

- kinson disease[J]. J Neurosurg, 2005, 102(1): 80-89.
- [7] Chen RW, Chuang DM. Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity [J]. J Biol Chem, 1999, 274(10): 6039-6042.
- [8] Manji HK, Moot GJ, Chen G. Lithium up-regulates the cytoprotective protein Bcl-2 in the CNS in vivo; a role for neurotrophic and neuroprotective effects in manic depressive illness[J]. J Clin Psychiatry, 2000, 9(1): 82-89.
- [9] Neri LM, Borgatti P, Capitani S, et al. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1584(2-3): 73-80.

收稿日期: 2006-10-09 修回日期: 2006-11-02

本文编辑: 宋成洁

闭胸法制备急性冬眠心肌动物模型的实验研究*

潘德锋, 夏勇, 徐晤, 钱文浩, 杨煜, 朱红, 李东野

(徐州医学院附属医院心内科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨闭胸法制备急性冬眠心肌动物模型的可行性及冠状动脉血流动力学特点, 为冬眠心肌的研究提供合适模型。方法 13只小型中国家猪, 以右冠状动脉为靶血管, 以冠状动脉内多普勒导丝为导引钢丝, 采用闭胸介入法将球囊导入靶血管, 通过球囊扩张造成冠状动脉严重狭窄($\geq 90\%$), 观测模型制备前后冠状动脉狭窄程度、心肌梗死溶栓治疗临床试验(thrombolysis in myocardial infarction, TIMI)血流分级、室壁运动、冠状动脉血流动力学指标的变化情况; 处死实验动物, 行三硝基四氮唑红(triphenyltetrazolium chloride, TTC)心肌大体染色及光镜检查, 观察心肌细胞的病理改变。结果 10只动物完成实验研究, 冠状动脉狭窄程度均 $\geq 90\%$, TIMI血流分级均 \leq II级, 左心室共有55个节段发生节段性室壁运动障碍, 狭窄冠状动脉远端的平均峰值流速、舒张收缩流速比值、冠状动脉血流速度储备均明显降低, TTC大体染色未示心肌坏死灶, 光镜仅示核周肿胀和毛细血管充血、扩张等改变, 表明模型制备成功。结论 闭胸法制备急性冬眠心肌模型效果确切, 安全可行, 动物死亡率低, 优于传统的开胸法, 有较好的应用前景。模型相关冠状动脉的血流动力学指标明显降低, 可作为判断模型成功的一。

关键词:冬眠心肌; 动物模型; 闭胸法; 猪

中图分类号: R541.4; R540.4⁺6 文献标识码: A 文章编号: 1000-2065(2006)06-0485-05

The establishment of an animal model of acute hibernating myocardium by closed-chest (interventional) method

PAN De-feng, XIA Yong, XU Wu, et al

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To define the feasibility of the closed-chest method in establishing animal model of acute hibernating myocardium (AHM), by assessing the hemodynamic indexes of the related coronary artery. **Methods** 13 little domestic Chinese swine were used in the study of AHM, using the right coronary artery as the target vessel. Intracoronary Doppler flow-wire was used as the guidewire in producing the coronary balloon injury. The hemodynamic indexes of the coronary and the histologic changes of AHM cells were observed. **Results** 10 models (76.92%) were established successfully. The stenosis of coronary artery was $\geq 90\%$. The thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) flow was \leq class II. 55 segments of the left ventricle showed dysfunction. The average peak velocity, diastolic systolic velocity ratio and coronary flow velocity ratio of the coronary artery distal to the stenosis decreased significantly. Histopathology showed swollen nuclei and dilated hyperemic capillaries, but no myocardial necrosis. **Conclusion** The closed-chest method is definitely feasible for establishing AHM model, safe and superior to the open-chest method, which is substantiated quantitatively by the decreased hemodynamic indexes of the related coronary artery.

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

* 基金项目: 江苏省卫生厅重点科研项目(H9809)

Key words: hibernating myocardium; animal model; closed-chest method; swine

冬眠心肌是心肌缺血后心肌存活的一种特殊形式,及时有效的再灌注可使其功能逆转,从而影响冠心病患者的治疗和预后,对冠心病患者的治疗方案的选择及预后评估具有重要的临床意义,是当今心血管病领域的研究热点之一^[1]。由于缺少一种成功的、公认的慢性冬眠心肌动物模型,故目前多采用急性冬眠心肌(acute hibernating myocardium, AHM)模型进行相关研究^[2],但以往由于技术上的限制,绝大多数研究采用开胸法建立 AHM 模型,具有创伤大、死亡率高、对模型动物的生理情况影响极大,其实验结果的临床应用及推广亦有所局限。因此,寻找一种安全可行的方法制备 AHM 模型是冬眠心肌相关研究中需迫切解决的一个问题,具有重要的科研意义。近年来,心血管介入技术的迅速发展为闭胸制备 AHM 模型奠定了基础。本实验对闭胸法制备 AHM 模型的可行性进行了探讨,并利用冠状动脉内多普勒导丝技术对模型相关冠状动脉的血流动力学指标进行评估,以期提供最佳的 AHM 动物模型用于相关研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象 13 只小型中国家猪,3~4 月龄,雌雄不拘;体重 30~50 kg,平均(40.69±4.72) kg;经检疫证实为健康状态。

1.2 主要仪器配置

1.2.1 Advantax-CLV/DLX 大型数字减影 X 线机用于指导动物模型制备过程中的介入操作。

1.2.2 HP SONOS 5500 超声诊断仪 配置 S₄ 可变频率探头,频率为 1.8~3.6 MHz,内置录像机及可读/写光驱。用于模型制备过程记录、分析二维图像,评估室壁运动。

1.2.3 Cardiometrics FloMap II 型超声诊断仪及多普勒血流速度测量导丝系统 多普勒血流速度描记导丝为直径 0.36 mm 的易弯曲导丝,顶端为“J”形,长 175 cm。超声换能器频率为 12 MHz,单向声束散射角 14°,取样容积距导丝顶端约 4 mm,纵向直径为 0.65 mm,横向直径为 2.25 mm。来自冠状动脉的回声信号经超声诊断仪的快速傅立叶转换,以连续频谱形式实时显示(包括流速趋势显示),可观测血流速度及时相流速比值^[3]。此系统用于分析、测量冠状动脉血流频谱,并且冠状动脉内多普勒导丝可用

作球囊导管的导引钢丝。

1.3 急性冬眠心肌动物模型制备

1.3.1 准备工作 肌注氯胺酮 300 mg、地西洋 20 mg 作为基础麻醉,肌注 3% 的戊巴比妥钠(30 mg/kg),达麻醉满意状态(四肢肌反射消失),仰卧位固定实验动物,耳静脉建立静脉通路。将针形电极分别刺入右上肢、左上肢、右下肢皮下,行心电图监护。

1.3.2 制备模型 右颈部备皮、铺巾、消毒。在气管右侧约 1.0 cm 处作一长 7~8 cm 的纵行切口,分离、暴露右侧颈动脉,远、近端分别放置 4 号线,以备结扎。以 12 号穿刺针穿刺颈动脉,置入 8F 动脉鞘,10 000 U 肝素冲管,全身肝素化。将增强器置于左前斜位 30°,在 X 线机引导下,经动脉鞘导入 8F JL₄ (Judkins 左冠状动脉导管)大腔导引导管至右冠状动脉^[4],与生理记录仪相连,监测冠状动脉压力。将复方泛影葡胺 1:1 稀释,行冠状动脉造影。经导引导管导入 0.36 mm 的多普勒导丝,至右冠状动脉远端,记录模型制备前冠状动脉血流动力学指标。以多普勒导丝为导引钢丝,导入 2.5 mm(直径)×20 mm(长度)~3.0 mm(直径)×20 mm(长度)的球囊,至右冠状动脉中段。利用压力泵,通过注入造影剂以 607.8~810.4 kPa(6~8 个大气压)扩张球囊,维持至少 30 min。冠状动脉造影示右冠狭窄程度≥90%,心肌梗死溶栓治疗临床试验(thrombolysis in myocardial infarction, TIMI)血流分级≤2 级,且超声心动图出现左心室节段性室壁运动异常则认为模型制备成功。之后利用冠状动脉内多普勒导丝重复测定冠状动脉血流动力学指标。实验过程中监测收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、心率(HR)等指标。

1.4 心脏标本的病理观察

1.4.1 三硝基四氮唑红(triphenyltetrazolium chloride, TTC)大体染色 经静脉注射 10% 的氯化钾,处死实验动物,使心脏停搏在舒张期。迅速开胸,取出心脏,用生理盐水将残余血液冲洗干净。将左室横切成 5~8 mm 的薄片,在 2% 的 TTC 磷酸盐缓冲液中 37° 恒温水浴 20 min;之后在 10% 的甲醛中固定。正常心肌染成砖红色,坏死心肌呈苍白色。

1.4.2 光镜检查 分别于正常区、缺血区随机取 3 处心肌组织(包括心内膜至心外膜的全层心肌),10% 甲醛固定 48 h,常规苏木精-伊红染色,行光镜检查,观察心肌细胞的病理改变。

1.5 观察指标

1.5.1 模型存活率及制备成功率

1.5.2 冠状动脉造影指标 采用随机配置的血管分析软件定量计算机分析法(QCA)测定冠状动脉狭窄程度,并进行TIMI血流分级的判断(0级指闭塞远端血管无前向血流灌注;1级指病变远端血管有前向血流灌注,但不能充盈远端血管床;2级指经3个以上的心动周期后病变远端血管才完全充盈;3级指在3个心动周期内造影剂完全充盈病变远端血管)。

1.5.3 心室壁运动指标 将左心室壁划分为16节段,以目测半定量法评估心室壁运动情况(1~4分):1分=运动正常,即心内膜运动幅度正常;2分=运动减弱,即心内膜运动幅度低下;3分=运动消失,即心内膜无内向运动;4分=反常运动,即收缩期心内膜向外膨出,心室壁变薄。

1.5.4 冠状动脉血流动力学指标 平均峰值流速(APV)、舒张收缩流速比值(DSVR)、冠状动脉血流速度储备(CFVR)。CFVR的测定:首先记录基础状态的平均峰值流速(APV_b),然后经导引导管向冠状动脉内注射12 μg腺苷,之后启动“搜索”功能,超声诊断仪自动记录峰值负荷状态的平均峰值流速(APV_p)并自动计算出CFVR,CFVR=APV_p/APV_b。

1.6 统计学处理 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据统计处理采用WSTAT 4.0医学统计软件,数据比较采用t检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 模型制备概况 本实验13只实验动物中,1只死于麻醉意外,2只实验过程中死于心室颤动,其余10只实验动物完成实验研究。

2.2 冠状动脉造影指标 模型制备成功后冠状动脉狭窄程度为90%~95%,平均92.7%±1.6%,TIMI血流分级均≤2级。

2.3 心室壁运动概况 左心室壁按16节段法划分,10只实验动物共有160个节段,模型制备成功后,在静息状态下,共有105个节段(65.63%)表现为心室壁运动正常,55个节段(34.37%)表现为心室壁运动异常,其中运动减弱节段(2分)33个(20.62%),运动消失节段(3分)22个(13.75%),无一节段表现为反常运动(4分)。

2.4 冠状动脉血流动力学指标 模型制备成功后APV、DSVR、CFVR等指标较模型制备前均明显降低,SBP、DBP、HR等指标未见明显改变(表1)。

表1 模型制备前后相关冠状动脉血流动力学指标的改变

指 标	模型制备前	模型制备后
APV (cm/s)	22.13±7.99	4.56±2.23**
DSVR	1.35±0.32	0.91±0.43*
CFVR	2.37±0.42	0.95±0.22**
SBP(mmHg)	120.75±15.39	113.88±17.00
DBP(mmHg)	92.46±25.10	88.88±22.50
HR(次/min)	149.87±17.21	157.13±15.16

与模型制备前比较: * P<0.05, ** P<0.01

1 mmHg=0.133 kPa

2.5 病理检查结果 TTC 大体染色未示心肌坏死灶;光镜检查示心内膜至心外膜全层心肌未见心肌细胞坏死的病理改变,与正常区对照,仅示心肌细胞水肿、核水肿以及心内膜毛细血管扩张、充血等非特异性改变(图1),证实AHM模型制备成功。

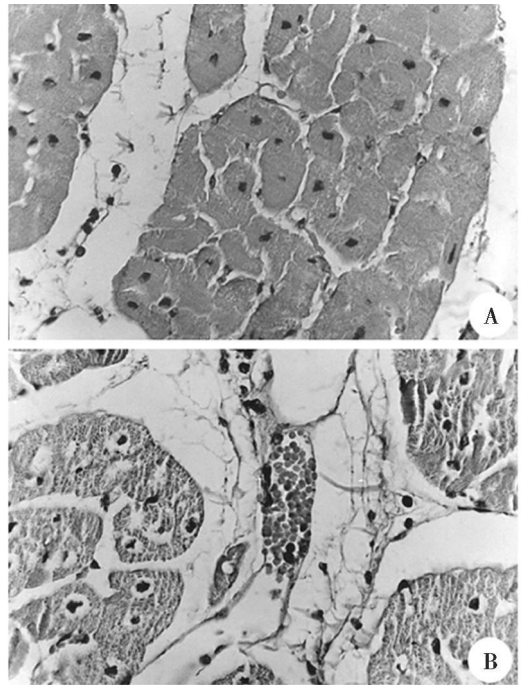


图1 心肌细胞病理结果(苏木精-伊红染色,×40)

A·正常心肌细胞形态正常,核形态正常;B·缺血心肌细胞水肿,核周水肿,毛细血管充血、扩张

3 讨论

存活心肌是当今心血管研究领域的研究热点之一^[1-2],及时有效的再灌注可使其功能恢复,对冠心病患者治疗方案及预后的选择具有重要的指导意义,目前日益受到临床医生的重视。因此,建立一种合适的动物模型进行存活心肌的相关实验研究具有重要意义。根据心肌的血流灌注情况,存活心肌可分为顿抑心肌、冬眠心肌2种形式。在既往存活心

肌的相关实验研究中, 顿抑心肌的研究远较冬眠心肌广泛且深入, 其根本原因在于顿抑心肌的实验研究有经典的、成功的慢性动物模型, 而冬眠心肌迄今仍无一种公认的、成功的慢性动物模型^[5]。因此, 冬眠心肌的深入研究受到了极大的限制, 目前多采用 AHM 模型进行冬眠心肌的相关研究, 此模型已被学者们所公认, 在冬眠心肌的相关研究中起到了至关重要的作用^[6]。

目前, 有关 AHM 的实验研究绝大多数采用开胸法制备动物模型, 但此种方法对实验动物创伤大, 严重影响了实验动物的生理状态, 尤其是对胸腔和心脏的生理功能造成严重打击, 并由此引发一系列血流动力学方面的改变, 不仅易造成实验动物的死亡, 而且实验结果受到影响, 使其复杂化, 难以向临床推广。鉴于开胸法制备心肌缺血模型的种种缺点, 曾有许多学者尝试通过闭胸法建立心肌缺血模型, 如微栓法、水膨胀型缩窄器等^[7]; 但由于其不能有效控制狭窄程度、与临床相关性差等缺陷, 未能得到进一步推广。近年来, 随着介入心脏病学的迅速发展和积极推广, 介入法用于闭胸制备动物模型逐渐得到重视, 国内外学者均进行了相应研究^[8-9], 积累了一定的经验, 闭胸法建立动物模型已成为近来较为提倡的方法。

以往国内外均未见闭胸法制备 AHM 模型的相关报道, 因此本研究在参考既往国内外学者经验的基础上, 对 13 只实验动物采用闭胸介入法制备 AHM 模型, 以期对冬眠心肌的相关研究提供一种更为合适的动物模型。目前, 国内外公认的冬眠心肌的判断标准为: 严重的冠状动脉狭窄, 异常的左心室功能, 无心肌坏死的证据。因此, 本研究在实验过程中将冠状动脉狭窄程度及心室壁运动情况作为判断模型是否形成的标准, 结果表明完成实验的 10 只动物均达到了冠状动脉狭窄 $\geq 90\%$ 、TIMI 血流 ≤ 2 级、左心室出现节段性心室壁运动障碍的标准。实验结束后心脏 TTC 大体染色, 未示坏死灶; 光镜检查示缺血区仅有毛细血管充血、肿胀等心肌细胞缺血的非特异性改变, 未示心肌坏死的病理改变, 表明成功制备了 AHM 模型。说明本实验采用的闭胸介入法制备 AHM 模型是成功的。

与开胸法相比, 本实验采用的闭胸法制备 AHM 动物模型具有以下优点: ①实验动物无须开胸, 创伤小, 生命体征平稳, 实验成功率高(10/13), 高于文献报道的开胸法制备动物模型的成功率(30%~60%)^[10]。②本研究在模型制备前后 BP、HR 等指标

未发生明显改变, 证实实验动物的胸腔及心血管系统处于正常生理状态, 基本未受干扰, 实验数据可信度高, 实验结果更宜向临床推广。③可对任意一支冠状动脉进行模型处理, 定位准确, 易于控制狭窄程度; 而开胸法制备动物模型时, 由于冠状动脉的解剖关系, 仅适合将前降支作为靶血管, 回旋支、右冠状动脉位于心脏后方, 不利于实验操作, 不适合作为靶血管。因此, 闭胸法制备 AHM 模型优于开胸法。

以往由于方法学的限制, 国内外少有冬眠心肌相关冠状动脉血流动力学特点的研究报道。本研究则在闭胸法成功建立动物模型的基础上, 与先进的冠状动脉内多普勒导丝血流测定技术相结合, 观测了模型相关冠状动脉的血流动力学指标的变化。结果表明, AHM 模型相关冠状动脉的 APV、DSVR、CFVR 等指标明显下降, 表明相关冠状动脉支配的冬眠心肌局部血流量明显减少, 并且心肌微循环的储备能力明显下降, 与文献报道的结果相一致, 符合冬眠心肌的病理生理特点^[1-2], 提示 APV、DSVR、CFVR 等指标可作为判断 AHM 模型制备成功的指标之一。因此, 闭胸法制备 AHM 模型有助于更进一步阐明某些现象的病理生理学改变及其发生机制, 尤其在冠心病发病率日益增高的情况下, 具有重要的应用价值。

总之, 闭胸介入法制备 AHM 模型使实验研究与临床研究达到更为有机的结合, 尤其在介入心脏病学蓬勃发展的今天, 它有望成为实验与临床研究的一个有力工具, 具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Rahimtoola SH, La Canna G, Ferrari R. Hibernating myocardium: another piece of the puzzle falls into place [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(5): 978-980.
- [2] Zaglavara T, Karvounis HI, Haaverstad R, et al. Dobutamine stress echocardiography is highly accurate for the prediction of contractile reserve in the early postoperative period, but may underestimate late recovery in contractile reserve after revascularization of the hibernating myocardium [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2006, 19(3): 300-306.
- [3] 葛均波. 冠脉内多普勒技术原理[M]//葛均波. 血管内超声多普勒学. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 16-20.
- [4] Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, et al. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine. A possible role for radiation therapy in restenosis prevention [J]. *Circulation*, 1995, 91(5): 1533-1539.
- [5] Heusch G, Schulz R. Features of short-term myocardial hibernation [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 186(1-2): 185-193.
- [6] Wijns W, Vatner SF, Camici PG. Hibernating myocardium [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(3): 173-181.

- [7] Christian TF, O'Connor MK, Schwartz RS, et al. Technetium-99m MIBI to assess coronary collateral flow during acute myocardial infarction in two closed-chest animal models [J]. J Nucl Med, 1997, 38(12): 1840-1846.
- [8] 孙立军, 李敬邦, 郭庆林, 等. 闭胸制备犬慢性心肌缺血和梗塞模型[J]. 第四军医大学学报, 1997, 18(1): 51-53.
- [9] Croisille P, Moore CC, Judd RM, et al. Differentiation of viable and

nonviable myocardium by the use of three-dimensional tagged MRI in 2-day-old reperfused canine infarcts [J]. Circulation, 1999, 99(2): 284-291.

- [10] 朱 愉. 实验动物模型 [M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1997, 38-40.

收稿日期: 2006-10-25 修回日期: 2006-11-13

本文编辑: 吴 进

雾化吸入化疗的肺组织损伤研究*

蔡 铭, 游庆军, 翁 鸯, 李先华, 常 庆, 常建华

(无锡市第四人民医院胸心外科, 江苏 无锡 214062)

摘要: 目的 观察雾化吸入顺铂(DDP)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、紫杉醇(PTX)化疗药后肺组织的病理学变化及其腱糖蛋白(tenascin-C, TN-C)、基质金属蛋白酶(MMPs)的表达, 评估雾化吸入化疗的安全性并探讨肺损伤修复的机制。方法 PTX(3 mg/kg)、DDP(5 mg/kg)、5-FU(10 mg/kg)、雾化液通过呼吸机经气管插管直接注入肺内。苏木精-伊红染色及免疫组化染色了解肺的病理学变化及TN-C表达, 明胶酶谱法(gelatin zymography)测定MMP-2、MMP-9的活性。结果 吸入DDP、5-FU、PTX可导致气管黏膜上皮增生、管周水肿、肺泡壁增厚、中性粒细胞及淋巴细胞浸润、血管壁增厚、肺泡融合, 但未见明显纤维化改变。雾化吸入后早期各组都有TN-C高表达, 其中PTX组TN-C高表达持续于损伤修复期。MMP-9表达偏重于雾化吸入后损伤早期, 而MMP-2更多表达于后期。结论 雾化吸入3 mg/kg以上剂量的PTX可导致较严重的肺损伤; 5 mg/kg的顺铂、10 mg/kg的5-FU比较安全; MMP-2与MMP-9可能在肺损伤修复过程中发挥不同的作用。

关键词: 化学疗法; 雾化吸入; 肺纤维化; 腱糖蛋白; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R452 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2006)06-0489-04

Damage of lung tissue following aerosolized chemotherapy in rats

CAI Ming, YOU Qing-jun, WENG Yuan, et al

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, The Fourth People's Hospital of Wuxi, Wuxi, Jiangsu 214062, China)

Abstract: Objective To study the damage of lung tissue and the mechanism of lung remodeling after aerosol administration of paclitaxel (PTX), cisplatin (DDP) and/or 5-fluorouracil (5-FU). **Methods** The aerosol administration of PTX (3 mg/kg), DDP (5 mg/kg) or 5-FU (2.5 mg/kg and 10 mg/kg), was carried out via tracheal intubation and mechanical aeration. H-E staining and immunohistochemistry. **Conclusion** Inhalation of PTX over 3 mg/kg may lead to significant damage of lung tissue, and it seems to be rather safe to inhale DDP and 5-FU of the current concentrations. MMP-2 and MMP-9 may play different roles, earlier and later, in the repairing process of the damaged lung tissue after the aerosolized chemotherapy.

Key words: chemotherapy; aerosolized inhalation; pulmonary fibrosis; tenascin-C; matrix metalloproteinase

目前, 大多数肺癌患者在发现时已经存在转移, 属中晚期, 传统化疗和放疗因其副作用, 患者生存质量不高。雾化吸入化疗法通过雾化吸入方法向肺组织直接投放化疗药物来治疗原发或转移性肺癌, 正在逐步推广。雾化吸入化疗法其特点是肺局部药物浓度高而全身药物浓度低, 支气管肺泡系统分布的

丰富的毛细血管网和淋巴网具有很强的吸收功能, 药物吸收后可以在局部达到较高的浓度, 避免肝脏和肠道通过性代谢, 当药物随着循环移出肺及附近淋巴系统后, 可在肝脏获得代谢降解, 因而产生的全身毒副作用较少。国内外对此法已经在动物和人体上做了初步的研究^[1-2], 揭示了本疗法的临床效果。