

## • 实验研究 Experiment research •

## 介入法建立长期可随访冠状动脉微栓塞动物模型

张庆勇, 王志华, 李晓波, 殷莲华, 李京波, 魏 盟

【摘要】 目的 应用微导管介入技术建立可随访的冠状动脉微栓塞动物模型。方法 10 只巴马系小型猪经导管选择性的于前降支(LAD)内注入  $15 \times 10^4$  个微栓塞球(直径  $45 \mu\text{m}$ ),致使冠状动脉微血管栓塞。分别测量冠脉血流储备分数(CFR)和左室射血分数(LVEF);心肌组织切片染色和超微结构变化观察;及术后 1 个月再行血管造影及 CFR 测量等检验。结果 冠脉内注射微栓塞球可导致微血管完整性的破坏( $\text{CFR} < 2.0$ )及左室功能障碍( $\text{LVEF} < 50\%$ )。组织切片 NBT 和 HE 染色均证实存在微血管栓塞;透射电镜微梗塞区心肌细胞水肿、纤维化明显;术后动物存活率高( $n = 10$ ),且可再行经皮血管造影及 CFR 的测量。结论 应用微导管介入技术可建立创伤小、死亡率低并可长期随访观察的小型猪冠状动脉微栓塞模型。是临床研究冠脉微血管栓塞发病机制的理想动物模型。

【关键词】 微栓塞; 血管内介入; 动物模型; 小型猪

中图分类号:R543.3 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2009)-12-0920-03

The establishment of animal model with coronary microembolization suitable for long-term observation by using endovascular microcatheter technique ZHANG Qing-yong, WANG Zhi-hua, LI Xiao-bo, YIN Lian-hua, LI Jing-bo, WEI Meng. Department of Cardiology, No.6 People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

【Abstract】 Objective By using percutaneous endovascular microcatheter technique to establish an animal model of coronary microembolization in mini-swine which is suitable for long-term observation. Methods Coronary microembolization was established in 10 mini-swine by infusing  $15 \times 10^4$  microspheres ( $\phi 45 \mu\text{m}$ ) selectively into the left anterior descending artery ( $n = 10$ ). Coronary flow reserve (CFR) was measured by Doppler wire and left ventricular ejection fraction (EF) was assessed by echocardiography. Hematoxylin and eosin (HE) staining and nitroblue tetrazolium (NBT) dye were used to demonstrate the presence of microembolization after the procedure of coronary microembolization. The ultra-structures of cardiomyocyte were observed by transmission electron microscopy (TEM). Before sacrifice, the CFR measurement and coronary angiography were performed again in survival animals. Results The coronary microvascular integrity ( $\text{CFR} < 2.0$ ) and left ventricular function ( $\text{EF} < 50\%$ ) were damaged by coronary microembolization. One month after the procedure, all the 10 animals survived and were able to receive the angiography and CFR measurement again. HE staining and NBT dye could demonstrate the presence of microembolization. The edema and fibrosis of cardiomyocytes could be revealed with TEM. Conclusion The animal model of coronary microembolization can be established in mini-swine by using percutaneous endovascular microcatheter technique. The model is suitable for long-term observation, the preparation is technically-simple and minimally-invasive with very low mortality. Therefore, this kind of animal model is an ideal experimental form for studying the mechanism of coronary microembolization. (J Intervent Radiol, 2009, 18: 920-922)

【Key words】 microembolization; endovascular technique; animal model; mini-swine

近年来,冠状动脉微栓塞在缺血性心脏病中的

基金项目:上海浦江人才计划(2008)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院心内科(张庆勇、王志华、李京波、魏 盟);复旦大学上海医学院生理与病理生理教研室(李晓波、殷莲华)

通信作者:张庆勇 E-mail:yeakcardio@yahoo.com.cn

作用受到越来越多研究者的关注<sup>[1-2]</sup>。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。以往的动物模型多在开胸条件下建立<sup>[3-4]</sup>。开胸手术不仅因为创伤面积大动物死亡率高,不易长期随访;而且开胸手术所致炎症反应易干扰微血管

栓塞的细胞因子变化。本研究的目的在于应用经皮微导管介入技术,以小型猪为实验对象,建立可随访的冠状动脉微血管栓塞的大型动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 巴马系小型猪 10 只,雌雄不拘,体重 20 ~ 25 kg,40 ~ 50 周龄。由交通大学附属第六人民医院动物实验中心提供。

1.1.2 试剂和器材 保存于 0.05 % (v/v) Tween 80 中的非放射性微栓塞球购买于美国 E-Z Trac 公司 [白色,直径  $(45.6 \pm 7.0) \mu\text{m}$ ,浓度  $1 \times 10^6$  个/ml]; 0.014 英寸多普勒导丝 (15 MHz, FloWire® XT, Endosonics); 微导管 (3.0/2.8 F, Cordis Inc.); 引导管 (7 F JR5.0, Cordis Inc.);

1.1.3 仪器 DSA 血管造影仪 (INNOVA 2000, GE, USA); FloMap® II 血流描记仪 (FloMap® II Ultrasound Instrument “Friendly Flo” CARDIOMETRICS®); 心脏超声诊断仪 SIEMENS Sequoia 512。

### 1.2 经导管微血管栓塞模型的建立

1.2.1 动物处置 动物先经地西洋 (10 mg/kg)、盐酸氯胺酮注射液 (5 mg/kg) 肌肉注射基础麻醉后气管插管,然后以  $0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (盐酸利多卡因和氯化琥珀胆碱) 静脉维持麻醉。呼吸机氧气和空气混合气体 18 ~ 20 次/min 辅助呼吸。

1.2.2 不同浓度微栓塞球的配制 取微栓塞球原液 1 ml ( $1 \times 10^6$  个/ml), 超声振荡充分混匀后稀释于不同体积的生理盐水中,配成  $1 \times 10^4$  个/ml 和  $5 \times 10^3$  个/ml 浓度。常温下保存,使用前超声振荡搅匀。

1.2.3 模型的建立 穿刺一侧股动脉置入 7 F 动脉鞘。肝素化 (200 u/kg) 并静脉维持 ( $100 \text{ u} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。冠状动脉指引导管 (7 F) 行左冠状动脉造影。微导管 (3.0/2.8 F Cordis Inc) 选择性插入前降支近段 (LAD) 内 3 ~ 5 mm,经连接于导管尾端的注射器注射微栓塞球。先以  $1 \times 10^4$  个/ml 浓度微球连续注射累计 10 万个微球量,然后再以  $5 \times 10^3$  个/ml 浓度微球注射至 15 万个微球量。术后退出现所有导管后并拔出动脉鞘管,按压止血。待动物清醒后拔出气管,连续 3 d 抗生素预防感染。

### 1.2.4 观察指标

1.2.4.1 影像学及血流动力学检查: 多普勒导丝测量冠脉血流储备分数 (CFR) 评估微血管完整性破坏的程度。超声心动测量心脏左室射血分数 (LVEF) 评价左室功能。术后 1 个月再行经皮冠状动脉血管造

影并测量 CFR, 评价其可随访性。

1.2.4.2 大体及病理观察: 心肌组织切片经苏木精-伊红 (HE) 和硝基四氮唑蓝染色 (NBT) 染色证实有无微血管栓塞及所致的心肌微梗死。透射电镜分析微栓塞心肌超微结构变化。

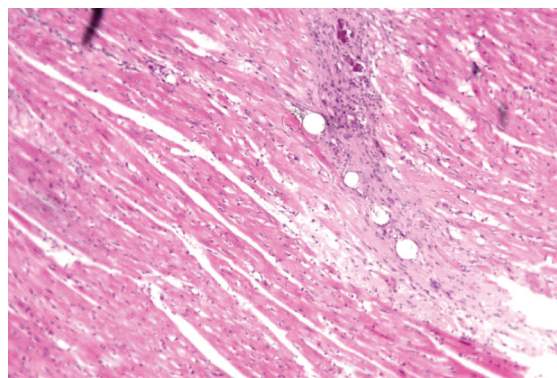
## 2 结果

### 2.1 血流动力学结果

CFR 值 [ $(1.6 \pm 0.5)$  比  $(2.2 \pm 0.4)$ ,  $P < 0.05$ ] 和 EF 值 [ $(42 \pm 5\%)$  比  $(60 \pm 8\%)$ ,  $P < 0.01$ ] 较基础状态下差异均有统计学意义。证实微血管栓塞可导致微血管完整性破坏以及左室功能障碍。

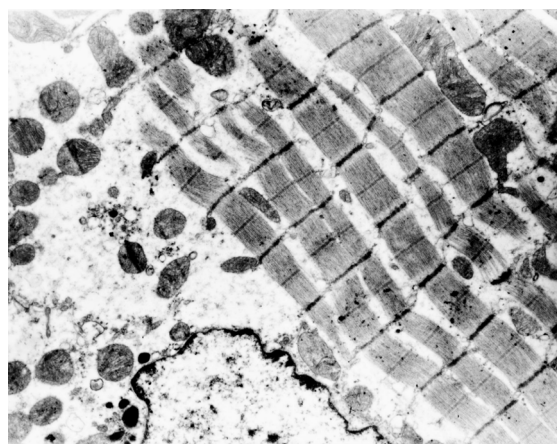
### 2.2 解剖及病理学结果

心肌 NBT 染色可见呈白色或浅蓝色的梗死心肌而正常心肌染色为蓝色。梗死心肌区域呈点灶状分布。心肌 HE 染色 (图 1) 可见微栓塞球沿微血管走行分布,微栓塞球附近大量炎症因子浸润。透射电镜可见 (TEM, 图 2) 微梗死区域心肌细胞水肿,成纤维细胞和胶原纤维沉积。



可见栓塞球沿血管分布,球周围大量炎症细胞浸润

图 1 造模后心肌病理图像



透射电镜下见心肌细胞肌丝断裂、水肿、纤维化,线粒体减少

图 2 造模后透射电镜图像

### 2.3 长期随访观察结果

术后 1 个月动物均无死亡。再次应用经皮导管

介入技术,成功完成血管造影和 CFR 的测定。

### 3 讨论

近年来,各种冠脉内介入手术所导致的斑块破裂或者动脉粥样斑块自然脱落而导致的微血管栓塞,已引起人们越来越多的关注。微血栓产生后随即被血流冲入远端,直接造成微血管栓塞,破坏微血管内皮的完整性而导致微循环功能障碍,对心肌灌注及血流动力学产生影响,而导致心肌功能障碍、血流储备降低,以及心肌坏死等病理生理变化<sup>[5-6]</sup>。

同已往开胸手术建立的冠状动脉微血管栓塞动物模型相比。应用经皮微导管技术建立的微血管栓塞动物模型具有以下优点。(1)成功率高:①小型猪的冠状动脉侧支循环较少,选择性冠脉内注射微球可较好的控制损伤心肌面积。②未注射微球的冠状动脉(LCX、RCA)仍能保持有效的心肌灌注,使得未损伤的心肌可以部分代偿微球栓塞区域所致的心肌缺血,从而使成活率提高。③采用分次注射且微球体积较小(直径 45  $\mu\text{m}$ ),避免因一次大量微球而造灌注造成大批微血管床破坏,使得冠脉循环急性崩溃。④小型猪体型小,冠状动脉较人类细小。2.8/3 F 的微导管(直径 0.97 mm)塑型柔软,不但能超选择性插入小型猪冠状动脉左前降支(LAD)内,而且对冠状动脉刺激性小,最大限度地减少冠状动脉损伤和痉挛,且能有效减少造影导管对冠状动脉血流动力学的影响。(2)可长期随访观察:①小型猪生长缓慢,便于长期饲养观察。②由于是采用经皮动脉穿刺方法,外周血管可以重复使用,避免因为血管结扎带来的血管浪费,同时也减少了因为开胸手术所致动物死亡率的增加。(3)更好的模拟临床变化:①以往的实验模型多选择犬。众所周知,犬的心脏解剖特点不同于人类,它的内外膜下血管丰富,具有较多的侧支循环。小型猪心脏解剖和人类相似,内膜下血管丰富,心肌内侧支循环少<sup>[7]</sup>。因此更适合用来作为心脏疾病研究的动物模型。②开胸手术增加了创伤因素对细胞因子的影响,干扰了对微血管栓塞后炎症因子变化,不利于机制研究。③光镜心肌组织病理学检查显示 LAD 供血区域心肌血管内有散在微球,多位于心肌内、中层,梗死区主要位于心内膜下,而且坏死及纤维化心肌呈灶状分布。电镜观察可见,梗死区心内、外膜小血管充血,

较多炎症细胞浸润,心肌层心肌细胞水肿,间质内成纤维细胞聚集,胶原纤维增生,均符合人类心内膜下心肌梗死病理特点。从病理生理角度更加符合人类冠脉微栓塞的发生发展过程。

经皮介入导管技术,具有创伤小,不需要结扎冠状动脉,动物容易存活,并且具备可长期随访,能较好模拟临床患者微血管栓塞的病理生理变化等特点。本组应用微导管介入技术成功建立了可随访的冠状动脉微血管栓塞动脉模型。通过较长时间的随访观察,不仅观察了冠脉微血管栓塞后心肌的急性炎症反应和微血管功能障碍的发生<sup>[8]</sup>,而且也观察了微血管栓塞后 1 个月内的心肌重塑过程及微血管功能障碍的变化,对临床研究微血管栓塞对心肌及微血管功能的影响等提供了实验依据<sup>[9]</sup>。

### [参考文献]

- [1] Grube E, Gerckens U, Yeung AC, et al. Prevention of distal embolization during coronary angioplasty in saphenous vein grafts and native vessels using porous filter protection[J]. *Circulation*, 2001, 104: 2436 - 2441.
- [2] Camici PG, Crea F. Coronary microvascular dysfunction[J]. *N Engl J Med*, 2007, 356: 830 - 840.
- [3] Dörge H, Neumann T, Behrends M, et al. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction: role of inflammation[J]. *Am J Heart Circ Physiol*, 2000, 279: H2587 - 2592.
- [4] Thielmann M, Dörge H, Martin C, et al. Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and sphingosine[J]. *Circ Res*, 2002, 90: 807 - 813.
- [5] Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36: 22 - 24.
- [6] Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease[J]. *Circulation*, 2000, 101: 570 - 580.
- [7] Unger EF. Experimental evaluation of coronary collateral development[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49: 497 - 506.
- [8] 张庆勇, 葛均波, 朱建华, 等. 肿瘤坏死因子及内皮素的异常与心肌微血管功能障碍程度相关性的分析[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34: 635 - 638.
- [9] Zhang QY, Ge JB, Chen JZ, et al. Mast cell contributes to cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54: 515 - 523.

(收稿日期:2009-08-03)



# 介入法建立长期可随访冠状动脉微栓塞动物模型

作者: 张庆勇, 王志华, 李晓波, 殷莲华, 李京波, 魏盟, ZHANG Qing-yong, WANG Zhi-hua, LI Xiao-bo, YIN Lian-hua, Li Jing-bo, WEI Meng  
作者单位: 张庆勇, 王志华, 李京波, 魏盟, ZHANG Qing-yong, WANG Zhi-hua, Li Jing-bo, WEI Meng(上海交通大学附属第六人民医院心内科, 200233), 李晓波, 殷莲华, LI Xiao-bo, YIN Lian-hua(复旦大学上海医学院生理与病理生理教研室)  
刊名: 介入放射学杂志 ISTIC PKU  
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY  
年, 卷(期): 2009, 18(12)  
被引用次数: 0次

## 参考文献(9条)

1. Grube E, C erckens U, Yeung AC Prevention of distal embolization during coronary angioplasty in saphenous vein grafts and native vessels using porous filter protection[期刊论文]-Circulation 2001
2. Camici PG, Crea F Coronary microvascular dysfunction[期刊论文]-New England Journal of Medicine 2007
3. Dorge H, Neumann T, Behrends M Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction:role of inflammation[期刊论文]-American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2000
4. Thielmann M, Dorge H, Martin C Myocardial dysfunction with coronary microembolization:signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine[期刊论文]-Circulation Research 2002
5. Erbel R, Heusch G Coronary microembolization[期刊论文]-Journal of the American College of Cardiology 2000
6. Topol EJ, Yadav JS Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease[期刊论文]-Circulation 2000
7. Unger EF Experimental evaluation of coronary collateral development[期刊论文]-Cardiovascular Research 2001
8. 张庆勇, 葛均波, 朱建华 肿瘤坏死因子及内皮素的异常与心肌微血管功能障碍程度相关性的分析[期刊论文]-中华心血管病杂志 2006
9. Zhang QY, Ge JB, Chen JZ Mast cell contributes to cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization[期刊论文]-Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2006

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfsxzz200912011.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200912011.aspx)

授权使用: qknfy(qknfy), 授权号: 8f5e3fbc-7109-45b8-a37e-9df70175fe03

下载时间: 2010年9月20日