

# 大鼠异侧颈总动脉端 - 侧吻合动物模型的制作 验证血管端 - 侧吻合的手术模型可行性评价

于仁朝, 李 健, 张业森, 马 骏, 赵永轩, 苏贺先

**[摘要]** **目的:**建立 SD 大鼠异侧颈总动脉端 - 侧吻合动物模型, 验证血管端 - 侧吻合的手术模型可行性。**方法:**选取成年 SD 大鼠 20 只, 将右侧颈总动脉远端穿过气管下面的组织, 与左侧颈总动脉行端 - 侧吻合, 记录缝合针数及吻合时间, 1 个月后取吻合口血管行 HE 染色及脑组织 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色进行观察。**结果:**成功建大鼠颈总动脉端 - 侧血管吻合动物模型, 手术成功率达 100%, 平均吻合 7 针, 平均吻合时间(40 ± 5)min。吻合 1 个月后观察通畅率 100%, HE 染色显示吻合口愈合良好, 大脑 2,3,5-氯化三苯基四氮唑染色显示无脑缺血灶。**结论:**模型制作成功率高, 能保证脑组织血液灌注。操作过程中需注意保护颈总动脉周围的分支血管及神经。模型可应用于烟雾病外科治疗及插入性血管移植的临床研究。

**[关键词]** 颈动脉/解剖学和组织学; 端 - 侧吻合; 显微外科; 动物模型

**[中图分类号]** R 322.121 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.10.004

## Establishment and evaluation of the end-to-side anastomosis model of the common carotid artery in rat

YU Ren-chao, LI Jian, ZHANG YE-sen, MA Jun, ZHAO Yong-xuan, SU He-xian

(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective:**To establish the end-to-side anastomosis model of the common carotid artery(CCA) in rat for simulating the operation model of vascular anastomosis. **Methods:**The end-to-side anastomosis model of left CCA and distal end of right CCA under the trachea tissue in 20 adult SD rat was established. The number of suture needle and anastomosis time were recorded. The anastomotic vessel and brain were stained using HE and 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, respectively. **Results:**The end-to-side anastomosis model of CCA was established in rat, the successful rate of which was 100%. The number of suture needle was 7, and anastomosis time were 40 ± 5 min, respectively. The patency rate of anastomosis was 100% after one month of anastomosis. The HE and 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride staining showed that the anastomosis healing was good, and brain had no cerebral ischemia. **Conclusions:**The blood vessel branch and nerve around the CCA should be protected during the process of model-making, the model can be used in the study of surgical treatment of moyamoya disease and vascular transplantation.

**[Key words]** carotid artery/anatomy and histology; end-to-side anastomosis; microsurgery; animal model

在神经外科手术中, 血管吻合应用越来越广泛。显微血管吻合之前, 血管吻合的手术动物模型的制作有利于临床显微操作技能的培养。本实验利用成年 SD 大鼠, 建立颈总动脉(common carotid artery, CCA)端 - 侧吻合动物模型, 成功模拟颞浅动脉 - 大脑中动脉(STA-MCA)吻合, 验证了端 - 侧吻合动物模型的可行性, 对其吻合过程中的技巧、注意事项及需要注意的细节进行总结, 为临床血管吻合及血管移植的进一步研究奠定了基础。现作报道。

### 1 材料与方法

1.1 实验材料 选择普通成年 SD 大鼠 20 只, 体质量 240 ~ 250 g, 蚌埠医学院实验动物中心提供。10-0 医用尼龙缝线购自上海浦东金环医疗用品有限公司。手术显微镜为上海玉研科学仪器有限公司产动物显微镜。实验动物均给予“3R”人道主义关怀。

#### 1.2 方法

1.2.1 术前准备 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.7 ml/100 g), 成功麻醉后, 动物仰卧, 四肢固定在鼠板上, 颈部伸直并固定、备皮、消毒。显微镜的调节: 目镜的调焦应先调节一只眼, 后调整另一只眼, 根据操作者本人的瞳距调节目镜, 获得完整清晰的图像。

1.2.2 吻合血管的准备 分离双侧的 CCA; 可在

[收稿日期] 2015-05-31

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 神经外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 于仁朝(1988 - ), 男, 硕士研究生。

[通信作者] 苏贺先, 硕士研究生导师, 主任医师. E-mail: hexiansu@soho.com

颈部沿下颌下腺至胸骨上缘做正中垂直皮肤切口,长 4~5 cm。用 4 号线向右侧缝合并牵拉开皮下脂肪、淋巴结和腺体组织及右侧的肩胛舌骨肌和右侧胸锁乳突肌,在两层肌肉的下面可见到右侧颈总动脉(R-CCA)和迷走神经包绕在颈动脉鞘内。在高倍镜(10~15倍)视野下,可见 CCA 与同侧的迷走神经伴行,仔细轻柔地分离 CCA 周围小的动脉分支和迷走神经,任何血管破裂和迷走神经损伤都可能直接影响到手术的过程,甚至可引起动物死亡,导致手术失败。在 R-CCA 近心端尽量靠近胸骨上区的近心端处夹 1 个血管临时阻断夹,R-CCA 远心端用 4 号线结扎,切记要在显微镜下轻柔分离与之紧密伴行的迷走神经,切忌过度牵拉及误夹,否则会造成动物的死亡。在结扎处的近端以 45° 剪断 R-CCA,小心将其从颈动脉鞘中分离出来。分离时不要过多牵拉与之伴行的迷走神经,尽量保护周围小的分支血管和神经。最后可用肝素 0.9% 氯化钠注射液冲洗 R-CCA。用上述同样方法游离左侧颈总动脉(L-CCA)。用一弯钩,在气管下面打一隧道,将 R-CCA 沿此隧道拉至气管左侧,用另一个血管临时阻断夹在尽量靠近气管的左侧夹住 R-CCA。去除气管右侧 R-CCA 上的血管夹。这一关键步骤使得 R-CCA 在没有张力并有足够的长度来进行缝合,弊端是由于在狭窄的空间内存在 2 个血管夹,影响吻合操作。为了吻合后使得右侧 R-CCA 的血流更好地通过 L-CCA 并供应大脑,避免在吻合口处形成涡流形成血栓的危险,在 L-CCA 的近胸骨上区近心端用 4 号线结扎,远心端用 1 个血管夹临时阻断,尽量保持被吻合侧(L-CCA)保持松弛。

**1.2.3 端-侧吻合** 成年大鼠的 CCA 直径在 0.8~1 mm,两侧 CCA 端-侧吻合时应该在最佳角度 45° 左右进行。将 R-CCA 的断端切断成 45° 的斜面,在 L-CCA 侧面上剪一约同等大小、形状的缺口,吻合口周围血管的外膜尽可能修剪整齐。用 10-0 医用尼龙缝线进行间断内膜外翻缝合,平均缝合 7 针。持针器持针时,针与针轴保持 90° 最稳定,夹持针的最佳位置在中点偏后,进针方向垂直于组织表面,同时向上轻推组织边缘,显微镊尽量避免夹持过多的组织,被缝合组织两侧的针距应尽量保持相等,针距约为针自身厚度的 3 倍。

为了牵引和定位,应先对吻合口的 3 点和 9 点处进行缝合,之后再缝合吻合口的外侧面。为了便于缝合吻合口的内侧面,可以将 R-CCA 轻轻地向外侧牵拉露出内侧面。为避免缝透血管,进针的方向

应与血管切口中线成放射状,也可在中间先缝合 1 针,不打结,缝合剩余部分时可牵拉缝合线以免缝透血管,可缝合完最后一并打结,避免最后 1 针缝合时盲目进针。拉线打结时,保持与进针出针方向一致,可避免造成不必要的血管损伤。当拉至线的末端时保留 3 mm 以备打结,打第 1 个结时,为避免组织的回缩,可绕持针器 2 圈,打外科结。

**1.2.4 吻合后处理及验证** 缝合结束后将 R-CCA 吻合口靠近气管左侧的血管夹去除,观察吻合口是否有渗血,再去 L-CCA 远心端血管夹,如有轻度渗血,可在吻合口上轻压明胶海绵约 5 min 后可止血(见图 1)。可行血管上提实验来验证吻合是否通畅。再次消毒并去除两侧缝合线,分层缝合颈部皮肤。

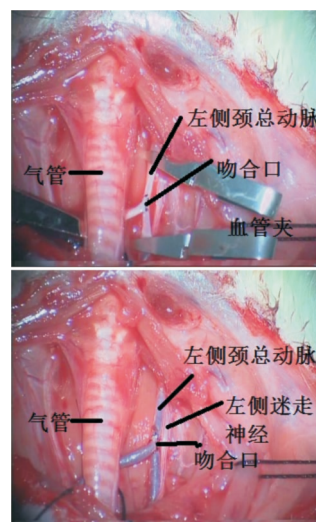


图1 大鼠颈总动脉端侧吻合过程

**1.2.5 评价方法** 1 个月后活体暴露吻合口,观察吻合血管愈合及通畅情况。然后取吻合口周围 0.5 cm 血管横断面进行 HE 染色。同时,尽可能快速取出脑组织,在去除不需要的组织后置于 -20 °C 冰箱短暂冷冻。由前向后冠状面每隔 2~3 mm 进行切片,然后将切片置于用 0.2 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)配制的 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)试剂中,在 37 °C 避光孵育 30 min 之后,在 10% 中性甲醛溶液中固定,后取出观察脑组织染色。

## 2 结果

本实验中,对 20 只 SD 大鼠进行了 CCA 端-侧吻合,术后发现 2 只大鼠双眼萎缩,大鼠 CCA 直径 0.8~1.0 mm,平均缝合 7 针,平均缝合时间(40±5)min。1 个月后采集血管吻合口标本,HE 染色显示血管吻合口内皮细胞生长良好(见图 2A),血管

通畅率达 100%, 未见血管狭窄及假性动脉瘤。脑组织 TTC 染色显示无缺血及脑萎缩(见图 2B)。

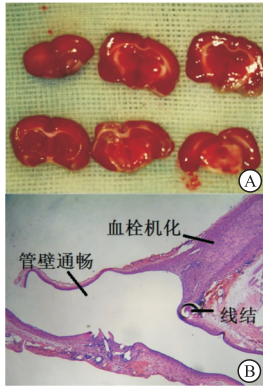


图2 大鼠1个月后脑组织TTC染色及吻合血管HE染色

### 3 讨论

在进行临床显微血管吻合之前,显微镜下血管吻合动物模型的制作是必不可少的。近年来,国外显微血管缝合的研究<sup>[1-3]</sup>多集中在血管吻合材料及器械的改进和有功能的缝合线上,而模拟临床手术的动物模型研究甚少。已有文献<sup>[4]</sup>中提及几种微血管的端-侧吻合动物模型,但对其制作过程及需要注意的细节未做细致描述。显微镜下操作过程中,要保持操作者心理和身体姿势的放松,同时还必须具备平静的心情、舒适的姿势以及找到一个良好的受力支撑点,从而避免手臂肌肉的抖动和疲劳。执笔式拿显微器械,拇指示指紧挨中指,中指位置最低,可通过无名指作为支撑点,稳定性较为可靠。严格按照气管前中线分离组织可明显减少不必要的出血,在分离 CCA 及与之伴行的迷走神经时动作尽量轻柔,避免迷走神经和 CCA 及其小分支的损伤,均是手术成败的关键。吻合成功后,少量的渗血通过明胶海绵压迫止血。依次缝合切口并用聚维酮碘消毒预防感染。本实验早期发现 2 只大鼠双眼萎缩,可能与开始经验不足、手法及操作相对粗暴所引起的迷走神经损伤有关。

由于大鼠大脑不仅由双侧的颈总动脉供血,还依靠双侧的椎动脉供血,虽然阻断双侧的 CCA 时间长达 40 min 左右,1 个月后脑组织 TTC 染色未见缺血灶,未造成脑组织缺血,证明大鼠脑组织对缺氧的耐受能力之强,适宜血管端-侧吻合动物模型的制作。本实验的不足是仅限于宏观方面的研究,对于影响吻合口血管内皮细胞生长因素如血管内皮生长因子、内皮祖细胞等及吻合口的血流动力学及造影

未做进一步研究。内皮祖细胞有修复损伤的血管内皮和参与新生血管形成的作用<sup>[5]</sup>。

SD 大鼠 CCA 端-侧吻合动物模型的建立,是进行显微血管吻合的良好模型,不仅可以模拟血管端-侧吻合的手术模型,还可应用于烟雾病外科治疗及插入性血管移植的临床研究。首先,SD 大鼠的 CCA 位置相对固定,位于气管两旁并与双侧的迷走神经伴行,对于大鼠而言,大脑是由双侧的 CCA 及双侧的椎动脉共同供血,即使只有单侧的 CCA 供血也不会造成脑组织的梗死,在吻合过程中,即使双侧的 CCA 同时阻断,在短时间内亦不会对脑组织产生致命性损害,未发现有心力衰竭表现,这是对比其他动物模型的优势所在。相对血管的端-端吻合,端-侧吻合更适用于临床。在烟雾病标准的外科治疗中,低流量的直接或间接搭桥术可迅速改善脑组织的缺血、缺氧<sup>[6]</sup>,直接搭桥最经典的是 STA-MCA 吻合术<sup>[7]</sup>,属于典型的端-侧吻合术。主要是通过颅内外血管的吻合来增加缺血脑组织的血流量<sup>[8]</sup>,端-侧吻合还可用于不能夹闭的 MCA 动脉瘤的插入性血管移植中<sup>[9]</sup>,治疗 MCA 重度狭窄或闭塞所引起的脑组织低灌注效果亦较为满意<sup>[10]</sup>。

因此,血管吻合的动物手术模型对于烟雾病的外科治疗及血管插入性移植等有重要临床价值。在进行血管端-侧吻合时一般是间断缝合,虽然国外研究<sup>[11]</sup>的激光焊接技术的应用可最大限度减少受体血管的吻合时间,多功能可调血管夹的应用也可缩短吻合时间<sup>[12]</sup>,但目前血管吻合仍以缝线缝合为主。本实验动物模型由于血流动力学未明显改变,符合动物模型制作的标准,且模型制作死亡率低,适合其他基础实验的进一步研究。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Okubo T, Harada K, Fujii M, *et al.* Hand-held multi-DOF robotic forceps for neurosurgery designed for dexterous manipulation in deep and narrow space [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014, 20(14): 6868-6871.
- [2] Huizhong Li, Gale BK, Sant H, *et al.* Design, fabrication, and testing of a novel end-to-end vascular coupling system [J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014, 20(14): 6593-6596.
- [3] Bauer F, Fichter AM, Loeffelbein DJ, *et al.* Microvascular anastomosis using modified micro-stents: a pilot in vivo study [J]. *Craniofacial Surg*, 2015, 43(2): 204-207.
- [4] Wong CY, de Vries MR, Wang Y, *et al.* Vascular remodeling and intimal hyperplasia in a novel murine model of arteriovenous fistula failure [J]. *Vasc Surg*, 2014, 59(1): 192-201.
- [5] 倪冠中, 刘文华, 徐格林, 等. 内皮祖细胞与烟雾病关系的研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2010, 9(6): 646-648.

运动能否降低骨骼肌线粒体肿胀的程度,还存在争议。Hardie<sup>[11]</sup>研究认为,阻断线粒体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性可导致细胞质内钙离子浓度升高,从而激活磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶,增加糖酵解,并使乳酸生成增加。线粒体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性增高可延缓运动带来的疲劳。

然而,规律的有氧运动对骨骼肌线粒体的保护作用并非一蹴而就。Green 等<sup>[12]</sup>在研究有氧运动对骨骼肌肌膜和 T 管  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ -ATP 酶的影响中发现,经过 6 d 的有氧训练可以提高酶的含量和活性,而为期 3 d 的有氧运动却与对照组差异无统计学意义,本实验与之结果类似。

实验结果表明,有氧运动可以提高大鼠心肌线粒体  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性,同时能够显著提高 ATP 酶含量,对保护和提高线粒体功能以及延缓运动带来的疲劳有一定的作用,然而此作用需要一定时间的积累。再延长训练时间或者增大训练强度对大鼠心肌线粒体  $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{K}^{+}$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶的活性以及线粒体肿胀程度有何影响,值得进一步研究探讨。

#### [参 考 文 献]

- [1] 李洁,邢良美. 模拟 3 500 m 不同低氧训练模式对大鼠力竭运动后心肌线粒体自由基代谢及呼吸链功能的影响[J]. 上海体育学院学报,2012,36(1):51-55.
- [2] 黄丽英. 低氧运动对大鼠心肌线粒体结构和功能的影响[J]. 首都体育学院学报,2009,21(4):462-465.
- [3] 申康均. 间歇性低氧训练对肥胖小鼠心肌形态学的影响[D]. 中南大学学报,2009,65(25):17-20.
- [4] 赵娟,李海英,薄海,等. 低氧及跑台运动对大鼠左心室肌线

粒体超微结构的影响[J]. 中国康复医学杂志,2011,26(12):1104-1107.

- [5] Reinila Y, Li W, Yan T, *et al.* Early detection of lesions of dorsal artery of foot in patients with type 2 diabetes mellitus by high-frequency ultrasonography [J]. J Huazhong Univ Sc Technolog Med Sci, 2011, 29(3):387-390.
- [6] Husse B, Sopart A, Isenberg G. Cyclical mechanical stretch-induced apoptosis in myocytes from young rats but necrosis in myocytes from old rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285(4):H1521-H1527.
- [7] Venkatraman M, Konga D, Peramaiyan R, *et al.* Reduction of mitochondrial oxidative damage and improved mitochondrial efficiency by administration of crocetin against benzo[a]. pyrene induced experimental animals [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(9):1639-1645.
- [8] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 9(12 Suppl):S16-S23.
- [9] Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(19/20):1412-1420.
- [10] 康少平,李旭光,董嘉良,等. 心肌缺血后处理抑制线粒体通透性转换孔开放的研究[J]. 中国实用内科杂志,2008,12(28 Suppl 2):40-42.
- [11] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream [J]. J Cell Sci, 2004, 117(23):5479-5487.
- [12] Green HJ, Ban DJ, Fowles JR, *et al.* Malleability of human skeletal muscle  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATPase pump with short-term training [J]. J Appl Physiol, 2014, 97(11):143-148.

(本文编辑 马启)

(上接第 1314 页)

- [6] Arikan F, Vilalta J, Torne R, *et al.* Rapid resolution of brain ischemic hypoxia after cerebral revascularization in moyamoya disease [J]. Neurosurgery, 2015, 76(3):302-312.
- [7] Okada Y, Kawamata T, Kawashima A, *et al.* The efficacy of superficial temporal artery-middle cerebral artery anastomosis in patients with moyamoya disease complaining of severe headache [J]. Neurosurg, 2012, 116(3):672-679.
- [8] 郝继恒,刘卫东,张利勇,等. 颞浅动脉-大脑中动脉吻合治疗烟雾病的疗效分析[J]. 中华神经外科杂志,2014,30(8):760-764.
- [9] 刘方军,石祥恩,张永利,等. 颞浅动脉插入性移植治疗大脑中

动脉动脉瘤[J]. 中华神经外科杂志,2014,30(3):217-220.

- [10] 江志贤,张晋宁,黄锦聪,等. 颞浅动脉-大脑中动脉吻合术治疗缺血性脑病的临床研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志,2014,19(4):166-167.
- [11] Puca A, Esposito G, Albanese A, *et al.* Minimally occlusive laser vascular anastomosis (MOLVA): experimental study [J]. Acta Neurochir (Wien), 2009, 151(4):363-368.
- [12] Pereira A, Ichihara S, Collon S, *et al.* Multiple adjustable vascular clamp prototype: feasibility study on an experimental model of end-to-side microsurgical vascular anastomosis [J]. Chir Main, 2014, 33(6):379-383.

(本文编辑 刘畅)