

大鼠下腔静脉血栓模型的建立及手术技巧

白云城,赵学凌,周如丹*,周志化,吴雪梅,王 兵

(昆明医科大学第一附属医院骨科,云南 昆明 650032)

[摘要] 目的:建立大鼠下腔静脉血栓模型,总结建立模型过程中的手术技巧与注意事项。方法:健康SD大鼠64只,分为对照组和造模组,造模组采用“狭窄法”,阻断下腔静脉大部分血流,通过结扎后相应时间点开腹观察和取材,进行病理学检查,评价造模是否成功。结果:对照组和造模组在实验过程中均未出现意外死亡,生存率100%。对照组下腔静脉无血栓形成(0/8);造模组在狭窄法术后2h可见有血栓形成(6/8,75%),至术后6h均可见血栓形成(8/8,100%),术后24h和48h,血栓形成,同时管腔内明显充血(16/16,100%),术后7d血栓有机化表现,但未出现明显消退(8/8,100%),术后14d至术后21d观察到血栓溶解消退(16/16,100%)。结论:采用狭窄法使下腔静脉血流淤滞,可成功建立下腔静脉血栓模型。

[关键词] 血栓;血管生物学;静脉血栓;动物模型;大鼠

[中图分类号] R619.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)03-394-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140329

Rat inferior vena cava thrombosis model and surgical techniques

Bai Yuncheng, Zhao Xueling, Zhou Rudan*, Zhou Zhihua, Wu Xuemei, Wang Bing

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rat model of inferior vena cava thrombosis, and to summarize the process of modeling techniques and surgical considerations. **Methods:** A total of 82 healthy SD rats were divided into the control group and the model group. The model group was adopted a "stenosis technology", which blocked most of blood flow in the inferior vena cava. At determined time points after ligation, laparotomy was performed and tissues were observed and sampled for pathological examination to evaluate modeling success. **Results:** Both of the two groups survived during the whole experiment and there were no accidental death, with the survival rate of 100%. The control group had no inferior vena cava thrombosis (0/8); in the Model group, thrombosis (6/8, 75%) was found after two hours of surgery, and it was visible after 6 hours (8/8, 100%). Between 24 to 48 hours after surgery, a stable thrombus formed with a lumen hyperemia (16/16, 100%). After 7 days, organic thrombus was observed, but there was no significant regression (8/8, 100%). The dissolving thrombus regression was observed between 14 to 21 days after surgery (16/16, 100%). **Conclusion:** The stenosis technology can be used to block inferior vena cava blood flow successfully to establish the inferior vena cava thrombosis model.

[Key words] thrombosis; vascular biology; venous thrombosis; animal models; rat

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(03):394-399]

静脉血栓栓塞症包括深静脉血栓 (deep venous thrombosis, DVT) 形成以及肺栓塞, 是临床上常见的血管疾病, 好发于髌膝关节置换术后患者、老龄患者

等人群, 目前全世界范围内其发病率和病死率有上升的趋势^[1]。DVT 栓子脱落后, 经上腔或下腔静脉进入肺循环, 引发肺栓塞。研究 DVT 的发病机制和疾病发展过程, 需要合适的研究对象, 出于伦理等因素, 研究者很难获得 DVT 患者的静脉组织或血栓直接进行研究^[2], 因此, 建立可进行实时观察研究的 DVT 动物模型成为必要的替代方法。理想的动物血栓模型应具备成栓稳定、制备技术简单、操作

[基金项目] 国家自然科学基金面上资助项目(81160236); 云南省卫生科技项目(2011WS0034, 2012WS0007); 云南省博士研究生学术新人奖项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: kittypku@qq.com

迅速、易重复等特点,所形成的血栓体积、质量应较大以易于分子鉴定,形成的血栓应在深静脉中(例如下腔静脉)^[3-4]。SD 大鼠具有培养繁殖快、价格低、手术耐受性强、可操作性高等优点,是一种较理想的实验物种,本研究选其作为造模动物,并应用狭窄法结扎下腔静脉,造成下腔静脉血流淤滞,血管管腔内形成血栓,成功建立下腔静脉血栓模型。结果及经验报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠 64 只,雌性,体重 180~230 g,由昆明医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(滇)2011-0004,实验动物分笼饲养,均给标准饲料喂养,自由饮水。动物分组先将 64 只大鼠按阿拉伯数字顺序编号,采用随机数表法将动物随机分为两组:造模组($n = 56$)和对照组($n = 8$)。

1.1.2 主要材料与仪器

10%水合氯醛由昆明医科大学第一附属医院制剂厂提供(20130414);青霉素(S0906808)为石家庄华北制药有限股份公司生产;手术器械由昆明医科大学外科手术实验室提供;4-0、5-0 爱惜康缝线(SA84G)为强生(中国)医疗器材有限公司生产;组

织标本病理切片在昆明医科大学第三附属医院病理科完成。

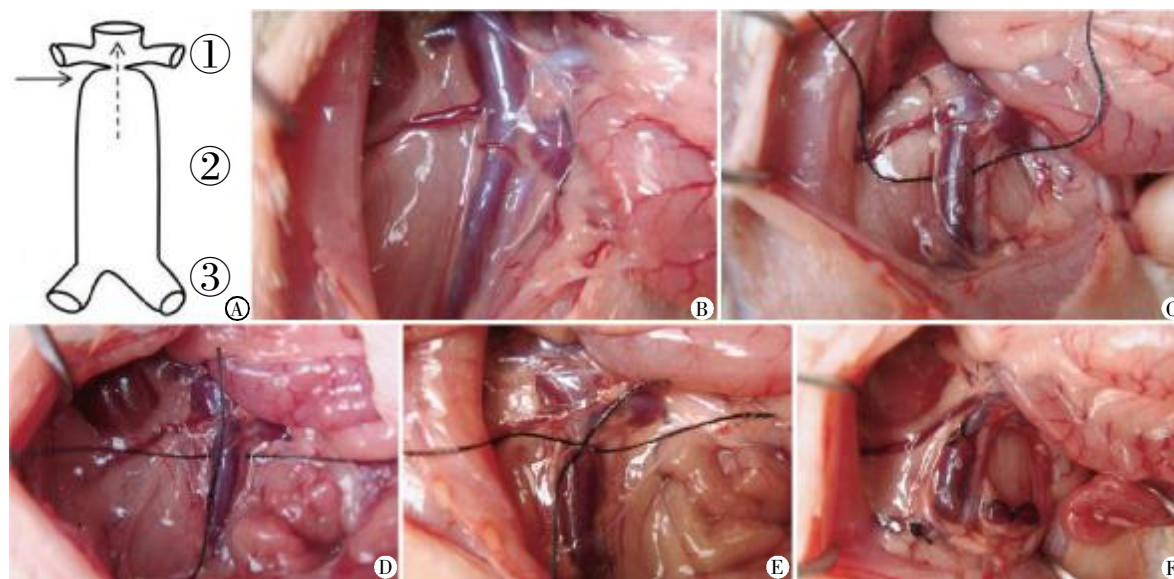
1.2 方法

1.2.1 模型复制

造模组大鼠术前 12 h 禁食,不限饮水。10%水合氯醛与生理盐水 1:1 稀释之后配成 5%水合氯醛,将 5%水合氯醛按(3.5 ml/kg)经腹腔注射麻醉。麻醉起效后常规备皮、消毒、铺巾,参照国外文献报道下腔静脉结扎小鼠的手术程序和经验^[5],经大鼠腹部正中切口进腹,将小肠牵向术野左侧,充分显露下腔静脉,打开后腹膜,确认左肾静脉下方 2 mm 处的下腔静脉结扎点,仔细游离下腔静脉,用 5-0 爱惜康缝线逐一显露和结扎左肾静脉以下的下腔静脉分支至髂静脉水平。结扎下腔静脉分支后,在结扎点穿过 5-0 爱惜康缝线,另取 1 根 4-0 爱惜康缝线与下腔静脉主干并排,5-0 缝线方结打结之后,谨慎抽出并排的 4-0 缝线,完成下腔静脉“狭窄”模型(图 1),此方法即为“狭窄法”。主要操作结束后,确认大鼠呼吸循环平稳,逐层关腹,皮下洒少许青霉素粉末。

对照组大鼠术前 12 h 禁食,不限饮水,与造模组相同麻醉,开腹、显露下腔静脉结扎点后用 5-0 爱惜康缝线结扎,打单个结,然后抽出线结,解除结扎,确认无活动出血,关腹程序同造模组。

所有实验大鼠术后保暖,保持环境温度在 25℃ 左右。单独饲养,麻醉清醒后少量饮水并给予食物。



A: 下腔静脉结扎点示意图。①肾静脉分支平面;②下腔静脉;③髂静脉分支平面。虚心箭头示造模后下腔静脉血流未完全受阻;实心箭头示下腔静脉结扎点。B: 显示下腔静脉与肾静脉分支解剖位置。C: 显示在左肾静脉下方 2 mm 处穿过 5-0 爱惜康缝线。D: 显示另取 1 根 4-0 爱惜康缝线与下腔静脉主干并排。E、F: 用 5-0 缝线方结打结之后,谨慎抽出 4-0 缝线,完成狭窄法造模过程。

图 1 狭窄法复制大鼠下腔静脉血栓模型过程

Figure 1 Establish a rat model of inferior vena cava thrombosis by stenosis technology

1.2.2 观察指标

术后观察动物的活动、进食及饮水情况,在实验饲养期间观察动物生存情况,观察造模组大鼠术后2 h($n=8$)、6 h($n=8$)、24 h($n=8$)、48 h($n=8$)、7 d($n=8$)、14 d($n=8$)、21 d($n=8$)的下腔静脉血栓形成情况。同时,在上述时间点及刚完成开腹时,各选1只对照组大鼠观察血栓形成情况($n=8$)。病理学检查:按上述时间点,取下腔静脉组织标本,采用4%多聚甲醛固定24 h,脱水后常规石蜡包埋,苏木素-伊红染色,不同倍数光镜下观察。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件,计量资料间的比较采用 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活率

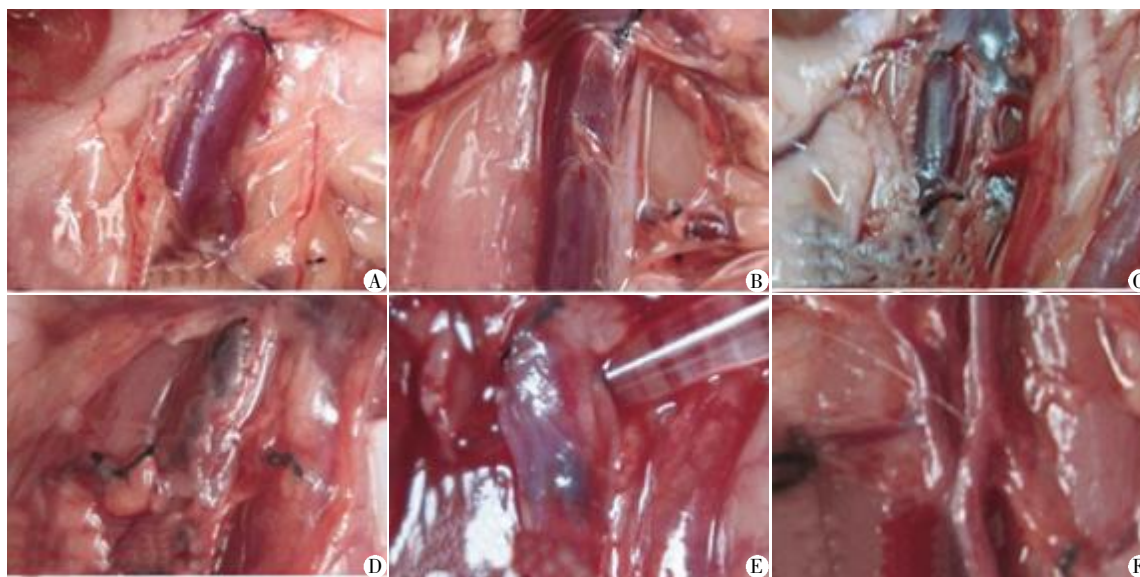
对照组与造模组术后大鼠存活率均为100%。

2.2 大体形态观察

在各个观察时间点,对照组大鼠仅见少许腹腔粘连,下腔静脉无肉眼血栓形成,说明结扎血管这一步骤并不是血栓形成的直接原因。图2、3显示狭窄法造模组术后各时间点血栓形成情况。术后2 h可见有血栓形成(6/8,75%);至术后6 h均可见血栓形成(8/8,100%);术后24、48 h,血栓形成稳定,并有管腔内明显充血(16/16,100%);术后7 d血栓已没有明显充血(8/8,100%),术后14 d血栓开始缩小(8/8,100%,图中未显示);至术后21 d观察到血栓有溶解消退(8/8,100%)。

2.3 病理学观察

对照组下腔静脉病理切片显示血管壁内皮细胞排列整齐,无纤维化增生及炎性细胞浸润。造模组可见术后2 h血栓形成,在造模后2~48 h,随着造模时



A:造模组在狭窄法术后2 h可见有血栓形成;B:术后6 h均可见血栓形成;C、D:术后24~48 h,血栓形成稳定;E:术后7 d血管腔没有明显充血;F:术后21 d观察到血栓溶解消退,下腔静脉再通。

图2 造模后不同时间点大体图片

Figure 2 The general picture at different time points after modeling

间的延长,管腔内充血加剧,并且不断有炎性细胞开始浸润,以中性粒细胞为主,周围可见纤维化增生改变。至第7天开始出现血栓的机化(图4)。

3 讨论

目前下腔静脉结扎模型所选用的动物主要为啮齿类动物和灵长类动物两大类,啮齿类动物以大鼠、小鼠为主^[6],灵长类动物多用狒狒^[7],本研究报道结扎大鼠部分下腔静脉建立血栓模型,探讨相应的手

术操作技巧,此方面的研究国内尚不多见。

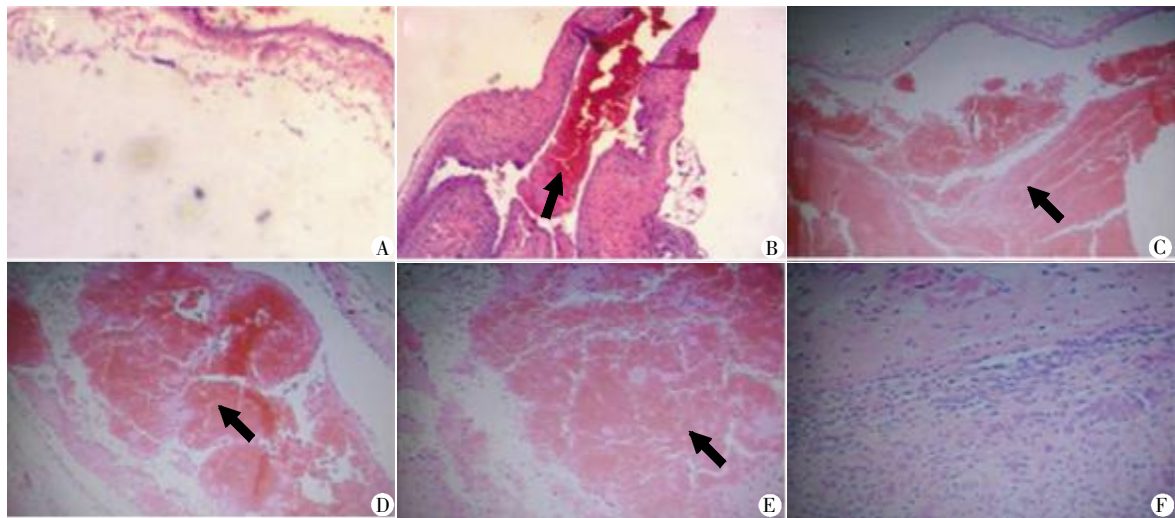
1846年Virchow提出血栓形成三大因素:血流状态改变、静脉内皮损伤、血液成分改变,奠定了静脉血栓形成的理论基础^[8]。现代研究发现,深静脉血栓形成的诱发因素既有手术创伤,也有静脉血液淤滞,但无论是创伤还是淤滞,深静脉血栓形成与静脉血管内皮受损并无直接关联。最新研究观点认为,淤滞或缺氧导致的静脉内皮细胞活化才是血栓形成的触发点^[2,9-10]。在长期卧床或保持制动的患者中,下



A: 为对照组未见血栓; B: 造模组术后 2 h 有微血栓形成; C: 术后 6 h 血栓完全形成; D: 术后 24 h, 血栓形成稳定, 血管腔扩张; E: 术后 7 d 血栓有机化表现, 并可见血管壁近心端为红色血栓(头侧), 远心端为白色血栓(尾侧); F: 术后 21 d 观察到血栓有溶解消退, 静脉血管再通。

图 3 造模后不同时间点下腔静脉标本

Figure 3 Different time points of the inferior vena cava specimens after modeling



A: 为对照组病理切片, 未见血栓形成; B: 造模后 2 h 可见微血栓; C: 造模后 6 h 血栓完全形成; D、E: 造模后 48 h 血栓形成并有充血; F: 造模后 7 d 血栓出现机化。图片中短箭头的位置代表血栓。

图 4 对照组与造模组下腔静脉病理切片(HE, ×40)

Figure 4 The inferior vena cava biopsy of the control group and the model group(HE, ×40)

肢静脉血液易引起淤滞, 下腔静脉的静脉窦易处于缺氧状态, 血液淤滞与缺氧相互促进, 导致该处静脉内皮细胞活化, 启动外源性凝血途径引发血栓。因此引发静脉血栓的起始事件是静脉内皮细胞的

活化而非损伤^[9-10]。报道的动物血栓造模多用钳夹静脉组织、电解法刺激静脉组织等直接损伤静脉内皮的方法^[11], 与实际临床状态有差异。近年, 无动物血管内皮损伤的血栓模型建立方法在国际上已有报道^[12]。

本研究前期已采用结扎下腔静脉的方法成功建立了小鼠深静脉血栓模型,并在此基础上进行了血栓机制的研究^[13]。无损伤的静脉内皮可引发血栓形成,且所造成的静脉血液淤滞比损伤内皮的方法更接近于临床情况,故本研究采用狭窄法建立稳定的大鼠下腔静脉血栓模型,并就相关操作经验进行探讨。今后我们将取动物的血清、静脉、血栓等为研究材料,进行血栓的形成机制、生长与消退机制等方面的研究。

结扎下腔静脉的方法主要包括完全结扎法和狭窄法两种方法。完全结扎法完全阻断下腔静脉及其侧支循环血流,下肢血液只能通过下腔静脉后侧属支以及门静脉系统回流,Zhou等^[14]学者报道在完全结扎大鼠下腔静脉的情况下,结扎点以下的静脉血管迅速扩大膨胀,结扎后15 min即可观察到管腔内的微血栓形成,约1 h后所有实验组大鼠的下腔静脉内均可见到血栓。本研究采用下腔静脉狭窄法,结扎下腔静脉各分支后,确认左肾静脉下方2 mm处的下腔静脉结扎点,在结扎点穿过5-0爱惜康缝线,另取1根4-0爱惜康缝线与下腔静脉主干并行,5-0缝线方结打结之后,谨慎抽出并排的4-0缝线,制造下腔静脉“狭窄”模型,阻断下腔静脉主干大部分血流,并结扎肉眼可见的侧支血管。实验结果显示,对照组大鼠结扎下腔静脉后立即放开线结,无一例形成血栓,结扎下腔静脉并不是形成血栓的直接原因。造模组大鼠在结扎2 h后开始形成血栓,结扎6 h后,所有实验大鼠均有血栓形成,在实验过程中大鼠均未发生意外死亡,以上结果显示成功建立了下腔静脉血栓模型。至造模后7 d,血栓开始出现机化,约21 d血栓消退,静脉可出现再通。狭窄法造模后的血管内仍有少量血流通过,在狭窄情况下,静脉内皮未受损,狭窄后导致的血液淤滞和缺氧促使了内皮细胞活化,触发了血栓形成,我们认为这是狭窄法造模成功的机制。在下腔静脉管腔未完全结扎的情况下,血栓溶解和再通也可以得到更好观察。相比较之下,完全结扎法完全阻断了下腔静脉血流,仅适用于研究血栓完全堵塞血管的情况,但完全结扎法也有血栓形成稳定、成栓率高、成栓时间早等优点^[12-13],在研究时可根据研究侧重点来选取适当的造模方法。

大鼠静脉系统常有解剖变异,而血管解剖变异情况又会影响血栓形成,如血栓长度、质量以及长度/质量比值,也会影响血栓消退的观察,因此需要特别关注建立下腔静脉模型的手术技巧,以避免因手术操作而引起的人为因素误差。首先需要确定下

腔静脉的结扎点,本研究选取在大鼠左肾静脉下方2 mm处结扎下腔静脉,这个结扎点的统一有利于建立标准,因为结扎后所造成的血栓从头侧向尾侧延伸,与静脉血流方向相反,结扎点即视为血栓头部,红细胞在此聚集(红色血栓),结扎点的统一有利于下一步血栓成分的分析。其次,啮齿类动物和灵长类动物的下腔静脉分支都常有解剖变异,造模时如何处理动物下腔静脉分支目前仍有争议^[14-15]。如前所述,结扎后血栓形成的方向是从头侧延伸至尾侧,即从下腔静脉结扎点开始延续至髂静脉分支处,但是在这段静脉的走行中,如果出现了侧支或者后支血管导致血液流通,血栓延续就会停止^[16],结扎造成的血栓全长一般从结扎点延续至第一支尚未处理的侧支或后支血管处。此步手术操作的关键就是结扎所有肉眼可见的下腔静脉侧支或后支血管,直至髂静脉分支处。此外,研究动物模型血栓时常用到“血栓重量”这一指标,我们在下一步工作中将对血栓重量进行称重和分析,在对动物个体提取标本时,常将血栓与静脉组织一起称量,得到的重量称为“湿重”,目前研究认为不同动物个体静脉壁组织重量差异对血栓重量分析无显著影响^[17]。我们认为以上介绍的建立大鼠下腔静脉血栓模型的手术技巧与基本操作,经验是可取的,并寄望将来更多同行进行实践验证,展开探讨与交流。

[参考文献]

- [1] Raskob GE, Silverstein R, Bratzler DW, et al. Surveillance for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: recommendations from a national workshop[J]. *Am J Prev Med*, 2010, 38(4 Suppl): S502-S509
- [2] Brooks EG, Trotman W, Wadsworth MP, et al. Valves of the deep venous system: an overlooked risk factor[J]. *Blood*, 2009, 114(6): 1276-1279
- [3] Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models[J]. *Blood*, 2011, 117(4): 1400-1407
- [4] Dayal S, Wilson KM, Motto DG, et al. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis[J]. *Circulation*, 2013, 127(12): 1308-1316
- [5] Diaz JA, Hawley AE, Alvarado CM, et al. Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava: a novel mouse model[J]. *Thromb Haemost*, 2010, 104(2): 366-375
- [6] Deatrick KB, Obi A, Luke CE, et al. Matrix metalloproteinase-9 deletion is associated with decreased mid-term

- vein wall fibrosis in experimental stasis DVT[J]. *Thromb Res*, 2013, 132(3): 360-366
- [7] Meier TR, Myers DD Jr, Wroblewski SK, et al. Prophylactic P-selectin inhibition with PSI-421 promotes resolution of venous thrombosis without anticoagulation [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99(2): 343-351
- [8] Virchow R. *Thrombosis and emboli*[M]. Canton, MA: Science History Publications; 1846
- [9] Bovill EG, vander Vliet A. Venous valvular stasis associated hypoxia and thrombosis: what is the link? [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73(2): 527-545
- [10] Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7): 2331-2336
- [11] Diaz JA, Alvarado CM, Wroblewski SK, et al. The electrolytic inferior vena cava model (EIM) to study thrombogenesis and thrombus resolution with continuous blood flow in the mouse [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(6): 1158-1169
- [12] Diaz JA, Obi AT, Myers DD Jr, et al. Critical review of mouse models of venous thrombosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 556-562
- [13] 刘海平, 赵学凌, 吴雪梅, 等. 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在小鼠深静脉血栓模型中的表达及其意义 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(4): 367-372
- [14] Zhou J, May L, Liao P, et al. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 863-869
- [15] Reitsma PH, Versteeg HH, Middeldorp S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 563-568
- [16] Alvarado CM, Diaz JA, Hawley AE, et al. Male mice have increased thrombotic potential: sex differences in a mouse model of venous thrombosis [J]. *Thromb Res*, 2011, 127(5): 478-486
- [17] von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(4): 819-835

[收稿日期] 2013-11-08

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度, 以及读者提供有关信息的出处, 应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料, 一般不宜列入参考文献, 可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行 GB7714-2005 的规定, 建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后, 用阿拉伯数字连续编序, 将序号置于方括号内, 并视具体情况把序号作为上角标, 或作为语句的组成部分。如“张xx^[1]研究发现……”, “李xx等^[2]认为……”, “模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全, 著录格式为:
主要责任者. 题名; 其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地: 出版者, 出版年, 引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况, 则不需重复著录, 按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。

(本刊编辑: 接雅俐)