

337-338.

- 7 Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, et al. Changes in brain natri-Uretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the valsartan heart failure trial (Val-HeFT)[J]. Circulation, 2003, 107(9): 1278-1283.
- 8 黄鹤楼, 陈群, 陆永怡. 缙沙坦联合美托洛尔对慢性充血性心力衰竭患者心室重构及心功能的影响[J]. 苏州大学学报(医学版), 2004, 24(6): 900-901.
- 9 张胜, 何顺德. 美托洛尔联合辛伐他汀治疗慢性充血性心力衰竭效果及对心室重构影响[J]. 临床误诊误治, 2015, 28(11): 79-83.

(收稿日期 2016-10-24)

(本文编辑 蔡华波)

·经验交流·

大鼠急性肺血栓栓塞症模型制备注射血栓规格探讨

高海青 王灵聪

急性肺血栓栓塞症 (acute pulmonary embolism, APE) 是由各种栓子堵塞肺动脉而致肺循环障碍的疾病。欧美国家的APE发病率和病死率较高, 我国近年也呈上升趋势。我国APE的流行病学调查发现, 1697余万位住院病人有18 206例APE病人, 年发生率0.1%, 2008年的病死率为8.7%^[1]。APE致病因素比较复杂, 有空气、脂肪、血栓等, 其动物模型不够成熟, 故本次实验拟探讨大鼠APE模型最佳注射血栓规格。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次实验时间为2016年3月至5月, 实验用雄性SD大鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司和北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 共7只, 无特定病原体, 体重为180~220 g, 在温度为20℃~25℃、相对湿度为40%~70%的饲养环境下, 饲养6 d备用。本次研究通过浙江中医药大学动物伦理委员会的审批。7只健康SD雄性大鼠随机分为三组, 按照不同注射血栓规格的具体分组为: 2 mm×1 mm

×30组(2只)、5 mm×1 mm×15组(2只)、5 mm×1 mm×30组(3只)。在手术前1天, 用一次性静脉针自大鼠尾静脉取血0.2 ml, 37℃水浴箱内过夜, 次日用注射器吹打出已凝固的血栓条, 制备成7个样本, 放入2 ml的注射器内备用。三组一般资料比较, 差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

1.2 APE模型的建立 次日, 大鼠经腹腔注射10%水合氯醛0.3 g/kg麻醉, 分离右颈总静脉, 放置穿刺针, 将已经制备好的栓子经穿刺针推入颈总静脉内, 注入栓子后快速推注0.9%氯化钠注射液1 ml防止栓子留置于导管或颈静脉内, 当大鼠出现呼吸加快加深, 表明APE造模成功。栓子推完后, 压迫颈总静脉止血, 观察无出血后, 逐层缝合关闭伤口。造模成功后6 h, 再次麻醉大鼠, 并处死, 取肺组织制作切片。制作切片方法为先去组织于4%甲醛溶液中固定3~5 d; 从固定液中取出组织, 修整为适当的形状及厚度; 组织块经过80%乙醇 I、90%乙醇 I、95%乙醇 I、100%乙醇 I、100%乙醇 II、100%乙醇 III 进行脱水处理; 二甲苯 I 20 min、二甲苯 II 20 min透明处理; 浸蜡处理, 石蜡 I 1 h、石蜡 II 4 h; 按照取材面向下的原则, 用石蜡包埋起组织, 待蜡块冷却凝固后置于-20℃冷藏; 切片厚度4 μm; 切片放入65℃恒温箱中烤片6~12 h; 装盒, 常温保存。行苏木精-伊红染色观察大鼠肺组织病理学改变。染色结果, 细胞核呈蓝色, 细胞浆呈粉红色, 红细胞呈较鲜艳的红色。

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2017.02.023

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY17H29006、LY12H29005), 浙江省医药卫生平台计划(2015ZDA022), 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目资助(2014-108)

作者单位: 310006 浙江杭州, 浙江中医药大学中医妇科(高海青); 浙江中医药大学附属第一医院ICU(王灵聪)

通讯作者: 王灵聪, Email: wlc501@139.com.

2 结果

2 mm × 1 mm × 30组中两个样本各取4叶肺组织进行染色,一张切片共可见14处肺动脉栓子形成,另一张切片共可见12处肺动脉栓子形成见封三图8。5 mm × 1 mm × 15组中一个样本取3叶肺组织进行染色,可见1处肺动脉栓子形成(栓塞面积大,比较明显);另一个样本取4叶肺组织进行染色,共可见3处栓子形成见封三图9。5 mm × 1 mm × 30组中一个样本取3叶肺组织进行染色,共可见4处栓子形成;另两个样本各取3叶肺组织进行染色,均共可见2处栓子形成见封三图10。

3 讨论

APE是由于内源性或外源性栓子堵塞肺动脉主干或分支引起肺循环障碍的临床和病理生理综合征,其发病率仅次于冠心病及高血压,死亡率居第三,仅次于肿瘤及心肌梗死。APE发展迅速、临床表现复杂、病死率高等特点日益引起人们注意,而动物疾病模型对其病理生理机制研究有着重要的科研价值^[2,3],因此,建立APE动物模型十分必要。APE模型的栓子制作很多,但最佳的APE模型的栓子大小的研究文献少有报道。故本次研究采用自体血栓作为栓塞剂,以此建立大鼠APE模型,选择自体血栓法不仅是因为其是常用的方法之一,而且操作简单易行,更是符合APE过程的自然发展。亦有相关文献报道,在研究有关APE的药物疗效观察、炎症反应、血流动力学等方面大多数均采用自体栓塞法^[4]。这符合APE疾病的生理、病理变化及其发生过程,具有极大的研究价值。栓子的大小和数目对模型的成功建立也至关重要,因为如果栓子太小、太少就会不易找到,不利于栓子的发现和肺动脉的取材,而栓子太大、太多则容易造成大面积APE致家兔快速死亡^[5],所以研究出最佳的栓子大小具有重要意义。

查阅资料发现,建立APE模型也有选用非小动物,如绵羊、猪、犬、兔,主要原因是动物体积大,操作方便,但实验成本过高。随着分子生物学的发展,近年来多选用大鼠,因为大鼠降低了实验成本,增加了实验的可重复性,具有对急性缺血、低氧耐受性较强,模型稳定,易于复制等优点^[6-8]。故本次实验对象选择大鼠。本次实验中应用自体血栓为栓子,制定不同规格,成功制作出APE的模型,证明此种方法制作APE动物模型可行,并且根据不同自体

血栓规格制作出的APE模型,挑选出2 mm × 1 mm × 30的血栓规格较为理想,为临床上更好建立APE动物模型提供一定的依据和参考,从而成为研究肺血栓栓塞症发病机制及评价各种治疗方法的一种重要途径。但相对于其他动物血栓模型大小制备来讲,现如今制作方法还存在不足之处,如大鼠可抽取的血液有限,股静脉管径较小,而且实验过程对动物本身伤害还是比较大的,这些都有待于进一步改进,并考虑其他新的尝试,使制作过程中副作用降到最低。

总之,模型制备中栓子的大小,形状和数目对模型成功建立至关重要,注入血栓的数量、形状和速度决定了APE的临床类型。本次实验从血栓的大小、形状及数目作为着眼点,对不同规格血栓所建立大鼠APE模型进行对比,得出注射血栓2 mm × 1 mm × 30所致的大鼠APE方法最佳。

参考文献

- 1 Konstantinides S, Torbicki A, Agnelli G, et al. 2014 ESC Guidelines on the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism[J]. Rev Esp Cardiol, 2015, 68(1):10-16.
- 2 范勇, 刘杨, 吴琦, 等. 两种不同方式复制大面积肺栓塞动物模型的比较[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(5):363-366.
- 3 叶瑞海, 陈少肾. 急性自体血栓肺栓塞大鼠动物模型制备[J]. 温州医学学报, 2006, 36(4): 323-335.
- 4 Wang L, Wu J, Zhang W, et al. Effects of aspirin on the ERK and PI3K/Akt signaling pathways in rats with acute pulmonary embolism [J]. Mol Med Rep, 2013, 8 (5):1465-1471.
- 5 陈永利, 张敬霞, 袁志明, 等. 急性血栓性肺栓塞动物模型的建立[J]. 实验性天津医科大学学报, 2003, 9(1):4-6.
- 6 王灵燕, 周仁芳, 王灵聪. 阿司匹林对急性肺栓塞大鼠肿瘤坏死因子- α 的干预[J]. 全科医学临床与教育, 2014, 12(6): 607-610.
- 7 吴文娜, 陈晓红. 白藜芦醇对大鼠急性肺栓塞后心肌细胞MC P-1及脑钠素表达的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2016, 45(3):311-314.
- 8 靳建军, 郭军, 陆慰萱. 辛伐他汀对大鼠急性肺栓塞的保护作用[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2012, 11(7):541-545.

(收稿日期 2016-11-02)

(本文编辑 蔡华波)