

## 大鼠血流缓慢模型的制备

张勇彬<sup>1,2</sup>, 陈伟毅<sup>1,3</sup>, 阮薇<sup>1</sup>, 林伟国<sup>1</sup>, 苏佳琪<sup>1</sup>, 邓方阁<sup>1\*</sup>

1. 广州医科大学附属第一医院/广州呼吸健康研究院/呼吸疾病全国重点实验室/国家呼吸系统疾病临床医学研究中心红外项目组, 广州 510120;
2. 梅州市人民医院超声科, 梅州 514031;
3. 广州市干部和人才健康管理中心医学影像中心, 广州 510700

**摘要:** **目的** 通过皮下反复注射肾上腺素、冰水游泳后观察血液流变学指标和双下肢超声结果, 以构建血栓形成前的大鼠血流缓慢模型。**方法** 选取12只健康SD大鼠, 肾上腺素组( $n=6$ )皮下注射0.8 mL/kg肾上腺素, 2 h后冰水游泳5 min, 注射4 h后再次注射, 并禁食16 h。生理盐水组( $n=6$ )皮下注射0.8 mL/kg生理盐水, 其制备方法与肾上腺素组一致。造模完成后, 行双下肢股静脉超声和血液流变学检查。**结果** 两组大鼠双下肢均无明显肿胀。在冰水游泳第1 min内, 肾上腺素组大鼠较生理盐水组兴奋( $P=0.015$ )。超声结果显示, 两组大鼠股静脉均无明显血栓形成, 但是肾上腺素组的右侧股静脉流速比生理盐水组低( $P<0.001$ )。血液流变学结果显示, 肾上腺素组大鼠的全血粘度低切( $P=0.024$ )及血浆粘度( $P=0.004$ )较生理盐水组高。**结论** 通过大鼠皮下反复注射肾上腺素及冰水游泳, 并利用血液流变学和超声检查, 可以构建大鼠血流缓慢模型。

**关键词:** 血流缓慢; 肾上腺素; 冰水游泳; 深静脉血栓形成

[中图分类号] R331.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1009-6213(2024)04-0169-06

Doi: 10.3969/j.issn.1009-6213.2024.04.004

### Experimental study of slow blood flow model in rats

Zhang Yongbin<sup>1,2</sup>, Chen Weiyi<sup>1,3</sup>, Ruan Wei<sup>1</sup>, Lin Weiguo<sup>1</sup>, Su Jiaqi<sup>1</sup>, Deng Fangge<sup>1\*</sup>

1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Guangzhou Institute of Respiratory Health/State Key Laboratory of Respiratory Disease/National Clinical Research Center for Respiratory Disease infrared project team, Guangzhou 510120; 2. Department of Ultrasound, Meizhou People's Hospital, Meizhou 514031; 3. Medical Imaging Center, Guangzhou Cadre and Talent Health Management Center, Guangzhou 510700

**Abstract: Objective** After repeated subcutaneous injection of epinephrine and swimming in ice water, the hemorheology indexes and ultrasound results of both lower limbs were observed to construct the slow blood flow model of rats before thrombosis. **Methods** Twelve healthy SD rats were selected, the epinephrine group ( $n=6$ ) was injected subcutaneously with 0.8 mL/kg epinephrine, swam in ice water for 5 minutes 2 hours later, injected again 4 hours later, and fasted for 16 hours. The normal saline group ( $n=6$ ) was injected subcutaneously with 0.8 mL/kg normal saline, and the preparation method was consistent with that of epinephrine group. After the molding was completed, the femoral veins of both lower limbs were examined by ultrasonography and hemorheology test. **Result** There was no significant swelling in the lower limbs of rats in both groups. After swimming in ice water for 1 min, rats in epinephrine group were more excited than those in normal saline group ( $P=0.015$ ). Ultrasound results showed that there was no obvious thrombosis in the femoral vein in both groups, but the right femoral vein flow rate in the

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2020A1515011370); 广州市开发区创新领军人才项目(2022-L002)

\* 通讯作者: 邓方阁, Email: fangge256@sina.com

adrenalin group was lower than that in the normal saline group ( $P < 0.001$ ). The hemorheological results showed that the whole blood viscosity was lower ( $P = 0.024$ ) and the plasma viscosity was higher ( $P = 0.004$ ) in epinephrine group than in normal saline group. **Conclusion** By repeatedly injecting epinephrine subcutaneously and swimming in ice water, and by using hemorheology and ultrasound measurement, the rat model of slow blood flow can be constructed.

**Key words** slow blood flow; adrenalin; swimming in ice water; deep vein thrombosis

静脉血栓栓塞(venous thromboembolism, VTE)包括深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)和肺栓塞(pulmonary embolism, PE)两种临床表现形式,是造成全球疾病负担的重要因素<sup>[1]</sup>。DVT好发于下肢血管,亚洲人DVT年发生率为5.3~17.1/10万人,PE的年发生率为3.9~7.0/10万人<sup>[2-3]</sup>。确诊DVT后1个月内病死率约6%,而PE病死率更是高达10%<sup>[4]</sup>。下肢DVT患者一旦发生深静脉内的血栓脱落就很有可能发生急性肺栓塞,从而严重威胁患者生命安全,并给整个社会造成沉重的医疗负担及经济压力<sup>[5]</sup>。DVT经典的Virchow三要素包括:血管内皮损伤、血流淤滞、血液高凝。血流淤滞是DVT的首要危险因素,长时间血流淤滞容易导致血栓形成<sup>[6]</sup>。早期诊断和规范治疗下肢深静脉血流缓慢状态,对预防下肢深静脉血栓及肺栓塞的发生具有重要意义。一方面,肾上腺素可以通过体液调节引起血管平滑肌收缩,导致血液回流阻力大;另一方面,应激反应(冷刺激)通过兴奋交感神经引起外周血管收缩,浓缩血液,进一步导致血液缓慢。因此,本研究通过短时间对大鼠皮下反复注射肾上腺素及冰水游泳刺激,并首次采用血液流变学指标和下肢静脉超声结果进行联合分析,以此模拟血栓形成前血流缓慢状态。

## 1 方法

### 1.1 实验动物

选取由广东省医学实验动物中心提供的12只健康SD大鼠,体重约 $250 \pm 20$  g,分笼适应性饲养1周,室温 $23^\circ\text{C}$ ,并采用10 h、14 h昼夜间断照明,正常饮水和摄食大鼠颗粒饲料。

根据皮下注射的药物,将12只大鼠分为肾上腺素组(6只)和生理盐水组(6只)。大鼠在造模完成后应立即行股静脉超声检查,随后处死并行腹主动

脉采血,采血2 h内行血液流变学检查。

本研究通过本院伦理委员会审查(批号:GD2019-166)。

### 1.2 模型制备

环境条件为温度 $23^\circ\text{C}$ 。实验采用的游泳桶高度为35 cm,直径为35 cm; $0^\circ\text{C}$ 冰水混合物的深度约25 cm。

肾上腺素组模型的制备方法:于大鼠皮下注射0.8 mL/kg肾上腺素,2 h后将其置于 $0^\circ\text{C}$ 冰水混合物中游泳5 min,纱布擦拭后放回鼠笼;注射4 h后再次注射0.8 mL/kg肾上腺素,并禁食16 h。生理盐水组模型的制备方法:于大鼠皮下注射0.8 mL/kg生理盐水,其制备方法与肾上腺素组一致。

### 1.3 大鼠在冰水中游泳的兴奋程度评估

大鼠在冰水混合物中游泳5 min,其四肢摆动频率随着时间的延长而不断减少。记录大鼠在冰水第1 min内的视频,均分为前段(0~20 s)、中段(20~40 s)和后段(40~60 s);从各段中随机截取5 s,记录其右下肢摆动次数(n),以4n代表所在时间段的摆动次数;三个时间段的次数总和为其第1 min内的摆动次数。本计数由两位研究者独立进行,每只大鼠均计算两次,取平均值为最终右下肢摆动次数。

根据大鼠第1 min内的右下肢摆动次数,将其分为兴奋组、一般组和缓慢组,同时将一般组和缓慢组归为不兴奋组,详见表1。

表 1 大鼠在冰水中游泳第1 min内的兴奋程度

组别	右下肢摆动频率
兴奋组	>100次/min
一般组	50~100次/min
缓慢组	<50次/min

### 1.4 大鼠固定方法

4%~5%浓度异氟烷诱导大鼠吸入麻醉3~5 min后,用2%~3%浓度维持其麻醉。大鼠在动物手术台上,取仰卧位固定,充分暴露腹部和双下肢。

### 1.5 下肢股静脉超声检查

采用Mindray M9便携式超声诊断仪,并选用5~12 MHz高频线阵探头。二维超声观察大鼠股静脉管腔内有无异常回声团,探头加压管腔是否可以完全压扁,并采用彩色多普勒观察血流是否通畅,以证实有无血栓形成。与此同时,利用超声频谱多普勒对大鼠右下肢股静脉流速进行测定。

### 1.6 腹主动脉取血和血液流变学检查

大鼠腹部用碘伏消毒,开腹后用镊子侧翻腹腔内脏器和分离筋膜组织,暴露腹主动脉,后用采血针取血。肝素锂管采集4~5 mL血液,于采血后2 h内完成血液流变学检查。血液流变学检查包括检测全血粘度(高中低切)及血浆粘度。

### 1.7 统计学分析

所有数据均采用SPSS 25.0统计软件进行处理。正态分布变量表示为 $\bar{x}\pm s$ ,非正态变量表示为中位数(四分位距)。采用Fisher精确检验对两组大鼠游泳第1 min内的兴奋程度进行比较。两组大鼠的血液流变学数据和右侧股静脉超声频谱流速的比较均采用两独立样本 $t$ 检验。当 $P<0.05$ 时认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般状态观察

两组大鼠精神状态良好,双下肢未见肿胀和发黑。在0℃冰水混合物中游泳的第1 min内,肾上腺素组大鼠的兴奋组、一般组和缓慢组数量分别为5只、1只和0只;生理盐水组大鼠的兴奋组、一般组和缓慢组数量分别为0只、4只和2只。因此,在冰水

中游泳的第1 min内,肾上腺素组大鼠较生理盐水组更加兴奋( $P=0.015$ ),详见表2。与此同时,每只大鼠双下肢的摆动幅度未见明显区别。5 min游泳结束后,两组大鼠均出现寒颤和反应减弱,但生理盐水组更加明显。

表2 肾上腺素组和生理盐水组大鼠的兴奋程度分析

组别	兴奋组	不兴奋组	兴奋比率/%	$P$
肾上腺素组	5	1	83	0.015*
生理盐水组	0	6	0	

注:\*为 $P<0.05$ 。

### 2.2 下肢股静脉超声检查结果

肾上腺素组和生理盐水组大鼠双侧股静脉管腔内未见明显异常回声团,探头加压均能完全压瘪,彩色多普勒显示血流通畅,未见明显充盈缺损。因此,两组大鼠的双侧股静脉均无明显血栓形成,见图1和图2。

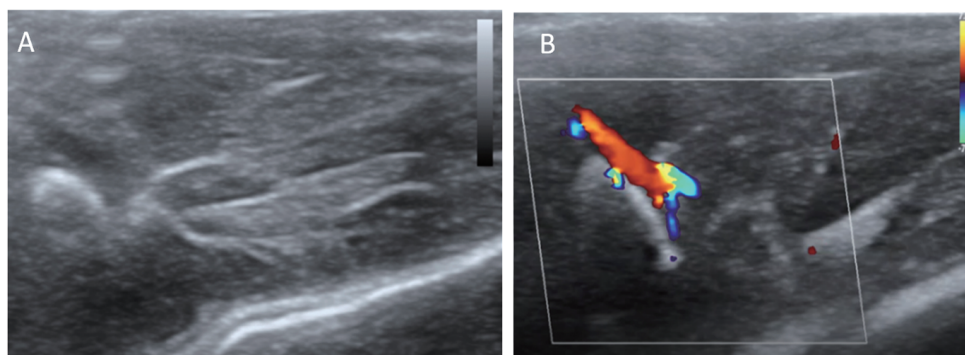
与此同时,肾上腺素组大鼠右侧股静脉的流速为 $10.2\pm 0.91$  cm/s,生理盐水组大鼠右侧股静脉的流速为 $14.8\pm 1.24$  cm/s,两者之间有统计学差异( $P=2.5\times 10^{-5}$ ),见图3。

### 2.3 血液流变学检测结果

肾上腺素组大鼠的全血粘度低切( $P=0.024$ )及血浆粘度( $P=0.004$ )较生理盐水组升高,见表3。

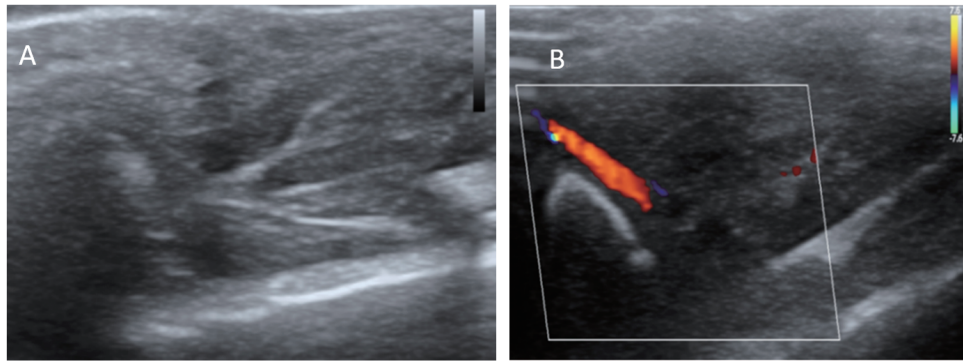
## 3 讨论

肾上腺素是儿茶酚胺类激素和神经递质,与不同受体结合可导致机体血流动力学改变。与其结合的受体主要是血管平滑肌的 $\alpha$ 受体、心肌的 $\beta_1$ 受



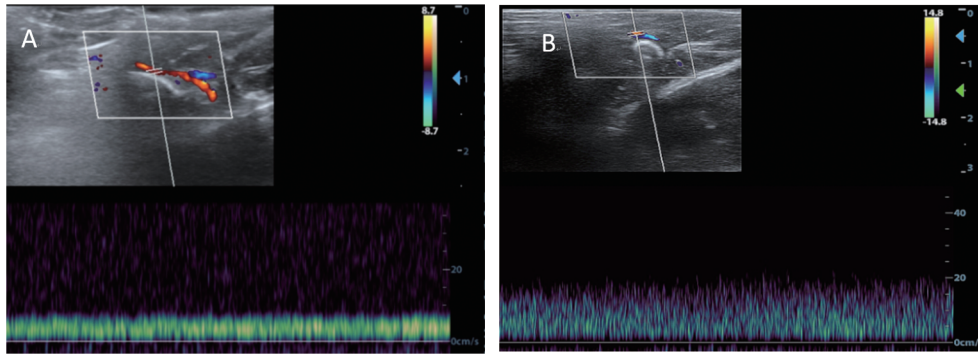
注:A.二维超声;B.彩色多普勒

图1 肾上腺素组大鼠双下肢静脉超声



注:A.二维超声;B.彩色多普勒

图2 生理盐水组大鼠双下肢静脉超声



注:A.肾上腺素组;B.生理盐水组

图3 大鼠右侧肢静脉的超声频谱流速测定

表3 肾上腺素组和生理盐水组建模后血液流变学检测结果(mPa·s,  $\bar{x} \pm s$ )

	全血粘度			血浆粘度
	低切(10 s <sup>-1</sup> )	中切(60 s <sup>-1</sup> )	高切(150 s <sup>-1</sup> )	
肾上腺素组	15.38 ± 3.21*	7.75 ± 1.20	6.22 ± 0.96	1.12 ± 0.08**
生理盐水组	11.25 ± 2.04	6.51 ± 1.07	5.47 ± 0.89	0.99 ± 0.03
<i>t</i>	2.657	1.885	1.386	3.792
<i>P</i>	0.024	0.089	0.196	0.004

注:\* :与生理盐水组比较,*P*<0.05;\*\* :与生理盐水组比较,*P*<0.01。

体以及血管平滑肌的β<sub>2</sub>受体。在血管上,肾上腺素可引起α受体占优势的皮肤、肾、胃肠道血管平滑肌、小动脉、小静脉收缩。血管平滑肌收缩使血管变窄,当静脉管腔变窄时,增加静脉回流阻力,血液回流速度减慢,导致血液回流受阻。在心脏上,肾上腺素与心肌的β<sub>1</sub>受体结合后,可产生正性变时与正性变力作用,心输出量增多、血压增高<sup>[7-8]</sup>。肾上腺素还可以与血小板表面α<sub>2</sub>受体结合,增强ADP诱导血小板聚集和激活效应,转化合成具有强烈聚集血小板与缩血管作用的TXA<sub>2</sub><sup>[9]</sup>。因此,肾上腺素

可以通过收缩外周血管、增高血压、诱导血小板聚集等机制导致血液缓慢。与此同时,寒冷会导致交感神经兴奋,从而收缩外周血管,导致血液回流受阻。寒冷刺激也会使血管内皮细胞损伤,受损细胞又释放出生物活性物质,血管壁通透性增高,血浆大量渗出,使血液增黏、增浓、增聚和微循环障碍,加重血液凝聚状态<sup>[10]</sup>。

寒冷刺激的方法有很多,有的实验将大鼠置于冰柜中,有的对大鼠进行冰敷处理,而有的将大鼠置入冰水中浸泡<sup>[11-13]</sup>。通过冰水游泳处理,大鼠不

仅接受了寒冷刺激,而且游泳可以进一步兴奋交感神经,使反射性血管收缩更为明显。李平等人<sup>[14]</sup>、朱虹等人<sup>[15]</sup>和王琳琳等人<sup>[16]</sup>均对大鼠皮下注射0.8 mL/kg 肾上腺素,并将其置入冰水中浸泡,以探讨不同药物对血流状态的影响。周华妙等人<sup>[10]</sup>连续2周每天定点对小鼠皮下注射肾上腺素和冰浴刺激,后2周隔天进行,以探讨血流淤滞状态。既往实验的具体操作步骤、方法和目的都不尽相同,同时建模和采血时间也不尽相同。在模型制备完成后,上述研究均立即行血液流变学检查以提示血流缓慢,并未对其进行连续监测。因此,既往研究均没有表明血流缓慢的持续时间。结合其他学者的研究,本实验选择短时间内对健康大鼠行2次0.8 mL/kg 肾上腺素注射以及冰水中游泳刺激,并首次对超声结果和血液流变学指标联合分析,以制备健康大鼠的急性血流缓慢模型。

相较于生理盐水组,肾上腺素组大鼠在冰水混合物中游泳的动作更频繁,活动幅度更大,这可能是由于肾上腺素能提高能量代谢水平所导致的。Gaetana Napolitano 等人<sup>[17]</sup>的研究结果表明,肾上腺素提高肝组织的最大有氧能力。左琳等人<sup>[18]</sup>发现异丙肾肾上腺素可以增加心肌细胞内游离钙水平,对心脏产生正性调节作用。不同模型的制备方式仅仅影响了该机体的能量代谢水平。本研究均采用的是健康大鼠,且未对其双下肢进行任何干预处理。因此,每只大鼠在冰水中游泳的双下肢摆动幅度无明显区别。

全血粘度是指全血在流动时与血管壁产生的一种内在摩擦力,是衡量血液内摩擦或流动阻力的指标<sup>[19]</sup>。全血粘度与流动性成反比,流动性越低,红细胞之间相互摩擦作用会增加,导致红细胞更难通过血管,从而增加全血粘度。血浆粘度是影响全血粘度的重要因素之一,血浆粘度越高,全血粘度也会相应增高<sup>[20]</sup>。周华妙等人<sup>[10]</sup>对小鼠反复注射肾上腺素及冰水浸泡,发现造模组的全血粘度较空白对照组高,并对小鼠的症状和体征进行量化评分,比如寒战程度、扎堆情况、四肢颜色情况(有无淤血发紫等),使评估指标更具有多样性和丰富性。李平等人<sup>[14]</sup>和刘校彤等人<sup>[21]</sup>认为血液流变学指标(全血粘度与血浆粘度)可以反映血液浓、粘、凝、聚的特点,以提示血液处于高粘滞状态。本研究中,

肾上腺素组大鼠全血粘度低切及血浆粘度较生理盐水组高,说明肾上腺素组血流缓慢、回流阻力大,处于高凝、高粘状态,从而初步证实了大鼠的血流缓慢模型的制备成功。

静脉超声检查无创,敏感性及特异性高,是临床广泛应用下肢DVT筛选和随诊的首选方法<sup>[22]</sup>。下肢DVT超声表现包括静脉不可压缩性、血栓形成伴静脉扩张、频谱和彩色多普勒血流异常等<sup>[23]</sup>。本研究采用的是未行双下肢干预处理的健康大鼠,而且每只大鼠游泳的双下肢摆动幅度无明显区别。因此,本研究均只对每只大鼠的右侧股静脉频谱流速进行测定。本研究中,两组大鼠均无明显血栓形成,而且肾上腺素组大鼠右侧股静脉血流频谱流速比生理盐水组低,侧面和进一步证实了大鼠血流缓慢模型的制备。

本文的局限性在于两组实验动物样本相对较少,得到的结果可能存在一定误差。与此同时,我们也没有对大鼠的症状和体征进行量化分析,缺少相应的评分系统。在模型制备成功后,既往研究均没有对血流状态的相关指标进行连续监测。因此,我们希望在后续研究中连续监测血流状态的相关指标,以得出血流缓慢的持续时间。

综上所述,本研究通过短时间内给予大鼠皮下反复注射肾上腺素及冰水游泳,并首次采用血液流变学检查和超声检查联合分析,构建了健康大鼠的急性血流缓慢模型。

**作者贡献声明** 张勇彬负责实验操作和论文撰写;陈伟毅负责实验设计和操作;阮薇,林伟国,苏佳琪负责数据整理和统计学分析;邓方阁负责研究指导、论文修改和经费支持

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Raskob G E, Angchaisuksiri P, Blanco A N, et al. Thrombosis: A major contributor to global disease burden [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(11): 2363-2371.
- [2] Cheuk B L, Cheung G C, Cheng S W. Epidemiology of venous thromboembolism in a Chinese population [J]. *Br J Surg*, 2004, 91(4): 424-428.
- [3] Jang M J, Bang S M, Oh D. Incidence of venous thromboembolism in Korea: from the Health Insurance Review and Assessment Service database [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(1): 85-91.

- [4] Behraves S, Hoang P, Nanda A, et al. Pathogenesis of thromboembolism and endovascular management [J]. *Thrombosis*, 2017, 2017: 3039713.
- [5] 吴斌, 罗世官. 下肢深静脉血栓性疾病治疗进展[J]. *右江医学*, 2021, 49(03): 233-236.
- [6] Comerota A J, Stewart G J, White J V. Combined dihydroergotamine and heparin prophylaxis of postoperative deep vein thrombosis: proposed mechanism of action [J]. *Am J Surg*, 1985, 150(4A): 39-44.
- [7] Otto C W, Yakaitis R W. The role of epinephrine in CPR: A reappraisal [J]. *Ann Emerg Med*, 1984, 13(9 Pt 2): 840-843.
- [8] Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines [J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2021, 82(3-4): 193-197.
- [9] Singh S, Malm C J, Ramström S, et al. Adrenaline enhances in vitro platelet activation and aggregation in blood samples from ticagrelor-treated patients [J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2018, 2(4): 718-725.
- [10] 周华妙, 郭勇. 寒凝血瘀证小鼠动物模型的建立及评价[J]. *中国中医药科技*, 2020, 17(1): 1-2, 7.
- [11] 吴晔莉, 张珊珊. 寒凝血瘀证动物模型的研制[J]. *中国中医基础医学杂志*, 1996, 2(2): 49-51.
- [12] 郑小伟. 寒凝血瘀证动物模型的量化研究[J]. *浙江中医学院学报*, 1999, 23(2): 43-45.
- [13] 成秀梅, 杜惠兰, 李丹. 寒凝血瘀证动物模型的创建[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2005(8): 604-605.
- [14] 李平, 王志强. 腰痛舒胶囊对寒凝血瘀模型血粘度的影响[J]. *安徽中医临床杂志*, 2003, 15(4): 328-329.
- [15] 朱虹, 龙子江, 陈明, 等. 合成水苏碱对血瘀模型大鼠血液流变性的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2007, 26(6): 38-40.
- [16] 王琳琳, 丁安伟. 赤芍总苷对大鼠血瘀证模型的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(6): 552-554.
- [17] Napolitano G, Barone D, Di Meo S, et al. Adrenaline induces mitochondrial biogenesis in rat liver [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2018, 50(1): 11-19.
- [18] 左琳, 宋峰, 赵锐, 等. 异丙肾上腺素对大鼠心脏功能的动态影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(5): 34-38.
- [19] 王加瑞. 血流变常测指标间关系及应用价值[J]. *中国血液流变学杂志*, 2005, 15(2): 137-138, 151.
- [20] Kiesewetter H, Jung F, Wenzel E, et al. [Variance, factors of influence and clinical relevance of plasma viscosity] [J]. *Biomed Tech (Berl)*, 1991, 36(10): 241-247.
- [21] 刘校彤. 欧当归内酯 A 对血瘀证大鼠血液流变学和内皮细胞损伤保护的研究[D]. 西南医科大学, 2022.
- [22] Needleman L, Cronan J J, Lilly M P, et al. Ultrasound for lower extremity deep venous thrombosis: multidisciplinary recommendations from the society of radiologists in ultrasound consensus conference [J]. *Circulation*, 2018, 137(14): 1505-1515.
- [23] Chopard R, Albertsen I E, Piazza G. Diagnosis and treatment of lower extremity venous thromboembolism: A review [J]. *JAMA*, 2020, 324(17): 1765-1776.

(收稿日期: 2023-12-17)

(本文编辑: 钱婷婷; 本文审校: 叶絮)