

内皮损伤后血栓模型制备方法的比较

张静秋, 陆永萍, 他林昆, 孙月, 陈琦
(云南大学附属医院/云南省第二人民医院超声科, 云南昆明 650021)

[摘要] **目的** 内皮损伤在深静脉血栓形成中起着重要的作用, 旨在比较多种方法制备兔股静脉内皮损伤后血栓模型的效果, 为深入研究内皮损伤及深静脉血栓提供良好的实验基础。**方法** 45只兔随机分为A、B、C 3组, 分别采取单纯夹闭法、联合完全结扎法及联合不全结扎法制备股静脉血栓, 每组15只, 对比建模后1 d、3 d、7 d血管内超声、实时剪切波表现及局部血管内皮病理改变。**结果** 血管内径及杨氏模量值于造模7 d后出现明显差异($P < 0.05$)。组间两两比较: 造模7 d C组杨氏模量值均较A组及B组增高($P < 0.05$)。病理证实, 造模第7天C组血管内出现一定程度的纤维蛋白机化血栓。**结论** 夹闭法联合不全结扎法能够产生较为稳定的内皮损伤和血栓形成, 该方法可为深入研究内皮损伤后深静脉血栓提供了有力的实验模型基础。

[关键词] 兔; 内皮损伤; 静脉血栓; 实时剪切波弹性成像

[中图分类号] R445.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)01-0035-06

Comparison of Methods for Generating Thrombotic Models after the Endothelial Injury

ZHANG Jingqiu, LU Yongping, TA Linkun, SUN Yue, CHEN Qi
(Dept. of Medical Ultrasound, The Affiliated Hospital of Yunnan University/ The 2nd People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** Endothelial injury plays a crucial role in forming deep vein thrombosis. This study aims to compare the effectiveness of various methods for creating rabbit femoral vein thrombotic models after the endothelial injury so as to provide a solid experimental foundation for further research on the endothelial injury and deep vein thrombosis. **Methods** Forty-five rabbits were randomly divided into three groups (A, B, C), with 15 cases in each group and subjected to the endothelial injury using the methods of simple clamping, combined complete ligation, and combined incomplete ligation, respectively. The intravascular ultrasonic manifestations and local endothelial pathological changes were compared at 1, 3, and 7 days after modeling. **Results** Significant differences in vascular diameter and Young's modulus values were observed after 7 days of modeling ($P < 0.05$). In pairwise comparisons between the groups, the Young's modulus values in group C were significantly higher than those in groups A and B after 7 days of modeling ($P < 0.05$). Pathological examination confirmed the presence of fibrinoid thrombus in the blood vessels of group C on the seventh day of modeling. **Conclusion** Combining simple clamping and incomplete ligation can produce a relatively stable endothelial injury and thrombus formation. This method provides a robust experimental model for further investigation into deep vein thrombosis after the endothelial injury.

[Key words] Rabbit; Endothelial injury; Venous thrombosis; Real-time shear wave elastography

[收稿日期] 2023-09-25

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202101AY070001-280); 云南省心血管超声创新团队基金资助项目(202305AS350021); 云南省“万人计划”基金资助项目(YNWR-MY-2018-004)。

[作者简介] 张静秋(1983~), 女, 云南昭通人, 硕士, 主治医师, 主要从事心血管疾病的超声诊断及临床研究工作。

[通信作者] 陆永萍, E-mail: Luyongping921@163.com

下肢深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)是一种常见病,其并发症肺栓塞(pulmonary embolism, PE)和血栓后综合征对患者的生活质量和生命安全产生显著影响^[1]。目前,对深静脉血栓的形成机制和诊疗方案的研究是一个热点领域,因此建立动物模型成为了关键。血管内皮细胞损伤是引发血栓形成的重要触发因素^[2-3]。因此,本研究寻找一种安全可行的方法,制备内皮损伤后的血管内血栓模型,通过超声及病理切片比较模型效果,旨在为深入研究内皮损伤和深静脉血栓提供可靠的实验模型,为更好地模拟 DVT 的发生过程,及深入研究 DVT 的机制和开发新的治疗方法提供基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

选取雄性日本大耳白兔(45)只,体重 2.5 ~ 3.2 kg。随机分为 3 组(A 组、B 组、C 组),每组 15 只。自由饮水,基础饲料喂养。本研究经昆明医科大学动物实验伦理委员会批准(伦理备案号:kmmu2020258A)。

1.2 仪器

采用法国 Supersonic Imagine 公司(Supersonic Imagine, Aixen Provence, France)生产的 Aixplorer 型全数字化彩色多普勒超声波诊断仪, L4-15 线阵探头,频率 12-15 MHz,也可以对存储的图像进行回顾性测量。

1.3 实验方法

1.3.1 动物血栓模型制备 将 3 组兔称重编号,在新环境下适应性喂养 1 周后,行股静脉造模,麻醉、取仰卧及四肢外展位固定,分别游离动、

静脉主干长约 1.5 cm,分组制备:A 组不做血管结扎处理,B 组采取完全结扎兔股静脉近端,C 组采取不全结扎兔股静脉近端(显露左股静脉后平行放置超滑缝线并一同结扎,打结后撤出超滑缝线)。此外,3 组均结扎股静脉侧支并使用无齿血管夹反复钳夹静脉管壁。术后缝合创口,连续 3 d 后肢肌注射青霉素 40 万 U 预防感染。

1.3.2 超声观察 纵行与横行扫查兔股静脉目标区域,观察血管内回声及血流情况并记录血管内径后(图 1),启用 SWE(shear wave elastography, SWE)模式,选取感兴趣区域,取样框面积 1mm²,测量血栓的弹性模量值[包括最大值(Max)、最小值(Min)和平均值(Mean)]、弥散度(Sd),选择图像稳定且 Sd<5Kpa 者,取样 3 次后计算平均值。对以上所有数据及图片均作记录并保存。

1.3.3 病理观察 超声检查后处死动物,取病变血管,放入 10% 中性福尔马林溶液内固定,血栓组织石蜡切片包埋,HE 染色,显微镜检。

1.4 统计学处理

所有数据用 SPSS17.0 进行统计分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物股静脉造模处普通超声显示

血管内皮损伤早期(建模后 1 d),A、B、C 3 组血管内呈均匀一致低回声。血管内皮损伤中期(建模后 3 d),C 组血管内回声较前稍增强,管腔内径较前增宽($P < 0.05$)。到晚期(建模后 7 d),B 组出现部分管腔闭塞萎缩,管腔均较前有所减

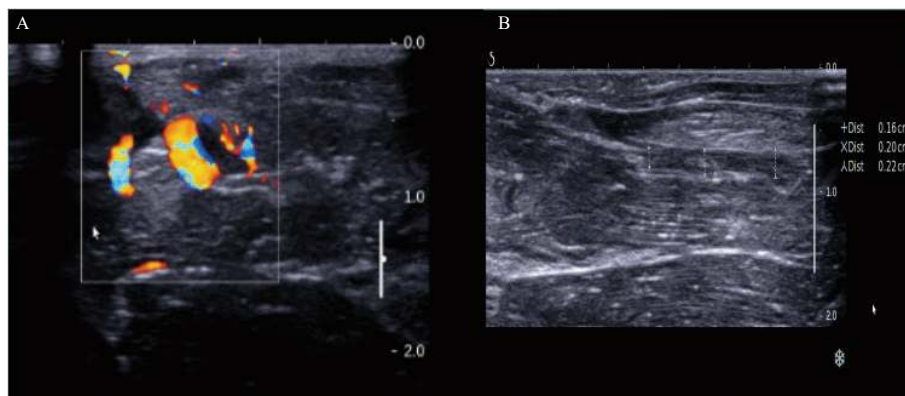


图 1 造模后超声横行与纵行扫查兔股静脉,观察血管内回声及血流情况并记录血管内径

Fig. 1 After modeling, perform transverse and longitudinal ultrasound scans of the rabbit femoral vein to observe the echo and blood flow within the blood vessels and record the vascular diameter

A: 横行; B: 纵行。

小($P < 0.05$); C组内血栓充填更明显, 管腔内回声稍增强, 管腔内径明显增宽($P < 0.05$); CDFI

显示: A组部分管腔内有点状或短线状血流通过, 内径测值见表1。

表1 3组兔股静脉管腔内径比较 $[(\bar{x} \pm s), \text{mm}]$

Tab. 1 Comparison of the intraluminal diameter of the femoral vein in three groups of rabbits $[(\bar{x} \pm s), \text{mm}]$

组别	<i>n</i>	术后1 d	术后3 d	术后7 d	<i>F</i>	<i>P</i>
A组	15	1.547±0.106	1.553±0.106	1.620±0.086	2.475	0.096
B组	15	1.567±0.105	1.473±0.122	1.413±0.226*	3.483	0.040#
C组	15	1.587±0.106	1.740±0.130*	1.980±0.204* [△]	25.336	< 0.001#

与术后1 d比较, * $P < 0.05$; 与术后3 d比较, [△] $P < 0.05$; # $P < 0.05$

2.2 实验动物股静脉造模处实时剪切波弹性成像显示

1 d、3 d及7 d兔股静脉造模处均有弹性显像, 见图2。

随着造模时间延长, 3组兔股静脉血栓模型

杨氏模量均值呈增高趋势, 且在造模后7 d显著增高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。同一时间内组间比较, C组于第3天及第7天血栓模型的杨氏模量较A、B 2组明显增高($P < 0.05$)。兔造模处股静脉血栓杨氏模量值比较结果, 见表2。

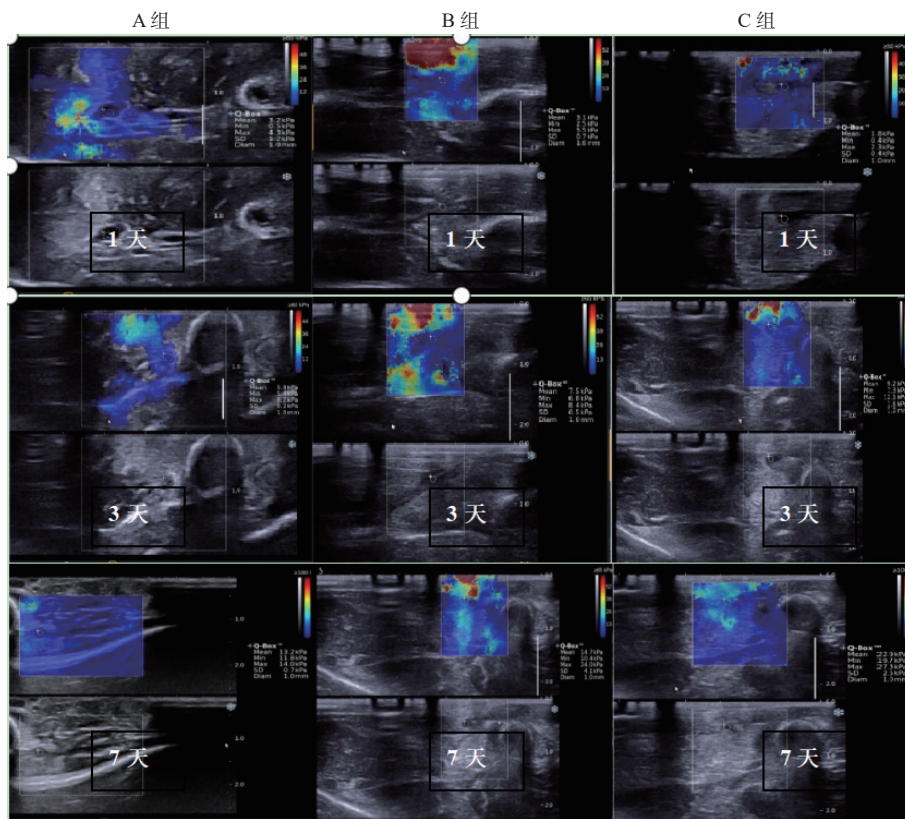


图2 造模后1 d、3 d及7 d 3组兔股静脉实时剪切波弹性成像观察

Fig. 2 Real-time shear wave elastography observation of the femoral vein in three groups of rabbits at 1 d, 3 d, and 7 d after modeling

2.3 病理切片观察分析血栓成分

随着造模后时间的延长, 3组实验组均出现不同程度的血管壁的损伤、内皮细胞脱落、炎细胞浸润, 最终导致不同程度的血栓形成, 并于造模第7天C组血管内出现一定程度的纤维蛋白机

化血栓, 见表3及图3。

3 讨论

Virchow^[4]最早提出了深静脉血栓形成的3大

表 2 3 组兔股静脉血栓模型杨氏模量值 MEAN 值比较 (Kpa)

Tab. 2 Comparison of mean values of Young's modulus (MEAN) in the femoral vein thrombus model of three groups of rabbits (Kpa)

组别	<i>n</i>	术后1 d	术后3 d	术后7 d	<i>F</i>	<i>P</i>
A组	15	5.16±1.001	5.987±0.756	9.22±1.725* [△]	45.546	< 0.001 [▲]
B组	15	4.747±0.986	5.927±0.834	10.56±2.564* [△]	51.566	< 0.001 [▲]
C组	15	4.453±1.119	7.993±1.223* ^{#+}	18.82±1.66* ^{△#+}	458.322	< 0.001 [▲]
<i>F</i>	1.760		22.549	98.855		
<i>P</i>	0.185		< 0.001* [#]	< 0.001* [△]		

与术后1 d比较, **P* < 0.05; 与术后3 d组比较, [△]*P* < 0.05; 同一时间内与A组比较, [#]*P* < 0.05; 同一时间内与B组比较, ⁺*P* < 0.05; [▲]*P* < 0.05。

表 3 建模后不同时期血管的病理学变化

Tab. 3 Pathological changes in blood vessels at different time points after modeling

组别	A组	B组	C组
1 d	血管壁少量内皮细胞脱落, 炎细胞浸润; 血管内血细胞淤滞	血管壁少量内皮细胞脱落, 管壁水肿可见炎细胞浸润, 血管内血细胞淤滞	血管壁部分内皮细胞脱落, 管壁水肿可见炎细胞浸润, 血管内血细胞淤滞
3 d	血管壁内肉芽组织增生, 血管内血细胞淤滞	部分血管壁纤维素样坏死, 血管周围炎细胞浸润, 血管内血细胞淤	部分血管壁纤维素样坏死, 血管周围炎细胞浸润, 部分血管内红色血栓形成
7 d	血管壁纤维组织增长, 部分血管内出现红色血栓	部分血管壁增厚, 血管周围炎细胞浸润, 血管内形成红色及	血管壁增厚, 血管内血栓形成, 出现纤维蛋白机化血栓

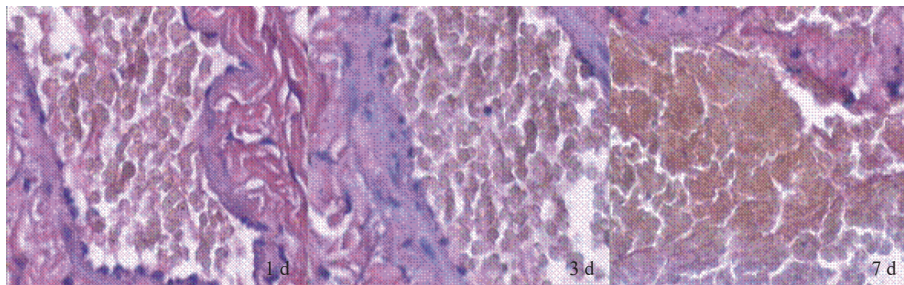


图 3 C 组兔建模 1 d、3 d 及 7 d 后股静脉血栓病理切片观察 (HE100×)

Fig. 3 Pathological observation of femoral vein thrombosis in rabbits of group C at 1 d, 3 d, and 7 d after modeling (HE100×)

因素: 血流淤积、静脉内皮损伤和血液高凝状态。目前, 深静脉血栓动物模型的制备方法主要包括阻断静脉血液回流以引发血液淤滞, 通过注入促凝物质、异物或机械性损伤血管内皮细胞等辅助手段诱发血栓形成^[5-6]。已报道的几种制备方法, 包括结扎法、创伤性击打后固定下肢、以及放置球囊导管阻塞血管并局部使用凝血酶^[7-10]。这些方法各有适用的研究领域, 相较于结扎法, 其余 3 种方法制备血栓时间较长、操作复杂、耗材较多, 并且没有关于机化血栓的报道。本研究旨在比较不同结扎方式制备动物股静脉血栓的效果, 以期找到一种简单而有效的方法来改进动物血栓

模型的制备过程, 为后续实验奠定良好的基础。

本研究使用超声联合实时剪切波弹性成像技术观察血栓形成过程, 并通过病理切片进行验证, 发现不全结扎法制备的静脉血栓模型更符合人体深静脉血栓的特点, 具有较高的成功率和更准确的数据基础。动物深静脉血栓模型的制备常因侧支循环的建立, 导致模型处血管的完全闭塞和管腔萎缩, 因此难以获取充满性深静脉血栓; 同时由于缺乏良好的观察方法, 不能很好地观察血栓形成过程, 最终导致血栓模型的成功制备率较低。超声联合实时剪切波弹性成像技术是一种非侵入性的影像学技术, 可以表征血栓的硬度^[11-12]。研

究已证实SWE可用于评估下肢深静脉血栓的硬度及静脉血栓的临床分期,且其效果优于常规超声检查^[13-15]。在本研究中,笔者利用这项技术实时、非侵入性观察血栓形成的过程,获取血栓的形态和血栓硬度的杨氏模量值,帮助笔者了解血栓的形成和演变过程,为后续实验提供了更准确的数据。同时,加入病理检查进行验证,结果表明使用单纯夹闭的方法形成的血栓主要是红色血栓,因此超声观察管腔内以低回声为主,管腔内可见少量血流信号,说明血栓易脱落。完全结扎法制造血栓模型超声及病理结果均证实管腔出现不同程度的闭塞和萎缩。联合不全结扎法同时应用了血流淤滞和静脉内皮损伤这2个导致血栓形成的关键因素,可以快速且大量地形成血栓。在制备模型后的第7天,超声检查发现C组血管内管腔内回声明显充填,SWE证实管腔内杨氏模量值明显升高,说明血栓出现机化后血栓硬度增高,通过病理证实该组血栓机化率明显增高。

笔者比较了单纯夹闭、联合完全结扎和联合不全结扎法制备血管内皮损伤后血栓模型的优缺点。发现单纯夹闭的方法虽然简单易行,使用止血夹反复夹闭股静脉,可通过损伤血管内皮,并短暂阻断了血流回流造成血流瘀滞,使该血管内处于高凝状态,从而引发血栓形成。但是,单纯夹闭的血栓形成效果不够理想,血栓往往不完整且容易脱落,这导致了观察效果较差。相比之下,完全结扎法能够较好地保持血栓的完整性。它通过将动物的股静脉完全结扎,阻断了血流,并促使血栓形成。这种方法的优点在于血栓形成相对完整,有利于观察和评估血栓的特征和性质。然而,完全结扎法也存在一些局限性。它可能导致血管闭塞和萎缩,影响血管的生理功能,甚至对动物的健康产生负面影响。与完全结扎法相比,不全结扎法则在模拟人体深静脉血栓方面更具优势。这种方法在不全结扎静脉血管壁时可造成一定的血管壁及内皮损伤,同时导致远端血流瘀滞,随着血管内的压力逐渐增高,血管壁承受的血液流体力学发生改变,引起血管壁的病理改变,并影响内皮细胞结构与功能。因此,通过不全结扎兔股静脉,可使血栓形成的速度更快。由于不全结扎法允许少量血流缓慢通过结扎段静脉,很好地模拟了人体静脉疾病的重度狭窄和血流缓慢的特点。因此,这种制模方式形成的静脉血栓模型更符合人体深静脉血栓的病理生理学特点。本研究还发现,使用这种方法进行建模的手术时间较短,血栓制成率高。有利于超声观察,为今后的

实验打下了良好的基础。

综上所述,本研究通过对比3种制备动物股静脉血栓的方法,可以看到不同方法各有其优势和局限性。结扎法简单易行,但血栓形成不完整且易脱落,观察效果较差。完全结扎法能够较好地保持血栓的完整性,但容易导致血管闭塞和萎缩,影响观察结果。而夹闭法联合不全结扎法能够产生较为稳定的内皮损伤和血栓形成。这种方法的优势在于,通过结扎不完全闭塞血管,可以模拟出更接近真实情况下的内皮损伤。此外,该方法制备的血栓模型在血管内径和杨氏模量值上显示出明显的变化,进一步验证了其有效性。这一研究结果对于进一步研究深静脉血栓的发生机制、预防和治疗方法具有重要的指导意义。

然而,笔者也注意到本研究存在一些局限性。首先,本研究仅使用兔作为实验动物,而不涉及其他物种,因此不能确定这种方法在其他动物模型中的适用性。其次,本研究的样本量相对较小,可能存在样本量不足的局限性。为了提高研究结果的可靠性和推广性,未来的研究将考虑增加样本量,并进行更严谨的统计分析,以更准确地评估不同方法制备血栓模型的效果。此外,本研究的观察时间较短,只观察了造模后1d、3d和7d的变化,没有对更长时间的变化进行观察。进一步的长期观察可能有助于更全面地评估血栓模型的稳定性和持久性。

总之,本研究的结果表明,夹闭法联合不全结扎法是制备内皮损伤后血栓模型的有效方法。然而,笔者需要进一步的研究来验证其与其他动物模型中的适用性,并扩大样本量、进行更长期的观察以评估其稳定性。

[参考文献]

- [1] Skeik N, Smith J E, Jensen J D, et al. Literature review of distal deep vein thrombosis[J]. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, 2021, 9(4): 1062-1070.e6.
- [2] 覃海敏,覃燕,高文,等. 静脉留置针致静脉血栓形成对白兔耳缘静脉中血管内皮损伤标志物表达水平的影响[J]. *广西医学*, 2021, 43(15): 1863-1867.
- [3] 王丽萍,陈蒙华,谢露,等. 海带多糖对内皮损伤大鼠血栓形成的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(2): 109-111.
- [4] Virchow Rudolf. *Gesammelte abhandlungen zur wis-*

- senschaftlichen medicin[M].Frankfurt A. M: Meidinger Sohn & Comp, 1856: 219-263.
- [5] Campos J, Brill A. By word of mouse: Using animal models in venous thrombosis research[J]. *Platelets*, 2020, 31(4): 447-454.
- [6] Ma S, Yin S, Zheng Y, et al. Establishment of a mouse model for ovarian cancer-associated venous thromboembolism[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2023, 248(1): 26-35.
- [7] 郭阆廷, 石锦, 陈曦, 等. COX-2靶向干扰对大鼠创伤性深静脉血栓形成的影响[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2022, 19(1): 11-14, 19.
- [8] 解梓琛, 孙克玉, 郭雪君. 中性粒细胞胞外诱捕网在小鼠静脉血栓栓塞形成中的作用及机制[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(20): 2129-2132.
- [9] 李观强, 孙元, 黄献琛, 等. 慢性髂静脉狭窄继发深静脉血栓动物模型的构建及影像学变化特点[J]. *中华实验外科杂志*, 2023, 40(5): 837-839.
- [10] 韦文姜, 肖承江, 李立恒, 等. 建立椎动脉急性血栓栓塞犬模型: 微球囊导管临时隔截取栓[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(18): 2849-2855.
- [11] 周丽珠, 吴静. 多普勒超声及实时剪切波弹性成像对静脉系统循证诊断效能的对比研究[J]. *影像研究与医学应用*, 2023, 7(4): 60-62.
- [12] Bosio G, Zenati N, Destremes F, et al. Shear wave elastography and quantitative ultrasound as biomarkers to characterize deep vein thrombosis in vivo[J]. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2022, 41(7): 1807-1816.
- [13] Rayes A, Zhang J, Lu G, et al. Estimating thrombus elasticity by shear wave elastography to evaluate ultrasound thrombolysis for thrombus with different stiffness[J]. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2023, 70(1): 135-143.
- [14] 洪登科, 杨嘉嘉, 薛恩生, 等. 实时剪切波弹性成像应用于股总静脉血栓临床分期[J]. *中国医学影像技术*, 2019, 35(8): 1200-1204.
- [15] 张静秋, 陆永萍, 梁婷婷, 等. 实时剪切波弹性成像技术对兔股静脉血栓的弹性研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2017, 33(3): 267-270.