

冠状动脉搭桥术后静脉桥再狭窄动物模型的建立

胡佳心, 王侃, 阮新民

(广州中医药大学附属第二医院心血管二科, 广东省广州市 510105)

[关键词] 冠状动脉搭桥术; 静脉桥; 再狭窄; 颈外静脉; 颈动脉; 动物模型

[摘要] **目的** 建立冠心病冠状动脉搭桥术后移植静脉桥再狭窄的动物模型。**方法** 26只新西兰兔随机分成3组: 高脂移植组($n=10$)、单纯移植组($n=10$)、正常对照组($n=6$), 分别给予自体颈外静脉移植加高脂饲料、自体颈外静脉移植加普通饲料、普通饲料喂养。移植组均进行颈外静脉反向吻合于颈动脉的搭桥手术, 术后用彩色超声检测血流量, 证明静脉桥通畅。2个月后, 用多普勒检测静脉桥血流量及内膜厚度, 取组织标本作病理切片检查, 以了解静脉桥有无血栓, 内皮细胞及平滑肌细胞有无增生迁移及血管基质有无增生等。**结果** (1) 术毕所有静脉桥均通畅。(2) 术后2个月彩色超声检查示高脂移植组与单纯移植组和正常对照组相比, 静脉桥内膜有斑块形成, 狭窄明显, 内膜明显增厚。(3) 术后2个月病理切片显示高脂移植组的静脉桥内皮细胞脱落、内膜增生、平滑肌细胞移行增殖和脂质沉积等典型的粥样硬化变化, 而单纯移植组和正常对照组则不明显。**结论** 兔颈外静脉反向吻合于颈动脉的静脉搭桥动物模型是可靠的, 其为研究静脉桥术后再狭窄提供了既简单又较理想的模型。

[中图分类号] R-332

[文献标识码] A

Establishment of Animal Model of Vein Graft Restenosis After Coronary Artery Bypass Grafting

HU Jia-Xin, WANG Kan, and RUAN Xin-Min

(Second Cardiovascular Department, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510105, China)

[KEY WORDS] Coronary Artery Bypass Grafting; Vein Graft; Restenosis; External Jugular Vein; Carotid Artery; Animal Model

[ABSTRACT] **Aim** To establish the animal model of vein graft restenosis after coronary artery bypass grafting in patients with coronary artery disease. **Methods** 26 New Zealand rabbits were randomly divided into three groups: (1) high fat graft group ($n=10$): rabbits treated by autologous external jugular vein grafting to common carotid artery and fed by high fat diet; (2) pure graft group ($n=10$): rabbits treated by autologous external jugular vein grafting to common carotid artery and fed by normal diet; (3) normal control group ($n=6$): rabbits fed by normal diet. The graft groups were performed by the external jugular vein anastomosis to the carotid artery bypass surgery. Blood flow was detected by color Doppler ultrasound, and the patency of vein graft was proved. Two months later, Doppler was used to detect the blood flow and intima thickness of vein graft, and the tissue specimens were taken for pathological examination, in order to understand whether there is thrombus in vein graft, proliferation and transfer of endothelial cell and smooth muscle cell, and proliferation of vascular matrix, etc. **Results** (1) All vein grafts were unobstructed after operation. (2) Two months after operation, color Doppler ultrasound examination showed that there were plaque formation, obvious stenosis and intima thickening of the vein grafts in high fat graft group, compared with the pure graft group and the normal control group. (3) The pathological examination showed that there were typical atherosclerotic changes such as shedding of the endothelial cells, intimal hyperplasia, smooth muscle cell migration, proliferation and lipid deposition on vein grafts in high fat graft group, while the changes in pure graft group and normal control group were not obvious. **Conclusions** The animal

[收稿日期] 2014-10-10

[修回日期] 2015-04-06

[基金项目] 广东省科技计划项目(20140212)

[作者简介] 胡佳心, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为冠状动脉搭桥术后血管桥再狭窄的防治, E-mail 为 1853643094@qq.com。王侃, 硕士, 主治医师, 研究方向为冠状动脉搭桥术后血管桥再狭窄的防治, E-mail 为 vsd2012@qq.com。阮新民, 硕士, 主任医师, 研究方向为冠状动脉搭桥术后血管桥再狭窄的防治, E-mail 为 1453386845@qq.com。

model of rabbit external jugular vein anastomosis to the carotid artery is reliable. It provides a simple and ideal model for the study of restenosis after vein grafts.

冠状动脉搭桥术又称冠状动脉旁路移植术 (coronary artery bypass grafting, CABG), 目前, 临床上大隐静脉仍然是 CABG 的主要材料, 然而其长期通畅性受到限制, 其 10 年闭塞率高达 50%, 在 3、8、12 年桥仍通畅的病例中, 分别有 13%、27%、50% 的桥粥样硬化病变^[1], 近年类似报道也有很多^[2-4]。在 CABG 中使用最多最常用的是大隐静脉材料^[5], 但最容易发生再狭窄或闭塞的也是静脉桥^[6-9]。因此, 延缓静脉桥再狭窄为当今冠状动脉外科的重要研究课题。然而, 选用什么样的动物模型进行研究是一个很重要的问题。如果选用狗或猪等大动物静脉作冠状动脉与升主动脉之间搭桥, 虽然更接近临床, 但花费的人力、物力和财力均很大, 实际操作时, 很难接受; 如果选择大鼠等小动物做为静脉桥模型^[10], 又与临床 CABG 的实际情况不太相符。所以, 寻找一种既简单实用又比较符合临床实际情况的动物模型很有必要。本文详细介绍一种兔颈外静脉反向吻合于颈动脉的搭桥动物模型。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

新西兰白兔(由广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号为 0005440) 26 只, 体重 2.5 ~ 3.0 kg, 雌雄不限, 随机分为 3 组: 高脂移植组 ($n=10$)、单纯移植组 ($n=10$)、正常对照组 ($n=6$), 分别给予自体颈外静脉移植加高脂饲料喂养、自体颈外静脉移植加普通饲料喂养、普通饲料喂养。移植组的兔均行颈外静脉反向吻合于颈动脉的搭桥手术。高脂饲料加工按 2% 胆固醇、6% 花生油和 92% 普通颗粒饲料的比例配制。

1.2 手术器械及用品

放大镜 1 个, 冠状动脉尖刀 1 把, 冠状动脉剪刀 1 把, 搭桥用细尖镊子 2 把, 搭桥持针器 1 把, 8/0 或 9/0 号聚丙烯缝线 1 卷, 细血管夹 2 个, 眼科尖细血管钳 2 把, 眼科剪 1 把, 无齿眼科镊 1 把, 组织剪 1 把, 蚊式弯止血钳 2 把, 小持针器 1 把, 0 号或 1 号丝线 1 卷等。3% 戊巴比妥钠、安多福消毒液、75% 酒精、0.9% 生理盐水、肝素钠、手套、孔巾、敷料、5~6 号头皮针、5 mL 和 10 mL 注射器、胶布、金霉素软膏。

1.3 手术过程

1.3.1 术前准备 准备手术器械, 动物称重, 计

算麻醉药用量, 拔除耳外缘兔毛, 准备静脉注射。

1.3.2 麻醉 取左/右耳外缘静脉。手指弹动或轻揉兔耳, 使静脉血管充盈, 以酒精常规消毒。左手食指、中指夹住静脉近端, 拇指绷紧静脉远端, 无名指及小指垫在下面, 右手持连注射器的头皮针尽量从静脉远端斜面向上刺入, 穿刺成功后移动拇指固定针头回抽有血液, 缓慢注入 (3~5 min 内注完) 3% 的戊巴比妥钠 (30 mg/kg)。麻醉同时观察动物的呼吸、心率、体温变化及肌张力、角膜反射及对夹捏的反应, 固定针头, 待动物角膜反射消失, 表明麻醉效果良好。固定于手术台上, 剪除颈部较大范围兔毛, 暴露术野, 注意保温。

1.3.3 分离左颈外静脉 麻醉成功固定好后, 以安多福常规消毒颈部拟切口皮肤, 铺无菌中单及孔巾。紧靠喉头下缘用镊子提起皮肤, 剪刀剪开或手术刀切开皮肤及皮下筋膜 5~7 cm, 止血钳钝性分离皮下组织和肌肉。左颈外静脉多位于颈部皮下胸锁乳突肌外缘。牵开切口一侧皮肤外翻, 即可见到暗紫色粗大的颈外静脉, 用蚊式组织钳在静脉外侧分离结缔组织, 游离出约 5 cm, 分支以 0 号或 1 号丝线结扎, 其头侧有 2 个分支也要分离出约 1~2 cm, 包括 2 个分支在内的颈外静脉的 3 个末端分别用 1 号丝线予以结扎, 先切断 1 个分支, 插入一个带侧软管的套管, 并固定, 再剪断其他 2 个末端。用肝素盐水 (250 mL 盐水加肝素 12500 U) 冲洗取下的颈外静脉管腔, 置于肝素盐水中保存。

1.3.4 分离颈动脉 术中可见颈中部位有两层肌肉, 一层与气管平行, 覆于气管上, 为胸骨舌骨肌; 其上有一层肌肉呈 V 字形走行向两侧分开, 为胸锁乳突肌。用镊子轻夹住一侧胸锁乳突肌, 用止血钳在两层肌肉交界处 (V 字形沟内) 将之分开, 沟底部即可见有搏动之颈动脉鞘。以眼科镊子或蚊式止血钳细心分开鞘膜, 一般在其中间有一分支, 以 0 号丝线结扎, 避开鞘膜内神经束, 分离出颈总动脉 5~7 cm, 穿线备用。

1.3.5 搭桥 游离的颈总动脉两端以无损伤血管夹阻断血流, 先在离远端阻断钳 (远心侧) 约 1 cm 处, 用细尖镊子分别提起两侧鞘膜, 用冠状动脉尖刀沿颈动脉长轴切开动脉前壁, 再用冠状动脉剪刀剪大一点, 切口长约 0.6~0.7 cm, 至少达动脉内径的一倍, 和静脉直径相当, 勿损伤颈动脉后壁。检查游离出来的颈外静脉, 将近心端剪成斜形切口, 分清“脚”和

“尖”,大小与颈动脉切口相当,并将颈外静脉的未插套管的一个分支与主干放于同一个方向,不要扭曲。先用8/0号聚丙烯缝线将颈外静脉的“尖”和“脚”与颈动脉切口的两端吻合,术者左侧的“尖”缝好后予以剪线,右侧的“脚”缝好后,不剪线留作连续缝合。再利用插有套管的分支作牵引,以显露颈动脉和颈外静脉的吻合部位,再用连续缝合法缝合颈外静脉和颈动脉吻合口,当缝完术者一侧后,转向对侧时,要用反针连续缝合,最后打结。连续缝合时针距约2 mm,要均匀,边距约1.5 mm。如果分支够粗,可用分支与颈动脉的近心端吻合,如果分支不够粗,则只能在分支的分叉处剪断,并适当扩大切口,以保证有0.6~0.7 cm的口径与颈动脉近心端吻合,吻合方法同远心端。放开血管夹,观察静脉桥有无出血,如有明显出血,则要重新阻断血流,经分动打水,找到漏血处,予以修补,如出血为少量渗血,则用干纱块予以轻轻压迫,往往可上血。无出血后,开放血流,观察有无搏动感,如有则肯定桥是通畅的,可用Mini Doppler仪检测血流声。确定桥通畅后,尽量贴近吻合口结扎吻合口之间的动脉,并于中间剪断动脉,这样桥可拉直一些。图1示吻合成功的情况,静脉桥充盈和搏动良好,颜色红润。观察无活动性出血后,冲洗,间断逐层缝合肌肉、皮下组织,安多福消毒后缝合皮肤,切口涂以金霉素药膏。可皮下注射青霉素或庆大霉素。

2 结果

2.1 血管桥通畅和吻合口狭窄情况

颈静脉与颈动脉搭桥术后2个月,先从外表观察和触摸静脉桥血管,如果可见明显的桥血管搏动,且手指可触及明确的桥血管搏动,说明静脉桥血管是通畅的。再应用Mini Doppler仪检测静脉桥血管的血流声,如桥血管血流声好,则表示桥血管通畅。应用以上2种方法对3组动物血管桥检查,均提示大部分动物的血管桥通畅,但并不能准确反映静脉桥血管和吻合口狭窄的情况。我们采用彩色多普勒仪检查所有动物的血管桥及吻合口内径和血流情况,显示高脂移植组的吻合口有明显狭窄,而单纯移植组和正常对照组则不明显(图2)。

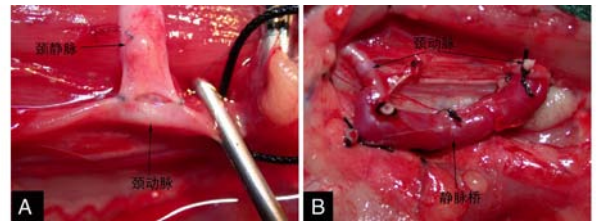


图1. 颈静脉与颈动脉端侧吻合 A为颈静脉与颈动脉行端侧吻合;B为吻合完成,静脉桥充盈和搏动良好,颜色红润。

Figure 1. End to side anastomosis between carotid vein and carotid artery

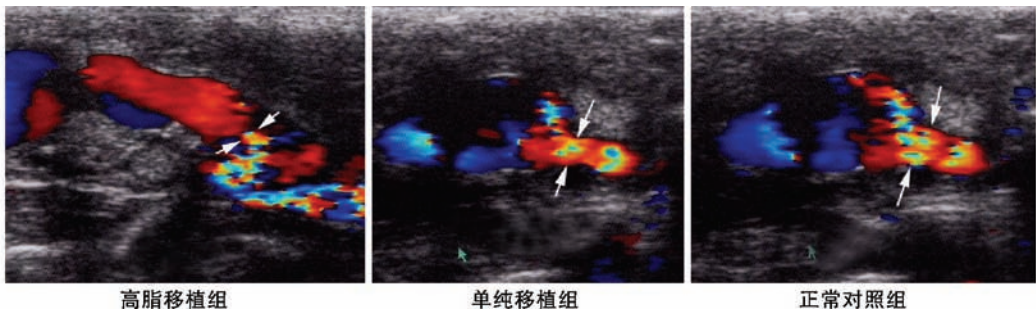


图2. 彩色多普勒检查吻合口狭窄情况 搭桥术后2个月,彩色多普勒显示高脂移植组的吻合口明显狭窄,而单纯移植组和正常对照组则基本正常。

Figure 2. Anastomotic stoma stenosis showed by color Doppler

2.2 术后血管桥内膜厚度

采用血管彩色超声测量静脉桥内膜厚度,了解静脉桥血管内膜增厚情况。术后2个月高脂移植组的血管桥内膜厚度比单纯移植组和正常对照组明显增厚($P < 0.01$;表1)。

2.3 术后病理切片检查

在所有无创检查完成后,经耳静脉注入高钾心脏停搏液处死动物,小心采取静脉桥血管及吻合口

部位组织,用组织固定液固定,并制作石蜡切片,对静脉桥血管行病理切片,HE染色,比较血管内膜厚度。结果显示,高脂移植组的静脉桥内膜比单纯移植组和正常对照组明显增厚(图3)。

3 讨论

随着人们生活水平的不断提高,冠心病的发病

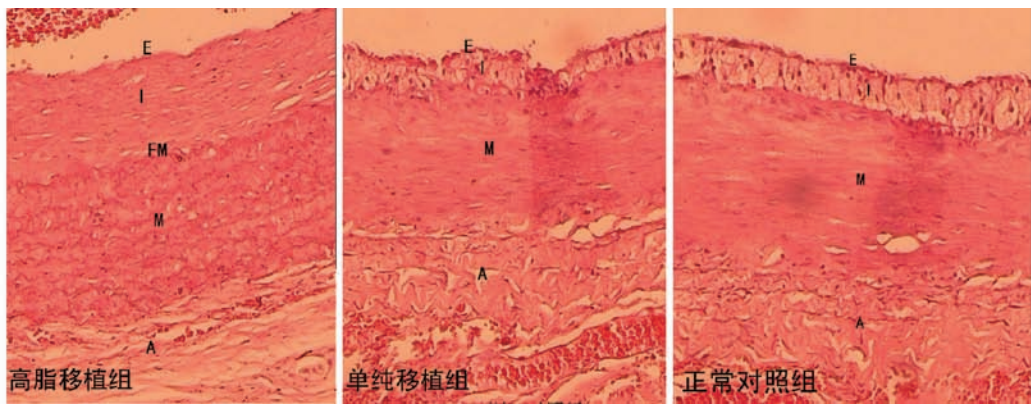


图 3. 静脉桥血管病理切片结果(×100) E 为内皮细胞(endothelial cell), I 为内膜(intima), M 为中膜(media), A 为外膜(adventitia), FM 为泡沫状巨噬细胞(foamy macrophage)。

Figure 3. Pathologic results of vein graft (×100)

表 1. 术后 2 个月静脉桥内膜厚度

Table 1. Intima media thickness of vein graft 2 months after operation

分 组	n	静脉桥内膜厚度(cm)
高脂移植组	10	0.0765 ± 0.0153 ^a
单纯移植组	10	0.0437 ± 0.0095
正常对照组	6	0.0473 ± 0.0140

a 为 $P < 0.01$, 与单纯移植组、正常对照组比较。

率也随之增加,需要行 CABG 手术的病人越来越多,而人体自身能提供的搭桥材料最多的就是静脉,但静脉桥较动脉桥易发生再狭窄,因此,如何提高静脉桥的长期通畅率是临床面临的一个重大课题。目前,关于血管再狭窄的实验研究动物模型主要是颈动脉或股动脉经皮冠状动脉腔内成形术后损伤再狭窄^[11-12],也有用动脉端端吻合的方法建立再狭窄的动物模型^[13],但很少见到符合临床的大隐静脉升主动脉-冠状动脉搭桥的动物模型报道。

Bai 等^[14]用一段颈外静脉与颈动脉采用袖口技术吻合建立静脉桥兔模型,来研究基因转移至静脉桥壁预防静脉桥再狭窄,取得了很好的结果。但他们所使用的袖口技术吻合静脉桥与颈内动脉,与临床 CABG 所使用的聚丙烯线连续吻合方法不一样,所造成的静脉内膜损伤方式及程度也不尽相同,因此,与临床实际情况相差较远。Saunders 等^[15]采用狗的颈外静脉反向吻合于颈动脉的方法建立静脉桥动物模型,研究静脉桥动脉化引起的有丝分裂激活蛋白激酶的不同活性,发现静脉桥动脉化后,其内膜明显增生。此种模型手术方式与临床相似,但颈内动脉比人的冠状动脉要粗,吻合比较容易,与

临床实际也不太相符,且使用狗作为实验对象成本较高。本研究我们使用价格相对较便宜的兔作为造模对象,且兔的颈动脉和颈外静脉直径均与人的冠状动脉和大隐静脉相似,用聚丙烯线连续吻合的方法也与临床类似,因此,所造的动物模型比较接近临床实际情况。在操作过程中,需要注意以下几点:(1)在分离颈外静脉时,要保留两根大的分支,其中一较细的分支套上一注射器,即可用来作牵引,同时在吻合时洒肝素水以便显露吻合,便于吻合。另外,静脉上的所有细小分支一定要仔细结扎或缝扎,以防吻合完开放血流后,漏血不止,难以止血。(2)在吻合时,要先将静脉桥的“脚”和“尖”与颈动脉纵形切口两端固定,然后,从静脉桥的“脚”向“尖”方向,再从“尖”向“脚”的方向连续吻合一圈。(3)吻合静脉桥的“脚”和“尖”时,边距要小些,以防吻合狭窄。

Kritchevsky 等^[16]研究发现花生油比奶酪和可可油更容易诱发纤维斑块较厚的粥样硬化病变。因此,本研究使用含 2% 胆固醇,6% 花生油和 92% 普通颗粒饲料的高脂饲料来喂养动脉。从本研究结果看,术后 2 个月,Mini Doppler 检测静脉桥血流声,单纯移植组和正常对照组所有血管桥均示有比较好的血流声,彩色 B 超检查也显示吻合口狭窄不明显;而高脂移植组中有 2 只兔检测不到静脉桥的血流声,彩色 B 超示吻合口有严重狭窄,且部分内膜有钙化斑块(图 2)。彩色 B 超测量静脉桥内膜厚度,显示高脂移植组的血管桥内膜厚度明显比单纯移植组(0.0765 ± 0.0153 cm 比 0.0437 ± 0.0095 cm, $P = 0.000$)和正常对照组(0.0765 ± 0.0153 cm 比 0.0473 ± 0.0140 cm, $P = 0.002$)均要厚(表 1)。静脉桥病理切片示高脂移植组血管内膜比单纯移

植组和正常对照组明显增厚(图3),这与文献报道^[17-18]的结果相似。

从以上结果可见,本动物模型完全达到造模的要求。本文作者曾使用本动物模型进行金钠多注射液预防静脉桥再狭窄的实验研究,获得良好的效果^[19]。

[参考文献]

- [1] Grondin CM, Campeau L, Thornton JC, et al. Coronary artery bypass grafting with saphenous vein [J]. *Circulation*, 1989, 79(6): 124-129.
- [2] Hindnavis V, Cho SH, Goldberg S. Saphenous vein graft intervention: a review [J]. *J Invasive Cardiol*, 2012, 24(2): 64-71.
- [3] Heidari MM, Foruzannia SK, Khatami M, et al. Apolipoprotein gene polymorphism in Iranian coronary atherosclerosis patients candidate for coronary artery bypass graft [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(7): 841-844.
- [4] 刘巍,周玉杰,刘宇杨,等. 静脉桥病变的介入治疗及临床预后观察[J]. *心肺血管病杂志*, 2013, 32(3): 247-250.
- [5] Wi JH, Joo HC, Youn YN, et al. Comparison of radial artery and saphenous vein composite Y grafts during off-pump coronary artery bypass [J]. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 46(4): 265-273.
- [6] Ege MR, Guray U, Guray Y, et al. Platelet distribution width and saphenous vein disease in patients after CABG [J]. *Herz*, 2013, 38(2): 197-201.
- [7] Lugano R, Pena E, Casani L, et al. UPA promotes lipid-loaded vascular smooth muscle cell migration through LRP-1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 19(6): 262-271.
- [8] Myat A, Asrress KN, McConkey H, et al. Physiological assessment of coronary haemodynamics: fractional flow reserve and beyond [J]. *Euro Intervention*, 2012, 7(10): 1236-237.
- [9] 张北平, Azriel BO, Bradley S. 冠状动脉搭桥术后静脉桥早期过度扩张的研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2013, 21(4): 11-13.
- [10] 叶岩,张成鑫,张士兵,等. miR-145 对大鼠静脉桥血管内膜增生的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(7): 917-922.
- [11] 周佩,林利,夏利,等. 颈动脉狭窄动物模型及其经皮血管成形术后的二维和彩色多普勒实验研究 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2003, 8(1): 47-49.
- [12] 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.
- [13] 董忠根,李贺君,王大平,等. 显微血管吻合后血栓形成的动物模型 [J]. *湖南医学*, 1998, 15(1): 6-7.
- [14] Bai HZ, Sawa Y, Zhang WD, et al. Gene transfer to vein graft wall by HVJ-liposome method: time course and localization of gene expression [J]. *Ann Thorac Surg*, 1998, 66(3): 814-820.
- [15] Saunders PC, Pintucci G, Bizakis CS, et al. Vein graft arterIALIZATION causes differential activation of mitogen-activated protein kinases [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 127(5): 1276-284.
- [16] Kritechevsky D, Tepper SA, Kim HK, et al. Experimental atherosclerosis in rabbit fed cholesterol-free diets: Comparison of peanut, corn, butter, and coconut oils [J]. *Exp Mol Pathol*, 1976, 24(5): 375-391.
- [17] Yuan SM, Jing H. A reappraisal of saphenous vein grafting [J]. *Ann Saudi Med*, 2011, 31(1): 62-71.
- [18] Cheng YQ, Zou RJ, Wang J, et al. Recent research progress in prevention and therapy of vein graft disease [J]. *Chin Heart J*, 2012, 24(8): 777-779.
- [19] 胡佳心,阮新民,石国亮,等. 金钠多注射液预防静脉桥再狭窄的实验研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(12): 156-158.

(此文编辑 曾学清)