

## • 实验研究 Experimental research •

## 兔梭形动脉瘤模型的制作

张连富, 徐善水, 方兴根, 李子付, 江国权

**【摘要】 目的** 利用猪胰弹力酶诱导法制作类似人颅内动脉瘤特点的兔颈内动脉梭形动脉瘤模型。**方法** 采用新西兰大白兔 25 只, 随机分为正常对照组 5 只、0.9%氯化钠溶液对照组 5 只和实验组 15 只, 实验组再随机分为 3 亚组(7、14 和 21 d 组), 每组 5 只。应用猪胰弹性蛋白酶消化兔右侧颈总动脉建立梭形动脉瘤模型, 7、14、21 d 时分别行 DSA 检测、HE 染色、弹力纤维染色观察模型动物的影像学 and 病理学变化。**结果** DSA 造影显示正常对照组血管直径( $1.64 \pm 0.17$ )mm; 0.9%氯化钠溶液对照组血管直径( $1.66 \pm 0.24$ )mm。7 d 组动脉瘤长径和宽径分别为( $19.33 \pm 1.65$ )mm 和( $2.86 \pm 0.21$ )mm; 14 d 组分别为( $19.66 \pm 1.18$ )mm 和( $3.95 \pm 0.54$ )mm; 21 d 组分别为( $19.84 \pm 0.82$ )mm 和( $4.03 \pm 0.95$ )mm。病理学观察发现 7 d 组梭形动脉瘤模型内弹力膜断裂, 中膜平滑肌结构紊乱, 细胞形态扭曲; 14 d 组梭形动脉瘤模型瘤腔内膜逐渐增生稳定; 21 d 组梭形动脉瘤模型瘤颈与瘤腔交界处结构的变化明显。弹力纤维染色显示 7 d 组梭形动脉瘤模型弹力层明显变薄; 14 d 组从交界处始弹力层逐渐变薄; 21 d 组变薄的弹力层基本稳定。**结论** 利用简单外科手术方法结合猪胰弹性蛋白酶消化局部血管壁, 可以建立形态学与人颅内动脉瘤相似的梭形动脉瘤模型, 且动脉瘤模型与人颅内动脉瘤病理结构相似。

**【关键词】** 动脉瘤; 弹性蛋白酶; 动物模型

中图分类号: R743.4 文献标志码: B 文章编号: 1008-794X(2014)-08-0711-05

**Preparation of fusiform aneurysms model in rabbits** ZHANG Lian-fu, XU Shan-shui, FANG Xing-gen, LI Zi-fu, JIANG Guo-quan. Department of Neurosurgery, Second People's Hospital of Anhui Province, Hefei, Anhui Province 230041, China

Corresponding author: FANG Xing-gen, E-mail: fangxinggen@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To establish the carotid fusiform aneurysm model in rabbits carrying similar characteristics of human intracranial aneurysms by using induction method with porcine pancreatic elastase. **Methods** Twenty-five New Zealand white rabbits were randomly divided into normal control group ( $n = 5$ ), saline control group ( $n = 5$ ) and study group ( $n = 15$ ). The rabbits of the study group were randomly and equally subdivided into 7-day subgroup, 14-day subgroup and 21-day subgroup. By using induction method with porcine pancreatic elastase to digest right common carotid the fusiform aneurysm model was established in all the rabbits of the study group. DSA examination, HE staining and elastic fiber staining pathologic examination were carried out at 7, 14 and 21 days after the procedure to observe the imaging and pathologic changes of the fusiform aneurysm models. **Results** DSA angiography showed that the mean vascular diameters of the normal control group and the saline control group were ( $1.64 \pm 0.17$ ) mm and ( $1.66 \pm 0.24$ ) mm respectively. The mean length and width of the fusiform aneurysm of the 7-day subgroup, 14-day subgroup and 21-day subgroup were ( $19.33 \pm 1.65$ ) mm and ( $2.86 \pm 0.21$ ) mm, ( $19.66 \pm 1.18$ ) mm and ( $3.95 \pm 0.54$ ) mm, and ( $19.84 \pm 0.82$ ) mm and ( $4.03 \pm 0.95$ ) mm, respectively. Pathologically, rupture of internal elastic membrane, disordered structure of tunica media smooth muscle and distortion of cell shape

were observed in the rabbits of 7-day subgroup. Gradually stabilized aneurysmal lumen intimal hyperplasia was seen in the rabbits of 14-day subgroup. Remarkable structure changes at the aneurysmal neck-cavity junction were found in the rabbits of 21-day subgroup. Elastic fiber staining demonstrated that strikingly thinned

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2014.08.014

基金项目: 弋矶山医院人才引进基金(YR201105)

作者单位: 230041 合肥 安徽省第二人民医院神经外科(张连富); 安徽芜湖 皖南医学院附属弋矶山医院神经外科(徐善水、方兴根、江国权); 上海 第二军医大学长海医院神经外科(李子付)

通信作者: 方兴根 E-mail: fangxinggen@gmail.com

elastic layer was observed in the rabbits of 7-day subgroup, gradually thinning elastic layer at the aneurysmal neck-cavity junction was seen in the rabbits of 14-day subgroup, and the thinned elastic layer became stable in the rabbits of 21-day subgroup. **Conclusion** Using simple surgical method combined with porcine pancreatic elastase to digest vascular wall, carotid fusiform aneurysm models can be reliably established in New Zealand white rabbits which carry similar morphologic and pathologic characteristics of human intracranial aneurysms(J Intervent Radiol, 2014, 23: 711-715)

**【Key words】** aneurysm; elastase; animal model

颅内动脉瘤是较常见的严重脑血管病。颅内动脉瘤破裂出血后会并发危及生命的脑血管痉挛、再出血和急性脑积水等并发症,具有较高的病死率和致残率<sup>[1]</sup>。其形成、生长、破裂等机制尚不清楚<sup>[2]</sup>。梭形动脉瘤是颅内动脉瘤中比较少见的一类动脉瘤,占颅内动脉瘤的 3% ~ 13%<sup>[3]</sup>。由于特殊的形态和地位,其治疗难度较大,风险也比其他颅内动脉瘤高。随着颅内动脉瘤介入治疗材料的不断发展,如何建立类似于人的颅内动脉瘤实验动物模型对于研究动脉瘤的形态结构、组织结构以及介入材料的研发显得十分重要。本研究报道利用猪胰弹性蛋白酶消化兔右侧颈总动脉,建立与人类颅内动脉瘤形态学和病理学相似的梭形动脉瘤模型,并进行相关分析。

## 1 材料与方法

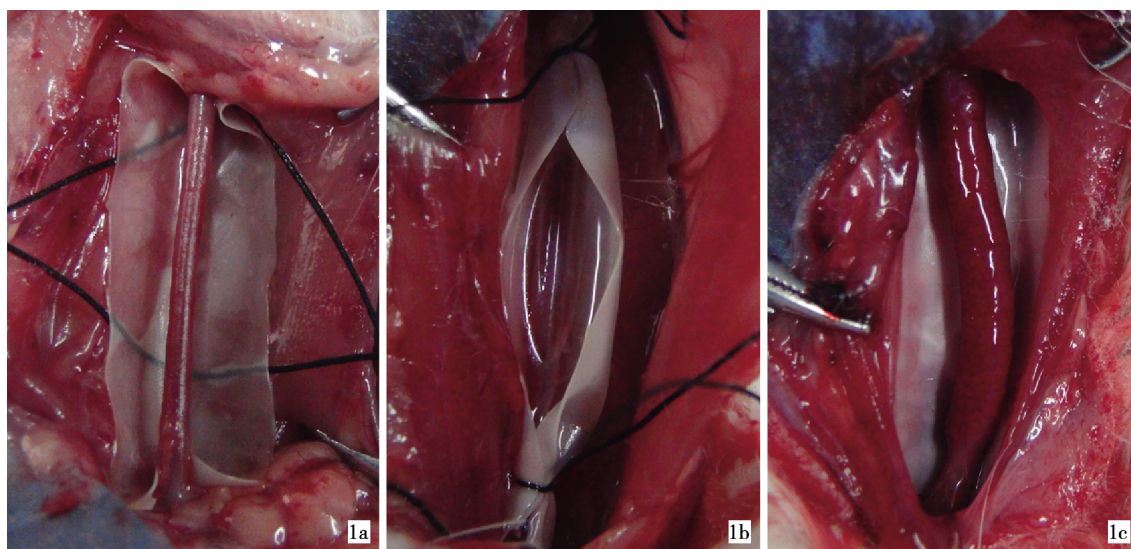
### 1.1 实验动物及分组

健康新西兰大白兔 25 只,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,

购自第二军医大学实验动物中心。将动物随机分为正常对照组 5 只、0.9%氯化钠溶液对照组 5 只和实验组 15 只,实验组再随机分为 7、14 和 21 d 3 个亚组,每组 5 只。

### 1.2 动物模型制备

动物术前 12 h 禁食,用速眠新(0.1 ml/kg)联合 1%戊巴比妥(10 mg/kg)静脉注射麻醉后,沿颈前正中切口,充分暴露右侧颈总动脉,游离出颈总动脉,用外科手术无菌手套制作大小 10 mm × 28 mm 乳胶片,垫于游离出的颈总动脉下,两端用 1 号手术切口缝合线结扎形成一凹槽,限定凹槽长度为 20 mm,向凹槽内注入猪胰弹性蛋白酶(上海林叶生物科技有限公司)80 u,待消化 20 min 后,吸干残留猪胰弹性蛋白酶,松开两端结扎线,用 0.9%氯化钠溶液反复冲洗数次,取出乳胶片,逐层缝合皮肤。对照组用生理盐水代替猪胰弹性蛋白酶,操作步骤同实验组(图 1)。



1a 动物正常右侧颈总动脉消化前

1b 乳胶片包裹右侧颈总动脉猪胰弹性蛋白酶消化

1c 右侧颈总动脉经猪胰弹性蛋白酶消化后

图 1 动物模型建立过程

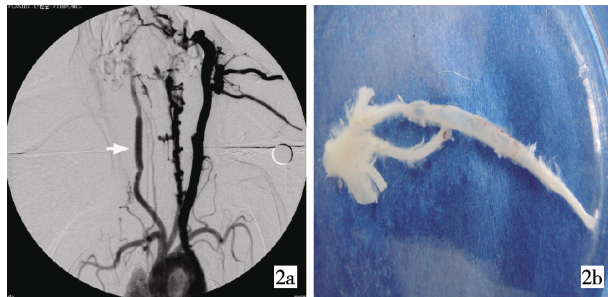
### 1.3 影像学检查

实验组和对照组分别在 7、14 和 21 d 处死前行静脉数字减影血管造影(IVDSA)检查。使用的 DSA

机器(Philps Allura Xper FD20)自带软件测量梭形动脉瘤长径、宽径(图 2a)。

### 1.4 组织学检查

实验组与对照组分别在 7、14、21 d 造影后灌注处死,取出右侧颈总动脉动脉瘤标本置 4%多聚甲醛固定 24 h 以上(图 2b),常规石蜡包埋,切片行 HE 染色、弹力纤维染色。



2a 箭头示梭形动脉瘤模型

2b 大体标本

图 2 21 d 时梭形动脉瘤模型的造影

### 1.5 统计学方法

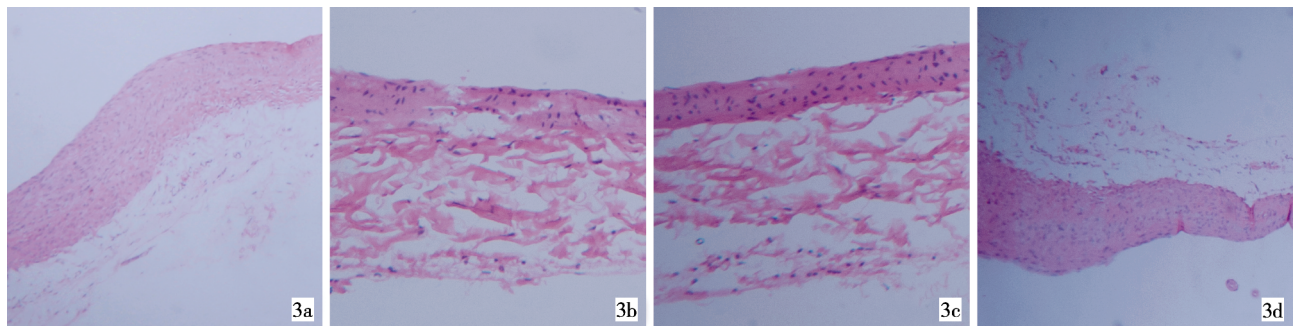
应用 SPSS16.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,对各组数据进行正态性和方差齐性检验,组间两两比较采用两独立样本  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

采用简单的外科手法,结合猪胰弹性蛋白酶局部消化包裹实验兔右侧颈总动脉壁,20 min 后即可见动脉局部膨胀,血管壁呈暗红色,动脉瘤搏动明显。

### 2.1 对照组和实验组术后病理所见

0.9%氯化钠溶液对照组术后 7、14 和 21 d 时大体解剖发现右侧颈总动脉与周围组织无粘连,血管壁无膨胀,搏动正常。0.9%氯化钠溶液对照组和正常对照组颈总动脉冠状切片 HE 染色显示血管壁内膜、中膜、外膜分层清楚,弹性纤维染色见 10 余层弹性层,结构完整。实验组术后 7、14 和 21 d 时造影后灌注解剖发现右侧颈总动脉与周围组织轻度粘连,颈总动脉局部形成梭形凸起,搏动明显。HE 染色显示 7 d 组的梭形动脉瘤模型内膜相对减少变薄;14 d 组的模型瘤腔内膜逐渐增生;21 d 组梭形动脉瘤模型增生的内膜增生趋于稳定(图 3)。弹力纤维染色显示 7 d 组梭形动脉瘤模型弹力层明显变薄,14 d 组从交界处始弹力层逐渐变薄;21 d 组从交界处始弹力层基本稳定(图 4)。

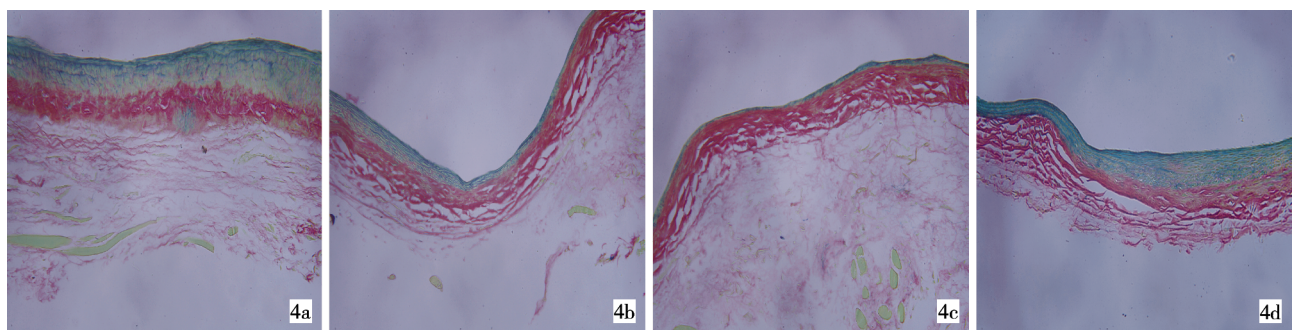


3a 0.9%氯化钠溶液对照组颈总动脉内膜、中膜、外膜结构完整

3b 实验组(7 d)梭形动脉瘤模型内弹力膜断裂,中膜平滑肌结构紊乱,细胞形态扭曲

3c 实验组(14 d)梭形动脉瘤模型

3d 实验组(21 d)梭形动脉瘤模型瘤颈与瘤腔交界处结构的变化

图 3 对照组和实验组术后颈总动脉膜结构变化(HE,  $\times 200$ )

4a 对照组颈总动脉弹力层完整

4b 实验组(7 d)从交界处始弹力层逐渐变薄

4c 实验组(14 d)梭形动脉瘤模型弹力层明显变薄

4d 实验组(21 d)从交界处始弹力层

图 4 对照组和实验组术后颈总动脉弹力层变化(弹力纤维染色,  $\times 200$ )



## 2.2 对照组和实验组影像学表现

与 0.9%氯化钠溶液对照组相比,实验组在猪胰弹力酶消化前血管直径无明显区别;0.9%氯化钠溶液对照组在消化 20 min 后血管直径增大不明显;而实验组在消化 20 min 后及 7、14 和 21 d 后的血管直径明显增大。造模后 7 d,经兔耳缘静脉造影检查测量正常对照组血管直径为  $(1.64 \pm 0.17)$  mm;0.9%氯化钠溶液对照组血管直径为  $(1.66 \pm 0.24)$  mm;实验组 7 d 动脉瘤长径平均值为  $(19.33 \pm 1.65)$  mm,宽径平均值为  $(2.86 \pm 0.21)$  mm;14 d 造影检查测量动脉瘤长径平均值为  $(19.66 \pm 1.18)$  mm,宽径平均值为  $(3.95 \pm 0.54)$  mm;21 d 造影检查测量动脉瘤长径平均值为  $(19.84 \pm 0.82)$  mm,宽径平均值为  $(4.03 \pm 0.95)$  mm。实验组术后 7、14、21 d 造影的动脉瘤长径间的两两比较应用配对样本 *t* 检验,差异均无统计学意义( $P < 0.05$ )。正常对照组与 0.9%氯化钠溶液对照组组间比较差异无统计学意义;实验组 14 d 组与 21 d 组组间比较差异无统计学意义,其余实验组与正常对照组和 0.9%氯化钠溶液对照组两两组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

近年,利用弹性蛋白酶诱导以制作实验动物动脉瘤模型的研究较为流行<sup>[4]</sup>。在颅内动脉瘤实验动物模型的研究中,Aassar 等<sup>[5]</sup>通过对弹性蛋白酶诱导的兔颈动脉囊状动脉瘤的病理学和分子生物学研究发现,该模型在血流动力学和组织病理学方面都非常接近人类颅内囊状动脉瘤,相对采用高血压和血管吻合技术制作的动脉瘤模型更为理想。在利用实验动物的颈总动脉经过弹性蛋白酶消化以诱导出所需的动脉瘤模型的研究中,大部分以囊形动脉瘤为主。梭形动脉瘤模型的研究相对较少。早期,国内有学者通过结扎大鼠一侧颈外动脉,利用游离近端插管向颈总动脉腔内注入弹性蛋白酶,成功地诱导出梭形动脉瘤,但其结扎了大鼠的一侧颈外动脉,在一定的程度上改变了局部血流的走向<sup>[6]</sup>。Reinald 等<sup>[7]</sup>用不同剂量的弹力酶通过兔右侧颈总动脉血管腔内消化制作梭形动脉瘤模型,并通过鉴定平滑肌细胞、巨噬细胞、和 MMP-9 的表达,确定 3U 的弹力酶是观察动脉瘤形态、弹力纤维破坏的最佳剂量,弹力酶消化 4 周后,可见巨噬细胞浸润,同时也指出该模型并未清晰地展示人类颅内动脉瘤伴随的动脉粥样硬化改变过程。Bhamidipati 等<sup>[8]</sup>将弹力酶局部浸润大鼠的腹主动脉也能制作出较为

成功的腹主动脉动脉瘤。而通过显微外科嫁接静脉建立梭形动脉瘤则是一种较成功的梭形动脉瘤模型构建方法,但其组织结构明显区别于原发动脉瘤,具有不易自发破裂的缺陷<sup>[9]</sup>。国内学者采用静脉囊移植方法在犬颈总动脉建立梭形动脉瘤,用以评价支架材料在动脉瘤模型中的应用价值,并指出该种动脉瘤模型制作过程操作复杂且与人类动脉瘤模型的病理变化不完全一致<sup>[10]</sup>。也有学者在血管结扎结合弹力酶诱导法和外科缝合静脉移植法制作的兔囊状动脉瘤模型比较中发现,血管结扎结合弹力酶诱导法制作的动脉瘤模型在组织上相对外科缝合静脉移植法更接近于自然发病的动脉瘤<sup>[11]</sup>。

本实验利用弹性蛋白酶结合简易的外科手术所建立的梭形动脉瘤模型具有如下特点:① 没有阻断动脉血管腔内血流,各分支血管血液流向均无大改变,更符合颅内动脉瘤的血流动力学特点。② 大鼠颈总动脉梭形动脉瘤造模前后及术中均未使用肝素等抗凝剂,实验兔的血压基本上也未发生较大波动,病理学改变上更接近于人类梭形动脉瘤在生理环境中受血流动力学作用机制所造成的真实病理损害。③ 本梭形动脉瘤模型的长度得到了很好的控制,通过简单的外科结扎能够造出理想长度的梭形动脉瘤模型。④ 该造模方法操作简便,造模成功率较高,制作的梭形动脉瘤模型形态学和大小与颅内动脉瘤相似,适用于梭形动脉瘤的形成机制、病理学以及介入材料的进一步研究。

在兔颈总动脉梭形动脉瘤造模后动脉瘤形态和病理学观测时间点的选择上,Krings 等<sup>[12]</sup>研究发现弹力酶诱导的兔动脉瘤模型影像学上 2~3 周趋于稳定。综上,我们分别在 7、14 和 21 d 对兔进行动脉血管造影和灌注取材。发现经过约 3 周的血流冲击,兔的颈总动脉梭形动脉瘤具有明显的增大趋势。病理学改变也发生着一定的变化,如瘤颈处弹力层较完整,但是远端弹力层破坏较严重。本实验中弹力酶诱导术后 7 d 弹性纤维染色可见动脉瘤壁变薄,血管弹力层在瘤颈口处突然断裂,这与 Abruzzo 等<sup>[13]</sup>报道的病理结果符合。

本实验中 HE 染色显示对照组正常颈总动脉内膜、中膜、外膜结构完整。弹力蛋白酶诱导后 7 d 显示梭形动脉瘤模型内弹力膜断裂,中膜平滑肌结构紊乱,细胞形态扭曲;14 d 梭形动脉瘤模型瘤腔内膜逐渐增生;21 d 梭形动脉瘤模型增生的内膜增生趋于稳定。弹力纤维染色显示对照组颈总动脉弹力层完整;7 d 梭形动脉瘤模型弹力层明显变薄;14 d

从交界处始弹力层逐渐变薄;21 d 从交界处始弹力层基本稳定。其血管内膜及弹力层的演变过程可能是在弹力蛋白酶的消化作用下血管壁的弹力层被破坏,随着血流的冲击,以及血压的作用,血管壁逐渐膨胀,内膜相对减少变薄,而随着时间的推移,血管膨胀趋于稳定,内膜开始逐渐代偿性增生。

造模前预先限定了梭形动脉瘤的长度,故实验组各时间段内的兔耳缘静脉血管造影显示梭形动脉瘤长径的差异无统计学意义,说明该造模方法能够制作出理想长度的梭形动脉瘤。在严格控制猪胰弹性蛋白酶注入量的基础上,7 d 的梭形动脉瘤模型宽径与 14 d 梭形动脉瘤宽径的差异有统计学意义,而 14 d 的梭形动脉瘤模型宽径与 21 d 梭形动脉瘤宽径的差异无统计学意义,说明在血管外膜以及弹力层损伤的情况下,经过 14 d 里血流动力学的作用,动脉瘤宽径明显增大,而随着时间的推移内膜增生,弹力层逐渐稳定,动脉瘤的膨胀趋于缓慢,该过程类似于人类颅内动脉瘤的自发性生长过程。虽然本实验中没有发现动脉瘤模型的术后自发破裂,但其是否具有自发破裂可能则需要更长期的随访。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ferguson S, Macdonald RL. Predictors of cerebral infarction in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neurosurgery, 2007, 60: 658 - 667.
- [2] Brisman JL, Song JK, Newell DW. Cerebral aneurysms [J]. N Engl J Med, 2006, 355: 928 - 939.
- [3] al-Yamany M, Ross IB. Giant fusiform aneurysm of the middle cerebral artery: successful Hunterian ligation without distal bypass[J]. Br J Neurosurg, 1998, 12: 572 - 575.
- [4] Sun J, Sukhova GK, Zhang J, et al. Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32: 15 - 23.
- [5] Aassar OS, Fujiwara NH, Marx WF, et al. Aneurysm growth, elastinolysis, and attempted doxycycline inhibition of elastase-induced aneurysms in rabbits [J]. J Vasc Interv Radiol, 2003, 14: 1427 - 1432.
- [6] 殷尚炯, 许百男, 孙正辉. 大鼠颈动脉梭形动脉瘤模型的建立 [J]. 基础医学与临床, 2006, 26: 1013 - 1014.
- [7] Reinald N, Fournier B, Naveau A, et al. Fusiform aneurysm model in rabbit carotid artery [J]. J Vasc Res, 2010, 47: 61 - 68.
- [8] Bhamidipati CM, Mehta GS, Lu G, et al. Development of a novel murine model of aortic aneurysms using peri-adventitial elastase[J]. Surgery, 2012, 152: 238 - 246.
- [9] Baldwin ZK, Chandiwal A, Huang W, et al. Slower onset of low shear stress leads to less neointimal thickening in experimental vein grafts[J]. Ann Vasc Surg, 2006, 20: 106 - 113.
- [10] 闫磊, 施万印, 朱悦琦, 等. 双 Willis 覆膜支架在犬颈动脉梭形动脉瘤模型的初步应用[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 709 - 713.
- [11] 卢川, 谢谦宇, 刘林祥. 血管结扎结合弹力酶诱导法兔动脉瘤模型的制作[J]. 介入放射学杂志, 2010, 19: 722 - 725.
- [12] Krings T, Busch C, Sellhaus B, et al. Long-term histological and scanning electron microscopy results of endovascular and operative treatments of experimentally induced aneurysms in the rabbit [J]. Neurosurgery, 2006, 59: 911 - 923; discussion 923 - 4.
- [13] Abruzzo T, Shengelaia GG, Dawson RC, et al. Histologic and morphologic comparison of experimental aneurysms with human intracranial aneurysms[J]. Am J Neuroradiol, 1998, 19: 1309 - 1314.

(收稿日期:2013-10-28)

(本文编辑:侯虹鲁)