

兔自体静脉移植植物粥样硬化模型的建立

黄东¹, 梁春^{1,2}, 罗育坤¹, 张红旗¹, 贾剑国¹, 王克强¹, 葛均波¹

(1. 复旦大学附属中山医院 上海市心血管病研究所, 2. 第二军医大学附属长征医院心内科, 上海市 200032)

[关键词] 医学实验动物学; 静脉移植植物粥样硬化模型; 自体静脉移植; 高脂饮食; 内膜增生; 家兔静脉; 粥样硬化模型

[摘要] 为研究自体静脉移植植物粥样硬化的发病机制以进行干预研究, 建立家兔动物模型。将 30 只雄性新西兰大白兔随机分为正常对照组($n=6$)、单纯移植组($n=12$)和高脂移植组($n=12$), 分别给予普通饲料喂养、单纯自体颈外静脉移植加普通饲料喂养和自体颈外静脉移植加高脂饲料喂养。实验 12 周末处死动物, 检测血脂水平, 同时观察静脉移植段的形态特征。结果发现, 高脂移植组出现明显的高脂血症, 其颈静脉移植段出现较典型的粥样硬化病变, 包括内皮细胞脱落、内膜增生、平滑肌细胞移行增殖、脂质沉积和泡沫细胞形成等; 单纯移植组的颈静脉移植段仅有明显的内膜增生和平滑肌细胞表型转换及增殖, 未见明显脂质沉积; 而正常对照组及各移植组对侧颈外静脉未见明显异常。结果提示, 自体颈外静脉移植结合高脂饲料喂养可成功建立兔自体静脉移植植物粥样硬化模型, 此模型可用于人自体静脉移植植物粥样硬化发生机理及防治措施等的研究。

[中图分类号] R-332

[文献标识码] A

Establishment of an Autologous Vein Graft Atherosclerotic Rabbit Model

HUANG Dong¹, LIANG Chun^{1,2}, LUO Yu-Kun¹, ZHANG Hong-Qi¹, JIA Jian-Guo¹, WANG Ke-Qiang¹, and GE Jun-Bo¹

(1. Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University; 2. Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] High-Fat Diet; Intimal Hyperplasia; Atherosclerosis; Rabbit; Autologous Vein Graft; Foam Cell

[ABSTRACT] **Aim** To establish a novel animal model to study the mechanism of autologous vein graft atherosclerosis and methods of preventing vein graft atherosclerosis. **Methods** 30 male New Zealand White rabbits were randomly assigned to normal control group (rabbits fed by normal diet, $n=6$), vein graft group (rabbits treated by autologous external jugular vein grafting to common carotid artery and fed by normal diet, $n=12$) or vein graft plus high-fat diet group (rabbits treated by autologous vein graft and fed by high-fat diet, $n=12$). Animals were sacrificed at 12 weeks after surgery. Serum lipid levels were measured and vein grafts were investigated by light microscopy and transmission electron microscopy. **Results** Hyperlipidemia and the typical atherosclerotic lesions of vein grafts were observed in the vein graft plus high-fat diet group. The lesion included intimal hyperplasia, the migration and proliferation of smooth muscle cells, the accumulation of lipid and cholesterol and the formation of foam cells. But only intimal hyperplasia and the migration of smooth muscle cells were observed in the vein graft group. There were no obvious changes in the external jugular veins of the normal control group. **Conclusions** The autologous typical vein graft atherosclerosis can be induced by autologous external jugular vein graft plus high-fat diet in rabbits. The animal model was suitable for the advanced research in the mechanism and prevention of human autologous vein graft atherosclerosis.

自体静脉移植搭桥术是治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病和下肢动脉硬化闭塞症等血管闭塞性疾病的主要方法之一, 而自体静脉(如大隐静脉)桥血管粥样硬化引起的自体静脉移植狭窄是手术中晚期疗效差乃至失败的主要原因^[1]。临床病理研究发现, 与动脉粥样硬化相比, 静脉移植粥样硬化具有其自身特点, 如粥样斑块呈弥漫性发展, 很少钙化, 因而容易破裂, 呈现不稳定性斑块表现, 不同于大多

数动脉自身的稳定性粥样斑块。但造成此种差异的机制不明。因此, 建立相应的自体静脉移植植物粥样硬化动物模型对深入研究静脉移植粥样硬化特有的发病机制具有重要意义, 但目前尚无这类动物模型的报道。本研究以兔自体颈外静脉端端吻合于同侧颈总动脉模拟搭桥, 通过喂饲高脂饲料的方法建立了自体静脉移植植物粥样硬化模型, 并对其病变特点进行了初步观察分析。

[收稿日期] 2003-06-24

[修回日期] 2003-12-19

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(973)(G2000056903)资助

[作者简介] 黄东, 硕士, 主要从事冠心病的研究。梁春, 博士后, 主治医师, 主要从事冠心病的研究。葛均波, 心内科教授, 博士研究生导师, 为本文通讯作者, E-mail: jbg@zshospital.net。

1 材料与方法

1.1 试剂

分析纯胆固醇粉购自上海化学试剂公司, 批号为 021231。

1.2 高脂饲料的配制

按文献[2]所述,在基础饲料中加 15% 蛋黄粉、0.5% 胆固醇和 5% 猪油。

1.3 实验动物分组

选择雄性新西兰大白兔 30 只,体重 2.0~2.5 kg,将动物随机分为三组: 正常对照组($n=6$),喂饲普通颗粒饲料;④单纯移植组($n=12$),行颈外静脉移植术后,同样喂饲普通颗粒饲料;④高脂移植组($n=12$),行颈外静脉移植术后,喂饲高脂饲料。实验共 12 周。

1.4 颈外静脉移植术的实施

以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉注射,麻醉成功后将动物固定于手术台上。剪毛,消毒,铺无菌巾单。取颈前正中切口,游离出左侧颈外静脉及颈总动脉,在颈总动脉的上下两端用无创动脉夹阻断血流后,横断血管。取左侧颈外静脉约 4.0 cm,倒向间置于同侧颈总动脉断端之间,以 9-0 缝线采用间断外翻法行端端吻合。检查无出血及吻合口渗血后即缝合伤口。术后肌注青霉素 800 ku。

1.5 病理标本的留取

所有动物于实验 12 周末经耳缘静脉空气栓塞法处死。行静脉移植术的两组动物留取左侧颈外静脉移植术及对侧颈外静脉,正常对照组留取左侧颈外静脉,生理盐水冲洗干净后,常规石蜡包埋,切片,HE 染色。部分标本用 2.5% 戊二醛固定,以备电镜制片。

1.6 透射电镜标本制备

静脉组织在 2.5% 戊二醛中固定 2 h,1% 锇酸固定 1 h,而后乙醇逐级脱水,Epon812 包埋后超薄切片,铀染色 30 min,铅染色 10 min,PHILIPS CM-120 透射电镜观察。

1.7 血脂测定

高脂喂养前及实验 12 周末由兔耳缘静脉采血,离心分离出血清进行血脂测定。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)采用酶法测定,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)采用磷钨酸镁沉淀法测定,低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)采用 Friedewald 公式计算。

1.8 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况

所有实验动物无中途死亡。行静脉移植术动物未发现局部感染,创口愈合良好。

2.2 各组间血脂比较

各组动物入选时各项血脂水平无显著性差异。12 周后高脂移植组 TC、TG 和 LDLC 水平明显升高,显著高于正常对照组和单纯移植组($P < 0.01$),而正常对照组和单纯移植组各项血脂指标比较无显著性差异($P > 0.05$; 表 1, Table 1)

表 1. 各组动物血脂水平比较

Table 1. Serum lipids in rabbits in three groups ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	<i>n</i>	总胆固醇	甘油三酯	低密度脂蛋白胆固醇	高密度脂蛋白胆固醇
正常对照组	6	1.43 ± 0.24	0.65 ± 0.15	0.53 ± 0.21	0.60 ± 0.11
单纯移植组	12	1.51 ± 0.28	0.67 ± 0.14	0.56 ± 0.32	0.64 ± 0.14
高脂移植组	12	22.91 ± 1.34 ^{ab}	1.80 ± 0.55 ^{ab}	18.39 ± 1.59 ^{ab}	1.99 ± 0.45 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b: $P < 0.01$, 与单纯移植组比较。

2.3 病理形态学观察

2.3.1 大体观察 正常对照组及各移植组对侧颈外静脉柔软、管壁薄;单纯移植组颈静脉移植术明显膨胀增粗,管腔扩大,内膜未见明显粥样硬化病变;而高脂移植组颈静脉移植术管壁僵硬、增厚,内膜可见弥漫性白色斑块。

2.3.2 光镜观察(HE 染色) 正常对照组及各移植组对侧颈外静脉内膜薄,内皮细胞完整,中膜平滑肌纤维层次少,排列稀疏,无明显脂质沉积(图 1A,

Figure 1A)。单纯移植组颈静脉移植术内膜明显增厚,内皮细胞脱落,内皮下层大量排列不规则的梭形增殖的平滑肌细胞,细胞外基质也明显增多。中膜平滑肌层数明显增多,排列紧密,未见明显脂质沉积(图 1B, Figure 1B)。高脂移植组颈静脉移植术内膜弥漫性增厚,内皮细胞脱落,内皮下层间隙明显增大,梭形细胞成分增多,排列紊乱;可见大量胞浆淡染和充满脂质空泡的泡沫细胞弥漫性分布于整个内膜,呈多层镶嵌式排列,可局部聚集形成脂质斑块;

斑块内未见明显细胞崩解、液化,梭形细胞可移行于表层泡沫细胞之间,斑块底部可见断续成层的弹力

纤维。中膜平滑肌纤维层数增多,可见灶性泡沫细胞浸润(图 1C, Figure 1C)。

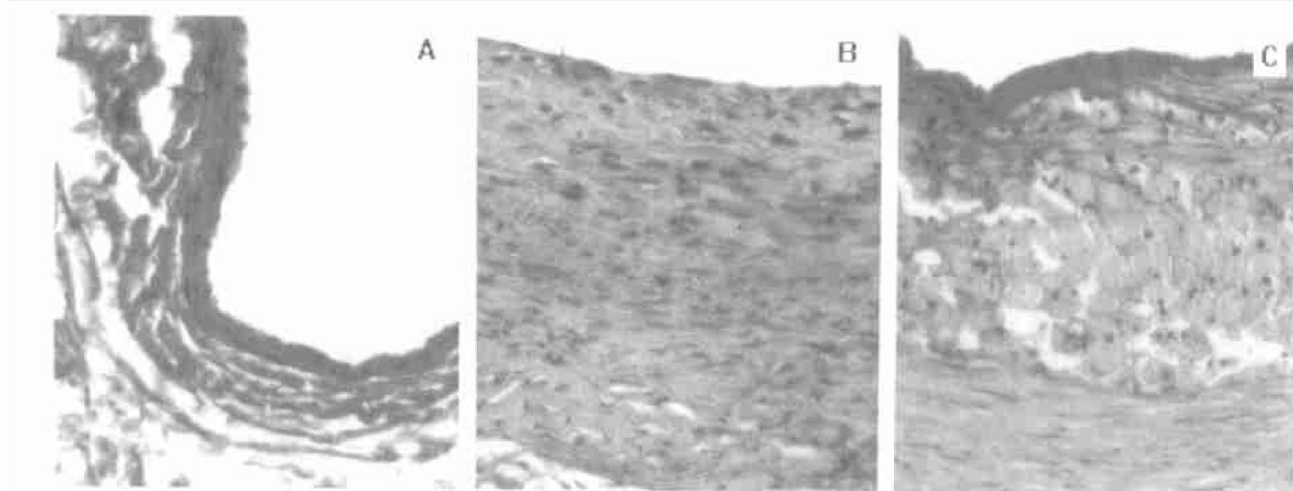


图 1. 各组颈静脉组织 HE 染色光镜观察结果 A 为正常对照组 ($\times 400$); B 为单纯移植组 ($\times 200$); C 为高脂移植组 ($\times 200$)

Figure 1. The light micrograph of the jugular veins or vein grafts of different group rabbits

2.3.3 透射电镜观察 正常对照组及各移植组对侧颈外静脉内皮细胞层及内弹力膜完整,中膜平滑肌细胞胞浆内细胞器少,肌丝含量相对较多(图 2A, Figure 2A)。单纯移植组颈静脉移植内膜增厚,内皮细胞脱落,大量平滑肌细胞由中膜移行进入内膜,内膜及中膜可见合成型平滑肌细胞:胞体及胞核均较大,胞质中粗面内质网及高尔基复合体、核糖

体等细胞器丰富,胞外基质成分明显增多,常见较多胶原纤维围绕平滑肌细胞(图 2B, Figure 2B)。

高脂移植组颈静脉移植内膜明显增厚,内皮细胞脱落,内皮下层可见大量吞噬了较多脂滴的泡沫细胞,同时可见吞噬了少量脂滴的合成型平滑肌细胞,这些平滑肌细胞胞浆内粗面内质网等细胞器丰富,胞外基质成分也明显增多(图 2C, Figure 2C)。

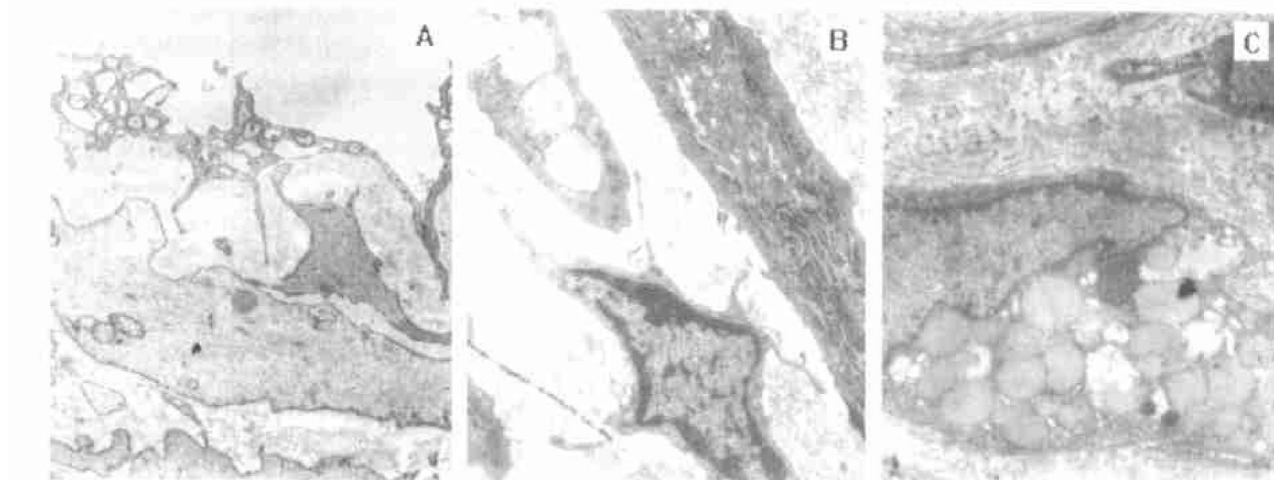


图 2. 各组颈静脉组织透射电镜观察结果 A 为正常对照组 ($\times 3\ 810$); B 为单纯移植组 ($\times 6\ 500$); C 为高脂移植组 ($\times 3\ 810$)

Figure 2. The transmission electron micrograph of the jugular veins or vein grafts of different group rabbits

3 讨论

近年来冠心病、动脉硬化闭塞症等血管闭塞性疾病的发病率日趋增高,血管搭桥或成形术是治疗这类疾病的主要方法之一,自体静脉(如大隐静脉)则成为首选的血管移植材料,但其术后并发的内膜增生和粥样硬化常导致手术的失败。最近的研究表

明,发生在内膜增生基础上的粥样硬化是自体静脉移植术后中晚期移植静脉狭窄的主要原因^[3]。建立典型的与临床情况类似的动物模型,是研究其发病机制、改进治疗措施的关键。既往的研究已建立了自体静脉移植的大鼠及家兔模型^[4,5],但主要局限于观察研究内膜增生这一过程,较少研究粥样硬化

在静脉移植物远期狭窄中的作用。因此我们参考既往动脉粥样硬化模型建立的方法^[6-8], 考虑利用高脂饮食建立自体静脉移植物粥样硬化模型, 获得了满意的结果。

本模型显示在高脂饲料喂养 12 周后, 兔颈静脉移植物在内膜增厚的基础上, 有弥漫性粥样硬化病灶形成, 泡沫细胞分布于整个管壁, 局部聚集形成脂质斑块, 斑块内纤维成分少, 细胞成分多, 未见明显钙质沉积, 纤维帽薄, 所有这些病理表现均类似于人大隐静脉移植物粥样硬化的病变特点, 与动脉不稳定性粥样硬化斑块的表现相似。

自体静脉移植物狭窄由三个独立但又相互关联的病理过程组成: 血栓形成、内膜增生和粥样硬化病变形成。手术操作及高压高速动脉血流均可损伤血管内皮细胞, 引起血小板粘附聚集, 炎症细胞浸润, 血栓形成, 造成移植静脉早期闭塞; 而内皮细胞、血小板和受损的平滑肌细胞均可释放多种生长因子, 如内皮细胞生长因子、血小板源生长因子、胰岛素样生长因子、碱性成纤维细胞生长因子等, 从而启动自身修复过程, 导致平滑肌细胞从收缩型向分泌型转换, 向内膜移行增殖, 并分泌大量细胞外基质, 从而导致内膜增生; 若此时有高脂血症等动脉粥样硬化危险因素存在, 由于内皮细胞受损和功能失调, 脂质沉积于内皮下层, 增殖的平滑肌细胞和浸润的巨噬细胞可吞噬脂质形成泡沫细胞。由于静脉自身的结构特点及置身于高压的动脉循环环境中, 内皮解剖上和功能上的完整性得到广泛破坏, 因此病变呈弥

漫性分布。本实验中观察到类似的这种内皮细胞受损、平滑肌细胞增殖并发生表型转换、向内膜移行、分泌胞外基质、泡沫细胞形成等病理变化, 为今后进一步深入研究其发生机制打下了基础。

总之, 利用高脂饲料建立的兔自体静脉移植物粥样硬化模型具有如下优点: 损伤小, 仅累及一侧颈动脉系统; 易于观察病变部位, 取材方便; 因此手术成功率高, 可重复性好; 诱发的高脂血症明显, 建立模型成功率高; 静脉移植段粥样硬化病变特点类似于人大隐静脉桥粥样硬化。该模型上述特点使其比较适合于人自体静脉移植物血管重构及粥样硬化病变的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation*, 1998, **97**: 916-931
- [2] 苗明三 (主编). 实验动物和动物实验技术. 北京: 中国中医药出版社, 1997; 200-201
- [3] Sarjeant JM, Rabinovitch M. Understanding and treating vein graft atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*, 2002, **11**: 263-271
- [4] 余波, 薛光华, 乐竹琴, 王铁平. 大鼠自体静脉移植后内膜增生与平滑肌细胞增殖. 上海医科大学学报, 1997, **24**: 285-288
- [5] 曲乐丰, 景在平, 曹贵松. 兔自体静脉移植物的中膜平滑肌细胞超微结构变化. 第二军医大学学报, 1999, **20**: 848-850
- [6] 李永秋, 徐明, 姚绍鑫, 张志勇. 实验性家兔颈动脉粥样硬化模型建立的建立. 中国动脉硬化杂志, 2003, **11**: 263-266
- [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**: 155-158
- [8] 郭延松, 杨军珂. 鼠动脉粥样硬化模型的建立. 中国动脉硬化杂志, 2003, **11**: 84-86

(此文编辑 文玉珊)