文章编号:1000-5404(2010)12-1245-04

论著

适于影像学研究的猪慢性心肌缺血模型的制备

文 利[1],崔建华[2],黄 河[3],谭 虎[3],陈 杰[3],刘卫金[1],舒通胜[1],郑嘉荣[4],胡 云[5],高云华[4] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:放射科[1],麻醉科[3],超声诊断科[4],核医学科[5];130033 长春,吉林大学中日联谊医院胸心外科[2])

[摘要] 目的 建立适于影像学研究的猪慢性心肌缺血模型。**方法** 家猪 10 只,开胸手术游离冠状动脉左回旋支,在左旋支近段放置塑料 Ameroid 缩窄环,以建立左旋支慢性狭窄的心肌缺血模型。模型建立后 5~6 周内每周 1 次行冠状动脉造影和心脏 MRI、超声及 SPECT 检查。以冠状动脉造影结果作为评价冠状动脉狭窄程度的标准。**结果** 10 只家猪中 2 只术后早期死亡,8 只成功建立慢性心肌缺血模型并存活至实验完成,共计行影像检查 38 例次,其中 35 例次满足图像分析。术后第 1 周,冠脉造影见左回旋支轻度狭窄,随术后时间延长,狭窄程度逐渐加重。术后第 3 周 1 只动物回旋支狭窄达 90%,术后第 5 周 4 只动物狭窄达 90%,第 6 周其余 3 只动物达 90%。MRI 扫描可见左室侧壁和后壁变薄,延迟灌注扫描见明显强化,超声及 SPECT 可见左室运动减弱,功能降低,缺血节段室壁灌注量降低甚至缺损。**结论** 应用塑料 Ameroid 缩窄环可以成功制备慢性心肌缺血的动物模型,并适用于各种影像学方法观察冠状动脉渐进性狭窄过程中左室结构及心功能的变化。

[关键词] 慢性病;心肌缺血;冠状血管造影术;磁共振成像;体层摄影术, 发射型计算机, 单光子;超声检查;动物模型;猪

[中图法分类号] R-332; R445; R542.2 **[文献标志码]** A

Establishment of swine model of chronic myocardial ischemia suitable for medical imaging

Wen Li[1], Cui Jianhua[2], Huang He[3], Tan Hu[3], Chen Jie[3], Liu Weijin[1], Shu Tongsheng[1], Zheng Jiarong[4], Hu Yun[5], Gao Yunhua[4] ([1]Department of Radiology, [3]Department of Anesthesiolgy, [4]Department of Ultrasonography, [5]Department of Nuclear Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Cardiothoracic Surgery, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun, Jilin Province, 130033, China)

[Abstract] Objective To establish a swine model of chronic myocardial ischemia for medical imaging research. **Methods** Ten pigs (20 to 26 kg) were sedated with an intramuscular injection of telazol (5 mg/kg). Thoracotomy was performed through the fourth left intercostal space. The pericardium was opened and an ameroid constrictor was placed around the proximal left circumflex artery (LCX) just distal to the main stem of the left coronary artery matching the size of the vessel. Animals received medical imaging examinations, including coronary angiography, cardiac MRI, echocardiography and cardiac SPECT once a week within 5 to 6 weeks after the surgery. The degree of coronary artery stenosis was evaluated according to the results of coronary angiography. **Results** Of the 10 pigs, 2 died at the early stage after surgery, and the left 8 were successfully induced to have chronic myocardial ischemia. The mild stenosis of LCX was found in 1 week after surgery, and the longer after surgery, the more serious stenosis of LCX was found. Ninety percent stenosis of LCX was found in 1, 4 and 3 pigs respectively in 3, 5 and 6 weeks after surgery. Thin lateral and posterior wall of left ventricle was found in plain MRI, which showing marked enhancement in delayed MRI perfusion scan. Echocardiography and SPECT showed motion weakness, function reduction and perfusion decrease or defects of ischemic segments of left ventricle. **Conclusion** The animal model of chronic myocardial ischemia can be successfully established with ameroid constrictor in pigs, which is an ideal model for medical imaging research.

[Key words] chronic disease; myocardial ischemia; coronary angiography; magnetic resonance imaging; tomography, emission-computed, single-photon; ultrasonography; animal models; swine

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30600157) and the Innovative Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2006). Corresponding author: Gao Yunhua, Tel: 86-23-68755631, E-mail: xqgaoyh@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30600157);第三军医大学科研创新基金(2006)

[通信作者] 高云华,电话:(023)68755631,E-mail: xqgaoyh@yahoo.com.cn

既往有关心肌缺血的研究多采用急性心肌梗死模型,即结扎动物冠状动脉的前降支或左旋支,使血管急性闭塞,造成心肌急性缺血、梗死,然后进行干预。而临床上慢性心肌缺血比急性心肌缺血更常见,也更具有干预价值。但急性心肌梗死模型难以模拟慢性心肌缺血的病理生理状况。因此,我们拟参照文献[1-4]报道的方法,制备慢性心肌缺血模型,以便为后续的影像学方法研究冠状动脉狭窄过程中左室结构及功能变化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象及常用材料

健康家猪10只,雌雄不拘,体质量20~26 (23.5±1.8)kg,购自本院实验动物中心。

Ameroid缩窄环购自Research Instruments SW, U. S. A,呼吸机为Blease 8200s。外科显微镜、特制手术缝合线及特殊手术器械由手术操作者自带;常规手术器械如小儿胸科剪、中号拉钩、胸腔撑开器等由本院动物实验中心提供。

1.2 模型制备主要步骤

模型制备参照文献[1,2]报道的方法进行。术前动物禁食禁水12 h以上,氯胺酮300 mg(约15 mg/kg)、速眠新20 mg和阿托品1 mg耳后肌肉注射诱导麻醉,称体质量,经耳静脉建立静脉通道,接三通管,以0.1%氯胺酮静脉麻醉维持。然后气管插管,呼吸机维持呼吸,呼吸频率30/min,呼吸比1∶1.5,潮气量15 ml/kg。静脉与胺氟醚吸入复合麻醉维持,动物取右侧卧位,连接心电监护仪进行监护,肌肉松弛剂为仙林,以保证手术过程中不出现自主呼吸。手术区备皮,消毒,铺无菌巾,左胸第4肋间切开10 cm进胸。逐层切开皮肤、皮下组织,钝性分离肌肉,暴露肋骨,胸腔撑开器撑开肋间隙,进入胸腔,以生理盐水纱布推开肺脏,充分暴露心脏。心包切开后悬吊于胸壁,轻轻推开左心耳,于左房室沟处暴露左冠状动脉回旋支,于心脏表面喷洒利多卡因。游离回旋支大约0.5 cm,穿过2根7号丝线,置于血管两端并轻提之,用血管钳夹持内径2.25 mm的Ameroid缩窄环,使环的侧口对准回旋支,快速将回旋支的近段套入环内,以无菌塑料束带环绕Ameroid缩窄环。然后停止操作,观察5 min,注意血压、心率、心肌颜色的变化,如无异常,即停用麻醉,换青霉素(400 U)液体输入,6-0 Proline线缝合心包,鼓肺,2-0和4-0 Vicryl线逐层关胸,缝合皮肤,切口消毒。观察动物反应及自主呼吸恢复情况,呼吸机频率逐渐调慢,当自主呼吸明显恢复,呼吸循环稳定,动物开始躁动时,拔除气管插管。动物能站立后,送回。

1.3 模型的影像学评价

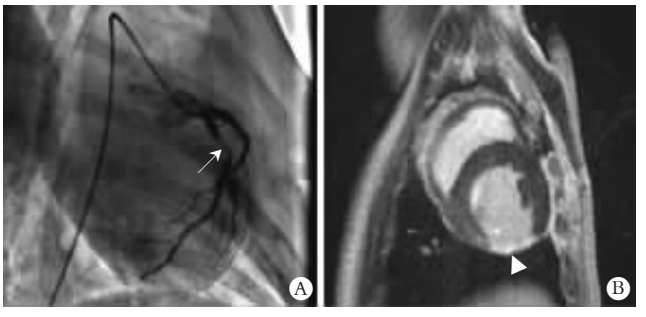
模型动物的影像学评价包括选择性冠状动脉造影、心脏超声、心脏核磁共振成像、心肌核素显像。心脏超声检查使用仪器为Philips iE33和GE Vivid 7超声诊断仪,S5-1探头。MRI为GE Twin Speed磁共振诊断仪。SPECT仪器为Infinia Hawkeye SPECT。选择性冠状动脉造影于超声检查当日或第2日进行,使用GE INOVA 2000心血管造影数字减影机,冠脉狭窄程度用狭窄血管内径与邻近正常血管内径的百分比表示,并据此将狭窄程度分为4度:无狭窄,狭窄<50%为轻度狭窄,狭窄50%~75%为中度狭窄,狭窄≥75%为重度狭窄。

2 结果

2.1 模型建立及影像学检查结果

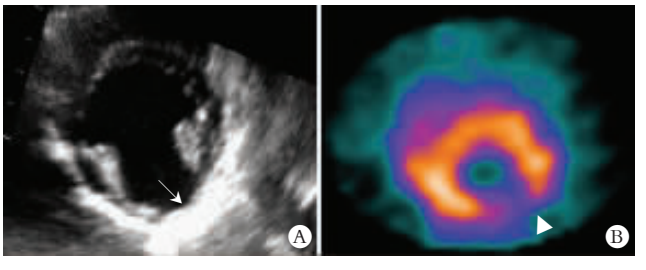
10只猪放环于冠状动脉左回旋支(left circumflex artery, LCX),其中2只于术后早期死亡(1只于手术当时死亡,1只于术后第4日晨死亡),其余8只成功建立模型,存活至完成影像学检查,成功率为80%。

模型建立后1~6周,每周1次影像学检查,当冠状动脉造影LCX狭窄≥90%则处死动物。冠状动脉造影显示,术后第1周,冠脉造影见左回旋支轻度狭窄,冠状动脉左回旋支随着建模时间推移出现渐进性狭窄,模型建立后第3周1只动物回旋支狭窄≥90%,术后第5周4只动物回旋支狭窄≥90%,其余3只动物于第6周≥90%(图1A)。1只完全闭塞者其远端未见血管显影,但邻近血管异常粗大,其余完全闭塞者可见闭塞远侧旋支血管逆向显影,并可见来源于前降支的侧支循环显影,侧支血管显影时间晚于前降支,消退亦慢。左前降支及右冠状动脉无明显狭窄。MRI扫描可见左室侧后壁变薄,延迟扫描可见明显强化(图1B)。超声及SPECT可见回旋支供血部位左室侧壁及后壁室壁变薄,左室运动减弱,功能降低,灌注减弱甚至缺失(图2)。术前4只猪行冠状动脉造影,左冠状动脉前降支、回旋支及右冠状动脉均未见狭窄,超声心动图、MRI、SPECT检查均未见异常。



↑:左旋支重度狭窄;▲:左室扩大,侧后壁变薄

图1 猪慢性心肌缺血模型建模5周后冠状动脉造影(A)和MRI(B)表现



↑:乳头肌平面短轴观左室侧后壁变薄;▲:左室侧后壁心肌灌注缺失

图2 猪慢性心肌缺血模型建模5周后心脏二维超声(A)和SPECT(B)表现

2.2 病理学观察

2.2.1 大体标本染色 于左冠状动脉口注射伊文思蓝染液后，心脏表面观，前降支供应的正常心肌被染成蓝色，回旋支供应的侧壁和后壁无蓝染。实验终止时环内血管明显狭窄，置环处血管腔变小，壁增厚，半月形动脉硬化（图 3）。



图 3 猪慢性心肌缺血模型建模后 5 周环内血管大体观察

2.2.2 HE 染色 正常节段心肌细胞结构完整，形态结构未见异常。缺血及梗死区正常心肌结构消失，心肌呈气球样变或大片凝固性坏死，可见血管扩张、淋巴细胞、嗜酸性细胞等炎细胞浸润，纤维母细胞增生。缩窄环置入部位血管：血管管腔变窄，管壁增厚，呈硬化表现，管壁并可见成团炎细胞浸润（图 4）。

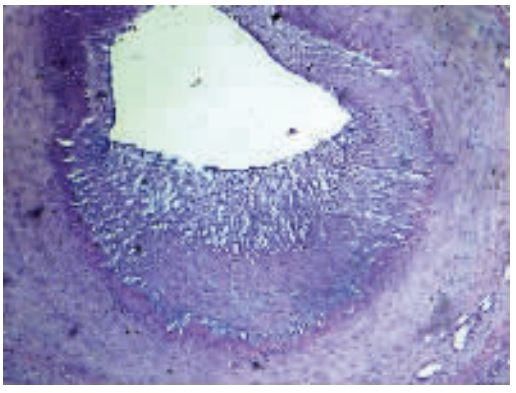


图 4 猪慢性心肌缺血模型建模后 5 周环内血管的病理学观察 （HE ×100）

3 讨论

医学影像学在冠心病的诊断、左室功能评价、患者疗效及预后评估等方面都起着重要作用。建立一个良好的慢性心肌缺血模型是进行冠心病左室影像学相关研究的前提。选择合适的动物进行慢性心肌缺血模型的建立对影像学研究是非常重要的。因猪的心脏解剖结构、侧支循环以及冠状动脉的口径更接近于人类，其凝血因子和纤溶活性与人的相近程度优于其他动物。猪的心脏比较大，与其他小动物如兔和鼠相比，较接近人体心脏大小，心率与人也比较接近，不需要使用 MRI 专用小动物线圈等特殊影像仪器设备就能得到较满意的图像，满足定量分析的需要。因此本实验选用猪作为建模对象，本实验结果也表明，选用猪进行建模，使用现有的常规临床影像设备即可满足实验需要。

目前通过开胸手术将 Ameroid 缩窄环套于冠状动脉外是最常用的制备慢性心肌缺血模型的方法。猪的冠状动脉左前降支活动度较大，容易引起置环部位的折叠，导致大面积的急性心肌梗死，导致猝死。LCX 所支配心肌有相对较多的侧支循环，该血管闭塞造成的心肌梗死面积小，动物存活率高，是慢性心肌缺血研究较为理想的动物模型[5-10]。因此本实验将 Ameroid 缩窄环放于冠状动脉左旋支外进行了模型建立，结果表明，该法制备的模型成功率高，置环后存活时间长，能满足用影像学方法动态观察左室心肌慢性缺血发展过程的需要。本实验动物建模中未使用血压及氧饱和度检测，仅 2 例因其 LCX 走行变异，左旋支位于心包血管下方，不易分离，反复操作多次，其中 1 例于放环后 5 min 左右出现室颤，抢救无效死亡；另 1 例于术后第 4 天晨死亡，解剖发现其右心系统有大块血栓形成（病理检查证实），其原因可能由于术中操作时间较长、麻醉时间较长，血流缓慢导致右心系统血栓、肺栓塞形成，导致其死亡。

本实验建模成功率较高，其原因可能与以下几个因素有关。首先模型建立前及手术过程中麻醉管理非常重要。由于开胸后胸腔与大气相通，如保留自主呼吸，容易出现纵隔摆动，造成大血管扭曲，静脉回流受阻，心排血量下降，动脉压降低，严重者可出现室颤[2]。因此，此种模型建立过程中的麻醉方法仍以气管内插管全身麻醉方法为主。猪的气管插管较难，因其嘴长腭厚，上腭长于下腭，上下腭分开困难，舌体肥厚、活动小、不易拉出。插管时要尽量分开其上下腭，猪的会厌往往紧贴上腭，喉镜难以将其挑开，应仔细分辨并用导管将其挑起，看清声门结构后迅速插管，插管时用管芯将气管导管塑直成“一”字型更容易成功。因为没有购到专用大动物喉镜，而一般成人大号喉镜镜片长度不够，因此在实验前我们对普通成人大号喉镜进行了一些修改，将其前端加长，降低了插管的难度，保证了插管的顺利进行。在诱导麻醉时，用氯胺酮加咪唑安定及阿托品肌肉注射、保留自主呼吸即可进入良好的基础麻醉状态，可以接受气管插管[11]。本实验中仅 1 例气管插管较难，在应用肌肉松弛药后才插管成功，其余气管插管均顺利。复合应用肌肉松弛剂可以打断自主呼吸，避免纵隔摆动。单一的静脉麻醉

药很难满足手术需要,因此常需采用多种静脉麻醉药、吸入麻醉、或联合肌松药复合麻醉的方法,同时辅以呼吸机维持呼吸,实验建模过程中麻醉平稳。

术中心脏表面操作导致室颤是死亡的主要原因之一,因此要求术者在进行心脏表面操作时动作应准确、轻柔,麻醉者应配合以全身及局部应用利多卡因,注意监测血压、心律,维持氧合,加强麻醉管理以减少室颤的发生率和死亡率[11,12]。在进行LCX剥离前即喷洒利多卡因于心脏表面,在心电图出现异常或心肌表面颜色出现轻微异常时需停止操作或进行相应处理。在手术过程中注意随时观察血压、心律、心电图等变化,并据此调整手术进程。如果ST段上抬,提示心肌缺血,应立即停止手术操作,待ST段恢复正常后才能行进一步手术操作。而且手术操作要快速利落。术中不能损伤心包血管,以避免因结扎血管而引起急性心肌缺血,使得模型成功率降低。严格无菌操作,以避免发生胸腔或伤口感染、心外膜与肺或胸膜粘连,影响动物存活和影像学检查。

Ameroid缩窄环是一种内径为2.00~2.75 mm的双层环,内径大小可根据需要定制,外层为金属、塑料或其他材料,内层为酪蛋白,吸水后会膨胀。需选择内径与靶血管直径相适应的缩窄环,内径过小则所需时间过短甚至造成急性缺血,而内径过大则达到一定冠脉狭窄程度所需时间延长。本实验根据动物体质量,选择环的内径为2.25 mm;根据实验所需影像检查的需要,选用其外层材料为塑料的缩窄环(塑料结构便于MRI检查,以免金属伪影及检查过程中环的潜在移位危险)。在放环后其外侧再以塑料束带缚住以限制其膨胀,故酪蛋白膨胀后只能向内挤压,可逐渐缩窄血管内径。Ameroid缩窄环造成血管完全闭塞所需时间平均为(26±4)d,同时由于血栓的形成,能使血管管腔狭窄达到95%以上,4~6周后可形成一个依靠侧支循环的具有存活能力的缺血区,缺血区仅有少数坏死心肌[13,14]。本实验中1只动物在3周时冠脉左回旋支放环局部血管狭窄≥90%,6周内所有动物的冠脉左回旋支狭窄程度均≥90%,其中4只闭塞,与文献报道基本一致。这一模型可模拟临床上常见的冠状动脉渐进性狭窄的过程,因此可用于观察在冠状动脉逐渐狭窄过程中的左室影像学表现的变化。

由于在置环手术后LCX将进行性狭窄,因此动物饲养过程中及每次影像检查前诱导麻醉时,应动作轻柔,避免过度刺激动物使其剧烈运动如蹦跳、奔跑等,使心肌血供需求增加而引起急性心肌缺血、加重心肌缺血导致死亡。在影像检查过程中,通过静脉留置针静脉滴注氯胺酮维持麻醉,动物麻醉平稳,安全,易苏醒。

综上,采用Ameroid缩窄环建立猪慢性心肌缺血模型,成功率高,能较好地模拟冠状动脉慢性狭窄的病变过程,满足影像观察的需要。但是仍然存在一定不足,如不能随心所欲控制其逐渐狭窄进程等。

参考文献:

[1] 王胜洵,于建波,刘东. 猪慢性心肌缺血模型的建立[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2004, 11(1):76-77.

[2] 黄澎,励建安,王红星. 应用改良Ameroid法建立冠状动脉慢性狭窄模型的实验研究[J]. 中国临床康复,2004, 8(27):5809-5811.

[3] Cui J, Li J, Mathison M, *et al*. A clinically relevant large-animal model for evaluation of tissue-engineered cardiac surgical patch materials [J]. Cardiovasc Revasc Med, 2005, 6(3): 113-120.

[4] 施冰,郭艳红,邓小莉,等. 中国实验小型猪慢性心肌缺血模型的制备[J]. 中国临床保健杂志,2006, 9(2):134-136.

[5] Fuchs S, Baffour R, Zhou Y F, *et al*. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 37(6): 1726-1732.

[6] Li J, De-Leon H, Ueno T, *et al*. Vasomotor function of pig coronary arteries after chronic coronary occlusion[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2003, 41(4): 600-608.

[7] Miyasaka Y, Haiden M, Kamihata H, *et al*. Usefulness of strain rate imaging in detecting ischemic myocardium during dobutamine stress [J]. Int J Cardiol, 2005, 102(2): 225-231.

[8] Christian T F, Peters K, Keck B, *et al*. Gated SPECT imaging to detect changes in myocardial blood flow during progressive coronary occlusion[J]. Int J Cardiovasc Imaging, 2008, 24(3): 269-276.

[9] Malik J A, Rubal B J, Clarke G D, *et al*. Use and limitations of magnetic resonance phase-contrast assessment of coronary flow reserve in a model of collateral dependence[J]. Comp Med. 2005, 55(4): 317-325.

[10] Radke P W, Heinl-Green A, Frass O M, *et al*. Evaluation of the porcine ameroid constrictor model of myocardial ischemia for therapeutic angiogenesis studies[J]. Endothelium, 2006, 13(1): 25-33.

[11] 黄河,杨天德,杨勇,等. 小型猪胰腺十二指肠移植术中的麻醉管理[J]. 四川动物,2003,22(3):180-182.

[12] 李书闻,王学勇,卿恩明,等. 中国实验小型猪心脏直视手术的麻醉管理[J]. 临床麻醉学杂志,2002,18(9):488.

[13] Roth D M, Maruoka Y, Rogers J, *et al*. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium[J]. Am J Physiol, 1987, 253(5 Pt 2):H1279-H1288.

[14] Fallavollita J A, Canty J M Jr. Ischemic cardiomyopathy in pigs with two-vessel occlusion and viable, chronically dysfunctional myocardium [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(4): H1370-H1379.

(**收稿**:2009-12-07;**修回**:2010-01-25)

(编辑 王 红)