

肢体缺血动物模型研究进展

陈斌玲¹, 焦雨欢¹, 刘双¹, 高冬^{1*}, 宋军²

1. 福建中医药大学, 福建福州 350108; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700

[摘要] 肢体缺血动物模型是进行缺血损伤机制、血管新生等研究的基础, 成功制作一种效果确切、重复性强的肢体缺血模型是保证实验研究能够顺利进行的关键。本文对近年来暂时和永久缺血两大类肢体缺血动物模型的适用情况、制作方法及评价指标作一简要综述, 以期对今后缺血动物模型的相关实验研究提供一定的线索。

[关键词] 肢体缺血模型; 适用情况; 制作方法; 评价指标

[中图分类号] R543.502

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2012)01(a)-012-03

Research progress on limb ischemia animal model

CHEN Binling¹, JIAO Yuhuan¹, LIU Shuang¹, GAO Dong^{1*}, SONG Jun²

1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Province, Fuzhou 350108, China; 2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] Limb ischemia animal model is the foundation for mechanisms study on ischemia injury as well as angiogenesis. Establishing an effective and reproducible animal model is particularly important for the study. This article reviews the application condition, construction method and evaluation index of limb ischemia animal model with temporary and permanent ischemia, in order to provide definite clues for the future study.

[Key words] Limb ischemia animal model; Application condition; Construction method; Evaluation index

当前缺血性疾病患者日渐增多, 以糖尿病肢体动脉闭塞症(DAO)、闭塞性动脉硬化症(ASO)和血栓闭塞性脉管炎(TAO)为主的下肢缺血性疾病发病率逐年增加。国外资料显示, 70岁以上老年人群中仅动脉硬化闭塞症患病率即可达15%~20%^[1]。而患病人群范围可覆盖至青壮年, 其高发生率和广泛累及率已严重危害着人们的身心健康和生存质量, 亟待探索其发生机制、预防措施及治疗方法。建立缺血动物模型是开展缺血性疾病研究的一种有效途径。通过对动物模型的在体研究, 有助于阐明缺血性疾病的病变机制、发展过程, 筛选出有特异性治疗作用的药物及方法。近年来, 通过建立动物后肢缺血模型进行血管新生、基因疗法和干细胞移植等研究已成为现代生物医学领域中的研究热点。综合国内外研究资料可见, 肢体缺血模型适用于急性缺血、慢性持续性缺血、肢体缺血再灌注以及缺血预处理等几方面的研究^[2-10]。因此, 如何根据实验目的正确选择肢体缺血模型的制作方法, 以及如何对该模型的缺血效果进行评价, 从而制作出效果确实可靠、稳定性良好的肢体缺血模型显得尤为重要。有学者根据缺血效果将缺血动物模型总结为暂时缺血和永久缺血两大类^[2], 本研究现对这两类肢体缺血模型的建立、应用和评价作一总结, 以期为该模型的相关研究应用提供参考。

1 模型制作

1.1 暂时缺血模型

暂时缺血模型包括肢体缺血再灌注损伤模型^[3]以及缺血预处理模型, 适用于肢体缺血再灌注损伤的防治^[4]、肢体远距

缺血预处理^[5]和肢体远距缺血后适应^[6]的研究。暂时缺血模型制作方法分为肢体环扎法和暂时阻断动脉法两种。肢体环扎法是外用绷带、止血带或橡皮筋等物质环扎于动物单侧或双侧肢体根部^[4,7], 一段时间后放开, 以此达到暂时缺血的目的。环扎时间视研究目的而异, 缺血再灌注损伤一般为4 h左右, 而肢体缺血后适应或肢体远距预处理多为5 min, 并反复多次进行。肢体环扎法具有无创性, 对实验动物的损伤较小。暂时阻断动脉法通过手术分离实验动物某侧局部供血动脉, 用血管夹暂时夹闭血流, 最少3 h后撤夹恢复血流灌注, 其效果比肢体环扎法可靠, 但对实验动物的损伤较大^[8]。Messina等^[2]将两种方法相结合使用, 以加强肢体的急性缺血程度, 其效果较单纯环扎或单纯夹闭血管要好。大体上看, 暂时缺血模型的建立方法简便、易行, 效果能够令人满意, 基本上可以符合实验要求。

1.2 永久缺血模型

永久缺血模型是目前国内外肢体急、慢性缺血模型的主流, 在缺血损伤、血管新生、细胞移植及基因转染等方面研究应用最为广泛^[9-11], 其制作方法繁多, 主要有血管结扎切断法和血管栓塞法等。

1.2.1 血管结扎切断法 血管结扎切断法在暂时阻断动脉法基础上, 将分离出的某支供血动、静脉主干或其分支进行结扎或切断以造成急性血管永久阻断而引起缺血, 为国内外肢体缺血模型中最常用的制作方法。根据阻断方式和阻断血管的不同又可细分为单纯结扎血管、结扎并切断血管、动静脉双阻断和单纯动脉阻断几种类型。单纯结扎血管法主要用于构建缺血时间不超过2周的急性缺血模型。而结扎并切断血管法比单纯结扎血管所产生的缺血现象严重, 缺血时间长达4周左右, 甚至Luo等^[12]通过2次手术造成实验动物更为严重的缺血, 持久时间约60 d, 适用于慢性持续性肢体缺血

[基金项目] 国家自然科学基金(项目编号: 30772877); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(项目编号: ZZ2006039)。

[作者简介] 陈斌玲(1986-), 女, 福建龙岩人, 硕士研究生; 研究方向: 中医药与血管新生。

* 通讯作者

模型的建立。动静脉双结扎切断虽可造成较严重的缺血损伤,但其引起的病理改变与外周动脉疾病存在较大差异^[13],目前主要用于缺血模型影响因素方面的研究。而单纯动脉结扎切断因其所引起的血流变化与临床外周动脉疾病相似而被广泛应用^[13],备选切断的血管有股动脉^[14]、股动脉及其分支^[15]、髂总动脉^[16]以及髂、股动脉及其分支^[17-18]等,所引起的缺血损伤程度大体上依该次序递增。不同学者因采用的实验动物品种不同,选择结扎切断的动脉也不尽相同,单纯切断股动脉或髂总动脉一般用于下肢血管非常细的大鼠等小型动物;结扎切断髂股段动脉及其分支,可用于犬、兔等大型动物及小鼠、大鼠等小型动物的造模^[18-20]。若实验动物下肢血管丰富,如小鼠解剖上虽然缺乏股深动脉,但髂股段存在大量侧支血管,则需同时切断髂股段的主要分支以防止侧支血流的快速重建^[20]。以此类推,结扎并切断髂股段动脉及其分支为最普遍采用的永久缺血模型造模方法。

1.2.2 血管栓塞法 血管栓塞法采用外周性血管栓塞剂注入实验动物下肢供血动脉引起血管栓塞进而产生缺血。不同栓塞剂栓塞效果不一。碘化油和明胶海绵属于短期血管栓塞剂,不仅无法栓塞微血管网,且 Kobayashi 等^[21]报道称,增加栓塞次数,会导致组织缺氧引起血管内皮生长因子(VEGF)及 Bcl-2 蛋白过量表达,加速形成侧支循环而降低栓塞效果,缺血持续时间约1周,无法满足慢性缺血的特性。而白及胶因其直径小至 3.5 mm,可栓塞末梢小动脉,维持时间长达 5 周,随后被降解吸收,可允许重复栓塞治疗。而且堵塞在较大口径血管内的白及胶在血流的冲击和溶解下,产生“迁徙”现象,到达更细的分支内造成更均匀、彻底的栓塞,同时,白及可抑制革兰阳性菌而减少被栓塞器官的感染^[22]。为进一步提高栓塞效果,可将白及胶进行乳化、冻凝、化学交联后制备出白及胶微球,其不仅具有白及胶的特性,还能在血液中缓慢膨胀机械性阻塞血管,粗糙的表面可促使血小板解体,导致继发性血栓形成,并可持续至少一个月不被溶解。因白及胶微球直径仅为几十微米,能更均匀、彻底地栓塞后肢小血管分支,达到完全性栓塞的效果,栓塞作用时间持久,效果稳定,重复性好,是一种理想的肢体缺血模型制作方法^[23]。目前国内学者多将其应用于大鼠慢性肢体缺血模型的制作,国外还未见相关报道。

1.2.3 其他方法 采用不同手段使动脉管腔狭窄或闭塞,适用于犬、兔等大型动物造模。马中等^[24]、边杰芳等^[25]通过结扎包括股深动脉在内的所有分支,纵形切开放动脉前壁 0.5 cm,自切开处向动脉腔远端并列插入 2 根长 25~30 cm,直径 1.5 mm 的螺旋状金属丝,插入后以无创血管缝线缝合动脉切口,并使股动脉管腔狭窄约 1/2,逐层缝合皮下组织及皮肤的方法制作犬后肢缺血模型。其原理是通过置入的异物使血管内皮受损,胶原成分暴露,激活外源性凝血机制,逐渐形成管腔内血栓;同时金属丝的机械栓堵人为将股动脉管腔狭窄约 1/2,迫使动脉血流锐减,侧支代偿相对不足,而造成显著的肢体慢性缺血症状。Grigorios 等^[26]通过将 3-F 导管插入新西兰大白兔左股浅动脉,并置入 5 个铂金线圈的方法使动物血管闭塞,成功制作肢体缺血模型。另外, Gale 等^[27]报道一种含有吸湿性酪蛋白的缩窄器,可吸收血管腔内水分并逐渐膨胀,进而阻塞整个血管腔,亦可用于制作慢性下肢缺血动物模型。

2 模型评价

2.1 暂时缺血模型

骨骼肌缺血损伤是一个多因素参与的复杂过程,目前主要围绕下述几方面机制的指标对模型进行相应评估:①能量代谢障碍。当组织缺血时,有氧代谢途径受阻而变为无氧代谢,乳酸、乳酸盐大量增加对细胞造成损害,细胞膜完整性破坏,细胞内酶及蛋白质外漏,而致血中肌酸磷酸激酶和乳酸脱氢酶的含量明显升高^[4]。②氧自由基损伤。肢体缺血或再灌注时,肌体产生大量氧自由基使组织内过多消耗超氧化物歧化酶(SOD),同时不饱和脂肪酸发生脂质过氧化形成丙二醛(MDA)不断损伤组织,并引起钙超载,进一步加重组织的损伤,故血清和骨骼肌 SOD、MDA 含量可反映组织氧自由基含量及氧化损伤程度^[4]。③骨骼肌钙离子超载和黄嘌呤氧化酶(XOD)^[28]水平。骨骼肌缺血和再灌注后不断产生的氧自由基损伤了细胞膜和线粒体膜,使 Ca^{2+} -ATP 酶活性不断降低,不能将胞内的 Ca^{2+} 泵出胞外,导致细胞内的 Ca^{2+} 浓度明显增加;同时,再灌注时钙离子交换受阻,线粒体及溶酶体内 Ca^{2+} 浓度升高, Ca^{2+} 与胞浆受体钙调蛋白结合后,激活蛋白酶,使黄嘌呤脱氢酶转变为 XOD 而大量堆积。④炎症反应。血清髓过氧化物酶(MPO)是中性粒细胞的标志酶,可反映中性粒细胞聚积的程度,下肢腓肠肌病理学检测可观察中性粒细胞的浸润情况^[4],通过检测 MPO 含量及骨骼肌病理学观察以明确炎症反应的程度。⑤血管内皮损伤。其可通过腓肠肌湿重干重比测定^[4]和病理学观察加以确定。前者反映骨骼肌组织水肿程度,与再灌注损伤时组织微血管床损伤有关;后者可直观形象地反映肢体骨骼肌微血管内皮细胞损伤情况。此外,结合机体骨骼肌缺血损伤的临床综合表现,还需进行肢体颜色、皮温、活动状态等一般状态观察^[16]。

2.2 永久缺血模型

要想建立与严重慢性肢体缺血患者具有相似性的动物模型,必须利用现有的技术手段,其中,微血管密度为判断侧支循环生成的“金标准”^[29],血管造影和血流灌注测定是必备的监测方法,从而客观、具体地评价缺血的程度和时间。国内外学者普遍以健侧肢体作为对照,从形态和功能两方面同时对下肢永久缺血模型进行评价^[30]。①形态方面:通过各种血管造影等技术手段分析后肢侧支血管数和微血管密度,最常用的血管造影术为动脉注射数字减影法^[15],但其空间分辨率不高,细小血管显示欠清晰,可采用 CT 血管造影^[30]更逼真地显示血管立体形态及其与周围结构关系。除此以外,还可结合病理形态学观察缺血组织结构进行多方面评价模型缺血效果。②功能方面:采用功能等级评分表^[31](目前已形成的有鼠后肢缺血等级评分标准表^[32])结合动物缺血损伤的一般临床表现对肢体功能进行评价,并使用激光多普勒灌注系统^[17]测定下肢血流量、血压和皮温评价肢体血流灌注情况。近年越来越多的先进技术被应用于侧支循环功能的评价,并各具特点,其中,放射性同位素灌注扫描简便易行,能准确地定量、定位,但显影所需时间较长^[30];CT 灌注成像能快速、无创、定量或半定量地反映组织血管生成及血流灌注,较准确地评估动物后肢缺血模型随时间推移发生的肌肉组织灌注变化,但存在运动伪影、溶剂效应等问题^[29];核磁共振成像不需注射造影剂,是一种非介入探测技术,但扫描时间长,空间

分辨率不及CT,且价格较昂贵^[26]。

3 问题及展望

鉴于肢体缺血动物模型的制备方法、实验条件控制等方面都取得了很大进展,且CT、核磁共振成像等新技术在模型评价中的推广应用,很大程度促进了肢体缺血模型的研究。但还有一些突出问题尚待解决,主要体现在永久缺血模型的稳定性和拟人性方面欠佳。由于实验动物具有极强的血管重建能力,并且急性缺血后局部产生的剪切力、炎性反应、内皮祖细胞的局部浸入以及动物丰富的侧支循环,使患肢能在短时间内促进血管新生,进而恢复血流。许多研究发现,即使结扎并切断实验动物后肢供血动脉,引起远端肢体缺血坏死的情况并不持久^[16,28],且不同的造模方法导致的缺血程度和持续时间差异较大,使得模型的稳定性亟待进一步提高。另外,双侧下肢缺血造模死亡率高^[20],导致实验动物一般为单侧造模,患肢由初期急性严重缺血可逐渐恢复到稳定的轻度缺血状态,而人的下肢慢性缺血往往发生在双侧,是一个缓慢的逐渐加重的过程。因此,如何建立一个拟人性较好、可行性高、重复性好的动物慢性肢体缺血模型仍有待进一步探索研究。可喜的是已有学者开始对不同年龄^[31]、不同品系^[33]、不同性别^[34]以及不同缺血效果^[27]的动物模型特点进行比较研究,为关键问题的解决提供了基本条件。同时,随着不同实验方法的整合和各种新技术的发明应用,必将进一步推进肢体缺血模型制作体系的完善。

【参考文献】

- Norgren L, Hiatt W, Dormandy J, et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC) [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007, 33: 71-75.
- Messina LM, Brevetti LS, Chang DS, et al. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: invited commentary [J]. J Control Release, 2002, 78 (1-3): 285-294.
- Erdem M, Bostan B, Günes T, et al. Protective effects of melatonin on ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle [J]. Eklem Hastalik Cerrahisi, 2010, 21(3): 166-171.
- 冯亚高, 黄晨, 银杏叶提取物预处理对肢体骨骼肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 医学信息, 2009, 22(2): 235.
- 吴芳, 耿智隆, 曹虹, 等. 远隔肢体缺血预处理对兔单肺缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2010, 26(4): 342-344.
- 赵瑾, 李杨, 黄磊, 等. 肢体缺血后适应对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1096-1101.
- 浦践一, 赵琪, 门秀丽, 等. 牛磺酸对大鼠肢体骨骼肌缺血再灌注后内质网应激反应的影响[J]. 中日友好医院学报, 2010, 24(4): 223-225.
- Jiang Q, Hu YH, Wei LC. Expression of tumor necrosis factor alpha in cartilage during limb ischemia-reperfusion injury [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(20): 3611-3614.
- Capt HM, Hancock CGE, Lt-Cmdr AS, et al. Hemorrhagic shock worsens neuromuscular recovery in a porcine model of hind limb vascular injury and ischemia reperfusion [J]. Journal of Vascular Surgery, 2011, 53 (4): 1052-1062.
- Edward A, Phelps NL, Peter M, et al. Bioartificial matrices for therapeutic vascularization [J]. PNAS, 2010, 107(8): 3323-3328.
- 李明琰, 陈建威, 张新建, 等. 不同剂量 HIF-1 基因对兔缺血后肢血管生成作用的影响[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(2): 210-213.
- Luo FW, David W, Göran L, et al. Vascular growth factor expression in a rat model of severe limb ischemia [J]. Journal of Surgical Research, 2002, 108(2): 258-267.
- Takako G, Naoto F, Akira AKI, et al. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse [J]. Tokai J Exp Clin Med, 2006, 3(31): 128-132.
- 魏芳晶, 王翠艳, 阴淑莹, 等. 腺相关病毒介导的血管内皮生长因子基因与骨髓间充质干细胞联合治疗大鼠肢体缺血的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2010, 29(10): 858-862.
- 杨盛家, 陈兵, 罗涛, 等. 大鼠后肢急性缺血模型的构建及评估[J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18(6): 580-583.
- 梁翠宏, 田铨, 徐蕴, 结扎切断法制作大鼠后肢缺血模型的效果[J]. 解剖学杂志, 2006, 29(6): 795-796.
- Yang ZJ, Moritz WB, Nicolas D, et al. Call for a reference model of chronic hind limb ischemia to investigate therapeutic angiogenesis [J]. Vascular Pharmacology, 2009, 51(4): 268-274.
- Troidl C, Nef H, Voss S, et al. Calcium-dependent signalling is essential during collateral growth in the pig hind limb-ischemia model [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010, 49(1): 142-151.
- Brian P, Ari H, Yang YG, et al. eNOS affects both early and late collateral arterial adaptation and blood flow recovery after induction of hindlimb ischemia in mice [J]. J Vasc Surg, 2010, 51(1): 165.
- 方伟, 郭曙光, 庞荣清. 兔后肢缺血模型的制作[J]. 云南医药, 2008, 29(29): 57.
- Kobayashi N, Ishii M, Veno Y. Co-expression of Bcl-2 protein and vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinomas treated by chemoembolization [J]. Liver, 1999, 19(25): 31.
- 郑传胜, 冯敦生, 张彦彤, 等. 中药白芨胶作为血管栓塞剂的实验研究[J]. 中华放射学杂志, 1998, 3(32): 88-91.
- 梁翠宏, 田铨, 徐蕴, 等. 结扎切断法与白芨微粒栓塞法建立大鼠后肢缺血模型效果比较[J]. 山东大学学报, 2007, 45(10): 1008-1010.
- 马中, 易军, 颜立军, 等. 肢体负压治疗对改善犬缺血肢体自由基损伤的影响[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(6): 514-516.
- 边杰芳, 杨振东, 宁莫凡. 犬后肢动脉闭塞性病变模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 1996, 13(6): 325-326.
- Grigorios K, Wesley D, Gilson MS, et al. Hind limb ischemia in rabbit model: T2-prepared versus time-of-flight MR angiography at 3T [J]. Radiology, 2007, 245(3): 761-763.
- Gale L, Tang C, David S, et al. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis and inflammation in rat hind limb ischemia [J]. Journal of Vascular Surgery, 2005, 41 (2): 312-320.
- 张娜, 耿菲, 刘燕, 等. 肢体缺血再灌注后肝损伤中细胞凋亡的发生及牛磺酸的保护效应[J]. 中国综合临床, 2009, 25(2): 130-132.
- 曾祥柱, 李选. CT 灌注成像评价 PAOD 兔后肢慢性缺血模型的实验研究[J]. 中国介入放射学, 2009, 3(1): 11-13.
- 蔡文杰, 王铭洁, 朱依纯. 下肢缺血模型中微循环功能研究方法的建立[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(5): 690-692.
- Tormod S, Westvik MD, Tamara N, et al. Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis [J]. Journal of Vascular Surgery, 2009, 49(2): 464-472.
- Yu J, Muinck ED, Zhuang Z, et al. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment and blood flow reserve [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 10999-11004.
- Paula K, Shireman Q, Marlon P. Differential Necrosis Despite Similar Perfusion in Mouse Strains after ischemia [J]. Journal of Surgical Research, 2005, 129(2): 242-250.
- Zenon S, Kyriakides LK, Pantelis P, et al. Gender does not influence angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia [J]. International Journal of Cardiology, 2003, 92(1): 83-91.

(收稿日期: 2011-09-09)