

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.072.html>

线栓法及结扎法制作大鼠下肢缺血模型的比较

王芳, 刘盛智, 赖坤, 周翔宇

摘要 用线栓和结扎股动脉两种方法制备 SD 大鼠下肢缺血模型, 通过多普勒激光扫描记录各组双下肢血流灌注值 (PU), 取大鼠双后肢腓肠肌及线栓处股动脉进行 HE 染色; 手术侧腓肠肌采用 Western blot 法检测血管内皮生长因子 (VEGF) 和血小板-内皮细胞黏附分子-1 (CD31)。结果显示, 结扎组的组织炎症、水肿发生时间较线栓组提前, 而组织血流灌注在第 49 天时两组并无太大差异, 结扎组的 VEGF 和 CD31 变化时间均比线栓组提前, 但两者的变化趋势是一样的, 在第 49 天时除线栓组 CD31 外, 均可恢复正常水平。长时间观察两种模型并没有太大差异, 故两种方法都可制作慢性下肢缺血模型。

关键词 结扎法; 线栓法; 下肢缺血模型

中图分类号 R 654.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)06-0913-04

随着人们生活水平的日益提高、饮食结构及人口老龄化等因素的改变, 外周动脉疾病 (peripheral artery disease, PAD) 的发病率和死亡率逐年增加。对下肢缺血性疾病发生发展过程及其治疗手段的探索显得尤为迫切, 而建立适当的动物模型是研究下肢缺血性疾病的基础。目前用得最多的方法是外周动脉结扎法以及血管栓塞法, 该研究就线栓法和结扎法两种方式制作大鼠下肢缺血模型并对其缺血效果进行比较。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 SD 大鼠, 雄性, 63 只, 190~240 g, 平均 225 g, 购自四川医科大学实验动物中心, 随机分为对照组 (21 只)、线栓组 (21 只)、结扎组 (21 只)。moorLDI2-HIR 激光多普勒血流仪购自英国 Moor Instruments 公司; 手术显微镜及显微手术器械购自重庆奥特光学仪器有限公司; 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,

VEGF)、血小板-内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31) 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.2 实验方法 模型制作前准备: 大鼠常规饮食, 提前 1 d 用 1% 戊巴比妥钠 (30~50 mg/kg) 腹腔麻醉后用宠物剃毛器将大鼠下腹部及双下肢毛发剔除, 再用 10% 的硫化钠祛除残余毛发。

1.2.1 动脉结扎组 (结扎组) 模型的制作 用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 术前行激光多普勒扫描后仰卧固定, 左后肢常规消毒铺巾, 在左侧腹股沟部作纵形切口, 分离暴露股动脉, 范围从腹股沟韧带至隐动脉、腘动脉分叉处。于腹股沟韧带处双重结扎股动脉主干, 远端结扎隐动脉、腘动脉等分支, 术毕, 缝合切口。

1.2.2 动脉线栓组 (线栓组) 模型的制作 麻醉方法、切口位置及股动脉分离同上, 于腹股沟韧带处分离股动脉主干后放入微型血管夹阻断血流, 用显微剪在手术显微镜下于股动脉前壁开一小口, 向远端插入 1 cm 长 4-0 的镍钛记忆合金缝线。用 10 个 0 的手术缝线缝合股动脉切口, 松开血管夹, 见无活动性出血后缝合切口。

1.2.3 对照组 麻醉方法、切口位置及股动脉分离同上, 分离后的股动脉不做任何处理, 随后缝合切口。

1.3 观察指标

1.3.1 后肢血流量测定 术前、术后立即、术后 3、7、14、21、28、35、42、49 d 对 3 组大鼠常规麻醉后, 于相对恒定的 26℃ 室温下, 行多普勒激光扫描记录双侧血流灌注 (perfusion unite, PU) 值。比较 3 组 SD 大鼠手术侧 (左侧) 与非手术侧 (右侧) 肢体的 PU 比值。

1.3.2 组织学检查 HE 染色: 于术后 7、14、21、28、35、42、49 d 行激光多普勒扫描后处死各组大鼠, 取大鼠双后肢腓肠肌及线栓处股动脉, 采用甲醛固定、石蜡包埋, 用作 HE 染色。

1.3.3 提取蛋白 取适当组织液氮研磨, 按组织: PMSF: RIPA = 1 mg: 0.1 μl: 10 μl 的比例加入 EP 管中冰上裂解, 超声、离心 (4℃、12 000 r/min 离心

2016-03-04 接收

基金项目: 四川省卫生计生委 2014 年科研基金 (编号: 140035)

作者单位: 四川医科大学附属第一医院血管甲状腺外科, 泸州 646000

作者简介: 王芳, 女, 硕士研究生;

周翔宇, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: xiangyuzhou971@163.com

10 min) 吸上清液 测蛋白浓度 加入 loading buffer , 沸水浴 5 min。

1.3.4 Western blot 法检测 样品经 SDS-PAGE 电泳 转移至 PVDF 膜上 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h , 敷一抗 4 ℃ 过夜 , TBST 洗膜 3 次 , 每次 10 min , 加二抗室温孵育 1 h , TBST 洗膜 3 次 , 每次 10 min , 暗室曝光、显影、定影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 , 采用两独立样本 *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 组织学结果

2.1.1 腓肠肌组织 HE 染色结果 线栓组: 术后 14 d 细胞形态结构正常染色均匀 , 术后 28 d 可见细胞染色不均 , 有炎细胞浸润 , 第 49 天可见少量纤维结缔组织增生。结扎组: 术后 14 d 细胞肿胀染色不均 , 原有形态改变 , 术后 21 d 见大量炎性细胞浸润 , 细胞形态变圆 , 术后 28 d 可见纤维结缔组织增生 , 第 49 天见大量纤维结缔组织增生。各组大鼠右侧腓肠肌组织形态改变不明显。

2.1.2 线栓组血管 HE 染色 术后 14 d 线栓处血管的组织结构保持完好 , 无内膜增生 , 未见血栓。术后 21 d 见血管内膜开始增生 , 术后 28 d 血管内膜大量增生 , 几乎完全堵塞血管。

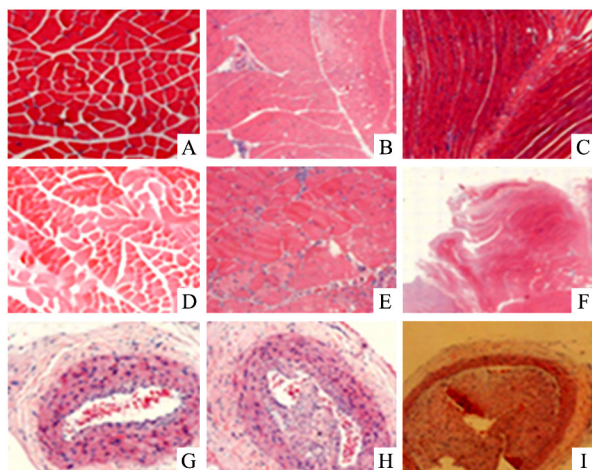


图1 腓肠肌和线栓组血管 HE 染色

A: 线栓组术后 14 d 腓肠肌 $\times 400$; B: 线栓组术后 28 d 腓肠肌 $\times 400$; C: 线栓组术后 49 d 腓肠肌 $\times 200$; D: 结扎组术后 14 d 腓肠肌 $\times 400$; E: 结扎组术后 28 d 腓肠肌 $\times 400$; F: 结扎组术后 49 d 腓肠肌 $\times 200$; G: 线栓组术后 14 d 线栓处血管 $\times 100$; H: 线栓组术后 21 d 线栓处血管 $\times 100$; I: 线栓组术后 28 d 线栓处血管 $\times 100$

2.2 激光多普勒血流成像仪检测双下肢血流灌注

与术前(图 2A) 比较 , 线栓组术后患侧血流减少不明显(图 2B) , 结扎组术后血流明显减少(图 2C) 。对照组在整个过程中血流 PU 值(左侧/右侧) 变化不明显。结扎组和线栓组均在术后达到最低值 (0.5094 ± 0.0460 vs 0.6785 ± 0.0726) , $P < 0.001$ 随后逐渐升高 , 术后 7 d 内血流恢复较快 , 术后 3 d 和 7 d 结扎组血流分别恢复到原来的 79.6%、94.1% , 线栓组血流分别恢复到原来的 84.8%、87.2% , 其中结扎组血流恢复速度快于线栓组 , 术后 7~49 d 血流恢复较缓慢 , 术后 49 d 两组血流分别为原来的 103.5%、95.8% (图 2D) 。

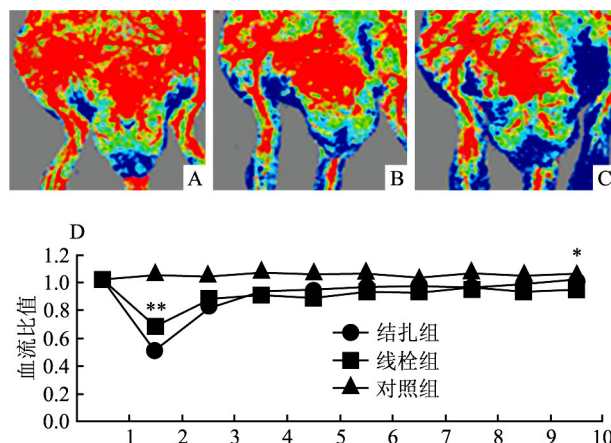


图2 激光多普勒血流成像仪监测双下肢血流灌注

A: 术前两侧下肢血流灌注; B: 线栓组术后血流灌注; C: 结扎组术后血流灌注; D: 三个组各时间点的 PU 比值(左/右) , 其中 1~10 分别代表术前、术后立即、术后 3 d、术后 7 d、术后 14 d、术后 21 d、术后 28 d、术后 35 d、术后 42 d、术后 49 d; 与结扎组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 Western blot 检测结果 VEGF: 结扎组从第 1 周开始依次减少 , 第 3 周含量最低 , 然后逐渐升高 , 第 6 周回到正常水平。线栓组含量从第 3 周开始减少 , 第 5 周时最低 , 第 7 周回到正常水平。CD31: 结扎组前 3 周含量较正常水平低 , 第 4 周时增高 , 随后依次降低 , 7 周时恢复正常水平。线栓组从第 2 周到第 4 周含量依次减少 , 第 5 周时增高 , 第 5 周到第 7 周逐渐降低。见图 3。

3 讨论

世界范围由 PAD 导致患者截肢率逐年增加^[1-2] , 寻找切实可行拟人性好的动物研究模型 , 才能使基础实验转化为临床所用。自 1987 年 Couffin-hal et al 通过结扎小鼠股动脉及各分支成功建立了后肢缺血模型后又将实验对象扩展到 Wistar 大鼠、

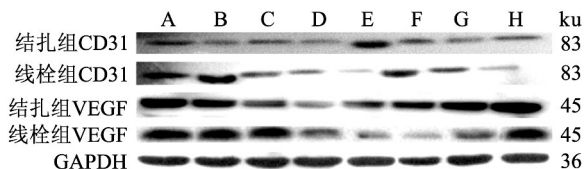


图3 Western blot 法检测结扎组和线栓组 1~7 周各时间点的 VEGF 和 CD31 的变化情况

A: 术前; B: 术后 1 周; C: 术后 2 周; D: 术后 3 周; E: 术后 4 周; F: 术后 5 周; G: 术后 6 周; H: 术后 7 周

SD 大鼠等其他鼠类动物^[3]。随后在不断探索中,有人指出这种模型的病理生理和组织恢复情况与临床上 PAD 患者不同,血管的急性阻塞会立即导致血管的应答,会强有力的刺激侧支生长^[4],于是研究者们开始探索新的造模方法,出现了以缩窄器^[4-5]、各种栓塞微粒^[3,6]、介入^[7-8]、线栓^[9]等栓塞法逐步阻断血流的方式,但目前各种方式仍处于探索之中,并没有得到国际公认。

本实验选择结扎和线栓股动脉两种方法,研究其在大鼠下肢长期缺血过程中是否有差异,以制备更好的下肢缺血动物模型。HE 染色显示,结扎组腓肠肌组织的细胞肿胀和炎细胞浸润发生时间都比线栓组早而且更严重,在长时间观察中纤维结缔组织增生也更明显。同时血管慢性阻塞过程使组织有时间来适应缺血,所以不会造成严重的组织损伤。激光多普勒动态监测皮肤微循环血流量显示两组的 PU 值均在术后达到最低值,1 周后并无太大差异,两者的变化时间点差不多一致。VEGF 为血管内皮生长因子,是最有效的促血管生长因子。CD31 为血小板-内皮细胞黏附分子,两者都可用于评估血管生成。两组的 VEGF 和 CD31 变化趋势是相似的,但结扎组两个指标的改变时间均较线栓组提前,说明结扎组侧支循环的建立要比线栓组快,有研究^[5,7]指出这可能与血管剪应力和炎症细胞的浸润有关系。试验中除了线栓组的 CD31 外,其他因子都能在 7 周的时间内达到正常水平,证明两种方法在长时间缺血上并无太大差异。

通过对各研究的观察显示,采用不同的栓塞材料^[6-7]栓塞股动脉,最后导致的组织学、组织因子、激光多普勒的变化都有一定差异,这也可能是栓塞法没有得到国际认可的原因。而结扎法中结扎血管

的范围不同最后的缺血效果也不相同^[6,10-12]。综上所述,两种方法都可以制备下肢缺血动物模型,一段时间内肢体缺血程度、组织学和组织因子的改变有一定差异,但在较长时间监测中,两组差异并不是很明显。故两种方法均可用于制备慢性肢体缺血,但结扎法的操作性、可控性明显优于线栓法。

参考文献

- [1] Zudin A M, Zazorina M A, Orlova M A. Epidemiology of chronic critical limb ischemia[J]. *Khirurgiia (Mosk)* 2014, 10: 78-82.
- [2] Baltgalvis K A, 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): H1128-45.
- [3] 邹知耕, 田 铨, 赵世刚, 等. 自体血栓并股动脉结扎建立有效的大鼠后肢缺血模型[J]. *解剖学杂志* 2011, 34(5): 718-20.
- [4] Dragneva G, Korpisalo P, Ylä-Herttuala S. Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: challenges in translating preclinical potential into clinical success[J]. *Dis Model Mech* 2013, 6(2): 312-22.
- [5] Yang Y, Tang G, Yan J, et al. Cellular and molecular mechanism regulating blood flow recovery in acute versus gradual femoral artery occlusion are distinct in the mouse[J]. *J Vasc Surg* 2008, 48(6): 1546-58.
- [6] Shin C I, Kim H C, Song Y S, et al. Rat model of hindlimb ischemia induced via embolization with polyvinyl alcohol and N-butyl cyanoacrylate[J]. *Korean J Radiol* 2013, 14(6): 923-30.
- [7] Zhuang Z W, Shi J, Rhodes J M, et al. Challenging the surgical rodent hindlimb ischemia model with the miniinterventional technique[J]. *J Vasc Interv Radiol* 2011, 22(10): 1437-46.
- [8] Korosoglou G, Gilson W D, Schär M, et al. Hind limb ischemia in rabbit model: T2-prepared versus time-of-flight MR angiography at 3T[J]. *Radiology* 2007, 245(3): 761-9.
- [9] 盛杨家, 陈 兵, 罗 涛, 等. Lewis 大鼠慢性后肢缺血模型的制备与评价[J]. *中国普外基础与临床杂志* 2012, 19(12): 1291-7.
- [10] Ziegler M A, Distasi M R, Bills R G, et al. Marvels, mysteries, and misconceptions of vascular compensation to peripheral artery occlusion[J]. *Microcirculation* 2010, 17(1): 3-20.
- [11] Paek R, Chang D S, Brevetti L S, et al. Correlation of a simple direct measurement of muscle pO₂ to a clinical ischemia index and histology in a rat model of chronic severe hindlimb ischemia[J]. *J Vasc Surg* 2002, 36(1): 172-9.
- [12] Yang Z, von Ballmoos M W, Diehm N, et al. Call for a reference model of chronic hind limb ischemia to investigate therapeutic angiogenesis[J]. *Vascul Pharmacol* 2009, 51(4): 268-74.

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.074.html>

NB-UVB 多疗程治疗白癜风的疗效比较

林洁 樊奇敏 许爱娥

摘要 观察 NB-UVB 进行多疗程治疗白癜风时各疗程疗效之间的比较。筛选符合本研究要求完成 3 个疗程光疗的 50 例白癜风患者,每个疗程的治疗包括:至少 30 次光疗;暂停光疗休息 3~6 个月。记录同一块白斑在各疗程完成后的复色情况。同一块白斑,第 1 个疗程和第 2 个疗程疗效差异无统计学意义,第 1 个疗程疗效优于第 3 个疗程疗效($P < 0.05$),第 2 个疗程疗效优于第 3 个疗程疗效($P < 0.05$);3 个疗程平均单次照射剂量比较差异无统计学意义。NB-UVB 治疗白癜风时,前 2 个疗程疗效相同,但第 3 个疗程疗效降低;进入平台期后休息 3 个月白斑恢复到初始治疗时的光敏感。

关键词 白癜风; NB-UVB; 疗效

中图分类号 R 758.4+1

2016-03-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81472887、81271758); 卫生部科学研究基金(编号:WKJ2012-2-036); 杭州市重大科技创新项目(编号:20122513A02)

作者单位: 安徽医科大学杭州临床学院、杭州市第三人民医院皮肤科 杭州 310009

作者简介: 林洁,女,硕士研究生;

许爱娥,女,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

xuaiehz@msn.com

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)06-0916-03

白癜风是一种以皮肤黏膜色素脱色为临床表现的皮肤病,窄谱中波紫外线(narrowband ultraviolet B phototherapy, NB-UVB)因其安全、有效而被广泛应用到白癜风的治疗中。既往关于 NB-UVB 疗效的研究^[1]大部分为 1 个疗程治疗后的疗效比较,但是连续进行多疗程的光疗后,各疗程疗效是逐渐增加、减弱还是不变未见报道。该研究对进行光疗的患者进行回顾性分析:评估连续进行 3 个疗程的光疗患者同一块白斑每个疗程的疗效是否相同。

1 材料与方法

1.1 病例资料 回顾 2008 年~2014 年在杭州市第三人民医院连续 3 个疗程行 NB-UVB 治疗者 50 例,男 21 例,女 29 例;年龄 17~46(31.17 ± 14.16)岁,病程 6 个月~20 年。皮损为 104 片,27 片位于面颈部,51 片位于躯干,26 片位于四肢。入选者符合:①临床上诊断为白癜风者^[2];②白斑近 3 个月未扩大;③近 3 个月内未系统服用过糖皮质激素、

Comparison between ligation and suture-occlusion to establish hind-limb ischemia model in rats

Wang Fang, Liu Shengzhi, Lai Kun, et al

(Dept of Vascular and Thyroid Surgery, The First Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou 646000)

Abstract Male SD rats were divided into ligation induced hind-limb ischemia group, suture-occlusion induced hind-limb ischemia group, sham operation group respectively. Ligation group was subjected to ligate the femoral artery, the occlusion group was occluded the femoral artery by suture. The laser Doppler imager was performed to evaluate the blood flow at different time points after operation. Then, the rats were sacrificed and the gastrocnemius and vessel were achieved to be further examined after angiography. Western blot was used to detect the protein expression of VEGF and CD31. Typical pathological manifestation of hind-limb ischemia was found in both experimental models, such as inflammation infiltration, edema and muscle fibrosis. There was no obvious difference of the blood flow in the two experimental groups. Western blot results showed that the protein expressions of VEGF and CD31 were decreased at early time of ischemia, then gradually restored till on the 49th day, which indicated that similar proteins changes happened in two ischemia groups. There was no obvious difference in two ischemia models, so the two methods could be used to induce chronic hind-limb ischemia animal model successfully.

Key words ligation; embolization; hindlimb; ischemia model