

• 专 论 Special comment •

慢性肢体威胁性缺血动物模型研究进展

王淦爽, 纪东华

【摘要】 构建慢性肢体威胁性缺血(chronic limb-threatening ischemia, CLTI)动物模型旨在研究 CLTI 病程中病理生理变化,寻找更有效的治疗手段。近年随着临床治疗进展,动物实验模型研究得以进一步完善和发展。目前广泛应用的 CLTI 动物模型包括啮齿动物(如大鼠和小鼠)和大型动物(如兔和猪)。建立慢性缺血动物模型的方法包括结扎切除法、动脉电凝法、Ameroid 环缩器以及腔内方法。该文就 CLTI 动物模型研究领域近年来主要进展做一综述,以便更清晰地了解不同动物和实验方法的优缺点,从而完善动物模型,为 CLTI 患者提供更好的治疗方案。

【关键词】 下肢动脉;慢性肢体威胁性缺血;动物模型

中图分类号:R543.5 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2025)-003-0234-04

Research progress in the establishment of animal models with chronic limb-threatening ischemia WANG Longshuang, JI Donghua. Department of Interventional Therapy, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province 116011, China

Corresponding author: JI Donghua, E-mail: nickji@126.com

【Abstract】 The animal models with chronic limb-threatening ischemia (CLTI) can be used to study the pathophysiological changes of CLTI so as to formulate more effective treatment strategies. In recent years, with the progress of clinical treatment techniques, studies on animal experimental models have been further improved and developed. Currently, the widely used animal models of CLTI include rodents (such as rats and mice) and large animals (such as rabbits and pigs). The methods of establishing CLTI animal model include ligation and excision, arterial electrocoagulation, Ameroid constrictor, and endovascular techniques. This review summarizes the recent major advances in the establishment of CLTI animal models, so as to enable the relevant workers to obtain a clearer understanding of the advantages and disadvantages of different animals and experimental methods, to improve the animal model, and to provide better treatment options for CLTI patients.

【Key words】 lower limb artery; chronic limb-threatening ischemia; animal model

慢性肢体威胁性缺血(chronic limb-threatening ischemia, CLTI)为外周动脉疾病终末期表现,以静息痛、皮肤溃疡和坏疽为主要特征,严重影响患者生活质量,甚至生存率。其病变特征为多支膝下动脉广泛动脉粥样硬化、管腔长段或多节段狭窄和闭塞,同时可能累及髂动脉、股腘动脉。由于 CLTI 病理生理过程慢性且复杂,在活体患者研究其病理生理机制具有挑战性。若有适用的动物模型,甚至能模拟缺血创面愈合过程,将有助于深入探讨 CLTI 临床发展机制,并引入新的治疗理念。此前已有多个研究中心使用动物模型研究下肢动脉缺血机制,但

目前多数动物模型针对的是急性肢体缺血和缺血-再灌注研究。大多数实验动物会迅速建立有效的侧支循环、动脉灌注在早期迅速正常化,不能充分模拟人类 CLTI 病理生理过程,因此急需能够模拟人类 CLTI 的动物模型。本文就 CLTI 动物模型研究领域近年来主要进展做一综述。

1 实验动物选择

目前下肢动脉慢性缺血动物模型中应用最多的是小鼠^[1-9],其次为家兔^[10-17]、大鼠^[18-22]、成年猪^[23-27]、幼年猪^[28]。

1.1 啮齿动物(老鼠)

啮齿动物作为最常用的下肢动脉慢性缺血动物模型,具有诸多优势:易于获取、操作简便、成本低廉、适用于大规模样本研究、数据易于统计、基因组序列高度同源于人类、可通过饮食管理或基因改造模拟人类疾病状态等。然而,老鼠肢体缺血引发的组织缺血坏死程度与品系相关,例如 DBA/1 J 小鼠更易发生组织坏死, BALB/c 和 ApoE^{-/-} 小鼠侧支循环较差。此外,由于老鼠体型较小,解剖结构、肌肉体积不同于人类,且自然抵抗动脉粥样硬化等特征^[4,29-30],作为下肢动脉慢性缺血模型不能完全模拟人类病理(动脉硬化及高血糖等)状态下 CLTI 病程。

1.2 家兔

家兔体型介于啮齿动物和较大动物之间,易采集血样,易获取细胞和组织,寿命比啮齿类动物长。但家兔缺点为成本较啮齿类动物高,且需要特殊饲养环境^[14,31]。

1.3 猪

猪的解剖和生理学与人类相似度较高,其胶原蛋白生化结构、皮肤再生周期(约 30 d)以及对各种生长因子的反应与人类相似。此外,猪体型较大,血管等解剖结构更易观察,无需借助显微镜。然而,使用猪作为动物模型可能存在一些挑战。首先是饲养所需经济和空间成本较高,其次猪基因改造难度较大,在试验过程中麻醉和转运相对不便,这使得难以进行大规模样本实验,进而导致统计数据不足。此外,猪皮肤血管相对较少,其皮肤具有腋泉汗腺而非汗腺,并且侧支循环发展较为迅速^[25,32]。

2 慢性缺血模型构建方法

2.1 结扎切除法

结扎切除法包括:①股动脉全切除+全侧支剥离^[7,29,33];②单侧髂外动脉结扎+双侧髂内动脉结扎^[24];③单侧髂总动脉结扎+髂外及股动脉切除+股深及股浅动脉结扎^[23];④序贯动脉结扎法^[9,22];⑤髂外动脉结扎+股动脉全切除法^[13];⑥股动脉及静脉全切除+全侧支静脉剥离^[1]。

2.2 动脉电凝法

动脉电凝法即双次动脉电凝^[7,33]。

2.3 Ameroid 环缩器

Ameroid 环缩器由外部金属套管和内部吸湿材料(主要是酪蛋白)组成,它通过吸收周围组织水分

导致血管逐渐狭窄、闭塞^[2-3,20,33]。

2.4 腔内方法

腔内方法包括血管支架结合血管栓塞、射频消融、血管内弹簧圈栓塞法^[3,11,16-18,21,25-28,34]。

3 各种动物模型优缺点

3.1 啮齿动物(老鼠)

老鼠 CLTI 模型可以通过结扎切除法、动脉电凝法以及 Ameroid 环缩器构建(表 1)。Lejay 等^[9]在研究中采用序贯动脉结扎法对 28 只小鼠进行髂动脉和股动脉依次结扎,使得缺血持续时间长达 30 d。Shimatani 等^[1]对 25 只小鼠使用股动脉及静脉全切除+所有侧支静脉剥离法构建 CLTI 模型,术后缺血持续时间为 63 d。Hellingman 等^[7]对 27 只小鼠进行单次动脉电凝和双次动脉电凝对比实验,结果显示单次动脉电凝后血流在 7 d 内完全恢复,而双次动脉电凝则延迟了血流恢复,缺血持续时间为 28 d。Tang 等^[20]对 42 只大鼠使用 Ameroid 环缩器,发现真皮血流恢复速度较慢,但无肌肉坏死、纤维化或炎症迹象,缺血持续时间可达 40 d。

3.2 家兔

家兔 CLTI 模型建立方法包括结扎切除法和腔内方法(表 2)。Hong 等^[14]对 8 只兔子采用股动脉全切除法构建 CLTI 模型,缺血持续时间可达 6 周,其中 5 只兔子被观察到足部缺血变化,然而术后第 2 周观察到侧支血管生成。因此可使用股动脉全切除+所有侧支剥离法^[7,29,55]进行改进,以延长缺血持续时间。有研究对 28 只兔子使用髂外动脉结扎和股动脉全切除法成功构建 CLTI 模型,缺血持续时间可达 90 d,并观察到腓肠肌缺血性萎缩、纤维化^[15]。Baik 等^[16]通过股浅动脉射频消融术对 9 只兔子构建肢体缺血模型,缺血持续时间可达 30 d。Liddell 等^[17]采用血管内弹簧圈栓塞股浅动脉方法对 17 只兔子构建肢体缺血模型,缺血持续时间可达 28 d。

3.3 猪

猪 CLTI 模型可使用结扎切除法及腔内方法构建(表 3)。常见方法为单侧髂外动脉结扎+双侧髂内动脉结扎。Deppen 等^[24]对 13 头猪采用此法成功构建 CLTI 模型,缺血持续时间可达 6 周,与 CLTI 病程相符;术后 6 周可观察到动脉收缩压下降,年龄较大猪群出现了类似人类间歇性跛行的步态功能障碍;术后运动诱导的灌注缺陷(注射腺苷后)观察显示,其特征类似人类外周动脉疾病所见。

表 1 老鼠 CLTI 模型特征

实验方法	具体方法	缺血时间(d)	优点	缺点
结扎切除法	序贯动脉结扎法 ^[9,22]	30	操作简单,缺血过程类似逐渐闭塞;术后 4 周水肿、炎症、坏死发生率,模拟病程与 CLTI 相似,适合 CLTI 研究	存在急性后肢缺血风险;小型哺乳动物存在肢体自截风险
	股动脉及静脉全切除 + 全侧支静脉剥离 ^[1]	63	血管生成受损;适合 CLTI 研究	操作复杂
动脉电凝法	双次动脉电凝 ^[7,33]	28	操作简单;适用于研究小腿肌肉血管生成;中度缺血;适合 CLTI 研究	存在急性后肢缺血风险
Ameroid 环缩器 ^[2-3,20,33]		40	渐进性动脉闭塞;肢体运动性能下降、自主活动减少;炎症和单纯压力依赖的基因表达较低;肌肉坏死较少;血流恢复较慢,可长达 4~5 周;适合 CLTI 研究	由于 Ameroid 环缩器深度和形状有所不同,可能导致动脉闭塞速度和肢体缺血严重程度不一致

表 2 家兔 CLTI 模型特征

实验方法	具体方法	缺血时间(d)	优点	缺点
结扎切除法	股动脉全切除法 ^[7,14,29,33]	42	操作简单;适用于研究小腿肌肉血管生成;适合 CLTI 研究	存在急性后肢缺血风险
	髂外动脉结扎和股动脉全切除法 ^[13]	90	操作简单;适合 CLTI 研究	存在急性后肢缺血风险
腔内方法	股浅动脉射频消融术 ^[16]	30	微创;保护周围组织免受损害;组织缺血时间长;伤口愈合时缺乏与缺血相关的侧支血管发育	存在急性后肢非进行性缺血风险;操作复杂
	血管内弹簧圈栓塞股浅动脉法 ^[17]	28	微创;保护周围组织免受损害;组织缺血时间长;伤口愈合时缺乏与缺血相关的侧支血管发育	存在急性后肢非进行性缺血风险;操作复杂

表 3 猪 CLTI 模型特征

实验方法	具体方法	缺血时间(d)	优点	缺点
结扎切除法	单侧髂外动脉结扎 + 双侧髂内动脉结扎 ^[24]	42	操作简单;缺血持续时间达 42 d;适合 CLTI 研究	存在急性后肢缺血风险;目前使用这种方法的研究较少
	单侧髂总动脉结扎 + 髂外及股动脉切除 + 股深及股浅动脉结扎 ^[25]	28	操作简单;缺血持续时间达 28 d;适合 CLTI 研究	存在急性后肢缺血风险;目前使用这种方法的研究较少
腔内方法	血管支架联合血管栓塞法 ^[25]	42	微创;保护周围组织免受损害;组织缺血时间长;伤口愈合时缺乏与缺血相关的侧支血管发育	存在急性后肢非进行性缺血风险;操作复杂

另一常见方法为单侧髂总动脉结扎 + 髂外及股动脉切除 + 股深及股浅动脉结扎。Samatoshenkov 等^[23]使用此法对 4 头猪构建 CLTI 模型,缺血持续时间达 28 d。Long 等^[25]使用血管支架联合血管栓塞法构建 8 头 Ossabaw 猪和 8 头 Yorkshire 猪 CLTI 模型,术后缺血持续时间达 6 周;Ossabaw 猪动脉生成反应与 Yorkshire 猪对比减弱。综上,结扎切除法和腔内方法皆适用于构建猪 CLTI 模型,但从操作复杂程度上对比,腔内方法要优于结扎切除法。

4 小结与展望

对于建立 CLTI 动物模型,结扎切除法更适用于老鼠和家兔,腔内方法更适用于猪。因此,可根据选取动物类型选择不同的建模方法。但总体上结扎切除法为最常用方法,其次为腔内方法。尽管 CLTI 动物模型研究已取得显著进展,但仍存在一些局限性,如动物模型虽能模拟一些疾病的病理生

理过程,但与人体各种病因所致 CLTI 病理生理过程仍存在差距,这使对 CLTI 的全面理解受到限制。因此,未来应致力于在健康动物上模拟糖尿病、高脂血症等人类疾病所致 CLTI 病理生理过程,以便进一步获得更接近糖尿病、高脂血症等病因所致动物损伤模型,从而更好地探讨疾病发生发展机制,并寻求能干预或改变病程的临床治疗手段。

[参 考 文 献]

[1] Shimatani K, Sato H, Saito A, et al. A novel model of chronic limb ischemia to therapeutically evaluate the angiogenic effects of drug candidates[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2021, 320: H1124-H1135.

[2] Krishna SM, Omer SM, Li J, et al. Development of a two-stage limb ischemia model to better simulate human peripheral artery disease[J]. Sci Rep, 2020, 10: 3449.

[3] Han SS, Jin Z, Lee BS, et al. Reproducible hindlimb ischemia model based on photochemically induced thrombosis to evaluate angiogenic effects [J]. Microvasc Res, 2019,

- 126;103912.
- [4] Parikh PP, Castilla D, Lassance-Soares RM, et al. A reliable mouse model of hind limb gangrene[J]. *Ann Vasc Surg*, 2018, 48;222-232.
 - [5] Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, et al. Murine model of hindlimb ischemia[J]. *J Vis Exp*, 2009;1035.
 - [6] Goto T, Fukuyama N, Aki A, et al. Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse[J]. *Tokai J Exp Clin Med*, 2006, 31;128-132.
 - [7] Hellingman AA, Bastiaansen AJNM, de Vries MR, et al. Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010, 40;796-803.
 - [8] Padgett ME, McCord TJ, McClung JM, et al. Methods for acute and subacute murine hindlimb ischemia[J]. *J Vis Exp*, 2016;54166.
 - [9] Lejay A, Choquet P, Thaveau F, et al. A new murine model of sustainable and durable chronic critical limb ischemia fairly mimicking human pathology[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2015, 49;205-212.
 - [10] 王征宇, 相建峰, 彭志清, 等. 血管介入法构建兔对比剂急性肾损伤模型的氧化应激和病理学改变[J]. *介入放射学杂志*, 2021, 30;368-373.
 - [11] Del GC, Ifergan G, Goudot G, et al. Evaluation of a new model of hind limb ischemia in rabbits[J]. *J Vasc Surg*, 2018, 68; 849-857.
 - [12] Hendricks DL, Pevac WC, Shestak KC, et al. A model of persistent partial hindlimb ischemia in the rabbit[J]. *J Surg Res*, 1990, 49;453-457.
 - [13] Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit[J]. *J Invest Surg*, 1994, 7;49-60.
 - [14] Hong JH, Bahk YW, Suh JS, et al. An experimental model of ischemia in rabbit hindlimb[J]. *J Korean Med Sci*, 2001, 16; 630-635.
 - [15] Sligar AD, Howe G, Goldman J, et al. Preclinical model of hind limb ischemia in diabetic rabbits[J]. *J Vis Exp*, 2019.
 - [16] Baik HW, Kwak BK, Shim HJ, et al. A new ischemic model using a radiofrequency wire electrode in a rabbit hindlimb[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2008, 31;790-798.
 - [17] Liddell RP, Patel TH, Weiss CR, et al. Endovascular model of rabbit hindlimb ischemia: a platform to evaluate therapeutic angiogenesis[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2005, 16;991-998.
 - [18] Shin CI, Kim HC, Song YS, et al. Rat model of hindlimb ischemia induced via embolization with polyvinyl alcohol and N-butyl cyanoacrylate[J]. *Korean J Radiol*, 2013, 14;923-930.
 - [19] Yang Z, von Ballmoos MW, Diehm N, et al. Call for a reference model of chronic hind limb ischemia to investigate therapeutic angiogenesis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 51;268-274.
 - [20] Tang GL, Chang DS, Sarkar R, et al. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia[J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41;312-320.
 - [21] Zhuang ZW, Shi J, Rhodes JM, et al. Challenging the surgical rodent hindlimb ischemia model with the miniinterventional technique[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2011, 22;1437-1446.
 - [22] Lundberg G, Luo F, Blegen H, et al. A rat model for severe limb ischemia at rest[J]. *Eur Surg Res*, 2003, 35;430-438.
 - [23] Samatoshenkov I, Krasivskyi I, Djordjevic I, et al. New experimental model of hind limb ischemia in pot-bellied pigs [J]. *Microvasc Res*, 2023, 145;104425.
 - [24] Deppen JN, Ginn SC, Kim NH, et al. A swine hind limb ischemia model useful for testing peripheral artery disease therapeutics [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14; 1186-1197.
 - [25] Long CA, Timmins LH, Koutakis P, et al. An endovascular model of ischemic myopathy from peripheral arterial disease [J]. *J Vasc Surg*, 2017, 66;891-901.
 - [26] Nikol S, Armeanu S, Engelmann MG, et al. Evaluation of endovascular techniques for creating a porcine femoral artery occlusion model[J]. *J Endovasc Ther*, 2001, 8;401-407.
 - [27] Engelmann MG, Shimizu MSI, Pelisek J, et al. Comparison of surgical versus endovascular occlusion models in pig femoral arteries[J]. *J Endovasc Ther*, 2004, 11;71-79.
 - [28] Johnson LL, Johnson J, Ali Z, et al. VEGF receptor targeted imaging of angiogenic response to limb ischemia in diabetic *vs.* non-diabetic Yucatan minipigs [J]. *EJNMMI Res*, 2020, 10;48.
 - [29] Krishna SM, Omer SM, Golledge J. Evaluation of the clinical relevance and limitations of current pre-clinical models of peripheral artery disease [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130; 127-150.
 - [30] McCafferty K, Forbes S, Thiemermann C, et al. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans; the role of comorbidities[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7;1321-1333.
 - [31] Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf HM, et al. The wide utility of rabbits as models of human diseases[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50;1-10.
 - [32] Ribitsch I, Baptista PM, Lange-Consiglio A, et al. Large animal models in regenerative medicine and tissue engineering; to do or not to do[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8;972.
 - [33] Aref Z, de Vries MR, Quax PHA. Variations in surgical procedures for inducing hind limb ischemia in mice and the impact of these variations on neovascularization assessment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20;3704.
 - [34] Margovsky A, Bobryshev YV, Chambers AJ, et al. Small vessel ischaemia induced by microbead embolization in the sheep hind limb[J]. *Aust N Z J Surg*, 1998, 68;592-598.

(收稿日期: 2024-05-07)

(本文编辑: 谷 珂)