

# 猪急性冠状动脉微栓塞模型的建立

苏强, 李浪, 马国添, 黄燕清, 周游, 王江友

(广西医科大学第一附属医院心血管内科, 广西南宁市 530021)

[关键词] 冠状动脉微栓塞; 血管内介入; 小型猪; 动物模型; 微梗死

[摘要] **目的** 应用微导管介入技术建立小型猪急性冠状动脉微栓塞(CME)模型。**方法** 巴马系小型猪随机分为假手术组和微栓塞组(CME组);CME组再按微球数目不同分为5万、10万、15万、25万微球亚组(各组存活小型猪均为5头)。CME组通过经皮冠状动脉介入法,于前降支中远端,经微导管注入微栓塞球,假手术组注射生理盐水,各组术后9h分别应用心脏超声检测心功能,HE染色和苏木素碱性复红苦味酸(HBFP)染色检测心肌微梗死面积。**结果** ①超声心动图参数显示,与假手术组比较,5万微球组心功能无明显改变( $P>0.05$ );与假手术组比较,10万微球组、15万微球组、25万微球组左心室射血分数(LVEF)均显著下降( $P<0.05$ ),心脏超声表现为左心室短轴缩短率(FS)和心排量(CO)下降及左心室舒张期末内径(LVEDd)增加。②CME各组均出现心肌微梗死灶,与5万微球组(4.62%±2.17%)比较,10万微球组(9.23%±3.97%)、15万微球组(12.24%±4.73%)、25万微球组(21.52%±6.19%)微梗死面积均明显增加( $P<0.05$ );③不同CME组之间比较,LVEF与微栓塞球数目成负相关( $r=-0.74, P<0.05$ )、心肌微梗死面积与微栓塞球数目成正相关( $r=0.87, P<0.05$ )。④心肌HE、HBFP染色示:10万微球组基本在每张切片均可发现微梗死灶,并且不引起大面积的心肌梗死。**结论** 经微导管于左前降支中段注射10万计数微球可以成功制作小型猪急性CME模型。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Establishment of A Model of Pig with Acute Coronary Microembolization

SU Qiang, LI Lang, MA Guo-Tian, HUANG Yan-Qing, ZHOU You, and WANG Jiang-You

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[KEY WORDS] Coronary Microembolization; Endovascular Technique; Pig; Animal Model; Microinfarction

[ABSTRACT] **Aim** By using percutaneous endovascular microcatheter technique to establish an animal model of acute coronary microembolization in pigs. **Methods** Coronary microembolization(CME) was established by injection of 40~120 μm microspheres(50, 100, 150, 250 thousands, respectively) selectively into the left anterior descending artery.

The survivors were randomly divided into CME1, CME2, CME3, CME4 subgroups( $n=5$ , respectively). The sham-operated group underwent injection by physiological saline instead of microspheres( $n=5$ ). Echocardiography was used to evaluate heart function. Microinfarction size was detected by hematoxylin and eosin (HE) and hematoxylin basic fuchsine picric acid(HBFP) staining.

**Results** ①Compared with sham-operated group, cardiac function was similar in CME1 group ( $P>0.05$ ). Compared with sham-operated group, the left ventricular ejection fraction(LVEF) of CME2, CME3 and CME4 groups were all markedly decreased( $P<0.05$ ). Echocardiography showed that LVEF, short axis fractional shortening(FS) and cardiac output(CO) decreased, but left ventricular end-diastolic diameter(LVEDd) increased( $P<0.05$ ) after CME. ②Microinfarction can be detected in all CME groups. Compared with CME1(4.62%±2.17%) group, the microinfarction of CME2(9.23%±3.97%), CME3(12.24%±4.73%) and CME4(21.52%±6.19%) groups were all significantly increased( $P<0.05$ ). ③LVEF was negatively correlative with the numbers of microspheres( $r=-0.74, P<0.05$ ). Microinfarction size was positively correlated with the numbers of microsphere( $r=0.87, P<0.05$ ). ④HE and HBFP staining could demonstrate the presence of microinfarction in CME2 group which did not cause a

[收稿日期] 2013-10-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81260042)和2014年广西研究生教育创新计划项目资助

[作者简介] 苏强,博士研究生,研究方向为冠心病介入诊治,E-mail为 suqiang1983@foxmail.com。通讯作者李浪,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为冠心病介入诊治,E-mail为 dlilang@163.com。马国添,博士,副教授,研究方向为冠心病介入诊治。

large area of myocardial infarction. **Conclusions** Acute coronary microembolization model was successfully established after injecting microspheres (100 thousands) into the left anterior descending artery by using percutaneous endovascular microcatheter technique.

冠状动脉微栓塞 (coronary microembolization, CME) 是急性冠状动脉综合征和经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 过程中常见的并发症, 可以导致“慢血流” (slow flow) 或“无再流” (no flow) 的发生, 严重影响冠心病的预后<sup>[1-3]</sup>。因此, 这一疾病的研究亟需可模拟临床患者冠状动脉微血管栓塞的动物模型, 随着冠状动脉微栓塞动物研究的深入开展, 目前已经建立了多种急性 CME 的动物模型, 以冠状动脉介入的方式建立猪 CME 模型最为贴近临床实际病理生理的情况, 但目前对于急性 CME 条件大模型的建立的最佳条件尚未形成统一结论。本研究拟通过经皮微导管介入技术, 以巴马小型猪为实验对象, 建立猪的急性 CME 模型, 旨在探索急性 CME 大动物造模成功的最佳条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康巴马系小型猪 34 头, 雌雄不拘, 体重 25 ~ 30 kg, 由广西大学动物科学技术学院提供。随机分为假手术组、CME 组, CME 组再按照微球数目分为: 5 万、10 万、15 万和 25 万微球亚组 (各组存活小型猪均为 5 头)。

### 1.2 主要药品、试剂、仪器

40 ~ 120  $\mu\text{m}$  微栓塞球 (Biosphere Medical Inc); 0.014 英寸 Runthrough 导丝 (Terumo Medical Corporation); 微导管 (1.8 F, Terumo Medical Corporation); 指引导管 (6F JR4.0, Cordis Inc); 彩色 M 型超声 (Philips sonos7500 型)。

### 1.3 CME 模型的建立

**1.3.1 动物处置** 动物先经盐酸氯胺酮注射液 (5 ~ 10 mg/kg) 肌内注射基础麻醉, 约 3 ~ 5 min 后实验猪出现站立不稳, 倒地后冲洗干净, 常规消毒、铺巾, 5<sub>1/2</sub> 号头皮针穿刺猪耳缘静脉成功后留置并静注地西洋作为维持麻醉, 用量为 0.5 mg/(kg · h)。

**1.3.2 微栓塞球的配制** 取微栓塞球原液 30  $\mu\text{L}$  于 1.5 mL 的 EP 管中, 加入生理盐水 1.5 mL, 充分吹打混匀, 用血细胞计数板于显微镜下计数 ( $\times 100$ ), 连续计数 5 次, 求得平均值, 后分别装出 5 万、10 万、15 万、25 万个微栓塞球于 60 mL 离心管内, 加入生理盐水至 30 mL, 常温下保存, 使用前超声振

荡搅匀<sup>[4]</sup>。

**1.3.3 模型的建立** 分离穿刺一侧股动脉, 植入 6F 动脉鞘, 经鞘注入肝素 200 U/kg 达肝素化, 后以 100 U/(kg · h) 维持。行冠状动脉造影, 并经指引导管送入微导管至左前降支分出第一对角支后的远端, 经微导管注入微栓塞球建立猪冠状动脉微栓塞模型, 注入微栓塞球。术毕肌注 80 万 U 青霉素预防感染<sup>[5]</sup>。

### 1.4 巴马小型猪心功能的检测

于微栓塞后 9 h 检测各组小型猪左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室舒张期末内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)、左心室短轴缩短率 (short axis fractional shortening, FS) 和心排血量 (cardiac output, CO)。探头频率为 12 MHz。所有测量值均取三个心动周期的平均值。所有超声心动图检查均由一位具有丰富超声心动图检查经验的专科医生完成。

### 1.5 组织取材

在麻醉状态下, 经耳缘静脉注入 10% 氯化钾处死实验动物, 开胸, 取出心脏, 平行于房室沟将心室切成 6 层 (层厚 5 ~ 8 mm), 取左心室前壁心肌 300 mg 固定于 4% 中性甲醛, 制备病理切片后行 HE 染色和 HBFP 染色检测心肌微梗死面积<sup>[6]</sup>。

### 1.6 心肌微梗死面积测量

HBFP 染色是诊断早期心肌缺血的一种重要染色方法, 缺血心肌、红细胞呈红染, 正常心肌胞浆黄染、胞核蓝染。DMR + Q550 病理图像分析仪检查, 每张 HBFP 染色切片随机选取 5 个视野 ( $\times 100$ ), 使用 Leica Qwin 分析软件平面法测量梗死区域, 并表示为总分析切片的面积百分比, 取平均值<sup>[4]</sup>。

### 1.7 统计学处理方法

采用 SPSS16.0 统计软件对实验数据进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用成组 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA 分析),  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验动物一般情况

各组间动物的体重和心率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。假手术组、5 万微球组、10 万微球组、

15 万微球组、25 万微球组小型猪随机入选数目分别为 6、6、6、7、9 头,存活小型猪均为 5 头,存活率分别为 83.3%、83.3%、83.3%、71.4% 和 55.6%,主要死于麻醉过量、大出血、恶性心律失常等;与假手术组、5 万微球组、10 万微球组比较,15 万微球组、25 万微球组存活率显著下降(均  $P < 0.05$ ),其中 25 万微球组下降更为明显( $P < 0.01$ )。

## 2.2 小型猪心功能指标的变化情况

术后 9 h,以心脏超声检测 LVEF、FS、CO 和

LVEDd 值评价小猪心功能,结果发现,与假手术组相比,5 万微球组心功能略有降低,但差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ),10 万微球组、15 万微球组、25 万微球组心功能均显著下降,表现为心肌收缩功能障碍和左心室扩张,即 LVEF、FS、CO 下降( $P < 0.05$ )以及 LVEDd 增加( $P < 0.05$ );其中小型猪 LVEF 与微栓塞球的数目成显著负相关( $r = -0.74, P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. 各组小型猪心功能指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Changes of cardiac function in each group( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	例数	LVEF	FS	CO(L/min)	LVEDd(mm)
假手术组	5	66.25% ± 1.83%	40.03% ± 4.59%	3.92 ± 0.92	3.56 ± 0.29
5 万微球组	5	63.26% ± 3.27%	38.59% ± 7.06%	3.90 ± 0.69	3.91 ± 0.23
10 万微球组	5	54.39% ± 3.99% <sup>a</sup>	30.26% ± 8.11% <sup>a</sup>	3.41 ± 0.89 <sup>a</sup>	4.62 ± 0.32 <sup>a</sup>
15 万微球组	5	50.19% ± 3.32% <sup>a</sup>	26.34% ± 7.92% <sup>a</sup>	2.89 ± 0.76 <sup>a</sup>	5.05 ± 0.41 <sup>a</sup>
25 万微球组	5	40.84% ± 3.05% <sup>a</sup>	21.43% ± 6.48% <sup>a</sup>	2.35 ± 0.63 <sup>a</sup>	5.87 ± 0.56 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与假手术组比较。

## 2.3 CME 的病理学观察

HBFP 染色结果显示,假手术组偶见心内膜下缺血,未见明显的梗死灶。5 万微球组光镜下微动脉内偶见微栓塞球,10 万微球组、15 万微球组、25 万微球组光镜下微动脉内均可见微栓塞球,一个或

几个聚集在一起,周围出现微梗死灶,多为楔形,呈局灶性分布(图 1)。HE 染色示微梗死灶内心肌细胞核溶解或消失,胞浆红染,周边心肌水肿、变性,周围炎性细胞浸润和红细胞渗出(图 2)。

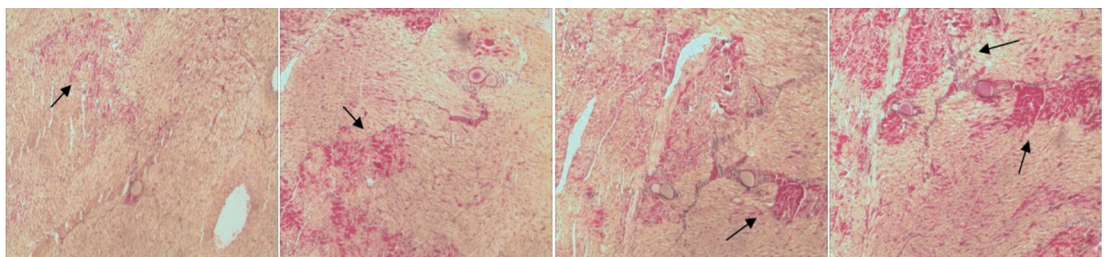


图 1. HBFP 染色显示 CME 各组心肌微梗死灶( $\times 200$ ) 从左到右依次为 5 万微球组、10 万微球组、15 万微球组、25 万微球组。缺血心肌红染,箭头示微梗死灶。

Figure 1. Microinfarction of HBFP staining in each coronary microembolization group( $\times 200$ )

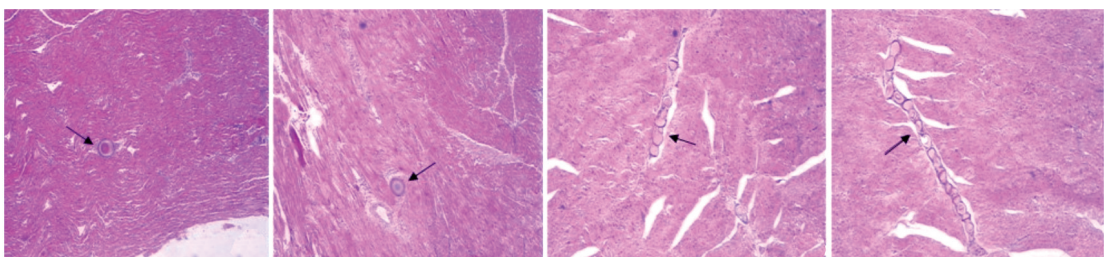


图 2. HE 染色显示 CME 各组心肌微梗死灶( $\times 200$ ) 从左到右依次为 5 万微球组、10 万微球组、15 万微球组和 25 万微球组。箭头示微球。

Figure 2. Microinfarction of HE staining in each coronary microembolization group( $\times 200$ )

## 2.4 心肌微梗死面积

假手术组未见明显的微梗死灶, CME 组均可见微梗死灶局灶性分布, 单个微梗死灶形状、面积类似, 不同 CME 组导致的微梗死面积不同, 5 万微球组、10 万微球组、15 万微球组、25 万微球组微梗死面积分别为  $4.62\% \pm 2.17\%$ 、 $9.23\% \pm 3.97\%$ 、 $12.24\% \pm 4.73\%$ 、 $21.52\% \pm 6.19\%$ 。与 5 万微球组比较, 10 万微球组、15 万微球组和 25 万微球组微梗死面积显著增加 ( $P < 0.05$ )。心肌微梗死面积与微栓塞球数目成显著正相关 ( $r = 0.87, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

CME 是急性冠状动脉综合征斑块破裂和桥血管介入治疗过程中常见的并发症, 一旦发生, 无论冠状动脉内应用溶栓剂、硝酸甘油、钙离子拮抗剂 (如异搏定)、血小板 GP II b/III a 受体抑制剂等措施均不能显著改善患者近期或远期预后, 它是影响冠状动脉微循环灌注的主要原因<sup>[7,8]</sup>。

近年来 CME 已引起广大研究学者们的关注, 越来越多的动物研究用来模拟并探讨临床冠状动脉性心脏病介入治疗过程所出现的 CME 导致心肌损伤的机制, 猪的心脏结构较狗或羊等动物而言更为接近于人的心脏, 故以冠状动脉介入的方式建立猪 CME 模型最为贴近临床上 CME 发生的病理生理情况<sup>[5]</sup>。大量的研究已表明<sup>[9]</sup>, CME 所导致的心功能障碍主要与炎症密切相关, TNF- $\alpha$  是参与其心功能损害的重要炎症因子, 由于开胸造模会导致全身的炎症反应并干扰微血管栓塞的细胞因子变化, 从而影响 CME 发生的病理生理机制的探讨, 故该方法造模已基本淘汰。虽然 Ma 等<sup>[10]</sup>研究发现经导管技术制作 CME 的模型能较传统的开胸造模更好地用于 CME 发病机制的研究, 但是其评价 CME 模型造模成功标准并不统一, 仅仅从血流改变或者组织学单方面评价造模后效果, 并且造模所用微球量也不一致, 忽略了 CME 造模成功的量化指标, 因此, 本研究通过经皮微导管介入技术, 以巴马小型猪为实验对象, 建立猪的急性 CME 模型, 通过注射不同微球量, 观察心功能和组织学方面的指标, 探索急性 CME 大动物造模成功的最佳条件。

研究证实, 急性 CME 能导致心功能进行性的下降, 心功能在 CME 后 6~9 h 达到最低点后逐渐恢复, 约 1 周恢复正常, 而心功能的改变与局部心肌血流的改变无关。此外, 研究还发现 CME 后局部心肌血流先上升后下降, 主要是由于缺血心肌释放的内

源性腺苷促使心肌未发生 CME 部位开放毛细血管床有关<sup>[11]</sup>。因此, 评价急性 CME 模型造模成功标准应该从微血栓、微梗死面积和血液动力学的指标, 如: LVEF、FS、CO、LVEDd 等方面去探讨。我们在预实验中也发现心功能在 CME 后 9 h 时达到最低, 因此本研究选择 CME 后 9 h 为实验观测时间点。

本研究发现小型猪心功能随微栓塞球数目增加而下降, 并为之呈负相关, 当微球数达到 15 万以上时, 小型猪的心功能明显下降并且死亡率明显增加, 25 万微球组有 50% 死于急性左心衰竭, 考虑与心肌微梗死面积显著增加有关。研究表明<sup>[12,13]</sup>, 各种 CME 模型的微梗死面积因所用模型和测量方法不同而有差异, 但梗死面积均比较小, 一般认为与栓塞后心功能的明显改变无关。故 15 万和 25 万微球数用于制作 CME 模型会明显增加动物的梗死面积, 进而增加死亡率, 影响了 CME 后致心功能损伤的主要因素的判断, 不符合 CME 实际的病理生理改变, 不宜推广。

此外, 本研究发现假手术组中未见明显微梗死灶, 仅在心内膜下可见散在的点状心肌缺血, 而 CME 各组均可见微梗死灶, 不同微球组导致的微梗死面积不同, 10 万、15 万、25 万微球组基本在每张切片上均可以找到明显的微梗死灶。5 万微球组虽然也有微梗死灶出现, 但是我们发现要找到微梗死灶相对困难许多, 需要连续切片多张。此外, 5 万微球组虽然对心功能也有一定的影响, 但与假手术组比较无明显统计学意义, 不符合 CME 后血液动力学改变。

结合心功能结果, 我们可以发现, 10 万微球组小型猪的心功能比较符合既往大多数 CME 动物模型的心功能变化, 并且其基本在每张切片上均可以找到明显的微梗死灶, 一定程度上反映了急性 CME 自然演变的病理生理过程。因此, 我们认为 10 万微球是较理想的构建小型猪 CME 模型所需的微球数目。

综上所述, 经微导管于左前降支中段注射 10 万计数微球可以成功制作小型猪急性 CME 模型, 能较好的模拟临床 CME 发生的病理生理情况, 值得推广。

### [参考文献]

- [1] Zimarino M, Affinito V. The prognosis of periprocedural myocardial infarction after percutaneous coronary interventions[J]. *Cardiovasc Revasc Med*, 2013, 14: 32-36.

- [2] Otto S, Seeber M, Fujita B, et al. Microembolization and myonecrosis during elective percutaneous coronary interventions in diabetic patients: an intracoronary Doppler ultrasound study with 2-year clinical follow-up [J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107: 289.
- [3] 胡信群, 刘振江, 方臻飞, 等. 延迟支架植入在高血栓负荷急性心肌梗死急诊介入治疗中的应用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2010, 35(5): 483-486.
- [4] Su Q, Li L, Liu YC, et al. Effect of metoprolol on myocardial apoptosis and Caspase-9 activation after coronary microembolization in rats[J]. *Exp Clin Cardiol*, 2013, 18: 161-165.
- [5] Ma JY, Qian JY, Jin H, et al. Acute hyperenhancement on delayed contrast-enhanced magnetic resonance imaging is the characteristic sign after coronary microembolization [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122: 687-691.
- [6] 傅发源, 张飞龙, 陈良龙. 瑞舒伐他汀对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌局部炎症反应及左心室功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(11): 907-911.
- [7] Grube E, Schofer JJ, Webb J, et al. Evaluation of a balloon occlusion and aspiration system for protection from distal embolization during stenting in saphenous vein grafts [J]. *Am J Cardiol*, 2002, 89: 941-945.
- [8] Kunadian V, Zorkun C, Williams SP, et al. Intracoronary pharmacotherapy in the management of coronary microvascular dysfunction[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2008, 26: 234-242.
- [9] 林运灵, 王伟伟, 陈宇宁, 等. 丙酮酸乙酯干预大鼠冠状动脉微栓塞对肿瘤坏死因子  $\alpha$ , 白细胞介素  $1\beta$  的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(5): 371-374.
- [10] Ma J, Qian J, Ge J, et al. Changes in left ventricular ejection fraction and coronary flow reserve after coronary microembolization[J]. *Arch Med Sci*, 2012, 8: 63-69.
- [11] Dorge H, Neumann T, Behrends M, et al. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279: H2 587-592.
- [12] Li L, Zhao X, Lu Y, et al. Altered expression of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with reduced cardiac function in rats following coronary microembolization [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 342: 183-190.
- [13] Li L, Su Q, Wang Y, et al. Effect of atorvastatin (Lipitor) on myocardial apoptosis and caspase-8 activation following coronary microembolization[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61: 399-406.

(此文编辑 许雪梅)