

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.36.023

兔腹主动脉粥样斑块的建立与超声评价*

张勇, 陆永萍[△], 周虹, 袁媛, 汤跃跃, 刘蕊, 李云燕, 徐丽荣

(昆明医科大学第四附属医院/云南省第二人民医院超声科, 昆明 650021)

摘要:目的 制备兔腹主动脉粥样斑块模型, 并使用超声监测其形成过程。方法 使用高脂饲养法对 60 只日本雄性大白兔进行喂养(模型组, 死亡 6 只), 超声监测其腹主动脉粥样斑块形成的过程, 并与 20 只正常兔对照(正常组), 最终通过病理证实。结果 模型组 52 只兔腹主动脉粥样斑块模型制备成功, 腹主动脉内中膜复合体厚度明显高于正常组。结论 高脂饮食是进行兔腹主动脉粥样硬化模型制备的有效方法, 动脉粥样硬化以动脉粥样斑块形成为典型特征, 高频超声能很好地评价兔腹主动脉粥样斑块形成的过程及情况。

关键词:兔; 腹主动脉; 粥样斑块; 超声

中图分类号: R445.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)36-4922-02

Establishment and ultrasonic evaluation of rabbit abdominal aorta atheromatous plaque*

Zhang Yong, Lu Yongping[△], Zhou Hong, Yuan Yuan, Tang Yueyue, Liu Rui, Li Yunyan, Xu Lirong

(Department of Medical Ultrasound, Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical College / Yunnan Provincial Second People's Hospital, Kunming, Yunnan 650021, China)

Abstract: Objective To prepare the rabbit abdominal aorta atheromatous plaque model, and to monitor its forming process by ultrasound. **Methods** Totally 60 Japanese male white rabbits (model group, dead 6 rabbits) fed by high fat diet and the abdominal aorta atheromatous plaque formation process was monitored by ultrasound, 20 normal rabbits were taken as control. The abdominal aorta atheromatous plaque was finally confirmed by pathology. **Results** 52 rabbits in the model group were successful in preparing the abdominal aortic plaque model. The thickness of intima-media complex was obviously higher than that of the control group. **Conclusion** High fat diet is an effective method for preparing the rabbit atherosclerosis model. The arterial atheromatous plaque formation is the typical characteristic of atherosclerosis. The high frequency ultrasound can better evaluate the formation process and condition of rabbit abdominal aorta atheromatous plaque.

Key words: rabbit; abdominal aorta; atheromatous plaque; ultrasound

动脉粥样硬化是目前人类主要的健康问题之一, 饮食结构及生活习惯的改变是动脉粥样硬化的主要原因, 其患病率呈上升的趋势^[1]。动脉粥样硬化是引起多种心脑血管疾病的病理生理基础, 随着动脉粥样硬化发生机制和预防、治疗方面研究的不断深入, 迫切需要建立一种简便易行、重复性好、有较典型病理改变、易于评价且适于干预治疗的动物模型。本研究选择高脂饲料喂养的方法建立兔腹主动脉粥样斑块模型, 用二维超声及病理观察、评价兔腹主动脉粥样斑块情况。用高频超声评价兔腹主动脉粥样斑块形成的过程及情况, 从而探讨兔腹主动脉粥样斑块模型制备的方法^[2]。

1 材料与方法

1.1 兔腹主动脉粥样斑块模型的建立 选取雄性日本大耳白兔 80 只, 体质量 2.0~2.5 kg, 由昆明医科大学实验动物科提供。60 只兔给予高脂饲料饲养(配方为: 1% 胆固醇, 7.5% 蛋黄粉, 8% 牛油, 83.5% 常规饲料), 自由饮水, 喂养 12 周后, 开始对兔的腹主动脉进行超声观察, 每 2 周观察 1 次, 发现斑块后, 详细进行超声检查及记录, 处死动物, 进行病理检查^[3]。另选取 20 只兔常规喂养, 喂养 12 周后, 超声观察并陆续处死动物, 约每 2 周处死动物 4 只, 并进行病理切片观察。

1.2 兔腹主动脉粥样斑块模型的超声评价 将兔子仰卧固定于操作台上, 胸腹部脱毛, 静脉留置针于耳缘静脉建立静脉通

道, 向静脉内推注 3% 戊巴比妥钠麻醉, 剂量为 1 mL/kg。麻醉成功后使用 Philip iE 33 超声诊断仪, L9-3 高频探头自剑下扫查, 获得腹主动脉稳定图像, 并观察兔腹主动脉内膜及斑块情况。在腹主动脉开口 2 cm 处避开斑块, 测量腹主动脉内中膜复合体的厚度; 沿兔腹主动脉长轴切面扫查, 后又取横断切面, 沿长轴方向扫查, 发现斑块后, 仔细观察斑块的回声、大小、形态, 对斑块的性质作出评价^[4]。

1.3 病理切片观察 超声观察后处死动物, 截取腹主动脉, 肉眼大体观察。用 10% 的中性甲醛溶液固定, 然后用 HE 染色方法制备成病理切片, 在显微镜下观察。

2 结果

2.1 超声观察 模型组喂养过程中死亡 6 只兔, 培养成活 54 只。52 只动物在 12~20 周不等的喂养周期内通过超声观察发现了腹主动脉粥样斑块(图 1、2), 有 2 只兔在饲养观察过程中始终未发现斑块(表 1)。正常组(正常喂养的兔)喂养过程中有 1 只死亡, 成活 19 只。观察过程中对其腹主动脉内中膜复合体厚度进行测量, 并与模型组比较(表 2)。模型组 54 只兔 12 周出现斑块 15 例, 软斑 13 例, 硬斑 2 例; 14 周增加 17 例, 共计 32 例, 软斑 26 例, 硬斑 6 例; 16 周增加 15 例, 共计 47 例, 软斑 38 例, 硬斑 9 例; 18 周增加 3 例, 共计 50 例, 软斑 38 例, 硬斑 10 例; 20 周增加 2 例, 共 52 例。20 周后, 所有斑块中

* 基金项目: 云南省自然科学基金面上项目(2011FZ288)。 作者简介: 张勇(1977—), 硕士, 主治医师, 主要从事腹部超声及介入方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: luyongp@163.com。

软斑 41 例,硬斑 11 例。软斑回声显示为中低回声,硬斑的回声增强。

表 1 模型组腹主动脉粥样斑块形成过程[n(%)]

时间	斑块	软斑	硬斑	无斑块	总计(n)
12 周	15(28)	13(24)	2(4)	37(72)	54
14 周	32(59)	26(48)	6(11)	22(41)	54
16 周	47(87)	38(70)	9(17)	5(13)	54
18 周	50(88)	38(70)	12(22)	4(12)	54
20 周	52(96)	41(76)	11(20)	2(4)	54

表 2 两组兔主动脉内中膜复合体厚度比较($\bar{x}\pm s$,mm)

组别	n	12 周	14 周	16 周	18 周	20 周
正常组	19	0.8±0.14	0.8±0.19	0.9±0.23	0.9±0.19	0.9±0.22
模型组	54	0.9±0.14*	1.0±0.18*	1.1±0.23*	1.2±0.19*	1.2±0.24*

*: $P<0.05$,与正常组比较。

正常组所有兔在超声观察过程中未见明显斑块,12、14、16、18 周模型组腹主动脉内中膜复合体均高于同时期正常兔主动脉内中膜复合体厚度($P<0.05$)。见图 1、2。



图 1 二维超声观察兔腹主动脉粥样斑块

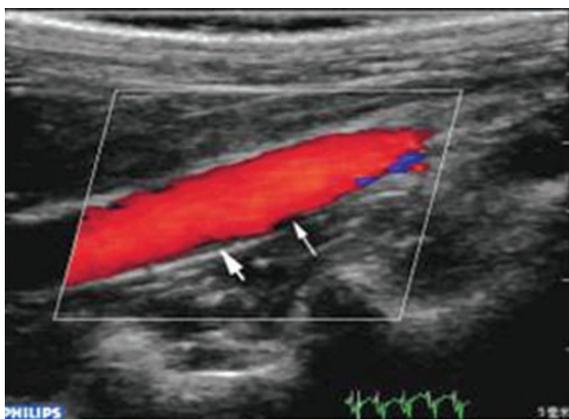
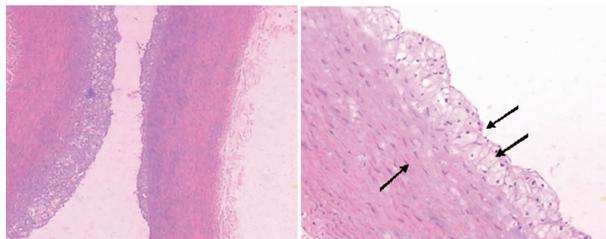


图 2 彩色血流显示斑块处血流充盈缺损

2.2 病理观察 52 例制备成功的模型,均经病理切片证实,在腹主动脉相应部位均有斑块形成,超声检查符合率 100%。常规饲养组兔腹主动脉柔软有弹性。高脂饲料饲养组腹主动脉至髂动脉分叉处内膜欠光滑,部分中断,内膜不均匀增厚,有浅黄色条纹发生,多处不光滑,呈凹凸不平的黄色斑块形成,管

壁僵硬。

显微镜下观察:内膜明显增厚,其下至中膜深层均有大量泡沫细胞构成斑块,中膜平滑肌细胞增殖,排列紊乱,为粥样斑块形成。52 例斑块病理证实软斑 42 例,符合率 97.6%,病理特征为内皮细胞呈长椭圆形,核裸露,胞质中可见大量泡沫细胞,线粒体肿胀、粗面内质网扩张,细胞周围可见大量胶原纤维;硬斑 10 例,符合率 100%,病理特征为含丰富胶原的基质及粥样斑块^[5](图 3)。



长箭头:大量泡沫细胞,短箭头:增殖紊乱的平滑肌细胞。

图 3 兔腹主动脉斑块病理图片 HE 染色 (图左×40,图右×100)

3 讨论

本研究对以往喂养模型和观察方法加以改进,设计出科学合理的喂养方法,采用专门配方喂养。高脂喂养 12 周后,超声观察便可发现兔腹主动脉陆续有粥样斑块形成,到了 16~20 周后斑块培养基本成功,成功率达 96%,模型兔腹主动脉均可见粥样斑块形成,本方法兔腹主动脉粥样斑块模型建立成功。培养过程中以软斑形成为主,随着病程的延长,软斑逐渐变为硬斑。

通过二维超声检查发现:52 只模型兔腹主动脉可见粥样斑块形成。其余 2 只模型兔腹主动脉始终未发现明显斑块。分析原因可能是:因高脂饲料喂养突然改变饮食结构,在喂养过程中部分模型兔出现明显腹泻,高脂饲料摄入不足,吸收减少。

本研究发现模型制备过程中早期软斑出现较多,后期硬斑发生率稍增加,但始终以软斑为主。直到兔饲养到 20 周前后其软斑 41 例,发生率为 79%。其原因可能为:(1)兔本身代谢方式的影响;(2)早期斑块仍处于新鲜、才形成过程中;(3)没有采取干预措施,减轻斑块炎症反应及血管生成,斑块未固定^[5-6]。

本研究中所有超声确定有斑块者后经病理切片均证实其相应部位有粥样斑块形成,二维超声根据斑块的回声来确定斑块的性质:一般认为中低回声为软斑,高回声及强回声以硬斑为主。经病理证实其性质基本符合,说明超声可准确评价动脉粥样斑块的形成及类型,在动物模型制备过程中可作为一种无创简便的监测工具,超声的影像可以作为评价动物模型制备成功与否、周期控制、喂养方案调整的依据。

本研究保守地从 12 周后开始观察,每两周动态观察 1 次至 20 周。已经发现有 15 例兔发生了粥样斑块,但何时最早出现,何种状态出现较早,没有记录到,因此认为可将其观察周期提前,探索出最佳的喂养及观察方案。

动脉粥样斑块动物模型的建立成为动脉粥样硬化研究中不可替代的工具。因动物本身的生理特点,现有的模型不可能完全地复制出人类动脉粥样硬化的变化和病理过程。家兔的动脉粥样硬化模型只能在一定程度上代表人类动脉粥样硬化的病变。由兔的病理形态学研究中可知,兔(下转第 4927 页)

然戒断症状,与以往文献相比较,最终成型的模型在相同的时间段均能观察到相似的戒断症状和体质量减轻情况。多年的研究表明药物滥用对大脑有损伤,药物滥用导致的成瘾是一种脑疾病,Cadet 等^[14]将药物成瘾造成的脑细胞丧失与细胞凋亡机制联系在一起,认为药物成瘾的神经损伤是由激活调控细胞凋亡的分子机制引起的。本实验中造模组大鼠脑切片图显示:造模组大鼠脑细胞呈现明显的凋亡改变,符合成瘾大鼠脑细胞改变情况,进一步表明造模成功。

近期研究发现,成瘾不仅有关于脑细胞的凋亡调控^[15],而且与学习和记忆也密切相关^[16],本造模法建立的苯巴比妥成瘾模型所造成的身体依赖结果可靠,重复性好,可以成为成瘾脑细胞凋亡调控与成瘾学习记忆能力研究的基础。

参考文献:

- [1] 郝伟. 精神病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2008:74-83.
- [2] 郑继旺,蔡志基. 镇静催眠药的身体依赖性动物评价方法[J]. 中国药理学通报,1993,9(3):224-227.
- [3] 陈素青,崔艳英,邱毅,等. 巴比妥类药物依赖性试验动物模型的建立[J]. 中国药物依赖性杂志,2012,21(4):264-269,277.
- [4] Tagashira E, Izumi T, Yanaura S. Experimental barbiturate dependence. I. Barbiturate dependence development in rats by drug-admixed food(DAF)method[J]. Psychopharmacology(Berl),1978,57(2):137-144.
- [5] 张开镐. 镇静催眠、抗焦虑药物的身体依赖性试验[J]. 中国药物依赖性杂志,2000,9(1):12.
- [6] 李净兵. 苯巴比妥对大鼠额叶、顶叶、小脑神经元及神经胶质细胞凋亡的影响[D]. 石家庄:河北医科大学,2011:11-13.
- [7] 魏泓. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:142-146.
- [8] 朱海霞,蔡方成,张晓萍,等. 长程服用苯巴比妥、氯硝安定、丙戊酸和托吡酯对未成熟脑发育影响的实验研究[J]. 中华儿科杂志,2007,45(2):121-125.
- [9] 陈锦. 长程施用抗癫痫药致大鼠脑损伤的机理研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2009:27-33.
- [10] Ishiwata Y, Nagata M, Yasuhara M. Effect of isoniazid on the pharmacodynamics of cefazolin-induced seizures in rats[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2005, 20(2): 117-120.
- [11] 袁晓冉,余方,何小华,等. 惊厥相关动物模型的研究进展[J]. 卒中与神经疾病,2010,17(5):312-315.
- [12] 张力,蔡志基. 苯巴比妥致大鼠身体依赖性实验[J]. 中国药物依赖性杂志,1996,5(4):206-211.
- [13] 沈强,俞彰,法京,等. 电镜下几种凋亡细胞的形态特征[J]. 复旦学报:医学版,2010,37(3):322-325.
- [14] Cadet JL, Jayanthi S, Deng X. Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis[J]. FASEB J, 2003,17(13):1775-1788.
- [15] 韦献良,梁莹,叶峻,等. 海洛因成瘾复吸大鼠脑组织神经元超微结构和神经递质变化的研究[J]. 电子显微学报,2004,2(5):530-535.
- [16] 宋岭,郝伟,崔涛涛,等. 大鼠配对前吗啡成瘾及戒断对子代焦虑样行为和学习记忆的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2009,18(6):519-522.

(收稿日期:2014-06-08 修回日期:2014-07-12)

(上接第 4923 页)

的斑块形态与人类斑块的早期病变相接近,更适合做 AS 发生早期机制的研究;加强对临床 AS 发病机制的研究,结合临床发病机制及病变特点,建立更加符合人类 AS 特点的动物模型对 AS 的诊断、治疗及预防具有重大的意义^[7]。

参考文献:

- [1] Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep,2011,3(3):225-233.
- [2] Tang YY, Xie YC, Huang YL, et al. Contrast-enhanced ultrasound in assessing atherosclerosis of abdomind aorta in rabbits model: a preliminary study [J]. J Kunming Medical College,2010,31(12):12-15.
- [3] Tsimikas S, Shaw PX. Non-invasive imaging of vulnerable plaques by molecular targeting of oxidized LDL with tagged oxidation-specific antibodies [J]. J Cell Biochem Suppl,2002(39):138-146.
- [4] Moulton KS, Olsen BR, Sonn S, et al. Loss of collagen X
- [5] VIII I enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis [J]. Circulation, 2004, 110(10): 1330-1336.
- [5] Hamilton AJ, Huang SL, Warnick D, et al. Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components in vivo[J]. J Am Coll Cardiol,2004,43(3):453-460.
- [6] Abdolreza Rezaie-Majd, Maca T, Robert A, et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6 interleukin-8, and monocyte chemoattractant protein-in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2002,22(7):1194-1199.
- [7] Yao CX, Yang B. Research and application of targeting microbubble contrast agent in ultrasonic diagnosis and treatment[J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2009, 18(1):83-85.

(收稿日期:2014-05-08 修回日期:2014-08-25)