

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.009

# 两种自体静脉移植再狭窄大鼠模型的对比研究<sup>\*</sup>

刘盛华,王武军  
(南方医科大学附属南方医院胸心血管外科,广州 510405)

**摘 要:**目的 对比研究两种大鼠自体静脉移植再狭窄的动物模型。方法 SD 大鼠 30 只,体质量 300~350 g,分成 A 组和 B 组。2 组大鼠均以右侧颈外静脉作为自体移植静脉,以 Cuff 套管法为吻合方法,A 组将右侧颈外静脉移植至右侧颈总动脉,B 组将右侧颈外静脉移植至腹主动脉。术后第 1、2、4 周分 3 次取材,对切片行 HE 染色,测量内膜和中膜的厚度。结果 B 组手术时间、吻合时间较 A 组长,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。两组大鼠在相对应时间点的内膜和中膜的厚度比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 两种模型均是研究自体移植静脉增生和狭窄的发病机制、病理变化及防治措施的理想动物模型。

**关键词:**静脉桥;再狭窄;疾病模型  
中图分类号:R654.2      文献标识码:A      文章编号:1671-8348(2014)32-4301-03

A comparative study of two types of autologous vein graft in rats<sup>\*</sup>  
Liu Shenghua, Wang Wujun  
(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, the Affiliated Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

**Abstract:** Objective To compare two types of autologous vein graft in rats. Methods SD rats weighing 300 g to 350 g were randomly divided into group A and group B. The right external jugular veins were grafted into the right carotid artery in group A, and that of group B were graft into abdominal aorta, both with cuff technique. Samples of veins tissues were harvested at 1, 2, 4 weeks. The tissue section were analyzed by HE staining. The intimal and medial thickness were measured. Results The operative time and anastomosis time of group B were longer than group A, and the difference were statistically significant ( $P<0.05$ ). The difference of intimal and media thickness of group B and group A was not statistically significant at the corresponding time points ( $P>0.05$ ). Conclusion Both are currently ideal models to explore the pathogenesis and pathological changes and precaution of vein restenosis after coronary artery bypass graft.  
**Key words:** vein graft; restenosis; disease model

自体静脉移植动物模型是研究冠状动脉旁路移植(coronary artery bypass graft, CABG)术后再次狭窄的主要方法,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<sup>[1]</sup>。本实验应用大鼠为建模动物,以 Cuff 套管法为吻合方法,利用大鼠颈外静脉作为桥血管,分别将颈外静脉移植至颈总动脉和腹主动脉。建立两种自体静脉再狭窄大鼠模型,将两种模型的进行对比研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 选取 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雌雄不限,体质量 300~350 g,购自南方医科大学实验动物中心。苏木素染液、伊红染液由南方医科大学实验室提供。二甲苯、中性树胶购自国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 方 法

**1.2.1 动物分组** 大鼠分为 A 组和 B 组,每组 15 只。均以右侧颈外静脉作为自体移植静脉,以 Cuff 套管法为吻合方法,A 组将颈外静脉移植至右侧颈总动脉,B 组移植至腹主动脉,分别建成两种自体静脉再狭窄的动物模型。

**1.2.2 模型建立** (1)A 组模型建立:10%水合氯醛按 300 mg/kg 行腹腔注射麻醉。1%肝素按 250 U/kg 腹腔注射予以全身肝素化。固定大鼠,取右侧胸锁乳突肌前切口,长约 3.0 cm,逐层切开。充分显露颈外静脉,长约 1.5 cm。采用“no

touch”技术游离右侧颈总动脉约 2.0 cm,取右侧颈外静脉作静脉桥,长度约 1.5 cm,两断端用 8/0 无损伤缝线结扎,用肝素、罂粟碱生理盐水冲洗管腔。右侧颈总动脉两端以无损伤“哈巴狗”血管夹阻断血流,中间纵行切开约 0.7 cm,并用肝素、罂粟碱生理盐水冲洗管腔。用长约 3.0 mm 动脉穿刺外鞘管(20 G, 1.1 mm)自制套管。将颈外静脉两端分别穿过套管,用眼科镊夹住残端两部分翻转于套管体部上,6-0 号丝线结扎套管固定。静脉桥制作完后放置于肝素、罂粟碱生理盐水中。用显微剪在动脉两端中间剪开,助手用两把眼科镊子牵开动脉管壁辅助,将待移植的右侧颈外静脉上下颠倒后分别插入右侧颈总动脉两端,6-0 丝线结扎固定,然后将结扎线与套管固定进一步防止滑脱。吻合完毕后依次开放远近端动脉夹,静脉桥充盈,观察搏动良好。彻底止血,术野消毒后缝合皮肤。(2)B 组模型建立:以同样的方法将右侧颈外静脉移植至腹主动脉。所有大鼠术后第 1 天开始每只肌注青霉素钠 4 万 U/d,用至术后 5 d,给予阿司匹林 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃抗凝。

**1.2.3 标本采集** 术后第 1、2、4 周分 3 次取材,每次每组随机选取 5 只大鼠。大鼠麻醉后从原切口找到静脉桥,观察桥静脉通畅后切取静脉。切取静脉桥标本后处死大鼠。静脉桥标本用生理盐水冲洗,4%多聚甲醛冲洗固定,脱水,石蜡包埋,切片厚度为 4 μm。每条静脉标本随机选取不同位置的切片共 5

<sup>\*</sup> 基金项目:广东省科技计划项目(2011B080701058)。 作者简介:刘盛华(1977—),主治医师,博士,现工作于武警广东省总队医院,主要从事心血管外科的研究。

张,HE 染色。

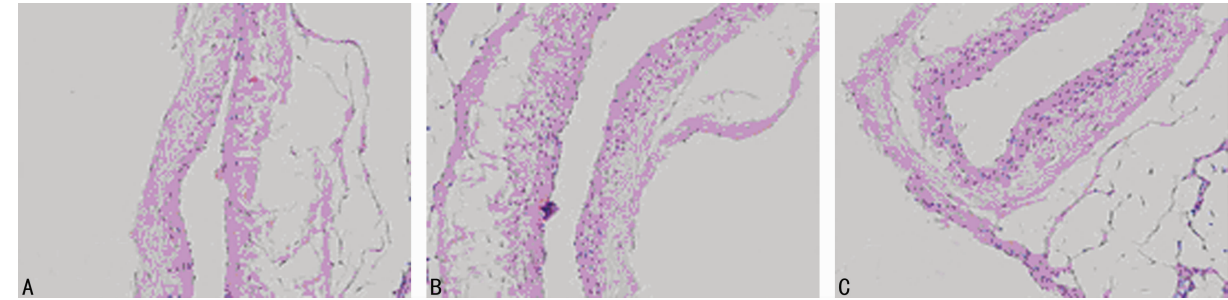
**1.2.4 观察指标** 每只大鼠选取 5 张切片,用 Image-Pro Plus6.0 图像分析软件测量内膜和中膜的厚度。每张切片从 3、6、9、12 点钟 4 个不同的位置测量,然后取平均值。

**1.3 统计学处理** 采用 SAS 8.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两两比较采用  $t$  检验,组间比较采用单因素方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

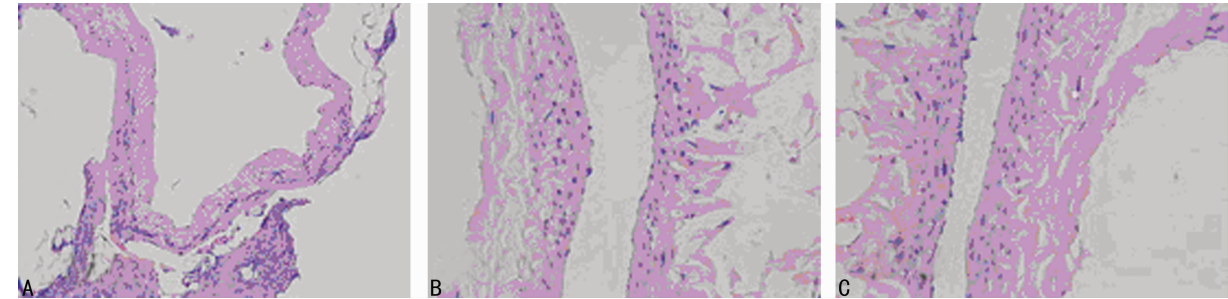
30 只大鼠建模后全部成活。共 30 条桥静脉均通畅,搏动

良好。两组大鼠手术时间、吻合时间比较 两组大鼠手术过程顺利,手术时间,见表 1。B 组手术时间、吻合时间均较 A 组长,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。两组大鼠术后不同时间桥静脉切片 HE 染色,见图 1、2。不同时间内膜和中膜的厚度比较,见表 2。两组大鼠随着术后时间的延长,内膜和中膜的厚度也逐渐增厚。B 组大鼠在第 1、2、4 周不同的时间点,内膜和中膜的厚度分别与 A 组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。



A:第1周;B:第2周;C:第4周。

图1 术后 A 组第 1、2、4 周静脉桥切片 HE 染色(×400)



A:第1周;B:第2周;C:第4周。

图2 术后 B 组第 1、2、4 周静脉桥切片 HE 染色(×400)

表 1 A 组与 B 组手术和吻合时间比较( $\bar{x}\pm s$ ,min)			
组别	n	手术时间	吻合时间
A 组	15	40.5±3.3	17.9±3.1
B 组	15	49.1±3.3*	23.4±2.8*

\*:  $P<0.05$ ,与 A 组比较。

表 2 A 组与 B 组大鼠术后不同时间桥静脉内膜和中膜的厚度比较( $\bar{x}\pm s$ , $\mu\text{m}$ )					
组别	n	管壁厚度	第 1 周	第 2 周	第 4 周
A 组	15	内膜厚度	19.0±1.5	41.2±1.9	59.8±1.9
		中膜厚度	17.4±1.1	37.6±1.1	51.6±2.4
B 组	15	内膜厚度	18.6±1.3	40.8±2.2	59.4±1.9
		中膜厚度	17.6±1.4	37.0±1.0	51.6±1.8

## 3 讨 论

作为治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的主要方法之一,迄今 CABG 已历经 40 余年的临床时间,尤其适用于多个危险因素的患者<sup>[2]</sup>。乳内动脉,尤其是做乳内动脉由于其解剖位置的优势和长期的通畅率,一直以来都作为 CABG 术中前降支搭桥的最佳桥血管。但是在乳内动脉条件较差时,大隐静脉仍然是首选的桥血管。长期以来使其在 CABG 中得到了广泛的应用<sup>[3]</sup>。

随访资料显示,乳内动脉吻合前降支,1 年通畅率达 95.7%,10 年通畅率在 90.0%以上<sup>[4]</sup>,明显优于大隐静脉。研究表明,大隐静脉 1 年内可能发生静脉吻合口近端狭窄、血栓形成,1 年、5 年的通畅率分别为 93.0%、74.0%。10 年通畅率在 50.0%~60.0%<sup>[5]</sup>,长期效果明显不如乳内动脉。静脉桥的再狭窄大大降低了手术的远期效果,对于再狭窄的发生机制仍有许多不明之处,目前认为再狭窄可能与大隐静脉游离过程中的损伤,术后血流动力学的改变以及炎症因子释放等一系列变化,术后新生内膜增生、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖、迁移所造成的血管重塑共同作用的结果<sup>[6]</sup>。术后较高的再狭窄发生率已经成为影响自体静脉在 CABG 术后中远期疗效最主要的限制因素<sup>[7]</sup>。

**3.1 建立静脉桥再狭窄动物模型的现状** 静脉移植动物模型是研究 CABG 术后再狭窄的主要方法,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。目前,研究移植静脉桥再狭窄的动物模型有猪、犬等大动物,也有大鼠、兔子等小动物。大动物操作相对简单,但所需费用较高。小动物价格便宜,易于饲养及管理。但由于其血管直径小,吻合操作困难,需要具备血管吻合相关技能的人员操作。实验性自体静脉移植模型多种多样,血管桥主要为颈外静脉和大隐静脉,移植部位多在颈动脉、腹主动脉或股动脉。有研究表明,移植早期再狭窄的主要原因是吻合技术和血栓形成<sup>[8]</sup>。在静

脉桥再狭窄模型的建立过程中血管吻合方法主要有连续缝合、间断缝合和 Cuff 套管法<sup>[9]</sup>。目前,国内外研究再狭窄的动物模型中关于大鼠血管移植模型报道相对较少,主要是采用显微外科缝合方法。因其需要精巧的纤维外科技术和很高的外科基本功,手术中操作空间小,常常因血管暴露不清造成误缝或管壁撕裂,而导致吻合口出血和狭窄。因此,改进静脉移植模型,提高近期通畅率,减少手术操作本身对血管的损伤对延长大鼠术后存活时间十分必要。大鼠价格低廉,Cuff 套管法建立颈外静脉移植到颈总动脉模型,操作简单,成功率高。该模型能真实地模拟静脉桥旁路移植至动脉环境术后静脉桥再狭窄的病理过程,是进一步研究防治静脉再狭窄的理想模型,有利于开展大规模的动物实验。此模型是研究移植静脉内膜增生和狭窄的发病机制、病理变化及探讨其防治促使的理想动物模型。本研究利用大鼠颈外静脉作为桥血管,分别将颈外静脉移植至颈总动脉和腹主动脉,建立两种自体静脉再狭窄大鼠模型,将两种模型的进行对比研究。两种模型均为目前动物实验中能反映 CABG 术后移植静脉再狭窄病理过程所用的理想模型。设计制作一种简单易行的移植血管再狭窄模型具有重要的实际意义。

**3.2 选择颈总动脉为移植部位的优点** 排除技术的干扰,尽管两种动物模型的建立同样能达到预期的效果。但髂动脉和腹主动脉的吻合由于需要进入腹腔,对动物创伤较大,并发症多,死亡率高。在供受血管选择中,由于颈外静脉解剖位置比较固定,便于寻找,且易于显露游离,且移除单侧静脉对动物的全身影响较小。另外,颈总动脉距离心脏较近,动脉压力较高,对移植静脉内膜损伤较大,易于更加真实地模拟 CABG 的病理生理变化。

**3.3 Cuff 套管技术的优点** 缝合法在收紧缝线时易造成管口的狭窄,又易于缝至对侧,手术具有较大难度。目前,采用小动物建立模型的过程中血管的吻合方式逐渐发展为套管法,并且收到较好的效果<sup>[10-11]</sup>。本研究认为,Cuff 套管法较间断缝合和连续缝合法操作简单,并且无需显微外科缝合,对手术者外科技术影响较小。一般不存在吻合口漏血情况,成功率较高。且因吻合口口径大小一致,对内膜损伤和血管剪切应力小,通畅率高,手术时间也明显缩短,Cuff 套管法和缝合法吻合血管均能真实反映 CABG 术后静脉桥再狭窄的情况,但前者更加简单。是进一步探寻 CABG 术后桥血管再狭窄病因和机制的理想模型。随着 Cuff 套管技术的出现其在动物模型建立过程中的广泛应用。使血管移植模型的建立和推广日渐可行。原装进口 Cuff 套管价格昂贵,国内购买定制存在较大困难。本实验所采用 Cuff 套管利用临床上较为常用的 BD 公司的动脉留置针套管(20 G,1.1 mm)制成。其材料易于获得,又有一定的韧性,但又不至于坚硬,其管径与大鼠的颈外静脉和颈总动脉基本吻合实验可用性强。自制的 Cuff 管远端可留一柄利于夹持,翻转时不易造成损伤。实验动物中均未观察到自制的套管有明显的异物反应,亦未见刺激局部血栓形成的现象。

**3.4 本实验模型建立过程中的注意事项** 显露腹主动脉时,将胃和肠道用盐水纱布包裹并向腹腔两侧推开即可达到良好显露效果,动作要轻柔。切记操作过程粗暴,或将胃和肠道拉出摆放在腹腔外,以免损伤肠管。开腹时腹腔内注入少量生理盐水使肠管漂起,轻揉两侧腹壁即可使肠管复位,防止术后发生肠扭转及肠梗阻的发生。分离动、静脉时采用“no touch”技术,尽量减少血管壁的损伤。分离颈总动脉时要避免损伤迷走神经和气管旁的小动脉。动脉分离完毕时,滴少于罂粟碱防止

血管痉挛。下腔静脉紧邻腹主动脉,在分离下腔静脉与腹主动脉时,要尽量避免损伤血管壁,尤其要避免损伤下腔静脉,否则会出现致命性的出血获取静脉桥后要用肝素水反复冲洗干净,预防血栓形成。Cuff 套管中间可作一切迹,以防止血管桥滑脱套管翻转时。开放静脉桥时,应先开放远端并排气,再开放近端,以防止气体栓塞,从而提高动物成活率。为了避免移植静脉血管出现扭曲,可在一端动静脉口吻合完毕后,短暂开放此端动脉夹使静脉桥血管轻度充盈以使静脉自然伸直。

综上所述,Cuff 套管法建立大鼠颈外静脉移植到颈总动脉模型,操作简单,成功率高,无近期免疫排斥反应,有利于开展大规模的动物实验。两种模型均是研究移植静脉增生和狭窄的发病机制、病理变化及防治措施的理想动物模型。

#### 参考文献:

- [1] Schachner T, Laufer G, Bonatti J. In vivo (animal) models of vein graft disease[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 30(3): 451-463.
- [2] Marui A, Okabayashi H, Komiya T, et al. Benefits of Off-pump coronary artery bypass grafting in high-risk patients[J]. Circulation, 2012, 126(1): S151-S157.
- [3] Tsakok M, Taylor SM, Tsakok T. Storage of saphenous vein grafts prior to coronary artery bypass grafting: is autologous whole blood more effective than saline in preserving graft function[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2012, 15(4): 720-725.
- [4] Lawrie GM, Morris GC Jr, Earle N. Long-term results of coronary artery bypass surgery: Analysis of 1698 Patients followed 15 to 20 years[J]. Ann Surg, 1991, 213(5): 337-385.
- [5] Gao CQ, Liu ZY, Li BJ, et al. Comparison of graft patency for off-pump and conventional coronary arterial bypass grafting using 64-slice multidetector spiral computed tomography angiography[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2009, 8(3): 325-329.
- [6] Peykar S, Angiolillo DJ, Bass TA, et al. Saphenous vein graft disease[J]. Minerva Cardioangiologica, 2004, 52(5): 379-390.
- [7] Qiao A, Zeng Y, Xu X. Comparisons of hemodynamics in 1-way and 2-way CABG[J]. J Biomed Eng, 2006, 23(2): 295-299.
- [8] 肖雅琼, 孙宗全, 张凯伦, 等. 大鼠自体颈外静脉移植模型的建立与改进[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2010, 39(1): 106-108.
- [9] Kloppenburg GT, de Graaf R, Grauls GE, et al. Chlamydia pneumoniae aggravates vein graft intimal hyperplasia in a rat model[J]. BMC Microbiol, 2007, 7: 111.
- [10] Zou Y, Dietrich H, Hu Y, et al. Mouse model of venous bypass graft arteriosclerosis[J]. Am J Pathol, 1998, 153(4): 1301-1310.
- [11] Mizuta T, Nakahara K, Shirakura R, et al. Total no-microsuture technique for rat lung transplantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991, 102(1): 159-160.