王达洋,徐筱青,赵明镜,等. 基于病理形态学系统综述探讨猪冠状动脉球囊损伤病变与动脉粥样硬化的差异[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 632-637.
Wang DY, Xu XQ, Zhao MJ, et al. Morphology of lesions induced by balloon injury in coronary arteries of swine: a systematic review [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 632-637.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.007

基于病理形态学系统综述探讨猪冠状动脉球囊损伤病变与动脉粥样硬化的差异

王达洋[1],徐筱青[1],赵明镜[1,2,3],王显[1,3*]

(1. 北京中医药大学东直门医院,北京 100700; 2. 中医内科学教育部重点实验室,北京 100700;
3. 北京中医药大学心血管病研究所,北京 100700)

【摘要】 目的 通过系统综述分析猪冠状动脉球囊损伤病变的组织形态学特征,并比较与人动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)斑块的组织形态学,为猪 AS 模型的合理应用提供依据。**方法** 检索 CNKI、万方、维普、PubMed 及 Web of Science 数据库,筛选使用球囊损伤法造成冠状动脉损伤的小型猪模型的相关研究;提取文中 AS 斑块的病理图像,分析其与人自发形成 AS 的异同。**结果** 共纳入符合要求的文献 38 篇;形态学分析显示球囊损伤法构建的病变常可在短期内形成严重的内膜增生导致管腔狭窄,增生内膜的主要成分为平滑肌细胞和蛋白聚糖的均匀混合,内侧弹力板断裂常见,纤维帽及脂质核心均少见;这一病变特征与动脉粥样硬化"纤维帽覆盖脂质核心"的病理特征具有显著差异。**结论** 球囊损伤导致的内膜增生与 AS 在形态学上存在差异,以此作为 AS 模型应用于脂质机制研究及临床前评价应慎重。

【关键词】 动脉粥样硬化;动物模型;小型猪;球囊损伤;病理形态
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0632-06

Morphology of lesions induced by balloon injury in coronary arteries of swine: a systematic review

WANG Dayang[1], XU Xiaoqing[1], ZHAO Mingjing[1,2,3], WANG Xian[1,3*]

(1. Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China.
2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education, Beijing 100700.
3. Cardiovascular Institute of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)
Corresponding author: WANG Xian. E-mail: wx0515@hotmail.com

【Abstract】 Objective To determine the histological difference between lesions induced by balloon injury and spontaneously formed plaque and to explore the potential impact on scientific research related to these differences. **Methods** Using the CNKI, Wanfang, Weipu, PubMed, and Web of Science databases, relevant studies on the coronary artery lesions induced by balloon injury were selected. Pathological images of atherosclerotic plaques in the articles were selected and analyzed for their differences from spontaneously forming atherosclerosis. **Results** Plaques induced by the balloon injury method can often form severe intimal hyperplasia in a short period of time, Resulting in stenosis of the lumen. The main components of the hyperplastic intima are smooth muscle cells and proteoglycans. Internal elastic plate rupture is

[基金项目]国家自然科学基金(81774058)。
Funded by National Natural Science Foundation of China(81774058).
[作者简介]王达洋(1991—),男,博士,研究方向:中西医结合防治冠心病及支架术后再狭窄研究。Email: wdy337@163.com
[通信作者]王显(1965—),男,博士,博士生导师,研究方向:介入心脏病学与中医药相关研究。Email: wx0515@hotmail.com

common, while fibrosis cap and necrotic cores are rare. **Conclusions** There are differences in morphology between intimal hyperplasia caused by balloon injury and atherosclerosis. Balloon injury may not be suitable as an atherosclerosis model and for mechanistic research and preclinical evaluation.

【**Keywords**】 balloon injury; atherosclerosis; intimal hyperplasia; collagen; fibrous plaque

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

目前,心血管疾病仍然是人类健康的头号杀手[1-2],而动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是急性心肌梗死、卒中等多种高危心血管疾病的病理生理基础。构建 AS 动物模型(尤其是大动物模型)对于 AS 相关的研究具有重要的意义,而在这一方面已有诸多的探索[3-5]。

在已知的造模方法中,球囊损伤法在 AS 动物模型的构建中常用。小型猪由于其心脏大小、冠状动脉的结构和生理特征与人非常相似,因而通过球囊损伤小型猪冠状动脉制备 AS 模型是认可度很高的方法。球囊损伤法是一种血管内介入手术。其思路是通过球囊对目标位置血管内膜进行机械损伤,以模拟 AS 形成中“内皮损伤”的过程[6]。手术操作方法为:动物麻醉后,经颈动脉或股动脉穿刺并置入鞘管,将球囊经导丝置于目标血管处,以球囊/血管直径约 1.3∶1的比例过度扩张,或往复拖拽数次[7-8],以达到损伤血管内皮细胞的目的。这一方法常和高脂饲喂联合使用,从机制上模拟人类 AS 的形成。早在 20 世纪 70 年代,这一方法初次被采用[9];在之后的数十年内,国内外已有多项研究采用这一方法[8,10-11];至今许多学者将其作为公认的造模方法。

球囊损伤法能够获得广泛的应用,更得益与其构建管腔狭窄的效率。在术后的数周至数月内,损伤部位即可出现高度的管腔狭窄[7,10];另一方面又可缩短昂贵的高脂饲喂所需的时间,从而极大节省了成本。此外,球囊损伤还可以“预定”斑块形成的位置,从而引起特定的器官慢性缺血,这是单纯高脂饲喂所不具备的优势。

然而球囊损伤法的上述优势使得其劣势逐渐被忽略。除手术、麻醉易造成动物死亡外,其主要的问题在于球囊损伤所构建“AS 斑块”与真正的人 AS 斑块存在组成成分上的差异,而结构成分差异所反映出的机制上的差异则可能对基于这些模型的研究造成影响。这些差异难以通过冠脉造影发现,但通过病理学方法进行组织形态分析则可以对二者进行区分。

因此本研究拟通过对球囊拉伤法构建小型猪 AS 模型的文献进行检索,提取文中 AS 病变的病理图像信息进行分析,对比其与人自发形成 AS 斑块的差异,并探讨其形成机制及对科学研究的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

研究对象为单独或联合使用球囊损伤法构建小型猪或普通家猪 AS 模型相关的实验研究,并对病理图像进行再评价。

1.2　方法

1.2.1　检索方法

以中国知网、万方、维普三大中文数据库及 PubMed、Web of Science 数据库作为资料来源。对“球囊损伤”、“动脉粥样硬化”、“模型”、“miniature swine”、“Balloon Injury”、“Atherosclerosis”等关键词进行检索,检索期限为建库至 2020 年 4 月 14 日。

1.2.2　文献筛选及标准

由 2 位研究者独立筛选文献并交叉核对,如有分歧则咨询第三方专家协助判断,如无法获得全文的与作者联系予以补充。

对于检索到的文献按照如下标准进行逐步筛选:(1)通过标题及摘要,排除所有重复文献及与构建 AS 模型无关的文献;(2)排除重复文献,获取全文并通读;(3)排除器官离体实验及细胞实验文献;(4)排除研究动物不为家猪或小型猪文献;(5)排除造模方法不为球囊损伤的文献;(6)排除未提供冠状动脉病理图像为的文献;(7)排除无法提供清晰彩色病理图像的文献;(8)排除未提供仅采用球囊损伤一种手术法的病变图像的研究;(9)排除同时合并其他除诱导高脂血症以外的干预方式的研究;(10)排除使用相同图像的文献。

1.2.3　资料提取

对最终筛选的文献进行资料提取,包括:(1)文献提供的病理图像(不包括联合其他手术法的图像,如支架、线圈、加热球囊、壁内注射等),并根据所提供的图像的特征进行重新描述;(2)手术与取材的时间间隔;(3)研究使用的动物品系;(4)研究采用的其他造模辅助方法。

1.2.4 病理学诊断标准

判断胶原纤维、蛋白聚糖和 SMC 参考以下诊断标准[12]：在 Masson Trichrome 染色（简称 Masson 染色）下胶原纤维蓝染，SMC 红染；在 Movat Pentachrome（Movat 五色套染）染色下胶原纤维黄染，蛋白聚糖蓝-绿染，SMC 红染；在 Azan 染色下，胶原纤维蓝色，肌纤维橘红-红染；Elastin Van Gieson（EVG）染色下胶原纤维红染；肌纤维呈黄染。对每张病理图片中 AS 斑块构成成分进行判断，分为"+"：肯定存在；"-"：肯定不存在；"+-"可能存在（病理特征不典型但不能排除）；"○"：根据提供的切片及染色方法无法进行判断。

1.2.5 偏倚风险评价

使用 SYRCLE 动物实验偏倚风险评估工具[13]对纳入的文献进行偏倚风险的评价。

1.3 统计学分析

采用基于病理图像的文献系统评价方法。由于这一方法不能反映各项研究的权重，因此不进行数据合并 Meta 分析，仅对文献进行描述统计。

2 结果

2.1 文献筛选流程及结果

2.1.1 文献筛选结果

从五大数据库中共检索到文献 878 篇；去除重复文献 139 篇，剩余 739 篇；根据题目及摘要，去除与冠状动脉球囊成形术无关的文献 489 篇，剩余 250 篇；去除无法提供清晰彩色病理图像的文献 180 篇，剩余 70 篇；去除合并使用其他手术法（如壁内注射）或干预（如病毒转染）且未提供仅采用球囊损伤一种手术法和（或）仅采用高脂饲喂一种干预方法的病变彩色病理图像的文献 32 篇，剩余 38 篇。

2.1.2 纳入文献信息总览

在纳入的 38 篇文献中，中文 3 篇，英文 35 篇；取材时间为手术后 2 ~ 52 周，大部分文献为术后 4 周；10 篇文献同时联用高脂饲喂法进行 AS 的造模，其余文献均采用单一的球囊损伤；仅有 5 篇文献采用单一的 H&E 染色，其余文献合并使用 Masson、EVG、Movat 五色套染、α-SMA 免疫组化、天狼星红染色等方法中的一种或多种进行组织学染色。

2.2 各研究中病理图像组织形态学结果

2.2.1 球囊损伤病变与人类 AS 组织形态的相似性

在纳入的所有研究中，大多数研究提供的图像与人类 AS 病变在形态学上具有明显的差异。具体表现为：可见管腔狭窄，主要以新生内膜为主；内侧弹力版断裂，纤维帽及脂质核心不可见；新生内膜主要构成为平滑肌细胞（smooth muscle cell，SMC）及蛋白聚糖。仅有 1 项研究提供的图像类似于人类 AS 病变，达到 AHA IV 期；但与人类典型的晚期 AS 病变形态"成熟纤维帽覆盖有脂质核心"的特征相比仍有较大差异。

在纳入的所有 38 项研究提供的病理图像中，病变的形态学基本一致，即：管腔存在中至重度狭窄，狭窄主要由新生内膜引起；新生内膜处内侧弹力板可见断裂；纤维帽、坏死核心及细胞外脂质不可见。病理特征统计信息（表 1）。

2.2.2 新生内膜的构成分析

由于在 H&E 染色下新生内膜的成分难以区分，因此通过观察使用 EVG、Masson、Movat 五色套染的病理切片（34 项研究），分析新生内膜的构成，结果提示新生内膜中平滑肌细胞、胶原纤维及蛋白聚糖均匀混合，胶原成分多于或少于中膜（使用中膜作为参照）；蛋白聚糖成分显著多于胶原成分（表 2）。

2.2.3 新生内膜中胶原成分的分析

在纳入的研究中有 4 项研究采用了天狼星红染色，1 项（Iso 2006）未进行偏振光检验，2 项研究的病理图像显示新生内膜中胶原成分以 III 型胶原为主，1 项显示以 I 型胶原为主。

表 1 纳入研究的图像病理特征统计

Table 1 Description of morphological features of images included

成分 Composition	是 Visible	否 Invisible	可能 Possible	染色方法及切片无法确定 Unclear due to section & staining
管腔狭窄 Lumen stenosis	33	3	0	2
纤维帽 Fibrosis cap	2	32	1	3
坏死核心 Necrotic core	2	32	1	3
内侧弹力版断裂 IEL fracture	33	1	0	4
细胞外脂质 Extracellular lipid	3	21	3	11
新生内膜 Intimal hyperplasia	38	0	0	0

2.2.4　高脂饲喂对球囊损伤后的病理形态特征的影响

在纳入的研究中共有 10 项研究采用联合高脂饲喂法构建 AS 模型,这些研究大多进行手术至取材的时间间隔较长。在这些研究中,除未提供完整血管横截面的 2 项研究外,其余均存在管腔狭窄,5 项研究狭窄大于等于 75%;有 5 项存在(或可能存在)胞外脂质沉积,2 项存在(或可能存在)坏死核心,2 项存在(或可能存在)纤维帽;1 项类似于典型的 AS 病变(见表 3)。

表 2　新生内膜构成成分的分析

Table 2　Analysis of structure of neointimal hyperplasia

染色方法 Staining methods	文献数 Number	是否均匀分布 Distributed evenly		胶原成分与中膜相比 Intimal collagen compared to media		蛋白聚糖成分与中膜相比 Intimal proteoglycans compared to media	
		是 Yes	否 No	较多 More	较少 Less	较多 More	较少 Less
EVG	15	14	1	4	11	-	-
Masson	13	13	2	3	10	-	-
Movat 五色套染 Movat Pentachrome	6	6	0	1	5	6	0

注:"-"表示 EVG 染色及 Masson 染色无法判断蛋白聚糖的含量。
Note. "-"means the content of proteoglycans cannot be judged via EVG and Masson staining sections.

表 3　高脂饲喂 + 球囊拉伤病理学特征统计

Table 3　Description of morphological features of lesions induced by high-cholesterol diet & balloon injury

成分 Composition	是 Visible	否 Invisible	可能 Possible	染色方法及切片无法确定 Unclear due to section & staining
管腔狭窄 Lumen stenosis	8	0	0	2
纤维帽 Fibrosis cap	1	6	1	2
坏死核心 Necrotic core	2	6	0	2
内侧弹力版断裂 IEL fracture	6	1	0	3
细胞外脂质 Extracellular lipid	3	1	2	5

2.3　偏倚风险

所有研究均提及动物的随机分组,但未阐明具体方法,因此选择性偏倚为"不确定";研究均未提及对研究者施盲,故实施偏倚为"不确定";所有研究均对所有动物进行测量评估,但由于论文篇幅论文无法提供所有病理切片的图像,故测量偏倚为"不确定";所有研究均未选择性报告结果,故不存在报告偏倚;33 项研究采用单纯球囊损伤(或联合高脂饲喂)作为对照组,36 项研究的研究目的非探索新生内膜的病理形态,因此发表偏倚风险较低。

3　讨论

3.1　球囊损伤病变与人类 AS 形态的差异

本研究认发现,由球囊损伤引起的冠状动脉病变具有以下形态学特征:血管内膜显著增生;增生内膜的主要成分为平滑肌细胞和蛋白聚糖,而胶原成分相对减少;内侧弹力板断裂常见;除非使用家族性高脂血症动物或长期高脂饲喂,否则难以见到脂质核心及纤维帽。

这一结果显著区别于临床中典型的 AS。根据 AS 分类的 AHA 分期及分类标准,其结缔组织成分似 III 型病变,但其管腔狭窄达到 V 型病变程度;富含脂质的 Va 型病变是冠状动脉中最典型的病变,而这类病变很少见到脂质核心的形成;含脂质较少的 Vc 型病变主要由胶原纤维构成,又主要见于下肢动脉[14-15],而这一病变胶原成分相对较少。因此这类病变难以划分为 AHA 标准中的任何一类。

3.2　球囊损伤病变与 AS 机制的差异

球囊损伤病变并不符合典型的 AS 病变任一时期的特征,可能反映了这一病变在形成机制上与 AS 的差异。在所有纳入的病理图像中,97% 切片均可见内侧弹力板(internal elastic lamina, IEL)断裂,由此猜想球囊损伤导致内膜增厚的主因是球囊拉伤引起的血管应力改变,导致中膜平滑肌细胞的表型转变,由收缩表型转变为增殖表型,由中膜迁移至内膜,大量增殖并分泌细胞外基质(其主要成分为蛋白聚糖);而冠状动脉作为弹力肌型动脉,其 IEL 相对薄弱,在球囊的过度扩张及拖拽下极易断裂,断裂的 IEL 又有助于活化的 SMC 迁移到内膜区;大量活化的 SMC 在内膜区域快速增殖,分泌细胞外基质,因此形成了以 SMC 及蛋白聚糖为主要成分的内膜增生,导致管腔高度狭窄。

球囊损伤病变缺乏脂质核心的原因在于:脂质核心主要由泡沫细胞崩解形成,而短期(数周)的高脂饲喂,在代谢正常的动物体内无法引起足够的脂质在管壁沉积,而长期(长达 1 至 3 年[16-17])高脂饲喂或使用患有脂类代谢异常遗传病的动物[7,11,18],则可以产生具有坏死核心的典型 AS(AHA IV 型)病变。

球囊损伤病变纤维帽少见的原因为:AS 纤维帽的形成机制是被激活的 SMC 及成纤维细胞大量分泌胶原,随着炎症反应由斑块表面逐渐向深部发展,SMC 崩解坏死而胶原纤维则沉积在斑块表面(即管腔一侧),但这一过程十分漫长;同时当沉积的胶原纤维出现侵蚀时可在侵蚀部位形成血栓,被机化后的血栓[14]及外源成纤维细胞[19]也参与了纤维帽的构成。而球囊损伤后短期内难以具备上述形成纤维帽形成的条件。但在一些长期的研究中可以见到胶原纤维向斑块表面沉积的趋势。

3.3 对科学研究的影响

构建 AS 动物模型的目的主要为机制研究、药理学研究、药效评价及介入器械评价。球囊损伤法构建的病变存在机制和形态学上的差异,对于上述研究可能会存在影响。比如,由于球囊损伤病变不存在细胞外脂质及坏死核心,而氧化低密度脂蛋白是 AS 形成中重要的致炎因素[20],球囊损伤病变的炎症水平可能远低于晚期 AS,因此该模型可能不适用于 AS 形成的脂质机制研究。另一方面,由于球囊损伤模型的新生内膜主要由蛋白聚糖和 SMC 为主,与典型的冠状动脉粥样硬化斑块相比具有较高的韧度,在支架部署时更易发生贴壁不良,因此理论上具有更高程度的支架内再狭窄及支架血栓的发生率[21],从而可能对介入器械的评价造成一定的影响。因此将球囊损伤病变作为“AS”病变而进行研究,可能会对研究结果造成不可预测的偏差。

4 结论

球囊损伤导致的内膜增生形态学上的具体表现为:血管内膜显著增生;增生内膜的主要成分为平滑肌细胞和蛋白聚糖,而胶原成分相对减少;内侧弹力板断裂常见。这一特征与 AS 的“纤维帽覆盖脂质核心”的特征具有显著差异。两种病变形态上的差异反映出机制上的差异,以该模型作为 AS 模型应用于脂质机制研究及临床前评价应慎重。

参 考 文 献(References)

[1] Knuuti J, Wijns W, Saraste A, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes [J]. Eur Heart J, 2020, 41(3): 407-477.

[2] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等.《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.
Hu SS, Gao RL, Liu LS, et al. Summary of china cardiovascular disease report 2018 [J]. Chin Circul J, 2019, 34(3): 209-220.

[3] Hamamdzic D, Wilensky RL. Porcine models of accelerated coronary atherosclerosis: role of diabetes mellitus and hypercholesterolemia [J]. J Diabetes Res, 2013, 2013: 761415.

[4] Iqbal J, Chamberlain J, Francis SE, et al. Role of animal models in coronary stenting [J]. Ann Biomed Eng, 2016, 44(2): 453-465.

[5] Schomberg DT, Tellez A, Meudt JJ, et al. Miniature swine for preclinical modeling of complexities of human disease for translational scientific discovery and accelerated development of therapies and medical devices [J]. Toxicol Pathol, 2016, 44(3): 299-314.

[6] Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic yucatan micropig [J]. Circulation, 1994, 89(6): 2816-2821.

[7] Ogita M, Miyauchi K, Onishi A, et al. Development of accelerated coronary atherosclerosis model using low density lipoprotein receptor knock-out swine with balloon injury [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0163055.

[8] Suzuki Y, Lyons JK, Yeung AC, et al. The porcine restenosis model using thermal balloon injury: comparison with the model by coronary stenting [J]. J Invasive Cardiol, 2008, 20(3): 142-146.

[9] Lee WM, Lee KT. Advanced coronary atherosclerosis in swine produced by combination of balloon-catheter injury and cholesterol feeding [J]. Exp Mol Pathol, 1975, 23(3): 491-499.

[10] Busnelli M, Froio A, Bacci ML, et al. Pathogenetic role of hypercholesterolemia in a novel preclinical model of vascular injury in pigs [J]. Atherosclerosis, 2009, 207(2): 384-390.

[11] Thim T, Hagensen MK, Drouet L, et al. Familial hypercholesterolaemic downsized pig with human-like coronary atherosclerosis: a model for preclinical studies [J]. EuroIntervention, 2010, 6(2): 261-268.

[12] 龚志锦, 詹镕洲. 病理组织制片和染色技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1994.
Gong ZJ, Zhan RZ. Pathological tissue preparation and staining technology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1994.

[13] Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, et al. Syrcle's risk of bias tool for animal studies [J]. BMC Med Res Methodol, 2014, 14: 43.

[14] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological

classification of atherosclerosis. A report from the vommittee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, american heart association [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995, 15(9): 1512-1531.

[15] Ross R, Wight TN, Strandness E, et al. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery [J]. Am J Pathol, 1984, 114(1): 79-93.

[16] Reitman JS, Mahley RW, Fry DL. Yucatan miniature swine as a model for diet-induced atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 1982, 43(1): 119-132.

[17] Prescott MF, Hasler RJ, von Linden RJ, et al. Familial hypercholesterolemia associated with coronary atherosclerosis in swine bearing different alleles for apolipoprotein B [J]. Ann N Y Acad Sci, 1995, 748: 283-292.

[18] Hoogendoorn A, den Hoedt S, Hartman EMJ, et al. Variation in coronary atherosclerosis severity related to a distinct LDL (Low-Density Lipoprotein) profile: findings from a familial hypercholesterolemia pig model [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(11): 2338-2352.

[19] Fleenor BS, Bowles DK. Negligible contribution of coronary adventitial fibroblasts to neointimal formation following balloon angioplasty in swine [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(5): H1532-H1539.

[20] 葛均波, 徐永健, 王辰. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
Ge JB, Xu YJ, Wang C. Internal medicine [M]. Beijing: People's Medical Press, 2018.

[21] Omeh DJ, Shlofmitz E. Restenosis [M]. Treasure island (FL): StatPearls Publishing & StatPearls Publishing LLC, 2019.

[收稿日期] 2019-05-27