

[文章编号] 1000- 4718(2005)11- 2155- 05

结扎犬冠脉左前降支后局部血管及心肌的病理生理变化*

何维来¹, 陈如坤¹, 周汝元², 葛圣林², 陈孝银³

(¹浙江大学医学院第二附属医院心胸外科, 浙江 杭州 310003; ²安徽医科大学第一附属医院心外科, 安徽 合肥 230030; ³暨南大学医学院, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 探讨结扎犬冠状动脉左前降支(LAD)方法制作典型局部冠状动脉狭窄及急性心梗模型的合理性、安全性。方法: 将30只老龄健康杂交犬随机分为A、B、C3组, 结扎LAD, 分别阻断25%、50%、75%的血流。测定结扎前及结扎后各时段内皮因子一氧化氮(NO)、内皮素-1(ET-1)、肌钙蛋白T(CTnT)及P-选择素(P-selectin)的含量变化, Western blotting方法检测心肌组织P-selectin基因表达情况, 两周后切取结扎处远段动脉及局部供血区心肌行电镜观察。结果: 与结扎前对比, A组4种检测指标含量变化不显著, B、C两组NO、ET-1、CTnT及P-selectin含量均有显著变化, 3组组间差异显著, P-selectin基因表达增加, 以C组最为显著, 所有犬均无因心梗发生死亡; 电镜观察: A组冠脉内膜及心肌损伤较轻, B、C两组损伤严重, C组呈典型冠状动脉狭窄及心肌缺血梗死及纤维化病变。结论: 结扎LAD阻断血流75%后损伤显著, 形成典型的局部LAD狭窄及急性心梗病变, 是适合CABG术外科研究安全、合理的模型方法。

[关键词] 冠状动脉狭窄; 内皮细胞; 心肌梗死; 模型, 动物; 冠状动脉分流术

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Pathophysiologic changes of local ischemic coronary artery and cardiac muscle after ligating canine LAD

HE Wei-lai¹, CHEN Ru-kun¹, ZHOU Ru-yuan², GE Sheng-lin², CHEN Xiao-yin³

(¹Department of Cardio-thoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Medical School of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; ²Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230030, China; ³Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To evaluate the reliability of making a research model of coronary artery stenosis and local myocardial infarction reproduced in dog by ligating canine LAD. **METHODS:** We disparted 30 aged healthy cross-breed dogs [(18.5 ± 6.7) kg] into three groups. The near part of the LAD through left minimal thoracic incision was ligated to interdict 25% (group A), 50% (group B), 75% (group C) of the flux, respectively. The changes of plasma endothelium-derived factors NO, ET-1, sP-selectin and CTnT were measured before ligation and at different time points after ligation. The expression of P-selectin gene in cardiac muscle was detected by Western blotting. The segments of distal parts of the ligated LAD were cut and pathological changes of the patches of topical cardiac muscle were observed by electronic microscope. **RESULTS:** After ligation, NO/ET-1, P-selectin and CTnT had significant changes in group B ($P < 0.05$) and group C ($P < 0.01$). The expression of P-selectin of cardiac muscle was highly up-regulated after ligating in B (50%) and C (75%) group, In C group animals, a typical far more intense expression pattern was found. Under electronic microscope, the endothelium and other structures of the LAD wall and ultrastructure of myocardial cells had obvious changes in later two groups, especially in group C. There were a typical stenosis of LAD and myocardial infarction. **CONCLUSIONS:** Ligating the LAD 75% severely damages the endothelial cell and cardiac muscle cells of local ischemic vessel and cardiac muscle, thus forms the typical local stenosis of coronary artery and myocardial infarction, such method is a safe and reasonable way for making a disease model for studying CABG in surgery.

[KEY WORDS] Coronary stenosis; Endothelial cells; Myocardial infarction; Models, animal; Coronary artery bypass

冠状动脉搭桥手术(coronary artery bypass graft, CABG)被广泛认为是治疗冠状动脉疾病的最有效方

[收稿日期] 2004- 10- 29 [修回日期] 2005- 01- 14

* [基金项目] 安徽省自然科学基金十五攻关课题资助项目(No. G321009)

E-mail: hewl2022@sohu.com

法,但 CABG 术后血管桥易于发生再狭窄,影响近、远期血管桥的通畅率和病人的生存率,国际上尚没有适合 CABG 外科研究合理、安全的制作典型局部冠状动脉狭窄及急性心梗动物模型方法,以研究再狭窄机制和有效的防治方法^[1]。采用损伤颈总动脉等大型动脉,及以离体血管代替研究,因与在体冠状动脉的结构和生理上有差异,不能科学地反映疾病和治疗机制,本研究采用不同程度结扎犬冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD)方法,观察分析对局部冠脉内皮及心肌的损伤作用,以及损伤后内皮细胞、炎症细胞与血小板等功能结构的表达变化及交互作用,籍此探讨本方法制作典型局部冠脉狭窄及急性心梗模型的可行性,并探索合适的结扎 LAD 程度。

材 料 和 方 法

1 实验材料

放免法测定内皮活性因子 ET-1 试剂盒及硝酸还原酶法测定 NO 试剂盒由北京北免东雅生物技术研究所提供, sP-selectin 检测试剂盒购自 GeneMay Inc San Diego, 快速一步法检测肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, CTnT) 试剂盒购自美国 Boehringer Mannheim Co., Western blotting 试剂购自于 Sigma Chemical Co.; Viridia M₃ 多功能监护仪(德国产), CYAM-32 麻醉呼吸机, γ-放免检测仪, ACUSON-128XP/10 彩色多普勒电脑显像仪(美国产,探头频率 2.5-4.0 MHz), JEM-100SX 电镜(日本产)等。

健康杂种犬 30 只,体重(18.5±6.7) kg,雌雄不限,由安徽医科大学实验动物中心提供,按相关实验动物管理办法进行饲养和管理。随机分成 3 组, A 组、B 组、C 组,各 10 只。

2 方法

2.1 结扎 LAD 及样品采集 用 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉注射初步麻醉动物后,气管插管接 CYAM-32 麻醉呼吸机予机械通气,给予室内空气混合氧及氟烷。Viridia M₃ 多功能监护仪连续监测心电图、直接动脉压 ABP、中心静脉压 CVP,常规消毒术野,左侧第 4 肋间小切口进胸,打开心包,找到 LAD,于 LAD 近端发出处约 0.5 cm,用换瓣线带针穿过前降支深面,备结扎阻断;将 ACUSON-128XP/10 彩色多普勒超声的消毒探头(2.5-4.0 MHz)直接置于备结扎处远端冠状动脉外心表,测量动脉的每分血流量。根据血流量测定阻断 75% 并打结固定。分别于阻断前及阻断后 5 min、30 min、60 min 经右心耳处抽血 6 mL,各测 NO 及 ET-1 含量,于阻断前及阻断后 3 h、6 h 分别自静脉置管抽血 2 mL 各测 CTnT 含量,阻

断前及阻断后 15 min、3 h、6 h、12 h、24 h 采静脉血备测 sP-selectin 含量。于结扎后 1.5 h、12 h 切取结扎后局部供血区心肌检测心肌组织 P-selectin 基因表达,并切取结扎前正常心肌组织作为对比。高胆固醇饲料连续饲养动物 2 周后,切取结扎处远段小片冠状动脉及供血区心肌,以 Krebs 液冲洗后,置于 4% PBS 戊二醛溶液初步保存,备电镜观察。

2.2 指标测定及观察方法 严格按各试剂盒说明书处理保存的被测样品,按要求采用放免法测定 ET-1 含量,硝酸还原酶法测定 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平,快速一步法检测 CTnT 含量,双抗体夹心法酶联免疫吸附实验(ELISA 法)测定血浆 sP-selectin 水平。

2.3 电镜观察 按要求处理标本, JEM-100SX 电镜下观察。

2.4 Western blotting(P-selectin 表达) 低温下提取心肌组织匀浆,缓冲剂(50 mmol/L Tris, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% 三硝基甲苯 X-100, 10 g/L 苯基烷硫酰氟化物, 1 g/L 亮氨酸, 1 g/L 抑肽酶)处理,孵育 10 min,组织匀浆离心(3 000 r/min, 5 min, 4 °C),上清液于 280 °C 贮存,样品(每格 100 mg 蛋白, biononic acid assay)加入钠十二烷基-硫酸聚丙烯酰胺凝胶中电泳(5% 堆胶, 7.5% 分离胶),将印迹从明胶电转移至硝酸纤维薄膜上,封闭后,印迹加兔多克隆抗体孵育 2 h, (1:5 000) 抗缩氨酸对应于 25 羧基端, P-selectin 氨基酸(31), 羊抗兔抗体与辣根过氧化物酶共扼,加 II 抗,最后冲洗印迹,用 ECL 化学荧光底物浸染, X-ray 胶片放射自显影观察。

3 统计学处理

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对 *t* 检验及单因素方差分析,以分析组间和组内差异显著性。

结 果

1 内皮活性因子含量变化情况

A 组在结扎 LAD 后各时点检测含量变化与 B、C 组对比有显著差异, A 组结扎后各时段 NO₂⁻/NO₃⁻ 和 ET-1 检测含量对比结扎前无显著差异,而 B 组及 C 组有显著差异(表 1)。

2 3 组心肌组织 P-selectin 表达及血浆 sP-selectin 含量变化

3 组结扎 LAD 后心肌组织 P-selectin 基因表达情况见图 1。3 组在结扎 LAD 后各时点血浆 sP-selectin 含量变化对比见图 2。

3 3 组血浆 CTnT 含量变化对比

A 组在结扎 LAD 后各时间含量变化与 B 及 C 组对比有显著差异,见图 3, A 组结扎后各时段血浆

表 1 3 组血浆 NO₂⁻ / NO₃⁻ (μmol/L) 和 ET- 1(ng/L) 含量变化

Tab 1 Changes of plasma NO₂⁻ / NO₃⁻ (μmol/L) and ET- 1(ng/L) control ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Measurement	Group	Before ischemia	Ischemia		
			5 min	30 min	60 min
NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	A(25%)	89.33 ± 11.36	88.94 ± 9.70	85.48 ± 6.58	88.71 ± 6.71
	B(50%)	88.99 ± 10.90	74.60 ± 9.89 ^{△*}	75.71 ± 7.90 [△]	71.20 ± 10.30 ^{△**}
	C(75%)	93.95 ± 6.67	76.53 ± 8.94 ^{△*}	82.90 ± 9.41 [△]	65.24 ± 11.11 ^{△△**}
ET- 1	A(25%)	53.12 ± 10.21	53.81 ± 9.68	57.46 ± 8.56	55.68 ± 9.32
	B(50%)	51.01 ± 9.12	72.05 ± 12.88 ^{△*}	53.57 ± 9.92	76.89 ± 10.76 ^{△△**}
	C(75%)	54.48 ± 9.59	72.57 ± 8.85 ^{△*}	56.74 ± 8.34 [△]	78.90 ± 10.75 ^{△△**}

[△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01 vs before ischemia; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs A group.

CTnT 含量与结扎前无显著差异, 而 B 组及 C 组有显著差异(P < 0.01)。

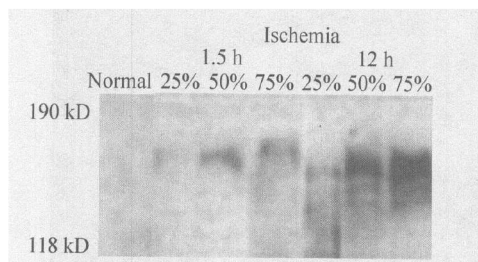


Fig 1 Expression of P- selectin of protein extracts from homogenate cardiac muscle of representative A (25%), B (50%), C (75%) after ligating LAD and normal cardiac muscle using Western blotting.

图 1 用 Western blotting 方法分析 A (25%), B (50%), C (75%) 3 组结扎及正常心肌组织匀浆提取蛋白 P- selectin 表达情况

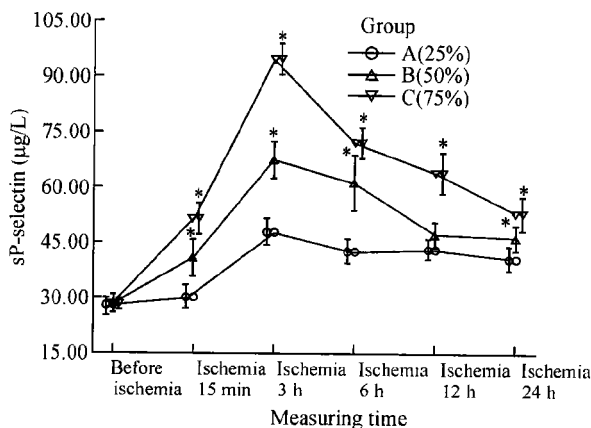


Fig 2 Measurement of plasma sP- selectin in different time after ligating LAD. $\bar{x} \pm s$, n = 10. * P < 0.01 vs A group.

图 2 结扎 LAD 后不同时段血浆 sP- selectin 检测含量变化

4 电镜观察结扎 LAD 后血管内膜及心肌的病理变化

A 组取材血管片段的血管壁各层结构损伤较轻, 内膜结构完整, 内皮细胞亚结构变化不明显, 平滑肌细胞增殖、脂质沉积及空泡化变表现相对较轻, 供血区心肌细胞结构无明显的变化, 线粒体轻度增

多, 有轻度的线粒体结构破坏, 见图 4.5。B 组及 C 组取材的血管片段及供血区心肌有明显的病理变化, 血管内膜结构有不同程度破坏, 内皮细胞表现为不同程度的损伤或缺失, 细胞内超微结构损伤明显, 管壁出现显著的增生和平滑肌细胞迁移, 平滑肌细胞内出现较多的脂质空泡, 动脉内弹力膜变薄, 心肌细胞结构有不同程度损伤及大片坏死, 出现线粒体严重破坏, 纤维断裂、肌小节结构异常现象, 心肌线粒体肿胀、膜破裂及结构异常, 坏死部分心肌纤维化明显, 见图 6- 9。

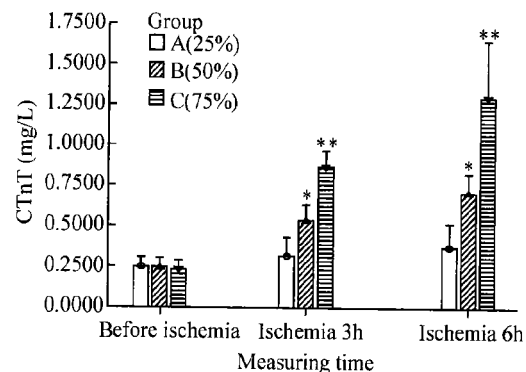


Fig 3 Measurement of plasma CTnT in different time after ligating LAD. $\bar{x} \pm s$, n = 10. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs A group.

图 3 结扎 LAD 后不同时段血浆 CTnT 检测含量变化

讨 论

冠状动脉是缺血再灌注损伤的关键结构, 管壁的内膜、弹力层、平滑肌等结构与其它动脉不同, 其肌源性收缩较弱, 血管阻力及心肌肌源性收缩只占影响腔径影响因素的 10%, 这种独特的结构和功能是 CABG 术缺乏合理的移植血管的重要原因^[2]。结扎 LAD 后, 缺血及再灌注损伤使内皮细胞发生表型变化及功能紊乱, 丧失血管扩张功能, 引起血小板凝集性增加, 白细胞炎症反应, 平滑肌细胞增生, 进一步加重血管狭窄和心肌梗死。缺血再灌注损伤后,

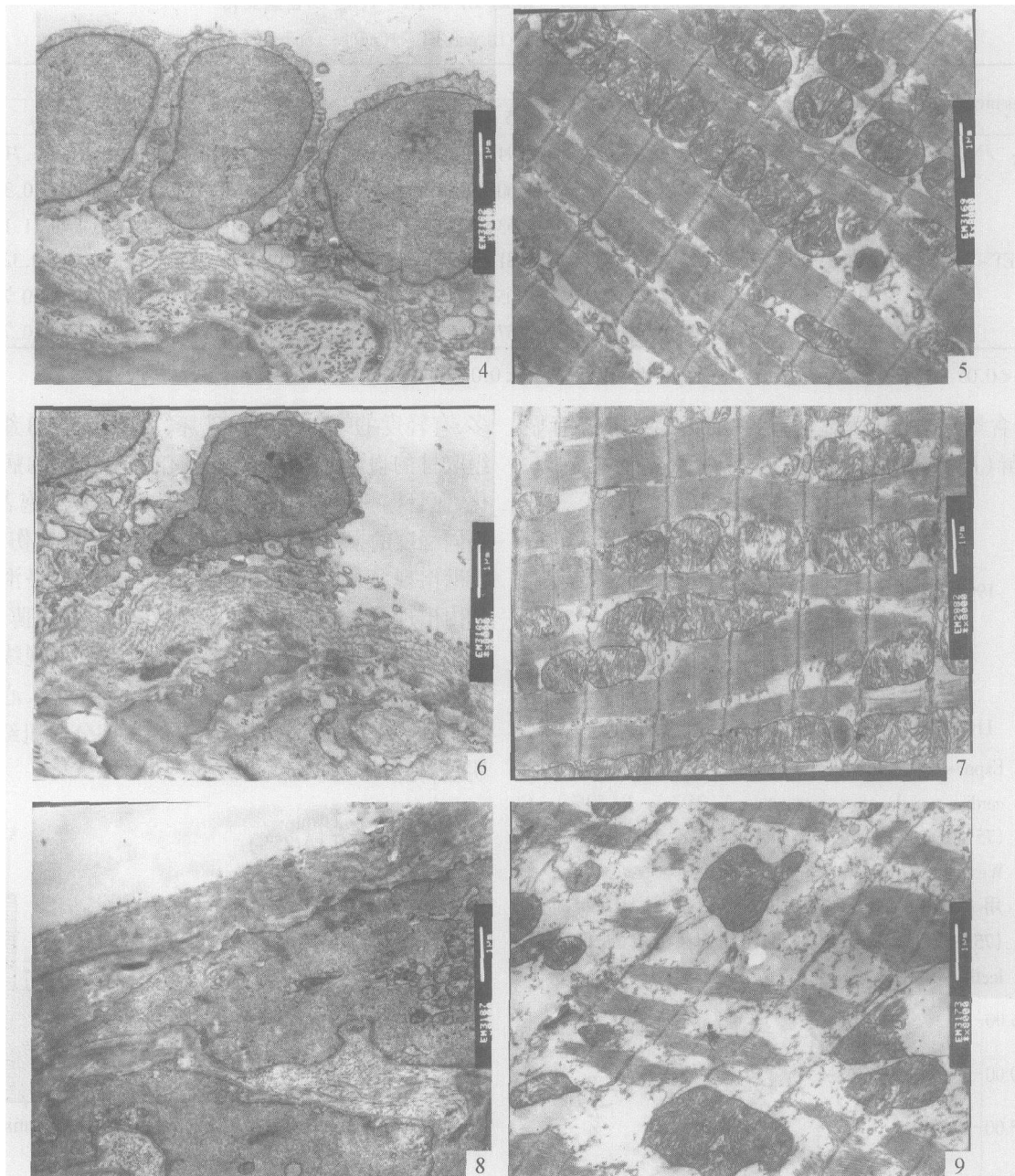


Fig 4 Changes of endothecium of LAD in A group after ligation. There were only some mild injury in endothecium of coronary artery ($\times 8\ 000$).

图 4 A 组结扎后 LAD 内膜变化

Fig 5 Changes of cardiac muscle in A group after ligation. There were only some mild injury in cardiac muscle, and mild damage in ultrastructure of myocardial cell ($\times 8\ 000$).

图 5 A 组结扎后心肌变化

Fig 6 Changes of endothecium of LAD in B group after ligation. There were obvious injury in endothecium of coronary artery. The endothelium became lost, the resilient layer had obviously become thinner, and there were more vacuole in the smooth muscle cell ($\times 8\ 000$).

图 6 B 组结扎后 LAD 内膜变化

Fig 7 Changes of cardiac muscle in B group after ligation. There were obvious infarction changes and slight fibrosis after infarction in cardiac muscle, and notable damage in ultrastructure of myocardial cell ($\times 8\ 000$).

图 7 B 组结扎后心肌变化

Fig 8 Changes of endothecium of LAD in C group after ligation. There were serious damages and absence of endothelium in endothecium of coronary artery, the resilient layer had notably become thinner, and there were more vacuole in the smooth muscle cell ($\times 8\ 000$).

图 8 C 组结扎后 LAD 内膜变化

Fig 9 Changes of cardiac muscle in C group. There were serious infarction and fibrosis after infarction in cardiac muscle ($\times 8\ 000$).

图 9 C 组结扎后心肌变化

血液中的白细胞、血小板、血管壁中的平滑肌细胞以及心肌细胞等结构在损伤后所产生的各种血管活性因子、粘附分子及炎症分子发生表达变化,与损伤后的内皮细胞表达变化产生交互作用和连锁反应^[3]。因此,只有冠状循环存在这种相互作用的环境,于冠状动脉局部复制狭窄模型以进行 CABG 外科研究可以更科学地反映疾病和治疗机制。

我们发现结扎 LAD 达到 75% 时,缺血和冠脉侧枝循环扩张对缺血部位的再灌注可以导致显著的内皮细胞损伤。内皮活性因子 NO/ET-1 的表达属于快速调节,结扎 LAD 75% 后 NO 检测水平显著下降,ET-1 显著上升,反映内皮细胞有严重损伤。NO/ET-1 表达变化引起其它多种内皮活性因子表达的连锁变化,这种变化对于冠状动脉的作用较其它血管尤为显著^[4]。NO 表达下降导致 LAD 及其末端分支痉挛、内膜增生,加重血管狭窄及心梗病变。ET-1 表达增加引起冠状动脉强烈收缩及远端阻力增加,诱导血管平滑肌细胞的原癌基因 *c-myc* 等表达上调和抑癌基因 *p53* 等下调,*c-myc* 表达改变是平滑肌细胞增生和迁移的始动因素,*p53* 和 *c-myc* 的表达改变致使平滑肌增殖、向内膜下迁移,并合成大量细胞外基质沉积于血管壁而引起新生内膜增厚,促进血管狭窄和心肌损伤^[5]。

炎症是冠状动脉狭窄及心梗发病机制的重要环节,P-选择素(P-selectin)表达和细胞间释放对白细胞进入损伤组织起着关键作用,其表达水平反映炎症激活程度。本实验结扎 LAD 75% 后,缺血和再灌注损伤通过 P-selectin 基因多肽性调节使其表达显著上调,细胞间 sP-selectin 释放显著增加。释放到细胞表面的 P-selectin 高亲和性结合于白细胞表面特定的白细胞分子配基 P-selectin 糖蛋白配基 1 (P-selectin glycoprotein ligand-1, PSGL-1) 发挥作用,使内皮细胞粘附俘获血流中央自由流动的白细胞,形成稳定的沿内皮白细胞附壁滚动,进一步迁移、溢出血管壁进入淋巴组织和炎症部位,激活炎症及血栓形成。体内 P-selectin 基因表达要受到白细胞和血小板的反应性调节,PSGL-1 的 O-多糖的结构预调对识别 P-selectin 有重要作用,影响 P-selectin 表达和作用^[6,7]。因此,P-selectin 表达对炎症的激活涉及内皮细胞、血小板和白细胞等多个功能结构,体外离体血管模型难于复制这种变化。

结扎 LAD 75% 后 CTnT 检测含量显著增加,反映心肌组织损伤显著。心肌肌钙蛋白(myocardial troponins, CTn, 包括 T, I, C) CTn 联结原肌球蛋白,共同构成横纹肌的主要收缩单位^[8]。结扎 LAD 后,心肌细胞变性、坏死,肌纤维结构破坏,CTn 连接结构破坏

而释放进入血液中,在结扎后 2 h 即检测出 CTnT 含量有显著的升高,CTnT 含量增加反映了心肌细胞损伤程度。另外,本研究检测 P-selectin 基因表达上调与 CTnT 含量增加具有一致性,反映了局部炎症连锁反应对心肌细胞损伤的放大作用。

根据本研究结果,我们认为结扎 LAD 75% 后内皮细胞、心肌细胞损伤及促炎症黏附分子表达变化显著,并且这种变化与血管狭窄、心梗及心肌纤维化病变存在一致性,体现了冠状动脉疾病的内皮细胞、平滑肌细胞、血小板、炎细胞及心肌等多种功能结构及其表达分子间的交互作用和连锁反应,因而结扎 LAD 75% 在体模型的局部冠状动脉狭窄和心梗病变是典型的,可以真实地反映冠状动脉疾病病变机制。另外,由于犬的冠状动脉回旋支、对角支相对发达,虽然结扎 LAD 75% 后局部病变显著,但来自回旋支、对角支动脉以及右冠动脉远段分支部分侧枝循环扩张对缺血部位的再灌注缩小了心梗面积,使犬不会因大面积心梗而心衰死亡,模型动物可以正常生存以供进一步的 CABG 外科实验研究,结扎犬 LAD 75% 是安全的。因此,采用本方法制作在体局部冠状动脉狭窄和心梗模型,适合于 CABG 研究。

[参 考 文 献]

- [1] Herlitz J. Secondary prevention after coronary artery bypass grafting- what do we know? [J]. Scand Cardiovasc J, 2004, 38(2): 69- 74.
- [2] Konidala S, Gutteman DD. Coronary vasospasm and the regulation of coronary blood flow[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2004, 46(4): 349- 373.
- [3] Samra SS, Walwaikar PP, Morye VK, et al. Accelerated atherosclerosis[J]. J Indian Med Assoc, 2002, 100(8): 516, 518- 521.
- [4] Dube S, Cauty JM Jr. Shear stress- induced vasodilation in porcine coronary conduit arteries is independent of nitric oxide release[J]. Am J Physiol, 2001, 280(6): H2581- H2590.
- [5] Bousette N, Giaid A. Endothelin- 1 in atherosclerosis and other vasculopathies[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2003, 81(6): 578- 587.
- [6] Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, et al. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury [J]. Front Biosci, 2000, 01(5): e103- e109.
- [7] Kälvegren H, Majeed M, Bengtsson T. Chlamydia pneumoniae binds to platelets and triggers P-selectin expression and aggregation. A causal role in cardiovascular disease? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003, 23(9): 1677- 1683.
- [8] Giannitsis E, Katus HA. Comparison of cardiac troponin T and troponin I assays- implications of analytical and biochemical differences on clinical performance[J]. Clin Lab, 2004, 50(9- 10): 521- 528.