1999;44(4):871-877.
- [21] Stehbens WE. Aneurysms and anatomical variation of cerebral arteries. *Arch Pathol.* 1963;75:45-64.
- [22] 赛力克·对山拜, 胡那匹亚, 阿尔达克, 杨振村, 等. 纤维连接蛋白在颅内脑动脉瘤中的表达及动脉瘤壁纤维结构的特殊染色[J]. *中华神经外科杂志*, 2013, 29(12):1256-1259.
- [23] 齐巍, 赵继宗, 王硕, 等. 免疫炎症反应与颅内囊性动脉瘤基质重塑的组织病理学研究[J]. *首都医科大学学报*, 2005, 25(4):461-463.
- [24] Ramachandran M, Laakso A, Harbaugh RE, et al. On the role of modeling choices in estimation of cerebral aneurysm wall tension. *J Biomech.* 2012;45(16):2914-2919.
- [25] 凌峻, 熊秋迎, 聂艳良, 等. 肾性高血压诱导的大鼠脑动脉瘤模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(9):1352-1353.
- [26] 包新杰, 赵浩, 赵英杰, 等. 线栓法插线深度对大鼠脑梗死模型制备的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3):233-236.

- [27] 马良,付强,关俊宏.实验性大鼠脑动脉瘤形成过程中MMP-2, MMP-9表达的动态变化[J].中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(3):197-200.
- [28] 康涛,张洪.经颈总动脉和经颈外动脉制作大鼠MCAO模型的比较[J].中华脑血管病杂志(电子版),2013,7(3):29-33.
- [29] 张贤华.Src 激酶抑制剂 PP2 抑制颅内动脉瘤形成的初步研究[D].南昌:南昌大学,2013.
- [30] Kilic T, Sohrabifar M, Kurtkaya O, et al. Expression of structural proteins and angiogenic factors in normal arterial and unruptured and ruptured aneurysm walls. *Neurosurgery*. 2005;57(5):997-1007.
- [31] Chien A, Liang F, Sayre J, et al. Enlargement of small, asymptomatic, unruptured intracranial aneurysms in patients with no history of subarachnoid hemorrhage: the different factors related to the growth of single and multiple aneurysms. *J Neurosurg*. 2013;119(1):190-197.
- [32] Schievink WI. Intracranial aneurysms. *N Engl J Med*. 1997; 336(1):28-40.
- [33] Bulters DO, Birch AA, Hickey E, et al. A randomized controlled trial of prophylactic intra-aortic balloon counterpulsation in high-risk aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2013;44(1):224-226.
- [34] Hop JW, Rinkel GJ, Algra A, et al. Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*. 1997;28(3):660-664.
- [35] Schweizer TA, Macdonald L. *The Behavioral Consequences of Stroke*. Berlin: Springer, 2014:177-197.
- [36] Kilbourn KJ, Levy S, Staff I, et al. Clinical characteristics and outcomes of neurogenic stress cardiomyopathy in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013; 115(7):909-914.
- [37] van den Berg JS, Pals G, Arwert F, et al. Type III collagen deficiency in saccular intracranial aneurysms. Defect in gene regulation? *Stroke*. 1999;30(8):1628-1631.
- [38] Kuivaniemi H, Prockop DJ, Wu Y, et al. Exclusion of mutations in the gene for type III collagen (COL3A1) as a common cause of intracranial aneurysms or cervical artery dissections: results from sequence analysis of the coding sequences of type III collagen from 55 unrelated patients. *Neurology*. 1993; 43(12):2652-2658.
- [39] Schievink WI, Schaid DJ, Michels VV, et al. Familial aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a community-based study. *J Neurosurg*. 1995;83(3):426-429.
- [40] Coutard M, Osborne-Pellegrin M. Genetic susceptibility to experimental cerebral aneurysm formation in the rat. *Stroke*. 1997;28(5):1035-1042.
- [41] Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L, et al. Chlamydia pneumoniae does not increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(4):578-584.
- [42] 赛力克,鲍遇海,更·党木仁加甫,等.选择性血管结扎法建立大鼠脑动脉瘤模型[J].中华神经外科杂志,2010,26(5):419-421.
- [43] Peters DG, Kassam AB, Feingold E, et al. Molecular anatomy of an intracranial aneurysm: coordinated expression of genes involved in wound healing and tissue remodeling. *Stroke*. 2001; 32(4):1036-1042.
- [44] Futami K, Yamashita J, Tachibana O, et al. Immunohistochemical alterations of fibronectin during the formation and proliferative repair of experimental cerebral aneurysms in rats. *Stroke*. 1995;26(9):1659-1664.
- [45] Morimoto M, Miyamoto S, Mizoguchi A, et al. Mouse model of cerebral aneurysm: experimental induction by renal hypertension and local hemodynamic changes. *Stroke*. 2002; 33(7):1911-1915.
- [46] Hashimoto N, Kim C, Kikuchi H, et al. Experimental induction of cerebral aneurysms in monkeys. *J Neurosurg*. 1987;67(6): 903-905.
- [47] Skirgaudas M, Awad IA, Kim J, et al. Expression of angiogenesis factors and selected vascular wall matrix proteins in intracranial saccular aneurysms. *Neurosurgery*. 1996;39(3):537-547.
- [48] Omodaka S, Sugiyama S, Inoue T, et al. Local hemodynamics at the rupture point of cerebral aneurysms determined by computational fluid dynamics analysis. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 34(2):121-129.
- [49] Fukazawa K, Ishida F, Umeda Y, et al. Using Computational Fluid Dynamics Analysis to Characterize Local Hemodynamic Features of Middle Cerebral Artery Aneurysm Rupture Points. *World Neurosurg*. 2013. in press.
- [50] Wong GK, Poon WS. Current status of computational fluid dynamics for cerebral aneurysms: the clinician's perspective. *J Clin Neurosci*. 2011;18(10):1285-1288.
- [51] Jeong W, Rhee K. Hemodynamics of cerebral aneurysms: computational analyses of aneurysm progress and treatment. *Comput Math Methods Med*. 2012;2012:782801.
- [52] 张建忠,吴曦,黄清海,等.血流动力学诱导炎症反应对颅内动脉瘤形成机制的研究进展[J].中国脑血管病杂志,2014(7):56.
- [53] 彭汤明,刘爱华,吴中学.血管壁剪切力相关易感基因对颅内动脉瘤形成早期的作用[J].中华神经医学杂志,2013,12(4):419-421.
- [54] 赖小彪.前交通动脉瘤形成、破裂和复发的危险因素及破裂的血流动力学机制研究[D].杭州:浙江大学,2013.
- [55] Rothbart D, Awad IA, Lee J, et al. Expression of angiogenic factors and structural proteins in central nervous system vascular malformations. *Neurosurgery*. 1996;38(5):915-925.
- [56] Abdulrauf SI, Malik GM, Awad IA. Spontaneous angiographic obliteration of cerebral arteriovenous malformations. *Neurosurgery*. 1999;44(2):280-288.
- [57] Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS*. 1997;79:233-269.
- [58] Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci*. 1998;76(6):1671-1681.
- [59] Stalmans I. Role of the vascular endothelial growth factor isoforms in retinal angiogenesis and DiGeorge syndrome. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2005;67(4):229-276.
- [60] 李东升,潘伟生,夏家辉,等.颅内动脉瘤患者 III 型胶原蛋白基因的限制性片段长度多态性分析[J].中华神经外科杂志,1996, 12(2): 84-87.