

## 大鼠及家兔颈动静脉分流的建立与肺动脉高压的观察

吴宇, 光雪峰, 戴海龙

(昆明医科大学附属延安医院 云南心血管病医院心内科, 云南昆明 650051)

**[摘要]** **目的** 为先心病合并肺动脉高压的研究建立合适的动物模型。 **方法** 选用 20 只 SD 大鼠, 分为分流组 ( $n_1=10$ , 用动脉套管法建立分流) 和对照组 ( $n_2=10$ , 仅结扎同侧颈总动脉、颈外静脉)。选用 24 只雄性新西兰大白兔, 分为分流组 ( $n_1=12$ , 采用左侧颈总动脉-左侧颈外静脉端侧吻合的方式建立分流) 和假手术组 ( $n_2=12$ , 处理同大鼠对照组)。大鼠组和家兔组分别在术后饲养 10 周后观察肺动脉高压评估指标。 **结果** 大鼠组: 术后 1 月即发现分流均闭塞。肺动脉压测量失败, 右心室肥厚指数 2 组之间无差异。但 WT% 和 WA% 之间有差异 ( $P<0.05$ )。家兔组: 术后 10 周仅有 1 只存在分流, 2 组之间其右心室收缩压、右心室肥厚指数、WT% 及 WA% 均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。 **结论** 家兔模型进行进一步改进后较适合建立分流型肺动脉高压动物模型。

**[关键词]** 先心病相关性肺动脉高压; 大鼠; 家兔; 颈动-静脉分流

**[中图分类号]** R543.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 10-0001-05

## Establishment of Carotid Artery-vein Shunt Model in Rats and Rabbits and Observation of Pulmonary Arterial Hypertension

WU Yu, GUWANG Xue-feng, DAI Hai-long

(Dept. of Cardiology, Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a suitable animal model for studies of pulmonary hypertension associated with congenital heart disease. **Methods** The 20 male SD rats were randomly divided into shunt group ( $n_1=10$ , which were used a polyethylene casing to creat a shunt between the left common carotid artery and the left external jugular vein and control group ( $n_2=10$ , which were ligated left common carotid artery and external jugular vein). The 24 male New Zealand white rabbits as experimental subjects and were randomly divided into shunt group ( $n_1=12$ , which were used the left carotid artery-the left external jugular vein end to side anastomosis way to create diversion,) and control group ( $n_2=12$ , which used the same method as rat control group). After 10 weeks we tested the some indicators to observe the changes of pulmonary hypertension in rats and rabbits. **Results** Rats: The shunts were closed after 1 month. The pulmonary vascular remodeling index (WT% and WA%) had difference ( $P<0.05$ ), the right ventricular hypertrophy index of two groups had no difference ( $P>0.05$ ). Rabbits: There was only 1 shunt signal detected after 10 weeks. The pulmonary vascular remodeling index (WT% and WA%) had difference ( $P>0.05$ ), the right ventricular hypertrophy index and right ventricular systolic pressure of two groups had no difference ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The rabbits shunt pulmonary hypertension model can be established for subsequent research.

**[Key Words]** Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease; Rat; Rabbit; Carotid artery-venous shunt

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (81360037); 云南省自然科学基金资助项目 (2012FB009)

**[作者简介]** 吴宇 (1988~), 女, 山东威海市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事心内科临床工作。

**[通讯作者]** 光雪峰. E-mail: gxfrm@yahoo.com.cn

先心病相关性肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease, PAH-CHD) 多见于左向右分流的先天性心脏病患者, 其属于动脉型肺高压。目前, 对此类肺动脉高压发病机制尚无明确的了解。因此, 建立出接近人体分流性肺动脉高压的动物模型对了解其发病机制是非常有必要的。目前多采用体-肺分流的方式建立模型。笔者通过以下方法进行研究, 探究哪种方式构建的模型更具有可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与器械准备

健康的 SD 大鼠 20 只, 体重范围为 250 ~ 300 g, 雄性, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 分为分流组 ( $n_1 = 10$ ) 和假手术组 ( $n_2 = 10$ )。健康的新西兰大白兔 24 只, 体重范围为 2.5 ~ 3 kg, 雄性, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 分为分流组 ( $n_1 = 12$ ) 和假手术组 ( $n_2 = 12$ )。

器械准备: 大鼠手术器械、家兔手术器械、压力换能器、3%戊巴比妥钠、肝素、青霉素等。

### 1.2 模型制备

大鼠组用套管法制备分流模型; 大鼠分流组方法参考杜福杰等<sup>[1]</sup>的方法。用 3% 的戊巴比妥腹腔麻醉 (1.2 mL/kg) 大鼠, 手术切口为左上颌线中点至左侧锁骨中点的连线。切开皮肤后, 游离出颈外静脉, 依照 0.2 mg/100g 的计量予大鼠腹部皮下注射肝素生理盐水 (1 g/mL)。继而游离左侧颈总动脉。阻断近心端血流, 结扎颈动脉远心端并离断动脉, 准备 1 个带 2 个尾巴的自制聚乙烯套管 (长度大约 0.3 cm, 不包括尾巴), 套在有游离好的颈动脉上, 并将动脉内膜外翻固定于套管上制成动脉套管后备用, 将动脉套管与之前游离好的静脉连接, 颈外静脉可见动脉血充盈, 并伴有搏动, 提示分流模型建立成功。小心减去套管尾巴, 术口撒适量青霉素粉末, 关闭术口, 术后背部皮下注射 10 万 U 青霉素, 连续注射 3 d 抗感染。术后 1 周每日皮下背部注射肝素 (1 g/mL), 每日饲喂阿司匹林 10 mg, 持续给药 1 月。假手术组处理仅将游离出的动静脉分别结扎即可关闭术口。

家兔分流组采用颈动静脉吻合合法新西兰大白兔称重, 麻醉后纵行切开气管左侧皮肤, 游离出左颈外静脉及左颈总动脉, 静脉予以肝素化后进行左侧颈总动脉与同侧颈外静脉端侧吻合术。术毕撒适量青霉素粉并关闭术口, 皮下青霉素抗

感染 7 d [40 万 U/ (只 × d)], 皮下低分子肝素抗凝 2 周 [186 U/ (kg × d)], 每日饲喂 50 mg 阿司匹林, 持续给药 3 月。家兔假手术组处理同大鼠假手术组。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 大鼠与家兔术后 10 周的一般情况** 包括分流通畅率及存活率。

**1.3.2 术后 10 周, 2 组实验动物的血流动力学改变** 大鼠采用开胸穿刺右室流出道方法测量右室收缩压。

家兔采用右心导管的方式测量右心室收缩压。笔者参考 Liu R 等<sup>[2]</sup>的方法进行右心室测压: 将 6F 动脉鞘管进行修剪, 使鞘管长度长约 8 cm。家兔称重、麻醉并切开右侧颈部皮肤, 将充满肝素盐水的右心导管插入右侧颈外静脉并送至右心室, 即可进行测压。记录数据后用空气栓塞的方法处死家兔进行取材。

**1.3.3 右心室肥厚指数** 动物测压完毕后, 处死动物, 取出心脏, 游离出右室游离壁 (RV), 室间隔 + 左心室 (LV+S)。根据公式: 右室肥厚指数 = 右室重量 / (左室重量 + 室间隔重量) × 100%, 计算右室肥厚指数, 并作统计学处理。

**1.3.4 肺小动脉管壁厚度占管径的百分比 (WT%) 及管壁横截面积占血管总横截面积的百分比 (WA%) 的检测** 从处死的实验动物的胸腔中, 小心并完整的摘取肺脏, 置入 10% 的甲醛固定液中固定, 待肺组织固定好后就可进行取材, 冲洗、石蜡包埋, 切片, 苏木精-伊红染色 (HE) 染色等病理组织切片制作的处理。将切片标本置于普通光镜下, 在大鼠组的每只实验动物的肺部组织病理切片标本中随机选取 3 ~ 5 根管腔近似圆形或者椭圆形的肺小动脉, 管径约在 30 ~ 100 μm, 运用 M379-E-15-NIS-Elements-BR-V.3.22 病理图文分析系统测定肺动脉管壁厚度 (WT)、管径 (ED)、管腔横截面积 (LA) 以及血管总横街面积 (TA), 计算 WT% (WT% =  $2 \times WT/ED \times 100\%$ ) 及 WA% (WA% =  $[1 - (LA/TA)] \times 100\%$ )。家兔组选取的动脉管径约 50 ~ 100 μm, 测量内容与方法同大鼠组。

### 1.4 统计学处理

所有计量资料都以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 软件已对各参数间进行成组 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

## 2.1 大鼠组

**2.1.1 存活情况** 分流组: 6 只大鼠术后死亡, 存活率 40%。假手术组: 10 只大鼠均存活至术后 1 月, 存活率 100%。

**2.1.2 颈部动静脉分流情况的观察** 术后 1 月发现分流均闭塞, 终止大鼠组实验, 见表 1。

表 1 分流组大鼠颈动-静脉通畅情况

Tab. 1 The patency situation of carotid artery-vein in rats in shunt group

分流通畅情况	术后即刻	术后 1 月
通畅 ( <i>n</i> )	10	0
闭塞 ( <i>n</i> )	0	6
通畅率 (%)	100	0

**2.1.3 实验动物肺动脉高压改变** (1) 右心室收缩压: 大鼠组因心脏、血管条件所限, 采用开胸直视行右室流出道穿刺的方法测压。但因无气管插管供氧条件, 大鼠开胸后即刻气胸死亡, 右心室收缩压测量失败; (2) 右室肥厚指数: 大鼠分流组与假手术组相比, 其右室肥厚指数无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 见表 2; (3) 病理切片: 光镜下可见, 分流组大鼠的肺动脉出现狭窄、闭塞等情况, 在管腔内可见血栓形成; 肺动脉内膜细胞排列紊乱, 中膜肌层呈偏心性增厚, 中膜肌层细胞增生明显, 对照组大鼠肺动脉内膜细胞排列规则, 中膜厚度较薄且均匀, 中膜肌层细胞未见明显增生, 分流组与假手术组的 WT% 有差异,  $P = 0.016$ ; 分流组与假手术组的 WA% 也有差异,  $P = 0.002$ , 见表 3。

表 2 分流组和对照组大鼠的右心室收缩压和右室肥厚指数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 2 The ventricular systolic pressure and right ventricular hypertrophy index of rats in shunt group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	右心室收缩压	右室肥厚指数
分流组	-	$57.82 \pm 13.54$
假手术组	-	$63.49 \pm 15.56$

表 3 分流组大鼠及对照组大鼠的 WT% 与 WA% ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 3 The pulmonary vascular remodeling index (WT% and WA%) of rats in shunt group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	WT%	WA%
分流组	$43.69 \pm 12.22^*$	$66.90 \pm 14.60^*$
假手术组	$34.04 \pm 9.90$	$52.42 \pm 9.60$

与假手术组对照组相比,  $^*P < 0.05$

## 2.2 家兔组

**2.2.1 一般情况** 分流组: 术后死亡 5 只, 存活率 58.3%。假手术组: 术前因麻醉过量死亡 1 只, 其余所有家兔均存活至术 3 月, 存活率 92%。

**2.2.2 颈部动静脉分流情况的观察** 术后 10 周仅有 1 只家兔分流存在, 见表 4。

**2.2.3 实验动物肺动脉高压改变** (1) 术后 10 周右心室收缩压及右心室肥厚指数。术后 10 周进行测压, 测量结果见表 5, 可见家兔在分流术后, 手术组和对照组相比无差异,  $P = 0.489$ 。手术组及假手术组的右心室肥厚指数无明显差异性。 ( $P = 0.772$ ); (2) 病理切片检查结果: 手术组的病理切片可见部分分流组家兔肺动脉狭窄甚至闭塞, 管腔内有血栓形成, 部分切片的肺组织可见肺充血, 少量手术组的肺动脉内膜细胞排列紊乱, 中膜的平滑肌层分布不均匀, 部分为偏心性分布, 管腔内可见血栓; 其余的分流组家兔肺动脉内膜较为完整, 中膜的平滑肌层薄且均匀, 未见平滑肌细胞明显增生, 管腔内偶可见血栓形成; 假手术组肺动脉未见明显的狭窄或闭塞, 肺动脉内膜较为完整, 中膜的平滑肌层薄且均匀, 平滑肌细胞未见明显增生, 管腔内偶见血栓形成。分流组与假手术组家兔的肺动脉的 WT% 无差异,  $P = 0.950$ , 手术组与假手术组 WA% 也无差异,  $P = 0.968$ , 详见表 6。

表 4 分流组家兔颈动-静脉通畅情况 (*n*)

Tab. 4 The patency situation of carotid artery-vein in rabbits shunt group (*n*)

分流通畅情况	术后即刻	术后 10 周
通畅 ( <i>n</i> )	12	1
闭塞 ( <i>n</i> )	0	5
通畅率 (%)	100	8.33%

表 5 2 组家兔右室收缩压和右心室肥厚指数的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 5 The ventricular systolic pressure and right ventricular hypertrophy index of rabbits in shunt group and control group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	右心室收缩压 (mmHg)	右室肥厚指数
分流组	$30.65 \pm 7.64$	$25.94 \pm 2.83$
假手术组	$25.21 \pm 12.66$	$26.33 \pm 4.87$

## 3 讨论

先心病相关性肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease, PAH-CHD) 是小儿先天性心脏疾病常见并发症,

表 6 2 组家兔肺动脉在 50 ~ 100  $\mu\text{m}$  范围内时 WT% 及 WA% 的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 6 The pulmonary vascular remodeling index (WT% and WA%) of rabbits in tow groups when the pulmonary artery in 50 ~ 100  $\mu\text{m}$  ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	WT%	WA%
分流组	41.23 $\pm$ 17.85	62.05 $\pm$ 17.85
假手术组	40.94 $\pm$ 13.89	62.25 $\pm$ 16.95

属于体 - 肺分流性肺动脉高压, 疾病的发生机制尚不完全明确, 现在较为认同的观点是: 异常的血流动力学导致血管收缩、血管壁重建及原位血栓形成这 3 种因素<sup>[3-6]</sup>的综合作用下使肺血管阻力进行性升高形成肺动脉高压. 而最新研究提示, 肾素 - 血管紧张素 II 和内皮素在肺血管结构重构中发挥着十分重要的作用, 参与了先天性心脏病患者肺动脉高压发生和进展的病理生理过程<sup>[5,7]</sup>.

在早期, 已经有许多学者尝试在大型动物上构建分流制作肺动脉高压模型, 基本都很成功<sup>[8-11]</sup>. 但大型动物模型制作复杂, 不易于大量复制用于研究, 因此考虑制作小型动物模型. 而目前较为得到认可的方法为括套管法和动静脉法. 笔者将这 2 种方法在不同动物身上进行实验并发现, 套管法虽然不需要用到吻合技术, 但在肉眼直视下翻膜困难, 且由于异物的存在 (套管) 大鼠颈部的异物炎症反应较重, 分流形成没多久就闭塞. 动静脉吻合术所构建的分流持续时间较长, 但吻合口闭塞率也不低, 提示吻合技术是决定分流持续时间长短的一个必要影响因素.

从病理切片观察可明确, 尽管 2 种方法都能使实验动物肺动脉产生肺高压的改变, 但 2 种方法的分流率都底下, 其根本原因考虑都是因内皮细胞受到损伤 (包括血液动力学产生改变, 建模时手术不可避免的损伤) 引起了血管内膜增生<sup>[12,13]</sup>, 血栓形成<sup>[14]</sup>, 最终导致分流闭塞, 这些都提示足量的给予抗凝、抗血小板药物是非常重要的. 而如何长期给予实验动物足量、精准的抗凝、抗血小板药物则是目前的难点.

当然, 还有其他因素导致分流闭塞. 一种是异物炎症反应 (套管, 缝线)<sup>[14]</sup>. 笔者的实验充分证明了这一点. 另一种是吻合口狭窄: 由于操作技术所限, 很有可能使吻合口狭窄. 狭窄的吻合口可导致血管所承受的剪切应力发生异常, 从而损伤血管内膜引起内膜增生反应. 危当恒等<sup>[15]</sup>的实验证实这一点.

家兔组虽然有 1 例分流维持到了术后 10 周, 但由于存活家兔数量较少, 导致数据分析时样本量少, 统计学结果存在偏差.

尽管实验结果不尽人意, 但从实验的结果可知, 以家兔作为实验动物, 用动静脉吻合的方式构建分流是较为可行的. 其可行性如下: (1) 血管较粗, 容易操作, 分流量大, 相对不容易闭塞; (2) 动静脉吻合目前已经广泛应用于临床, 是非常成熟的技术, 因此在实验中, 若吻合技术能得到保障, 那么相信分流的通畅率也能提高. 除此之外, 由于家兔心脏较大, 收集右室收缩压也较为方便, 能够较为准确的评估实验动物血流动力学改变情况; (3) 如何以易操作、精准的方式给予实验动物抗血小板、抗凝药物是下一步待研究的对象.

#### [参考文献]

- [1] 杜福杰, 潘丽萍, 李福海. 套管连接法建立高血流大鼠肺动脉高压模型[J]. 中国医疗前沿: 学术版, 2008, 12 (6): 7 - 12.
- [2] LIU R, WU S, CAO G, et al. Transfection of human hepatocyte growth factor gene inhibits advancing pulmonary arterial hypertension induced by shunt flow in a rabbit model[J]. Transplant Proc, 2013, 45(2): 705 - 712.
- [3] MICHEL T, VANHOUTTE P M. Cellular signaling and NO production [J]. Pflugers Arch, 2010, 459 (6): 807 - 816.
- [4] 汪圣毅, 王玉琦, 符伟国, 等. 细胞成分在血管内膜增生中的作用 [J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11 (7): 553 - 554, 556.
- [5] GALIE N, TORBICKI A, BARST R, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. Eur Heart J, 2004, 25(6): 2 243 - 2 278.
- [6] GALI N, HOEPER M M, HUMBERT M, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), Endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. Eur Heart J, 2009, 30 (20): 2 493 - 2 537.
- [7] 范文斌, 乔建华. 先天性心脏病合并肺动脉高压手术后血浆内皮素和肾素 - 血管紧张素 II 变化以及相互关系[J]. 罕少疾病杂志, 2010, 13(6): 10 - 13.
- [8] RENDAS A, LENNOX S, REID L. Aorta-pulmonary shunts in growing pigs. Functional and structural

(下转第 27 页)

- (4):435-445
- [4] GE L, RATCLIFFE M. The Use of Computational flow modeling (CFD) to determine the effect of left ventricular shape on blood flow in the left ventricle [J]. *Ann Thorac Surg*, 2009, 87(4): 993-994.
- [5] TANAKA M, SAKAMOTO T, SUGAWARA S, et al. Blood flow structure and dynamics, and ejection mechanism in the left ventricle: analysis using echo-dynamography [J]. *J Cardiol*, 2008, 52 (2): 86-101.
- [6] MONIN J L, DEHANT P, ROIRON C, et al. Functional assessment of mitral regurgitation by transthoracic echocardiography using standardized imaging planes diagnostic accuracy and outcome implications [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(2): 302.
- [7] 叶木奇, 刘晓真, 姜海明, 等. 经食管实时三维超声心动图在二尖瓣脱垂解剖定位中的应用价值[J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(11): 1 831-1 832.
- [8] BEN-ZEKRY S, NAGUEH S F, LITTLE S H, et al. Comparative accuracy of two-and three-dimensional transthoracic and transesophageal echocardiography in identifying mitral valve pathology in patients undergoing mitral valve repair: initial observations [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2011, 24(10): 1 079-1 085.
- [9] MESAS C E, VELOSO H H, DE PAOLA A A. Anticoagulation for atrial fibrillation: underutilization in a Brazilian tertiary outpatient clinic [J]. *Clin Cardiol*, 2004, 27 (11): 592-593.
- [10] NESSER H J, MOR-AVI V, GORISSEN W, et al. ventricular volumes using three-dimensional echocardiographic speckle tracking: comparison with MRI [J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(13): 1 565-1 573.
- [11] 陈剑, 丁云川, 尹帆, 等. 前壁心肌梗塞患者左室壁三维运动与左室流场变化相关性研究[J]. *昆明医科大学学报*, 2014, 35(10): 65-69.
- [12] 王庆慧, 丁云川, 陈剑, 等. 三维斑点追踪技术在评价冠心病患者左心室扭转中的应用[J]. *实用医院临床杂志*, 2012, 9(5): 19-21.
- (2015-03-22 收稿)

(上接第 4 页)

- assessment of the changes in the pulmonary circulation [J]. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1979, 77(1): 109-118.
- [9] FASULES J W, TRYKA F, CHIPMAN C W, et al. Pulmonary hypertension and arterial changes in calves with a systemic-to-left pulmonary artery connection [J]. *Journal of Applied Physiology*, 1994, 77(2): 867-875.
- [10] REDDY V M, WONG J, LADDIROAT J R, et al. Altered endothelium-dependent vasoflctive responses in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow [J]. *Am J Physiol*, 1996, 40(7): 562-570.
- [11] MICHEL R P, HAKIM T S, HANSON R E, et al. Distribution of lung vascular resistance after chronic systemic-to-pulmonary shunts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1985, 249(6): H1 106-H1 113.
- [12] WILCOX J N. Restenosis and related proliferative vasculopathies Advential remodeling associated with restenosis [J]. *Vasc Surg*, 1988, 27(7): 1 652-1 164.
- [13] 曲乐丰, 王玉琦. 血管内膜增生的研究进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(2): 93-94.
- [14] 催进, 张雅洁. 病理学案例版 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 36-38.
- [15] 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, 6(14): 410-414.
- (2015-03-10 收稿)