

通过损伤动脉外膜建立兔颈动脉粥样硬化狭窄和再狭窄模型

樊健^{1,2}, 叶猛¹, 张皓¹, 张柏根¹, 齐砚庆¹, 潘以锋¹

(1. 上海市交通大学医学院附属仁济医院血管外科, 上海市 200060

2. 江苏省启东市人民医院神经外科, 江苏省启东市 226200)

[关键词] 动脉粥样硬化; 动脉再狭窄; 动物模型; 血管腔内治疗; 动脉外膜

[摘要] 目的 球囊扩张后动脉再狭窄严重制约着经皮血管腔内治疗术的治疗效果, 为探讨动脉再狭窄的发病机制, 本研究尝试建立动脉再狭窄模型。方法 采用右颈总动脉可吸收线套环缩窄术加高脂饲料喂养新西兰兔, 建立颈动脉粥样硬化狭窄模型。4周后, 自右颈外动脉远端结扎并切断颈外动脉, 由结扎近心侧插入扩张球囊导管进行球囊扩张, 建立动脉再狭窄模型。然后以普通饲料喂养 4周后, 对颈动脉标本进行组织学及形态学分析, 并以对侧颈总动脉为正常对照组。结果 套环颈动脉管腔较对照组有缩窄, 平滑肌细胞有增殖, 排列紊乱, 内皮细胞呈乳头状突入管腔。球囊扩张后, 内膜较对照组及动脉缩窄组显著增厚 ($P < 0.05$)。组织切片可见内、中弹力层断裂, 内膜有大量泡沫细胞, 脂质沉着, 粥样斑块组织形成。外膜滋养血管数量增加。结论 通过本方法可成功构建实验兔血管再狭窄模型, 且操作简单, 建立模型时间短, 为探讨血管再狭窄的发生机制提供了条件。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A Double-Injury Model of Rabbit Carotid Artery for the Understanding of Restenosis After Experimental Angioplasty

FAN Jian^{1,2}, YE Meng¹, ZHANG Hao¹, ZHANG Baigen¹, QI Yanqing¹, and PAN Yifeng¹

(1. Vascular Surgery Department, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200060; 2. Neurosurgery Department, People's Hospital of Qidong, Qidong 226200, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Restenosis Model; Angioplasty; Adventitia

[ABSTRACT] **Aim** The efficacy of percutaneous transluminal angioplasty (PTA) is limited by high incidence of restenosis. For investigating the mechanism of restenosis following angioplasty, an applicable restenosis model that mimics human vascular injury are needed. **Methods** Arterial lesions were induced by placement of an absorbable thread around the right common carotid artery of rabbits. After 4 weeks, the thread was absorbed, and a subgroup of rabbit carotid arteries was subjected to secondary balloon dilation. Histological difference among the experimental groups was assessed 4 weeks after the double-injury approach. **Results** 8 weeks after thread placement, the shrunk carotid artery demonstrated atherosclerotic lesions. The atherosclerotic carotids in other group underwent angioplasty, resulting in plaque medial layer disruption and significant intimal hyperplasia. Neointimal lesions were composed of foam cell and extracellular matrix. The number of adventitial vasa vasorum increased compared with control group. **Conclusion** The animal model of atherosclerosis and restenosis was successfully created. This method was simple, economical and manageable, and the model was steady and easily repeated.

动脉再狭窄 (restenosis, RS) 是影响血管腔内治疗效果的棘手问题, 约有 30% ~ 50% 的患者于术后 1 年发生血管再狭窄。如何抑制受扩张血管内膜增生, 减轻动脉再狭窄是血管腔内治疗领域的一个重要研究内容。为了能更好地研究动脉再狭窄的发生、发展机制, 制定有效的防治措施, 需要建立确切、简单、快速及经济的动脉粥样硬化再狭窄模型。基于内皮细胞破坏、内膜增生在人类动脉粥样硬化发生中的重要作用, 通常采用直接破坏血管内皮来建

立动脉粥样硬化狭窄模型, 然后对病变部位进行球囊扩张, 从而建立动脉再狭窄模型。本实验则尝试通过损伤动脉外膜来获得具有动脉粥样硬化改变的动脉狭窄模型。

1 材料和方法

1.1 颈动脉粥样硬化狭窄模型的制备

14 只新西兰兔 (上海宝牧实验动物养殖场, 许可证号: SCXK 沪 2004-0007) 雌雄不拘, 体重 2.5 ~ 3 kg。随机分为右颈动脉粥样硬化狭窄组 ($n = 7$) 和右颈动脉再狭窄组 ($n = 7$), 从两组中各随机取 2 只实验兔的左颈动脉作为空白对照组。全部实验兔

[收稿日期] 2009-08-02

[修回日期] 2009-10-05

[作者简介] 樊健, 主治医师。通讯作者叶猛, 博士, 主治医师, E-mail 为 Forestmengy@hotmail.com。

均以高脂饲料 (2% 胆固醇 + 6% 花生油 + 92% 正常饲料) 饲养, 2 周后按下法建立颈动脉狭窄模型。造模术当天术前对实验兔禁食、禁水。4% 异戊巴比妥钠 (1.5 mL/kg 耳缘静脉缓慢推注) 静脉麻醉, 固定四肢, 备皮。消毒铺巾, 取颈部右旁正中切口, 锐钝性分离颈前肌群, 暴露并游离右颈动脉, 经耳缘静脉给予普通肝素 (100 U/kg) 后, 于甲状软骨下方约 10 mm 处将 5-0 爱惜康可吸收缝线套于预先游离出的右颈动脉后壁, 取口径 0.7 mm 金属短管平行置于颈动脉表面, 结扎可吸收线后, 拔除金属管, 使颈动脉在结扎处呈狭窄状态。缝合颈部切口。术后当天单次肌注 8 万 U 庆大霉素, 继续高脂饲料饲养。

1.2 建立再狭窄模型

高脂饮食 4 周后, 对右颈动脉再狭窄组颈动脉狭窄段进行球囊扩张。同法再次暴露右颈总、颈内、颈外动脉, 观察首次手术颈动脉结扎处, 见可吸收线基本吸收, 局部管壁有增厚。全身肝素化后, 结扎颈外动脉远端, 切开颈外动脉, 由颈外动脉逆行插入球囊导管, 选择的球囊直径约为颈总动脉直径的 1.2 ~ 1.5 倍, 在导丝引导下通过颈动脉狭窄处, 行球囊扩张 (6 atm, 2 min), 负压状态下缓慢退出球囊, 结扎颈外动脉。关闭切口后, 单次肌注庆大霉素 1 次。右颈动脉粥样硬化狭窄组实验兔仅行右颈外动脉结扎。所有动物术后均改为普通饲料。

1.3 颈动脉标本组织学观察与形态学分析

第二次手术后 4 周, 同法麻醉实验兔, 原切口暴露并切取颈动脉标本, 范围从颈总动脉起始部到颈总动脉分叉处。用肝素稀释液冲洗清除腔内残留血液, 10% 中性福尔马林浸泡 24 h 后行石蜡包埋。常规病理连续切片, 切片间隔 2 mm, 切片厚度 4~5 μm 。所有切片行 HE 染色及弹力纤维、胶原纤维染色, 光学显微镜下选取管腔最狭窄段作为观察对象。各标本均选取最狭窄的 1 张切片进行图像分析。应用 AxioPlan 2 imaging 显微图象分析系统, 在 5 倍光学放大下, 用鼠标勾勒内、中弹力层, 分别检测内膜、中膜及管腔面积。

1.4 统计学处理方法

实验所得数据用 SAS6.12 统计软件建立数据库, 进行统计计算。变量均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较采用非配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 动物基本情况

实验期间实验兔体重由 2.12 ± 0.31 kg 增加到

2.88 ± 0.29 kg。观察期间 3 只实验兔死亡, 其中 2 例死于腹泻, 1 例死于肺部感染。另取 3 只实验兔补足。

2.2 颈动脉标本大体观察

术中取材时见右颈动脉粥样硬化狭窄组于原套线处管壁增厚、苍白、僵硬。右颈动脉再狭窄组颈动脉较右颈动脉粥样硬化狭窄组增粗更为明显, 部分动脉壁可见粥样斑块形成。对侧颈动脉外观与正常血管无异。

2.3 颈动脉病理形态学观察

各组内膜、中膜及管腔面积详见表 1。对照组动脉内膜、中膜和外膜三层结构清晰, 内皮细胞形态完整, 单层有序排列, 紧贴内弹力层; 位于中膜的平滑肌细胞呈梭形有序分层排列; 各弹力层完整, 无损伤断裂 (图 1A)。右颈动脉粥样硬化狭窄组管腔在套线缩窄处有狭窄, 管腔较对照组显著缩小 ($P < 0.05$); 管壁增厚, 内膜增厚, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$), 内皮细胞呈乳头状向管腔内突出, 内弹力层基本完整, 中膜有增厚, 细胞成分增加; 平滑肌有增生, 排列紊乱, 淋巴细胞、中性粒细胞及泡沫细胞少见 (图 1B)。右颈动脉再狭窄组颈动脉经过球囊扩张后, 管腔面积较对照组及右颈动脉粥样硬化狭窄组增加 ($P < 0.05$); 内膜增生显著, 与对照组及右颈动脉粥样硬化狭窄组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 内膜可见大量泡沫细胞及中性粒细胞和单核巨噬细胞, 部分标本内、中弹力层见断裂; 中膜细胞成分减少, 平滑肌细胞萎缩, 数量减少, 部分被胶原纤维组织取代, 中膜与内膜互相移行; 外膜可见炎症细胞浸润 (图 1C)。

表 1 各组内膜、中膜和管腔面积 ($\times 10^4 \mu\text{m}^2$)

参 数	对照组 (<i>n</i> = 4)	右颈动脉粥样 硬化狭窄组 (<i>n</i> = 7)	右颈动脉 再狭窄组 (<i>n</i> = 7)
内膜面积	6.91 \pm 3.22	38.85 \pm 32.93 ^b	79.13 \pm 38.33 ^{bc}
中膜面积	37.09 \pm 10.40	46.39 \pm 15.643	75.27 \pm 18.86 ^{ac}
管腔面积	70.67 \pm 68.56	60.89 \pm 37.35 ^a	102.36 \pm 58.48 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; c 为 $P < 0.05$ d 为 $P < 0.01$, 与右颈动脉粥样硬化狭窄组相比。

弹力及胶原纤维染色发现对照组中膜弹力纤维连续, 外膜可见少量胶原纤维; 右颈动脉粥样硬化狭窄组中膜弹力纤维较对照组有增加, 局部排列较紊乱, 外膜可见少量胶原纤维; 右颈动脉再狭窄组中膜弹力纤维减少, 排列紊乱、分散, 胶原纤维向中膜移行。

对外膜滋养血管 (vasa vasorum, VV) 观察发现对照组外膜滋养血管较少 (图 1A); 右颈动脉粥样

硬化狭窄组外膜可见少量增生滋养血管 (图 2); 右颈动脉再狭窄组滋养血管数量增加 (图 2)。

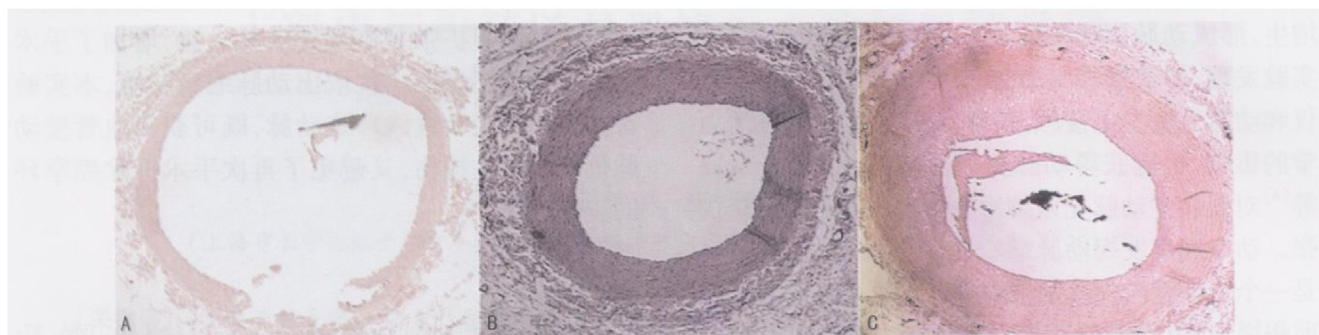


图 1. HE 染色观察各组颈动脉病变情况 (×5) A 为对照组, B 为右颈动脉粥样硬化狭窄组, C 为右颈动脉再狭窄组。

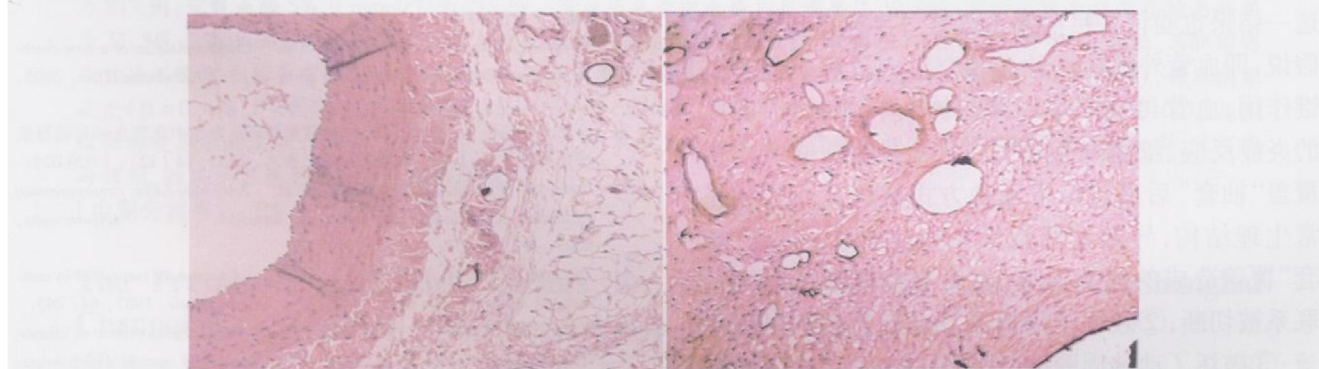


图 2. HE 染色观察右颈动脉粥样硬化狭窄组 (左) 和右颈动脉再狭窄组 (右) 颈动脉外膜滋养血管 (×40)

3 讨论

为了能更好研究血管再狭窄的病理生理机制, 探索抗血管再狭窄治疗方案, 以及评估一种新型腔内治疗设备是否安全、有效, 需要建立可靠的动脉再狭窄模型。用于构建动脉再狭窄模型的动物种类很多, 可供选择的有鼠、兔、狗和猪等, 靶血管有鼠颈动脉、腹主动脉, 兔颈动脉、髂动脉, 大型哺乳动物冠状动脉。动物成本上因大型动物价格较贵, 本实验未予采用。而靶血管方面, 腹主动脉、髂动脉和冠状动脉处理上需要借助于 DSA 造影设备, 对设备要求相对较高, 因此本实验选择颈动脉作为研究对象, 使实验操作变得简单。另外实验鼠和兔相比, 由于动脉粥样硬化性病变在啮齿类动物不容易发生, 且啮齿类动物缺乏胆固醇酯转移酶^[1], 无法通过高脂饮食获得动脉粥样硬化钙化斑块, 而兔体内存在这种酶, 因此可通过高脂饮食诱发动脉粥样硬化。其次鼠体型较小, 颈动脉首次或二次损伤时只能通过直径较小的顺应性低压球囊牵拉获得, 这与临床低顺应性球囊高压扩张引起的管壁损伤存在不小差异, 兔则

因颈动脉或髂动脉较粗, 可进行低顺应性球囊高压扩张。故对于研究球囊扩张后血管再狭窄, 选用兔要优于鼠。

为建立兔颈动脉再狭窄模型, 单纯高脂饮食 (2% 胆固醇 + 6% 花生油) 往往实验周期较长, 且病变部位难以预控, 故需要在高脂饮食基础上施以损伤血管手段, 诱导颈动脉内膜出现动脉粥样硬化性改变。常用机械方法有直接损伤动脉内膜, 如低顺应性球囊高压扩张、顺应性球囊低压动脉内皮剥离等, 也有采用空气干燥术、化学药物损伤局部内膜等^[2]。近来有学者通过在动脉外周套线或套环^[3-5]诱发动脉内膜向心性肥厚, 从而建立动脉狭窄模型。Yamasaki 等^[6]将这种通过影响血管外膜来建立动脉狭窄模型和传统造模方法进行了比较, 发现前者引起的血管内膜增生反应相对较弱, 增生速度也较慢。但由于动脉外膜覆盖的“袖套”可激发血管外膜及血管周围组织免疫排斥反应, 在此基础上进行二次球囊扩张将进一步激活管壁的炎症反应, 促进血管内膜增生和血管重塑。

目前尚未明确这种造模方法的原理。早期认为动脉管壁覆盖“袖套”引起血管收缩,造成血管急性血流动力学改变,从而导致血管内膜损伤,引起内膜增生,形成动脉粥样硬化性损伤^[7]。但 Booth 等^[8]实验发现,即使选择具有弹性的材料做“袖套”,且仅和动脉外壁发生接触,消除异物对动脉血流动力学的影响,也能获得动脉粥样硬化性狭窄。Jahnke 等^[4]对鼠腹主动脉先以缩窄环缩窄,然后行球囊扩张。动态观察发现动脉缩窄后细胞增殖、管壁增厚是一个由外壁向内壁发展的过程。最初表现为外膜面积增加,中膜面积减少,内膜中度增厚。第 3~7 天,外膜、中膜的细胞数量开始增加,至 14 天外膜、中膜细胞密度开始下降,而内膜细胞密度开始增加。二次损伤后外膜厚度进一步减小,内膜显著增生。这一结果也验证了目前关于血管再狭窄机制方面的假说,即血管外膜在动脉再狭窄形成过程中起着关键作用,血管再狭窄系一种“外向内 (outside-in)”的炎症反应、细胞增殖过程^[9-11]。在动脉壁节段性覆盖“袖套”后通过以下几种方式破坏了外膜的正常生理结构,导致动脉粥样硬化性损伤: ①由“袖套”覆盖造成的隔离区域,血管和血管周围环境的联系被切断; ②破坏了隔离区域动脉管壁的淋巴引流; ③破坏了动脉周围神经网络; ④破坏了隔离区动脉外膜滋养血管。其中外膜滋养血管结构的完整性对维持动脉管壁的正常结构尤为重要。实验发现破坏动脉外膜滋养血管可引起动脉粥样硬化性病理改变^[12]。当外膜滋养血管被破坏后,动脉中膜缺氧,可诱导分布于中膜外层的平滑肌细胞向内膜迁移,导致内膜增厚。

基于此,本实验选择了动脉缩窄建立动脉粥样硬化性损伤,而且该方法在具体操作上还具有以下两个优点: ①损伤定位准确,通过套线缩窄锚定了狭窄部位。②因对兔颈总动脉球囊扩张通常采用

颈外动脉入路,对颈总动脉球囊扩张后结扎颈外动脉。如果选择通过直接损伤颈总动脉内膜的方法建立颈动脉狭窄模型,就必须对颈外动脉进行修复,以便为二期球囊扩张提供颈外动脉入路,增加了手术的难度。为了避免二次取出动脉缩窄装置,本实验首次采用可吸收缝线环绕动脉,既可获得血管壁动脉粥样硬化性损伤,又避免了再次手术拆除缩窄环的步骤。

[参考文献]

- [1] Tall AR. Plasma lipid transfer proteins [J]. *J Lipid Res* 1986 **27**: 361-367.
- [2] Touchard AG, Schwartz RS. Preclinical restenosis models: challenges and successes [J]. *Toxicologic Pathology* 2006 **34**: 11-18.
- [3] Leidenfrost JE, Khan ME, Boc KP, et al. A model of primary atherosclerosis and post-angioplasty restenosis in mice [J]. *Am J Pathol* 2003 **163** (2): 773-778.
- [4] Jahnke T, Karbe U, Schafer FKW, et al. Characterization of a new double-injury restenosis model in the rat aorta [J]. *J Endovasc Ther* 2005 **12**: 318-331.
- [5] 金海燕, 冬毕华, 彭 旷, 等. 动脉粥样硬化发生中高脂血症与动脉狭窄的作用比较 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (12): 1 020-024.
- [6] Yamasaki M, Kawai J, Nakaoka T, et al. Adrenomedullin overexpression to inhibit cuff-induced arterial intimal formation [J]. *Hypertension* 2003 **41**: 302-307.
- [7] Hirosumi J, Namoto A, Ohkubo Y, et al. Inflammatory responses in cuff-induced atherosclerosis in rabbits [J]. *Atherosclerosis* 1987 **64**: 243.
- [8] Booth RFG, Martin JE, Honey AC, et al. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation [J]. *Atherosclerosis* 1989 **16**: 257-268.
- [9] Shi Y, O'Brien JE, Fard A, et al. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries [J]. *Circulation* 1996 **94**: 1 655-664.
- [10] Durand E, Mallat Z, Addad F, et al. Time courses of apoptosis and cell proliferation and their relationship to arterial remodeling and restenosis after angioplasty in an atherosclerotic rabbit model [J]. *J Am Coll Cardiol* 2002 **39**: 1 680-685.
- [11] Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries [J]. *Circulation* 1996 **93**: 2 178-187.
- [12] Barker SG, Talbot A, Cottam S, et al. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig [J]. *Arterioscler Thromb* 1993 **13**: 70-77.

(此文编辑 许雪梅)