

# 新型小鼠跨区供血耳瓣模型的构建

梁成<sup>1</sup>, 庄跃宏<sup>2</sup>, 郑和平<sup>1</sup>, 吴剑威<sup>1</sup>, 马雷<sup>1</sup>, 谢志平<sup>1</sup>

(1. 福建医科大学福总临床医学院(南京军区福州总医院)比较医学科,福州 350025;  
2. 福建医科大学人体解剖与组织胚胎学系,福州 350108)

**【摘要】** 目的 建立一个实时活体观察血管形态学变化小鼠跨区供血耳瓣模型。方法 体重25~30 g清洁级ICR小鼠30只,双耳脱毛后,观察其血管分布情况。小鼠麻醉后,用眼科剪从尾侧向头侧剪断鼠耳底部尾侧2/3,保留头侧1/3,形成耳前血管蒂跨三个血管体、二个choke区的耳瓣模型。将小鼠侧卧置于二维图像采集系统的动物承载台上,调节电视显微镜物镜并固定为25倍,设置步进参数,“弓”型路线渐次、局部采集造模后0,1,2,3,5,7,10,14,21,30 d的时间点图像,合成鼠耳全景图。重点观察皮瓣的坏死率、皮瓣内choke血管的形态学变化。**结果** ICR小鼠耳有三个恒定的血管体来供养,从内到外依次为头侧血管体、中间血管体及尾侧血管体。术后5 d,耳瓣坏死面积趋于稳定,坏死率为(15±7)%。内侧血管体与中间血管体之间的choke动静脉的管径出现快速扩增,两者都在第10天左右达最大,choke静脉管径最高峰可达到原来的(3.9±0.5)倍,choke动脉管径最高峰可达到原来的(3.5±0.7)倍。10 d后,choke静脉管径开始减小,21 d后逐渐平稳,而choke动脉管径于术后10 d左右开始平稳,之后无明显减小。**结论** ①跨区皮瓣切取后,静脉扩张是被动扩张,而动脉扩张是主动增值;②跨区皮瓣切取后血流动力学供区与潜力供区之间的choke区参与扩张的choke血管数量及扩张度均小于解剖供区与血流动力学供区之间的choke血管;③小鼠耳瓣模型为研究血管扩张机制及遴选促皮瓣存活药物的理想动物模型。

**【关键词】** 鼠耳;跨区皮瓣;choke血管;坏死

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014)07-0025-05  
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.007.005

## Construction of a cross-territory flap on the mouse's ear

LIANG Cheng<sup>1</sup>, ZHUANG Yue-hong<sup>2</sup>, ZHENG He-ping<sup>1</sup>, WU Jian-hui<sup>1</sup>, MA Lei<sup>1</sup>, XIE Zhi-ping<sup>1</sup>

(1. Department of comparative medicine, Fujian Medical University Affiliated Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, PLA, Fuzhou 350025, China; 2. Department of human anatomy and history and embryo, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

**【Abstract】 Objective** To establish a mouse's cross-territory ear flap that enables chronic, in-vivo observation of the change of vascular morphology. **Methods** 30 ICR mice, weighing 25~40 g, were used for this study. Commercial depilatory cream was used to first remove the hair of the mice, after which the vascular pattern in the ears was investigated. According to the observation of the vascular pattern in the mouse's ear, the eye scissors were used to sever the outer 2/3 of the base of the ear, in which process a ear's flap based on a vascular pedicle but crossed three vascular territories was created. After the creation of the flap, the mice were placed on an automatic controlled movable machine with the ear's flaps spread over a customized Plexiglas. Then the flaps were photographed under the stereoscope (×25) at the following time points: 1,2,3,5,7,10,14,21,30 d. the necrosis of the flap, and the morphological change of the vessels within the

**【基金项目】** 福建省自然科学基金资助项目(2012J01410)。

**【作者简介】** 梁成(1989-),男,硕士生,E-mail: 593441085@qq.com。

**【通讯作者】** 郑和平(1962-),男,教授,主任医师,硕士生导师,研究方向:比较医学,E-mail: zhpfz@163.com。

flap were analyzed. **Results** The ICR mouse's ear was supplied three angiosomes, which were respectively named as the cephalic, median and caudal angiosomes from inside out. Five days after the flap's creating, necrotic rate of  $(15 \pm 7)\%$  was developed. The choke vessels between the medial and median angiosomes expanded rapidly in diameter, reaching the plateau 10d after flap creation, resulting the dilated choke veins and arteries at their peak being  $3.9 \pm 0.5$  and  $3.5 \pm 0.7$ , respectively, than their initial sizes. The diameter of the choke veins began to shrink at approximately 10d, stabilizing after 21d. The diameter of the choke arteries plateaued and stabilized at around 10d. **Conclusion** ①after harvest of extended flap, the dilation of veins seemed to passive, whereas the dilation of arteries seemed to active; ② the number of the choke vessels between the dynamic and potential territories that are involved in dilation and extent of the dilation are much smaller than that of the choke vessels between the anatomic and dynamic territories; ③ the mouse's ear flap is an excellent model of further study of mechanism underlining the dilation of choke vessels and for the screening of vasoactive drugs that augment the survival of the large flap.

**【Key words】** Mouse's ear; Extended flap; Choke vessels; Necrosis

肿瘤切除、烧伤,特别是交通伤等引起的较大面积软组织缺损,面积往往超过单个轴形皮瓣的覆盖能力,临床医生根据缺损修复的需要,将皮瓣扩大切取,超出解剖供区的限制,甚至到达远邻的潜力供区,这就是所谓的跨区皮瓣<sup>[1]</sup>。跨区皮瓣切取后,皮瓣需跨过血管体之间的吻合血管,也就是 Taylor<sup>[2]</sup>认为的 choke 血管向皮瓣远端供血。生理状态下吻合血管管径极其细小,是跨区皮瓣切取后血流以足够的速率与量通往远端的最大障碍,因此皮瓣能完全存活的关键在于不同区域间的吻合血管是否都能扩张成为真性吻合。因此,对跨区皮瓣血管体间的 choke 血管在皮瓣切取后的生物学变化进行深入研究,对提高跨区皮瓣的存活率有重要的意义。目前,几种研究 choke 血管的动物模型,均存在较明显的缺陷<sup>[3-5]</sup>。本研究在观察小鼠耳的血管分布情况后,在小鼠耳上切取跨三区皮瓣,不仅成功观察到吻合区血管的形态变化过程,也得到一稳定的皮瓣坏死模型,为以后进一步研究血管扩张机制及遴选促皮瓣存活药物的理想动物模型奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 可编程数控二维精密图像采集系统设计

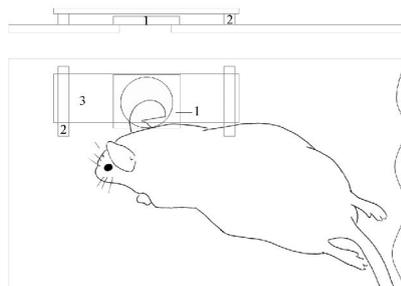
可编程数控二维精密图像采集系统(图 1)。包括:十字滑台、数控两轴运动控制器、步进电机驱动器、步进电机、电源、动物承载台、体视显微镜、数码相机。①十字滑台:精度 0.01 mm;②控制器:可编辑程序;③动物承载台(图 2):载物台的中间镂一直径为 2 cm 的圆孔,主要用来增加透光性。圆孔上粘贴一块  $(3 \times 2 \times 0.4)$  cm 的小有机玻璃板,主要用于放置鼠耳。在小有机玻璃板的两侧粘两小有机玻璃条,比中间小有机玻璃板高 1 mm 便可,用于放置

载玻片压平鼠耳,但又不至于阻断鼠耳血供;④体视显微镜(moticam 1300);⑤数码相机(OLYMPUS SZ-16)。



图 1 可编程数控二维精密图像采集系统

Fig. 1 Precise two-dimensional Image-collecting system that is programmable and digitally controlled



注:1. 置耳台;2. 玻片台;3. 玻片。

图 2 动物承载台

Note: 1, place table of ear; 2, table for hold slides; 3, slide.

Fig. 2 Animal holding table

由于滑台的高度与轴长限制,与显微镜物距无法匹配,决定了动物承载台和滑台不能直接组合置于物镜下。因此,必须要做一个足够面积的有机玻璃托板,将动物承载台连接并间接固定在滑台上,通过滑台的往复运动,带动动物承载台运动,从而巧妙地实现鼠耳按“弓”型路线准确步进。

## 1.2 实验动物

30 只清洁级 ICR 小鼠, 雄性, 体重 25 ~ 30 g, 鼠耳完整无皮肤病变或外伤, 由福建医科大学动物中心【SCXK(闽)2012-0001】提供; 饲养于南京军区福州总医院比较医学科屏障环境【SYXK(闽)2013-0004】, 环境温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度 40% ~ 65%。

## 1.3 模型建立

用戊巴比妥钠(45 mg/kg)将小鼠麻醉成功后, 商业人用脱毛膏鼠耳脱毛并用流水冲净, 体视显微镜下( $\times 25$ )观察鼠耳的血管分布情况。根据观察结果, 用眼科剪从尾侧向头侧剪断小鼠耳基底部尾侧 2/3, 保留头侧 1/3, 形成以耳前动静脉为蒂内含三个血管体、二个 choke 区的跨区供血耳瓣。

## 1.4 图像采集

小鼠麻醉成功后, 侧卧置于图像采集系统的动物承载台上, 鼠耳盖上载玻片, 尽量展平鼠耳。调节体视显微镜物镜并固定为 25 倍; 设置步进参数, 使动物承载台在 X、Y 轴上步进距离 0.25 cm/次, 间隔时间为 5 s, 行进路线为“弓”型。动物承载台每移动一次采集一次图像, 每只小鼠整耳大概需采集 10 张图像。图像采集时间点为耳瓣切取后 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 21, 30 d。

## 1.5 数据测量及统计分析

用 Photoshop CS5/photomerge 功能自动合成每只鼠耳的全景图, 分别测量: ①耳瓣总面积与坏死部分面积; ②不同时间点耳瓣血管体间的 choke 动、静脉的管径变化。用 Microsoft Excel 2010 统计分析: ①耳瓣坏死率; ②不同时间点耳瓣血管体间 choke 动、静脉的管径扩张值。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, choke 血管扩张值绘制数据点折线图。

## 2 结果

### 2.1 鼠耳的血管分布

鼠耳面积约为  $1.5 \times 1.3$  cm, 厚度约为 0.3 mm, 透光度好。在体视显微镜下清晰可见 3 条血管束: 尾侧血管束、中间血管束及头侧血管束。每个血管束均有一条动脉与相伴行的静脉, 动脉直径为 0.2 ~ 0.5 mm, 静脉直径为 0.9 ~ 2.1 mm。头侧血管束进入鼠耳基底部后, 沿着鼠耳前侧缘走行。尾侧血管束在整个走行过程中分支较少, 末端与中间血管体的内侧分支吻合。中间血管体在进入基底部后往往分为三大支, 中间支垂直向上走行, 内侧支往内侧走行, 与头侧血管体吻合; 尾侧血管体在进入

基底部前往往分为两支, 两支一并进入耳体, 与中间血管体外侧分支往往有细小吻合。头侧血管体与尾侧血管体分别约供应 1/4 的耳体, 中间血管体约供应 1/2 的耳体(图 3A)。

### 2.2 耳瓣内血管管径变化及坏死面积

术后即刻, 耳瓣透光性最佳, 动静脉均清晰可见。术后 24 h, 便可以观察到第三血管体所供应的区域出现部分坏死的征象: 高倍镜( $\times 100$ )下可见血管内无血液流动, 组织脱水, 血管周围出现众多红斑, 为溢出的红细胞。术后 4 d, 耳瓣水肿较为厉害, 致使其透光性有所降低, 在显微镜下耳瓣整体较为暗淡, 静脉依然较为清晰, 但动脉观察则有点困难。术后 5 d, 耳瓣坏死面积趋于稳定, 坏死率为  $(15 \pm 7)\%$ (彩插 5 图 3B)。耳瓣术后, 头侧血管体与中间血管体之间的 choke 动、静脉的管径出现快速扩增, 两者都在第 10 天左右达到最大, choke 静脉管径最高峰可到达原来的  $(3.9 \pm 0.5)$  倍, choke 动脉管径最高峰可达到原来的  $(3.5 \pm 0.7)$  倍。10 d 后, choke 静脉管径开始减小, 21 d 后逐渐平稳, 而 choke 动脉管径于术后 10 d 左右开始平稳, 之后无明显减小(图 4)。在中间血管体与尾侧血管体之间扩张的 choke 血管数量及幅度多小于第一 choke 区, 在少数出现较明显扩张的耳瓣中, 第三血管体所支配的区域坏死率出现明显降低(彩插 5 图 5)。耳瓣切取后 30 d 内, 很多小鼠鼠耳上可以观察到第二血管体内的静脉除了与头侧血管体直接相连的内侧分支管径增加后处于一个较平稳的状态, 其它两个分支内的静脉在耳瓣切取后 4 d 左右, 由于静脉回流障碍出现的静脉被动扩张, 而后期耳瓣皮瓣血供重构稳定后, 扩张的静脉明显萎缩、退化, 管径比耳瓣切取前减小。皮瓣会出现一个明显的静脉回流轴向, 尾侧血管体内的未坏死部分的静脉在耳瓣基底部通过细小的静脉连到第二血管体的基部, 后通过第二血管体的内侧分支直接到内侧血管体。

## 3 讨论

### 3.1 跨区供血皮瓣的概念及本实验结果对其存活机制的提示

人体皮肤的每一支动脉均有一个明确的供血范围, 即解剖学供区。每一个解剖学供区与其周围相邻动脉之间均有丰富的吻合, Taylor 等<sup>[2]</sup>将这种吻合称为 choke 血管。一侧血管被切断或阻断时, 其管道内血压下降, 此时, 解剖学供区血管内的血

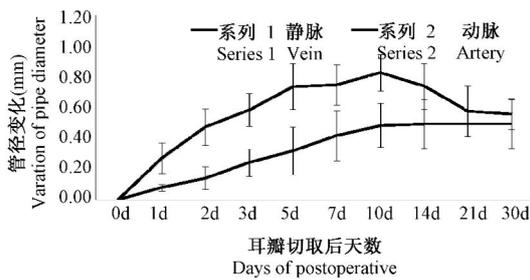


图4 choke 血管管径变化趋势

Fig.4 choke vessels diameter change trend

流就会跨越原来的吻合部位 (choke vessels) 向远端供血。这种紧邻解剖学供区的扩张部分被称之为血流动力学供区 (dynamic territory)。在跨越动力学供区的基础上,若再继续向远邻的供区延伸,则称其为潜力供区 (potential territory)。这表明:可将皮瓣从解剖学供区向紧邻的动力学供区扩张切取,若再继续向远邻的潜力供区延伸,则可得到更大的皮瓣<sup>[1]</sup>,这就是所谓的跨区供血皮瓣。临床经验及动物实验提示跨区皮瓣切取后,动力供区往往能够顺利存活,而皮瓣坏死最容易出现在动力供区与潜力供区之间 choke 区及其远端潜力供区部分,其原因有待深入研究<sup>[7]</sup>。

在小鼠耳瓣模型中,可以观察到耳瓣切取后,头侧血管体及中间血管体之间的 choke 动静脉迅速扩张,高峰期 choke 静脉可达原来管径的  $3.9 \pm 0.5$  倍,choke 动脉可达原来管径的  $3.5 \pm 0.7$  倍,根据 Hagen-Poiseuille 流体方程  $R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$ ,  $F = \frac{\pi \Delta P r^4}{8\eta L}$ , choke 动、静脉内血管的阻力在高峰期都分别减小到原来的约  $1/231$  及  $1/150$ ,而血流量则约提高到了原来的  $231$  及  $150$  倍,阻力减少对于静脉回流的意义更大,因为静脉压力低,阻力的降低能大大促进静脉回流。之前血管体间逐渐减小管径的 choke 吻合逐渐变成了真性吻合,将解剖供区与动力供区融合成一个大的解剖学供区,动力供区中的随意血供也变成了轴型血供,血供得到保证。我们观察到中间血管体与尾侧血管体之间,也就是第二 choke 区的扩张 choke 血管数量及扩张的幅度都远不如第一 choke 区,这或许可以用以下两点解释:①目前认为血管扩张与血流剪切应力关系密切,血管扩张发生的触发因素就是血管内血流剪切应力急剧增加引起的<sup>[8-10]</sup>,而血流剪切应力大致可以按照牛顿流体力学公式  $T = \frac{4\eta Q}{\pi r^3}$  估算( $T$  剪切应力,  $\eta$  血液黏度

系数,  $Q$  单位时间血流量,  $\pi$  常数,  $r$  血管半径)。当耳瓣切取后,中间血管体内血压骤降,形成了头侧血管体与中间血管体之间的压力差,迫使血流经过 choke 血管流向中间血管体,原来基本无血液流动的 choke 区血流量增加,血流剪切应力增加,促使动脉扩张的快速出现。而第二 choke 区两端的中间血管体与尾侧血管体在耳瓣切取后的血流量都骤降,流经第二 choke 区的血流量并没有骤升,故第二 choke 区的血流剪切应力并没有增加,导致其扩张动力不足;②由于血管扩张涉及到血管壁内平滑肌细胞、内皮细胞的大量复制及增生,故所需较多能量供给。耳瓣切取后第一 choke 区内 choke 血管的血供得到保证,能量供给也得到保证,而第二 choke 区 choke 血管内血流量急剧减少,能量供给受限,平滑肌细胞与内皮细胞等大量复制及增生所需的能量供给得不到保证,故扩张受限。

耳瓣切取后,耳瓣内静脉在早期均出现明显的扩张,而后期很多扩张静脉又出现回缩,管径较小,甚至消失,提示耳瓣内静脉早期的扩张可能属于被动扩张,可能是静脉回流瘀滞的一个表现。皮瓣切取后 7 d 左右,慢慢就能看到耳瓣内一个明显的静脉回流轴向;尾侧血管体内的未坏死部分的静脉在耳瓣基底底部通过细小的静脉连到第二血管体的基部,而后通过第二血管体内侧分支直接到头侧血管体,耳瓣内静脉似乎都是选择以最短距离回到蒂部。而皮瓣动脉没有明显的管径增加又回缩的现象,提示动脉扩张早期可能是因为失神经或者代谢产物积累、缺氧等原因造成血管的扩张,只是弹性的扩张期,之后出现动脉壁细胞的增值,属于主动增值。

### 3.2 耳瓣模型的优缺点

耳瓣模型与目前文献上报道的用于跨区供血皮瓣研究的动物模型相比有以下优点:(1)耳瓣切取后,耳瓣内整个血管的形态学变化可在活体上长时间观察,明显优于文献上报道的在大鼠或兔子背部切取皮瓣,再按照时间点分批处死动物进行血管造影的方法。目前文献上报道的动物皮窗模型是另外一种能够实现对皮瓣切取后皮瓣内血管形态学活体长时间观察的方法<sup>[3-4]</sup>。小鼠耳瓣模型与皮窗模型相比有较明显的优点:①不用安装皮窗,避免了很大的一个干扰因素;②避免皮下组织直接暴露于皮下,大大减小动物的感染率和致死率,提高模型的成功率;③操作方便,不用安装皮窗,不用缝

皮,与每只大鼠皮窗模型至少需 30 min 制作相比,耳瓣模型从耳瓣制作到照片合成完毕只需 5 ~ 8 min;(2)耳瓣内坏死与成活的组织界限清晰可见,耳瓣坏死率容易精确计算。我们认为该模型是最好的用于筛选具有血管活性,能促进皮瓣存活的药物;(3)小鼠耳成对,可互相作为对照组。小鼠耳瓣模型作为跨区皮瓣模型最大的缺点在于鼠耳属于复合组织,除了皮肤还有软骨,与单纯的皮瓣相比,其生理可能存在不同。

### 3.3 鼠耳模型建立要点

耳瓣模型的制作过程中需注意以下两点:①当耳瓣切取后,由于疼痛,小鼠具有相互啃咬的天性,不恰当的圈养会导致小鼠相互啃咬耳瓣,并增加小鼠耳瓣感染可能性,使试验功亏一篑,本模型中必须保证所有小鼠单独饲养;②不恰当的放置盖玻片会压瘪甚至截断鼠耳中正常的血流,影响试验的统计,所以两侧的架高条的高度必须适中,给盖玻片和鼠耳留有一定空间,既能保证鼠耳铺平又能保证血流通畅。

综上所述,本课题建立的鼠耳模型能清晰的对跨区皮瓣微循环的形态学变化进行长时间的活体观察,并具有稳定坏死率,不失为研究血管扩张机制及遴选促皮瓣存活药物的理想动物模型。

#### 参考文献:

[ 1 ] Cormack GC, and Lamberty BG. A classification of fascio-

cutaneous flaps according to their patterns of vascularisation[J]. Br J Plast Surg. 1984, 37: 80 - 87.

- [ 2 ] Taylor GI, and Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications[J]. Br J Plast Surg. 1987,40: 113 - 141.
- [ 3 ] Zhuang Y, Hu S, Wu D, *et al.* A novel in vivo technique for observations of choke vessels in a rat skin flap model. Plast Reconstr Surg. 2012, 130: 308 - 317.
- [ 4 ] 戴开宇,胡斯旺,庄跃宏,等. 大鼠背部跨区皮瓣的 Choke 静脉的变化规律[J]. 解剖学报. 2013,44 :238 - 244.
- [ 5 ] Williams BA, Currie RW, Morris SF. Impact of arteriogenesis in plastic surgery: choke vessel growth proceeds via arteriogenic mechanisms in the rat dorsal island skin flap [ J ]. Microcirculation. 2009,16: 235 - 250.
- [ 6 ] 唐茂林,章伟文,张世民,等. 穿支皮瓣研究进展[J]. 中国临床解剖学杂志,2011,6:602 - 605.
- [ 7 ] Taylor GI, Corlett RJ, Dhar SC, *et al.* The anatomical (angiosome) and clinical territories of cutaneous perforating arteries: development of the concept and designing safe flaps[J]. Plast Reconstr Surg. 2011, 127: 1447 - 1459.
- [ 8 ] Schaper W. Collateral circulation: past and present[J]. Basic Res Cardiol. 2009,104; 5 - 21.
- [ 9 ] Troidl K, and Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease. Diabetes Metab Res Rev[J]. 2012,28 Suppl 1: 27 - 29.
- [ 10 ] Heil M, Schaper W. Insights into pathways of arteriogenesis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2007, 8(1): 35 - 42.

[ 修回日期 ]2014-05-22