

[文章编号] 1007-3949(2008)16-03-0189-04

• 实验研究 •

置入铜丝缠绕型支架制作猪急性心肌梗死模型

赵慧强, 韩雅玲, 王守力, 崔继福, 王斌, 荆全民, 马颖艳, 栾波

(中国人民解放军沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 辽宁省沈阳市 110016)

[关键词] 病理学与病理生理学; 急性心肌梗死; 冠状动脉; 支架; 动物模型

[摘要] 目的 探讨在猪冠状动脉内置入铜丝缠绕型支架制作急性心肌梗死模型的可行性, 建立一种新的急性心肌梗死模型方法。方法 16 头中国实验用小型猪经股动脉穿刺, 在前降支置入自制的铜丝缠绕型支架。1 周内观察心肌钙蛋白 I、心电图、心脏超声和冠状动脉造影。然后处死取出心脏, 取目标冠状动脉和心肌, 做病理学检查。结果 16 头小型猪均发生了心肌梗死。梗死发生后死亡 2 头, 其中 1 头在术后 8 h 猝死, 1 头在术后 1 周冠状动脉造影复查时死于麻醉中; 其余 14 头均存活在 1 周以上, 完成复查, 总的成功率为 87.5%。结论 该模型制作具有操作简单、创伤小、成本低、死亡率低、成功率高等诸多优点, 可作为较好的实验研究动物模型。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Replication of Acute Myocardial Infarction by Implanting Copper-stent in Coronary Artery of Pig

ZHAO Hui-Qiang, HAN Ya-Ling, WANG Shou-Li, CUI Ji-Fu, WANG Bin, JING Quan-Min, MA Ying-Yan, and LUAN Bo

(Department of Cardiology, Shenyang General Hospital, Cardiovascular Research Institute of PLA, Shenyang 110016, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Coronary Artery; Stent; Animal Model

[ABSTRACT] **Aim** To explore and establish a new pig model of acute myocardial infarction. **Methods** Self-made copper stents were implanted in left anterior descending coronary arteries of 16 pigs. Troponin I, echocardiography, coronary angiography, electrocardiogram and pathologic evaluation were performed to confirm AMI at one week after procedure. **Results** The model of myocardial infarction was successfully established in 14 of the 16 pigs and the success rate was 87.5% (14/16).

One pig had sudden death at 8 hours and another died during anaesthesia at one week after procedure. **Conclusion** The method of establishing the pig model of myocardial infarction by implanting copper-stent in coronary artery is simple, convenient, safe and has a relatively high success rate and low mortality.

急性心肌梗死模型是研究急性心肌梗死的重要物质基础。目前建立动物急性心肌梗死模型的方法较多, 有结扎冠状动脉法、球囊封闭法^[1,2]、栓塞法^[3,4]、钳夹法^[5]、血栓形成法^[6]等。但都存在一些缺点, 如需要开胸, 手术创伤大且术后不易存活; 或者冠状动脉闭塞过快, 容易导致恶性心律失常和猝死; 以及操作繁杂、时间长等。本研究采用在猪的冠状动脉内置入铜丝制作的缠绕型支架的方法, 使之产生血栓性闭塞和心肌梗死, 试图建立一种新的、简单、安全、有效的急性心肌梗死模型方法。铜丝支架成本较低, 可以采用经皮冠状动脉介入治疗的方法置入冠状动脉内, 支架在 X 光下显影, 手术操作简单, 创伤小, 而且还可以介入开通进行介入治疗的相关研究。

1 材料和方法

1.1 动物

16 头中国小型猪由沈阳军区总医院全军二级实验动物中心提供, 体重为 25~30 kg, 雌雄不限, 6~8 月龄。

1.2 支架制作

采用直径 0.1 mm 的铜丝, 制作缠绕型支架, 形态为螺旋状的正弦曲线波。支架直径为 1.5 mm, 长度为 12 mm (图 1)。



图 1. 铜丝支架图 A 为制作好的支架, B 为球囊扩张后的支架。

1.3 模型复制方法及成功标准

术前 3 天口服巴米尔(阿斯利康公司)300 mg/d。

[收稿日期] 2007-11-27 [修回日期] 2008-03-10

[基金项目] 辽宁省科技攻关计划项目(20072250048)

[作者简介] 赵慧强, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病介入治疗, 联系电话为 024-23051120, E-mail 为 zhaohq05@yahoo.com.cn。通讯作者韩雅玲, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 全军心血管病研究所所长, 研究方向为冠心病介入治疗。王守力, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗。

手术当日以氯胺酮 6~8 mg/kg、阿托品 0.5 mg 肌注, 戊巴比妥钠 40 mg/kg 行腹腔注射麻醉。呈仰卧位缚于导管床, 以静脉留置针穿刺耳静脉建立静脉通道并予以心电监护。手术分离左侧或右侧股动脉, 成功后以桡动脉穿刺针穿刺, 置入 6 F 桡动脉鞘管, 随后给予肝素 200 IU/kg。用 JR 3.5 指引导管行选择性冠状动脉造影。选择 2.0×15 mm 负压球囊, 将支架置于球囊外表面, 采用经皮冠状动脉介入治疗技术置入左前降支, 以 6~8 atm 的压力释放支架。在支架置入后 1 h、3 h 复查造影观察冠状动脉闭塞情况。手术结束后缝合或结扎股动脉, 缝合皮下、皮肤, 给予青霉素肌注 400 万单位/d, 共 5 d。成功标准为猪能存活到完成冠状动脉造影复查, 且冠状动脉造影复查证实血管完全闭塞或病理学证实心肌梗死。

1.4 术后观察

分别在术后 1 h、3 h 和 1 周时复查冠状动脉造影。观察目标血管闭塞情况及侧枝循环情况(采用 rentrop 分级)。分别于术前、术后 1 周行心脏超声检查。分别在术前、术后 1 周做 12 导联心电图。术后 24 h 内持续心电监护。

1.5 心肌肌钙蛋白 I 检测

分别在术前, 术后 4 h、8 h、12 h、16 h、24 h、2 d、3 d 和 4 d 取静脉血, ELISA 法检测血清肌钙蛋白 I 浓度, 试剂盒由大连泛邦公司提供。

1.6 病理学观察

造影复查证实闭塞后随机取 5 头猪处死。立即取出心脏, 迅速分离出目标冠状动脉, 剪下后用 4% 多聚甲醛固定, 支架段血管取出支架后石蜡包埋, 切片, HE 染色。沿支架远端向血管远端注射 1% Evans, 显示目标冠状动脉供应区域, 在此区域内垂直于左室长轴从心尖向心底切片, 厚度 0.5 cm, 置入 1% 三苯基四氮唑中染色, 37℃ 孵育 30 min, 观察颜色变化。再取梗死区心肌标本, 4% 多聚甲醛固定, 行石蜡包埋, 切片, HE 染色; 另取部分梗死心肌标本戊二醛固定, 行透射电镜检查。

2 结果

2.1 存活情况

16 头小型猪中共 2 头死亡, 1 头于术后 8 h 猝死, 1 头在术后 1 周复查冠状动脉造影时死于麻醉中, 其余 14 头均存活在 1 周以上完成复查(5 头 1 周后处死, 另 9 头存活在 3~6 个月以上), 总死亡率为 12.5% (2/16)。

2.2 冠状动脉造影结果

14 头小型猪完成了冠状动脉造影复查。在术后 1 h、3 h 均未发生狭窄或闭塞, 在 1 周时复查均发生了完全闭塞。闭塞出现 1 级侧枝循环 2 例, 2 级 2 例(来自右冠状动脉或回旋支), 0 级 10 例(图 2, A 为术前造影, B 为术后 1 周复查造影, 可见前降支完全闭塞)。

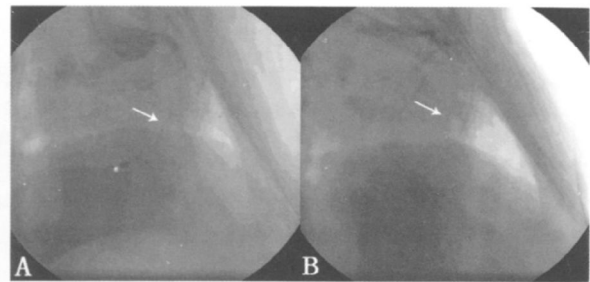


图 2. 冠状动脉造影结果 A 为术前, B 为术后 1 周。

2.3 心脏超声

14 头小型猪术前心脏二维超声检查均正常; 术后 1 周检查发现心室前间隔、心尖、左心室前壁发生运动减弱或消失、矛盾运动(可见室壁呈矛盾运动, 收缩期向外膨出, 舒张期向内突入, 图 3)。

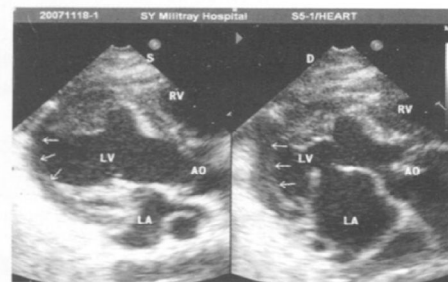


图 3. 室壁呈矛盾运动的超声心动图 S 为收缩期, D 为舒张期, LV 为左心室, LA 为左心房, AO 为主动脉, RV 为右心室。

2.4 心电图和心电监护

1 头猪术后 1 h 内发生室颤, 经 300 J 非同步电复律后恢复窦性心律, 成功存活, 2 头在 24 h 内出现室早、短阵室速。总的室性心律失常发生率为 18.8% (3/16)。术后 1 周复查心电图 V1~4 出现异常 Q 波, V5、V6 呈 rS 形, 3 头猪心电图还在 ①、② aVF 导联显示异常 Q 波。

2.5 心肌肌钙蛋白检测

置入支架 16 h 后心肌肌钙蛋白开始升高, 平均在术后 24 h 以后达到峰值, 然后逐渐下降, 96 h 后接近术前水平。

表 1. 猪术前、术后各时间点的血浆肌钙蛋白浓度 ($\mu\text{g/L}$)

时 间	Tnl
术前	0.6 ± 0.2
术后 4 h	0.7 ± 0.1
术后 8 h	0.6 ± 0.1
术后 12 h	0.8 ± 0.2
术后 16 h	3.1 ± 0.7^b
术后 24 h	25.6 ± 6.4^b
术后 2 d	17.8 ± 4.3^b
术后 3 d	5.2 ± 2.3^b
术后 4 d	1.4 ± 0.5^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与术前比较。

2.6 病理学结果

肉眼观察支架段以远的血管供应区域, 梗死区域心肌呈灰白色, 而正常心肌为红色(图 4); 梗死心肌在三苯基四氮唑中孵育后呈砖红色或鲜红色, 正常心肌不染色, 梗死区主要位于心尖部、前间隔、前壁, 部分出现在靠近心尖的膈面心肌; 支架段血管 HE 染色显示管腔内主要为正在机化的血栓, 可见大量的纤维母细胞和条索状的纤维素(图 5); 梗死区心肌 HE 染色, 低倍镜下可见大量心肌坏死(心内膜下尚有一层存活的心肌), 炎症细胞浸润; 高倍镜下可见肌纤维溶解断裂、消失, 炎症反应剧烈, 炎症细胞主要为巨噬细胞及少量的嗜碱性粒细胞(图 6); 透射电镜可见正常心肌肌丝排列整齐, 肌小节清楚, Z 线和 M 线清晰可见, 线粒体正常; 梗死心肌出现肌丝溶解、断裂、消失, 肌小节无法辨认, 线粒体减少, 且膜不完整, 嵴大量溶解, 线粒体呈空泡状(图 7)。

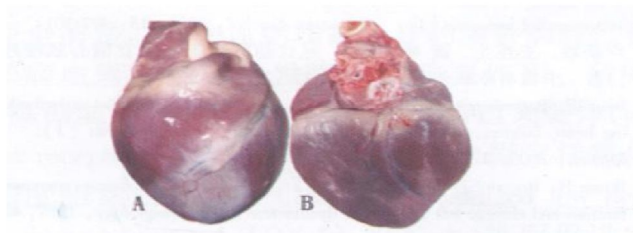


图 4. 发生心肌梗死的心脏 A 为前面观, B 为后面观。

3 讨论

在当前用于制作急性心肌梗死模型的动物中, 猪的循环系统在解剖和生理上与人最类似, 因此在有条件的单位往往成为制作心血管病动物模型的首选动物。当前制作急性心肌梗死模型的方法均存在一定的缺点^[7]: 如死亡率高, 操作繁杂费时等, 因此建立一种新的、简单、安全、有效的急性心肌梗死模型方法很有必要; 而且随着冠心病介入治疗的发展,

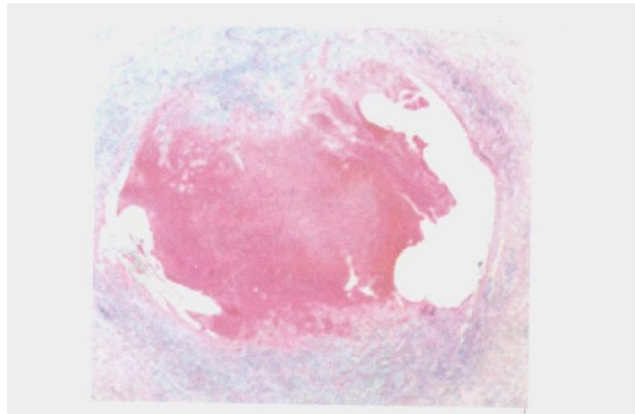


图 5. 闭塞段的 HE 染色(40) 空白处为支架孔。

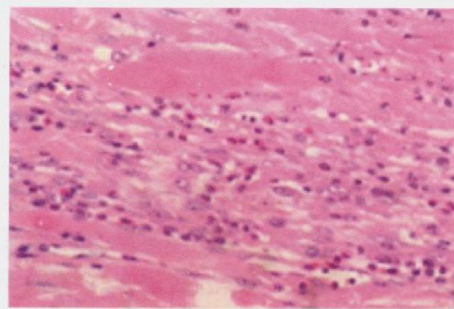


图 6. 梗死心肌的 HE 染色(400)

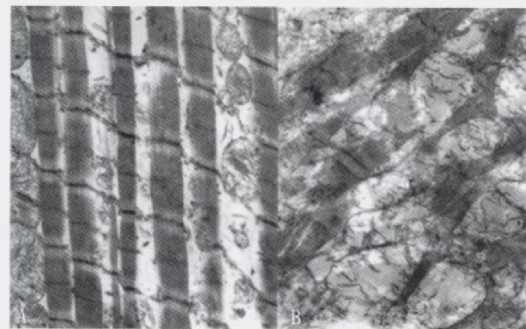


图 7. 心肌的透射电镜(4000) A 为正常心肌, B 为梗死的心肌。

也需要相关的动物模型进行新的介入器械、治疗策略等方面的研究, 而当前的方法均不能满足在闭塞冠状动脉病变处进行介入治疗的要求。近年来, 有学者使用镀铜支架置入动物血管内使之产生完全闭塞, 效果较好^[8], 但成本较高, 还需要在支架表面镀铜。作者对此法进行改进, 采用 0.1 mm 铜丝制作缠绕型支架, 再置入冠状动脉内制作心肌梗死模型, 降低了成本, 而且制作方法较为简单。本研究主要探讨该方法的可行性和安全性。

研究结果显示 16 头小型猪冠状动脉均发生了完全闭塞, 产生了心肌梗死, 血栓闭塞率为 100% (16/16)。提示在没有预先球囊损伤血管, 或没有动脉粥样硬化的基础之上直接置入铜丝支架也可以产

生完全闭塞;结果还显示闭塞病变在1周时仍有一定的炎症反应,在支架孔周围最为明显,病变已开始机化,纤维素减少,大量纤维母细胞出现(但支配区域的梗死心肌尚未开始机化,炎症反应仍然很严重)。铜丝支架引起血管闭塞的主要机制可能为:支架表面的铜离子吸引带负电的血液成分(血小板、红细胞、白细胞等)黏附,形成血栓;④支架置入的机械损伤,损伤内皮,促发血栓形成;⑤支架局部血管内膜的无菌性炎症反应。

关于发生心肌梗死的时间,术后1 h、3 h 冠状动脉造影均未发现狭窄或闭塞,而术后的肌钙蛋白测定显示:在术后16 h 开始明显升高,提示此时发生了急性心肌梗死,而冠状动脉的闭塞应在之前2~4 h,即术后12~14 h。

本研究中有14头存活到1周以完成复查,5头在1周时处死,其余均可存活到3个月以上,总的模型制作成功率在87.5%(14/16)。16头动物中有一头在置入支架后8 h 后死亡,考虑是因为支架置入的位置过高,即靠近左前降支近端,所以梗死面积很大,考虑死亡原因为心源性休克。经尸体解剖证实为左室大面积梗死,前降支血栓闭塞;另1头在存活1周后拟复查冠状动脉造影时麻醉中死亡,分析主要原因可能为心肌梗死后心功能不全、肺淤血,导致对麻醉剂和麻醉过程耐受性降低,戊巴比妥钠麻醉后抑制呼吸又未能及时气管插管人工辅助呼吸而最终死亡,尸检及病理学检查证实发生了血栓闭塞和心肌梗死。因此建议在置入支架时位置不宜过高,放置在第一对角支甚至第二对角支以后的前降支部分较为安全;另外,在对梗死后的动物手术时应注意减少麻醉药的用量,注意其对循环、呼吸功能的影响。

本方法动物死亡率低的原因除了创伤较小,操作时间短外,还可能是因为置入支架后引起的血栓闭塞较结扎冠状动脉和直接填充异物堵塞血管更为缓慢,使发生恶性室性心律失常的几率降低,死亡率降低。造影显示闭塞均在术后3 h 以后,据肌钙蛋白和心电监护推测应在术后8~12 h 左右。铜丝支架置入血栓生长可能需要一定的时间;最主要的是支架置入时球囊选择合适(1~1.1:1)、扩张压力也过高,没有造成血管撕裂,使血栓生长较慢;术前服用阿司匹林,术中肝素也可能有一定作用。

在以氯胺酮诱导麻醉的同时应注射阿托品以减少呼吸道分泌物和气管痉挛的发生,必要时术中可

再次使用阿托品。戊巴比妥有一定抑制呼吸的作用,因此术中应密切注意呼吸情况,一旦发生呼吸停止,应立即气管插管,连接呼吸机或人工气囊挤压辅助呼吸,动物一般能逐渐恢复自主呼吸。建立静脉通路、心电监护等也很重要和必要。本实验使用静脉留置针穿刺耳静脉并留置24 h 左右,既方便术中、术后补液、给药,也能用于术后取血。

文献报道猪的正常心率在55~60次/min。但在本实验中发现,由于应激、麻醉等原因,麻醉后猪的心率可达160~250次/min,心率过快,影响实验操作;还可使动物心脏舒张期缩短,心肌灌注不足,心肌耗氧量增加,有可能引起心肌缺血缺氧及心功能不全,对手术和麻醉的耐受力降低。因此,在术中应注意避免猪的心率过快,当猪的心率超过180次/min时可给予倍他乐克(用量为5~15 mg)静脉注射,维持其心率在160次/min以下,通常比较安全。

总之,本方法是制作大体动物心肌梗死的一种安全有效的方法,主要优点有:成本低,支架制作简单;④操作简单而且手术时间短,常规的PCI操作技术即可完成;⑤不需开胸,创伤小,仅分离股动脉穿刺即可;⑥发生恶性心律失常及猝死的几率低,总死亡率低;⑦支架经扩张后贴壁,可以进行再次介入开通,进行相关研究;⑧闭塞处主要病理变化仍是血栓形成,闭塞管腔的仍是血栓而不是其他异物;⑨模型制作成功率高。

[参考文献]

- [1] Odenstedt J, Mansson C, Jansson SO, et al. Endocardial electromechanical mapping in a porcine acute infarct and reperfusion model evaluating the extent of myocardial ischemia [J]. *J Invasive Cardiol*, 2003, **15**: 497-501.
- [2] 卢新政, 王连生, 黄峻, 等. 冠状动脉闭塞建立猪心肌梗死模型[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 218-220.
- [3] Issa ZF, Rosenberger J, Groh WJ, et al. Ischemic ventricular arrhythmias during heart failure: a canine model to replicate clinical events [J]. *Heart Rhythm*, 2005, **2** (9): 979-983.
- [4] Ikram H, Rogers SJ, Charles CJ, et al. An ovine model of acute myocardial infarction and chronic left ventricular dysfunction [J]. *Angiology*, 1997, **48** (8): 679-688.
- [5] Palmaers T, Albrecht S, Leuthold C, et al. Post-resuscitation haemodynamics in a novel acute myocardial infarction cardiac arrest model in the pig [J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2007, **24** (7): 580-588.
- [6] Edwards R, Yousef Z, Rakhit R, et al. A model of closed chest regional myocardial infarction in the rabbit: a clinically relevant in vivo system of post-infarction remodelling [J]. *Basic Res Cardiol*, 2002, **97** (5): 374-383.
- [7] 孙慧君, 范江霖. 心肌梗死动物模型研究的最新进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 113-114.
- [8] Song W, Lee J, Kim H, et al. A new percutaneous porcine coronary model of chronic total occlusion [J]. *J Invasive Cardiol*, 2005, **17** (9): 452-454.

(此文编辑 李小玲)