

·综述 General review·

五指山小型猪在心血管系统疾病建模中的应用

田玉龙, 钟红珊

【摘要】 五指山小型猪是中国特有的、具有自主知识产权的高度近交猪种,具有遗传性稳定、体型小、体重轻、抗逆性强等特点,因组织器官结构及生理生化指标与人类相似,已越来越广泛地应用于医学研究领域。在我国,五指山小型猪被用来构建高脂血症模型、动脉粥样硬化模型、急性心肌梗死模型和心力衰竭模型、心脏骤停模型、心肺复苏后心肌代谢评估等心血管疾病模型。五指山小型猪在心血管系统解剖及生物学行为与人高度相似,将会在未来心血管病研究中发挥日益重要的作用。

【关键词】 五指山小型猪; 心血管系统疾病; 动物模型; 医学研究

中图分类号:R528.1 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2016)-04-0363-04

Application of Wuzhishan miniature pigs in establishing experimental models of cardiovascular system disease TIAN Yu-long, ZHONG Hong-shan Department of Interventional Radiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Key Laboratory of Diagnostic Imaging and Interventional Radiology of Liaoning Province, Shenyang, Liaoning Province 110001, China

Corresponding author: ZHONG Hong-shan, E-mail: zhonghongshan@hotmail.com

【Abstract】 Wuzhishan miniature pig breed is unique to China, which is highly inbred pig breed with independent intellectual property rights. The pigs have some certain characteristics, such as genetic stability, small size, light weight and strong resistance, etc. As its structures of tissues and organs as well as its physiological and biochemical index are quite similar to those of human beings, it has been more and more widely used in the field of medical research. In China, Wuzhishan miniature pigs have already been used in establishing various models of cardiovascular system diseases, including hyperlipidemia model, model of atherosclerosis, acute and chronic ischemia-induced myocardial infarction model, heart failure model, heart arrest model, model used for evaluation of myocardial metabolism after cardiopulmonary resuscitation, etc. In aspect of the cardiovascular system anatomy and biological behavior, Wuzhishan miniature pigs are highly similar to human beings, therefore, the utilization of Wuzhishan miniature pigs will play an increasingly important role in the study of cardiovascular disease in the future.(J Intervent Radiol, 2016, 25: 363-366)

【Key words】 Wuzhishan miniature pig; disease of cardiovascular system; animal model; medical research

猪在解剖学及生理学方面与人有较大的相似性,其在医学研究中的重要性日渐显著。小型猪是以科学研究为目的经过人工选育的猪种,具有遗传性稳定,体型小,体重轻,便于实验操作及管理的特点。五指山小型猪是中国农业科学院北京畜牧兽医

研究所由原产地引至北京扩群繁育,进行近交系培育,获得的中国特有的、具有自主知识产权的高度近交小型猪。目前,五指山小型猪作为模型动物已应用于冠状动脉疾病为主的心血管系统疾病的研究中,其在主动脉疾病的进一步模型建立研究中表现出良好的应用前景。

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2016.04.022

基金项目:国家自然科学基金(81571778)

作者单位:110001 沈阳 中国医科大学附属第一医院介入放射科、辽宁省影像诊断与介入治疗重点实验室

通信作者:钟红珊 E-mail: zhonghongshan@hotmail.com

1 五指山小型猪概述

1.1 简介

五指山猪原产地位于海南中部少数民族居住的山区,因山区交通不便,少数民族主要采取自繁

自养的方式,长期的极度近亲交配,使其主要特征如体型、外貌、毛色等稳定地遗传下来,成为该地区特有的小型猪种,称为五指山猪^[1]。五指山猪是我国珍贵的猪种,体型甚小,增重缓慢。1989 年中国农科院畜牧研究所引入猪种,获得保种成功,目前已经培育出国际领先的近交系小型猪,近交系数为 0.993^[2]。该猪被毛分为黑背白腹两部分,四肢细而短,头小而长,成年体重不超过 35 kg,性早熟,遗传学稳定,抗逆性强,便于饲养及管理^[3-4]。

1.2 解剖学

近交系五指山小型猪心脏的大体形态以及在胸腔的位置与人类的基本相似。从大体上观察,心脏呈左、右稍扁倒立的圆锥形,位置略靠胸腔后方,位于 3~7 肋骨之间。整个心腔由房中隔和室中隔为界分成左右互不相通的两部分,每一部分又分为上部的心房和下部的心室,同侧的心房和心室经房室口相通,故心脏有 4 个腔,分别是左心房、左心室、右心房和右心室。左心室的出口为主动脉口,位于左心室前上方的右侧,相继连接升主动脉、主动脉弓部有两个分支,分别为左右头臂干,继续延伸为(降)胸主动脉及腹主动脉^[5]。

1.3 生理及生化指标测定

五指山小型猪常规生理及生化指标与人类相对比,绝大多数指标如红细胞计数、血红蛋白、血小板计数、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 Ca^{+2} 离子与人正常参考值范围相类似,但部分指标,如淋巴细胞计数及总胆固醇指标存在差异^[6-8]。

1.4 心电图

应用 6 导联心电图进行比较分析,五指山小型猪心电图的波形与人相似,但心率较快,存在偶发性窦性心率不齐。P-R 间期、QRS 波群时间分别为 0.08~0.11 s 及 0.04~0.07 s;有清晰的 S-T 段,偏移小于 1 mm^[8-9]。

2 五指山小型猪在心血管系统疾病中的应用

2.1 高脂血症模型

谢忠忱等^[10]、陈亮等^[11]选用 3~4 月龄的近交系五指山小型猪 30 头,建立了高脂血症模型。具体方法为对照组:动物数 6 头,喂猪基础饲料;1.5%胆固醇组:动物数 12 头,含 1.5%胆固醇的饲料;3.0%胆固醇组:动物数 12 头,含 3%胆固醇的饲料。实验前及以后每月称体重,每月测定血清三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。高脂饮食组 TC、

HDL-C 及 LDL-C 均明显升高,且在第 1 个月增幅最为明显,分别为实验前的 5.5~7 倍、5 倍及 7~10 倍。高脂饮食组 TC 到 3 个月后达到最高,为基线的 8~10 倍。高脂饮食组 HDL-C 及 LDL-C 到第 4 个月时达到最高,分别为基线的 7 倍左右及 12~15 倍。对照组中各指标没有变化。尽管 3%胆固醇组比 1.5%胆固醇组各指标稍有增加,但 2 个高脂组无统计学差异($P>0.05$)。应用高脂饮食饲养五指山猪,在 1 个月时即可观察到血脂异常,3~4 个月后到达峰值,以后血脂水平趋于稳定,可模拟人类高脂血症发生发展过程。

2.2 动脉粥样硬化模型

陈华等^[12]应用 30 头 3~4 月龄五指山小型猪为实验对象,建立了动脉粥样硬化模型。30 头五指山猪分为 3 组:对照组 6 头,喂基础饲料;实验组分别饲喂含 1.5%胆固醇的高脂饲料(T_1 组)和含 3.0%胆固醇的高脂饲料(T_2 组)。在实验的 4、6、8 和 12 个月进行一般临床观察、血脂相关指标检查、心血管系统和主要脏器做病理学检查。结果提示高脂、高胆固醇饲料能够引起五指山小型猪血清胆固醇指标升高和动脉粥样硬化病形成。在实验后 4 个月,实验组动物均出现明显的早期动脉粥样硬化病变;至 6 个月和 8 个月,动脉病变逐渐加重;至实验后 12 个月,在动物的大、中动脉观察到广泛的病变。动脉病变易发且严重的部位为腹主动脉、髂动脉和冠状动脉,动脉病变少见且较轻的部位为颈总动脉、肠系膜总动脉和肾动脉。陈华等^[13]对重要脏器的病理学研究结果显示,不同部位血管的病变有所不同,可分为 3 种类型:第 1 类为胸主动脉和心脏大动脉出口部大血管的脂纹病变,表现为动脉内膜隆起但高度一般小于 1 mm,动脉壁增厚。镜下见内膜增厚,主要为内皮下大泡沫细胞聚集,中膜增厚,可见平滑肌细胞之间脂质沉积增多。第 2 类为腹主动脉、髂动脉等处典型的纤维斑块病变,表现为斑块隆起明显,高度一般可达 1~2 mm,镜下见斑块表面形成较厚的纤维帽,其中散在分布有泡沫细胞和脂滴。第 3 类为以冠状动脉为典型的中小动脉的病变,常涉及全部血管内膜,但是通常一侧隆起更显著,严重的部位致血管腔狭窄。病变严重的部位也有脂质核形成,并有中膜浅层平滑肌变性、坏死和增生。对于高脂饮食饲养的五指山猪,在实验 4 个月时,行病理学检查发现了早期动脉硬化的改变,其后逐渐加重,到 12 个月时在大、中动脉可发现明显的动脉硬化表现,并且病理学检查亦发现脂

纹、斑块及血管狭窄等典型的改变,与人类动脉硬化发生、发展过程极为相似。

2.3 心肌梗死及心力衰竭模型

罗富良等^[14]对 12 头五指山猪进行选择性冠状动脉造影。造影结果显示,五指山猪的冠脉血管分布稳定、分支少。12 头中国五指山猪获得较好的左右冠状动脉造影图像,造影图像显示右冠状动脉粗大,由右冠脉开口出发直至后降支均十分清晰,分支少而细,动脉圆锥支和窦房结支均较为清晰,但都较细长,锐缘支清晰明显,其余分支多细短。五指山猪的左冠状动脉主干均极短,随即分出前降支和回旋支。与人类冠状动脉各分支的发出和走行较为一致。

张晶等^[15]对 18 头五指山小型猪,采用冠脉内球囊阻断及微球栓塞法成功建立急性心肌梗死及慢性心力衰竭模型。具体方式为:将球囊导管定位于左前降支,第 2 对角支开口后,抽动球囊损伤冠脉内膜,其后阻断冠脉血流 120 min。阻断结束后,撤出球囊导管,将导管选入左前降支,缓慢注射微血栓微球混悬液,来制作急性心肌梗死模型。术后 14 d 病理大体检查显示心肌坏死部位为心尖、左室前壁和前间隔部,梗死区室壁变薄,颜色变白。HE 染色显示左心室前壁及心尖部心肌冠状动脉内散在的微血栓阻塞,心内膜下心肌出现灶性凝固性坏死。

顾晓龙等^[16]应用五指山小型猪 16 头,在 DSA 监视下,应用合适直径的球囊导管,对左前降支近段,阻断 180 min。术后取左心室前壁梗死区心肌组织,行病理学检查。结果显示 13 头猪术后存活,成功率为 81.2%。24 h 病理大体标本显示左室下壁前部、心尖部、左室前壁和前间隔部颜色变白,未见变薄。HE 染色显示梗死区域心肌出现灶性凝固性坏死,间质水肿,炎性细胞浸润。建立了急性心肌梗死及急性心力衰竭模型。此外,顾晓龙等^[17]还针对犬和小型猪应用介入方法建立心肌梗死模型进行了对比。结果显示五指山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。左冠状动脉分布特点,与人类的符合度约占 90%^[18-19]。五指山猪的心脏解剖、生理特性与人类更为接近,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。

傅向华等^[20]采用五指山猪为实验对象,应用选择性冠状动脉前降支内微球分次灌注方法造成心肌缺血坏死,建立了稳定存活的小型猪慢性缺血性心力衰竭动物模型。方法为:15 头 8~11 个月龄的五

指山小型猪,将导管选择性插入冠脉左前降支,注入直径 100 μm 的栓塞微球,阻塞冠状动脉微动脉。术后行病理学检查,显示左心室前壁及心尖部心内膜下心肌血管内散在的半透明微球阻塞,伴灶性凝固性坏死,并呈现缺血性坏死心肌炎和慢性纤维胶原增生的病理特征。五指山小型猪的冠状动脉,因走行和分布特点与人类更为接近,且侧支循环少,更容易应用其制造心肌梗死模型及相关机制研究。

2.4 心脏骤停及心肺复苏模型

吴彩军等^[21]应用 30 只 12~14 周龄的五指山猪,经气管插管呼吸机辅助通气,在呼气末停用呼吸机给氧,断开气管插管连接处,堵塞气管插管并且停用静脉麻醉维持用药。观察幼猪动脉血压值变化,以动脉收缩压<30 mmHg 作为窒息心脏骤停(CA)模型成功判断标准。CA 等待非干预时间 8 min 后,立即以 100%氧气浓度恢复机械通气。同时立即行人工胸外按压,按压频率为 100 次/min,按压深度为胸廓前后径的 1/3,按压和放松周期比例为 1:1。持续按压 2 min 作为一个循环,每个循环末分析心电图波形,若心电显示室颤波形,则开始电击除颤。若在心肺复苏(CPR)4 min 后没有恢复自主循环,则给予肾上腺素稀释后静脉推注,然后继续进行持续按压。每 2 个循环作为一个复苏周期,以此类推,直至幼猪复苏或失败终点。结果显示,采用气管夹闭堵塞方法,导致窒息 CA 需要的设备简单,成本低,操作容易,模型成功率可达 100%;五指山幼猪窒息 CA 模型复苏成功率为 40%(12/30)。并且能够较好地模拟人类的心肺复苏过程。

此外,吴彩军等^[22]还应用五指山猪 2 种不同原因引起心脏骤停模型,并行复苏后进行心肌代谢活性的比较。具体方法为电击室颤与窒息分别导致的的心脏骤停模型,应用 PET-CT 测定活体猪复苏后存活心肌的代谢特点。结果提示窒息导致心脏骤停复苏后心肌损伤致代谢降低较电击室颤严重;室颤导致心脏骤停复苏后心肌代谢降低在 24 h 后恢复至正常水平。应用五指山猪作为实验模型进行心血管系统疾病的研究,仅有少数报道^[23-28],主要集中在心脏骤停及心肺复苏方面。Zhang 等^[23]也应用了室颤与窒息方法分别导致五指山猪心脏骤停模型,其结果与吴彩军等研究结论基本一致。Gong 等^[24]应用五指山猪心脏骤停模型,模拟了人类温和降温对大脑皮层线粒体氧化应激的保护作用。Hua 等^[25]研究了低温对于心脏骤停后五指山猪脑脊液生化反应的变化,提示温和降温减少和延缓了心脏骤停引

起的脑脊液谷氨酸的增加,对大脑有保护作用。Gu 等^[26]研究了不同的复苏策略对五指山猪心脏骤停后脑损伤的影响,结果提示先除颤还是先心肺复苏均不影响 24 h 的生存率。

3 展望

心血管疾病是危害人类健康的严重疾病,在我国居民的死亡谱中,心血管疾病已经成为仅次于恶性肿瘤的第二号杀手。如何有效地预防及治疗心血管疾病,是目前临床中亟待解决的重要问题。寻找合适的动物模型来模拟人类疾病的发生、发展,是治疗和预防心血管疾病的必要手段。既往研究结果表明,五指山小型猪在高脂血症、动脉硬化及冠状动脉病研究中有很重要的作用,其心血管系统因解剖学、血流动力学与人类相似,经过诱导可发生发展为高脂血症、动脉粥样硬化,其病变与人类极为近似。按照人类心血管疾病自然病程来讲,在全身广泛的动脉粥样硬化基础上,可能会进展为主动系统疾病,如主动脉瘤、主动脉夹层等。五指山小型猪作为实验动物有着无可比拟的优越性。其心血管解剖学、生理生化指标与人高度相似,越来越多地被用来替代犬或猴等非啮齿类动物,大大加快人类心血管系统疾病发生、发展机制的研究。

[参考文献]

- [1] 冯书堂,李奎,刘岚,等. 小型猪近交系新品种的培育与开发利用[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23: 274-280.
- [2] 本刊辑. 中国农业科学院育成国际领先水平小型猪近交系[J]. 中国猪业, 2014: 36.
- [3] 冯书堂. 遗传资源创新是我国地方猪种保存和利用的重要途径——记我国近交系小型猪培育、利用 20 年[J]. 猪业科学, 2010, 27: 106-110.
- [4] 黄丽娟. 浅谈五指山猪保种现状、存在问题及对策[J]. 安徽农学通报, 2007, 13: 221-222.
- [5] 靳二辉. 近交系五指山小型猪解剖组织学研究及内源性反转录病毒(PERV)的检测[D]. 华中农业大学, 2008.
- [6] 孙瑞萍,王峰,魏立民,等. 海南原产地五指山猪生理生化指标测定[J]. 畜牧与兽医, 2011, 43: 62-64.
- [7] 黄雷,牟玉莲,杨述林,等. 高龄五指山小型猪近交系血液生化指标测定[J]. 实验动物科学, 2013, 30: 44-47.
- [8] 靳洪涛,凡春荣,李慧,等. 实验用五指山小型猪正常生理值测定[J]. 实验动物科学, 2007, 24: 69-73.
- [9] 黄丽娟,贾琳,苟鹏,等. 三个品系小型猪正常心电图的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18: 23-26.
- [10] 谢忠忱,黄广勇,陈华,等. 五指山小型猪高脂血症模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16: 537-540.
- [11] 陈亮,潘永明,徐孝平,等. 五指山小型猪高脂血症模型的心脏自主神经功能变化[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20: 35-40.
- [12] 陈华,谢忠忱,黄广勇,等. 五指山小型猪动脉粥样硬化模型的建立[J]. 实验动物科学, 2007, 24: 39-43.
- [13] 陈华,李春海,谢忠忱,等. 五指山小型猪动脉粥样硬化模型的病理学研究[J]. 实验动物科学, 2007, 24: 44-48.
- [14] 罗富良,慎慧,吴爱丽,等. 中国五指山猪的冠脉造影特征[A]; 第六届生命科学研究与实验动物替代法国际大会(北京卫星会议)暨第三届北京实验动物科学国际论坛论文汇编[C]; 2007 年.
- [15] 张晶,傅向华,贾辛未,等. 小型猪急性心肌梗死后心力衰竭模型的构建[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18: 33-36.
- [16] 顾晓龙,黄军,董正华,等. 五指山小型猪急性心肌梗死合并急性心力衰竭模型的建立及评价[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33: 5932-5934.
- [17] 顾晓龙,黄军,董正华,等. 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[J]. 重庆医学, 2014, 43: 1090-1092.
- [18] 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: 1867-1872.
- [19] 冯书堂,李奎,牟玉莲,等. 五指山小型猪近交系培育与遗传资源创新[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20: 849-857.
- [20] 傅向华,刘晓坤,谷新顺,等. 经导管法冠脉内微球灌注建立小型猪慢性缺血性心力衰竭模型研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86: 1129-1132.
- [21] 吴彩军,李春盛,杨军,等. 五指山幼猪窒息心脏骤停模型复苏生存率的研究[J]. 中国急救医学, 2013, 33: 973-975.
- [22] 吴彩军,李春盛,杨军,等. 室颤与窒息法心脏骤停动物模型复苏后 PET 心肌代谢的比较[A]. 《中华急诊医学杂志》第十二届组稿会暨第五届急诊医学青年论坛论文汇编[C]; 2013 年.
- [23] Zhang Y, Li CS, Wu CJ, et al. Comparison of cerebral metabolism between pig ventricular fibrillation and asphyxial cardiac arrest models[J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128: 1643-1648.
- [24] Gong P, Li CS, Hua R, et al. Mild hypothermia attenuates mitochondrial oxidative stress by protecting respiratory enzymes and upregulating MnSOD in a pig model of cardiac arrest[J]. PLoS One, 2012, 7: e35313.
- [25] Hua R, Li C, Gong P, et al. Cerebrospinal fluid biochemistry reflects effects of therapeutic hypothermia after cardiac arrest in a porcine model[J]. Am J Emerg Med, 2012, 30: 1420-1428.
- [26] Gu W, Hou XM, Li CS. Effect of different resuscitation strategies on post-resuscitation brain damage in a porcine model of prolonged cardiac arrest[J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127: 3432-3437.
- [27] Gu W, Li CS, Yin WP, et al. Expression imbalance of transcription factors GATA-3 and T-bet in post-resuscitation myocardial immune dysfunction in a porcine model of cardiac arrest[J]. Resuscitation, 2013, 84: 848-853.
- [28] Gu W, Zhang Q, Yin W, et al. Caspase-3-mediated splenic lymphocyte apoptosis in a porcine model of cardiac arrest[J]. Am J Emerg Med, 2014, 32: 1027-1032.

(收稿日期:2015-11-03)

(本文编辑:俞瑞纲)