

颈总动脉套管法与颈外动脉结扎法建立局部低切应力动脉粥样硬化兔模型的比较

周淑媛¹, 王迎寒^{1,2}, 巩仔鹏¹, 阮从潇¹, 阚晓溪¹, 朱晓新^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

[摘要] **目的:** 通过对比颈总动脉套管法与颈外动脉结扎法建立动脉粥样硬化兔模型的试验研究, 比较2种方法在制模时间, 模型稳定性方面的差异。**方法:** 雄性新西兰兔30只, 随机分成空白组($n=6$); 套管组($n=8$); 结扎组($n=8$); 高脂组($n=8$)。所有试验兔在高脂喂养前、后分别检测血脂水平, 于第8周处死动物, 取套管近心端与结扎近心端血管行病理学检查。**结果:** 高脂组饲养8周形成明显的高脂血症; 与高脂组相比, 单纯套管法颈动脉内膜脂质沉积较轻, 但内膜明显增厚, 内膜、中膜、外膜均出现不同程度的坏死; 结扎法病变比套管法轻, 但仍严重于正常组。**结论:** 与单纯高脂饲养法相比, 单纯套管法试验兔8周也可形成明显的动脉粥样硬化血管病变, 套管近心端可形成局部低切应力模型, 模型稳定性好。

[关键词] 动脉粥样硬化; 动物模型; 颈总动脉套管; 颈总动脉结扎

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0166-04

[doi] 10.11653/syfy2013100166

Comparison of Establishing Rabbits Carotid Atherosclerosis Model Induced by Low Shear Stress Using Carotid Artery Cannula and Carotid Artery Ligation

ZHOU Shu-yuan¹, WANG Ying-han^{1,2}, GONG Zi-peng¹, RUAN Cong-xiao¹,
KAN Xiao-xi¹, ZHU Xiao-xin^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** Study rabbits carotid atherosclerosis model test by comparing carotid artery cannula method with the external carotid artery ligation method, the differences of modeling time and model stability of two methods are obtained. **Method:** Thirty Male New Zealand rabbits were randomly divided into four groups which are control group ($n=6$); cannula group ($n=8$); ligation group ($n=8$); fat group ($n=8$). Lipid levels of all rabbits were measured before and after the high fat diet. After 8 weeks, all rabbits were sacrificed and pathological examinations were made by taking the cannula proximal end and ligation of the proximal end of the vascular. **Result:** High-fat group formed a significant hyperlipidemia after 8 weeks. Compared with the high-fat group, simply cannula carotid intimal lipid deposited lighter, but vascular intima thickness was obvious increasing, at the same time, intima, media and membrane were necrosis in varying degrees. The ligation lesions were lighter than the tube method, while it is still more serious than the normal group. **Conclusion:** Compared with the high-fat diet alone, using simple cannula technique, rabbits can also form atherosclerotic vascular lesions for 8 weeks, and sleeve proximal end would form a local low shear stress model which has good stability.

[Key words] atherosclerosis; animal models; carotid artery cannula; carotid artery ligation

[收稿日期] 20130220(011)

[基金项目] 国家直属科研院所技术开发研究专项资金(NCSTE-2007-JKZX-301); 国家自然科学基金面上项目(30973901); 重大新药创制综合性中药新药研究开发技术大平台项目(2009ZX09301-005-2-4); 中国中医科学院自主选题项目(ZZ20090207)

[第一作者] 周淑媛, 博士研究生, 从事心血管药理学研究, Tel: 010-64015008, E-mail: zyxxyw@sina.com

[通讯作者] * 朱晓新, 研究员, 从事中药药理学和药代动力学研究, Tel: 010-64056154, E-mail: zhuxx59@yahoo.com.cn

血流动力学在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的病理过程的血管重建(remodeling)中起着重要作用,波动的低流体切应力可诱发或促进灶性动脉粥样硬化和内膜增生。As斑块有特殊定位,多在动脉分支、开口、起始部位;同一血管又好发于分叉、分枝、狭窄及弯曲部位。研究发现这些部位切应力较低,经测量约 $4 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ^[1-3]。在研究流体切应力对As的作用中,有研究者通过结扎动物的某一处动脉,形成在体改变动脉血流及切应力的动物模型,如结扎大鼠、兔的颈总动脉或颈外动脉形成一段具有低血流和低切应力的颈总动脉,也有研究者应用套管法造成动脉局部狭窄,来研究低血流或低切应力对血管重建的影响^[4-6]。本研究采用在兔颈动脉外膜置入改良的硅橡胶圈或结扎颈外动脉,旨在比较套管法与结扎法建立兔颈部低切应力模型的优缺点。

1 材料

1.1 动物 30只雄性新西兰大白兔,由北京市通力实验动物养殖场提供,体重 $(2.5 \pm 0.2) \text{ kg}$,许可证号SCXK(京)2005-0003。

1.2 药物与试剂 总胆固醇试剂盒[TC,批号YZB(京)0397-2012];甘油三酯试剂盒[TG,批号YZB(京)0422-2012];高密度脂蛋白胆固醇试剂盒[HDL-C,批号YZB(京)0402-2012];低密度脂蛋白胆固醇试剂盒[LDL-C,批号YZB(京)0596-2012]均由北京北化康泰临床试剂有限公司提供。

1.3 仪器 TS 420 血流仪(美国,Transonic),MP150 多导生理记录仪(美国,BioPac),2000 半自动生化分析仪(德国,Humalyzer)。

2 方法

2.1 分组 兔随机分为4组:高胆固醇喂养组(8只)、硅胶管干预组(8只)、颈外动脉结扎组(8只),空白组(6只),经适应性喂养1周后用于实验。

2.2 模型制备

2.2.1 套管法 采用3%戊巴比妥钠经耳缘静脉麻醉($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)动物,行颈部正中切开分离出长约3~4 cm的颈总动脉。使用硅橡胶圈(内径1 mm,外径2 mm)置入兔左颈动脉外膜,硅橡胶圈的开口处由硅胶黏合剂封闭,将颈动脉放回原位置。右侧为假手术侧也置入硅橡胶圈,分离假手术侧周围的连接组织和迷走神经,使双侧颈动脉接受相同的牵拉,缝合切口前将假手术侧的硅橡胶圈取出。术后次日套管组兔给予正常颗粒饲料喂养,共喂养8周。

2.2.2 结扎法 兔麻醉后,暴露两侧颈总动脉中段和颈外动脉起始段,然后用4号手术线在颈内颈外动脉分叉稍远处穿线,双重结扎左颈外动脉。右侧相同部位做假手术处理。术后次日结扎组兔给予正常颗粒饲料喂养,共喂养8周。

2.2.3 高脂造模法 高脂模型组兔左颈总动脉侧也置入硅橡胶圈,分离动脉周围的连接组织和迷走神经,使左侧颈动脉接受相同的牵拉,缝合切口前将硅橡胶圈取出。手术后给予1%高胆固醇颗粒饲料喂养,共喂养8周。

2.3 颈总动脉血流量的测定 采用Transonic systems TS 420 血流仪(美国),于套管(或结扎)前、第8周末暴露家兔颈总动脉近心端、右侧颈总动脉,把血流仪探头座黏附在血管表面,待稳定后测量血流量,以“ $\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ ”作为血流量单位。

2.4 取材及指标检测 分别于造模前和造模8周,从家兔耳中动脉取血,测定全血黏度及分离血清。耳缘静脉注射空气针处死动物,取颈总动脉套管近心端和结扎近心端5 mm、右侧同部位血管段常规固定,HE染色,用于病理形态学观察内皮形态变化及脂质渗透情况。用自动生化检测仪检测TG,TC,HDL-C,LDL-C。颈总动脉平均流体切应力由Poiseuille流体公式计算: $\tau = 4\eta Q/\pi r^3$,式中 τ, η, Q, r ,分别表示平均流体切应力、全血黏度、平均血流量、半径。

2.5 统计学方法 采用SPSS 12.0软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 造模前后体质量的影响 高胆固醇喂养组、硅橡胶圈干预组、颈外动脉结扎组兔的体质量造模8周后为 $(3.3 \pm 0.2) \text{ kg}$,较造模前 $(2.6 \pm 0.1) \text{ kg}$ 均增加,但同一时间点组间体重差别无统计学意义。

3.2 套管法和结扎法近心端兔颈总动脉血流量与术前相比,手术后家兔颈总动脉近心端平均血流量均显著降低,各组 $P < 0.05$,套管组近心端血流量比结扎组明显降低,如表1。

3.3 套管法和结扎法近心端兔颈总动脉切应力与术后8周右侧相比,兔左颈总动脉近心端切应力的各项数值减小均有显著统计学意义($P < 0.05$)。套管组比结扎组切应力减低显著,二者差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示在兔的左颈总动脉近心端形成了低切应力模型,套管法造模后低切应力维持时

表 1 颈总动脉套管与颈外动脉结扎后颈总动脉近心端平均血流量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$)

组别	n	术前	术后即刻	8 周近心端	8 周右侧
空白	6	88.71 ± 10.23	87.15 ± 15.24	85.16 ± 14.27	87.25 ± 17.58
高脂	8	86.32 ± 14.58	86.37 ± 17.23	80.54 ± 17.23	84.16 ± 10.25
套管	8	86.82 ± 17.30	26.80 ± 4.45 ^{1,2,4,5)}	29.33 ± 2.45 ^{1,2,4,5)}	82.81 ± 5.98
结扎	8	87.50 ± 11.47	41.53 ± 6.58 ^{1,2,3,4,5)}	47.42 ± 5.89 ^{1,2,3,4,5)}	81.87 ± 4.57

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与高脂组比较²⁾ $P < 0.05$; 与套管组比较³⁾ $P < 0.05$; 与术前比较⁴⁾ $P < 0.05$; 与 8 周右侧比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

间和程度较好。见表 2。

表 2 颈总动脉套管与颈外动脉结扎对颈总动脉

近心端切应力的影响 ($\bar{x} \pm s$) dynes/cm²

组别	n	8 周近心端	8 周右侧
空白	6	15.96 ± 2.56	16.24 ± 1.54
高脂	8	13.25 ± 1.25	15.54 ± 2.65
套管	8	2.95 ± 0.55 ^{1,2,4)}	15.78 ± 2.45
结扎	8	4.85 ± 0.82 ^{1,2,3,4)}	15.17 ± 3.50

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与高脂组比较²⁾ $P < 0.05$; 与套管组比较³⁾ $P < 0.05$; 与 8 周右侧比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

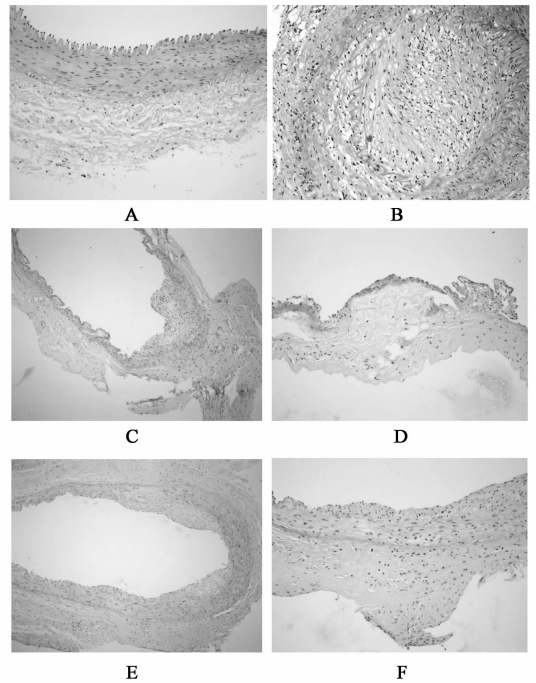
3.4 对兔血脂的影响 造模术前检测的血脂指标,各组间差异无显著性。饲喂高脂饲料 8 周的家兔采血离心后肉眼即可见为高脂肪血且有乳糜,空白组血液离心后上清液清亮。检测结果高脂组胆固醇明显增高,比空白对照高出 10 ~ 15 倍,甘油三酯升高不明显,高密度脂蛋白有的升高有的下降。与空白组比较,高脂组的 TC, TG, LDL-C, HDL-C 含量明显升高 ($P < 0.05$)。置入硅胶管或结扎饲养 8 周后血脂水平的改变:与空白组比较,套管组与结扎组血脂水平有所增加,但差异无显著性;套管组、结扎组与高脂组比较差异有显著性 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 3 种造模动物血脂水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	TG	LDL-C	TC	HDL-C
空白	0.86 ± 0.11	0.41 ± 0.07	0.75 ± 0.05	1.11 ± 0.02
高脂	14.55 ± 1.02 ¹⁾	10.53 ± 0.89 ¹⁾	15.50 ± 0.35 ¹⁾	0.67 ± 0.11 ¹⁾
套管	1.98 ± 0.21 ^{1,2)}	0.76 ± 0.05 ^{1,2)}	1.23 ± 0.06 ^{1,2)}	1.29 ± 0.04 ²⁾
结扎	1.87 ± 0.05 ^{1,2)}	0.67 ± 0.04 ^{1,2)}	1.01 ± 0.11 ^{1,2)}	1.33 ± 0.03 ²⁾

3.5 病理形态学观察 正常组左颈总动脉内膜、中膜和外膜结构正常,未见明显病变。套管组左颈总动脉近心端动脉壁萎缩,内膜不完整,内皮细胞断裂、脱落;中膜和外膜可见较多坏死组织。颈外动脉结扎组左颈总动脉结扎处近心部位动脉内膜增厚,可见增生的平滑肌细胞、胶原纤维、脂质和少量炎症细胞,外膜有少量坏死组织,较套管组的病变均轻。

高脂组左侧颈总动脉管腔内可见大量的脂纹,动脉腔内充满着大量成堆的泡沫细胞(图 B),较套管组和结扎组病变略重。见图 1。



A. 正常组左颈总动脉; B. 高脂组左侧颈总动脉; C, D. 套管组左颈总动脉; E, F. 结扎组左颈总动脉

图 1 As 家兔左颈总动脉近心端病理形态的变化 (HE 染色, × 200)

4 讨论

切应力的高或低,与心血管疾病特别是动脉粥样硬化关系密切,近十几年来,开展了一些在体改变动脉血流和切应力的不同动物模型研究,如动脉结扎或缩窄模型、动-静脉屡模型^[7-8]等等。为了建立一种简单易行,并能较长时间维持低切应力的模型,本实验对动脉套管(缩窄)模型和动脉结扎模型进行了比较。研究表明,在同等条件下,结扎模型 8 周后血流量降低程度比套管模型低,二者差异显著 ($P < 0.05$),并且近心端低切应力的维持上,套管模型也优于结扎模型。

临床研究发现^[9-10],大约 50% 的动脉粥样硬化病人没有高脂血症,高血压或吸烟但血脂正常的人可有 As 斑块。不喂高脂饲料单纯低切应力能否导

致 As? 需要动物模型的事实来回答。通过观测病理切片,与单纯的高脂饲养法相比套管法造成了内膜的损伤,使受损血管局部内膜增厚;内皮细胞断裂、脱落;中膜和外膜可见较多坏死组织。颈外动脉结扎组左颈总动脉结扎处近心部位动脉内膜增厚,可见增生的平滑肌细胞、胶原纤维、脂质和少量炎症细胞,外膜有少量坏死组织,较套管组的病变均轻。内膜损伤,血管内膜的增厚以及中膜和外膜的坏死性病变,构成了一个不可逆的互为因果的病理生理循环^[11],从而使建立的动脉粥样硬化模型更加稳定^[12]。在不喂高脂饲料的兔颈总动脉低切应力-动脉粥样硬化模型中,左颈外动脉套管与结扎后兔的血脂 4 项中 TC, TG, LDL-C 有轻度增高,与术前相比,均有显著统计学意义($P < 0.05$)。但这种统计学意义不能解释为高血症,因为其实际数值仍然很小,以血清 TC 为例,虽然有统计学意义上的“显著”增高,但其最高也没有超过 $2.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;而且与喂高脂饲料的兔动脉粥样硬化模型的高血症相比,其数值很小。虽然不喂高脂饲料的兔颈总动脉低切应力-动脉粥样硬化模型的血脂轻度升高的原因尚不清楚,但是这种血脂升高可能对低切应力侧颈总动脉形成 As 有促进作用。不喂高脂饲料的兔颈总动脉低切应力-动脉粥样硬化模型的 As 形成时间要晚,结合其血脂水平也较低的情况,可以认为,血脂在动脉硬化形成中虽然不像低切应力和传统认为的那样起决定作用,但也起重要的促进作用。

本实验建立的兔颈总动脉套管低切应力模型避开了颈动脉分叉处(颈外动脉结扎)的复杂流场,选择了单纯层流的两侧颈总动脉中段近心端,如实地获得了在体切应力的数据,并观察了左颈总动脉套管后颈总动脉切应力较长期的变化规律,实际计算结果如前所述,兔左颈外动脉套管后左颈总动脉近心端切应力显著减小、右颈总动脉切应力无显著变化,并一直持续至 8 周,因此将兔颈总动脉低切应力模型建立在可靠系统数据的基础上,可以把左颈总动脉近心端作为低切应力侧,右颈总动脉为假手术正常切应力对照侧;这种自身对照不仅能节约材料,更重要的是使得其他非研究因素的影响全部抵消,可以把两侧的差异归因于低切应力的影响,从而分离出低切应力的效应。颈总动脉套管模型为进一步研究在体低切应力对动脉粥样硬化形成和消退的影响及其机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Krizanac-Bengez L, Mayberg M R, Janigro D. The

cerebral vasculature as a therapeutic target for neurological disorders and the role of shear stress in vascular homeostasis and pathophysiology [J]. *Neurol Res*, 2004, 26 (8): 846.

- [2] 姜宗来,丛兴中,李玉泉,等. 切应力作用下与血管 SMC 联合培养的 EC 的形态学[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(11): 1007.
- [3] Caroline Cheng, Dennie Tempel, Rien van Haperen, et al. Shear stress-induced changes in atherosclerotic plaque composition are modulated by chemokines [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(3): 616.
- [4] 危当恒,王贵学,王佐,等. 剪切应力对家兔血管内膜增生及动脉粥样硬化斑块形成的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(6): 410.
- [5] Deshun Lu, Ghassan S Kassab. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology [J]. *J R Soc Interface*, 2011, 20(8): 1379.
- [6] Michael P Szymanski, Eleni Metaxa, Hui Meng, et al. Endothelial cell layer subjected to impinging flow mimicking the apex of an arterial bifurcation [J]. *Ann Biomed Eng*, 2008, 36(10): 1681.
- [7] Hui Li Lin, Lei Zhang, Chun Xi Liu, et al. Haemin-enhanced expression of haem oxygenase-1 stabilizes erythrocyte-induced vulnerable atherosclerotic plaques [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(4), 1484.
- [8] 李贵才,刘占军,徐德铤,等. 家兔动脉粥样硬化模型稳定性的观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(5): 294.
- [9] James A Stewart, T Aaron West, Pamela A Lucchesi. Nitric oxide-induced collagen IV expression and angiogenesis: FAK or fiction? Focus on 'Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells' [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(5): C968.
- [10] Conway D E, Williams M R, Eskin S G, et al. Endothelial cell responses to atheroprone flow are driven by two separate flow components: low time-average shear stress and fluid flow reversal [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(2): 367.
- [11] 庄磊,曹铁生,段云友,等. 多普勒超声评价血流剪切力对血管重构的影响 [J]. 中国医学影像技术, 2002, 18(8): 737.
- [12] J Souliis, G Giannoglou, M Dimitrakopoulou, et al. Influence of oscillating flow on LDL transport and wall shear stress in the normal aortic arch [J]. *Open Cardio Vasc Med J*, 2009, 11(3), 128.

[责任编辑 聂淑琴]