

实验性家兔颈动脉球囊扩张动脉狭窄动物模型的建立

李永秋¹, 徐明¹, 姚绍鑫², 张志勇³

(河北医科大学附属唐山工人医院 1. 神经内科, 2. 导管室, 3. 病理科, 河北省唐山市 063000)

[关键词] 医学实验动物学; 动脉狭窄动物模型的建立; 经皮动脉球囊扩张; 血管平滑肌细胞; 血栓形成; 动脉粥样硬化; 家兔

[摘要] 30%~50% 的再狭窄严重制约了经皮腔内血管成形术治疗效果, 为探索再狭窄的发病机制以进行干预研究, 建立家兔动物模型。取颈部正中切口, 无菌暴露兔右颈动脉, 在颈内动脉起始部及颈总动脉近心侧距动脉分叉 2 cm 处用动脉夹临时夹闭, 自颈外动脉远端结扎并由结扎近心侧穿刺进入导丝、球囊导管, 撤除颈总动脉动脉夹进行经皮腔内血管成形术。然后在不同时间进行组织学及形态学分析, 并以左侧颈总动脉作正常对照组。结果发现, 颈总动脉经皮腔内血管成形术后早期主要病理改变是血栓形成, 中晚期为血管平滑肌细胞由中层移行到内膜并失控增殖伴有基质增多; 第 15 天管腔出现明显狭窄、内膜增厚。结果提示, 家兔颈总动脉经皮腔内血管成形术模型模拟了临床经皮腔内血管成形术过程, 死亡率低、成功率高, 为经皮腔内血管成形术之动脉阶段局部用药或转基因治疗实验首选模型。

[中图分类号] R332

[文献标识码] A

Establishment of a Stenosis Model in Carotid Artery of Rabbit by Percutaneous Transluminal Angioplasty

LI Yong-Qiu¹, XU Min¹, YAO Shao-Xin², and ZHANG Zhi-Yong³

(1. Department of Neurology, 2. Department of Intervention, 3. Department of Pathology, Tangshan Gongren Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Tangshan 063000, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Thrombosis; Atherosclerosis; Rabbit; Stenosis; Percutaneous Transluminal Angioplasty

[ABSTRACT] **Aim** The efficacy of percutaneous transluminal angioplasty (PTA) is limited by a high incidence of chronic restenosis which has been reported to be as high as 30%~50% within 3~6 months. This study was designed to establish an animal model to study the mechanism of restenosis and methods of preventing restenosis. **Methods** Right common carotid artery (CCA), internal carotid artery (ICA) and external carotid artery (ECA) were exposed with a midline linear skin incision in the neck. The right CCA 2 cm proximal to the carotid bifurcation and the right ICA at orifice were temporary occluded by aneurysmal straight clips. The right ECA was ligated at the exposed distal end. A 2.0 cm or 1.5 cm balloon catheter was used to induce injury of the right CCA. The catheter was introduced into the CCA through a small window opened in the ECA, which is proximal to the ligation site. After the clip of the CCA was removed the deflated catheter was passed through the CCA into the aortic arch. An inflated balloon with 8 atmospheric pressure in the aortic arch was slowly pulled back to the ECA to mechanically expand the right CCA. At 3rd, 7th, 15th days after the balloon injury, the rabbits were killed and histological and morphometric analysis of the right CCA were performed (left CCA as control). **Results** Histological and morphometric analysis indicated thrombosis is main changes in early stage and followed by VSMC from media into intima and unregulated proliferation and lead to obviously intimal thickening and stenosis at 15 days after PTA. **Conclusion** For its advantages such as low mortality, high practicability and good reproduce, the model is an ideal model for study of the mechanism and the prevention of restenosis.

随着 DSA、颈动脉超声检查广泛应用, 发现了更多颈动脉狭窄的病例。冠状动脉血管成形术也被引用到颈动脉狭窄的治疗。而 30%~50% 的再狭

窄^[1-3] 严重影响了经皮腔内血管成形术(percutaneous transluminal angioplasty, PTA) 的临床效果。探索再狭窄的发病机制建立防治措施是非常紧迫的任务。建立与人类颈动脉球囊扩张血管成形术近似的动物模型是进一步开展实验研究的依据和首先要解决的课题。本实验尝试建立一种简便易行、稳定的实验性颈动脉 PTA 后动脉狭窄动物模型。

[收稿日期] 2002-09-09 [修回日期] 2003-04-15

[作者简介] 李永秋, 男, 1965 年出生, 河北省乐亭县人。博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管疾病。E-mail: impeach@netease.com。徐明, 女, 1964 年出生, 辽宁省营口市人, 主治医师, 从事动物实验及帕金森氏病研究。姚绍鑫, 1965 年出生, 河北省滦南县人, 医学硕士, 副主任医师, 从事介入治疗研究。

1 材料与方法

1.1 家兔颈动脉经皮腔内血管成形术模型

选择3月龄雄性家兔40只,体重 1.35 ± 0.15 kg。用25%乌拉坦、按1 g/kg耳缘静脉注射麻醉。颈正中线性切口暴露并游离右颈总动脉(common carotid artery, CCA)、右颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和右颈外动脉(external carotid artery, ECA)。在右CCA近心侧距ICA、ECA分叉约2 cm处及右ICA起始处用动脉瘤直夹临时夹闭,在暴露的右ECA距颈动脉(carotid artery, CA)分叉远心侧约1 cm处结扎。自耳缘静脉注射肝素钠200 IU/kg 5 min,用细针头作为穿刺针自右ECA结扎处近侧刺入动脉进入导丝,在穿刺点近侧束以牛皮筋以备止血。撤出右CCA动脉夹,继续进入导丝,撤除穿刺针(撤除时为防止穿刺点出血,拉紧牛皮筋),在导丝引导下将1.5 mm直径球囊导管(10只兔子)或2.0 mm直径球囊导管(30只兔子)经右ECA至右CCA入主动脉弓,然后将气囊充气,压力为8个大气压。自主动脉弓向右ECA后退,机械扩张右CCA,重复3次,每次30 s,使右CCA内膜剥脱及机械损伤,撤出导管。在穿刺点近侧结扎右ECA,室温下标准混合饲料喂养。

1.2 病理观察及形态学分析

用1.5 mm球囊导管进行PTA的家兔于术后第15天处死(标本送光镜观察);用2.0 mm球囊导管进行PTA的家兔于术后第3天、第7天及第15天处死(标本送光镜及电镜观察)。所有家兔在处死前用10%水合氯醛腹腔内注射麻醉,固定于手术台。颈部正中切口,暴露双侧CCA,取自颈动脉分叉近心侧CCA 2 cm节段送检,以左侧CCA作对照,分别送光镜与电镜观察。送光镜者用福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚约5 μ m,HE染色常规观察;送电镜者用戊二醛固定。用显微镜和计算机分析系统分别计算横截面管腔内径、内膜厚度和中膜厚度及内膜/中膜厚度比值。

1.3 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用方差分析,两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 形态学分析

球囊扩张术后第15天狭窄程度较第3天及第7天明显。术后第15天2.0 mm球囊导管较1.5 mm球囊导管狭窄程度更明显。狭窄主要因为新生内膜层增厚而中层无明显改变(表1, Table 1)。

表1. 形态学分析

Table 1. Morphometric Analysis ($\bar{x} \pm s$)

分 组	管腔内径 (μ m)	内膜厚度 (μ m)	中膜厚度 (μ m)	内膜/中膜 厚度
对照组	560 \pm 50	2.5 \pm 10	120 \pm 10	20 \pm 120
2.0 mm 导管				
3 天	480 \pm 40 ^a	31 \pm 10 ^a	120 \pm 10	250 \pm 90 ^a
7 天	370 \pm 30 ^b	18 \pm 10 ^b	150 \pm 20	540 \pm 100 ^b
15 天	330 \pm 30 ^{bcd}	190 \pm 20 ^{bcd}	140 \pm 20	1360 \pm 100 ^{bcd}
1.5 mm 导管				
15 天	350 \pm 20 ^b	84 \pm 30 ^b	140 \pm 10	570 \pm 110 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, 与1.5 mm球囊导管组15天比较; d: $P < 0.05$, 与7天比较。

2.2 病理观察

光镜下,对照组血管无内膜增厚及腔内血栓形成;球囊扩张后第3天,可见贴壁血栓形成,少量炎性细胞浸润,弹力层回缩,无明显血管平滑肌细胞增殖;球囊扩张后第7天,新鲜血栓少见,未溶解血栓呈玻璃样变,可见较明显的平滑肌细胞移位生长,少量炎性细胞浸润,内膜增厚;球囊扩张后第15天,内膜明显增厚,主要成分为血管平滑肌细胞及丰富胶原的基质(图1, Figure 1)。

电镜下,对照组血管内皮光滑,整齐连续,内皮细胞有不规则细长微绒毛,相邻内皮细胞间则见到紧密联接,内皮下胶原原纤维、弹性纤维散布于基质中,可见到较厚的弹性膜,内弹性膜深层有较多胶原原纤维、弹性纤维和基质,平滑肌细胞散在其中,呈不规则长条状,有细长凸起,互相交联且与弹性膜交叉在一起。VSMC局部放大观察,核呈长梭型或不规则型,核膜局部内陷,细胞质中等电子密度,有的能见到丰富的细胞器。球囊扩张后第3天,内皮细胞表面光滑,较圆钝,微绒毛极少,细胞基质电子密度低,有的细胞内细胞器较少,有的能见到丰富粗面内质网,散在线粒体和少量质膜小泡,细胞核呈长椭圆形,电子密度较低,有的可见1~2个核仁,内皮细胞间见类似VSMC核膜内凹,有丰富粗面内质网、线粒体,紧邻内皮下可见双核细胞,细胞基质呈中等电子密度,有少量细胞器分布,并见与其它细胞紧密排列,中膜内VSMC紧密排列在一起,细胞器丰富,可见到大量粗面内质网,线粒体,核呈长椭圆形,其内可见1~2个核仁,核膜局部内陷(图2A, Figure 2A);球囊扩张后第7天,内皮细胞圆钝,排列密集,内皮细胞微绒毛有明显增多,细胞器也变的较为丰富,可见到较多线粒体及质膜小泡,紧邻内皮细胞下

可见到多个细胞紧密排列, 可能为移行到内膜下后新生 VSMC, 其中细胞器较为丰富, 核电子密度较高, 呈椭圆形或不规则。此类细胞深层可见大量胶原原纤维及基质(图 2B, Figure 2B); 球囊扩张第 15 天, 内皮细胞核呈长椭圆形, 中等电子密度, 细胞质

中可见散在线粒体细胞, 紧邻内皮细胞下可见到新生 VSMC, 其核呈不规则形, 部分核膜内陷, 胞质中可见大量细胞器, 线粒体、粗面内质网、质膜小泡极为丰富, 表明其功能极为活跃, 此类细胞周围可见大量胶原原纤维(图 2C, Figure 2C)。

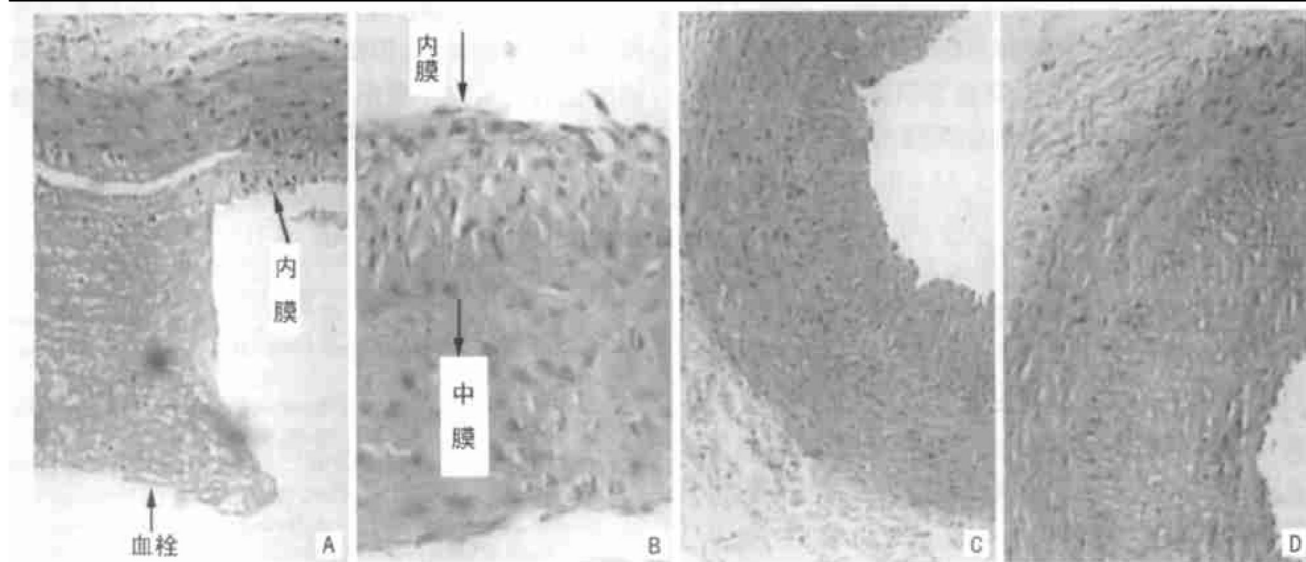


图 1. 颈动脉球囊扩张 HE 染色光镜观察结果

A: 第 3 天, 2.0 mm, 4×10 ; B: 第 7 天, 2.0 mm, 10×10 ; C: 第 15 天, 1.5 mm, 4×10 ; D: 第 15 天, 2.0 mm, 4×10 。

Figure 1. The light micrograph of carotid artery after dilated with balloon

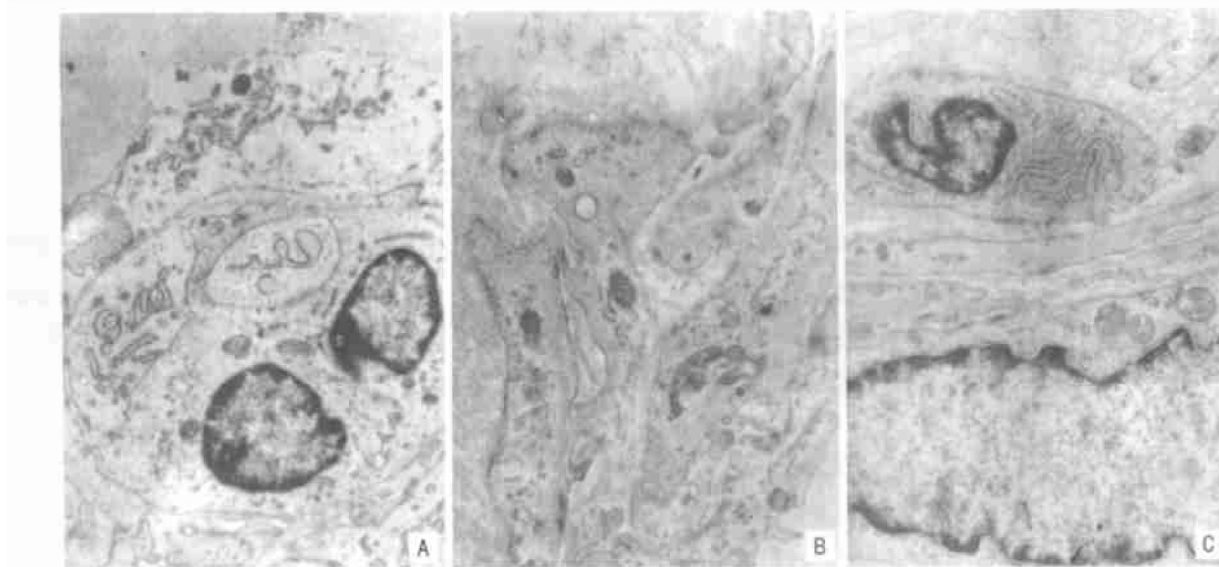


图 2. 颈动脉球囊(2.0 mm)扩张电镜观察结果

A: 第 3 天, 3.3×1000 ; B: 第 7 天, 5×1000 ; C: 第 15 天, 5×1000 。

Figure 2. The electron micrograph of carotid artery after dilated with balloon

3 讨论

目前用于动脉狭窄研究的动物模型有猪、狗、猴、大鼠及兔等^[4,9], 大型动物费用较高且饲养不便。大鼠模型^[4,6]颈动脉较细, 必须使用显微镜且手术视野小不利于操作, 而家兔容易饲养, 其颈动脉比较粗, 易于分离颈动脉及导管操作, 肉眼直视下手术且

成功率高, 是制作颈动脉 PTA 狭窄模型比较理想的实验动物。

本研究用家兔成功地制作颈总动脉 PTA 动物模型, 并对 PTA 后不同时间(第 3 天、7 天及 15 天)动脉血管狭窄程度以及所用球囊型号对狭窄程度的影响作比较, 提出家兔颈总动脉 PTA 后半个月狭窄

程度较明显,并且2.0 mm球囊导管较1.5 mm球囊导管致动脉狭窄更明显,最适宜用作兔颈动脉PTA动物模型的建立。提示进行某种针对再狭窄的治疗观察时,可于颈总动脉PTA半个月后进行对比,能明确显示和评价治疗效果。

选择动物时,尽可能使体重相差最小为好。实验动物的血管粗细与动物体重密切相关,这就要求所选的动物体重相差越小,其血管粗细变化越小,用同一型号球囊对动脉扩张造成损伤的程度就相近,可以减小误差。本研究选用 1.35 ± 0.15 kg家兔,这也是模型制作的关键之一。另外,在手术过程当中,在ECA近侧束以牛皮筋,在撤出穿刺针时拉紧防止出血,在降低动物死亡率方面起到了重要作用。

本动物模型的制作基本模拟了临床进行颈动脉PTA,用动脉夹在ICA起始处及CCA距动脉分叉近心侧2 cm处结扎以游离颈动脉球囊扩张内剥脱节段来进行基因转移或局部用药。此方法在临床上可以用双球囊导管来完成。

建立可行的颈动脉PTA动物模型是实验研究的主要依据。密切关系到颈动脉PTA后再狭窄实验研究的意义和价值。理想的动物模型应具备如下特点:动物存活率高,存活时间长,再狭窄率高,操作简便,重复性好,费用低,可做大量实验,最接近人类颈动脉PTA后再狭窄。本实验具备以上几个特点。目前在国内外具有创新性,值得推广使用。

张磊等^[7]、高奋等^[8]和潘永源等^[9]已成功建立颈动脉粥样硬化模型,在颈动脉粥样硬化狭窄的基础上,进行动脉球囊扩张支架置入观察再狭窄会更接近临床,这是下一步要开展的工作。

本研究除了以家兔作实验动物建立颈动脉PTA动物模型外,并对颈动脉PTA后第3天、7天及15

天动脉壁进行组织学观察。结果发现,PTA早期主要是内膜剥脱、弹力环回缩,弹力板的破坏及血栓形成。第7天可以见到新生内膜增生,主要为平滑肌细胞及细胞外基质,富含胶原纤维,并可以看到少数处于分裂状态的平滑肌细胞。而第15天这种变化更为明显。这与先前的研究成果类似,提示血管平滑肌细胞在颈动脉PTA后再狭窄的发生中占很关键的位置。抑制平滑肌细胞增殖和移行在防止PTA后血管再狭窄会起到至关重要的作用。

[参考文献]

- [1] Srauss WE, Fortin T, Hartigan P, Folland ED, Parisi AF. Veterans affairs study of angioplasty compared to medical therapy investigators. A comparison of quality of life scores in patients with angina pectoris after angioplasty compared with after medical therapy: outcomes of a randomized clinical trial. *Circulation*, 1995, **92**: 1 710-719
- [2] Landau C, Lange RA, Hillis LD. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*, 1994, **330**: 981-993
- [3] King SB, Lembo NJ, Weintraub WS. A randomized trial comparing coronary bypass surgery. *N Engl J Med*, 1994, **331**: 1 044-050
- [4] Todaka T, Yokoyama C, Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Tsukahara T. Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke*, 1999, **30**: 419-426
- [5] Harada Mitsunori, Toki Yukio, Numaguchi Yasushi, Osanai Hiroyuki, Ito Takayuki, Okumura Kenji, et al. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries without bleeding complications. *Cardiovasc Research*, 1999, **43**: 481-491
- [6] Numaguchi Yasushi, Naruse Keiji, Harada Mitsunori, Osanai Hiroyuki, Mokuno Shinji, Murase Kichiro, et al. Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 1999, **19**: 727-733
- [7] 张磊,陈国荣,郑荣远,王群姬,谢淑萍,王拥军. 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 155-158
- [8] 高奋,李静海,肖传实. 高同型半胱氨酸血症兔模型动脉硬化形成. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (4): 348-349
- [9] 潘永源,王立,万岁桂. 2型糖尿病患者活化血小板糖基化复合物水平与颈动脉粥样硬化的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 245-247

(此文编辑 文玉珊)

•资料•

2001年《中国科学技术论文统计源期刊》生物医学类(10)

中华肝脏病杂志
中华骨科杂志
中华航空航天医学杂志
中华核医学杂志
中华护理杂志
中华结核和呼吸杂志
中华精神科杂志

中华口腔医学杂志
中华劳动卫生职业病杂志
中华老年心脑血管病杂志
中华老年医学杂志
中华理疗杂志
中华流行病学杂志
中华麻醉学杂志

中华泌尿外科杂志
中华内分泌代谢杂志
中华内科杂志
中华男科学
中华皮肤科杂志
中华普通外科杂志
中华器官移植杂志