

· 实验研究 ·

动物前肢淋巴水肿模型构建的实验研究

柴凡 梁燕 姜军

【摘要】 目的 使用 3 种方法建立动物前肢淋巴水肿模型,并对不同的模型构建方法进行比较。**方法** 将 18 只日本大耳白兔随机、平均分配入放射线照射组、手术组和联合处理组,分别使用放射线照射法、手术切除法及联合法处理动物一侧前肢并连续观察 18 周。使用排水法测量并记录动物双侧前肢体积变化,用核素显像法同步观察动物双前肢淋巴引流情况。通过对动物前肢体积变化进行统计学分析,结合动物肢体淋巴核素显像结果,评价不同方法建立肢体淋巴水肿效果的优劣。**结果** 术后 18 周时共存活 14 只动物,其中 7 只模型构建成功,总成功比例为 7/14。在存活动物中,联合法建模成功的比例为 4/4,手术法为 3/4,放射法无一成功(0/6)。3 种模型构建方法间差异有统计学意义($F=17.57, P=0.000$),联合法和手术法模型构建效果明显好于放射法(P 均 <0.050)。**结论** 联合法和手术法均是制作肢体淋巴水肿动物模型较好的方法,可以为后续研究提供适宜的动物模型。

【关键词】 淋巴水肿;动物模型;乳腺肿瘤

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Construction of animal models of fore limb lymphedema: an experimental study

CHAI Fan, LIANG Yan, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: JIANG Jun, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of animal models of fore limb lymphedema built by three different methods. **Methods** Eighteen *Oryctolagus cuniculus* were equally divided into three groups ($n=6$ in each group) at random. Radiographic exposure, surgical ablation and combined methods were used in the three different groups respectively to make fore limb lymphedema on one side, then the volume changes of the fore limbs were observed for 18 weeks. The volume changes of the fore limbs of both sides were measured and recorded by a draining method, and the draining status of the fore limb lymph of both sides were observed using radionuclide imaging technique. The changes of the fore limbs of the three groups were compared and statistically analyzed. According to the radionuclide imaging and draining results of the fore limb lymph, the effects of the three different methods for building the animal models of fore limb lymphedema were evaluated. **Results** A total of 14 animals survived, in whom seven animal models of fore limb lymphedema were successfully built at 18 weeks after operation. Four models were successfully constructed in 4 survived animals in the

基金项目:全军医学科学技术研究“十一五”计划课题(06MA191);第三军医大学西南医院创新基金

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院乳腺疾病中心

通信作者:姜军, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

combined method group, three models successfully constructed in 4 survived animals in the surgical ablation method group, and nought model in 6 survived animals in the radiographic exposure method group. There was a statistical difference between the three methods ($F = 17.57, P = 0.000$). The combined method and the surgical ablation method were markedly prior to the radiographic exposure method in building the animal models of fore limb lymphedema (both $P < 0.050$). **Conclusions** The combined method and the surgical ablation method are reliable to build an animal model of fore limb lymphedema, which can provide proper animal models for further lymphedema investigation.

【**Key words**】 lymphedema; animal models; breast neoplasms

乳腺癌患者术后患侧上肢淋巴水肿,目前尚无公认有效的治疗方法。为更好地模拟并研究乳腺癌患者术后上肢淋巴水肿的病程、观察水肿的进展、探索有效治疗方法,需要建立动物前肢淋巴水肿的模型进行实验研究。本研究选用日本大耳白兔,使用放射线照射法、手术切除法和两法联用的联合法制作动物前肢淋巴水肿模型,并对不同方法建立淋巴水肿模型的效果进行比较,旨在寻找一种较好的模型构建方法,为肢体淋巴水肿的深入研究提供可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康日本大耳白兔 18 只(第三军医大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK 渝 20070003),3~4 月龄,体质量 1.7~2.2 kg,雌雄不限,普通级。为消除个体差异,将动物入组标准定为双前肢体积差值 < 5 ml(排水法测量,浸水深度为肘关节上方 1 cm 平面)。饲养及观测环境为第三军医大学西南医院动物观察室。

1.2 实验分组

将 18 只日本大耳白兔编号后按随机数字表抽取法分配到放射线照射组、手术切除组和联合处理组,每组 6 只。统一对动物右前肢进行实验处理,自身左前肢为对照。

1.3 动物前肢淋巴水肿模型的构建

1.3.1 放射线照射法:放射组 6 只动物,分别仰卧位固定于鼠、兔两用恒温手术操作台,依次置入 ^{60}Co 放射治疗仪发射窗下方,选择右前肢及腋窝区 $6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$ 范围照射野,一次性给予 1500 cGy 剂量的 γ 射线,照射后常规饲养、观察。

1.3.2 手术切除法:手术组 6 只动物,分别于术前 10 min 使用 2% 戊巴比妥钠溶液自兔耳缘静脉行静脉麻醉,术中辅以乙醚吸入维持麻醉效果。麻醉显效后,将兔仰卧位固定于鼠、兔两用恒温手术操作台,右侧前肢及腋窝区剃毛,

仔细消毒皮肤,术区铺盖无菌手术治疗巾。在右前肢第 2、3 趾蹼间皮下注射亚甲蓝注射液 0.2 ml 并轻柔按摩 3 min,然后在右侧腋窝沿皮纹方向切开皮肤、皮下组织,切口长约 6 cm,切口线贯穿腋窝,手术视野可暴露整个腋窝及胸肌外侧轮廓。依照亚甲蓝注射液染色指引,切除右侧腋窝、胸肌外缘及锁骨下水平淋巴结,破坏、结扎全部可见的蓝染淋巴管。术中注意保护腋动脉、腋静脉及腋神经,避免损伤重要血管和神经。淋巴结切除完成后,在兔右前肢肘横纹上 2 cm 处环形切开皮肤,切除切线上方约 3 cm 宽度皮下结缔组织,遇血管时以附近肌肉覆盖保护,然后将皮肤覆盖创面,缝合切口。彻底止血、清点器械无误后间断缝合皮肤,关闭切口。使用红霉素药膏涂擦手术创面,肌注硫酸庆大霉素注射液预防感染。术后创面定期换药,继续使用抗生素预防感染 1 周。

1.3.3 联合处理法:分别对该组 6 只动物,依照手术切除法处理,术后第 7 天再依照放射法进行 1 次放射线照射,最大限度模拟临床上乳腺癌患者根治术后辅以放射治疗的过程。

1.4 模型构建效果检测

1.4.1 双前肢体积变化检测:对所有动物连续观察至模型构建后 18 周,每周定期使用排水法测量、记录双侧前肢体积变化,对比 3 种方法造成动物双侧前肢体积变化。考虑到动物个体差异及肢体自然生长情况,本研究中将观察终点时动物双前肢体积差值 ≥ 5 ml 视为构建前肢淋巴水肿模型成功的标准。

1.4.2 腋窝引流功能检测:在模型构建前和模型构建后 18 周两个时间点,使用核素显像法检测、对比动物双侧前肢淋巴引流功能。扫描前 30 min 于双前肢第 1、2 趾蹼间皮下各注射^{99m}Tc^m) 0.1 ml(约 9.25×10^6 Bq)并轻柔按摩 3 min,使用 ECT 核素扫描系统行单光子发射计算机断层成像(single-photon emission computed tomography, SPECT)探头平面扫描,观察动物腋窝淋巴结显影情况。将 ECT 系统采集的图像进行对比分析,比较淋巴引流功能的变化情况。

1.5 统计学方法

实验数据使用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析。以自体左侧前肢为对照,计算兔双侧前肢体积差值。为排除术后短期炎性水肿的影响,本研究在动物肢体淋巴水肿趋于稳定后(10 ~ 18 周),对兔前肢体积参数采用重复测量实验的方差分析法进行统计学处理。考虑到本项研究最终样本量相对较少,统计分析时组内数据不满足球形分布检验(Mauchly's Test of Sphericity),为避免数据偏倚,在组间比较时采用 Greenhouse-Geisser 法进行校正检验,统计结果以 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物前肢淋巴水肿模型建立情况

在模型构建后 1 周内 18 只日本大耳白兔因急性感染死亡 4 只(联合组 2 只,手术组 2 只),其余 14 只均存活至术后 18 周。最终符合成功标准共 7 只动物,总成功比例为 7/14。在存活动物中,联合法建模成功的比例为 4/4,手术法为 3/4,放射法无一只建模成功(0/6)。

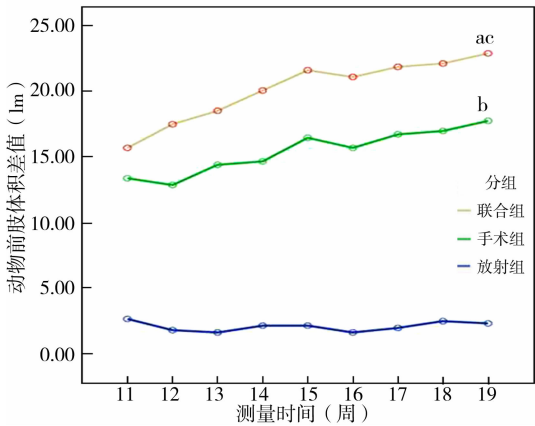
2.2 各组模型建立效果比较

联合组和手术组动物的术侧前肢在术后早期均发生明显的炎性水肿,3 周内达高峰,8~9 周降至最低,10~18 周炎性水肿作用已消退,肢体淋巴水肿稳定增加,双侧前肢体积差值详见表 1。双前肢体积差值变化曲线如图 1 所示:联合组和手术组动物前肢体积差值持续增大,至观察终点时仍可维持较高的水平;放射组动物早期也可出现前肢体积差值增大,但后期体积差值不能长期维持,曲线逐渐低平趋向于自然生长状态,至观察终点时亦不能达到模型构建成功标准。3 种模型构建方法间差异有统计学意义($P < 0.050$),联合法和手术法建立肢体水肿模型的效果明显优于放射法(P 均 < 0.050),但联合法和手术法建模效果间差异无统计学意义($P > 0.050$)。

表 1 术后 10~18 周动物的双前肢体积差值 (ml)

组别	10 周	11 周	12 周	13 周	14 周	15 周	16 周	17 周	18 周
放射组 ^{ab}	3.50(1.25)	3.00(1.25)	2.50(1.25)	3.00(0.25)	3.00(0.25)	2.50(1.25)	3.00(1.50)	3.50(2.50)	3.50(2.75)
手术组	15.00(9.25)	14.50(10.25)	16.00(11.25)	16.50(12.50)	18.50(15.25)	18.50(16.00)	19.00(17.50)	19.50(19.25)	20.00(19.50)
联合组 ^c	15.50(4.50)	17.00(6.25)	18.00(7.75)	19.00(9.25)	20.00(10.75)	19.50(11.25)	20.00(11.50)	20.50(11.25)	21.00(11.50)

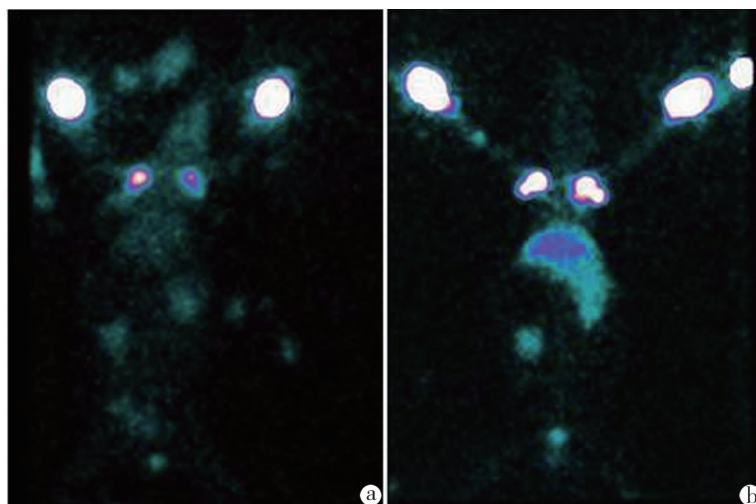
$P = 0.000$, 3 组间比较; a: $P = 0.002$, 与手术组比较; b: $P = 0.000$, 与联合组比较; c: $P = 0.212$, 与手术组比较



$P = 0.000$, 3 组间比较; a: $P = 0.000$, 与放射组比较;
b: $P = 0.002$, 与放射组比较; c: $P = 0.212$, 与手术组比较

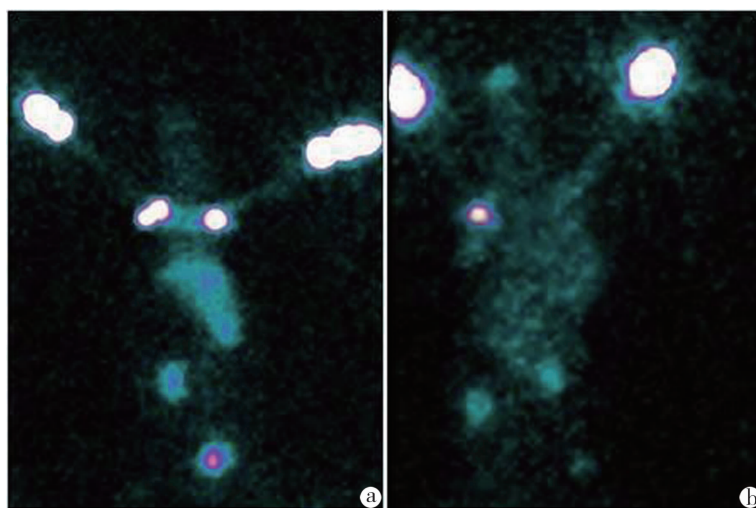
图 1 动物双前肢体积差值变化曲线

动物双前肢腋窝淋巴结核素显像结果:模型构建前所有动物双侧腋窝淋巴结均可显影,前肢淋巴引流通畅(图 2~4);模型构建后 18 周时联合组和手术组动物术侧腋窝内均无淋巴结显影,而放射组动物照射侧腋窝淋巴结均可正常显影(图 2~4)。



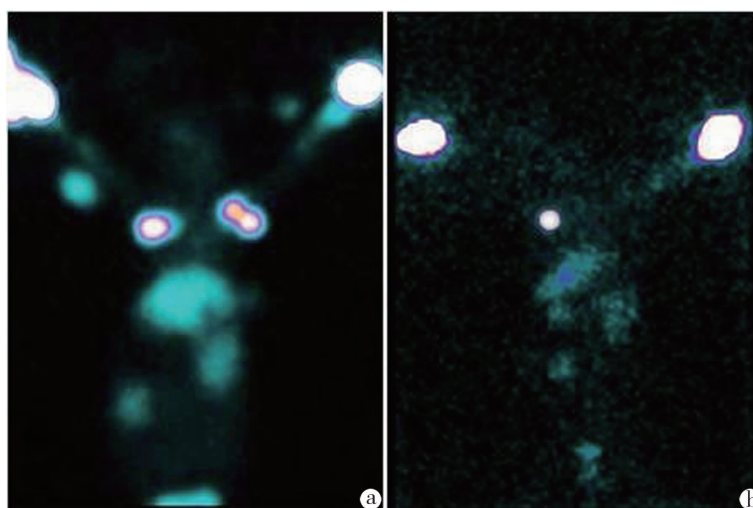
a:照射前;b:照射后

图 2 放射组照射前后淋巴结显影情况比较



a:手术前;b:手术后

图 3 手术组手术前后淋巴结显影情况比较



a:处理前;b:处理后

图 4 联合组处理前后淋巴结显影情况比较

3 讨论

在实验动物的选择方面,既往文献报道可用于肢体水肿模型制作的动物有狗、大白鼠和家兔等^[1-5]。狗性情凶猛,术后不便于观察检测,死亡率及饲养成本均比较高;大白鼠模型成功率较高且成本低廉,但因其肢体较小不便于观察,且解剖结构与人体差距较大,尤其是血管和淋巴管过于纤细,不利于手术操作;兔性格温顺易于捕捉和饲养,局部血管和淋巴管易于显微外科操作,饲养成本也较为低廉,故本研究选用日本大耳白兔作为实验对象。

在实验方法的选择方面,鉴于腋窝淋巴结切除的手术方式不当^[6-7]、淋巴结切除及其范围过大^[8-9],以及过早或过度放射治疗^[10-11]均是造成乳腺癌患者术后上肢淋巴水肿的重要因素,本研究用动物近似地模拟临床乳腺癌根治术中淋巴结切除的治疗过程,分别采用仅行放射线照射、仅行手术切除及手术与放射线照射联合的 3 种方法进行探索,最终成功制作出动物前肢淋巴水肿模型。

皮下组织环切法构建模型是研究淋巴水肿发病机制、探索治疗方法的重要手段^[12-13]。有研究者认为,经此法形成的慢性、长期水肿较为稳定,但存在局部损伤较大、动物死亡率较高的隐患^[14-15]。本研究采用的手术切除法最大限度模仿了乳腺癌根治术的淋巴结切除操作,同时破坏了动物前肢皮下结缔组织中的淋巴管网,最终可以造成动物前肢淋巴水肿。经该法处理的动物在实验观察期内,双前肢体积差值长期存在,形成水肿的效果稳定,可以成功构建模型。该方法与文献报道类似,实验中也出现因局部损伤、严重炎症反应致动物死亡的现象,在后续的重复性试验中仍然需要继续改进。

放射线照射法构建模型的效果与放射剂量及动物耐受性关系紧密。放射剂量过大易导致放射治疗并发症,甚至会引起动物死亡。Lee Donaldson 等^[11]报道使用 4500 cGy 的放射剂量照射时 9% ~ 13% 的动物出现早期死亡和晚期患肢并发症(如局部皮肤溃烂、软组织纤维化或骨坏死等)。梁炳生和孙泮等^[16-17]在进行家兔肢体淋巴水肿模型构建时分别使用了 2000 cGy 和 1500 cGy 的放射剂量,观察至术后 18 周时效果仍然满意,未发生明显放射性损伤。为避免放射并发症的出现,本研究采用相对安全的 1500 cGy 剂量放射剂量进行照射。观察至放射线照射后 18 周时动物双侧前肢体积差异已消失,不能长期维持肢体水肿状态。全组动物未出现其他肢体并发症,无放射性致死现象发生。因此,笔者推测在 1500 cGy 剂量的基础上适当增大放射剂量,有可能会提高肢体淋巴水肿动物模型构建的成功率,但是这一推论尚需要进一步实验加以证实。

本研究发现联合法制作肢体淋巴水肿动物模型效果较好,能制作前肢体积差值较手术法更加明显的淋巴水肿模型,但由于本研究总体样本量较小,最终可存活至实验观察终点的动物数量比较少,导致进行统计分析时在联合组与手术组之间尚不能获得显著性差异。如果进一步扩大样本量,则有可能在两种模型构建方法比较时获得差异性的结果。既往实验研究表明:局部放射治疗可以加强手术切除法的效果,手术与放射线照射相结合的方法具有手术操作简便、可重复性好,模型稳定的优点,与临床乳腺癌患者治疗过程相似度高,因此具有较高的研究价值^[18-19]。国外 Frezza^[20]和国内梁炳生等^[16]的研究显示,淋巴结根治性切除后辅以放射治疗与先放射治疗再行淋巴结根治性切除两种方法,在构建肢体淋巴水肿动物模型效果方面无明显区别。本研究使用先手术后照射的联合法构建动物模型,与单纯的手术切除或仅行放射治疗的方法相比优点明显:(1)肢体淋巴水肿模型制作成功率高,淋巴水肿出现早,效果稳定持久;(2)所有存活动物均发生淋巴水肿,水肿程度高于其他两种模型,与临床乳腺癌根治术后辅以放射治疗后出现肢体淋巴水肿具有极大的相似性。综上所述,笔者认为联合法和手术法均是制作肢体淋巴水肿动物模型较好的方法,可为乳腺癌根治术后上肢淋巴水肿的研究提供适宜的动物模型。

参考文献

- [1] Foldi M, Clodius L. Missteps when mice with lymphatically insufficient tails leap from molecular biology to human clinical lymphology [J]. *Lymphology*, 2007, 40 (4):188-190.

- [2] 王国英,钟世镇,刘牧之. 大白鼠肢体淋巴水肿模型的实验研究 [J]. 中华实验外科杂志,1985,2(3):116-118.
- [3] Shin WS, Szuba A, Rockson SG. . Animal models for the study of lymphatic insufficiency [J]. Lymphat Res Biol, 2003, 1(2):159-169.
- [4] Hadamitzky C, Pabst R. Acquired lymphedema: an urgent need for adequate animal models [J]. Cancer Res, 2008, 68(2):343-345.
- [5] Schneider M, Ny A, Ruiz de Almodovar C, et al. A new mouse model to study acquired lymphedema [J]. PLoS Med, 2006,3(7):264.
- [6] Erickson VS, Pearson ML, Ganz PA, et al. Arm edema in breast cancer patients [J]. J Natl Cancer Inst, 2001, 93(2):96-111.
- [7] Pain SJ, Vowler S, Purushotham AD. Axillary vein abnormalities contribute to development of lymphedema after surgery for breast cancer [J]. Br J Surg, 2005, 92(3):311-315.
- [8] Wilburn O, Wilburn P, Rockson SG. A pilot, prospective evaluation of a novel alternative for maintenance therapy of breast cancer-associated lymphedema [J]. BMC Cancer, 2006, 84(6):1-10.
- [9] Purushotham AD, Bennett Britton TM, Klevesath MB, et al. Lymph node status and breast cancer-related lymphedema [J]. Ann Surg, 2007, 246(1):42-45.
- [10] Grills IS, Kestin LL, Goldstein N, et al. Risk factors for regional nodal failure after breast-conserving therapy: regional nodal irradiation reduces rate of axillary failure in patients with four or more positive lymph nodes [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 56(3):658-670.
- [11] Lee Donaldson L, Witte MH, Bernas M, et al. Refinement of a rodent model of peripheral lymphedema [J]. Lymphology, 1999, 32(3):111-117.
- [12] Cheung L, Han J, Beilhack A, et al. An experimental model for the study of lymphedema and its response to therapeutic lymphangiogenesis [J]. Bio Drugs, 2006, 20(6):363-370.
- [13] Saaristo A, Karkkainen MJ, Alitalo K. Insights into the molecular pathogenesis and targeted treatment of lymphedema [J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 979(12):94-110.
- [14] 刘执玉. 淋巴的基础与临床[M]. 北京:科学出版社, 2003:168.
- [15] Maby El, Hajjami H, Petrova TV. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(6):1063-1078.
- [16] 梁炳生,冯勇,常文凯,等. 慢性肢体淋巴水肿模型的比较研究 [J]. 实用骨科杂志, 2004, 10(3):216-218.
- [17] 孙洋,曹卫刚,李圣利,等. 实验性兔后肢淋巴水肿模型构建 [J]. 上海第二医科大学学报, 2004, 24(6):426-431.
- [18] Mitchel AK, Sumner AS, William K, et al. An experimental model for chronic lymphedema [J]. Plast Reconstr Surg, 1990, 85(4):575.
- [19] 陈德谊. 乳腺癌手术后的淋巴水肿 [J]. 国外医学·外科学分册, 2001, 28(3):161-162.
- [20] Frezza EE, Mezgebe H. Gallbladder carcinoma: a 28 years' experience [J]. Int Surg, 1997, 82(3):295-300.

(收稿日期:2010-09-01)

(本文编辑:罗承丽)

柴凡,梁燕,姜军. 动物前肢淋巴水肿模型构建的实验研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2011, 5(4):466-473.