

·综述·

心肌缺血动物模型制备方法*

吴涛¹

心血管疾病是当今威胁人类生命健康的重大疾病,而心肌缺血性疾病又是心血管疾病中的焦点。心血管疾病康复机制研究的关键技术之一是复制心肌缺血动物模型。本文综述常用的心肌缺血动物实验模型的制作方法和研究进展。

1 急性心肌缺血动物模型

急性模型是指短期实验模型,根据模型的特点分为以下几种。

1.1 冠状动脉部分狭窄动物模型

国内学者陈士良早在20世纪80年代就自行研制了剪刀式微米缩窄器^[1]。该缩窄器头部为两个半径为1.5mm的活动半圆,可以卡在冠状动脉上,再用游标卡尺测量出缩窄器尾部尺寸便可以计算出两个半圆内冠状动脉的面积。如果在其上游再放置一个磁流量探头,就可以得出冠状动脉狭窄程度和冠状动脉血流的关系^[2]。国外也有类似用机械缩窄器制作冠状动脉定量狭窄的报道^[3-4]。Prinzen等^[5]制作了可以自动化调节的冠状动脉狭窄模型。该模型在冠状动脉表面缝一水囊,该水囊外接加压泵,此泵调节水囊的压力。在水囊下游冠状动脉插管监测狭窄远端的灌注压,该压力作为反馈信号输入一个伺服系统,实现自动调节冠状动脉狭窄程度。这些可调节的血管狭窄模型可用于冠状动脉部分阻断后冠状动脉血流变化的研究,但是不适于反复心肌缺血的研究。

1.2 冠状动脉完全阻塞动物模型

该类型的动物模型常见于缺血再灌注损伤^[6-10]、缺血预适应^[11-12]、心肌顿抑^[13]、急性心肌冬眠^[14]、心梗^[15]和缺血导致冠状动脉侧支开放^[16]等研究。常用的方法主要是结扎法、球囊扩张法和压迫法等。结扎法^[6-8,13,15]通过结扎或结扎松解缝线,球囊扩张法^[9,14]通过介入技术使在冠状动脉内的球囊扩张或扩张后收缩,这两者都可以产生心肌缺血或缺血再灌注。王红星等^[16]在兔冠状动脉左室支主干远断0.5cm处穿一根5/0缝线,线的两端共穿过一个聚乙烯小管以形成闭环。拉紧闭环并用止血钳固定即阻断血管产生缺血,放松闭环即发生再灌注。在上述的研究过程中,虽然产生缺血的手段不同,但是最终都是冠状动脉的完全阻塞。值得注意的是,根据不同的实验目的和动物,缺血和再灌注时间长短不尽相同,这是制作该类动物模型时需要注意之处。

1.3 离体心肌缺血模型

离体心肌缺血模型多见于有关缺血过程中心肌能量代谢方面的研究^[17-19]。Taniguchi等^[17]在研究Dichloroacetate对心脏缺血性损伤的保护机制中制作了大鼠离体心脏缺血模型。该模型需要使用Langerdorff灌注系统。该系统的灌注液中混合一定浓度的氧气以维持心肌的氧供。通过阻断左房流入和主动脉流出道血流来导致心肌的缺血缺氧。Monteiro P^[18-19]在研究咪达普利和丙酮酸对急性缺血心肌线粒体功能的影响时制作了类似的心肌缺血模型。由于该模型可以排除全身代

谢的影响,比较确切地得出心肌氧耗,并且可以控制所给药物浓度,因此比较适合研究心肌缺血过程中的代谢变化。由于是离体实验,所得的结果和在有整体调节的情况下不同,这是该类模型的局限之处^[17]。

2 慢性心肌缺血动物模型

慢性模型是指长期实验的动物模型,该类模型更符合人类的疾病过程。在研究心血管疾病康复训练的中心效应中,必需复制反复心肌缺血刺激的慢性动物模型。根据制作方式不同,常用有以下几类:

2.1 收缩环法

2.1.1 Ameroid收缩环法:Ameroid环内垫有亲水性物质,可以直接套在冠状动脉上,在2—3周内逐渐使管腔狭窄(>75%)直至闭塞^[20-21]。目前Ameroid缩窄器有标准型、塑料型和钛合金型。后者属于改进型,可行多种特殊检查。徐国会等^[22]在猪左旋支发出第一分支前卡上Ameroid缩窄器,术中放弃了既往从胸骨左缘第4、5肋间进胸法,改从胸骨正中入路,避免了术后胸腔粘连。术后3周行冠状动脉造影显示45%的动物完全闭塞,56%的动物狭窄程度大于75%。二维心超显示左室功能减退,局部室壁运动异常。黄澎等^[22]在徐国会的基础上进一步改进从胸骨左缘入路,避免了胸骨劈开,使手术创伤进一步减小。但是术中可能损伤胸廓内动脉,需要引起注意。目前在慢性冠状动脉狭窄导致心肌缺血和侧支循环的研究中大多采用Ameroid收缩环法,Ameroid缩窄器产生模型的时间短,试验结果可靠^[23-25]。

2.1.2 纤维素膨胀环法:张瑞珍等^[26]在小型猪左旋支近端套一内径为2.5mm的纤维素膨胀环,该环吸水后逐渐膨胀。冠状动脉造影显示,3周后血管狭窄95%—98%,8周后狭窄大于98%,镜检仅个别动物心内膜下有小面积的心肌梗死。

2.1.3 Delran缩窄器法:Folts等^[27]首先介绍了该缩窄器的使用。先用测径器精确测量冠状动脉的外径,然后选择预先准备好的圆筒状的塑料狭窄器卡在相应的冠状动脉。该狭窄器长约2.5mm,能造成冠状动脉60%—80%的狭窄。James等^[28]在猪的前降支和左旋支同时安装内径1.5mm的Delran缩窄器,造成缺血性心肌病的动物模型。该动物模型有中等程度的左心室充盈压提高,整体收缩功能下降,和充血性心衰类似(NYHA Class II and III),并且具有典型的冬眠心肌特征。不足的是该模型在术后42天左右有较高的猝死率(25/40)。值得注意的是,用该缩窄器造成的小型猪单支左前降支(LAD)的慢性狭窄不会造成心肌梗死,不会有左心室整体的功能障碍和心衰^[29]。

*审校:励建安(南京医科大学第一附属医院康复科,南京,210029)

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京,210029

作者简介:吴涛,男,硕士研究生

收稿日期:2005-08-19

在以上的模型制备方法中,前两种都是利用材料的吸水膨胀性,机械压迫冠状动脉,使之产生近乎完全的闭塞。此法导致的慢性心肌缺血和临床过程相近,但是由于是完全闭塞,不能控制狭窄程度,这点又和实践中遇到的冠状动脉部分狭窄不符。后者是按照实验需要,产生固定的部分狭窄,该狭窄确立后不能再次改动。

2.2 压迫法

2.2.1 气囊压迫法: Masahiro 等^[9]在研究促进冠状动脉侧支循环形成的缺血负荷时,在犬左旋支根部安置了气囊,气囊上游安放有流量计。气囊由一个自动充气系统控制,预设好单次缺血时间,频率和冠状动脉血流减少的比率后,每天气囊都会自动充气、放气造成左旋支的可逆性狭窄。狭窄的程度由流量计监测到的信号自动调控。王骏等^[10]在研究侧支循环形成的最佳日缺血负荷时改进了气囊压迫法。他们将自制的气囊固定于兔的左室支,充气端从颈部皮肤穿出固定。随后在体外用注射器给气囊充气,使之膨胀压迫冠状动脉,同时观察心电图 ST 段变化,监测缺血效果。该方法和前者相比简单易行,无需特殊的仪器,实验结果可靠。上述模型都是根据需要定期造成冠状动脉的部分狭窄,但是该狭窄不能在基础状态下稳定维持,这一点需要改进。

2.2.2 水囊压迫法: James 等^[12]在制作慢性冬眠心肌动物模型时一改以往的 Ameroid 缩窄器法,使用了水囊压迫法。James 等认为,以往用 Ameroid 缩窄器导致冠状动脉的完全闭塞,和临床中常见的冠状动脉部分狭窄有区别。而用水囊造成的部分狭窄就避免了冠状动脉完全狭窄,使得模型和人类疾病过程更加相似^[13]。他们在成年小型猪左旋支近端安置了水囊和超声流量探头,于术后 3 天给水囊注水,同时监测冠状动脉血流,当血流减少 90% 时即停止注水。在随后的两天用同样的方法调整水囊注水量,以后直到实验结束不再变动水囊体积。在随后 1 个月的多巴酚丁胺超声心动图试验、正电子发射扫描和电镜检测都显示该模型是冬眠心肌病的成功复制。该模型为心肌冬眠机制的研究和临床长期心肌缺血治疗方案的选择提供了良好的实验对象^[14]。不足的是 James 没有观察水囊压迫造成部分狭窄的长期效果(只观察了 30 天),并且所需设备较复杂。

2.2.3 冠状动脉结扎法: 应用最为广泛、最早的方法是开胸完全或部分阻断冠状动脉^[15]。Mertes^[16]在制作犬冬眠心肌时应用了结扎法。他首先开胸结扎冠状动脉,4 周后再次开胸,通过分流术使结扎血管再通。第二次开胸前后多巴酚丁胺超声心动图试验显示该动物模型符合心肌冬眠的特征。Anderson 等^[17]将冠状血管与一直径为其 1/3 的表面光滑的铁棍一并结扎,然后迅速抽出铁棍,造成前降支狭窄 75%。无独有偶, Boudina^[18]在制作大鼠长期心肌缺血模型时使用了类似的方法: 左侧第四肋间开胸,上提左心耳暴露左冠状动脉,在其起始部位远端 1—2mm 穿线,随后用一个直径 300 μ m 的探针贴近血管,结扎缝线后迅速抽出探针,使血管扩张以避免完全堵塞。张运^[19]在制作慢性冬眠心肌时,先用彩色多普勒超声心动图测量犬左前降支内径,记录血流频谱。然后利用无损导线缩窄左前降支,使左前降支内径减少 50%。术后 6 周左右心超显示局部室壁运动异常,大部分犬未见心肌坏死

灶。Llaneras^[40]在制作缺血性二尖瓣功能不全动物模型时亦使用了结扎法。他们选择性地结扎了绵羊左旋支动脉的第二和第三分支,8 周后心超显示有明显的二尖瓣反流,镜检有二尖瓣乳头肌的梗死。结扎法复制的动物模型,其实是造成急性心肌缺血后的慢性病理过程,这和心肌反复缺血刺激后的病理过程是不同的,因此所得结论外推到临床时必须慎重。

2.2.4 冠状动脉内狭窄法: Nakhjavan 等^[41]将心导管插入犬左前降支及左旋支动脉,然后通过导丝送入金属狭窄器(长 4mm、内径 2.0mm、外径 3.25mm)造成冠状动脉的部分狭窄。Tohngrude 等^[42]将 0.125mm 厚的铅薄片卷成的圆筒状,外裹一个内径 1.0mm 的热收缩塑料管。经心导管将该缩窄器送入猪冠状动脉,导致管腔部分狭窄。Vas R 等^[43]用类似的方法闭胸制备冠状动脉部分狭窄(缩窄 68.5%)。然后超速起搏导致心肌缺血。该缺血是可逆的,静息下没有缺血,增加心率(150bpm)时有缺血表现。此类方法避免了开胸对心脏生理功能的影响。但致窄物短细且狭窄程度轻,不适宜作磁共振检查。孙立军^[44]等用不同内径的聚乙烯导管制成 50% 或 75% 的缩窄器(狭窄有效长度为 10mm),采用 Selding 技术建立犬冠状动脉狭窄动物模型。试验中 15 条犬冠状动脉狭窄造影均获成功。因缩窄器不具磁性,可行磁共振检查。通过导管技术制作冠状动脉部分狭窄的方法,虽然狭窄效果可靠,但此方法技术难度大,操作困难,而且为了避免血管内异物可能引起的血栓,必须使用肝素抗凝^[45],这点需要引起重视。

2.2.5 内膜增殖法: Schwartz 通过导管技术在血管内安置支架使血管内膜损伤,进而成功地建立了一种再狭窄的动物模型^[46]。杨水祥等^[49]改进了 Schwartz 方法,应用了球囊扩张术。他在心电图和 X 线的监控下,将支架送入犬冠状动脉内,同时在 81.6—101.32kPa 压力下持续扩张 30—60s,从而导致冠状动脉内弹力膜破裂平滑肌细胞移行增殖。30 天后内膜明显增厚,管腔狭窄,与临床上置入冠状动脉内支架与再狭窄病理过程相似。此技术的主要缺点是狭窄或闭塞的程度不易控制。

2.2.6 饮食药物法: Nakamura 在制作冠状动脉痉挛模型时应用了此法^[47]。首先通过饮食诱导小型猪动脉粥样硬化,在实验需要时给予组胺或血清素以诱导痉挛,10s 后即可见早期的收缩功能障碍。该方法的不足之处是模型制备耗时较长。Perez 等^[48]在犬冠状动脉安置一个吸附有选择性缩血管物质的离子交换凝胶。该胶能持续释放药物作用于邻近心肌和循环系统。然后通过钾或血清素诱发持续的冠状动脉痉挛。静脉给予硝酸甘油或二氢吡啶类钙离子拮抗剂来逆转痉挛。该动物模型没有血小板血栓的形成。此类动物模型为不稳定心绞痛的发生机制,以及预防和治疗药物筛选提供了良好的研究对象^[47-48]。

参考文献

- [1] 陈士良,臧益民,朱妙章,等.冠状动脉狭窄对血流量的影响[J].生理学报,1989,41(1):91—96.
- [2] 李清,沈学东,朱伟,等.二次谐波显像评价冠状动脉血流储备和狭窄程度的实验研究[J].中国超声医学杂志,1999,15(2):81—83.
- [3] Schmidt A, de Almeida-Filho OC, Ayres-Neto EM, et al. Head-to-head comparison of dipyridamole, dobutamine and pacing stress echocardiography for the detection of myocardial ischemia in an animal model of coronary artery stenosis[J]. Braz J Med Biol Res, 2001, 34(7):903—911.

- [4] Schmidt A, Cesar de Almeida Filho O, Mello Ayres-Neto E, et al. Is left ventricular diastolic thickening documented during dobutamine and pacing stress echocardiography related to myocardial ischemia? An animal model study[J]. *Echocardiography*, 2002,19(1):7-13.
- [5] Prinzen FW, Alewijnse R, van der Vusse GJ, et al. Coronary artery stenosis controlled by distal perfusion pressure: description of the servo-system and time-dependent changes in regional myocardial blood flow [J]. *Basic Res Cardiol*, 1987,82(4): 375-387.
- [6] Auchampach JA, Ge ZD, Wan TC, et al. A3 adenosine receptor agonist IB-MECA reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in dogs [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285 (2):607-613.
- [7] Coetzee A, Moolman J. Halothane and the reperfusion injury in the intact animal model[J]. *Anesth Analg*, 1993,76(4):734-744.
- [8] Klein HH, Pich S, Lindert-Heimberg S, et al. Failure of chronic, high-dose, oral vitamin E treatment to protect the ischemic, reperfused porcine heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25(1):103-112.
- [9] Mor-Avi V, Caiani EG, Collins KA, et al. Combined assessment of myocardial perfusion and regional left ventricular function by analysis of contrast-enhanced power modulation images [J]. *Circulation*, 2001, 104(3):352-357.
- [10] Kavanaugh KM, Aisen AM, Fechner KP, et al. The effects of propranolol on regional cardiac metabolism during ischemia and reperfusion assessed by magnetic resonance spectroscopy [J]. *Am Heart J*, 1990,119(6):1274-1279.
- [11] Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FL, et al. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment [J]. *Circulation*, 1993, 87(3):881-892.
- [12] Miyamae M, Fujiwara H, Kida M, et al. Preconditioning improves energy metabolism during reperfusion but does not attenuate myocardial stunning in porcine hearts [J]. *Circulation*, 1993,88(1):223-234.
- [13] Li XY, McCay PB, Zughaib M, et al. Demonstration of free radical generation in the "stunned" myocardium in the conscious dog and identification of major differences between conscious and open-chest dogs [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92(2): 1025-1041.
- [14] 李东野,潘德锋,夏勇,等. 冠状动脉内多普勒技术评价急性冬眠心肌动物模型冠状动脉血流动力学特点 [J]. *中国介入心脏病学杂志*, 2002,10(4):217-219.
- [15] Udo Hoffmann, Ryan Millea BS, Christian Enzweiler. Acute Myocardial Infarction: Contrast-enhanced Multi-Detector Row CT in a Porcine Model[J]. *Radiology*, 2004, 231:697-701.
- [16] 王红星, 励建安, 路鹏, 等. 缺血负荷对家兔冠状动脉固有侧支循环开放的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2003,18(5):274-277.
- [17] Taniguchi M, Wilson C, Hunter CA, et al. Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(4):1762-1769.
- [18] Monteiro P, Gala S, Nobre S, et al. Impact of imidapril on cardiac mitochondrial function in an ex-vivo animal model of global myocardial ischemia [J]. *Rev Port Cardiol*, 2005, 24(1): 53-61.
- [19] Monteiro P, Duarte A, Moreno A, et al. Pyruvate improves mitochondrial bioenergetics in an ex-vivo animal model of myocardial ischemia[J]. *Rev Port Cardiol*, 2003, 22(1):79-88.
- [20] Myers RW, Scherer JL, Goldstein RA, et al. Effects of nitroglycerin and nitroglycerin-methoxamine during acute myocardial ischemia in dogs with pre-existing multivessel coronary occlusive disease[J]. *Circulation*, 1975,51(4):632-640.
- [21] 徐国会, 励建安, 陈亦江, 等. 慢性冠状动脉狭窄及侧支循环动物模型的建立[J]. *中国康复医学杂志*, 2001, 16(3):137-141.
- [22] 黄澎, 励建安, 王红星. 应用改良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.
- [23] 黄澎, 励建安, 袁红洁, 等. 有氧运动训练对慢性冠状动脉狭窄后侧支循环生成的初步研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2001,17(1):22-25.
- [24] Firoozan S, Wei K, Linka A, et al. A canine model of chronic ischemic cardiomyopathy: characterization of regional flow-function relations [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276 (2 Pt 2):446-455.
- [25] Hamawy AH, Lee LY, Samy SA, et al. Transmyocardial laser revascularization dose response: enhanced perfusion in a porcine ischemia model as a function of channel density[J]. *Ann Thorac Surg*, 2001,72(3):817-822.
- [26] 张端珍, 盖鲁粤, 文应峰, 等. 猪缺血性心脏病模型的快速建立 [J]. *解放军医学杂志*, 2002, 9(27): 846.
- [27] Folts JD, Crowell EB Jr, Rowe GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin[J]. *Circulation*, 1976,54:365-370.
- [28] James A Fallavollita, John M, Cauty Jr. Ischemic cardiomyopathy in pigs with two-vessel occlusion and viable, chronically dysfunctional myocardium[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002,282: 1370-1379.
- [29] Fallavollita JA, Perry BJ, Cauty JM Jr. 18F-2-deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium: evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium[J]. *Circulation*, 1997,95:1900-1909.
- [30] Mohri M, Tomoike H, Noma M, et al. Duration of ischemia is vital for collateral development: repeated brief coronary artery occlusions in conscious dogs[J]. *Circulation Research*, 1989,64: 287-296.
- [31] 王骏, 励建安, 金挺剑, 等. 心肌缺血日负荷对新西兰兔血管内皮生长因子表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2005, 20(3): 165-168.
- [32] James D. St. Louis, G. Chad Hughes, Kypson AP, et al. An experimental model of chronic myocardial hibernation [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 69:1351-1357.
- [33] O'Konski MS, White FC, Longhurst J, et al. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation [J]. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1987,1:69-77.
- [34] Hughes GC, Biswas SS, Yin B, et al. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF [J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 77(3): 812-818.
- [35] Harris AS. Delayed development of ventricular ectopic arrhythmias following experimental coronary occlusion [J]. *Circulation*, 1950,1:131-138.
- [36] Mertes H, Segar DS, Johnson M, et al. Assessment of hibernating myocardium by dobutamine stimulation in a canine model[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 26(5):1348-1355.
- [37] Anderson HT, Kessinger JM, McFarland WJ, et al. Response of the hypertrophied heart to acute anemia and coronary stenosis[J]. *Surgery*, 1978, 84 (1) :8-15.
- [38] Boudina S, Laclau MN, Tariosse L, et al. Alteration of mitochondrial function in a model of chronic ischemia in vivo in rat heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282(3): 821-831.
- [39] 季晓平, 张运, 葛志明, 等. 慢性心肌冬眠动物模型的建立[J]. *山东医科大学学报*, 2001, 39(6):517-519.
- [40] Llaneras MR, Nance ML, Streicher JT, et al. Pathogenesis of ischemic mitral insufficiency [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1993,105(3):439-442; 442-443.
- [41] Nakhjavan FK, Shedrovlazky J, Goldberg H. Experimental myocardial infarction in dogs[J]. *Circulation*, 1968,38:777-782.
- [42] Johnsrude IS, Goodrich JK, Durham NC. An experimental partial occlusive device for vessels delivered by arterial catheter [J]. *Am Heart J*, 1969,77:805-808.
- [43] Vas R, Elkayam U, Meerbaum S. A closed chest animal model for the study of reversible ischemia [J]. *Cardiology*, 1981,67 (3):133-147.
- [44] 孙立军, 李敬帮, 郭庆林, 等. 闭胸式制备犬慢性心缺血和梗塞模型[J]. *第四军医大学学报*, 1997,18(1):51-53.
- [45] Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, et al. Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model[J]. *JACC*, 1992,19:267.
- [46] 杨水祥, 李天德. 冠状动脉血管损伤后再狭窄犬模型的建立[J]. *解放军医学杂志*, 1996,21(2):142-143.
- [47] Nakamura M. Myocardial ischemia [J]. *Jpn Circ J*, 1985,49(1): 1-12.
- [48] Perez JE, Saffitz JE, Gutierrez FA, et al. Coronary artery spasm in intact dogs induced by potassium and serotonin[J]. *Circ Res*, 1983, 52(4):423-431.