

# 经皮冠状动脉栓塞法建立猪急性心肌梗死模型及缺血修饰白蛋白水平的动态变化

王丽平, 王绍欣, 段娜娜, 程建新, 汪砚雨, 王可, 刘相勇, 魏利娟, 孟雅丽

(河南科技大学第一附属医院心内科, 河南省洛阳市 471003)

[关键词] 急性心肌梗死; 冠状动脉栓塞; 缺血修饰白蛋白; 动物模型; 猪

[摘要] **目的** 探讨经皮冠状动脉明胶海绵栓塞法建立猪心肌梗死模型, 观察猪急性心肌梗死(AMI)早期血清缺血修饰白蛋白(IMA)的动态变化。**方法** 选用中华小型猪16只, 麻醉后经股动脉穿刺, 行冠状动脉造影后经微导管注入明胶海绵堵塞猪钝缘支。分别在术前及术后10、30 min和1、2、3、4、6、8、10、12、24、48 h抽血观察IMA的动态演变。于术后1、3、5、7、10天处死猪, 取出心脏, 取心肌组织做病理学检查。**结果** 15头猪心肌梗死造模成功, 心电图、心脏标本、病理切片均显示典型心肌梗死改变。IMA在猪心肌梗死后10 min后即开始升高, 6 h达峰值, 48 h降至正常范围。**结论** 经皮冠状动脉明胶海绵栓塞法建立猪AMI模型科学可靠, 简单易行, 可重复性强。IMA是AMI早期的敏感指标, 血清IMA水平的动态检测对AMI的早期诊断有一定的临床意义。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Swine Model of Acute Myocardial Infarction Established by Percutaneous Coronary Artery Embolism and Dynamic Changes of Ischemia Modified Albumin

WANG Li-Ping, WANG Shao-Xin, DUAN Na-Na, CHENG Jian-Xin, WANG Yan-Yu, WANG Ke, LIU Xiang-Yong, WEI Li-Juan, and MENG Ya-Li

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

[KEY WORDS] Acute Myocardial Infarction; Coronary Artery Embolism; Ischemia Modified Albumin; Animal Model; Swine

[ABSTRACT] **Aim** To establish the swine model of myocardial infarction by percutaneous coronary artery embolism with gelatin sponge, and to observe the dynamic changes of early serum ischemia modified albumin (IMA) in swine with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** 16 Chinese mini-swines were via femoral artery puncture after anesthesia, and obtuse marginal branch was blocked by injecting gelatin sponge via micro catheter after coronary artery angiography. The dynamic changes of IMA were observed by continuously measuring serum IMA in the preoperative and postoperative 10, 30 min and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 h. The swines were sacrificed at 1, 3, 5, 7, 10 days after the AMI, and specimens of the myocardium were taken for histopathological examination. **Results** The 15 mini-swine models of myocardial infarction were established successfully, and AMI was confirmed by electrocardiogram, cardiac specimen and histopathological examination. IMA began to rise after 10 min and arrived the highest serum concentration in 6 h, and decreased to normal range in 48 h after AMI. **Conclusions** The method of swine AMI model established by percutaneous coronary artery embolism with gelatin sponge is scientifically reliable, simple, and repeatable. IMA is sensitive marker in the early of AMI, and dynamic detection of serum IMA level has certain clinical significance in early diagnosis of AMI.

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是常见的急危重症, 因其发病、致残、致死率高

而越来越受到人们的关注。在AMI早期心肌缺血的表现形式多种多样, 寻求一种简单、快速的方法

[收稿日期] 2014-09-14

[修回日期] 2015-01-03

[作者简介] 王丽平, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管介入, E-mail 为 2639647095@qq.com。通讯作者王绍欣, 硕士, 主任医师, 研究方向为心血管介入, E-mail 为 wsxdoctor@163.com。段娜娜, 硕士, 住院医师, 研究方向为心血管内科。

来早期识别 AMI 患者是至关重要的。心肌标志物的检测在诊断 AMI 方面发挥着主要作用,2012 年欧洲心脏病学会(European Society of Cardiology,ESC)在心肌梗死新的定义中也强调了心肌标志物的地位。AMI 患者由于就诊时间不确定,早期检测血清心肌标志物可能出现较大偏倚;而动物实验可准确控制心肌梗死的时间点,真实的反映心肌标志物的变化规律。近年研究表明缺血修饰白蛋白(ischemia modified albumin,IMA)是一个早期敏感的心肌缺血诊断指标,其敏感性显著高于传统的生物化学标志物<sup>[1]</sup>。本实验通过经皮明胶海绵栓塞冠状动脉法建立猪心肌梗死模型并观察 IMA 动态演变,为 AMI 的早期诊断提供实验数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

采用动物自身前后对照实验,选择中国动物实验用中华小型猪,由江苏泰州泰和生物科技有限公司提供,共 16 头,体重 10~20 kg,同种同窝,雌雄不限。实验过程中对动物的处理符合动物伦理学标准。

### 1.2 主要材料和仪器

介入材料(Guiding 导管、微导管、6F 动脉鞘管)、麻醉药品、抢救药品、试剂盒、酶标仪、心电监护仪、除颤仪等。

### 1.3 猪 AMI 模型制备

术前准备:术前禁食、禁水 8 h。肌注安定 10 mg,5 min 后,经猪耳缘静脉用静脉套管针建立静脉通路,缓慢静脉推注氯胺酮(10 mg/kg)麻醉后,将小型猪取仰卧位固定至导管床上,静脉推注阿托品(25  $\mu$ g/kg)抑制猪口腔分泌物,保持呼吸道通畅,呼吸机及除颤仪备用。连接心电监护仪电极及四肢导联,心率 160~200 次/分。在手术过程中根据猪肢体活动情况静脉轮流追加氯胺酮(每次 20 mg)及安定(每次 5 mg),观察生命体征,避免呼吸抑制。

手术方法:①达到麻醉理想状态后,常规消毒、铺巾,用桡动脉穿刺针以 Seldinger 法穿刺猪右侧股动脉,将 6F 桡动脉鞘植入猪股动脉,鞘内注射肝素 10000 U,以后每隔 1 h 追加 2000 U。②在 X 射线血管造影机下,采用左前斜 45°,在 J 型导丝的引导下,送 6F JR4.0 Guiding 导管至升主动脉根部,测压力为 165/130 mmHg,再分别进入左右冠状动脉,多体位造影,多体位投照,明确、分析冠状动脉分布。③将一 Runthrough NS 导丝送入回旋支远端,送另一

Runthrough NS 导丝至钝缘支(obtuse marginal ramus,OM),沿此导丝送入微导管至 OM,沿微导管缓慢匀速注入明胶海绵混悬液约 2 mL,造成钝缘支闭塞;冠状动脉造影显示钝缘支血流中断,成功建立心肌梗死模型。④撤出 Runthrough NS 导丝及微导管,在 J 型导丝引导下撤出指引导管,拔出桡动脉鞘,将锁骨下静脉管植入猪股动脉内,绷带加压包扎固定。⑤术后每天给予肝素 3000 U 皮下注射,口服阿司匹林每天 75 mg。

### 1.4 心肌标志物检测

分别于术前及术后 10、30 min 和 1、2、3、4、6、8、10、12、24、48 h 抽取猪耳缘静脉血,在 30 min 内以 3000 r/min 离心,分离出血清,放在 -80℃ 的冰箱保存待用。用双抗体夹心酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)法检测 IMA,试剂盒由艾莱萨生物科技(上海)有限公司提供;严格按照试剂盒说明书操作,用美国 BioTek 酶标仪完成测定。

### 1.5 病理检查

分别于术后 1、3、5、7、10 天将猪处死,取出心脏,用生理盐水灌洗干净,置于 40 g/L 甲醛液中固定 7 天。于左心室侧壁及后壁梗死区、缺血区和正常区中心切取 0.3 cm  $\times$  0.3 cm 的组织,分别用 70%、80%、90%、95%、100% 的乙醇脱水 2~4 h,二甲苯透明 30 min,再浸蜡、包埋,制成 4  $\mu$ m 厚的石蜡切片,进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色,光学显微镜下观察。

### 1.6 统计学处理

测得 IMA 数据用 SPSS 16.0 数据统计包处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 猪 AMI 模型建立情况

16 头中华小型猪在心肌梗死模型制作过程中,共有 15 头猪存活,且达到心肌梗死动物模型标准;另外 1 头在心肌梗死模型制作完成后 24 h 因烦躁、呼吸窘迫死亡,解剖后证实死于肺栓塞。

### 2.2 冠状动脉造影情况

15 头猪成功完成冠状动脉造影,明胶海绵混悬液均成功注入冠状动脉回旋支第一钝缘支,成功建立猪 AMI 模型。猪正常冠状动脉造影图像显示:钝缘支较粗大(图 1A);明胶海绵栓塞猪钝缘支近段后,远端血流消失(图 1B)。

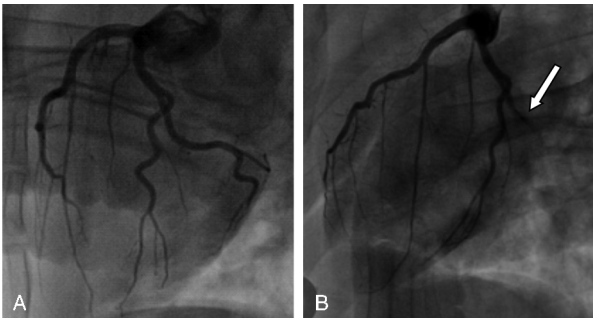


图 1. 明胶海绵栓塞钝缘支前后冠状动脉造影 A 为栓塞前;B 为栓塞后,白色箭头所指部位为明胶海绵栓塞钝缘支近段,远端血流消失。

Figure 1. Coronary angiography before and after OM artery embolised by gelatin sponge

2.3 心电图情况

明胶海绵混悬液栓塞猪冠状动脉第一钝缘支前,心电图正常,窦性心律,心率 214 次/分(图 2)。栓塞后,心电图显示:ST 段抬高,T 波高尖(图 2);表明发生了心肌梗死,猪 AMI 模型建立成功。

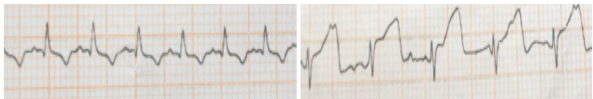


图 2. 明胶海绵栓塞钝缘支前后心电图变化 左图为栓塞前,右图为栓塞后。

Figure 2. Electrocardiogram changes before and after OM artery embolised by gelatin sponge

2.4 IMA 水平变化情况

中华小型猪 AMI 模型建立成功后血清 IMA 的浓度变化趋势:中华小型猪 AMI 后 10 min 血清 IMA 开始迅速升高,6 h 达到峰值,之后逐渐下降,48 h 时血清 IMA 浓度降至正常范围(图 3、表 1)。

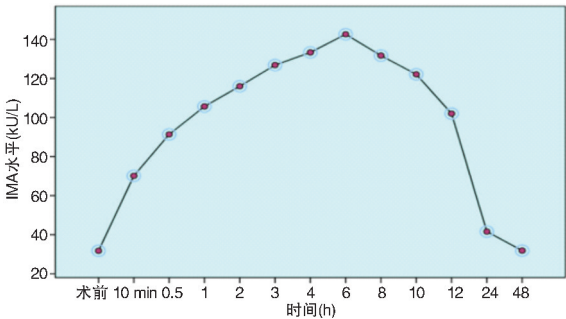


图 3. 造模前后 IMA 的浓度变化

Figure 3. Change of IMA concentration before and after model preparation

表 1. 猪心肌梗死模型建立前后各时间点血清 IMA 水平( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 1. Serum IMA levels at each time point before and after the establishment of swine model of myocardial infarction ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

时间	IMA( kU/L)	时间	IMA( kU/L)
术前	37.79 ± 0.16	术后 6 h	142.64 ± 0.39 <sup>a</sup>
术后 10 min	70.12 ± 0.19 <sup>a</sup>	术后 8 h	131.66 ± 0.41 <sup>a</sup>
术后 30 min	91.26 ± 0.42 <sup>a</sup>	术后 10 h	122.14 ± 0.32 <sup>a</sup>
术后 1 h	105.68 ± 0.15 <sup>a</sup>	术后 12 h	102.03 ± 0.53 <sup>a</sup>
术后 2 h	116.02 ± 0.33 <sup>a</sup>	术后 24 h	41.59 ± 0.60 <sup>a</sup>
术后 3 h	126.90 ± 0.30 <sup>a</sup>	术后 48 h	31.93 ± 0.38
术后 4 h	133.29 ± 0.55 <sup>a</sup>		

所有时间点血清 IMA 浓度采用重复测量方差分析, $F = 1.019 \times 10^4$ 。  
a 为  $P < 0.01$ ,与术前相比。

2.5 心脏大体标本观察

分别于术后 1、3、5、7、10 天处死中华小型猪,心脏标本可见 14 头猪心肌坏死部位基本一致,位于左心室的侧壁及后壁,梗死区室壁变薄,颜色灰白,随梗死时间延长质地变硬,凹陷(图 4)。



图 4. 模型建立后猪心脏大体标本

Figure 4. Swine heart specimen after model preparation

2.6 梗死心肌病理检测

心肌梗死区在左心室的侧壁及后壁,冠状动脉内有血栓阻塞。梗死心肌行 HE 染色,于光学显微镜下观察并摄片,结果显示,梗死区心肌细胞变性,胞质深染,核固缩消失,胞浆溶解,肌纤维断裂,纤维组织增生,横纹模糊,各种细胞排列紊乱,炎性细胞浸润(图 5)。未梗死心肌细胞排列整齐、形态正常、分界清楚,细胞核位于中心,胞浆染色均匀,心肌横纹可见。



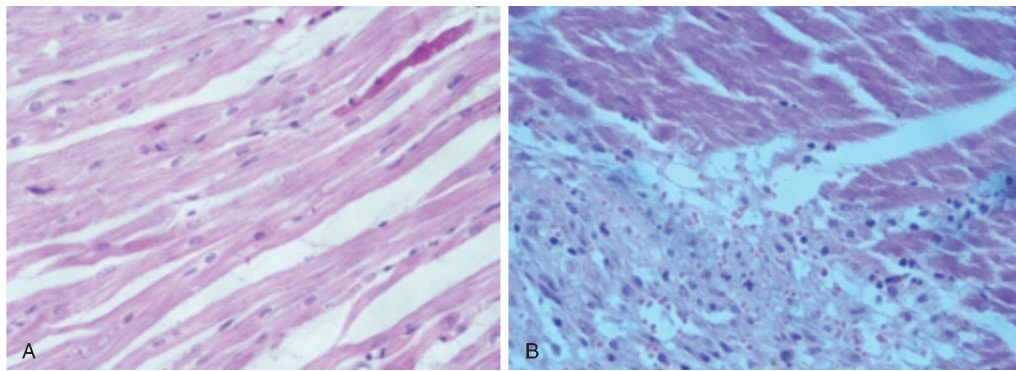


图 5. 猪梗死前后心肌组织 HE 染色 ( $\times 400$ ) A 为正常心肌细胞, B 为梗死后心肌细胞。

Figure 5. Myocardial tissue HE staining before and after infarction in swine ( $\times 400$ )

### 3 讨论

成功建立心肌梗死动物模型可为心肌标志物的研究搭建一个良好的平台,目前国内外多通过开胸结扎鼠、兔等小型动物的不同部位的冠状动脉建立 AMI 动物模型,但开胸结扎手术复杂、创伤大,术后恢复慢、易感染、死亡率高,且小动物与人的切合度偏低,不利于实验研究。随着介入治疗技术的成熟及普及,经皮腔内冠状动脉成形术建立心肌梗死模型对动物创伤小,死亡率低,术后容易饲养,恢复较快。猪在生理特点、疾病发生和冠状动脉解剖结构方面与人类相近,血管内膜和心肌损伤的机制和恢复的时间也与人类相似<sup>[2]</sup>。

本实验用 16 只中华小型猪,成功制备 AMI 模型 15 只,成功率 93.75%,成模率高于尹巧香等<sup>[3]</sup>用球囊堵闭法建立猪的 AMI 模型 (17/30, 56.67%)。本造模法的优势在于:采用 Seldinger 法穿刺猪股动脉来建立心肌梗死模型,和以往切开猪股动脉植入动脉鞘相比较,创伤小,简单易行,操作方便,可重复性强,国内外鲜有报道;成功穿刺后需选择合适的指引导管,因中华小型猪的升主动脉较短, JL3.5 造影导管不易对吻左冠状动脉, JR4.0 造影导管弯曲度较小,容易对吻猪的左冠状动脉且同轴性好,对冠状动脉的刺激性小,降低猪死亡率。明胶海绵栓塞和球囊堵闭猪冠状动脉相比较,可以避免血管再通,封堵彻底,动物恢复快;术中用微导管通路推注明胶海绵混悬液可以准确地堵塞较小的冠状动脉血管,较以往堵闭冠状动脉大血管所造成的心肌损伤小,可以较好地控制梗死心肌的面积,保持有效的心肌灌注来提高动物的存活率。猪侧支循环较少,对心肌缺血耐受性差,闭塞回旋支及较大冠状动脉极易引起大面积急性心肌梗死;因

此我们选择堵闭回旋支的分支 OM 支来避免此种情况的发生,堵闭猪 OM 支远端后,其心肌梗死心电图演变过程与人类接近。不同时间的心脏病理标本显示疤痕均位于左心室侧壁和后壁部位,与人体 OM 支闭塞后产生的位置一致。成功建立猪 AMI 模型为心肌标志物 IMA 的连续动态检测提供了良好的实验基础。

人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 由肝脏合成,含 585 个氨基酸,体内一系列金属离子可与其 N 末端的氨基酸序列结合。美国学者 Bar-Or<sup>[4]</sup>发现在生理情况下 N 末端的氨基酸序列与过渡金属钴、镍、铜等有很强的结合能力;而在心肌梗死早期心肌缺血时,缺血心肌局部血流灌注不足,氧供减少,组织细胞反应性氧产物增多、酸中毒,及自由基损害,使血清白蛋白的性质发生变化,导致了与过渡金属结合能力下降, HSA 转化为 IMA。Vasile 等<sup>[5]</sup>报道 IMA 在心肌缺血发作后 5~10 min 血中浓度即可升高。在心肌缺血或坏死早期,其他心肌坏死标志物均为阴性时, IMA 即作为高度敏感的缺血指标就可在血液中检出,可以帮助 AMI 的早期诊断,以便在疾病的可逆期内进行危险分层及干预来改善患者的预后,减少病死率。作为一种新的理想心肌标志物, IMA 成为第一个被美国食品药品监督管理局批准销售的心肌缺血标志物。

Dawie 等<sup>[6]</sup>对内科重症监护室的 25 例胸痛病人及 30 例健康志愿者进行 IMA 的检测研究,从心电图和心脏彩色超声来区分 AMI 和非 AMI,建立了 IMA 的参考范围, AMI 患者的平均 IMA 水平为  $83.0 \pm 6.6$  kU/L, 显著高于健康对照组的  $26.0 \pm 1.2$  kU/L ( $P = 0.0001$ ), IMA 的敏感性和特异性分别为 100.0% 和 83.5%, IMA 工作特征曲线下面积为 0.948, 可信区间为 0.940~0.983。Patil 等<sup>[7]</sup>、Gu-

rumurthy 等<sup>[8]</sup>对发病在 6 h 以内的急诊胸痛患者做了血清 IMA 变化的研究,AMI 和不稳定型心绞痛患者的血清 IMA 水平远高于非心脏性胸痛患者的血清 IMA 水平。以上研究表明 IMA 在 AMI 早期有较高的诊断价值,是心肌缺血开始时的敏感标志物,可作为诊断和评估心肌缺血或梗死的有效指标,在 AMI 的排除诊断和危险分层中发挥着重要的作用,以便临床上采取相应的治疗措施。

IMA 因其较高的敏感性近几年已引起了广泛的关注,现在多以急性胸痛患者为研究对象来探讨 AMI 后 IMA 的最早出现时间及演变规律。但 AMI 患者由于发病、就诊时间点不确定,心肌标志物的测定时间出现较大偏倚,而制作猪心肌梗死模型,可以人为地控制心肌梗死的时间来检测血清 IMA 动态演变规律,对临床研究及评价 IMA 检测的意义有一定的参考价值。本实验通过建立猪 AMI 模型,完整地反映了从心肌缺血到梗死的病理演变,比较客观、准确、科学的反映了 IMA 的动态变化过程。本实验发现,IMA 在心肌梗死后 10 min 迅速升高,6 h 达到峰值,之后开始逐渐下降,约 48 h 降至正常。传统的心肌标志物如心肌肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶在诊断 AMI 方面都有较高的特异性,但多在心肌损伤后 4~6 h 才会出现,在心肌缺血的可逆期内多检测不到<sup>[9]</sup>。IMA 高度的敏感性能在可逆期尚未发生心肌梗死情况下迅速检测出心肌缺血及损伤,有助于急诊室胸痛患者的早期诊断及排除急性心脏疾病,避免因漏诊冠状动脉病变而造成严重的后果;同时降低急诊胸痛病人的检查费用,减少其留院观察时间,患者受益的同时也能节约医疗资源,有一定的社会经济价值。

IMA 可随血液循环到达体内各个组织器官,在非心源性缺血的情况下如脑、肺、胃肠道和骨骼肌缺血时 IMA 也会增高,其特异性较低<sup>[10]</sup>;但其高度的敏感性适用于心肌肌钙蛋白阴性且心电图正常的胸痛患者的心肌缺血或心肌梗死的排除诊断。在诊断 AMI 时应结合其他的心肌生物化学标志物、心电图及临床症状、体征来综合分析,从而快速准确地诊断病情,让患者得到及时有效的治疗。现在主张对 AMI 患者同时检测心肌肌钙蛋白和 IMA,两者联合使用可提高诊断心肌梗死的灵敏度且可使确诊的时间提前。

制作猪心肌梗死模型来检测 IMA 的动态变化国内外少有报道。猪 IMA 的临界值范围是多少?如何指导实际临床的诊断、治疗?这些问题都值得探讨,有待于以后增加样本量来进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Dominguez Rodriguez A, Abreu Gonzalez P. Current role of ischemia-modified albumin in routine clinical practice[J]. Biomarkers, 2010, 15(8): 655-662.
- [2] Suzuki Y, Yeung AC, Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease[J]. J Biomed Biotechnol, 2011; 19:5483.
- [3] 尹巧香, 赵玉生, 王 姮, 等. 延迟增强核磁共振评估经皮球囊封堵冠状动脉法制备的小型猪心肌梗死模型[J]. 南方医科大学学报, 2013, 33(1): 34-39.
- [4] Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a maker for myocardial ischemia--a preliminary report[J]. J Emerg Med, 2000, 19(4): 311-315.
- [5] Vasile VC, Jaffe AS. Emerging biomarkers for acute heart conditions [J]. Curr Opin Cardiol, 2014, 29(4): 312-318.
- [6] Dawie J, Chawla R, Worku Y, et al. Diagnosis of ischemic heart disease using CK-MB, troponin-I and ischemia modified albumin [J]. Ethiop Med J, 2011, 49(1): 25-33.
- [7] 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]. Clin Diagn Res, 2013, 7(5): 804-808.
- [8] Gurumurthy P, Borra SK, Yeruva RK, et al. Estimation of ischemia modified albumin (IMA) levels in patients with acute coronary syndrome [J]. Indian J Clin Biochem, 2014, 29(3): 367-371.
- [9] Maneewong K, Mekrungruangwong T, Luangaram S, et al. Combinatorial determination of ischemia modified albumin and protein carbonyl in the diagnosis of non ST-elevation myocardial infarction [J]. Indian J Clin Biochem, 2011, 26(4): 389-395.
- [10] Shen XL, Lin CJ, An LL, et al. Assessment of ischemia-modified albumin levels for emergency room diagnosis of acute coronary syndrome [J]. Int J Cardiol, 2011, 149(3): 296-298.

(此文编辑 曾学清)