

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-11-0868-05

小鼠下腔静脉移植模型的建立和改良

曹剑¹, 屈正¹, 杜杰², 王颖², 石洪涛²

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院心外科, 2. 北京市心肺血管疾病研究所, 北京市 100029)

[关键词] 动物模型; 移植; 移植物闭塞, 血管; 小鼠

[摘要] **目的** 建立异体下腔静脉移植于颈动脉的动物模型, 以模拟冠状动脉旁路移植术后静脉桥再狭窄的病理过程。**方法** 游离供体小鼠下腔静脉, 切断受体小鼠右颈总动脉, 实验组采用“袖套式”结扎吻合法、对照组采用缝合法将下腔静脉两端分别与颈总动脉断端行端端吻合。术后对比两组血管通畅情况, 于术后 1 周、2 周、4 周、6 周对实验组小鼠取材, 行 HE 染色及免疫组织化学染色观察桥血管病理变化情况。**结果** 实验组 1 例麻醉过量死亡, 手术完成即刻各吻合口均通畅, 无出血、狭窄及血管扭曲等情况。术后 2 例急性血栓形成, 手术平均耗时 46.0 ± 10.6 min; 对照组手术完成即刻 2 例近端吻合口出血死亡, 术后 2 例急性血栓形成, 手术平均耗时 68.0 ± 12.4 min; 后期静脉桥管壁逐渐增厚, 管腔逐渐狭窄, HE 染色及免疫组织化学染色显示中膜、内膜不同程度增生及炎症细胞浸润。**结论** 小鼠异体下腔静脉移植模型能真实反映冠状动脉旁路移植术后静脉桥狭窄的情况, 是进一步研究移植静脉内膜增生的理想模型。“袖套式”结扎吻合法建立小鼠下腔静脉移植模型, 较以经常用的吻合法时间短、出血少、通畅率高。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

Construction and Improvement of Inferior Vena Cava Vein Graft Model in Mouse

CAO Jian¹, QU Zheng¹, DU Jie², WANG Ying², and SHIHONG-TAO²

(1. Department of Cardiovascular Surgery, Anzhen Hospital Affiliated to China Capital Medical University; 2. Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Animals Model; Vein Graft; Graft Occlusion; Vascular; Mouse

[ABSTRACT] **Aim** To construct vein grafts restenosis model in the C57BL/6 mouse to mimic graft restenosis after coronary artery bypass grafting. **Methods** Under anesthesia the inferior Vena cava in mice was harvested and grafted into the carotid artery in “non-suturing sleeve pattern” with a cuff or in interrupted stitch. Patency of grafts was evaluated respectively. Animals were sacrificed at the 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 6 weeks postoperation, and the grafted tissue fragments were stained with HE and immunohistochemically. **Results** In the experimental group 1 mouse died due to overdosage of pentobarbital; all grafts were patent without distortion and leakage immediately after procedure and 2 grafts failed due to thrombosis; the average operation time was 46.0 ± 10.6 min. In the control group 2 mice died from hemorrhage immediately after procedure; 2 grafts failed due to thrombosis; the average operation time was 68.0 ± 12.4 min. Vessel wall thickening was observed and progressed gradually at the time of harvest, which resulted in growing narrow of graft lumen. Histological analysis demonstrated varying degrees of neointimal hyperplasia and inflammatory cells. **Conclusion** The inferior Vena cava vein graft model established by using sleeving which is more efficient and less leaky with higher graft patency when compared to interrupted stitch may be an ideal model for further study on the prevention of vein intimal hyperplasia after bypass grafting.

冠状动脉旁路移植术 (CABG) 是晚期冠心病的主要治疗方法, 自体大隐静脉是 CABG 术中最常用的旁路桥材料。然而, CABG 术后因内膜增生而导致的桥血管再狭窄使静脉桥的 10 年堵塞率达到 50%, 其中 60% 的患者需要再次手术以解除梗阻。随着我国 CABG 术的不断推广应用, 因静脉桥血管

狭窄或堵塞而再次就诊的病人也将逐渐增多。因此, 如何减轻或延缓 CABG 术后静脉桥再狭窄的发生、发展, 提高静脉桥的远期通畅率, 已成为心血管外科亟待解决的临床问题。本实验将小鼠下腔静脉与右侧颈总动脉行端端吻合, 以期建立一种与 CABG 术后静脉移植物再狭窄病理过程相似的动物模型, 为静脉移植物再狭窄的治疗提供实验基础。

[收稿日期] 2010-06-29 [修回日期] 2010-10-09

[作者简介] 曹剑, 研究方向为心功能衰竭的外科治疗, E-mail为 sword_cad@yahoo.cn。通讯作者屈正, 博士, 主任医师, 教授, 从事心功能衰竭外科治疗的研究, E-mail为 quzheng@yahoo.com。杜杰, 教授, 博士研究生导师, 从事压力对静脉桥再狭窄的研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

实验动物均为北京市心肺血管疾病研究所杜杰

实验室提供的 C57BL/6 小鼠, 共 54 只。实验组按取材时间 (1 周、2 周、4 周和 6 周) 随机分为 4 组 ($n = 10$ 或 12); 对照组为间断吻合合法组 ($n = 10$)。

1.2 仪器和设备

莱卡 (Leika) 手术显微镜, 显微外科手术器械, 8/0 丝线, Cuff (Portex, London, UK)。

1.3 模型建立

清洁级 C57BL/6 小鼠, 体重 20~30 g 雌雄不拘。用 1% 戊巴比妥那腹腔内注射麻醉 (0.1 mL/10 g)。仰卧位固定于手术平板, 充分暴露颈部皮肤。备皮后以 75% 酒精消毒术野, 取颈部正中切口, 上达下颌、下至胸骨上缘暴露小鼠唾液腺。在 Leika 手术显微镜下, 分离受体小鼠右侧唾液腺暴露右颈总动脉。分离唾液腺的过程中以钝性分离为主, 尽量避免损伤小血管, 减少出血。钝性分离右颈总动脉周围结缔组织, 过程中应充分游离近心端保证动脉长度, 远端游离至血管分叉处, 注意勿损伤伴行的静脉。充分游离动脉后, 用两根 8/0 丝线分别在血管中部结扎并从两个线结的中点剪断右颈总动脉。在执行这一步操作的过程中注意打结要紧, 避免牵拉血管时出现线结滑脱导致大出血; 两个线结之间的距离不宜过大。离段动脉后, 将近端和远端血管分别从由外径 0.65 mm、内径 0.5 mm 的尼龙管制成的 Cuff 中穿过。Cuff 在术前制备, 长度 1 mm, 尾端备有长约 1 mm 的手柄, 留作动脉夹的夹持固定部位。动脉头端应超出 Cuff 约 1 mm, 将 Cuff 手柄部和动脉用微动脉夹钳夹固定后, 减去血管头端线结, 将超出 Cuff 的动脉壁外翻套于 Cuff 外壁, 并分别用 8/0 丝线打结固定。操作过程中手法应轻柔, 打结不宜过紧, 起到固定作用即可, 避免 Cuff 变形导致的血流动力学异常 (图 1A-D)。

供体小鼠麻醉方法同前, 取腹部正中切口暴露下腔静脉, 钝性分离静脉周围脂肪组织和结缔组织。打开胸腔, 在小鼠右心房处作一切口后用 10 mL 注射器从左心室灌注肝素生理盐水, 浓度为 200 kU/L。待肝脏变白后, 取下横膈和心房段下腔静脉, 在远端保留部分心房组织以辨认近心端, 放入冰肝素生理盐水中保存待移植。

将下腔静脉近心端袖套状套于颈总动脉远端 Cuff 外壁、远心端套于颈总动脉近端 Cuff 外壁后用 8/0 丝线结扎固定 (图 1E)。应确保下腔静脉的线结在颈动脉线结的上方, 避免后者暴露于管腔导致急性血栓形成。去除动脉夹后, 应能观察到移植静脉及两端颈总动脉的搏动。若在恢复血流后移植静脉无搏动或在数分钟内搏动逐渐减弱, 则可能有血

凝块形成或近端血液流出口狭窄。一旦出现这种情况则标志手术失败。若移植静脉搏动良好, 则用 6/0 缝线间断缝合切口。完成整个手术一般需要约 1 h, 静脉离体时间应保持在 15 min 到 1 h。术后将小鼠置于暖水袋上保持体温至麻醉清醒。对照组按间断缝合的方法吻合下腔静脉和右颈总动脉, 其余处理与实验组相同。

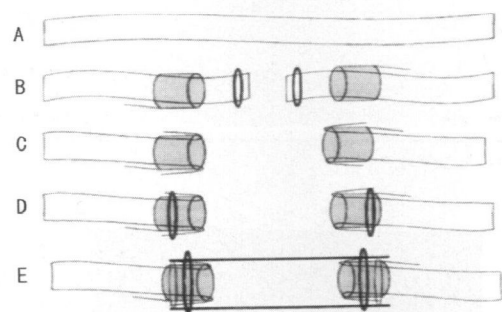


图 1. 下腔静脉与右颈总动脉的吻合方法

1.4 通畅率检查

术后第 3 天, 常规麻醉小鼠后, 剪开原颈部切口缝线, 观察静脉桥颜色及搏动情况。若桥血管颜色鲜红、搏动良好, 则表明手术成功; 若桥血管呈黑色或观察不到搏动, 则表明急性血栓形成, 手术失败。

1.5 组织学检查

术后根据不同时间点 (1 周、2 周、4 周、6 周) 分别取材。常规麻醉后, 沿正中线暴露腹腔及胸腔, 在小鼠右心房处作一切口, 用 10 mL 注射器从左心室灌注生理盐水 10~20 mL, 待肝脏变白后灌注 3 mL 多聚甲醛以固定桥血管。剪开颈部切口, 分别在近端及远端结扎线外侧剪断桥血管。镜下适当分离血管外壁结缔组织, 保留桥血管中段, 置于 4% 多聚甲醛中固定 1 h 后放入 20% 蔗糖溶液中 4℃ 保存。常规冰冻切片, 厚度 7 μm, 对不同时间点的所有组织切片行 HE 染色; 对术后 2 周及 6 周的组织切片行 Massion 染色, 巨噬细胞表面抗原 (macrophage-2, Mac-2)、α 平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA) 及肿瘤坏死因子 β (tumor necrosis factor-β, TNF-β) 免疫组织化学染色。

2 结果

2.1 血管通畅情况

实验过程中实验组 1 例麻醉过量死亡, 手术完成即刻各吻合口均通畅, 无出血、狭窄及血管扭曲等情况; 术后 2 例急性血栓形成, 取材时见血管为黑色

(图 2 A); 余无血栓形成, 血管颜色及搏动良好 (图 2 B)。对照组手术完成即刻 2 例近端吻合口出血死

亡; 术后 2 例急性血栓形成 (表 1)。

表 1. “袖套式”吻合法与间断缝合法对比

| 指 标 | 袖套法 1 周组 | 袖套法 2 周组 | 袖套法 4 周组 | 袖套法 6 周组 | 缝合法组 |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------|
| 样本量 (只) | 10 (5 对) | 12 (6 对) | 10 (5 对) | 12 (6 对) | 10 (5 对) |
| 吻合口出血 (例) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 急性血栓 (例) | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| 死亡 (例) | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 通畅率 | 100% ^a | 83.3% ^a | 80% ^a | 100% ^a | 66.7% |
| 手术耗时 (min) | 47.0 ± 8.8 ^a | 42.0 ± 10.4 ^a | 49.0 ± 11.1 ^a | 44.0 ± 6.9 ^a | 68.0 ± 12.4 |

a 为 < 0.05 与缝合法组相比。

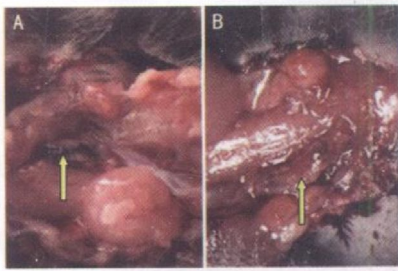


图 2 术后 3 天桥血管通畅检查

2.2 病理学检查

HE 染色显示正常小鼠下腔静脉管壁很薄, 内膜仅为单层内皮细胞, 附着在血管外膜的是疏松纤维组织。实验组术后内膜增生逐渐加重, 管壁逐渐增厚, 增生细胞以平滑肌细胞为主, 同时伴有细胞外基质沉积、胶原增多及炎症细胞浸润 (图 3)。

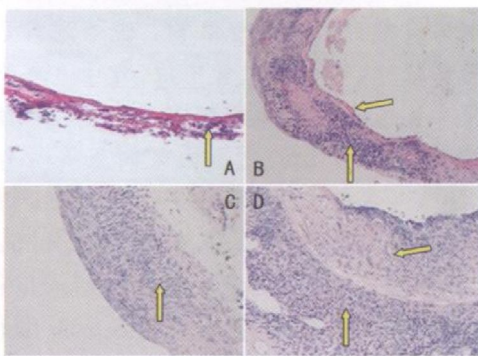


图 3 术后不同时间静脉桥病理切片 HE 染色照片 (100 ×)

A 为术后 1 周组, 血管壁薄, 中层平滑肌增生尚不显著但可见大量炎症细胞黏附于中膜; B 为术后 2 周组, 中层平滑肌可见增生以及大量炎症细胞浸润其中, 内膜可见增厚; C 为术后 4 周组, 中层平滑肌可见进一步增生, 内膜不均匀增厚; D 为术后 6 周组, 平滑肌显著增生, 内膜明显增厚, 管腔显著狭窄, 炎症细胞大量浸润。

对术后 2 周及 6 周的组织切片行 Massion 染色, 可见管壁中层绿色胶原纤维大量增生 (图 4)。

免疫组织化学染色对比分析术后 2 周、6 周组织切片 Mac-2 (点状棕色区域)、TNF-β (点状棕色区域) 及 α-SMA (长条状棕色区域) 表达, 可见 6 周后桥血管壁 Mac-2 表达多于术后 2 周, TNF-β 主要表达于血管外膜, 且 6 周后桥血管外膜 TNF-β 表达多于术后 2 周, 表明随着术后时间的不同上述反应静脉桥炎症及增生情况的蛋白及分子表达有明显差异 (图 5)。

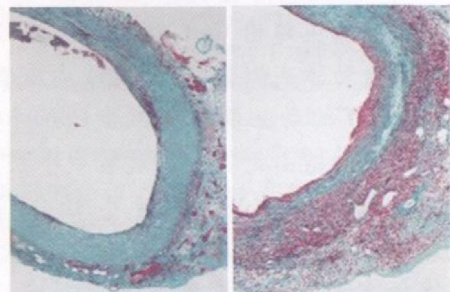


图 4 术后 2 周 (左)、6 周 (右) 静脉桥病理切片 Massion 染色照片 (50 ×)

3 讨论

冠状动脉旁路移植 (CABG) 手术于 20 世纪 60 年代出现, 经过几十年的发展, 已成为冠心病治疗的常规手术之一, 然而术后相当一部分患者出现静脉血管桥再狭窄, 有报道术后 1 年 15% 的桥管会发生堵塞, 然后每年以 1% ~ 4% 的速率递增, 至术后 10 年仅有 60% 的桥管保持通畅, 大大降低了手术的成功率^[1]。静脉桥再狭窄的发生主要与手术创伤、移

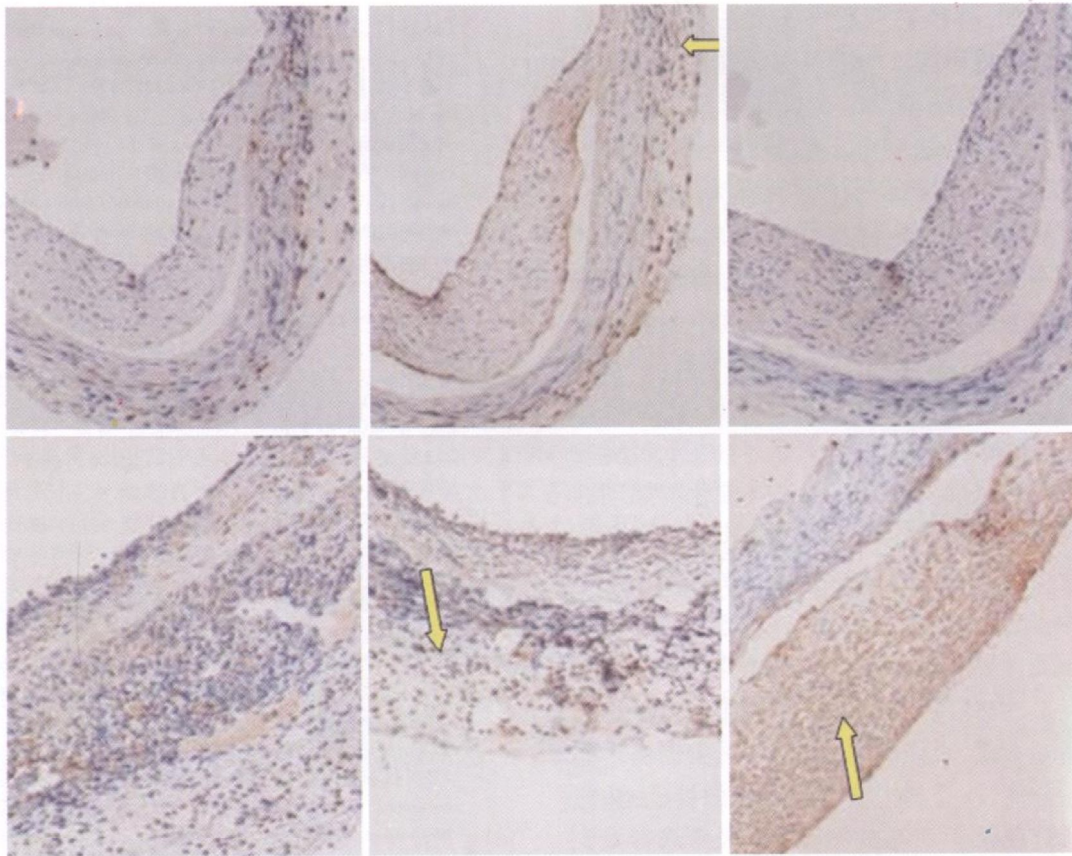


图 5 术后 2 周(上)和 6 周(下)静脉桥病理切片 Mac-2(左)、TNF- β (中)及 α -SMA(右)免疫组织化学染色照片(200 \times)

植血管缺血及血流动力学改变等有关。它包括 3 个不同但相互延续的病理过程,即局部血栓形成、新生内膜形成及晚期的血管粥样硬化改变。其中新生内膜形成是导致再狭窄的主要原因^[2]。其治疗主要包括药物治疗、基因治疗、血管外支架、放射治疗及其他一些方法^[3-6]。最近几十年针对这种疾病出现了很多新的治疗方法,包括抑制炎症反应、抑制平滑肌细胞增殖和迁移、内皮祖细胞治疗等^[7-10],但是很多实验室的研究成果仍没有在临床上得以实施。

1996 年 W esterband 及其同事^[11]报道,将搭桥术后发生病变的大隐静脉桥血管组织切片后行 HE 染色发现,所有病变的静脉桥内膜及中膜严重增生,管腔完全闭塞或大于 90% 闭塞;行巨噬细胞表面标志物 CD68、单核细胞表面标志物 CD45 及 α -SMA 免疫组织化学染色分析发现在静脉壁中层和内层均有三者的大量表达并随时间进展加重,初步表明静脉桥再狭窄的过程与炎症反应密不可分。此后 N kol 等^[12]同样以搭桥术后患者再狭窄的静脉桥为实验对象进行了相关研究,证实了 W esterband 的实验结果。在本实验中,术后静脉桥血管壁中膜、内膜增生及管腔狭窄程度随时间推移而加重;反映血管壁炎

症及增生程度的 Mac-2、TNF- β 及 α -SMA 的表达也随时间推移而增加,提示桥血管炎症反应逐步加重。这都与人体冠状动脉搭桥术后静脉桥血管的病变过程一致,此外本模型将小鼠下腔静脉移植于右颈总动脉,静脉壁所受的机械牵张力及血流剪切力增加,这也与冠状动脉搭桥术后大隐静脉的血流动力学变化一致,因此本模型能较为准确地模拟冠状动脉搭桥术后静脉桥的病理生理变化过程,是研究移植术后再狭窄的重要手段,既可以研究静脉桥的病理变化、发病机制,又可以用于检验干预措施是否有效^[13]。目前研究血管桥再狭窄的动物模型有大动物如猪、犬,也有小动物如大鼠、小鼠等^[14-17];有自体颈外静脉、异体颈静脉和下腔静脉三种类型的静脉可供移植。大动物操作相对简单,但价格昂贵,成本高。小动物价格便宜,易于饲养及麻醉管理,但由于其血管直径较小,吻合操作困难,常因吻合技术不过关造成血管损伤、狭窄和血栓形成,导致术后桥管堵塞,模型成功率低,并影响结果判读。本实验使用 C57BL/6 小鼠作为下腔静脉移植物的供体和受体,其优势在于遗传背景清晰、在高脂饮食条件下易形成粥样硬化斑块且目前应用的多种转基因及基因敲

除小鼠都以其为遗传背景,具有较高的科研价值。

有研究表明,移植物早期再狭窄主要是吻合技术问题 and 血栓形成引起。因此改善静脉移植模型手术操作、提高近期通畅率及减少操作对结果的影响十分必要。传统缝合法吻合下腔静脉与颈动脉时,由于血管直径较小,对吻合操作的要求高,不仅建立模型所需时间较长而且常常容易出现吻合口漏或吻合口狭窄。本实验采用“袖套式”结扎吻合的方法建立小鼠下腔静脉移植模型,避开了微小血管缝合的技术瓶颈,具有时间短、出血少、通畅率高的特点。本模型成功建立的要点及改进之处还有:分离血管前腹腔注射肝素,减少血栓形成。④由于对静脉的任何损伤或牵拉都可能是血管粥样硬化的始动因子,故为避免影响实验结果,在手术操作过程中应注意尽量避免镊子或其他器械与静脉内膜直接接触以及对下腔静脉的直接钳夹或牵拉。分离下腔静脉时采用钝性分离,尽量减少对血管外膜的损伤,冲洗管腔时动作轻柔,以免损伤内膜。④分离颈动脉时不需切断胸锁乳突肌,只需用粗线牵引,减少创伤。同样采用钝性分离,注意勿损伤与之伴行的神经,注意保持颈动脉合理长度以免吻合后产生张力或者太长导致桥血管成角引起出血或血栓形成。取供体下腔静脉时,近心端应保留部分心房组织,这样吻合时利于辨认,保证下腔静脉血流方向与术前一致,避免血流方向改变对实验产生影响。应确保下腔静脉的线结在颈动脉线结的上方,避免后者暴露于管腔导致急性血栓形成。吻合时带线需松紧适度,线太紧开放后容易狭窄,太松又会漏血。同时要保证动、静脉端都要带到,以免撕脱引起出血。

[参考文献]

- [1] Parang P, Aroa R. Coronary vein graft disease pathogenesis and prevention [J]. *Can J Cardiol* 2009 **25** (2): 57-62
- [2] R Bichini F, Pugno F, Ferrero V, et al. Long-term histological and immunohistochemical findings in human venous aorto-coronary bypass grafts [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008 **114** (3): 211-220
- [3] Guo MK, Zhang Q, Chen ZF, et al. The effects of the autologous venous external stents on intimal hyperplasia of the vein grafts in rabbits [J]. *Zhonghua WaiKe Za Zhi* 2010 **48** (2): 138-141.
- [4] Dindyal S, Woodbum KR. Changing practice from conventional surgery to endovenous treatments produces excellent results for both long and short saphenous varicose veins [J]. *Ann R Coll Surg Engl* 2010 **92** (1): 87.
- [5] Bhargava S, Roy H, Yla-Herttuala S. Gene therapy to prevent occlusion of venous bypass grafts [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008 **6** (5): 641-652
- [6] Schachner T. Pharmacologic inhibition of vein graft neointimal hyperplasia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006 **131** (5): 1065-072
- [7] Sroka R, Weik K, Sadeghi-Azandaryani M, et al. Endovenous laser therapy-application studies and latest investigations [J]. *J Biophotonics* 2010 **3** (5-6): 269-276
- [8] Eefting D, de Vries MR, Grimbergen M, et al. In vivo suppression of vein graft disease by nonviral electroporation-mediated gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 linked to the amino terminal fragment of urokinase (TMP-1 ATF), a cell-surface directed matrix metalloproteinase inhibitor [J]. *J Vasc Surg* 2010 **51** (2): 429-437.
- [9] Desai M, Mirzay-Razzaz J, von Delft D, et al. Inhibition of neointimal formation and hyperplasia in vein grafts by external stent/sheath [J]. *Vasc Med* 2010 **15** (4): 287-297.
- [10] Jia G, Mitra AK, Gangahar DM, et al. Regulation of cell cycle entry by PTEN in smooth muscle cell proliferation of human coronary artery bypass conduits [J]. *J Cell Mol Med* 2009 **13** (3): 547-554
- [11] Westerband A, Mills JL, Marek JM, et al. Immunocytochemical determination of cell type and proliferation rate in human vein graft stenoses [J]. *J Vasc Surg* 1997 **25** (1): 64-73
- [12] Nikolic S, Huehns TY, Weir L, et al. Restenosis in human vein bypass grafts [J]. *Atherosclerosis* 1998 **139** (1): 31-39
- [13] Schachner T, Laufer G and Bonatti J. In vivo (animal) models of vein graft disease [J]. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006 **30** (3): 451-463
- [14] 刘苏健, 邓勇志, 马捷. 大鼠血管移植模型的建立及改进 [J]. *山西医科大学学报*, 2007, (10): 955-957.
- [15] 陈宏林, 尤庆生, 沈卫东, 等. 冠状动脉旁路术后静脉桥狭窄模型的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, (03): 139-141.
- [16] Zou Y, Dietrich H, Hu Y, et al. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis [J]. *Am J Pathol* 1998 **153** (4): 1301-310
- [17] 苏刚, 孙全全, 董念国, 等. 大鼠自体移植静脉内膜增生模型的改进 [J]. *华南国防医学杂志*, 2006 (06): 10-12

(此文编辑 许雪梅)