

## • 实验研究 Experimental research •

## 新西兰白兔严重冻伤模型实验观察

付金鑫, 段 峰, 张金龙, 袁 冰, 张 恒, 阎洁羽, 管 阳, 王 燕,  
袁 凯, 王茂强

**【摘要】 目的** 实验观察新西兰白兔严重冻伤模型的大体、影像学、血液学、病理学变化。**方法** 采用乙醇浸泡法建立新西兰白兔严重冻伤模型 12 只, 并进行常规复温治疗。分别于冻伤前、冻伤后复温前、复温后即刻、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 对 10 只兔严重冻伤模型进行受累肢端肿胀程度、皮肤颜色观察及血管造影; 于冻伤前、复温后即刻、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 进行血常规、血生化、凝血及纤溶活性指标检测, 放射免疫分析法测定血浆血栓素 B2(TXB2) 和 6-酮-前列腺素 F1 $\alpha$ (6-keto-PGF1 $\alpha$ ) 水平, TBA 比色法测定血浆丙二醛(MDA) 含量, 黄嘌呤氧化酶法测定血浆超氧化物歧化酶(SOD) 含量。于冻伤前、冻伤后复温前、复温后即刻和复温后 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d 对其余 2 只模型受累肢端进行常规组织病理学检查。采用趾端截肢率和得分法计算模型的自然预后截肢率。**结果** 模型复温后即刻至复温后 12 h, 受累肢端皮肤颜色由紫蓝色转为粉红色, 肿胀程度逐渐加重, 肢端血管造影显示血流逐渐恢复, 复温后 12 h 至截肢皮肤颜色由粉红色转变为紫蓝色, 最后变为黑色, 肿胀程度减轻至最后干瘪, 肢端血管逐渐闭塞, 血流逐渐消失, 皮肤颜色紫蓝及暗黑区域大致对应血管闭塞区。白细胞水平在复温后即刻~3 d 持续升高; 红细胞、血红蛋白、红细胞比容于复温后即刻始升高, 12 h 达高峰, 24 h 恢复基线水平, 2 d、3 d 下降; 血小板水平于复温后即刻~2 d 持续下降, 24 h 达低谷, 3 d 恢复升高; 丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、血尿素氮、血清肌酐值较基线值差异无统计学意义( $P>0.05$ ); 6-keto-PGF1 $\alpha$  水平于复温后即刻~12 h 持续升高, 12 h 达高峰, 24 h~3 d 开始下降; TXB2 水平于复温后即刻~3 d 持续升高; MDA 水平于复温后即刻~3 d 持续升高; SOD 水平于复温后即刻~24 h 持续升高, 24 h 达高峰, 2 d、3 d 开始下降。模型左前肢血管病理检查结果显示, 复温后即刻~24 h 大量血管扩张淤血或充血, 未见明显血栓, 2~5 d 可见混合血栓。受累趾端最终截肢率为 82.5%, 得分法结果为 (20.6 $\pm$ 3.8) 分。**结论** 新西兰白兔严重冻伤模型受累肢端复温后即刻至复温后 12 h 血流逐渐恢复, 24 h 血栓形成, 血管逐步闭塞。冻伤后血液处于高凝状态, 机体出现严重炎症反应, PGI2-血栓素 A2 及氧化-抗氧化系统失衡。

**【关键词】** 冻伤; 实验动物模型; 血管造影

中图分类号: R645 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2022)-10-0982-06

**Experimental observation of severe frostbite in New Zealand white rabbit models** FU Jinxin, DUAN Feng, ZHANG Jinlong, YUAN Bing, ZHANG Heng, YAN Jieyu, GUAN Yang, WANG Yan, YUAN Kai, WANG Maoqiang. Department of Interventional Radiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: WANG Maoqiang, E-mail: wangmq@vip.sina.com

**【Abstract】 Objective** To observe the gross, imaging, hematological, and pathological changes of severe frostbite in the New Zealand white rabbit models. **Methods** By using ethanol immersion method the severe frostbite model was established in 12 New Zealand rabbits, and conventional rewarming treatment was adopted. Observation of the affected limb swelling and skin color, and angiography were conducted in 10 rabbits before frostbite, between frostbite and rewarming, immediately after rewarming, as well as at 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d, 6 d after rewarming. Before frostbite, immediately after rewarming, and at 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d after rewarming, the blood routine, blood biochemistry, coagulation and fibrinolytic activity indicators were tested, the levels of plasma thromboxane B2(TXB2) and 6-keto-prostanin F1(6-keto-PGF1 $\alpha$ ) were determined by radioimmunoassay, the levels of plasma malondialdehyde(MDA) were determined by TBA

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.10.010

作者单位: 100853 北京 解放军总医院介入放射科(付金鑫、段 峰、袁 冰、张 恒、阎洁羽、管 阳、王 燕、袁 凯、王茂强); 首都医科大学附属北京同仁医院放射科(张金龙)

通信作者: 王茂强 E-mail: wangmq@vip.sina.com

colorimetry, and the superoxide dismutase (SOD) contents were determined by xanthine oxidase method. Before frostbite, between frostbite and rewarming, immediately after rewarming, as well as at 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d after rewarming, routine histopathological examinations of the affected limb toes were performed. The toe amputation rate and scoring method were used to calculate the natural prognostic amputation rate. **Results** Between immediately after rewarming and 12 h after rewarming, the color of the affected limb skin in severe frostbite models changed from purple to pink, while the swelling degree increased gradually. Angiography showed that the blood flow recovered gradually. During the period from the 12th hour after rewarming to amputation the skin color changed from pink to purple blue and finally to black, the swelling tissue was finally changed to the withered status, the limb blood vessels gradually occluded, the blood flow gradually disappeared, the skin areas presenting purple blue and black in color were roughly correspond to the vascular occlusion areas. The leukocyte levels continued to increase immediately after the rewarming until 3 d after rewarming. The red blood cells, hemoglobin and erythrocyt increased immediately after rewarming, which reached its peak at 12 h and returned its baseline level at 24 h, then it began to decrease at 2 d and 3 d after rewarming. The platelet levels began to decrease immediately after rewarming, which reached its low valley at 24 h after the rewarming, then it rose again at 3 d after the rewarming. The postoperative levels of the alanine aminotransferase, aspartate transaminase, blood urea nitrogen and serum creatinine were not statistically significant different from the baseline ones ( $P>0.05$ ). The levels of 6-keto-PGF1 $\alpha$  began to decrease immediately after rewarming until 12 h after rewarming when it reached its peak, then it began to decrease at 24 h to 3 d after rewarming. The TXB2 levels were continuously increased immediately after rewarming until 3 d after rewarming. The MDA levels began to increase immediately after rewarming to 3 d after rewarming. The SOD levels began to increase immediately after rewarming until 24 h after rewarming when it reached its peak, then it began to decrease at 2-3 d after rewarming. The pathological examination of the left forelimb of the experimental rabbits showed that massive vascular dilatation or congestion with no obvious thrombosis could be observed immediately after rewarming until 24 h after rewarming, and in 2-5 d after rewarming the mixed thrombus was seen. The final amputation rate of the affected toes was 82.5% with a score of (20.6 $\pm$ 3.8) points. **Conclusion** In the experimental severe frostbite models of New Zealand white rabbit, the blood flow of the affected limbs begins to recover immediately after rewarming to 12 hours after rewarming. At 24 h after rewarming, the thrombosis formation begins to appear, and the blood vessels become gradually occluded. In frostbite condition, the blood is in a hypercoagulable status, the body exhibits a severe inflammatory response, and the PGI2-TXA2 and the oxidation-antioxidant system become unbalanced. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 982-987)

**【Key words】** frostbite; experimental animal model; angiography

冻伤是人体处于寒冷环境引起的局部或全身性损伤。目前研究冻伤的动物模型主要有大鼠和兔模型,建模方法包括液氮致冻法、乙醇浸泡冷冻法及模拟高原低氧复合冷冻法<sup>[1-3]</sup>。冻伤的病理生理学变化过程可分为相互重叠的预冻期、冻融期、血液淤滞期和缺血期<sup>[4]</sup>。冻伤组织损伤机制主要包括直接损伤和间接损伤<sup>[5]</sup>,前者指组织冻结直接引起细胞内外液冰晶形成,冰晶破坏细胞膜造成细胞死亡,此外细胞外渗透压增加导致细胞脱水,细胞内代谢紊乱,后者指冷冻引起血管强烈收缩、血管内皮细胞受损、基底膜通透性增加,血小板聚集、血栓形成、红细胞外渗、组织水肿,此外内皮细胞合成和分泌前列环素(prostacyclin,PGI2)功能受损。PGI2有抗血小板聚集及舒张血管作用,与血栓素A2(thromboxane A2,TXA2)拮抗处于动态平衡中,但PGI2释放减少加速血栓形成,氧化与抗氧化系统失

衡,类似于缺血-再灌注损伤。目前部分研究报道了新西兰白兔严重冻伤模型的病理生理学变化,但缺乏影像学、病理学及PGI2-TXA2、氧化-抗氧化平衡状态研究。本研究使用乙醇浸泡冷冻法建立新西兰白兔严重冻伤模型并进行大体、影像学、血液学及病理学实验观察。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

取经隔离检疫合格的普通级新西兰白兔(北京市维通利华实验动物公司提供)12只,雌雄各半,12~15周龄,体质量3.0~4.0 kg。采用单笼饲养,保持安静环境,防止动物惊吓,每日喂食2次(上午9时,下午3时),颗粒饲料供应量为130~150 g,并给予充足的纤维素供应,饮水不限。本实验已获解放军总医院实验动物伦理委员会批准,整个实验过

程严格遵守动物福利伦理 3R 原则。

## 1.2 兔严重冻伤模型建立及复温

新西兰白兔前足充分剃毛,在平第 4 指骨粗隆处划一冷冻线,自冷冻线中点上方插入针状热电偶监测第 2、3 跖趾关节交界处组织温度,将左前肢端浸泡于 $-20^{\circ}\text{C}$  95%乙醇中,冻伤至监测组织温度下降至 $-5^{\circ}\text{C}$ 后再继续冷冻 7 min 即完成左前肢严重冻伤模型构建。将严重冻伤模型受累肢端置于加有聚维酮碘的  $37\sim 39^{\circ}\text{C}$  恒温循环水槽中复温治疗 25~35 min,复温终点为肢端变红或肢端柔软易弯折。

## 1.3 兔严重冻伤模型实验观察

大体观察:分别于冻伤前、冻伤后复温前、复温后即刻,和复温后 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 进行受累肢端外观观察及拍照记录,观察记录组织肿胀程度及颜色变化。

血管造影:分别于冻伤前、冻伤后复温前、复温后即刻,和复温后 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 进行患肢动脉造影:经耳缘静脉按  $0.1\text{ mL/kg}$  剂量注射速眠新进行麻醉(麻醉前 12 h 禁食水),兔仰卧位固定于自制小木板上,剔除右后肢内侧和腹股沟区兔毛,常规消毒、铺巾,沿右股动脉鞘区切开皮肤  $2\sim 3\text{ cm}$ ,分离皮下组织,暴露并剪开股动脉鞘,分离出长  $1.5\sim 2\text{ cm}$  股动脉,远端用丝线结扎,近端穿丝线并将其稍提紧使股动脉血流暂时阻断;用眼科镊夹起股动脉壁外侧,眼科剪在股动脉壁内侧剪一小口,将引导导丝沿破口插入股动脉,顺导丝置入 4 F 动脉鞘,缓慢推入股动脉内约  $2\text{ cm}$ ;用丝线将动脉鞘固定于股动脉,拔出导丝及动脉鞘内套管,将剪短的 4 F 导管置入动脉鞘内,导入 2.2 F 微导管;DSA 导引将微导管头端超选择插管至肱动脉远端,使用弹力绷带于股动脉处固定动脉鞘及微导管,防止撕咬及导管移位;经动脉推注小剂量硝酸甘油,注入对比剂(速率  $0.5\sim 1\text{ mL/s}$ ,注射压力 200 psi,总量  $1.5\sim 3\text{ mL}$ )。造影术后连续 5 d 肌内注射青霉素 80 万 U。

血常规、生化、凝血及纤溶活性指标检测:于冻伤前、复温后即刻,和复温后 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 经耳缘静脉抽取静脉血  $3\text{ mL}$ ,离心分离血浆( $3\ 000\text{ r/min}$ ,  $15\text{ min}$ ),保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱,采用全自动分析仪检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞比容(HCT)、血小板(PLT)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)。

血浆血栓素  $\text{B}_2$ (TXB $_2$ )和 6-酮-前列腺素  $\text{F}_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ )检测:于冻伤前、复温后即刻、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 经耳缘静脉抽取静脉血  $1.5\text{ mL}$ ,颠倒混匀,分离血浆( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $3\ 500\text{ r/min}$ ,  $15\text{ min}$ ),保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱,采用 TXB $_2$  及 6-keto-PGF $_{1\alpha}$  放射免疫分析药盒(北京普尔伟业生物科技公司)进行检测。

血浆丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测:于冻伤前、复温后即刻,和复温后 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 经耳缘静脉抽取静脉血  $1.5\text{ mL}$ ,离心分离血浆( $3\ 000\text{ r/min}$ ,  $15\text{ min}$ ),保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。血浆 MDA 含量通过 TBA 比色法测定,血浆 SOD 含量使用黄嘌呤氧化酶法测定。

常规组织病理学检查:取材时点为冻伤前、冻伤后即刻、复温后即刻,和复温后 6 h、12 h、24 h、2 d、3 d、4 d、5 d,切取待检测组织放入 4%甲醛固定 48 h 以上,组织样本取材厚  $3\text{ mm}$ ,梯度乙醇脱水 70%、80%、95%、100%各 30 min,二甲苯 2 瓶各 20 min,石蜡浸蜡两缸各 12 min,包埋,切片  $4\text{ }\mu\text{m}$ ,烤片;二甲苯 3 瓶脱蜡,每瓶 8 min,100%乙醇 2 瓶,每瓶 8 min,90%、80%、60%乙醇每瓶各 8 min;苏木精-伊红(HE)染色 4 min,盐酸乙醇分化  $2\sim 3\text{ s}$ ,0.5%氨水 20 s,上镜观察,0.5% HE 染色 1 min,80%、90%乙醇各分化  $3\sim 5\text{ s}$ ,95%乙醇 5 min,100%乙醇 3 瓶,每瓶 5 min,二甲苯 2 瓶,每瓶 5 min;中性树脂胶封片;显微镜观察并图像采集分析。

自然预后截肢率统计:采用趾端截肢率和得分法统计计算模型的自然预后截肢率,趾端截肢率=趾肢指端数/受累趾端数,得分法即人为定义各趾端及关节平面分数,根据截趾范围得出最终截趾分数,最终截趾分数=A、B、C、D 四纵向趾端截肢平面的分数总和<sup>[6]</sup>。趾端及关节平面截趾分数定义图示见图 1。

## 1.4 统计学分析

正态分布计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,比较采用  $t$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

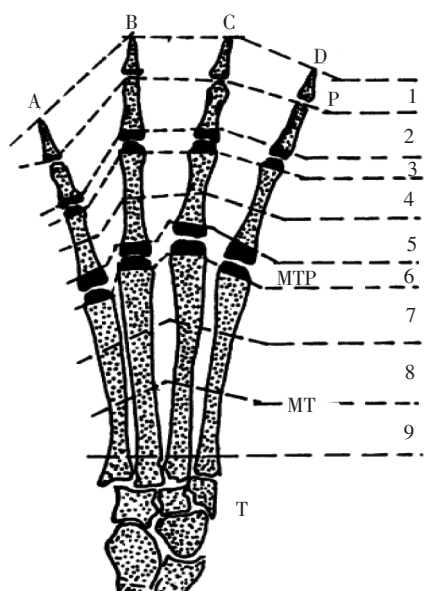
### 2.1 大体观察及血管造影

新西兰白兔严重冻伤模型左前肢在实验各时间点的大体观察及血管造影变化情况,见图 2。

### 2.2 血液学检测

兔严重冻伤模型在实验各时间点的血液学检测结果见表 1。WBC 水平在复温后即刻~3 d 持续升高,6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 时较冻伤前基线显著

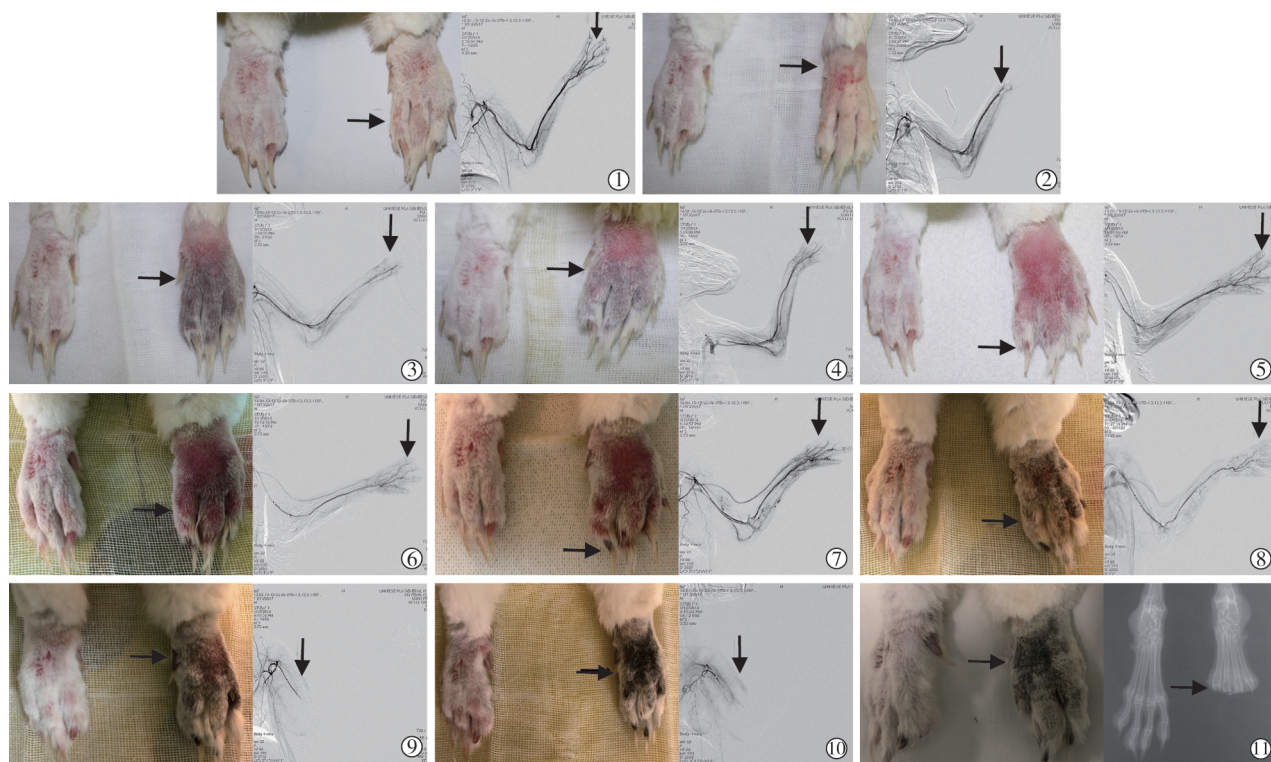




P 为指骨, MTP 为跖趾关节, MT 为跖骨

图 1 趾端及关节平面截趾分数定义图示

升高( $P<0.05$ );RBC、HGB、HCT 变化趋势基本保持一致,复温后即刻始升高,12 h 达高峰,RBC 水平于复温后 12 h 明显高于基线水平( $P<0.05$ ),HGB、HCT 水平于 6 h、12 h 明显高于基线水平( $P<0.05$ ),24 h 恢复基线水平,2 d、3 d 下降,RBC 水平于 3 d 明显低于基线水平( $P<0.05$ ),HGB、HCT 水平于 2 d、3 d 明显低于基线水平( $P<0.05$ );PLT 水平于复温后即刻~2 d 下降,24 h 达低谷,6 h、12 h、24 h、2 d 明显低于基线水平( $P<0.05$ ),3 d 恢复升高。复温后即刻、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 血清 ALT、AST、BUN、SCR 值较基线值差异无统计学意义( $P>0.05$ )。复温后即刻~3 d PT 水平持续下降,2 d、3 d 较基线显著降低( $P<0.05$ );APTT 水平于 6 h~3 d 持续降低,24 h、2 d、3 d 较基线显著下降( $P<0.05$ );FIB 水平于复温后即刻~3 d 持续升高,12 h、24 h、2 d、3 d 较基线显著升高( $P<0.05$ )。复温后即刻~12 h 血浆 6-keto-



①冻伤前,左前肢外观正常,无肿胀,皮肤颜色红润(箭头),血管造影示前肢血管主干及分支显影良好(箭头);②冻伤后复温前,第 4 趾骨粗隆远端为冻结状态(箭头),皮肤颜色苍白,血管造影示第 4 趾骨粗隆远端血管闭塞,血流完全中断(箭头);③复温后即刻,掌趾肿胀明显,皮肤粉红色及蓝紫色交界平面位于第 4 趾骨(箭头),越接近远端颜色越深,血管造影示第 4 趾骨血管部分血流恢复,中远端仍无血流(箭头);④复温后 6 h,掌趾肿胀明显,皮肤粉红色及蓝紫色交界平面向远端移动至第 3 趾骨近端(箭头),越接近远端颜色越深,血管造影示血管血流区面积增大至第 3 趾骨近端,中远端仍无血流(箭头);⑤复温后 12 h,掌趾肿胀仍明显,皮肤颜色转为粉红色(箭头),血管造影示血流大部分恢复,仅趾尖部充盈缺损(箭头),部分毛细血管显影;⑥复温后 24 h,掌趾肿胀仍明显,皮肤颜色加深,呈暗红色(箭头),血管造影示掌趾血管变细,指端无血流区增大,毛细血管显影减少(箭头);⑦复温后 2 d,掌趾肿胀仍明显,皮肤颜色进一步加深,呈紫蓝色(箭头);血管造影示趾端无血流区增大,静脉回流障碍(箭头);⑧复温后 3 d,掌趾肿胀程度减轻,皮肤颜色进一步加深,呈紫黑色(箭头),血管造影示趾端无血流区进一步增大,血管变细,静脉回流差(箭头);⑨复温后 4 d,掌趾肿胀程度减轻,皮肤颜色进一步加深,呈暗黑色(箭头),血管造影示肱动脉中上 1/3 处血流中断(箭头);⑩复温后 5 d,掌趾干瘪,皮肤颜色呈黑色(箭头),血管造影示肱动脉闭塞范围增大(箭头);⑪复温后 6 d,掌趾干瘪,皮肤颜色呈黑色(箭头),X 线片示第 3 趾骨近端平面截肢(箭头)

图 2 兔严重冻伤模型左前肢大体观察及血管造影变化



PGF1 $\alpha$  水平持续升高,12 h 达高峰,复温后即刻、6 h、12 h、24 h 较基线显著升高 ( $P<0.05$ ),24 h~3 d 开始下降,2 d、3 d 较基线显著下降 ( $P<0.05$ );复温后即刻~3 d 血浆 TXB2 水平持续升高,复温后即刻、6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 较基线显著升高 ( $P<0.05$ )。复温后即刻~3 d 血浆 MDA 水平持续升高,6 h、12 h、24 h、2 d、3 d 较基线显著升高 ( $P<0.05$ );复温后即刻~24 h 血浆 SOD 水平持续升高,24 h 达高峰,6 h、12 h、24 h 较基线显著升高 ( $P<0.05$ ),2 d、3 d 开始下降,较基线显著下降 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 组织病理学检查

兔严重冻伤模型冻伤前后左前肢血管病理学变化过程见图 3。

### 2.4 截肢率

兔严重冻伤模型受累趾端 160 个,最终截趾 132 个,截趾率为 82.5%,得分法结果为 (20.6 $\pm$ 3.8) 分。

## 3 讨论

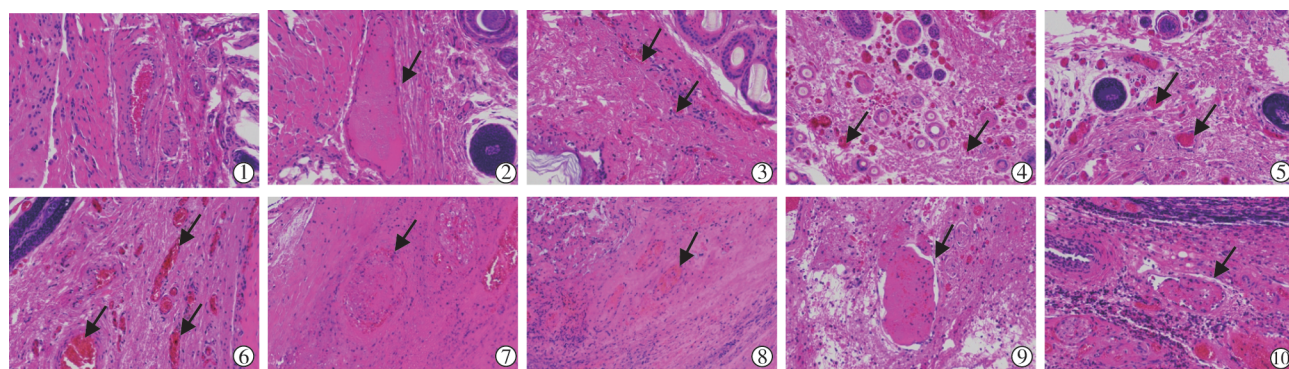
本研究采用乙醇浸泡冷冻法建立新西兰白兔严重冻伤模型,通过观察建模前后左前肢大体及血管造影变化发现,冻伤后微循环变化可大致分为两个阶段:血管开通阶段(复温后即刻~12 h)和血管闭塞阶段(复温后 12 h 至截肢)。在血管开通阶段,冻伤后肢端皮肤苍白,肢端血管闭塞,复温后即刻~12 h 皮肤颜色由紫蓝色转为粉红色,肿胀程度加重,肢端血流逐渐恢复;血管闭塞阶段,受累肢端

表 1 兔严重冻伤模型冻伤前后血液学检测结果

( $\bar{x}\pm s$ )

指 标	冻伤前	复温后					
		即刻	6 h	12 h	24 h	2 d	3 d
血常规							
WBC( $\times 10^9/L$ )	8.2 $\pm$ 0.7	9.3 $\pm$ 1.3	11.5 $\pm$ 0.8*	13.9 $\pm$ 1.1*	15.7 $\pm$ 0.9*	16.9 $\pm$ 1.5*	18.4 $\pm$ 1.1*
RBC( $\times 10^{12}/L$ )	5.7 $\pm$ 0.2	5.9 $\pm$ 0.1	6.1 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.2*	5.8 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.2*
HGB(g/L)	133.0 $\pm$ 9.0	142.0 $\pm$ 11.0	152.0 $\pm$ 15.0*	160.0 $\pm$ 13.0*	131.0 $\pm$ 14.0	123.0 $\pm$ 8.0*	118.0 $\pm$ 18.0*
HCT(%)	39.9 $\pm$ 1.3	41.1 $\pm$ 2.2	44.2 $\pm$ 1.8*	45.9 $\pm$ 3.1*	38.6 $\pm$ 2.8	35.1 $\pm$ 1.9*	31.9 $\pm$ 3.4*
PLT( $\times 10^9/L$ )	401.0 $\pm$ 26.0	389.0 $\pm$ 35.0	352.0 $\pm$ 49.0*	328.0 $\pm$ 51.0*	308.0 $\pm$ 47.0*	319.0 $\pm$ 34.0*	417.0 $\pm$ 53.0*
血生化							
ALT(U/L)	29.7 $\pm$ 2.6	31.3 $\pm$ 3.6	30.8 $\pm$ 2.8	29.4 $\pm$ 4.6	28.9 $\pm$ 3.3	32.3 $\pm$ 3.1	29.1 $\pm$ 4.6
AST(U/L)	31.1 $\pm$ 3.2	32.1 $\pm$ 2.9	33.5 $\pm$ 4.3	32.9 $\pm$ 3.5	33.7 $\pm$ 4.1	29.9 $\pm$ 5.2	31.1 $\pm$ 3.7
BUN(mg/dL)	21.4 $\pm$ 1.8	21.4 $\pm$ 2.1	20.3 $\pm$ 1.3	19.2 $\pm$ 3.1	18.5 $\pm$ 2.4	18.8 $\pm$ 2.7	19.6 $\pm$ 1.9
SCr( $\mu$ mol/L)	91.4 $\pm$ 7.7	92.2 $\pm$ 6.5	88.0 $\pm$ 8.6	87.3 $\pm$ 5.8	90.2 $\pm$ 8.6	89.8 $\pm$ 7.8	88.4 $\pm$ 7.9
凝血及纤溶活性							
PT(s)	12.9 $\pm$ 0.6	13.1 $\pm$ 0.8	12.6 $\pm$ 1.1	12.3 $\pm$ 0.8	12.1 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 0.9*	11.8 $\pm$ 0.9*
APTT(s)	76.0 $\pm$ 5.5	78.3 $\pm$ 6.2	75.5 $\pm$ 7.4	74.3 $\pm$ 5.8	72.6 $\pm$ 7.7*	70.6 $\pm$ 6.0*	71.7 $\pm$ 6.9*
FIB(g/L)	5.8 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.4*	7.2 $\pm$ 0.5*	7.3 $\pm$ 0.4*	7.3 $\pm$ 0.4*
6-keto-PGF1 $\alpha$ (pg/mL)	208.7 $\pm$ 66.7	357.3 $\pm$ 103.7*	521.1 $\pm$ 145.2*	739.5 $\pm$ 198.6*	398.2 $\pm$ 122.8*	156.6 $\pm$ 38.4*	103.7 $\pm$ 25.5*
TXB2(pg/mL)	285.4 $\pm$ 98.2	1 354.1 $\pm$ 278.2*	2 324.7 $\pm$ 315.7	2 465.4 $\pm$ 337.1*	2 075.8 $\pm$ 298.4*	2 577.0 $\pm$ 423.6*	2 517.2 $\pm$ 388.9
MDA(nmol/mL)	9.8 $\pm$ 1.9	11.0 $\pm$ 2.0	15.2 $\pm$ 2.9*	19.2 $\pm$ 3.5*	24.5 $\pm$ 2.9*	26.1 $\pm$ 3.6*	27.4 $\pm$ 4.1*
SOD(U/mg)	107.3 $\pm$ 15.8	112.4 $\pm$ 17.0	135.8 $\pm$ 19.8*	152.4 $\pm$ 22.1*	201.4 $\pm$ 35.9*	81.4 $\pm$ 15.9*	75.1 $\pm$ 13.4*

\* 与冻伤前相比,  $P<0.05$



①冻伤前血管未见异常;②冻伤后复温前静脉淤血,充满大量红色血浆及少量白细胞(箭头);③④⑤⑥复温后即刻、6 h、12 h、24 h 大量血管扩张淤血或充血,管腔内充满红细胞,未见明显血栓(箭头);⑦⑧复温后 2 d、3 d 血管内可见明显的混合血栓(箭头),主要构成成分为不溶性纤维蛋白、白细胞和红细胞;⑨⑩复温后 4 d、5 d 血管内可见混合血栓(箭头),周围组织伴有坏死,坏死细胞核固缩或碎裂,结构基本丧失

图 3 兔严重冻伤模型冻伤前后左前肢血管病理学变化过程

皮肤颜色由粉红色转变为紫蓝色至最后变为黑色, 肿胀程度减轻至干瘪, 肢端血管逐渐闭塞, 血流逐渐消失, 皮肤颜色紫蓝及暗黑区域可大致对应血管闭塞区。既往研究发现, 冷冻伤后微循环变化过程: 血流停滞、再通、再次恶化, 最终结局为无复流或好转<sup>[7-8]</sup>。本研究结果提示, 严重冻伤后血流变化规律与上述研究基本一致, 初步发现皮肤颜色与血管闭塞的大致对应关系。

本研究观察到, 兔严重冻伤模型复温后即刻~3 d WBC 水平持续升高, 复温后 RBC、HGB、HCT 变化趋势基本保持一致, RBC、HGB、HCT 水平于复温后即刻始升高, 12 h 达到高峰, 24 h 恢复冻伤前基线水平, 2 d、3 d 下降; PLT 水平于复温后即刻~2 d 持续下降, 24 h 到达低谷, 3 d 恢复升高。刘志洲等<sup>[9]</sup>报道, 严重冻伤后 WBC、RBC、HGB、HCT 变化趋势基本保持一致, 认为 WBC 持续升高主要由寒冷刺激作用及后期无菌性炎症引起, RBC 先期增加主要是由于先期组织缺氧引起的代偿性增加, 后期由于血液稀释及机械性溶血导致病理性减少, PLT 前期由于血栓形成大量消耗而减少, 后期由于机体代偿性增加。

有研究通过冻伤大鼠凝血系统研究发现, APTT、PT 于冻伤后缩短, FIB 升高<sup>[10]</sup>。本研究中 APTT、PT 水平于复温后持续下降, FIB 水平于复温后即刻~3 d 持续升高。冻伤后机体凝血系统发生紊乱, 机体处于高凝状态, FIB 复温后持续升高表明血栓形成。

严重冷冻伤可导致血管内皮损伤, 血管内皮细胞生物学功能之一是合成及释放具有强烈抑制 PLT 聚集及扩血管作用的 PGI2<sup>[11-12]</sup>。6-keto-PGF1 $\alpha$  是 PGI2 代谢产物, 因此血浆 6-keto-PGF1 $\alpha$  含量变化可反映 PGI2 变化。本研究中观察到兔严重冻伤模型血浆 6-keto-PGF1 $\alpha$  水平于复温后即刻~12 h 持续升高, 12 h 达高峰, 24 h~3 d 开始下降。TXA2 是一种由 PLT 合成及释放的具有强烈 PLT 聚集及缩血管作用的生物活性物质, TXB2 是其代谢产物。本研究中观察到血浆 TXB2 水平于复温后即刻~3 d 持续升高。Lorentzen 等<sup>[12]</sup>研究中也出现类似的冻伤后血浆 6-keto-PGF1 $\alpha$  和 TXB2 水平变化趋势, 认为前期血浆 6-keto-PGF1 $\alpha$  水平升高是由于内皮细胞受损、细胞膜破裂、大量 PGI2 释放入血引起, 后期由于内皮细胞坏死合成 PGI2 能力下降, 因此导致后期血浆 6-keto-PGF1 $\alpha$  水平大幅度下降; 血浆 TXB2 水平于复温后持续升高可能是由于冻伤后血管内皮损伤引起 PLT 黏附、聚集, PLT 进一步释放促进凝血的生物活性物质, 进而促进血栓形成。

机体在正常情况下存在氧化与抗氧平衡系统,

但本研究发现兔严重冻伤模型血浆反映脂质过氧化产物的 MDA 水平于复温后即刻~3 d 持续升高, 血浆清除氧自由基的 SOD 水平于复温后即刻~24 h 持续升高, 24 h 达高峰, 复温后 2 d、3 d 较基线显著下降。这表明冻伤后氧化-抗氧化平衡系统被打破, 氧化过程增强, 抗氧化能力减弱, 因此加重冻伤损害; 血浆 SOD 水平先升高后下降可能是由于前期血浆 MDA 增加引起的代偿性增加, 后期过氧化物大量堆积超过机体代偿能力, SOD 又被大量消耗, 进而出现 SOD 大幅下降至冻伤前。

总之, 本研究发现, 新西兰白兔严重冻伤模型左前肢血管于复温后即刻~24 h 大量扩张淤血或充血, 未见明显血栓, 复温后 2~5 d 可见混合血栓, 这与血管造影结果对应一致, 进一步证明严重冻伤复温后受累肢端血流停滞-再通-再次恶化-最终无复流或好转的变化过程。

#### [参 考 文 献]

- [1] 苗明三, 项丽玲, 白 明, 等. 冻伤动物模型制备规范(草案)[J]. 中国中药杂志, 2018, 43:410-414.
- [2] 崔亚玲, 刘小虎, 许子华, 等. 肝素钠肌醇烟酸酯乳膏对兔皮肤冻伤的治疗作用及刺激性研究[J]. 东南国防医药, 2021, 23: 449-454.
- [3] 王洪瑾, 冯艳萍, 张科伟, 等. 红景天苷对高原冻伤大鼠血管内皮细胞释放舒缩因子的影响研究[J]. 中国美容医学, 2021, 30:99-102.
- [4] 付金鑫, 张金龙, 王茂强. 经导管动脉溶栓治疗严重冻伤的研究进展[J]. 中华放射学杂志, 2018, 52:404-408.
- [5] Gao Y, Wang F, Zhou W, Pan S. Research progress in the pathogenic mechanisms and imaging of severe frostbite[J]. Eur J Radiol, 2021, 137:109605.
- [6] Endorf FW, Nygaard RM. Social determinants of poor outcomes following frostbite injury: a study of the National inpatient sample[J]. J Burn Care Res, 2021, 42: 1261-1265.
- [7] Isozaki S, Tanaka H, Horioka K, et al. Hypoxia-induced nuclear translocation of  $\beta$ -catenin in the healing process of frostbite[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2022, 1868: 166385.
- [8] Masters T, Omodt S, Gayken J, et al. Microangiography to monitor treatment outcomes following severe frostbite injury to the hands[J]. J Burn Care Res, 2018, 39: 162-167.
- [9] 刘志洲, 李 勇. 检验医学在冻伤研究和治疗中的应用[J]. 医学信息, 2013, 26:693.
- [10] 顾心奇, 周卢珊, 彭心怡, 等. 茄根醇提取物治疗 II 度冻伤模型大鼠实验研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2020, 30:627-630.
- [11] Zhou Y, Yan H, Li T, et al. New use of old medicine: Nifedipine acts on the TRP family and inflammatory proteins in the treatment of chilblain[J]. Burns, 2022, 48: 372-380.
- [12] Lorentzen AK, Davis C, Penninga L. Interventions for frostbite injuries[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 12: CD012980.

(收稿日期:2022-05-10)

(本文编辑:边 佑)