

[文章编号] 1007-3949(2007)15-04-0281-05

• 实验研究 •

## 兔颈动脉粥样硬化发展过程中血管壁重塑及生物力学特性的变化

武晓玲<sup>1</sup>, 陈卫军<sup>2</sup>, 迟路湘<sup>3</sup>, 鲁向辉<sup>3</sup>

(1. 中国人民解放军第 251 医院神经内科, 河北省张家口市 075000; 2. 第三军医大学基础医学部解剖学教研室  
重庆市生物力学实验室, 3. 第三军医大学西南医院神经内科 重庆市介入脑血管病学研究所, 重庆市 400038)

[关键词] 病理学与病理生理学; 颈动脉粥样硬化; 血管重塑; 生物力学参数; 胶原; 兔

[摘要] 目的 检测兔颈动脉粥样硬化形成过程中不同时期血管壁重塑及生物力学参数的变化。方法 30 只日本大耳白兔按抽签法随机分为正常饮食组( $n=6$ )和手术组( $n=24$ ), 手术组饲高脂饮食, 一周后左侧颈动脉实施空气干燥内膜损伤术, 并以右侧颈动脉留做假手术组; 正常饮食组 2 周后及手术组于术后 2、4、8 及 12 周利用微机万能材料试验机控制系统测定血管最大载荷、抗拉强度、弹性模量、屈服强度、断裂伸长率等指标, 测试后留取病理标本做免疫组织化学及 HE 和 Masson 染色, 测定中膜胶原含量。结果 手术组颈动脉出现较典型的粥样硬化病变。随粥样硬化程度增加, 血管内膜增厚, 中膜变薄, 大量增生的胶原组织代替平滑肌纤维, 血管弹性模量增高, 硬度增大, 顺应性减低。手术后 12 周组与假手术组、手术后 2、4 及 8 周组相比均有显著差异。但 2 周组与假手术组相比差异不明显。结论 在动脉粥样硬化早期, 血管呈正性重塑, 弹性模量略有降低以适应新的力学环境。但随着粥样硬化程度加重, 动脉壁胶原含量增加, 管壁弹性减低, 硬度增加, 呈负性重塑过程, 为介入治疗增加难度。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Changes of Vascular Remodeling and Biomechanical Parameters of Carotid Atherosclerosis in the Rabbits

WU Xiao-Ling<sup>1</sup>, CHEN Wei-Jun<sup>2</sup>, CHI Lu-Xiang<sup>3</sup>, and LU Xiang-Hui<sup>3</sup>

(1. Department of Neurology, the 251 Hospital, People's Liberation Army, Zhangjiakou 075000; 2. Department of Anatomy, the Third Military Medical University Biomechanical Laboratory, 3. Department of Neurology, Shouthwest Hospital, Third Military Medical University Chongqing Interventional Institute of Cerebrovascular Disease, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] Carotid Atherosclerosis; Vascular Remodeling; Biomechanical Properties; Collagen; Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of biomechanical properties of carotid atherosclerosis in rabbits and its connection with the content of collagen. **Methods** 30 male Japanese White rabbits were randomly divided into control group ( $n=6$ ) and the surgery group ( $n=24$ ). The control group was fed by normal diet, but the surgery group was fed by high cholesterol diet and treated in left carotid artery by air-drying. Meanwhile right carotid artery was treated as sham group. At 2, 4, 8 and 12 week after operation, the biomechanical properties were measured on a tensile testing machine. The Elastic modulus, the strength failure and the peak load was measured, meanwhile the degree of artery stenosis was showed by DSA. The stenosis rate, mean integral optical densities (IOD) of media collagen were calculated. **Results** The typical atherosclerotic plaque showed in surgery group. Following development in degrees of the atherosclerosis, the intima showed proliferation and media showed atrophy and became thin, a mass of collagen tissue proliferated and filled in the smooth muscle cell. Artery elastic modulus and stiffness was increased and artery compliance was decreased. Statistic analysis showed significant difference at the 12 week group, compared with sham group and 2, 4 and 8 week group after operation, but it showed no such significant difference at 2 week group after operation, compared with sham group. **Conclusions** At the early carotid atherosclerosis, vessel showed positive remodeling. Elastic modulus decrease to adapt to the new mechanical condition. But following development in degrees of the atherosclerosis, the content of the artery wall collagen increases, the vessel wall elasticity decrease and stiffness increases. The vessel occurs negative remodeling. It suggests that the interventional treatment be in difficulty.

血管弹性减低和硬度增加是中老年人心脑血管病发生的危险因素。Urbina 等<sup>[1]</sup>研究发现, 在不

同种族年轻人颈动脉弹性减低与卒中危险因素间亦存在明显相关性。因此, 对血管的研究成为现代生物医学的一项重大课题。动脉的刚度除与管壁的弹性成分含量有关外, 还与弹性成分的空间构型、生物代谢状态等多种因素有关。动脉粥样硬化后管壁中的胶原纤维含量和弹力纤维含量将出现不等比例增

[收稿日期] 2006-10-20

[修回日期] 2007-04-02

[作者简介] 武晓玲, 硕士, 主治医师, 主要从事介入脑血管病学研究。陈卫军, 副教授。通讯作者迟路湘, 博士, 副主任医师, 主要从事脑血管病介入诊断和治疗方面研究。

加,从而影响动脉壁力学性质。本研究旨在利用兔颈动脉粥样硬化模型探讨动脉粥样硬化不同时期血管壁重塑与生物力学变化的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胆固醇(化学纯)购自成都科龙化工试剂公司,批号为041103。花生油为市售鲁花牌花生油。精密玻璃转子气体流量计(LZB-2型,沈阳正兴流量仪表有限公司生产)。普通饲料购自第三军医大学实验动物中心。高脂饲料按2%胆固醇、6%花生油、92%普通颗粒饲料加工配制。

### 1.2 实验动物及分组

雄性日本大耳白兔30只,体重2.0~2.5 kg,4月龄,由第三军医大学实验动物中心提供。将动物按抽签法随机分为两组:正常对照组( $n=6$ )喂普通颗粒饲料;手术组( $n=24$ )喂高脂饲料,1周后实施左侧颈动脉内膜空气干燥术,右侧留做假手术对照组。术后继续高脂饲料喂养,分别于术后第2、4、8及12周处死动物。正常对照组于实验2周后处死。所有动物均单笼喂饲,饮水不限,自由摄食。

### 1.3 内膜空气干燥术

术前12 h禁食,不禁饮。在严格无菌条件下,经速眠新注射液0.2 mL/kg肌肉麻醉,颈部脱毛清洁消毒后,正中切口,于甲状软骨上方水平分离左侧颈总动脉,长约2.5 cm,发现颈动脉小分枝,则预以单线结扎。两端以动脉夹阻断血流。4.5号头皮针尽可能平行于血管纵轴方向穿刺阻断血管的两端,生理盐水冲洗置换出管腔内的血液后,接上已调节好流量为250 mL/min的气流,历时5 min造成内皮干燥,然后管腔内重新充满生理盐水,放开临时动脉夹恢复血流。湿润棉片轻轻压迫穿刺点3~5 min止血。解开侧支结扎线,恢复血供。缝合皮肤创口并包扎。术后肌注庆大霉素预防感染。

### 1.4 颈动脉数字减影血管造影检查

全麻下行颈动脉数字减影血管造影检查。无菌条件下按常规检查操作。先行右股动脉切开,再由切口置入带导丝的5F导管,X线透视下分别将导管头端送到右侧和左侧颈总动脉近心端行正侧位造影。留取颈动脉造影图像。

### 1.5 血管造影片判定颈动脉狭窄程度

以Photoshop6.0软件精确测量造影片,测量每根颈动脉最狭窄区的最小残腔直径和狭窄远端正常颈总动脉直径,计算狭窄率。狭窄程度的判定:狭窄

率<30%为轻度狭窄,30%~60%为中度狭窄,60%~90%为重度狭窄,100%为完全闭塞。

### 1.6 生物力学测试

取双侧颈动脉2 cm,保持室温,精心剥离血管周围的疏松结缔组织,用数字式游卡(CH-10-0.01型测厚仪)测量离体无应力血管的厚度和管径,以确定试验件的截面积。力学试验在微机万能材料试验机控制系统(RGT-5A型,深圳市瑞格尔仪器有限公司生产)上进行,采用10 N传感器,测量误差为1/1000,加载速度为10 mm/min,微机自动记录应力-应变曲线,整个过程不断用生理盐水喷滴以保持原有水分,室温保持在25℃,实验时必须先重复同样的加载卸载过程,经预处理后血管试件的长度为初长度,然后进行一维拉伸实验。

### 1.7 病理学检查

取双侧颈动脉1.0 cm,置于福尔马林液中固定,用作HE染色、Masson三色染色及免疫组织化学染色。利用CK40倒置显微镜观察组织切片并摄片。Masson三色染色判定为胶原纤维呈绿色,平滑肌纤维呈红色,红细胞呈橘红色。光镜下,利用Image pro-plus真彩图分析软件检测管壁胶原纤维的平均积分光密度(IOD)值,用数码显微镜将图像传输至微机,利用图像分析软件进行分析。免疫组织化学染色切片用3% $H_2O_2$ 灭活内源性过氧化物酶,经抗原修复后加二抗,同种动物正常血清封闭,然后分别加入一抗小鼠抗兔 $\alpha$ -SM-actin单克隆抗体(博士德公司)、生物素化二抗及链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,DAB显色,苏木素复染。胞浆内见棕黄色颗粒为 $\alpha$ -SM-actin阳性。

### 1.8 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,组间多个样本均数比较采用单向方差分析,均数的多重两两比较用SNK检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 狭窄率及胶原纤维平均光密度值变化

假手术组颈动脉未见斑块生长;手术组术后2周颈动脉狭窄率与4、8及12周比较差异显著( $P < 0.05$ ),但4、8及12周间比较差异无显著性。手术组术后2、4、8及12周胶原纤维平均光密度值呈逐渐增高趋势( $P < 0.05$ ),且术后4、8及12周胶原纤维平均光密度值与正常对照组和假手术组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ;表1)。

表 1. 狭窄率和胶原纤维平均光密度值的变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

分 组	狭窄率				胶原纤维平均积分光密度值			
	2 周	4 周	8 周	12 周	2 周	4 周	8 周	12 周
正常对照组					78.07 $\pm$ 4.22			
假手术组					91.67 $\pm$ 1.38	93.24 $\pm$ 3.20	96.22 $\pm$ 3.92	91.94 $\pm$ 2.97
手术组	36.58% $\pm$ 8.53%	60.28% $\pm$ 5.08%	76.07% $\pm$ 5.35%	65.58% $\pm$ 8.36%	108.23 $\pm$ 2.81 <sup>a</sup>	147.47 $\pm$ 7.52 <sup>ab</sup>	168.80 $\pm$ 6.74 <sup>ab</sup>	200.61 $\pm$ 5.39 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较。

## 2.2 生物力学指标变化

手术组术后 2、4、8 及 12 周弹性模量逐渐增高 (图 1A), 各时间段与正常对照组比较均差异显著 ( $P < 0.05$ ); 手术组术后 4、8 及 12 周弹性模量与假手术组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。手术组术后 2、4、8 及 12 周最大载荷逐渐增高 (图 1B), 术后 12 周最大载荷与假手术组和正常对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。手术组术后 2、4、8 及 12 周抗拉强度逐渐增高 (图 1C), 术后 8 周和 12 周抗拉强度与假手术组和正常对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。

正常对照组应力—应变曲线上速度均匀、平缓, 证明管壁柔顺性好, 尽管压力上升, 由于管壁弹性刚度好, 弹性模量不因压力升高而无止境升高, 保持了动脉本身的弹性特征。而粥样硬化动脉的应力—应变曲线上上升的坡度和速度明显与正常对照组不同, 斜率逐渐增大, 曲线左移, 变陡直, 弹性段明显缩短, 平台期少 (图 2)。

## 2.3 病理学改变

手术组术后 2 周内膜轻度增生, 内膜下少许泡

沫细胞和脂质沉积, 内弹力层基本存在, 中膜结构无明显改变, 平滑肌排列整齐 (图 3); 术后 4 周内膜增生较重, 内、中膜中平滑肌细胞大量增殖, 泡沫细胞较少, 部分管壁中膜增厚, 管腔变小 (图 4A); 术后 8 周内膜进一步增厚, 细胞数目减少, 但细胞体积增大, 胞内脂质成分增多, 细胞外基质明显增多, 中膜变薄, 并出现纤维化, 弹力纤维消失, 平滑肌纤维由结缔组织代替, 并含有脂滴、泡沫细胞及胆固醇裂隙 (图 4B); 术后 12 周病变更为严重, 细胞核数目进一步减少, 病变内充满大量无定形脂质或坏死细胞成分, 偶见胆固醇结晶, 大量脂质侵入中膜, 胶原增生, 平滑肌细胞明显减少, 偶有脂质突破中膜, 穿透管壁。正常对照组和假手术组  $\alpha 2SMA$  阳性细胞主要分布在中膜; 手术组术后 2 周和 4 周血管损伤处的内膜和中膜有不同程度增殖的  $\alpha 2SMA$  阳性细胞, 外膜也出现  $\alpha 2SMA$  阳性细胞。术后 8 周和 12 周中膜平滑肌纤维萎缩、变薄、排列紊乱, 大量胶原增生 (图 5), 病变严重处平滑肌纤维完全消失, 由脂质及胶原纤维代替 (图 5B)。

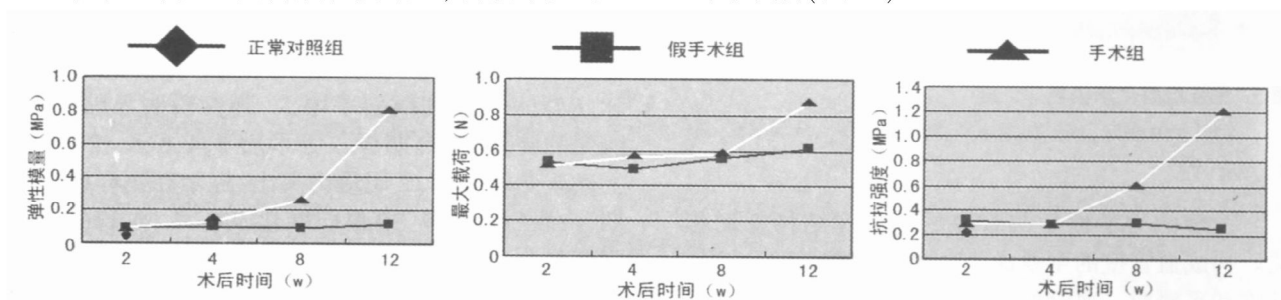


图 1. 生物力学指标变化

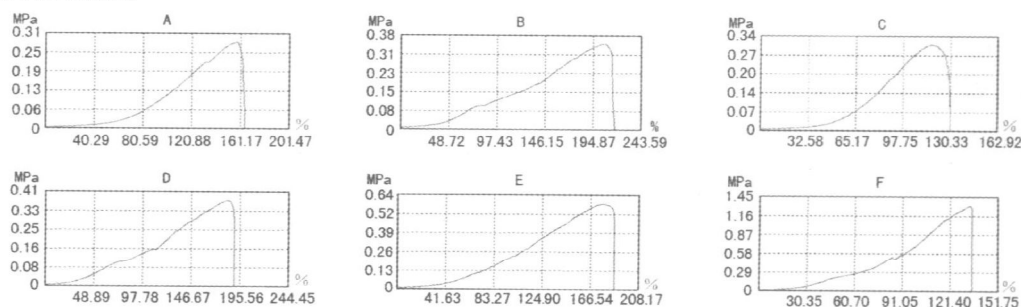


图 2. 各组应力—应变曲线变化



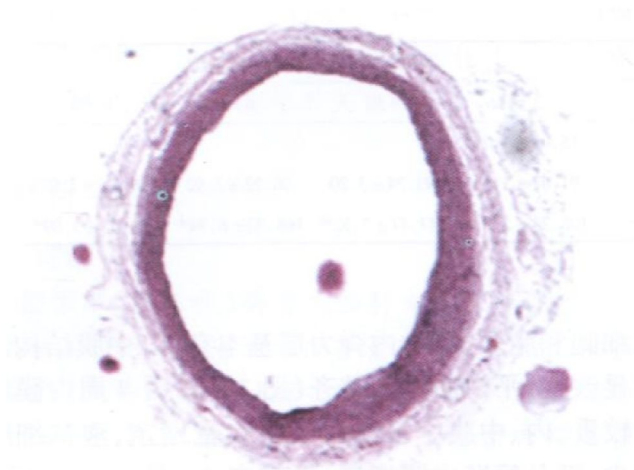


图 3. HE 染色 (×40)

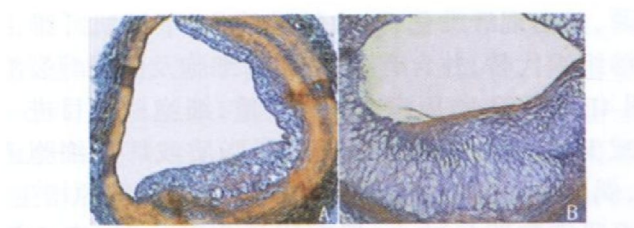


图 4. Masson 染色 (×20)

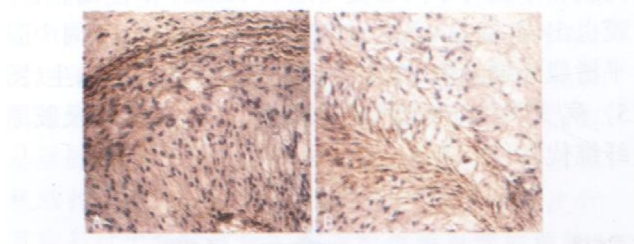


图 5. 免疫组织化学染色 (×20)

### 3 讨论

血管的力学性质与管壁的成份和结构密切相关。构成血管壁的主要成份是内皮、弹性纤维、胶原纤维和平滑肌。血管的力学性质主要取决于弹性纤维、胶原纤维和平滑肌的性质、含量及空间构型<sup>[2]</sup>。弹性纤维、胶原纤维和平滑肌在力学性质上有明显差异。弹性纤维是典型的线弹性体,模量大约为0.6 MPa;胶原纤维的模量很高,大约1 GPa;平滑肌拥有很明显的粘性,并且模量非常低,大约只有弹性纤维的十分之一。可见,胶原纤维是力的主要承担者。实验得知,在低应力下承载的主要是弹性纤维和平滑肌。在高应力时,胶原纤维是主要的承载体<sup>[3]</sup>。万能生物力学材料测试仪进行材料测试的基本原理

是通过对组织拉伸或者挤压作用,使组织发生一定的变形,测试单元连接中央控制单元和计算机系统,将组织的变形以位移改变,拉力改变随时间变化显示出来,并间断采集数据,直到组织发生断裂,最终给出组织材料力学特性曲线和最大负荷值等数据。弹性模量是组织在单位面积所承受的应力与组织在应力作用下应变的比值,它适合与应力应变曲线是非线性关系时组织弹性的描述,通过计算弹性模量来反应管壁的弹性特征。抗拉强度又叫断裂极限,当组织在拉伸到某一强度时,组织的部分承载单元发生了断裂,紧接着所有的拉力继续作用于剩下的承载单元,直到所有组织发生断裂。

本研究结果发现,随着狭窄程度增高及粥样斑块形成时间延长,弹性模量及最大载荷、抗拉强度呈明显增高趋势,说明粥样硬化的血管发生了结构变化,使其柔顺性减小,以致于达极限荷载时血管不能象正常动脉那样再作较大的伸展。Nagaraj 等<sup>[4]</sup>和 Chandran 等<sup>[5]</sup>分别利用血管内超声测定猪颈动脉粥样硬化后弹性模量改变,发现弹性模量随管壁厚度增加而呈升高趋势。分析正常组应力—应变曲线形态,大约在应变的前20%,呈现为一低平的上升,从形态上可以看作弹性拉伸,此段应该是弹力纤维承载的低应力区。此后出现一陡然上升的转变,期间的过渡表现为一弧状转角,这一转角应该是弹力纤维作用即将结束和胶原纤维作用已经开始的合成作用区,此处两种承载成份均起作用。最后曲线又达第三节段,即出现直线上升趋势,曲线斜率大,但属于非线弹性改变,此节段应当属于胶原纤维承载的区域。但对比正常对照组,出现粥样硬化改变的动脉,应力—应变曲线斜率增大,弹性段明显缩短,曲线变的陡直,平台期少。手术后2、4、8及12周中,上述改变以术后12周最为突出,提示在粥样硬化后期,内膜明显增厚、中膜纤维化及坏死,血管的非扩张性成分(胶原纤维)增加,使血管弹性丧失,质地变硬变脆,管壁应力—应变曲线左移<sup>[6]</sup>。术后2周弹性模量、抗拉强度等与假手术组差异不明显,这与 Hudetz 等<sup>[7]</sup>发现在动脉硬化第一期弹性模量略低结果一致。Hayashi 等<sup>[8]</sup>在总结粥样硬化后动脉弹性模量改变时,发现早期的研究有较多矛盾的结论。Riley 等<sup>[9]</sup>在分析不同种族人群颈总动脉弹性与内中膜厚度关系的临床研究中亦发现早期弹性模量减低。我们认为,在动脉硬化初期弹力纤维及平滑肌组织在内膜增殖,管壁轻度增厚,但管腔代偿性扩张,血管呈正性重塑表现,动脉的增量扩张产生局部补偿结果,而造成弹性模量降低的假象。

颈动脉硬化病变初期,中膜平滑肌细胞分裂增殖,并迁移到内膜,分泌结缔组织基质,包括胶原纤维、弹性纤维和蛋白多糖,引起内膜增厚,参与内膜粥样硬化斑块的形成。但病变进一步发展,管壁内膜增厚明显,中膜萎缩,弹性结构排列紊乱,甚至断裂、消失,胶原大量增生,平滑肌由结缔组织代替,并出现纤维化,加之组织中钙盐沉积,使中膜变薄,整个管腔呈负性重塑表现。有作者认为胶原成分少者斑块易破裂,而胶原过多可导致管腔狭窄<sup>[10]</sup>。此外,胶原密度与动脉重构的类型有关,负重构者胶原密度较正重构者高<sup>[11]</sup>。

综合上述结果分析,在颈动脉硬化后期,大量产生的胶原纤维使血管硬度增加,管壁组织在应力作用下应变能力下降,弹性模量增高,顺应性下降。而血管的生物力学特性如顺应性、硬度改变又会影响作用在粥样斑块的各种力学因素,导致斑块稳定性下降,容易破裂,为血管内治疗增加难度。

#### [参考文献]

- [1] Urbina EM, Srinivasan SR, Kietlyka RL, Tang R, Bond MG, Chen W, et al. Correlates of carotid artery stiffness in young adults: The Bogalusa Heart Study [J]. *Atherosclerosis*, 2004, **176** (1): 157-164.
- [2] Nicos Labropoulos, Joseph Zarge, Ashraf Mansour M, Kang SS, Baker WH. Compensatory arterial enlargement is a common pathobiologic response in early atherosclerosis [J]. *Am J Surg*, 1998, **176** (2): 140-143.
- [3] Rousseau EP, Sauren AA, van Hout MC, van Steenhoven AA. Elastic and viscoelastic material behaviour of fresh and glutaral dehydretreated porcine aortic valve tissues [J]. *J Biomech*, 1983, **16** (5): 339-348.
- [4] Nagaraj A, Kim H, Hamilton AJ, Mun JH, Smulevitz B, Kane BJ, et al. Porcine carotid arterial material property alterations with induced atheroma: an in vivo study [J]. *Med Eng Phys*, 2005, **27** (2): 147-156.
- [5] Chandran KB, Mun JH, Choi KK, Chen JS, Hamilton A, Nagaraj A, et al. A method for in vivo analysis for regional arterial wall material property alterations with atherosclerosis: preliminary results [J]. *Med Eng Phys*, 2003, **25** (4): 289-298.
- [6] Nerem RM. Vascular fluid mechanics, the arterial wall, and atherosclerosis [J]. *J Biomech Eng*, 1992, **114** (3): 274-282.
- [7] Hudetz AG, Gyurgy M, Kovach AGB, Tibor Kerényi, László Fody, Emil Moros. Biomechanical properties of normal and fibrosclerotic human cerebral arteries [J]. *Atherosclerosis*, 1981, **39** (3): 353-365.
- [8] Hayashi K. Experimental approaches on measuring the mechanical properties and constitutive laws of arterial walls [J]. *J Biomech Eng*, 1993, **115** (4B): 481-488.
- [9] Riley WA, Evans GW, Sharrett AR, Burke GL, Barnes RW. Variation of common carotid artery elasticity with intima-media thickness: the ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities [J]. *Ultrasound Med Biol*, 1997, **23** (2): 157-164.
- [10] 程训民, 何国祥, 全识非, 冉肇力, 刘建平, 姚青, 等. 中度狭窄病变中斑块分布对冠状动脉生物力学特性的影响 [J]. *中国循环杂志*, 2004, **19** (5): 335-337.
- [11] Fuessl RT, Kranenberg E, Kiausch U, Baer FM, Sechtem U, Hopp HW, et al. Vascular remodeling in atherosclerotic coronary arteries is affected by plaque composition [J]. *Coron Artery Dis*, 2001, **12** (2): 91-97.

(此文编辑 文玉珊)