

移植静脉再狭窄动物模型研究进展

王小文 冯 波 吕志前 黄 春 向小勇

【摘要】 移植静脉再狭窄动物模型的建立对探索移植静脉术后再狭窄的发病机制、研发防治药物靶点和研究治疗策略有重要意义。近年来随着分子生物学技术的发展和桥血管狭窄发病机制研究的深入,使得基因治疗用于防治移植静脉术后再狭窄成为可能。该文介绍常用的几种移植静脉再狭窄动物模型的特点和造模方法。

【关键词】 再狭窄;静脉移植;基因治疗;动物模型

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2017.02.005

大隐静脉是冠状动脉旁路移植术(CABG)最常用的血管移植材料之一,其临床使用率超过 70%。然而,长期随访结果表明,15%~25%的静脉桥血管在术后 1 年出现狭窄,术后 10 年的堵塞率超过 50%^[1-3]。CABG 术后桥静脉血管狭窄是一个复杂的、多因素参与的血管重构过程,主要包括 3 个病理阶段:血栓形成、内膜增生、粥样硬化。内膜增生是术后移植静脉再狭窄发生的关键环节,也是不同因素导致移植血管再狭窄的共同中间环节^[4-5]。

目前已经有多种动物模型用于研究移植静脉再狭窄(vein graft restenosis, VGR)的发病机制和防治策略。相比小动物,大动物的静脉移植手术操作相对容易,其血管解剖和血流动力学更接近于人类,更适合用于构建再狭窄动物模型。大动物的成本高,建模需要特殊的手术设备以及更多的药物;小动物较易获得,饲养成本低,手术所需设备较简单。

1 模型动物的选择

1.1 小鼠 VGR 模型

小鼠是动物模型中应用较多的物种,随着转基因技术和基因敲除技术的发展,可针对感兴趣基因构建功能获得和功能缺失小鼠模型,目前已成功制备出多种小鼠 VGR 模型,如载脂蛋白 E 基因

(ApoE^{-/-})、微小 RNA-126 基因敲除(miR-126^{-/-})小鼠模型^[6],这是小鼠用于 VGR 发病机制研究的一大优势。小鼠 VGR 模型的构建方法一般是将供体小鼠的下腔静脉移植至受体小鼠的颈动脉或股动脉^[7-8],但小鼠血管移植吻合手术不易操作,吻合过程中易导致桥静脉损伤,且动态观察小鼠模型及取样较难,留取血液标本困难,现在已很少应用于 VGR 模型构建。小鼠模型 VGR 发生的部位通常在吻合口处,这与人类十分相似。小鼠 VGR 模型建立后即刻可观察到手术所致的内皮组织损伤,术后 1 周可观察到内膜增生和血栓形成^[9-10];导致内膜增生的细胞大部分来源于供体小鼠的移植静脉,小部分来自于受体小鼠^[11]。研究显示,血管内皮细胞向间叶细胞转化也是移植静脉内膜增生发生再狭窄的重要机制之一^[12]。随着术后的推移,移植静脉血管内膜和管壁厚度持续增加,至术后 4 周达到稳定水平,且此时胶原增生、堆积^[10]。

1.2 大鼠 VGR 模型

大鼠 VGR 模型常用的血管吻合方法包括将腔静脉、颈静脉、髂腰静脉或腹壁静脉移植至腹主动脉、颈动脉或股动脉^[11, 13]。桥静脉移植成功 3 d 后,桥静脉中的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)开始发生表型转化,即由静止型(收缩型)VSMC 转换成增殖型(合成型)VSMC。正常血管中膜的 VSMC 处于成熟的稳定状态,几乎无增殖及合成细胞外基质能力,称为静止型 VSMC,其功能主要是维持血压及血管壁的完整性。当受到血流动力学改变、缺氧等因素刺激时,VSMC 可发生转化,此时的 VSMC 具有很强的增殖及合成

基金项目:重庆市卫生局重点项目(2013-1-015);上海市科委医学类重大科研支撑项目(15411952400)

作者单位:400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心胸外科(王小文,黄 春,向小勇);香港中文大学生物医学研究院再生医学重点实验室(冯 波);200233 上海交通大学附属第六人民医院心胸外科(吕志前)

通信作者:黄 春,Email:hcsurgery@163.com

能力,称为增殖型 VSMC^[14]。这是 VSMC 独有的特性,也是以内膜增生为主要病理改变的 VGR 发生发展的必要前提^[15]。移植静脉血管壁厚度在术后 7 d 开始增加,一直持续至术后 3 周。

1.3 兔 VGR 模型

兔的体型非常适合制作动物模型,饲养方便,费用也不高。构建 VGR 模型常用的方法是将兔颈静脉移植至同侧或对侧颈动脉^[16],因血管直径相对较大,血管吻合时既可行端-端吻合,也可行端-侧吻合。移植术后 7 d 桥静脉血管厚度明显增加,且至少在术后 6 个月内其厚度将会持续增加,一般最厚的部分为移植静脉狭窄段的远端^[11]。内膜增生所致的再狭窄机制与大鼠 VGR 模型相似,为 VSMC 表型转化后增殖、迁移至内膜并产生细胞外基质和胶原堆积^[17]。兔对外源性胆固醇吸收率高,对高血脂清除力低,采用高脂饮食可以提高巨噬细胞对移植静脉浸润,增加基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的水平,这适于构建移植静脉再狭窄晚期伴粥样硬化的病变模型,且不同的饮食结构可产生不同类型的模型^[18]。兔移植静脉模型一般用于桥静脉疾病的相关危险因素的研究,如高胆固醇血症、高血压及糖尿病等^[13]。

1.4 小型猪 VGR 模型

小型猪是目前研究 VGR 比较理想的模型之一,其饮食结构及心血管系统的解剖、生理等特点接近于人类。构建 VGR 模型的方法主要是将大隐静脉或颈静脉移植至颈动脉^[11]。剥离大隐静脉一般取后腿外侧切口,长 8~10 cm,然后将大隐静脉与颈动脉行端-端吻合或端-侧吻合^[19]。实际临床工作中,CABG 的血管吻合方式主要是端-侧吻合,而不是端-端吻合,因此小型猪 VGR 模型可以从大隐静脉的获取、准备和移植等方面模拟人的手术。小型猪模型 VGR 部位也与人相似,为吻合口附近。移植静脉厚度在术后 2 周明显增加,且移植静脉中膜和内膜增厚程度在术后 1 个月即可达到最大^[11]。小型猪移植静脉的内膜增生细胞也主要来源于供体移植静脉^[20]。

1.5 其他 VGR 模型

犬具有来源充足、手术耐受性好、对环境适应和抗感染能力强、大隐静脉管腔直径大且易吻合等优点,有利于静脉移植这类复杂手术的进行。此外,犬还可以直接模拟人的不停跳下 CABG 手术,取犬左后腿大隐静脉 10 cm,经左胸第四肋间切口

暴露心脏,不停跳下完成大隐静脉和降主动脉及左主动脉前降支的吻合^[21]。犬 VGR 模型虽是 CABG 术后研究较为理想的模型,但高胆固醇饮食喂养通常不发生动脉硬化,较难模拟人类 VGR 晚期粥样硬化病变。

考虑到经济成本和可操作性等因素,大鼠比较适合用于基础研究,而小鼠比较适合用于体内药物测定和干预研究,小型猪和犬比较适合用于临床相关因素和临床前期研究。

2 造模方法

2.1 缝合法

间断缝合法是构建 VGR 动物模型最常用的方法之一,国内外多项研究均选择缝合法构建 VGR 模型^[22-23]。以大鼠 VGR 模型构建为例(见图 1),其操作要点如下:于正中切口分离颈外静脉,取长约 1.5~2.0 cm 的颈外静脉;充分游离颈动脉后,用上直形无损显微血管夹切断颈动脉;立刻用肝素生理盐水冲洗动脉管腔;修剪颈动脉断端处的血管外膜;用 11-0 Polypropylene 缝线间断缝合动、静脉断端。因静脉壁薄,易贴附在一起,不易进针吻合,建议在吻合口滴少许肝素生理盐水,浸于其中的静脉将会保持管腔样结构,易于吻合。分别在 11 点和 7 点钟位置缝牵引线,在两牵引线之间的血管前壁分别间断缝合 3 或 4 针。前壁缝合完将血管夹轻轻的翻转至对侧,充分暴露血管后壁,在 3 点钟位置缝合动静脉血管壁,作牵引后在两牵引之间的血管后壁分别间断缝合 2 或 3 针。按上述方法将静脉近心端与颈动脉远心端吻合。注意吻合血管时一定要进行全层缝合,同时防止缝合到对侧血管壁而导致吻合口闭合,移植静脉血管段不能扭曲或过长。

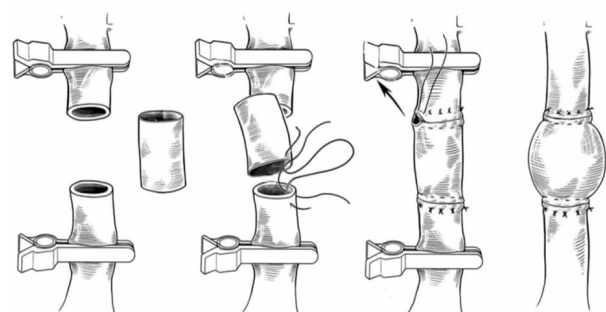


图 1 间断缝合法构建大鼠移植静脉再狭窄动物模型示意图

2.2 Cuff 法

Cuff 法(见图 2)是缝合法的替代方法之一,在小鼠、大鼠和兔 VGR 模型构建中均有应用^[24-25]。Cuff 法以及改良 Cuff 法较间断缝合法具有以下优

势;不需显微外科缝合,设备及操作简单,手术时间缩短,受术者技术影响相对较小,成功率高;静脉桥及动脉缺血时间短,受损伤小,通畅率高;吻合口大小一致,血流剪切应力小,对内膜损伤小;动静脉的内膜连接处不产生异物反应,不会刺激局部血栓形成。但因动物血管细、静脉壁薄,将移植静脉套入 Cuff 套管的过程中容易造成静脉撕裂,且反复操作会造成血管内外膜的损伤,引起术后血栓形成和血管坏死,因此采用 Cuff 法构建 VGR 模型建议选择兔等血管直径较大的动物。

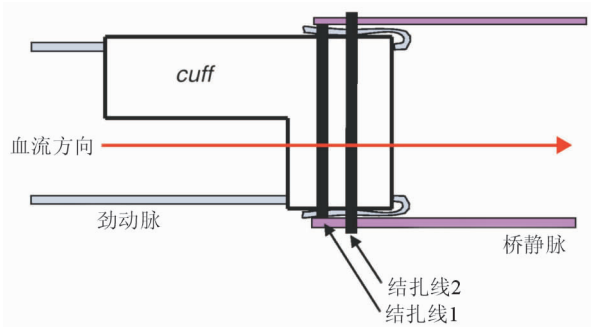


图 2 Cuff 法构建移植静脉再狭窄动物模型示意图

2.3 粘合法

粘合法血管吻合术具有广阔的应用前景。Poloxamer-407 聚合物溶液低温时是液体,在局部应用后,当温度升高时转变成具有良好黏附性和缓释性的凝胶。Chang 等^[26]应用 poloxamer-407 凝胶进行血管吻合的研究,根据 poloxamer-407 独特的热控性,将其作为填塞物注入到吻合血管断端,加热至 40 ℃,使其变成凝胶态,用于撑开并吻合血管,再于血管吻合口周围涂抹氰基丙烯酸盐进一步粘合血管;待温度降低后, poloxamer-407 又转为液态,血管恢复通畅。该血管吻合技术快速、简单、吻合效果可靠,且将手术操作所致的血管内膜损伤降到最低,该技术应用于 VGR 模型是否有助于减少吻合口内膜增生性狭窄尚待进一步验证。

2.4 磁吻合法

磁吻合法是通过永磁材料制成吻合装置,利用磁体相互间的引力吻合血管的一种无缝线吻合技术,在血管吻合、空腔脏器间的吻合以及活体肝移植吻合中应用已有报道,吻合效果可靠^[27-30]。但磁材料留置体内可能会对人体产生不良影响,磁体无法降解,血管吻合后磁性材料不能从吻合口自行脱落,合金磁体耐腐蚀性及生物相容性较差,长期留置体内易腐蚀并会释放有害金属离子。生物可降解纳米磁性复合材料的研制有望解决上述不足,但

用于外科吻合还有待验证^[31]。磁吻合法比较适合应用于旁路 VGR 模型构建。

总之,理想的 VGR 动物模型应该与临床实际发病情况类似,复制 CABG 术后移植静脉内膜增生所致狭窄的病理变化。随着实验方法和技术手段的改进,VGR 动物模型将对 VGR 的防治研究发挥重要作用。

参 考 文 献

- [1] Graham MM, Ghali WA, Faris PD, et al. Survival after coronary revascularization in the elderly[J]. *Circulation*, 2002, 105(20):2378-2384.
- [2] Hata M, Sezai A, Niino T, et al. What is the optimal management for preventing saphenous vein graft diseases: early results of intravascular angioscopic assessment[J]. *Circ J*, 2007, 71(2):286-287.
- [3] Weintraub WS, Grau-Sepulveda MV, Weiss JM, et al. Comparative effectiveness of revascularization strategies[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(16):1467-1476.
- [4] Bhardwaj S, Roy H, Ylä-Herttuala S. Gene therapy to prevent occlusion of venous bypass grafts[J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2008, 6(5):641-652.
- [5] Muto A, Model L, Ziegler K, et al. Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies[J]. *Circ J*, 2010, 74(8):1501-1512.
- [6] Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1[J]. *Nat Med*, 2014, 20(4):368-376.
- [7] Cooley BC. Murine model of neointimal formation and stenosis in vein grafts[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(7):1180-1185.
- [8] Zhang L, Freedman NJ, Brian L, et al. Graft-extrinsic cells predominate in vein graft arterIALIZATION[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(3):470-476.
- [9] Torsney E, Mayr U, Zou Y, et al. Thrombosis and neointima formation in vein grafts are inhibited by locally applied aspirin through endothelial protection[J]. *Circ Res*, 2004, 94(11):1466-1473.
- [10] Thomas AC, Newby AC. Effect of matrix metalloproteinase-9 knockout on vein graft remodelling in mice[J]. *J Vasc Res*, 2010, 47(4):299-308.
- [11] Thomas AC. Animal models for studying vein graft failure and therapeutic interventions[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12(2):121-126.
- [12] Cooley BC, Nevada J, Mellad J, et al. TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(227):227ra34.
- [13] Borin TF, Miyakawa AA, Cardoso L, et al. Apoptosis, cell

- proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (cip1) in vascular remodelling during vein arterialization in the rat[J]. Int J Exp Pathol, 2009, 90(3): 328-337.
- [14] Xie C, Ritchie RP, Huang H, et al. Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(7):1485-1494.
- [15] Shi N, Chen SY. Smooth Muscle Cell Differentiation: model systems, regulatory mechanisms, and vascular diseases[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(4):777-787.
- [16] Wong AP, Nili N, Jackson ZS, et al. Expansive remodeling in venous bypass grafts: novel implications for vein graft disease[J]. Atherosclerosis, 2008, 196(2):580-589.
- [17] Wang XW, Zhao XJ, Xiang XY. Gene therapy for vein graft failure[J]. J Card Surg, 2013, 28(2):144-147.
- [18] Newby AC, George SJ, Ismail Y, et al. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes [J]. Thromb Haemost, 2009, 101(6): 1006-1011.
- [19] 邱志兵, 陈鑫, 万松, 等. STAT3 信号通路 with 血管重塑中平滑肌细胞表型转化及增殖关系[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(12):1624-1626.
- [20] Jevon M, Ansari TI, Finch J, et al. Smooth muscle cells in porcine vein graft intimal hyperplasia are derived from the local vessel wall [J]. Cardiovasc Pathol, 2011, 20(3): e91-94.
- [21] Shintani T, Sawa Y, Takahashi T, et al. Intraoperative transfection of vein grafts with the NFkappaB decoy in a canine aortocoronary bypass model: a strategy to attenuate intimal hyperplasia[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 74(4): 1132-1137.
- [22] 汪颖厚, 辛世杰, 杨栋, 等. 大鼠移植静脉重塑中 Wnt5a 表达的变化[J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(1):28-30.
- [23] Wang XW, He XJ, Lee KC, et al. MicroRNA-221 sponge therapy attenuates neointimal hyperplasia and improves blood flows in vein grafts[J]. Int J Cardiol, 2016, 208(6):79-86.
- [24] DeSart KM, Butler K, O'Malley KA, et al. Time and flow-dependent changes in the p27 (kip1) gene network drive maladaptive vascular remodeling[J]. J Vasc Surg, 2015, 62(5):1296-1302.
- [25] 赵智伟, 葛建军, 周正春, 等. 改良 cuff 法和间断缝合法在静脉桥狭窄模型中的应用[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(4):474-476.
- [26] Chang EI, Galvez MG, Glotzbach JP, et al. Vascular anastomosis using controlled phase transitions in poloxamer gels[J]. Nat Med, 2011, 17(9):1147-1152.
- [27] Heitmann C, Khan FN, Erdmann D, et al. Vein graft anastomoses with magnets [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007, 60(12):1296-1301.
- [28] 刘仕琪, 雷鹏, 高睿, 等. 磁吻合技术实现门静脉快速无缝线吻合动物实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2013, 19(10):758-761.
- [29] 刘仕琪, 雷鹏, 吕毅, 等. 磁压榨吻合技术快速无缝线吻合犬股动脉[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2015, 31(1): 28-30.
- [30] 刘仕琪, 雷鹏, 吕毅, 等. 磁吻合技术实现下腔静脉吻合组织与电镜观察[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(2): 258-260.
- [31] 王善佩, 李建辉, 钱军民, 等. 外科吻合用生物可降解纳米钽铁硼磁性复合材料的研制[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(16):2505-2510.

(收稿:2016-06-05 修回:2016-11-27)

(本文编辑:丁媛媛)