

颈动脉粥样硬化兔造模的常用方法

王敏 综述, 崔可飞 审校

(郑州大学第一附属医院超声科, 河南省郑州市 450000)

[关键词] 颈动脉狭窄; 动脉粥样硬化; 兔; 动物模型

[摘要] 兔颈动脉粥样硬化狭窄模型制备的方法很多, 包括内膜空气干燥法、球囊损伤法、颈总动脉套环法、直流电刺激颈动脉外膜法、幽门螺杆菌感染法、显微缝合法、放射处理法、液氮损伤法、化学烧灼法等, 不同的造模方式颈动脉粥样硬化狭窄形成的机制及病理特点各不相同。本文重点介绍颈动脉粥样硬化兔模型的制作方法及其优、缺点。

[中图分类号] R332

[文献标识码] A

Commonly Used Methods to Build Carotid Atherosclerosis Models of Rabbits

WANG Min, and CUI Ke-Fei

(Department of Sonography, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China)

[KEY WORDS] Stenosis of Carotid Artery; Atherosclerosis; Rabbit; Animal Models

[ABSTRACT] There are many methods to build carotid atherosclerosis models of rabbits. For example, air drying, balloon injury, silicone collar, electrical stimuli, microsurgical suture, Helicobacter pylori infection, radiation treatment, liquid nitrogen damage method, chemical burning method, etc. Different ways of building carotid atherosclerotic stenosis have different mechanism and pathological characteristics. This article focuses on the methods of making the carotid atherosclerotic models and their advantages and disadvantages.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是导致颈动脉狭窄的重要因素,颈动脉粥样硬化斑块形成是缺血性中风和短暂性脑缺血发作的主要原因之一,随着对颈As的发病机制及预防、治疗方面研究的不断深入,迫切需要建立一种As模型。由于伦理道德的限制,难以开展正常人颈动脉粥样硬化的实验和其他科学研究。因此建立一种简便易行、便于重复并且能较好地重现人类颈动脉粥样硬化斑块性狭窄的发生、发展病理变化的动物模型很有必要。

兔为最早用于复制动脉粥样硬化模型的动物,1908年Ignatowski^[1]用牛奶、肉和蛋黄喂养兔来诱导动脉粥样硬化为首报道,之后用胆固醇饲料喂养兔诱导动脉粥样硬化成为经典方法^[2]。以往研究发现,兔在脂代谢方面与人类有一些相似之处^[3],兔与人的血浆都具有胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)活性,载脂

蛋白B的编码部位都在肝脏,载脂蛋白B都只存在于乳糜微粒中,体内脂蛋白成分都以低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)为主,而肝脏低密度脂蛋白受体表达都较低,血浆中富含胆固醇酯转运蛋白,而CETP在As发生和发展中起重要的作用^[4]。另外,兔对外源性胆固醇吸收率高(75%~90%),在进食高脂饲料后,短时间内可形成高胆固醇血症,容易产生动脉粥样硬化斑块。兔的这些特性使之成为复制动脉粥样硬化模型最广泛的动物。

1 高脂饮食 + 内膜空气干燥法

1982年,Leveen等^[5]首次报告了隔离的动脉段气体干燥损伤加高脂喂养复制动脉粥样硬化病变,所选的血管为兔的股动脉,现此法同样适用于颈动脉粥样硬化模型的制作。干燥的气流直接风吹血

[收稿日期] 2014-03-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81371583)

[作者简介] 王敏,在读硕士研究生,研究方向为超声浅表器官,E-mail为877892495@qq.com。通讯作者崔可飞,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为超声浅表器官,E-mail为cuikefei2010@126.com。

管内膜,造成内皮细胞功能障碍和变性。损伤当时并不立即造成内皮细胞剥脱,而是在术后 24 ~ 72 h 内逐渐变性、坏死、脱落,中膜损伤相对轻微,术后内膜增生明显,附加高脂饲料喂养 2 个月基本成模^[6]。具体步骤为:动物术前 12 h 禁食,不禁水。在严格无菌条件下,麻醉动物,颈部脱毛清洁消毒后,作颈正中切口,于甲状软骨上方水平分离右侧颈总动脉,长约 2.5 cm,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,接上已调节好流量的气流(80 ~ 250 mL/min),一定时间(5 ~ 15 min)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。缝合皮肤创口并包扎。术前术后均无需使用抗生素。文献^[7-15]中各位学者使用的高脂饲料成分为 1.5% 或 2% 胆固醇、2% 或 6% 花生油,另可加适量甲硫氨酸等,而气体流速、时间则不太一致。

该法损伤相对轻柔,由于干燥的气流直接风吹血管内膜,所以损伤最严重的是内膜,中膜损伤相对轻微。内皮细胞的修复与内膜的增殖过程更接近颈动脉疾病的生理过程。由于隔离血管段的长度可以准确掌握,干燥气体的流速、时间可以精确控制,因而损伤程度可保持相对恒定,内膜增殖程度和内膜、中膜中细胞的增殖程度易于量化,可重复性好,操作简便,易于确定损伤部位。但要注意控制好气体流量和时间,气体流量过大、时间过长对内膜损伤较重,会引发血管阻塞;反之,内皮损伤则较轻,不足以引起动脉粥样硬化性狭窄。

2 高脂饮食 + 球囊损伤法

1980 年 Block 等报道了血管成形术后家兔动脉形态学的变化,此法成为复制动脉粥样硬化再狭窄模型的经典方法。具体步骤为:实验动物术前 12 h 禁食,不禁水,麻醉后从耳缘静脉给予肝素 200 U/kg,仰面固定,颈部脱毛清洁消毒后,沿颈部正中切开皮肤 5.0 cm 左右,暴露并游离一侧颈总动脉 3.0 ~ 4.0 cm,并于甲状软骨上方水平分离右侧颈内、外动脉,分别用动脉夹临时夹闭颈总动脉近心端及颈内动脉,颈外动脉远心端结扎,近心端用线提起,距颈内、外动脉分叉点 0.5 cm 约 45 度角“V”形剪开颈外动脉,逆行插入球囊约 5.0 cm,连接手推式压力泵,注入适量肝素生理盐水(以回拉稍有阻力为宜),自近心端缓慢回拉,反复 3 次后撤出导管。结

扎右颈外动脉近心端,使右颈总、颈内动脉恢复血流,缝合皮肤。术后连续 3 天每日肌注青霉素 80 万单位。球囊损伤术后高脂饮食 8 周即可形成 As 病变。例如 Okabe 等^[16]使用的是 2.75 mm 经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty,PTCA)球囊导管,扩张为 6 个大气压,损伤 3 次,其研究发现:病变要形成富含平滑肌细胞的纤维帽(类似于人的动脉斑块),球囊损伤后的正常饮食(4 周)是必要的,4 周正常饮食后再给予 0 ~ 8 周高脂饮食,会出现不同程度的内膜增厚。国内各位学者使用的球囊大小和充盈程度略有不同^[17-21],其中叶炳华等^[19]通过比较不同大小球囊对建立兔颈动脉粥样硬化模型成功率的影响而得出球囊与血管直径之比应以略小于 1.5:1(1.3 ~ 1.4:1)为宜。

球囊损伤后,血管内皮细胞损伤、功能障碍,血液循环中的单核细胞侵入动脉壁,演变为巨噬细胞,吞噬沉积于管壁的脂质,形成泡沫细胞,血管内皮的完整性遭到破坏后,局部炎症反应加重,炎症细胞聚集,内皮细胞本身还会根据血管环境合成平滑肌细胞生长促进因子,使平滑肌细胞迁移、增殖,细胞外基质合成增多,内膜增厚,因此高脂饮食联合球囊损伤加速了 As 病变的进程。由于该法使用不当可造成较严重的内弹力板及中膜损伤,并存在一定的血管闭塞率,因此要把握好球囊直径的大小、扩张的程度及反复牵拉的速度。

3 高脂饮食 + 颈总动脉套环法

1989 年,Booth 等^[22]报道在高脂饮食兔的颈动脉外膜植入硅橡胶圈,由于血管外膜的功能障碍,7 天即可形成局部缺血区,其特点类似于人类动脉粥样硬化早期病变。该法后被应用于颈动脉 As 造模方式。具体步骤为:动物术前 12 h 禁食,不禁水,麻醉后仰面固定,脱毛消毒后在颈部做一正中切口,分离双侧颈总动脉,将一个无生物活性的、柔软的、空心的硅橡胶圈放置于一侧颈动脉周围(另一侧作为对照)诱导动脉内膜增厚,硅橡胶圈放置的动脉段被认为是动脉粥样硬化斑块形成的好发区域,后高脂饮食约 2 周即可形成 As 病变。文献^[23-27]中各位学者的方法略有不同。其中刘恒方等^[26]使用了改良的硅橡胶圈,其部分外侧壁被纵向去除,使之密闭程度分别为 25%、50%、75%、100%,并设置正常饮食及高脂饮食;其结论为:硅橡胶圈接触血

管长度 5 mm 为最佳,既有人为性狭窄又不阻断血流,损伤后高胆固醇饲养 2 周即可建立粥样硬化性颈动脉狭窄动物模型。金海燕等^[27]应用了两种内径大小不同的硅胶套环,1.2 mm 的小环套于左侧颈总动脉,确保套环处血管狭窄但仍有血流通过,不造成血管闭合,1.5 mm 的大环套于右侧颈总动脉,没有狭窄,血流通畅,双侧互相对照,高脂组与正常饮食组互相对照;其结论为:动脉狭窄时的血流动力学变化,可以不依赖于高脂血症而诱发动脉粥样硬化病变,狭窄血管远心处血流动力学变化更具促进病变形作用。

血管套环使颈动脉狭窄,造成局部血流动力学变化以“锚定”动脉粥样硬化病变形成的部位,逐渐导致血管滋养管闭塞,血管周围神经网络破坏,血管扭曲,血流速度改变,动脉套环的机械刺激可引发血管局部的炎症反应,特别是动脉外膜炎症可促进动脉斑块形成,再加上高脂饮食脂质在血管壁的沉积,模拟了人类 As 的形成过程。该法具有造模时间短、成模快、操作简单、无需血管壁的外科损伤、程度可控、术后动物管理相对容易的优点,不足之处在于这种途径与人类的颈动脉粥样硬化狭窄在形成过程上明显不同。

4 高脂饮食 + 直流电刺激颈动脉外膜法

1979 年, Schlote^[28]应用此法造模。具体步骤为:动物术前 12 h 禁食,不禁水,麻醉后仰卧固定,颈部备皮、消毒,沿气管正中切开皮肤,游离颈总动脉,将一个 8 mm 长、0.1 mm 厚的聚四氟乙烯制成的管套宽松的安放在一侧颈总动脉(保持宽松是为了使血管有足够的空间搏动,不至于限制血液的流动),管套上有两个金电极,在血管上正好处于相对的位置,这种设计可以使血管壁接受透壁的电刺激,每天刺激 0.5 h × 1 次或 2 次,1 ms/imp,10 ~ 15 Hz,1.5 ~ 3.0 mA,同时给予 2% 胆固醇饮食,持续 4 ~ 6 周;刺激部位平滑肌细胞增生,最大的粥样硬化斑块位置位于刺激电极的阳极下方。Chiesa 等^[29]分离兔颈总动脉后,沿垂直于血管长轴的动脉夹施加电流刺激(150 mA,1 ~ 2 s),后 1.5% 胆固醇高脂饲料喂养 3 个月,即可形成动脉粥样硬化软斑。李秋梅等^[30]调整电流为 1.2 ~ 1.5 mA,刺激 10 ~ 15 min,术后第 2 天开始饲喂高脂饲料,6 周后可造模成功。

电刺激血栓形成仅刺激血管造成家兔颈动脉

内膜损伤,加上高脂饮食 4 ~ 6 周造成动物高脂血症,形成了电刺激血管段特有的局限性动脉粥样硬化斑块,随着时间的延长,斑块发展致管腔狭窄。本方法符合动脉粥样硬化形成的损伤及脂质浸润学说,模拟了人类动脉粥样硬化的形成过程,避免了血管的切口,不影响正常的血运。不足之处为本方法形成的动脉粥样硬化斑块成分与临床上人的粥样硬化斑块成分是否相似,尚需进一步研究证实。

5 幽门螺杆菌感染法

2000 年, Farsak 等^[31]对人的动脉(冠状动脉、颈内动脉、腹主动脉)粥样硬化斑块进行了研究,用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术检测幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp) DNA,发现 37% 的人动脉粥样硬化斑块处有 Hp DNA,而正常对照组则无 1 例;他们认为 Hp 在 As 的发病机理中有重要的意义,尤其是在 Hp 感染流行的区域,以及用传统高危因素无法解释的高发动脉粥样硬化病变。北曼哈顿研究历时 7 年研究结果显示, Hp 等微生物的感染可引起患者颈内动脉斑块厚度的增加,导致斑块易损性增加,从而导致缺血性卒中的发生^[32]。Rožankovič 等^[33]的研究则认为, Hp 细胞毒素相关基因 A(cytotoxic-associated gene A, CagA)可能在颈动脉粥样硬化的发展过程中引发自身免疫反应,并增加颈动脉粥样硬化斑块的易损性。陶珍等^[34]通过酶联免疫吸附试验检测颈动脉粥样硬化斑块内幽门螺杆菌-细胞毒素相关蛋白 A(Hp-CagA)-IgG 抗体的浓度,得出斑块内 Hp-CagA-IgG 抗体表达的增高可能通过影响斑块的稳定性,导致颈动脉粥样硬化性脑梗死的发生,并成功用 Hp 感染建立了兔颈动脉粥样硬化^[35];具体步骤:先高脂喂养 6 周,经兔耳缘静脉注射 Hp 标准菌株 0.5 mL[4×10^8 CFU; CFU: 菌落形成单位(colony-forming unit)],每间隔 24 h 注射 1 次,连续 3 次,对照组以等量生理盐水同样处理,继续高脂饮食喂养,实验第 8 周时造模成功;本研究在高脂血症基础上通过 Hp 感染建立的兔颈动脉粥样硬化模型,从发病机制的角度使动物模型与临床实际更为接近,进一步验证了 Hp 感染和颈动脉粥样硬化的相关性。不足之处在于本方法是否会引起全身血管的动脉粥样硬化,还有待进一步研究。

目前研究表明, Hp 感染机体后可通过炎症反应、氧化应激、内皮功能障碍和免疫反应等多种途

径引起与动脉粥样硬化相关的因子增高,从而促进动脉粥样硬化的发生和进展^[36-41]。

6 结 语

此外,还有显微缝合法、放射处理法、液氮损伤法、化学烧灼法等。目前比较常用的方法为内膜空气干燥法及球囊损伤法,前者要控制好气体流量和时间,后者要把握好球囊直径的大小、扩张的程度及反复牵拉的速度。动脉粥样硬化模型制作方法较多,只要方法、步骤得当,就可以成功造模。随着各种前沿技术的发展,在动物身上更精确的复制人类动脉粥样硬化将成为可能。

[参考文献]

[1] Ignatowski AC. Influence of animal food on the organism of rabbits[J]. ST Petersburg Izvest Imp Voyenno-Med Akad, 1908, 16: 154-176.

[2] Dornas WC, Oliveira TT, Augusto LEF, et al. Experimental atherosclerosis in rabbits[J]. Arquivos Brasileiros De Cardiologia, 2010, 95(2): 272-278.

[3] 赵瑾,迟路湘. 颈动脉粥样硬化兔模型的建立[J]. 中国脑血管病杂志, 2006, 2(11): 522-524.

[4] Nagashima M, McLean JW, Lawn RM. Cloning and mRNA tissue distribution of rabbit cholesteryl ester transfer protein[J]. Journal of Lipid Research, 1988, 29(12): 1643-649.

[5] Leveen RF, WOLF GL, Villanueva TG. New rabbit atherosclerosis model for the investigation of transluminal angioplasty [J]. Investigative Radiology, 1982, 17(5): 470-475.

[6] Chen X, Ren S, Ma MG, et al. Hirulog-like peptide reduces restenosis and expression of tissue factor and transforming growth factor- β in carotid artery of atherosclerotic rabbits[J]. Atherosclerosis, 2003, 169(1): 31-40.

[7] Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening [J]. Laboratory Investigation, 1975, 32(3): 339-351.

[8] 王国栋,褚现明,郭英华,等. 全反式维甲酸对兔颈动脉粥样硬化性狭窄中平滑肌细胞凋亡及其机制的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2006, 5(1): 418-420.

[9] 徐永革,周定标,郑集义,等. 颈动脉粥样硬化性狭窄动物模型的建立[J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19(4): 255-258.

[10] 张磊,陈国荣,郑荣远,等. 高脂饲料加空气干燥术建立兔颈动脉粥样硬化模型[J]. 中国动脉硬化杂志,

2001, 9(2): 155-158.

[11] 赵瑾,迟路湘,陈德英. 基质金属蛋白酶2在兔颈动脉内膜损伤后动脉粥样硬化斑块中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(8): 792-794.

[12] 成勇,帅杰,李朝武,等. 家兔不同类型颈动脉斑块中基质金属蛋白酶2表达的形态学研究[J]. 中华神经医学杂志, 2008, 6(12): 1232-235.

[13] 艾志兵,何国厚,李承晏,等. 家兔颈动脉粥样硬化模型的建立[J]. 卒中与神经疾病, 2005, 12(2): 96-99.

[14] 沈长银,石蓓,赵然尊,等. 兔颈动脉粥样硬化狭窄动物模型的建立及病理学评价[J]. 遵义医学院学报, 2008, 31(4): 345-348.

[15] 沈长银,石蓓,赵然尊,等. 兔颈动脉粥样硬化狭窄动物模型的制备[J]. 四川大学学报(医学版), 2009, 40(5): 923-926.

[16] Okabe T, Hoshiga M, Negoro N, et al. Rabbit plaque models closely resembling lesions in human coronary artery disease[J]. International Journal of Cardiology, 2011, 147(2): 271-277.

[17] 李树荣. 兔颈动脉粥样硬化斑块的MRI研究[D]. 广州: 中山大学, 2008; 7-9.

[18] 李永秋,徐明,姚绍鑫,等. 实验性家兔颈动脉球囊扩张动脉狭窄动物模型的建立[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(3): 263-266.

[19] 叶炳华,管耘园,卢辉和,等. 不同大小球囊损伤术加高脂饲料建立兔颈动脉粥样硬化模型的比较[J]. 南通大学学报(医学版), 2006, 26(4): 244-246.

[20] 石蓓,刘志江,赵然尊,等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心脏功能及损伤血管再狭窄的影响[J]. 中华医学杂志, 2011, 91(32): 2269-273.

[21] 卢静,廖祁伟,尹淇,等. 两种动脉粥样硬化兔模型制作方法的比较[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(8): 96-99.

[22] Booth RFG, Martin JF, Honey AC, et al. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation[J]. Atherosclerosis, 1989, 76(2): 257-268.

[23] Soma MR, Donetti E, Parolini C, et al. Recombinant apolipoprotein AI milano dimer inhibits carotid intimal thickening induced by perivascular manipulation in rabbits[J]. Circulation Research, 1995, 76(3): 405-411.

[24] De Meyer GRY, Van Put DJM, Kockx MM, et al. Possible mechanisms of collar-induced intimal thickening[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997, 17(10): 1924-930.

[25] Scott TM, Honey AC, Martin JF, et al. Perivascular innervation is lost in experimental atherosclerosis[J]. Cardioscience, 1992, 3(3): 145-153.

[26] 刘恒方,李新华,杨期东,等. 改良硅橡胶圈加高胆固醇

- 醇喂养诱导颈动脉狭窄兔模型的建立[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10(1): 17-19.
- [27] 金海燕, 冬毕华, 彭旷, 等. 动脉粥样硬化发生中血脂血症与动脉狭窄的作用比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 14(12): 1 020-024.
- [28] Schlote W. Responses of vessel walls to chronically applied electrical stimuli[J]. *Basic Research in Cardiology*, 1979, 74(1): 10-20.
- [29] Chiesa G, Di Mario C, Colombo N, et al. Development of a lipid-rich, soft plaque in rabbits, monitored by histology and intravascular ultrasound[J]. *Atherosclerosis*, 2001, 156(2): 277-287.
- [30] 李秋梅, 王硕仁, 赵明镜, 等. 家兔新型动脉粥样硬化狭窄模型的建立及其动态观察[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(1): 25-28.
- [31] Farsak B, Yildirim A, Akyön Y, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae and Helicobacter pylori DNA in human atherosclerotic plaques by PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(12): 4 408-411.
- [32] Elkind MSV, Luna JM, Moon YP, et al. Infectious burden and carotid plaque thickness: the Northern Manhattan study[J]. *Stroke*, 2010, 41(3): e117-e122.
- [33] Rožankovič PB, Huzjan AL, Čupič H, et al. Influence of CagA-positive Helicobacter pylori strains on atherosclerotic carotid disease[J]. *Journal of Neurology*, 2011, 258(5): 753-761.
- [34] 陶珍, 曲乐丰, 丁素菊, 等. 颈动脉粥样硬化斑块内幽门螺杆菌-细胞毒素相关蛋白 A-IgG 抗体的表达与颈动脉粥样硬化性脑梗死的关系[J]. 上海医学, 2009, 32(4): 296-298.
- [35] 陶珍, 曲乐丰, 丁素菊, 等. 幽门螺杆菌感染致兔颈动脉粥样硬化模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2010(1): 37-41.
- [36] Kebapcilar L, Bilgir O, Cetinkaya E, et al. The effect of Helicobacter pylori eradication on macrophage migration inhibitory factor, C-reactive protein and fetuin-A levels [J]. *Clinics*, 2010, 65(8): 799-802.
- [37] Hamed SA, Amine NF, Galal GM, et al. Vascular risks and complications in diabetes mellitus: the role of Helicobacter pylori infection[J]. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 2008, 17(2): 86-94.
- [38] Wang CA, Liu YC, Du SY, et al. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein promotes myeloperoxidase release from human neutrophils[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 377(1): 52-56.
- [39] Akbas HS, Basyigit S, Suleymanlar I, et al. The assessment of carotid intima media thickness and serum paraoxonase-1 activity in Helicobacter pylori positive subjects [J]. *Lipids in Health and Disease*, 2010, 9: 92.
- [40] Ameriso SF, Fridman EA, Leiguarda RC, et al. Detection of Helicobacter pylori in human carotid atherosclerotic plaques[J]. *Stroke*, 2001, 32(2): 385-391.
- [41] Lenzi C, Palazzuoli A, Giordano N, et al. H pylori infection and systemic antibodies to CagA and heat shock protein 60 in patients with coronary heart disease[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(48): 7 815.
- (此文编辑 曾学清)