

## 冠状动脉微循环障碍动物模型建立的方法及评析

苏立硕, 王贤良, 毛静远

天津中医药大学第一附属医院心血管科, 天津 300193

通信作者: 王贤良 电话: 022-27432329, 电子邮件: xlwang1981@126.com

**摘要:** 冠状动脉微循环障碍动物模型是研究冠状动脉微循环障碍病理及治疗干预机制的重要平台, 现常用的动物模型制备方法主要是通过机械性阻塞和化学性损伤形成冠状动脉微栓塞或微血栓, 造成冠状动脉微循环障碍, 本文总结和对比了常用冠状动脉微循环障碍动物模型建立方法的技术要点及优缺点。

**关键词:** 冠状动脉微循环障碍; 冠状动脉微血栓; 动物模型

中图分类号: R-332 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2014)05-0542-04

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2014.05.017

### Establishment and Evaluation on the Animal Models with Coronary Microcirculation Dysfunction

SU Li-shuo, WANG Xian-liang, MAO Jing-yuan

Department of Cardiology, First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China

Corresponding author: WANG Xian-liang Tel: 022-27432329, E-mail: xlwang1981@126.com

**ABSTRACT:** Animal models of coronary microcirculation dysfunction are useful in research on the pathology of coronary microcirculation dysfunction and its intervention mechanisms. Currently, such animal models are prepared mainly by mechanical obstruction and chemical damage form coronary microembolization or microthrombosis. This paper summarizes the currently available preparation techniques and compared their advantages and disadvantages.

**Key words:** coronary microcirculation dysfunction; coronary microvascular thrombosis; animal model

*Acta Acad Med Sin*, 2014, 36(5):542-545

冠状动脉微血栓形成或血栓栓塞是冠状动脉微循环障碍的重要原因, 建立理想的冠状动脉微血栓形成或血栓栓塞动物模型, 是探讨冠状动脉微循环障碍发生、发展和药效、药理的价值研究平台。人类疾病动物模型的设计, 应遵循相似性、重复性、可靠性、适用性、可控性、易行性和经济性的原则<sup>[1]</sup>。复制冠状动脉微循环障碍实验动物模型目前多选用猪、犬和大鼠等, 其中犬血液循环系统发达, 猪的心血管系统与人类相似, 但两者价格较高, 故不常选用; 而大鼠体型较小, 易获得, 且价格较低, 相对较为理想<sup>[2]</sup>。

在造模方法上, 目前常用的主要有机械性栓塞和化学性损伤栓塞两种, 前者主要包括冠状动脉内注射微栓塞球法、自体微血栓法, 后者主要指冠状动脉内注射月桂酸钠。本文分析和总结了常用冠状动脉微循环障碍动物模型建立方法的技术要点和优缺点。

#### 冠状动脉内注射微栓塞球法

应用的实验动物多为猪、犬等大动物, 即导管直接从前降支或回旋支注入制备好的微栓塞球, 以造成

冠状动脉微栓塞，导致冠脉微循环障碍<sup>[3-5]</sup>。

**实验动物及材料** 实验动物为12周龄的健康小型家猪，体重25~30 kg，雌雄不限。实验材料包括手术台、紫外灯、手术器械、针线等1套，3%戊巴比妥钠、氯胺酮、地西洋、肝素、6F动脉鞘、DSA血管造影机、超导磁共振成像仪、6F指引导管和3.0/2.8F微导管。

#### 实验步骤

**微栓塞球制备：**取直径为42 μm的微栓塞球原液（Dyno公司，挪威）30 μl于1.5 ml的EP管中，加入0.9% NaCl液1.5 ml，充分吹打混匀，用血细胞计数板于100×显微镜下计数，连续计数5次，求平均值，后分装出12万个微栓塞球于60 ml离心管内，加入0.9% NaCl液至30 ml，再次计数核查。

**麻醉：**以20 mg/kg氯胺酮和地西洋2 mg/kg肌内注射诱导麻醉，3%戊巴比妥钠静脉推注维持麻醉。术中维持动物体温在37~38℃。

**插管造影：**分离右侧股动脉，植入6F动脉鞘，经鞘注入肝素200 U/kg达肝素化，后以100 U/(kg·h)维持。行冠状动脉造影，并经指引导管送入微导管（3.0/2.8F Cordis Inc.）至左前降支分出第1对角支后的远端。

**注射：**使用前充分振荡微栓塞球液，用60 ml注射器抽出，再用5 ml 0.9% NaCl液冲洗2次离心管，抽入60 ml注射器中，后经微导管在40 min内注入左前降支冠状动脉内<sup>[4]</sup>，后以10 ml 0.9% NaCl液冲洗微导管。术后给予青霉素8万U肌注3 d预防感染。

**相关检测评价指标** 陈章炜等<sup>[3]</sup>采用此方法造模后2 h血清转化生长因子-β<sub>1</sub>（trans-forming growth factor-β<sub>1</sub>，TGF-β<sub>1</sub>）升高，6 h达到高峰，1周时下降，心肌病理切片可见微小梗死灶。此外还有研究显示，通过此方法造模后1周，模型组心肌大体切片NBT染色可见微小梗死灶，证明通过该方法可以建立冠状动脉微栓塞模型，形成冠状动脉微循环障碍<sup>[5]</sup>。

**优缺点分析** 冠状动脉内注射微栓塞球法主要通过机械性阻塞冠状动脉远端微血管，造成微循环障碍，其机制与冠状动脉再通术后血栓、斑块碎片等随血流阻塞远端微血管相似。优点是不需要开胸、损伤小、动物死亡率低、可靠性高。主要缺点是栓塞的微球与实际冠状动脉斑块破裂后释出的富含血小板、纤维蛋白、红细胞等成分的血栓栓子不同，其不为血中纤溶物质所溶解，不能实现再通，而且微球对局部组织释放的血管活性物质的反应同真正的微血栓也存在

差别<sup>[6]</sup>，不能引起血管收缩、凝血改变、局部炎症反应等微环境改变，与临床病理生理不符，对药物治疗的研究应用价值较小，且实验成本较高，操作复杂，易行性较差。

## 自体微血栓法

采用大鼠自身血凝固成血栓后研磨成的颗粒状栓塞剂，注入主动脉根部或者左心室，引起冠状动脉微血管堵塞，造成冠状动脉微循环障碍<sup>[7-8]</sup>。

**实验动物及材料** 实验动物为清洁级大鼠，体重约250~300 g。实验材料包括小动物呼吸机、手术台、紫外灯、手术器械、气管插管、针线等1套，1%戊巴比妥钠。

#### 实验步骤

**自体血栓制备：**大鼠剪尾取血约1 ml，体外自凝成血凝块。研磨成均匀颗粒悬液备用。

**麻醉：**1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔内注射麻醉后仰卧位固定。

**辅助通气：**颈部备皮后切开皮肤，暴露气管。经口气管插管后接小动物呼吸机辅助呼吸，有氧正压通气，潮气量2~3 ml，吸呼比1:2，呼吸频率60次/min。

**开胸：**经左侧胸壁第2肋间逐层开胸，暴露心脏后撕开心包，露出主动脉根部。

**注射：**用小动脉夹钳夹升主动脉，使用0.5 mm胰岛素注射器刺入主动脉根部，分2次注入自体血栓0.2 ml，约10 s后松开钳夹，压迫止血后关胸复苏。术后给予青霉素8万U肌注3 d预防感染。

**相关检测评价指标** 可通过观察心脏病理切片予以评价。有研究发现，心脏HE染色显示模型组小冠状动脉栓塞数量明显多于假手术组和正常对照组，MSB染色显示模型组纤维蛋白染色阳性的微动脉数量明显多于假手术组和正常对照组，Sirius-Red染色显示模型组心肌胶原纤维面积百分比明显高于假手术组和正常对照组，提示进入冠状动脉的血栓微粒阻塞了微小冠状动脉，造成冠状动脉微栓塞、微循环障碍<sup>[7]</sup>。

**优缺点分析** 该模型制备的机制为机械性堵塞，堵塞材料为自身血栓，成分与临床冠状动脉微血栓成分接近，但是无内皮损伤和微血管病变因素。优点为血栓来源于自身，且富含血小板、纤维蛋白、红细胞等，可以成功诱发大鼠冠状动脉微栓塞，且模型相对更符合冠状动脉微栓塞时病理的改变。此外，实验动物可选用大鼠，较冠状动脉内注射微栓塞球法可明显

降低实验成本<sup>[6]</sup>。主要缺点是该模型为非原位血栓形成,不以血管内皮损伤为起始病因<sup>[9]</sup>,无临床冠状动脉血管内皮损伤表现,且血栓制备复杂,需要多次注入血栓微粒,开胸时间较长,损伤大,对呼吸和循环影响大,动物死亡率高。

## 化学损伤法

多采用心尖部或主动脉根部注射月桂酸钠,造成冠状动脉微血管的损伤和栓塞,形成冠状动脉微循环障碍<sup>[10]</sup>。

**实验动物及材料** 实验动物为清洁级大鼠,体重约250~300 g。实验材料为小动物呼吸机、手术台、紫外灯、手术器械、气管插管、针线等1套,1%戊巴比妥钠、月桂酸钠(20 mg/ml)。

### 实验步骤

**麻醉:** 1%戊巴比妥钠50 mg/kg腹腔内注射麻醉后仰卧位固定。

**辅助通气:** 颈部备皮后切开皮肤,暴露气管。经口气管插管后接小动物呼吸机辅助呼吸,有氧正压通气,潮气量2~3 ml,吸呼比1:2,呼吸频率60次/min。

**开胸:** 经左侧胸壁第2肋间逐层开胸,横断胸骨,暴露心脏后撕开心包,露出主动脉根部。

**注射:** 用小动脉夹钳夹升主动脉,使用0.5 mm胰岛素注射器刺入主动脉根部注入月桂酸1.0 mg/kg(浓度10 mg/ml),约10 s后松开钳夹,压迫止血后关胸复苏。术后给予青霉素8万U肌注3 d预防感染。

**相关检测评价指标** 可通过观察微血管内皮损伤情况、微栓塞形成情况和检测血管内皮损伤相关因子检测和评价该方法。有研究结果显示,实验模型组出现微动脉血管内皮损伤及微栓塞形成,对照组则未出现。Nagar-Olsen染色可见模型组心肌缺血,对照组无心肌缺血,提示该方法可以诱导冠状动脉微血栓形成,造成冠状动脉微循环障碍<sup>[10]</sup>。此外有研究结果发现,与对照组相比,模型组一氧化氮(nitrogen monoxide, NO)水平明显下降,内皮素-1(endothelin-1, ET-1)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平明显上升,提示该方法可导致冠状动脉微血管内皮损伤和(或)内皮功能障碍<sup>[9]</sup>。

**优缺点分析** 该方法通过化学药物造成微血管内皮损伤,引起微血管病变,诱发血小板黏附聚集、促进微血管栓塞的形成。优点是月桂酸钠1 h左右可

见冠状动脉微动脉发生内皮损伤,诱发微血栓,而较大动脉内无明显血栓形成<sup>[6,10-12]</sup>,病理组织学损害与冠状动脉微栓塞相同,伴局灶心肌低氧<sup>[10]</sup>、心功能下降、心脏结构改变<sup>[13]</sup>,HE染色示血管内皮损伤以及炎性细胞浸润的程度明显高于微球注射组<sup>[11]</sup>,且实验成本较低,是合适的冠状动脉微血管内皮损伤致微循环障碍模型。主要缺点为需要开胸操作,损伤大,对呼吸和循环影响大,动物死亡率相对较高<sup>[14]</sup>,如果采用小动物呼吸机辅助呼吸,可降低死亡率。

总之,目前冠状动脉微循环障碍主要发病机制包括血管内皮功能异常、炎症反应、微血管病变、血流动力学异常等,临床主要表现为再通后无复流、慢血流和X综合征。冠状动脉内注射微栓塞球法和自体微血栓法为机械性栓塞,其产生栓塞的机理与血管堵塞造成心肌毛细血管阻力增加导致的冠状动脉微循环障碍相似,不影响血管内皮功能,不会引起炎症反应和微血管病变,也不能反映临床上的多种发病机制。化学损伤法通过化学损伤方法造成血管内皮功能异常,可引起炎症反应,导致冠状动脉微循环总阻力增加,其形成的微栓子机制和成分都与临床非常相似。故通过化学损伤法建立的动物模型与临床冠状动脉微循环障碍特点更为接近,适用于不同发病机制导致的冠状动脉微循环障碍实验研究,有利于冠状动脉微循环障碍形成机制和治疗的进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] 李彦川,李欣欣.心力衰竭动物模型简述[J].医学综述,2011,17(8):1154-1157.
- [2] 彭成.中医药动物实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2008:13-20.
- [3] 陈章炜,钱菊英,马剑英等.猪冠状动脉微栓塞模型血清TGF- $\beta$ 1的表达[J].中国临床医学2009,16(2):172-175.
- [4] Andreas S, Rainer S, Petra G, et al. Coronary microembolization does not induce acute preconditioning against infarction in pigs-the role of adenosine [J]. Cardiovascular Res, 2004, 63(2):313-322.
- [5] 陈章炜.心室重构和心肌凋亡对冠状动脉微栓塞后心功能不全的影响及机制[D].上海:复旦大学,2011:19-24.
- [6] Dorge H, Neumann T, Bethends M, et al. Perfusion-contraction mismatch with coronary microvascular obstruction; role of inflammation [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(6):H2587-H2592.
- [7] 傅发源,陈良龙.一种新的大鼠冠状动脉微栓塞模型

- [J]. 中国心血管病研究杂志, 2004, 2(4):296-297.
- [8] Li S, Zhong S, Zeng K, et al. Blockade of NF-kappaB by pyrrolidine dithiocarbamate attenuates myocardial inflammatory response and ventricular dysfunction following coronary microembolization induced by homologous microthrombi in rats [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(1):139-150.
- [9] 陈良, 蒋锦琪, 张良道. 大白兔冠状动脉微血栓模型的建立 [J]. *临床心血管病杂志*, 2012, 28(1):76-79.
- [10] 叶明芳, 陈良龙, 陈丹, 等. 大鼠冠状动脉微血栓模型 [J]. *福建医科大学学报*, 2003, 37(1):58-59.
- [11] 沈成兴, 梁春, 陈良龙, 等. 经冠状动脉内注射月桂酸钠构建大鼠冠状动脉微栓塞模型 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13(4):447-450.
- [12] Skyschally A, Leineweber K, Gres P, et al. Coronary microembolization [J]. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101(5):373-382.
- [13] 綦海, 张毛毛, 吴健, 等. 月桂酸钠致心肌微循环栓塞机制的研究 [J]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2011, 3(6):49-53.
- [14] Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, et al. A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-Kinase inhibitor [J]. *Stroke*, 2000, 31(9):2245-2250.

(收稿日期: 2014-03-12)