

Application of ultra-high resolution small animal ultrasound imaging system in rat models of abdominal artery implantation

XU Zeqin¹, LI Liqiang¹, GU Yongquan¹, LI Jianxin¹, FENG Zengguo², TONG Zhu¹,

XU Qing³, GAO Xixiang¹, QI Yixia¹, GUO Jianming¹, ZHANG Jian^{1*}

(1. Department of Vascular Surgery, Xuanwu Hospital, Capital Medical University,

Institute of Vascular Surgery of Capital Medical University, Beijing 100053,

China; 2. School of Materials Science & Engineering, Beijing Institute of

Technology, Beijing 100081, China; 3. Medical Experiment and Test

Center, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the application value of ultra-high resolution small animal ultrasound imaging in rat models of abdominal artery implantation, and to observe the hemodynamic changes of (Poly[ε-caprolactone], PCL)-heparin grafts. **Methods** Totally 10 rats were used to establish models of abdominal artery implantation of heparin-conjugated PCL grafts. Ultra-high resolution small animal ultrasound imaging was performed to measure wall thickness, graft luminal diameter and blood flow velocity of heparin-conjugated PCL scaffold in different time points, and then statistical analysis was performed. **Results** The wall thicknesses of heparin-conjugated PCL scaffold were significantly different among 1, 2 and 3 months after implantation ($F=16.92$, $P<0.01$), also between 1 month and 2 months after implantation ($P=0.01$), as well as between 1 month and 3 months after implantation ($P<0.01$). There was no statistic difference of luminal diameter ($F=0.08$, $P=0.99$) nor blood flow velocity ($F=0.58$, $P=0.59$) of heparin-conjugated PCL scaffold among different time points after implantation. One month after implantation, no aneurysm was found in heparin-conjugated PCL scaffold. However, heparin-conjugate PCL scaffold with aneurysm showed significantly bigger luminal diameter ($t=2.94$, $P=0.03$) and lower blood flow velocity ($t=4.28$, $P=0.01$) than those without aneurysm 3 months after implantation. **Conclusion** Ultra-high resolution small animal ultrasound imaging can be used for accurate measurement of hemodynamic changes of heparin-conjugated PCL scaffolds in rat models of abdominal artery implantation.

[Keywords] ultrasonography; models, animal; rats; aorta, abdominal; hemodynamics

DOI:10.13929/j.1672-8475.201809050

超高分辨率小动物超声影像系统在大鼠腹主动脉移植模型中的应用

徐泽勤¹, 李立强¹, 谷涌泉¹, 李建新¹, 冯增国², 佟 铸¹,

许 晴³, 高喜翔¹, 齐一侠¹, 郭建明¹, 张 建^{1*}

(1. 首都医科大学宣武医院血管外科 首都医科大学血管外科研究所, 北京 100053; 2. 北京理工大学

材料科学与工程学院, 北京 100081; 3. 首都医科大学医学实验与检测中心, 北京 100069)

[摘 要] **目的** 探讨超高分辨率小动物超声影像系统在大鼠腹主动脉移植模型中的应用价值, 观察聚 ε-己内酯(PCL)-肝素人工血管在体血流动力学变化。 **方法** 选取 10 只 Wistar 大鼠, 应用 PCL-肝素人工血管完成大鼠腹主动脉移植, 建

[基金项目] 国家重点研发计划(2017YFC1104100)、首都卫生发展科研专项(首发 2016-1-2012)。

[第一作者] 徐泽勤(1990—), 男, 山东临沂人, 博士, 医师。研究方向: 小口径人工血管相关研究。E-mail: i1033648886@163.com

[通信作者] 张建, 首都医科大学宣武医院血管外科 首都医科大学血管外科研究所, 100053。E-mail: zhangjiandoctor@126.com

[收稿日期] 2018-09-28 **[修回日期]** 2019-01-09

立大鼠腹主动脉移植模型。应用超高分辨率小动物超声影像系统检测大鼠体内 PCL-肝素人工血管在不同时间点的管壁厚度、管腔内径及血流速度,并进行统计学分析。**结果** 移植模型建立后 1、2、3 个月,PCL-肝素人工血管管壁厚度差异有统计学意义($F=16.92, P<0.01$),且 1 个月与 2 个月间($P=0.01$)、1 个月与 3 个月间($P<0.01$)管壁厚度差异均有统计学意义;不同时间点 PCL-肝素人工血管管腔内径($F=0.08, P=0.99$)及血流速度($F=0.58, P=0.59$)差异均无统计学意义。建模后 1 个月,PCL-肝素人工血管均无动脉瘤样扩张改变;建模后 3 个月,瘤样扩张的 PCL-肝素人工血管管腔内径明显大于未扩张者($t=2.94, P=0.03$),血流速度明显低于未扩张者($t=4.28, P=0.01$)。**结论** 超高分辨率小动物超声影像系统可精确测量 PCL-肝素人工血管在大鼠腹主动脉移植模型体内的血流动力学变化。

[关键词] 超声检查;模型;动物;大鼠;主动脉;腹;血流动力学

[中图分类号] R-332; R445.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2019)05-0304-05

当前心血管疾病是造成死亡的首要原因^[1]。对终末期心血管疾病患者常需进行血管重建,以自体血管移植效果较好,然而目前临床血管重建所需自体血管存在供源有限和尺寸不匹配等缺陷^[2],人工降解血管材料因此受到广泛关注,但此类材料存在力学性能及生物相容性差等缺点。近年来,国内外学者^[3-4]致力于构建组织工程血管的材料学研究,寻找可代替自体血管用于临床的血管移植植物。

血管移植相关动物实验中,常需对移植植物进行血流动力学检查,超声技术是目前应用最广泛的成像方法。但临床超声检查的成像频率常为 12~15 MHz,图像空间分辨力为 300 μm ,不足以精确测量小动物移植血管血流动力学相关数据。过去十余年中,高频率成像系统获得长足发展,超声检查对小动物模型结构成像的空间分辨力进一步提高,并已用于心血管研究领域^[5]。本课题组^[6]既往研究发现,肝素表面改性后的聚 ϵ -己内酯 [Poly(ϵ -caprolactone), PCL] 材料具有良好的生物相容性。本研究应用超高分辨率小动物超声影像系统检测 PCL-肝素人工血管在大鼠体内血流动力学变化,探讨其在大鼠腹主动脉移植模型中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 大鼠腹主动脉移植模型建立 选取雄性 Wistar 大鼠 10 只(购于北京维通利华实验动物技术有限公司,北京市实验动物质量合格许可证编号为 SCXK:2016-0006),8~9 周龄,体质量 300~320 g,中位体质量 310.8 g。将大鼠放入麻醉诱导箱,调节氧气至 1 L/min,调节恩氟烷至 2.5%。全身麻醉大鼠后,将其以俯卧位保定于大鼠专用操作台,口鼻部置于麻醉面罩内,调节恩氟烷的维持量为 2%~3%。备皮、消毒后,沿腹部正中依次切开皮肤、肌肉直至暴露腹腔。分离腹主动脉前脂肪组织,分离肾下腹主动脉。阻断腹主动脉后切开血管,采用直径 2 mm、长 10 mm 的 PCL-肝素人工血管(由北京理工大学提供)端端吻合于腹主动脉(图 1A),充分止血后逐层关闭腹腔。

1.2 血流动力学检查 采用 VisualSonics Vevo 2100 超高分辨率小动物超声影像系统,MS 550D 探头(中心频率 40 MHz),焦距 7 mm,轴向分辨力和横向分辨力分别为 40 μm 和 90 μm ;分别于建模后 1、2、3 个月行血流动力学检查,观察腹主动脉移植植物通畅情况。检查前对大鼠以恩氟烷进行麻醉,方法同前。分别检测大鼠腹主动脉近心端吻合口处正常血管、PCL-肝素人工血管及远心端吻合口处正常血管的血流动力学变化,检测指标包括血管内径、管壁厚度及血流速度。

1.3 离体标本观察 完成末次血流动力学检查后麻醉大鼠,方法同前。局部消毒后切开皮肤、肌肉直至暴露腹腔。游离 PCL-肝素人工血管周围组织,主要是下腔静脉、血管周围纤维结缔组织。以动脉夹分别夹闭 PCL-肝素人工血管近心端及远心端,剪断动脉夹间血管,取出 PCL-肝素人工血管,以生理盐水充分冲洗管腔后,沿血管纵行切开,观察离体血管形态。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各部位不同时间点间血管内径、管壁厚度、血流速度比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 法;瘤样扩张与未扩张的 PCL-肝素人工血管间血管内径、管壁厚度、血流速度比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管形态改变 建模后 1 个月,血流动力学检查未发现 PCL-肝素人工血管呈动脉瘤样扩张改变(图 2A);2 个月 3 只大鼠体内移植植物出现动脉瘤样扩张(图 2B);3 个月 5 只大鼠体内移植植物出现动脉瘤样扩张(图 2C)。

末次血流动力学检测完成后取材,离体标本观察证实超声所见 5 只大鼠体内 PCL-肝素人工血管出现动脉瘤样扩张(图 1C),血管内壁苍白,内膜下可见脂质沉积(图 1E);其余 5 只大鼠体内 PCL-肝素人工血管形态均规则(图 1B),血管内壁光滑(图 1D)。

2.2 血流动力学指标变化

2.2.1 管壁厚度和血管内径 建模后 1、2、3 个月,近

心端吻合口处正常血管、远心端吻合口处正常血管管壁厚度差异均无统计学意义(P 均 >0.05),而 PCL-肝素人工血管管壁厚度差异有统计学意义($P<0.01$);两两比较,移植模型建立后 1 个月与 2 个月($P=0.01$)、1 个月与 3 个月($P<0.01$)管壁厚度差异均有统计学意义,而 2 个月与 3 个月($P=0.06$)差异无统计学意义。见表 1。

建模后 1、2、3 个月近心端吻合口处正常血管、远心端吻合口处正常血管及 PCL-肝素人工血管内径差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 1。

建模后 2 个月与 3 个月瘤样扩张与未扩张的 PCL-肝素人工血管管壁厚度差异无统计学意义($t=$

1.44、0.07, $P=0.20$ 、0.95);建模后 2 个月瘤样扩张与未扩张的 PCL-肝素人工血管内径差异无统计学意义($t=2.35$, $P=0.06$),而建模后 3 个月瘤样扩张的 PCL-肝素人工血管内径明显大于未扩张者($t=2.94$, $P=0.03$)。见表 2。

2.2.2 血流速度 动脉瘤样扩张 PCL-肝素人工血管腔内血流速度明显下降,声像图表现为颜色不一的紊乱血流信号(图 2B),未扩张 PCL-肝素人工血管腔内血流呈正常波峰形态(图 2A)。建模后 1、2、3 个月,近心端吻合口处正常血管、远心端吻合口处正常血管及 PCL-肝素人工血管血流速度差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 1。

表 1 大鼠腹主动脉移植模型正常血管不同时间血流动力学检查指标($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

检测时间	近心端吻合口处正常血管			PCL-肝素人工血管			远心端吻合口处正常血管		
	血管内径 (mm)	管壁厚度 (mm)	血流速度 (mm/s)	血管内径 (mm)	管壁厚度 (mm)	血流速度 (mm/s)	血管内径 (mm)	管壁厚度 (mm)	血流速度 (mm/s)
建模后 1 个月	1.92±0.07	0.36±0.04	808.55±134.48	1.85±0.12	0.45±0.06	505.76±41.92	1.87±0.04	0.31±0.03	609.55±62.85
建模后 2 个月	1.98±0.12	0.32±0.05	796.23±65.83	1.83±0.05	0.63±0.08	500.04±80.15	1.85±0.08	0.29±0.04	635.61±71.43
建模后 3 个月	1.94±0.05	0.33±0.06	825.89±109.77	1.82±0.10	0.74±0.05	560.81±96.34	1.77±0.15	0.30±0.03	653.72±100.68
F 值	0.40	0.65	0.06	0.08	16.92	0.58	0.78	0.14	0.23
P 值	0.69	0.55	0.09	0.99	<0.01	0.59	0.50	0.88	0.80

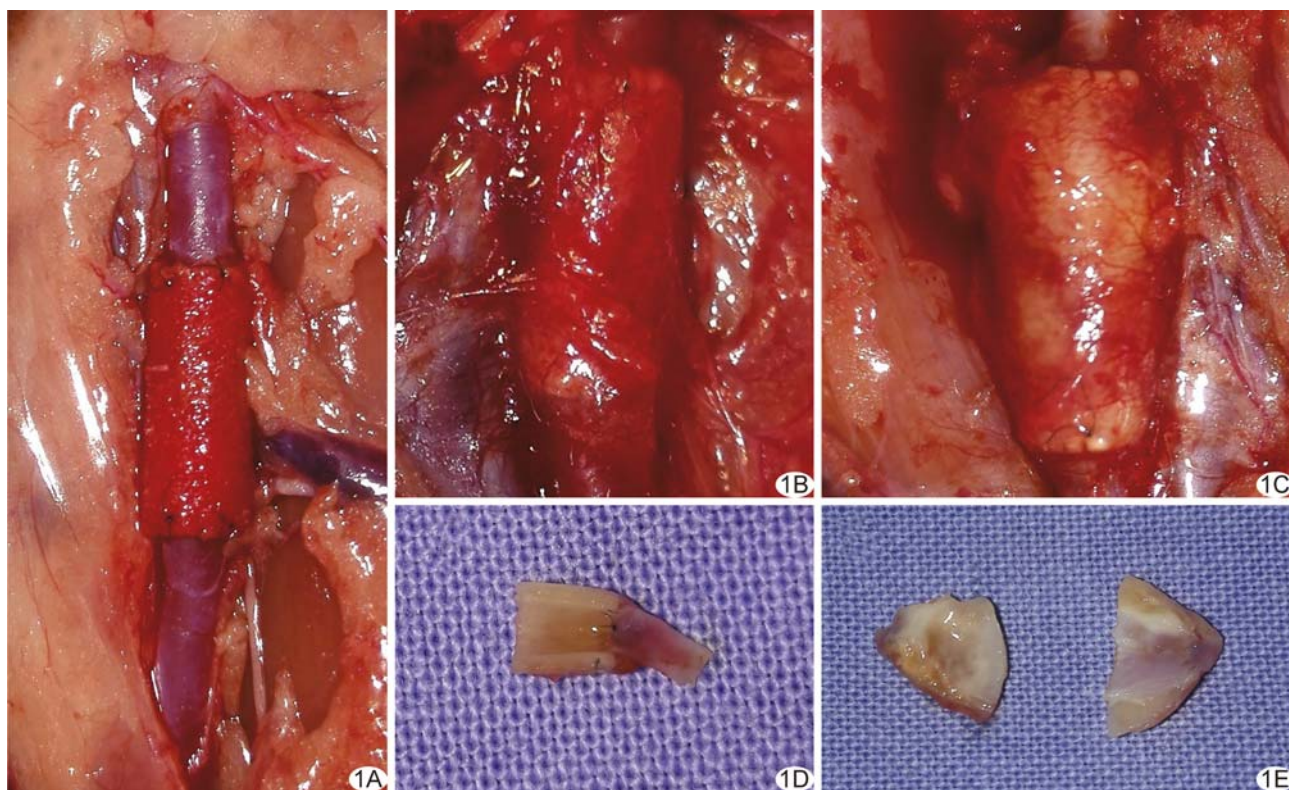


图 1 PCL-肝素血管移植及取出 A. 将 PCL-肝素人工血管植入大鼠腹主动脉,建立大鼠腹主动脉移植模型; B. 移植模型建立后 3 个月取材,正常 PCL-肝素人工血管形态; C. 移植模型建立后 3 个月取材,动脉瘤样扩张 PCL-肝素人工血管形态; D. 移植模型建立后 3 个月取材,正常 PCL-肝素人工血管内腔表面; E. 移植模型建立后 3 个月取材,动脉瘤样扩张 PCL-肝素人工血管内腔表面

表 2 大鼠腹主动脉移植模型 PCL-肝素人工血管不同时间血流动力学检查指标 ($\bar{x} \pm s$)

检测时间	瘤样扩张 (n=5)			未扩张 (n=5)		
	血管内径 (mm)	管壁厚度 (mm)	血流速度 (mm/s)	血管内径 (mm)	管壁厚度 (mm)	血流速度 (mm/s)
建模后 1 个月	—	—	—	1.85±0.12	0.45±0.06	505.76±41.92
建模后 2 个月	2.19±0.31	0.70±0.05	353.85±144.50	1.83±0.05	0.63±0.08	500.04±80.15
建模后 3 个月	2.80±0.66	0.75±0.28	218.30±126.38	1.82±0.10	0.74±0.05	560.81±96.34

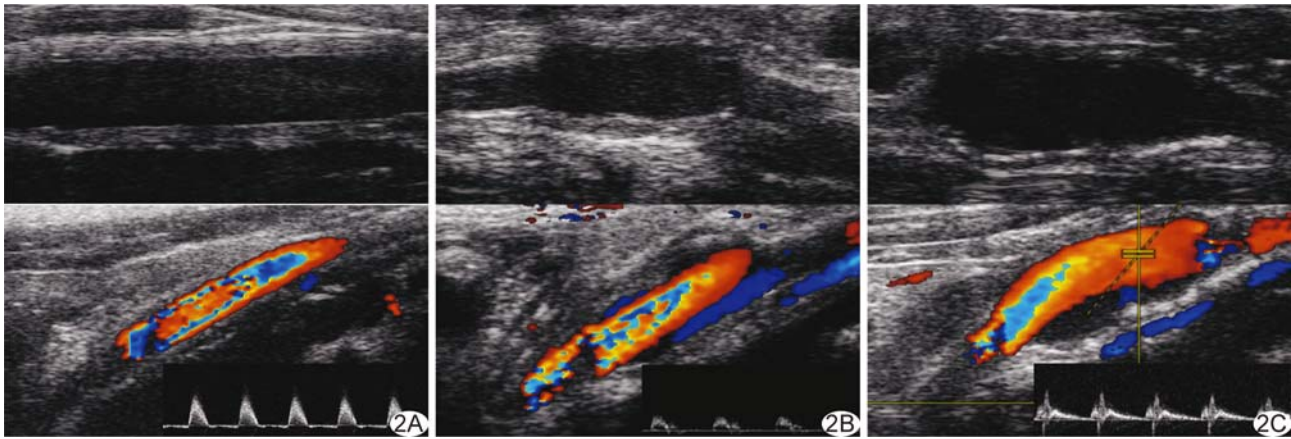


图 2 大鼠腹主动脉移植模型建立后超高分辨率小动物超声影像系统血流动力学检查 A. 建模后 1 个月 PCL-肝素人工血管声像图, 血管未扩张; B. 建模后 2 个月 PCL-肝素人工血管声像图, 血管呈瘤样扩张; C. 建模后 3 个月 PCL-肝素人工血管声像图, 血管呈瘤样扩张

建模后 2 个月瘤样扩张与未扩张的 PCL-肝素人工血管血流速度差异无统计学意义 ($t=1.82, P=0.12$), 但建模后 3 个月瘤样扩张的 PCL-肝素人工血管血流速度明显低于未扩张者 ($t=4.28, P=0.01$)。见表 2。

3 讨论

生物可降解材料组织工程血管是当前研究热点之一。聚己内酯因其强度高、降解速率、孔径人工可调、易加工及在体内降解产物对人体无害等优点而广泛应用于血管组织工程相关领域^[7]。肝素含有糖胺聚糖成分, 可促进组织生长^[6]。与其他细胞外基质相比, 多糖可为生物材料提供结合活性物质的位点, 同时稳定性更高而免疫原性更低^[8]。应用静电纺丝技术制备纳米纤维, 可模拟天然细胞外基质的结构, 有助于细胞生长^[9]; 通过肝素表面改性后, 以这种技术制备的 PCL 材料血管具有较好的生物学性能^[6]。

MRA、CTA 等影像学检查是诊断动脉病变的重要依据。MRA 通过非对比增强和对比增强技术使血管显像, 可评估动脉管腔^[10]。近年来迅速发展的三维时间飞跃法 MR 血管成像 (3D time-of-flight MR angiography, 3D TOF MRA) 技术无需注射对比剂, 不存在电离辐射, 适用于需长期影像学观察的患者; 但 MRA 检查费用较为昂贵, 扫描时间较长。CTA 也可

用于评估动脉病变, 与 MRA 相比, 主要优势在于图像采集相对较快, 通常可在 1 min 内完成对主动脉的图像采集, 其主要缺点是存在电离辐射, 同时 CTA 过程中需要使用碘对比剂^[10]。超声血管检查无需造影剂, 不存在电离辐射, 且可准确检测血管及移植物的血流动力学变化^[4]; 超声造影以声诺维 (SonoVue) 作为血池显像剂, 通过谐波成像技术, 可准确监测各种脏器的血液微循环灌注情况。SonoVue 不经过肾脏代谢, 无肾脏毒性, 能够随呼吸排出体外, 动物实验^[4]及临床研究^[11-12]均已证实其安全性。目前超高分辨率小动物超声已用于评价小鼠心血管及移植物流动力学相关研究领域^[4, 13], 还可用于检测 ApoE 小鼠腹主动脉瘤中血栓等^[14]。

大鼠腹主动脉移植模型可用于评价聚合物材料的生物相容性。本研究应用高分辨动物超声测量大鼠腹主动脉移植模型 PCL-肝素人工血管的血管内径、管壁厚度、血流速度以及血管移植后通畅情况, 发现人工血管管壁不断增厚, 建模后 1、2、3 个月差异有统计学意义 ($F=16.92, P<0.01$), 但血流状态保持稳定, 建模后 1、2、3 个月血管内径及血流速度差异均无统计学意义 ($F=0.08, 0.58, P=0.99, 0.59$), 即 PCL-肝素人工血管移植后生长良好, 未发生血栓形成、管腔狭窄、过度增生等情况。但本研究发现部分 PCL-肝素人工血

管出现动脉瘤样扩张,血流速度明显降低,具体原因还有待今后进一步实验分析。

总之,高分辨动物超声可作为检测大鼠腹主动脉移植模型的重要实验工具,具有广阔应用前景。

[参考文献]

- [1] Frendl CM, Tucker SM, Khan NA, et al. Endothelial retention and phenotype on carbonized cardiovascular implant surfaces. *Biomaterials*, 2014,35(27):7714-7723.
- [2] Ju YM, Ahn H, Arenas-Herrera J, et al. Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels: A preclinical large animal study. *Acta Biomater*, 2017,59:58-67.
- [3] Dvir T, Timko BP, Kohane DS, et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol*, 2011,6(1):13-22.
- [4] Xu Z, Gu Y, Li J, et al. Vascular remodeling process of heparin-conjugated poly(epsilon-caprolactone) scaffold in a rat abdominal aorta replacement model. *J Vasc Res*, 2018,55(6):338-349.
- [5] Tara S, Kurobe H, Maxfield MW, et al. Evaluation of remodeling process in small-diameter cell-free tissue-engineered arterial graft. *J Vasc Surg*, 2015,62(3):734-743.
- [6] Cao J, Geng X, Wen J, et al. The penetration and phenotype modulation of smooth muscle cells on surface heparin modified poly (epsilon-caprolactone) vascular scaffold. *J Biomed Mater Res A*, 2017,105(10):2806-2815.
- [7] Ren X, Feng Y, Guo J, et al. Correction: Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*, 2015,44(15):5745.
- [8] Bacakova L, Novotna K, Parizek M. Polysaccharides as cell carriers for tissue engineering: The use of cellulose in vascular wall reconstruction. *Physiol Res*, 2014,63(Suppl 1):S29-S47.
- [9] Ingavle GC, Leach JK. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2014,20(4):277-293.
- [10] Evangelista A. Imaging aortic aneurysmal disease. *Heart*, 2014,100(12):909-915.
- [11] Baracchini C, Viaro F, Favaretto S, et al. Safety and tolerability of SonoVue (R) in patients with large artery anterior circulation acute stroke. *J Neuroimaging*, 2017,27(4):409-413.
- [12] Perera RH, Hernandez C, Zhou H, et al. Ultrasound imaging beyond the vasculature with new generation contrast agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2015,7(4):593-608.
- [13] Yamaleyeva LM, Pulgar VM, Lindsey SH, et al. Uterine artery dysfunction in pregnant ACE2 knockout mice is associated with placental hypoxia and reduced umbilical blood flow velocity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015,309(1):E84-E94.
- [14] Jansen CHP, Brangsch J, Reimann C, et al. In vivo high-frequency ultrasound for the characterization of thrombi associated with aortic aneurysms in an experimental mouse model. *Ultrasound Med Biol*, 2017,43(12):2882-2890.

《中国介入影像与治疗学》被数据库收录情况

《中国介入影像与治疗学》杂志是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,被以下数据库收录:

《中文核心期刊要目总览》收录期刊

中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)

中国科学引文数据库核心期刊

WHO《西太平洋地区医学索引》(WPRIM)来源期刊

荷兰《医学文摘》收录源期刊

俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊