

标准化兔下肢缺血模型的建立

常聪聪, 丁 洋, 马 龙, 杨书翰, 魏凯凯, 万圣云*

安徽医科大学第二附属医院普外科, 安徽 合肥 230601

[摘要] **目的:**探讨建立标准化兔下肢缺血模型的方法,为在缺血模型上进行的实验提供一个稳定的实验平台。**方法:**将12只新西兰大白兔随机分成2组,每组6只,实验组于左髂总动脉下段水平(髂内动脉与髂外动脉分支处),对照组于左股动脉起始部水平(腹股沟韧带处)结扎,在数字减影血管造影(DSA)下评估缺血模型建立后的下肢供血情况,术后第3天与第10天测股内侧体表温度并进行下肢大体观察。**结果:**实验组DSA下未发现明显可见的侧支动脉供血,对照组下肢造影则显示仍有部分髂内动脉侧支到达下肢供血,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**于髂总动脉下段水平结扎后无明显可见的侧支血管到达下肢供血,可建立基本相同的兔下肢缺血模型。

[关键词] 兔;下肢缺血模型;模型制作方法;结扎法

[中图分类号] R654.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1081-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180813

Establishment of the standardized lower limb ischemia model in rabbits

Chang Congcong, Ding Yang, Ma Long, Yang Shuhan, Wei Kaikai, Wan Shengyun*

Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China

[Abstract] **Objective:** To explore the standard method of lower limbs ischemia model establishment in rabbits to provide a consistent condition for the subsequent study on the basis of ischemia. **Methods:** Twelve New Zealand rabbits were divided into 2 groups (Group I and Group F) according to a random number table with 6 rabbits in each. The rabbits were ligated at the lower segment of the left common iliac artery (cross of internal and external iliac artery) in the group I, or at the start level of left femoral artery (inguinal ligament) in the group F, respectively, followed by DSA to observe the lower limbs blood supply, and measurement of vastus medial shell temperature at the 3rd and 10th day of ligation. **Results:** No blood supply of branch artery was observed in group I whereas there were still branches from the external iliac artery to the lower limb ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ligation at the lower segment of the common iliac artery can promise to block the blood supply for the lower limb, which can be used to establish a consistent lower limb ischemia model.

[Key words] rabbit; hindlimb ischemia animal model; construction method; ligation therapy

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08):1081-1084]

近年来,慢性周围动脉疾病(chronic peripheral arterial disease, PAD)的发病率呈逐年上升的趋势^[1],如下肢动脉硬化闭塞症、血栓闭塞性脉管炎、糖尿病足等,这些疾病可引起严重肢体缺血,严重者导致肢体坏死,甚至引起截肢、死亡等严重不良预后^[2]。目前针对PAD的主要治疗方法包括动脉旁路移植术、腔内介入技术以及近年兴起的干细胞移植等^[3]。目

[基金项目] 安徽省自然科学基金(KJ2013Z115);安徽医科大学临床科学基金(2015xkj107)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wshy63@sina.com

前干细胞移植治疗在体外实验及临床治疗中研究广泛,但干细胞具有多向分化的潜能,具有成骨、成瘤的风险,因此干细胞移植治疗的效果与安全性需要在动物实验中进一步研究^[4-5]。在细胞移植治疗缺血疾病等实验的研究中应预先建立一个缺血的动物模型,而后进行细胞移植并检测移植后的血管新生及缺血的缓解情况,但是在这些动物实验研究中细胞移植效果的评价应依赖于一个统一的缺血模型平台,否则,移植效果对比的说服力将大大降低,因此,缺血模型的制备与评估标准是影响细胞

移植治疗等实验的一大关键因素,本实验的目的就是探讨建立一个标准化的缺血模型,为之后在缺血模型上进行的实验提供一个稳定的实验平台。

1 材料和方法

1.1 材料

3~4个月龄的健康清洁级12只新西兰大白兔(安徽医科大学实验动物中心),平均体重(2.5 ± 0.5)kg,雌雄不限。速眠新II(西南药业股份有限公司);青霉素/链霉素(Gibco公司,美国);盐酸利多卡因(北京紫竹药业有限公司);优维显造影剂(拜耳医药保健有限公司广州分公司)。

数字减影血管造影(DSA)机(PhilipsFD20,飞利浦公司,荷兰);器械包(安徽医科大学第二附属医院);温度计(常州市希雅仪表有限公司);注射器(江苏苏云医疗器械有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 下肢缺血模型制备

3~4个月龄的健康清洁级新西兰大白兔(已备皮)随机分为2组,于右下肢肌肉注射速眠新II(0.2 mL/kg),麻醉完成后仰卧位于左侧腹股沟处做约3 cm斜行切口,小心游离股动脉,与同行静脉及神经分离,对照组6只自股动脉起始部(腹股沟韧带处)结扎股动脉,实验组6只于髂总动脉下段水平(髂内动脉与髂外动脉分支处)结扎。

1.2.2 DSA造影

将已经完成下肢缺血模型制作的实验组兔子仰卧位置于DSA机床上,经髂总动脉入路插入肝素浸泡的3F微导管,头端置于髂总动脉内,以1.5 mL/s的速度注入已调配到适宜浓度的造影剂优维显15 mL,采用连续电影摄影记录造影结果,摄影速度为14帧/s,采集图像15幅/s,放大倍率1.25倍,用数字减影的方法处理造影结果,观察并计数其所显示的血管。造影完成后缝合切口,术后3 d青霉素/链

霉素抗感染。

1.3 统计学方法

实验结果的统计分析均用SPSS 16.0统计软件进行分析,组内离散程度用中位数四分位距法[$M(P_{25}, P_{75})$]进行描述,两组间离散程度用 χ^2 检验进行比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DSA造影结果对比

兔下肢血供较复杂,术前造影可见多条分支血管(图1A),对照组结扎股动脉后造影下观察可见髂内动脉部分小分支血管仍可到达下肢供血(图1B),实验组结扎髂总动脉后则无明显可见分支血管到达下肢供血,偶可见1支小分支血管(图1C),对照组 $M(P_{25}, P_{75})$:2.00(1.75, 3.25)条,实验组 $M(P_{25}, P_{75})$:0.00(0.00, 0.25)条,对照组离散程度明显大于实验组,两组间比较对照组高于实验组($\chi^2=8.605$, $P < 0.05$),差异有统计学意义。

2.2 术后下肢温度对比

术后体表温度在同一房间、同一条件下测量,可排除环境温度的影响。术后3 d测下肢股内侧体表温度,对照组 $M(P_{25}, P_{75})$:24.55(24.25, 24.92)°C,实验组 $M(P_{25}, P_{75})$:24.30(24.20, 24.55)°C,两组组内离散程度差别不大(图3),对照组与实验组组间对比没有明显区别($\chi^2=1.107$, $P > 0.05$),差异无统计学意义。

术后10 d测下肢股内侧体表温度,对照组 $M(P_{25}, P_{75})$:27.95(27.15, 29.00)°C,实验组 $M(P_{25}, P_{75})$:25.75(25.57, 26.02)°C,对照组离散程度明显大于实验组(图4),两组间比较对照组明显高于实验组($\chi^2=7.410$, $P < 0.05$),差异有统计学意义。

2.3 术后大体观察

术后3 d观察对照组与实验组缺血下肢均有炎症,肌张力减低,备皮部位毛发无可见变化,两组无



A:红色箭头所示兔下肢分支血管复杂繁多;B:红色箭头所示结扎股动脉后仍可见数之分支血管为下肢供血;C:红色箭头所示髂总动脉结扎后基本未见分支血管为下肢供血,黄色箭头所示髂总动脉结扎后偶可见一条小分支血管。

图1 动脉结扎术后下肢DSA造影观察结果

Figure 1 Observation of lower limb blood supply by DSA after artery ligation

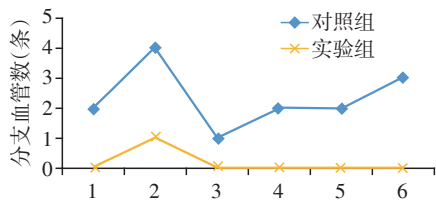


图2 两组动脉结扎后DSA下可见的血管数

Figure 2 The counting of vessels by DSA after artery ligation in the two groups

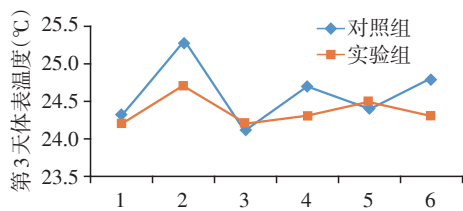


图3 两组术后3 d股内侧体表温度

Figure 3 The medial shell temperature three days after ligation in the two groups

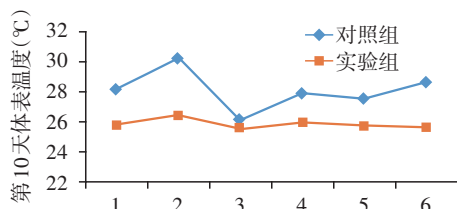


图4 两组术后10 d股内侧体表温度

Figure 4 The medial shell temperature ten days after ligation in the two groups

明显差别。

术后10 d观察对照组炎症有明显减轻,实验组炎症仍在加重,对照组肌张力明显高于实验组,对照组备皮部位毛发有轻微增长,实验组备皮部位毛发则无明显变化。

3 讨论

1978年Herring等^[6]首次报道自体血管内皮细胞体外种植于人工血管内表面可减少移植于犬腹主动脉段人工血管血栓形成,开创了人工血管内皮化的新途径,近年来,细胞移植治疗成为治疗下肢动脉闭塞症、糖尿病血管病变等PAD的有效方法,尤其是对一些下肢血管长段闭塞以及远端流出道狭窄的患者,传统手术自体或者人工血管移植效果差,介入支架治疗也难以植入^[7],细胞移植治疗成为这部分患者的有效的方法,但是细胞移植治疗的效果与安全性需要在动物实验中进一步研究^[4-5]。兔子价格相对便宜,操作相对简单逐渐成为建立下肢缺血

模型的首选实验对象,但是兔子下肢血管相对较复杂,分支血管杂乱繁多,当存在股动脉等主要下肢供血血管时,侧支循环开放程度较小,当主要供血血管结扎后,侧支循环开放增加,但开放的程度存在差异,因此建立缺血模型的方法不同,建立的缺血模型其缺血程度也将存在差异。然而大样本动物实验中移植效果的评价依赖于一个稳定的缺血模型,否则其移植效果评价的说服力将大大降低,因此建立一个稳定的下肢缺血模型至关重要。

目前兔子下肢缺血模型建立方法有多种,如结扎法、切除法、缩窄栓塞法、高脂饮食法等^[8-10],结扎法和切除法直接阻断下肢血管血流,其效果基本相同,但结扎法更为简单方便,易于操作,缺点是这两种方法建立的是下肢急性缺血的模型,与正常病变有所不同。在大鼠下肢缺血模型研究中发现,股动脉结扎法其有效缺血维持时间约3 d,适用于较短期的研究,髂总动脉结扎的有效缺血时间则能维持40 d左右,完全适用于细胞移植的实验研究^[11]。虽然缩窄栓塞法和高脂饮食法可以使下肢血管逐渐变窄堵塞,形成下肢慢性的缺血,更为贴近正常下肢血管病变的病理生理,但是其缺血变化难以统一,单一的缺血模型效果更佳,无法建立一批效果基本统一的缺血模型。

在结扎法建立下肢动脉缺血模型的研究中,髂总动脉下段及股动脉起始部为最常用的两个结扎部位,因此,本研究中采用实验组髂总动脉下段水平和对照组股动脉水平结扎分组对比的方法,探讨下肢缺血模型构建的效果,通过DSA观察构建的缺血模型下肢血管情况以及术后股内侧体表温度对比,发现对照组股动脉水平结扎后仍有部分髂内动脉的小分支血管可到达下肢供血,而且组内可见血管数不均一,离散程度较大,模型的缺血程度不均一,而实验组从髂总动脉水平结扎后DSA下则无明显可见分支血管到达下肢供血,与对照组有明显差别。在建立的下肢缺血模型中,术后股内侧体表温度和肌张力这两项指标与缺血程度呈负相关,即缺血越严重其体表温度和肌张力就越低,而炎症程度则与缺血程度呈正相关,即缺血越严重其炎症程度就越重,所以股内侧体表温度、肌张力和炎症程度可以间接反映下肢缺血模型的缺血程度。缺血模型建立术后第3天股内侧体表温度两组差别较小,术后第10天股内侧体表温度对照组升高明显高于实验组,而且对照组内温度离散程度较大,实验组体表温度虽然有所升高,但是升高较少,而且组内

温度离散程度较小。大体观察上对照组下肢炎症恢复快,而实验组炎症仍有加重,对照组肌张力明显高于实验组。

综上所述,虽然通过髂总动脉水平结扎建立的是急性兔下肢缺血模型^[12],但是该缺血效果基本统一,可以建立一批可以相互对比的兔下肢缺血模型,而且该方法以及取材都简单方便,可以为细胞移植等研究提供一个缺血效果基本相同的实验平台。

[参考文献]

- [1] Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease[J]. *Circ Res*, 2015, 116(9):1509-1526
- [2] Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis[J]. *Lancet*, 2013, 382(9901):1329-1340
- [3] Lu D, Chen B, Liang Z, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 92(1):26-36
- [4] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S, et al. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. *Nature*, 2007, 448(7151):313-317
- [5] 张凯辉,徐宝山,杨强,等.骨髓间充质干细胞在多种疾病治疗中的应用进展[J].*中国组织工程研究*, 2017, 21(21):3400-3406
- [6] Herring M, Gardner A, Glover J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium[J]. *Surgery*, 1978, 84(4):498-504
- [7] Ding MC, Fang LI, Wang B, et al. Percutaneous endovascular angioplasty for the treatment of arteriosclerosis obliterans of the lower extremities showing no outflow tract visualization: a preliminary exploration[J]. *J Intervent Radiol*, 2015, 5(5):383-387
- [8] Del GC, Ifergan G, Goudot G, et al. Evaluation of a new model of hind limb ischemia in rabbit[J]. *J Vasc Surg*, 2017, pii: S0741-5214(17)32122-5. doi: 10.1016/j.jvs.2017.07.140.[Epub ahead of print]
- [9] Chen T, Chen D, Li F, et al. Netrin-1 with stem cells promote angiogenesis in limb ischemic rats[J]. *J Surg Res*, 2014, 192(2):664-649
- [10] Baltgalvis KA, White K, Li W, et al. Exercise performance and peripheral vascular insufficiency improve with AMPK activation in high-fat diet-fed mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(8):H1128-1145
- [11] Gao W, LI J. Femoral artery occlusion increases muscle pressor reflex and expression of hypoxia-inducible factor-1 α in sensory neurons[J]. *J Cardiovasc Dis*, 2013, 1(2):34-40
- [12] Shin CI, Kim HC, Song YS, et al. Rat model of hindlimb ischemia induced via embolization with polyvinyl alcohol and N-butyl cyanoacrylate[J]. *Korean J Radiol*, 2013, 14(6):923-930

[收稿日期] 2017-12-27

本刊现已启用网上稿件管理系统,作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。