doi:10.11659/jjssx.05E023049

·基础研究·

大鼠主动脉支架术模型的建立及光学相干断层扫描评估

邓梦杨[1],张靖宇[2],周登禄[1],王贵学[3],严文华[4],赵晓辉[1] (1.陆军军医大学新桥医院心内科,重庆 400037;2.陆军军医大学学员基础医学院三大队,重庆 400038;3.重庆大学生物工程学院,重庆 400044;4.重庆医科大学附属第二医院血管疝腹壁外科,重庆 400010)

[摘 要] **目的** 建立大鼠主动脉支架术动物模型,为冠状动脉支架再狭窄等研究提供实用的小动物平台。**方法** SD雄性大鼠18只(500~700 g),麻醉消毒后,经左髂动脉切口于肾动脉分叉处上方10 mm的腹主动脉处行2.5 mm×16.0 mm支架植入,缝合左髂动脉切口。术前及术后即刻、1个月、2个月、6个月对支架段血管进行光学相干断层扫描(OCT)检测分析。**结果** 通过切开髂动脉于大鼠腹主动脉行支架植入术均获成功,无大鼠死亡及跛行。OCT检查结果显示:术前大鼠主动脉内膜显示清晰,直径约2 mm;术后即刻支架钢梁突出内膜、贴壁良好;术后1个月可见内皮细胞覆盖;术后2个月见少量内膜增生;术后6个月可见较明显的内膜增生,未见血栓形成。**结论** 大鼠经髂动脉切开主动脉支架植入可行性强,可通过OCT进行精准评估。

[关键词] 大鼠;主动脉;支架;光学相干断层扫描
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [收稿日期] 2023-05-10

Establishment of rat aortic stenting model and evaluation by optical coherence tomography

DENG Meng-yang[1], ZHANG Jing-yu[2], ZHOU Deng-lu[1], WANG Gui-xue[3], YAN Wen-hua[4], ZHAO Xiao-hui[1] (1. Cardiovascualr Department, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Third Brigade of Students, Basic Medical School, Army Medical University, Chongqing 400038, China; 3. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China; 4. Department of Vascular Hernia Abdominal Wall Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective An animal model of aortic stenting in rats was established to provide a practical small animal platform for the study of in-stent restenosis. **Methods** SD male rats (n=18, 500~700 g) were anesthetized and disinfected. Drug-eluting stents (2.5 mm×16 mm) were implanted into the abdominal aorta 10 mm above the bifurcation of the renal artery via left iliac artery incision, and the left iliac artery incision was sutured. The vessel is evaluated by optical coherence tomography (OCT) before operation, immediately after operation, 1 month, 2 months and 6 months after operation. **Results** Stents were successfully implanted into the aorta of all rats via iliac artery incision, without death or lameness. The results of OCT showed that the intima of the aorta was clear before operation, with a diameter of about 2 mm; Immediately after operation, the stent steel beam had prominent intima and good adhesion; Endothelial cell covered the stent 1 month after operation; A small amount of intimal hyperplasia was observed 2 months after operation; There was obvious intimal hyperplasia 6 months after operation, and no thrombosis was found. **Conclusion** The stent implantation through iliac artery incision in aorta of rats is highly feasible and can be accurately evaluated by OCT.

Keywords: rat; aorta; stenting; optical coherence tomography

冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)的病理基础是粥样斑块形成,可引起冠状动脉狭窄甚至闭塞,最终导致心肌梗死及猝死等严重后果,致死、致残率高,是威胁人类健康的重大疾病[1]。冠状动脉介入治疗是目前冠心病治疗的重要手段,目前我国年介入治疗例数已经突破100万例[2]。因此,深入研究冠状动脉支架植入后血管病理生理变化及生物学机制具有非常重要的科学价值和社会意义。

动物模型是冠心病介入治疗临床前期研究的重要平台,由于小动物具有基因改型技术成熟、繁殖快、维持消耗少等优点,成为基础科学研究的重要对象。我们既往建立兔髂动脉双支架模型[3],为分叉病变双支架内再狭窄及血栓发生提供了良好的模型。本研究拟探讨建立大鼠主动脉支架植入模型的可行性,为冠状动脉介入基础研究提供可用的小动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD雄性大鼠18只(由陆军军医大学新桥医院实验动物中心提供),体质量500~700 g。动物实验符合

[基金项目] 中国博士后科学基金(2022MD713708);重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-bshX0069)

[通信作者] 赵晓辉,E-mail:doctorzhaoxiaohui@yahoo.com;严文华,E-mail:306331@cqmu.edu.cn

重庆大学动物伦理委员会的要求。每个过程都遵循实验动物的伦理准则。

1.2 药品与器械

器械:雷帕霉素涂层2.5 mm×16.0 mm药物洗脱支架(山东百多安医疗器械股份有限公司,L605钴铬合金)、PTCA导丝(美国雅培公司)、压力泵、眼科镊、眼科剪等。麻醉药物:乳化异氟烷(吉林省华牧动物保健品有限公司)、戊巴比妥(德国默克公司)。肝素钠注射液购自常州千红生化制药股份有限公司;注射用庆大霉素购自山东鲁抗医药股份有限公司;生理盐水购自四川科伦药业股份有限公司。设备:光学相干断层扫描(optical coherence tomography,OCT)仪购自美国雅培公司。

1.3 操作步骤及手术要点

术前准备:所有动物在术前3 d喂食阿司匹林(5 mg·kg^{-1}·d^{-1},拜阿司匹灵)+硫酸氢氯吡格雷(1.5 mg·kg^{-1}·d^{-1},波立维)至处死取样结束,以防止支架植入后血栓形成。术前禁食12 h。

大鼠主动脉支架术模型建立(图1):腹腔注射8%乳化异氟烷(0.5 mL/100 g),约2 min后大鼠失去意识,剪去多余毛发后,用脱毛膏去除腹部毛发。碘伏消毒后30 s用70%乙醇脱碘,沿腹中线将皮肤和肌肉层剪开以暴露腹腔,显微镊钝性分离暴露腹主动脉、右髂动脉和左髂动脉。3-0缝合线暂时阻断腹主动脉、左髂动脉和右髂动脉的血流,支架通过左髂动脉切口插入肾动脉分叉处上方10 mm的腹主动脉,并通过将球囊导管加压至10 ATM保持30 s来展开,然后放气30 s以保持负压。这个过程需要重复3次,以保证支架完全展开。然后,将负压的球囊导管慢慢拔出,同时确保支架留在原位。恢复腹主动脉和右髂动脉的血流后,用9-0可吸收缝合线缝合左髂动脉的切口,恢复左髂动脉血流,将脏器位置恢复原位后,用3-0可吸收缝合线层层缝合肌肉层和皮肤层。碘伏消毒后,将大鼠侧身置于光照保温环境下,以保证其快速苏醒,以苏醒后24 h内其后肢都可以正常活动、无供血异常等视为手术成功。术后3 d内所有大鼠注射庆大霉素(50 mg/kg)。

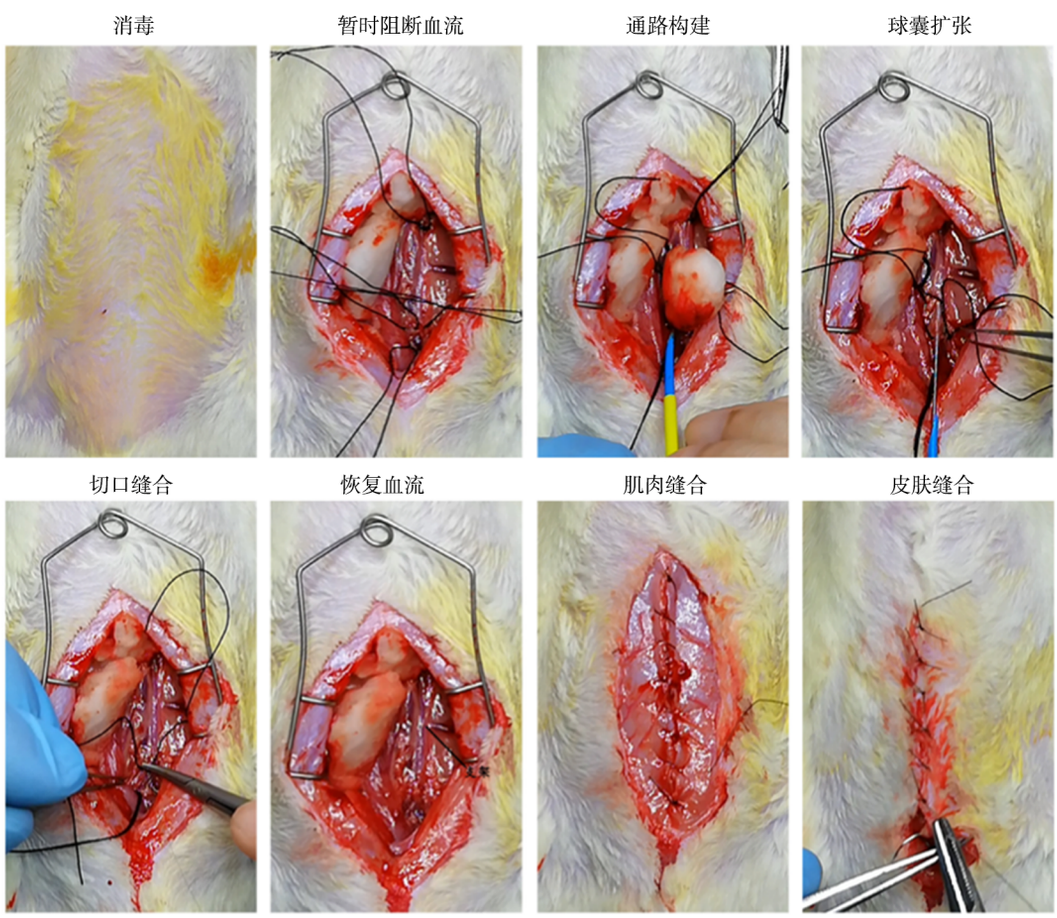


图1 大鼠主动脉植入支架过程

1.4 大鼠主动脉支架OCT及组织学评估

给予大鼠静脉注射过量4%戊巴比妥(1 mg/kg)后,用100 U/mL肝素钠心脏灌注加压去除多余的血细胞(直至灌注出的液体呈无色),并加压灌注4%多聚

甲醛维持血管形态。加压灌注30 min后,仔细取出支架段血管并固定在4%多聚甲醛中,以便后续进行OCT检测。

利用PTCA导丝预置于支架内,将OCT成像导管头端装配于BMW导丝上,然后送入支架超过支架远端2 cm。设定OCT影像系统回撤速度为1 mm/s,获取图像的速度为15帧/秒。

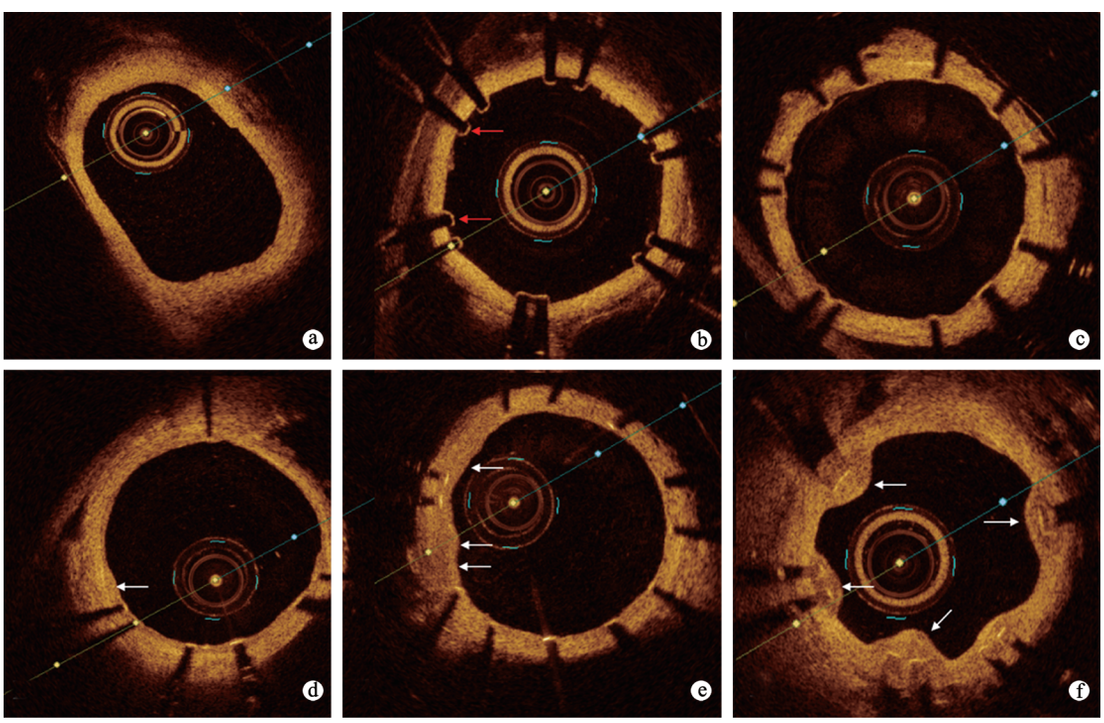
2 结果

2.1 手术一般情况

共有18只大鼠进行了支架植入,成功率100%。平均植入时间约30 min,无大鼠死亡及下肢跛行。

2.2 OCT检查结果

OCT检查提示:术前内膜显示清晰,主动脉血管直径约2 mm(图2a);术后即刻支架钢梁显影清晰,扩张良好,膨胀率95%,无贴壁不良及支架内血栓(图2b);术后1个月支架钢梁有内皮细胞覆盖,无贴壁不良及支架内血栓(图2c);术后2个月及3个月支架钢梁被新生内膜覆盖,局部增生,未见支架内血栓(图2d、e);术后6个月支架钢梁被新生内膜覆盖,局部增生明显,未见支架内血栓(图2f)。



a:术前;b:术后即刻(红色箭头指支架钢梁);c:术后1个月;d:术后2个月(白色箭头指局部增生);e:术后3个月(白色箭头指局部增生);f:术后6个月(白色箭头指局部增生)

图2 大鼠主动脉支架前后OCT检查

3 讨论

本研究在国内首次报道了经髂动脉大鼠主动脉支架植入技术,且植入技术和检测方法也与既往报道有差异,为冠状动脉介入治疗的研究提供了新的小动物模型。

冠状动脉介入动物模型构建是冠状动脉研究不可或缺的一个手段,猪冠状动脉和兔髂动脉支架模型是被广泛采用的模型[3-4],但是由于花费高等缺点限制了其应用。既往研究也报道了大鼠颈动脉或主动脉支架植入的相关模型[5-7],但是由于大鼠颈动脉直径小,所以需要特殊设计的支架等器械。而大鼠主动脉与人体冠状动脉直径相差较小,相似性较强,较适合进行相关模型的建立。

目前通过几种途径进行主动脉支架植入,包括经颈动脉途径、腹主动脉切开、髂动脉及股动脉途径[6-10]。有研究发现,腹主动脉切开由于术中长时间阻断腹主动脉血流,会导致支架内血栓的发生率增加及实验动物死亡率增加[9];经颈动脉及股动脉途径操作难度较大,学习曲线长,并发症发生率高;而经髂动脉途径可能是较合适的植入路径[9-10]。

本研究利用SD大鼠成功建立主动脉支架植入模型,而且经髂动脉切开途径操作较简单、学习曲线较短,通过3~5只大鼠进行练习即可。支架内血栓是大鼠主动脉支架的主要并发症,这可能与阻断血流时间

较长、肝素化不充分、支架扩张不全等有关，但本研究中未发现支架内血栓形成，提示该方法具有较好的稳定性。这可能与以下因素有关：①采用的是经髂动脉途径，操作时间较短；②术前采用双联抗血小板；③支架球囊10 ATM扩张3次，支架膨胀较好；④大鼠体质量大，血管直径较大。

OCT是一门新兴的断层扫描成像技术，其原理是利用近红外光扫描血管内、血管壁及其周围组织的结构，通过记录不同生物组织的反射光，产生高分辨率的组织显微图像，能有效指导疾病的诊断和治疗[11]。OCT最大的优势是分辨率高，可达10 μm，穿透力2~3 mm[12]。其在识别冠状动脉斑块（尤其是易损斑块）、巨噬细胞数量、支架植入后结构改变及内膜增生、内膜厚度、血栓形成等方面具有非常重要的应用价值。

本研究利用OCT评价大鼠主动脉支架植入后的支架结构、病理、血栓等变化，结果发现大鼠主动脉没有内、中、外膜三层结构，与人类冠状动脉结构不同，但与人的肺动脉OCT影像相似。原因可能如下：①主动脉OCT影像结构与冠状动脉本身有差异；②本研究使用的大鼠周龄较大，血管弹性更差，这可能与心血管系统细胞组成有关[13]；③大鼠主动脉经多聚甲醛固定后，血管失去原有的血管弹性，相对来说弹力板结构更薄，而活体OCT的血管结构与组织切片的内、中、外膜不同[14]。

另外，本研究术后OCT提示支架显影清晰，对判断植入后膨胀、贴壁情况，支架内血栓的发生均有较好的效果；术后1个月内皮化基本完成，在术后2个月时部分管壁内膜增生增加，与既往研究报道的4~6周内膜增生最明显[15]基本一致；术后6个月内膜增生依然在不断增长。

然而本研究也存在一定局限性：①动物数量较少，仅仅是验证其可行性和准确性，未对血管结构及支架内膜增生等进行系统性评估；②时间点分组不够细，对内膜增生的长期发展情况缺乏评价；③没有进行活体血管腔内影像检测。

本研究报道了经髂动脉切开大鼠主动脉支架植入技术，随访时间较长，并且利用OCT观察了支架植入后的病理生理变化，为冠状动脉介入治疗的研究提供了新的小动物模型和较好的评价方法。

[参考文献]

[1] Mortensen MB, Dzaye O, Btker HE, et al. Low-density lipoprotein cholesterol is predominantly associated with atherosclerotic cardiovascular disease events in patients with evidence of coronary atherosclerosis: the western denmark heart registry[J]. Circulation, 2023, 147(14): 1053-1063. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.122.061010.

[2] 沈 雳，李晨光，吴轶喆，等.《中国心血管医疗器械产业创新白皮书(2021)》概要[J]. 中国介入心脏病学杂志，2022，30(4)：251-258. doi:10.3969/j.issn.1004-8812.2022.04.002.

[3] 肖 寒，谭亚军，王玉清，等. 兔腹主动脉分叉双支架术模型的建立[J]. 第三军医大学学报，2017，39(10)：971-976. doi:10.16016/j.1000-5404.201701075.

[4] Xiao H, Chen S, Wang G, et al. A "Jail Escape Technique" (JET) for distal side branch wiring during provisional stenting: Feasibility and first-in-man study[J]. J Interv Cardiol, 2017, 30(6): 527-534. doi: 10.1111/joic.12456.

[5] Fishbein I, Alferiev I, Bakay M, et al. Local delivery of gene vectors from bare-metal stents by use of a biodegradable synthetic complex inhibits in-stent restenosis in rat carotid arteries[J]. Circulation, 2008, 117 (16): 2096-2103. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.746412.

[6] Roks AJM, Henning RH, van Boven AJ, et al. Rat abdominal aortic stenting: a simple model displaying in-stent restenosis [J]. Am J Cardiol, 2002, 89(9): 1149-1150. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02185-9.

[7] Lowe HC, James B, Khachigian LM. A novel model of in-stent restenosis: rat aortic stenting[J]. Heart, 2005, 91(3): 393-395. doi:10.1136/hrt.2003.028076.

[8] Oyamada S, Ma X, Wu T, et al. Trans-iliac rat aorta stenting: a novel high throughput preclinical stent model for restenosis and thrombosis [J]. J Surg Res, 2011, 166 (1): e91-e95. doi: 10.1016/j.jss.2010.11.882.

[9] Langeveld B, Roks AJ, Tio RA, et al. Rat abdominal aorta stenting: a new and reliable small animal model for in-stent restenosis[J]. J Vasc Res, 2004, 41(5): 377-386. doi: 10.1159/000080891.

[10] Cornelissen A, Florescu R, Schaaps N, et al. Implantation of human-sized coronary stents into rat abdominal aorta using a trans-femoral access[J]. J Vis Exp, 2020(165). doi:10.3791/61442.

[11] Teruo S, Hiroyoshi M, Shinji K, et al. Clinical features and lipid profiles of plaque erosion over lipid-rich plaque versus fibrous plaque in patients with acute coronary syndrome[J]. Atherosclerosis, 2022, 360:47-52. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2022.07.008.

[12] Eisuke U, Mitsuaki M, Nathaniel RS, et al. Coronary morphological features in women with non-ST-segment elevation MINOCA and MI-CAD as assessed by optical coherence tomography[J]. Eur Heart J Open, 2022, 2(5): oeac058. doi:10.1093/ehjopen/oeac058.

[13] Abdellatif M, Rainer PP, Sedej S, et al. Hallmarks of cardiovascular ageing[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(11): 754-777. doi: 10.1038/s41569-023-00881-3.

[14] Prati F, Regar E, Mintz GS, et al. Expert's OCT Review Document. Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis[J]. Eur Heart J, 2010, 31(4): 401-415. doi: 10.1093/eurheartj/ehp433.

[15] Zhao X, Huang L, Yin Y, et al. Autologous endothelial progenitor cells transplantation promoting endothelial recovery in mice [J]. Transpl Int, 2007, 20(8): 712-721. doi: 10.1111/j.1432-2277.2007.00497.x.

（编辑：杨 颖）