

介入法建立比格犬和小型猪急性心肌梗死模型的对比研究

顾晓龙¹, 黄军¹, 董正华¹, 雷辉燕³, 龚志华², 文艳飞², 向定成^{2△}

(1. 南方医科大学研究生学院, 广州 510515; 2. 广州军区总医院心血管内科, 广州 510010;

3. 广州军区总医院超声影像科, 广州 510010)

摘要:目的 比较介入法建立比格犬与小型猪两组动物急性心肌梗死模型的成功率及风险, 为选择更合适的动物建模提供理论基础。方法 比格犬和五指山小型猪各 6 头, 全身麻醉下行右侧股动脉切开穿刺术, 左冠状动脉造影后选择冠状动脉球囊送至前降支中段行缺血预适应, 并持续封堵 180 min 后撤出球囊, 术前、术后均连续观察心电图变化, 术后 7 d 处死动物取出心脏行病理学检查。结果 比格犬组均存活, 小型猪组死亡 1 例(1/6); 比格犬组发生心肌梗死 1 例(1/6), 小型猪组 5 例(5/6); 比格犬组未发生恶性心律失常, 小型猪组 6 例均发生恶性心律失常(6/6); 两组造模所需时间比较[(4.61±0.47)h vs. (4.82±0.55)h], 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 小型猪在介入法建立心肌梗死模型中虽然风险高于比格犬, 但是成功率仍较高, 是建模的理想动物。

关键词:心肌梗死; 猪, 雏型; 模型, 动物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.09.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)09-1090-03

The comparison of establishment of the acute myocardial infarction model between the beagle dogs and the mini-pigs by interventional technique

Gu Xiaolong¹, Huang Jun¹, Dong Zhenghua¹, Lei Huiyan³, Gong Zhihua², Wen Yanfei², Xiang Dingcheng^{2△}

(1. School of Graduate, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Cardiovascular Medicine, the General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China; 3. Department of Ultrasound Imaging Division, the General Hospital of Guangzhou Military Region, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective To explore the success rate and the risk of establishment of the acute myocardial infarction model between the beagle dogs and the mini-pigs by interventional technique, further to provide theoretical basis for choose a more suitable animal model. **Methods** 6 dogs and 6 mini-pigs were anaesthetized, then underwent the coronary arteriography via femoral artery. After ischemic preconditioning the coronary balloon was inflated to occlude the middle left anterior descending coronary for 180 minutes. The electrocardiogram was examined throughout the operation and the pathological sections were examined until the animals were executed one week later. **Results** All beagle dogs survived, while 1 case of mini-pigs dead(1/6). There was 1 cases(1/6) of beagle dogs had acute myocardial infarction, while 5(5/6)cases in mini-pigs. All mini-pigs had malignant arrhythmia(6/6) but never seen in beagle dogs. The time needed for building a model was similar between the two groups, the difference had no statistical significance($P>0.05$). **Conclusion** The risk of establish myocardial infarction model in mini-pigs is higher than beagle dogs, but the success rate is still high, it might be the better choice.

Key words: myocardial infarction; swine, minijature; models, animal

建立急性心肌梗死动物模型已成为研究心血管疾病的常用方法, 冠心病介入治疗技术的成熟和普及为心肌梗死动物模型的建立提供了新的途径^[1-2]。但所采用的动物种类却有不同选择, 心血管模型常用的动物有小鼠、大白兔、犬、猪, 其中小鼠是早期外科结扎建立心肌梗死模型的常用动物, 不适用于介入法, 介入法所常用的动物为犬和小型猪。本文分别用五指山小型猪和比格犬作为实验动物, 采用介入封堵法建立急性心肌梗死模型, 从建立模型的成功率、风险等方面比较这两种动物的差异, 以期急性心肌梗死模型选择更合适的动物提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与材料 选取比格犬和五指山小型猪(批号: 4407700010)各 6 只, 雌雄不限, 体质量 15~22 kg, 分为比格犬组和小型猪组。实验材料有 Siemens Artis 数字减影血管造影机、6F 动脉鞘管及 0.035 普通导丝(Cordis 公司), 0.014 Runthrough 指引导丝(Terumo 公司), 6FJR3.5 Launcher 指引导管(Medtronic 公司), 2.0 mm×20.0 mm Sprinter 球囊(Medtronic 公司), 压力泵、“Y”阀、三通板、高压注射器, Phil-

ips M8004A 监护仪、静脉切开包、除颤仪、心电图机、碘海醇注射液(扬子江药业)。

1.2 术前准备与麻醉 两组动物均在禁食 8 h 后, 肌内注射氯胺酮 200 mg, 速眠新 0.5 mL, 咪达唑仑 5 mg 诱导麻醉, 称重并清洗, 双腹股沟及胸腹部备皮, 运至介入室, 将动物仰卧四肢固定于手术台, 牙垫固定, 持续吸氧。耳后静脉打套管针给以 5% 葡萄糖 250 mL+10% 氯化钾静脉滴注, 接胸部及四肢电极, 记录术前及术中心电图, 同时接心电监护观察心率及心律, 除颤仪接电极同步除颤备用。给以氯胺酮 2.5 mg+咪达唑仑 0.25 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 维持麻醉, 根据肢体活动及眼球转动情况、呼吸频率对麻醉药物进行调整, 术前 30 min 静脉滴注 1 次青霉素 480 万 U+氯化钠 100 mL。

1.3 模型建立 常规消毒铺巾, 切开并暴露右侧股动脉, 直视下穿刺股动脉, 置入 6F 动脉鞘管, 退出短导丝, 从鞘管给以肝素 5 000 U, 肝素盐水冲管, 在 DSA 机透视下, 经导丝引导, 送入 6FJR3.5 指引导管到左冠开口, 根据左冠开口形状将导管头适当塑形, 选择左前斜 30°+头位 30°行左冠状动脉造影, 观察清楚前降支走行后, 送入 0.014 英寸×185 cm Runthrough

指引导丝到前降支远端,根据前降支中段内径选择 2.5 mm×20.0 mm Sprinter 球囊,定位于前降支中段(第二对角支开口后),3~4 atm 扩张球囊,造影确认冠状动脉血流完全中断,先进行缺血预适应,先后阻断前向血流 1、2、5 min,每次间隔 1 min,缺血预适应的时间根据心电监护是否有频发室性早搏、室性心动过速或房室颤动决定,心律相对稳定,然后持续阻断前向血流 180 min,180 min 后撤出球囊、导丝,术中如出现室性心动过速、房室颤动、低血压、呼吸停止,均按照临床治疗原则给以抢救。

1.4 术后处理 手术结束后结扎股动脉穿刺口近端及远端,逐层缝合,缝合皮肤前生理盐水冲洗伤口,清除伤口内的积血,并局部应用庆大霉素 4 万 U,乙醇消毒伤口,对皮后纱布覆盖弹力胶带固定,两组动物均送回动物实验室,给以青霉素 480 万 U 每日 2 次肌肉注射,持续 3 d。

1.5 急性心肌梗死的评估

1.5.1 心电图检测 分别于术前、术后 30 min、术后 3 h、术后 24 h 行肢体导联及胸导联心电图检查。

1.5.2 血心肌酶学指标检测 分别于术前、术后 12 h 和术后 24 h 从动物股静脉取 5 mL 静脉血标本留样,检测上述时间点的肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB),肌钙蛋白 I(TnI)浓度。

1.5.3 心肌大体标本及病理染色 术后 7 d,静脉滴注 10% 氯化钾注射液 20 mL 处死动物,并取出两组动物心脏,观察大体标本,后离断大血管,切除右室部分,分别从梗死区和非梗死区切取标本,甲醛固定后制成蜡块,作病理切片,行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般状况 比格犬组犬均存活,无 1 例死亡;小型猪组 1 例死亡,病死率 16.67%(1/6),死亡原因为封堵后 30 min 出现

顽固性房室颤动死亡。小型猪组术中每例均有超过 1 次的房室颤动或室性心动过速,比格犬组均无房室颤动及室性心动过速发生。两组动物均无感染、出血及休克发生。两组造模所用时间比较[(4.61±0.47)h vs. (4.82±0.55)h],差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般状况比较(n=6)

组别	死亡 [n(%)]	房室颤动/室性 心动过速[n(%)]	心肌梗死 [n(%)]	造模时间 ($\bar{x} \pm s$,h)
比格犬组	1(16.67)	0	1(16.67)	4.61±0.47
小型猪组	0	6(100)	5(83.33)	4.82±0.55

2.2 造影结果 两组动物均成功完成左冠状动脉造影,均未行右冠状动脉造影,用 6FJR3.5 指引导管代替造影管行冠状动脉造影。小型猪组左冠状动脉两支血管分布相对均衡,且大部分前降支支配范围广泛,而比格犬组前降支相对细小,回旋支粗大。球囊封堵冠状动脉后血流心肌梗死溶栓治疗(TIMI) 0 级,有时球囊扩张近段可见血管腔窄影。

2.3 心电图改变 所有小型猪组在球囊封堵后立即出现 T 波高尖、ST 段抬高急性心肌梗死表现,而比格犬组均未见 T 波高尖,3 例未出现显著 ST 段抬高,3 例出现轻度而短暂的 ST 段抬高,但约 20 min 左右 ST 段回落。

2.4 血液心肌酶学指标比较 两组实验动物术前各项指标比较,差异无统计学意义。术后 12 h、术后 24 h,小型猪组 TnI、CK、CK-MB 3 种指标均显著高于比格犬组($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 病理结果 1 周后解剖心脏大体标本,5 只存活的小型猪前壁均能看到室壁变薄,颜色明显苍白,而比格犬大体标本 5 只外观未见明显异常,1 只可见前壁颜色稍白,见图 1、2。病理切片 HE 染色小型猪组均可见细胞坏死、淋巴细胞浸润、纤维组织增生,而比格犬组 5 只未见明显细胞坏死,仅可见极少量心肌纤维组织增生,1 只可见心肌细胞坏死、淋巴细胞增生。

表 2 两组动物血液心肌酶指标比较分析($\bar{x} \pm s$)

指标	术后 12 h		术后 24 h	
	小型猪组	比格犬组	小型猪组	比格犬组
TnI(ng/dL)	6.83±1.02 ^a	0.87±0.19	5.46±0.97 ^a	0.72±0.16
CK(U/L)	1 968.48±129.34 ^a	457.28±70.89	1 783.53±110.75 ^a	402.65±87.78
CK-MB(U/L)	221.03±38.47 ^a	52.77±16.54	198.45±23.38 ^a	46.50±11.62

^a: $P < 0.05$, 与比格犬组比较。



图 1 小型猪大体标本



图 2 比格犬大体标本

3 讨 论

目前用于急性心肌梗死模型制作的动物种类有小鼠、大鼠、小型猪、犬、猫、兔、羊等,早期使用且现在仍被广泛使用的是鼠^[3],但鼠由于体积小,心脏也很小,不便于采取血标本,耐受能力很差,病死率高等,并不是一种理想的心肌梗死造模动物。近年来,球囊封堵法建立心肌梗死模型已逐渐被研究者使用^[4],因为这种方法将对实验动物机体的生理状态干扰降到最小。犬和猪是最常用的实验动物,体型适中,方便导管操作,且这两种动物的心脏解剖、生理特性与人比较接近,实验结果较鼠、兔等更具有说服力,便于过渡到人类的临床实验。

猪和犬冠状动脉分布及解剖有着显著的不同。犬基本为左冠状动脉优势型,且多数左回旋支粗大,前降支细小,尤其是侧支循环非常丰富,完全阻断心肌供血变得非常困难,这和本实验观察的一致,实验过程中完全阻断前降支血流后,3 例比格犬出现 ST 段轻度抬高,但数分钟后即恢复正常,此时重复造影,前降支血流仍为 TIMI 0 级,3 只封堵后心电图无任何改变,分析其原因可能与犬丰富的侧支循环有关,这当中 3 例比格犬的侧支平时即处于开放状态,侧支在主支血管闭塞时开放。而小型猪冠状动脉的解剖及分布特点与人类相似度更高,尤其是左冠状动脉分布特点,与人类的符合度约占 90%^[5],且侧支循环极少,对缺血耐受性差,冠状动脉血流急性闭塞尤其是前降支闭塞后极易引起大面积心肌梗死及恶性心律失常、心源性休克等并发症,病死率较高^[6-7]。本研究中 6 例小型猪,有 1 例因顽固性房室颤动和室性心动过速死亡,且所有小型猪在冠脉封堵后立即出现显著 ST 段抬高,且抬高程度逐渐增加,在封堵后 3~10 min 均出现室性心律失常,即使经过缺血预适应,所有小型猪均除颤 2 次以上,在封堵后均出现血压不同程度下降,经过药物处理后血压可回升。

急性心肌梗死的诊断方法较多,包括心电图、肌钙蛋白在内的心肌标志物检测等^[8]、病理学检查等,其中组织学病理检查是较敏感可靠的特异性指标,且心肌梗死的组织学改变常早于血液指标及超声心动图的变化^[9]。因此本研究选择病理学诊断结合连续观察心电图作为诊断急性心肌梗死的标准,既节约成本,又方便可靠。本研究中所有小型猪除 1 例死亡外大体标本不经过任何处理即可见前壁心肌不同程度的变白,比格犬的大体标本除 1 例外均未见到颜色明显变化,病理切片 HE 染色显示小型猪组心肌细胞坏死,少量散在中性粒细胞及单核、淋巴细胞浸润,纤维细胞增生,而比格犬组除 1 例外仅可见少量纤维组织增生。

综上所述,小型猪使用球囊封堵前降支制作急性心肌梗死模型成功率显著高于比格犬,虽然模型建立风险显著高于比格犬,但其仍有相对较高的成功率。为提高小型猪的存活率,作者认为,一个完善的实验团队是进行动物实验的根本,其中包括有临床经验的心血管介入医师、超声医师、麻醉指导、动物实验室的指导;其次就是对于心律失常及血栓等做好预备工作,

比如术前即开始补钾^[10],充分肝素化^[11],以及充分的缺血预适应^[12];最后是出现任何病情变化时应按照临床的抢救原则进行积极抢救,而这些均需建立在丰富的临床经验以及一定的实验基础上。

参考文献:

- [1] Reffelmann T, Sensebat O, Birnbaum Y, et al. A novel minimal-invasive model of chronic myocardial infarction in swine[J]. *Coron Artery Dis*, 2004, 15(1): 7-12.
- [2] 李峰杰, 李贻奎. 心肌梗死动物模型研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(1): 5-10.
- [3] Ke Q, Yang Y, Rana JS, et al. Embryonic stem cells cultured in biodegradable scaffold repair infarcted myocardium in mice[J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2005, 57(6): 673-681.
- [4] 宋桂仙, 李小荣, 张凤祥, 等. 猪心肌梗死后室性心律失常模型建立方法的比较[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2012, 26(3): 246-249.
- [5] 彭朝权, 王景峰, 杨珂, 等. 经皮球囊封堵冠状动脉法制备小型猪心肌梗死模型及评价[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(9): 1867-1872.
- [6] 冯书堂, 陈幼春. 五指山猪生物学特性、易地繁育及遗传多样性研究[J]. *生物多样性*, 1998, 6(3): 172-179.
- [7] 黄浙勇, 葛均波, 张少衡, 等. 猪急性心肌梗死模型发生心室颤动的相关因素分析[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(5): 351-354.
- [8] Patil SM, Banker MP, Padalkar RK, et al. The clinical assessment of ischaemia modified albumin and troponin I in the early diagnosis of the acute coronary syndrome. [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(5): 804-808.
- [9] Arnold L, McGrath B, Cocks M, et al. Adriamycin cardiomyopathy in the rabbit: an animal model of low output cardiac failure with activation of vasoconstrictor mechanisms[J]. *Cardiovasc Res*, 1985, 19(6): 378-382.
- [10] Pignier C, Rougier JS, Vié B, et al. Selective inhibition of persistent Sodium current by F 15845 prevents ischaemia-induced arrhythmias[J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(1): 79-91.
- [11] Uriuda Y, Wang QD, Hatori N, et al. Coronary thrombolysis/thrombolysis in pigs: effects of heparin, ASA, and the thrombin inhibitor inogatran [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1998, 39(2): 81-89.
- [12] van Vuuren D, Lochner A. Ischaemic postconditioning: from bench to bedside[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2008, 19(6): 311-320.
- [13] 齐科研, 黄慧, 吕泽平, 等. 血脂异常与高血压的关联研究: 社区人群心脑血管事件前瞻性研究系列之十一[J]. *中国老年保健医学*, 2009, 7(1): 43-45.
- [14] 罗斌, 梁碧涛. 不同剂量辛伐他汀治疗老年高脂血症的疗效对比[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(6): 2370-2371.
- [15] 冯美杰. 不同剂量辛伐他汀治疗老年高脂血症疗效对比[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(1): 201-202.

(收稿日期: 2013-10-23 修回日期: 2013-11-26)

(上接第 1089 页)

et al. Meta-analysis of cardiovascular outcomes trials comparing intensive versus moderate statin therapy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48: 438-445.

[11] Topol EJ. Intensive statin therapy—a sea change in cardiovascular prevention[J]. *N Eng J Med*, 2004, 350: 1562-1564.

[12] 何甲均, 徐学广, 郑莘. 辛伐他汀和盐酸小檗碱治疗高脂血症和颈动脉粥样硬化的疗效[J]. *天津医药*, 2007, 35(7): 539-541.

(收稿日期: 2013-11-28 修回日期: 2014-01-09)