

杨丽丽,康静,任建勋,等.不同缺血时间对中国小型猪心肌缺血再灌注损伤的影响研究[J].中国比较医学杂志,2023,33(8):28-37.

Yang LL, Kang J, Ren JX, et al. Effects of various ischemia times on myocardial ischemia-reperfusion injury in the Chinese miniature swine model [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 28-37.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.08.005

不同缺血时间对中国小型猪心肌缺血再灌注损伤的影响研究

杨丽丽¹,康 静^{1,2},任建勋¹,郭 浩¹,孟红旭¹,马彦雷¹,史 跃¹,
刘建勋^{1*},李 磊^{1*}

(1.中国中医科学院西苑医院中药药理北京市重点实验室,国家中医心血管病临床医学研究中心,北京 100091;
2.黑龙江中医药大学,哈尔滨 150040)

【摘要】 目的 探讨不同缺血时间对中国小型猪急性心肌缺血再灌注损伤的影响,为建立适合的小型猪心肌缺血再灌注模型提供依据。方法 中国小型猪 29 只,随机分为假手术组(6 只)、缺血 30 min 组(7 只)、缺血 60 min 组(7 只)及缺血 90 min 组(9 只)。各组戊巴比妥钠麻醉后行左冠状动脉造影,后将球囊经导丝交换入冠脉左前降支中部,术中连续心电监护记录 ST 段改变情况、室颤及除颤次数,再灌注 3 h 后处死。于缺血前、再灌即刻、再灌后 1 h、2 h 及 3 h 采集超声心动图,描记心脏收缩功能左心室射血分数(left ventricular ejection fraction,EF)及左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,FS);检测血清肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme,CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性,丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量。TTC/伊文思蓝双重染色观察心肌梗死面积,硫磺素 S 染色法观察再灌后无复流面积。结果 缺血 90 min 组动物死亡率较缺血 30 min 组、缺血 60 min 组高;随缺血时间增长,室颤及除颤次数明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);缺血 90 min 组再灌注 3 h 时 EF 值、FS 值较其他组明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);模型组动物在心电图缺血性改变、心肌梗死及无复流面积、心肌组织染色及血清 CK-MB、LDH、SOD、MDA 含量方面无显著性差异。结论 心肌缺血 90 min 再灌注小型猪模型的恶性心律失常及死亡率高,缺血 30 min 再灌注 3 h 条件建立的模型能复制临床疾病的特征性病变且死亡率低,适合于发病机制及药物作用研究。

【关键词】 心肌缺血再灌注;小型猪;动物模型;冠状动脉球囊栓塞;最佳时间

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2023)08-0028-10

Effects of various ischemia times on myocardial ischemia-reperfusion injury in the Chinese miniature swine model

YANG Lili¹, KANG Jing^{1,2}, REN Jianxun¹, GUO Hao¹, MENG Hongxu¹, MA Yanlei¹, SHI Yue¹, LIU Jianxun^{1*}, LI Lei^{1*}

(1. Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Cardiovascular Diseases, Beijing 100091, China.

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040)

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(82174015);中国中医科学院科技创新工程项目资助(CI2021A04609)。

【作者简介】杨丽丽(2000—),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学。E-mail:y15501163299@163.com

【通信作者】刘建勋(1955—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:中药药理学,中药新药研发。E-mail:liujx0324@sina.com

李磊(1982—),男,博士,副研究员,硕士生导师,研究方向:中药药理学,中药新药研发。E-mail:lilei0502@126.com

* 共同通信作者

[Abstract] Objective To investigate various ischemia times of myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI) in Chinese miniature swine and provide the basis to establish the optimal model of MI/RI in Chinese miniature swine. **Methods** Twenty-nine Chinese miniature swine were randomly divided into a sham group ($n=6$), 30 min ischemia group ($n=7$), 60 min ischemia group ($n=7$), and 90 min ischemia group ($n=9$). After pentobarbital sodium anesthesia, left coronary angiography was performed in each model group, and a balloon was exchanged into the middle of the left anterior descending branch through a wire. We elevated the ST segment on a body surface electrocardiogram and the numbers of ventricular fibrillations and defibrillations during the operation. Left ventricular ejection fraction (EF) and left ventricular fractional shortening (FS) were recorded before the operation, before reperfusion, and at 1, 2 and 3 h of reperfusion. Serum levels of creatine kinase isoenzyme (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were measured at the same time. The area of myocardial infarction was observed by double staining with TTC/Evans blue. The non-reflowed area after reperfusion was observed by thioflavin S staining. **Results** Mortality was the highest in the 90 min ischemia group. The numbers of ventricular fibrillations and defibrillations were increased significantly with increasing ischemia time ($P<0.05$, $P<0.01$). Ejection fraction and fractional shortening were obviously lower after 90 min of ischemia and at 3 h of reperfusion compared with those in the other groups ($P<0.05$, $P<0.01$). No significant differences were found in the electrocardiogram, areas of myocardial infarction and non-reflow, myocardial tissue staining, or serum levels of CK-MB, LDH, SOD, and MDA among model groups. **Conclusions** A swine model of MI/RI with 90 min of ischemia had strong arrhythmias and high mortality, whereas models established under ischemia for 30 min with reperfusion for 3 h replicated the characteristic lesions of clinical disease with low mortality and are suitable for studies of pathogenesis and drug actions.

[Keywords] myocardial ischemia-reperfusion; swine; animal model; coronary balloon occlusion; optimal occlusion
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 主要是由于冠状动脉闭塞引起缺血损伤和组织坏死,其起病急、进展快,已经成为全球发病率和死亡率的主要诱因,及时地经皮冠状动脉介入 (percutaneous coronary intervention, PCI) 治疗是减小心肌梗死面积和保留左心室收缩功能最有效的治疗方法^[1]。然而,快速再灌注所带来的效益会在一定程度上被恢复的血供抵消,反而加重了心肌损伤、进一步增大梗死面积,称为心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI)^[2-3]。MI/RI 是影响心肌梗死患者预后的重要因素,可引起心肌顿抑、再灌注不良、无复流、微血管损伤或阻塞等^[4]。研究表明,MI/RI 的机制可能与氧自由基的形成、 Ca^{2+} 超载、炎性因子释放、能量代谢紊乱和内皮功能障碍有关^[5-6]。

近年来,实验室研究表明药物和非药物的治疗方法可减轻 MI/RI、减小心肌梗死面积,但将其运用于临床发现改善患者预后的效果并不理想,只有 20% 的药物显示出疗效^[7]。造成此类现象的原因可能是临床前实验设计不严谨、不系统、重复性低等^[8-10]。因此,实现实验室研究到临床实践的有效转化成为当今医学亟需解决的问题,选择合适的 MI/RI 模型和实验方案可能有助于将科研成果向临

床转化,更高效、更方便地发掘人类疾病的发生和发展变化^[11-13]。

小鼠、大鼠、兔等小动物与大动物相比,具有成本低、易处理、易操纵基因组等优点,且相关 MI/RI 模型在探寻作用机制、评价治疗效果等方面已得到广泛应用^[14-16]。但小动物生理学特性、结构及功能与人体差异较大,将小动物 MI/RI 模型研究进行临床转化可能会受到心脏尺寸小、冠状动脉解剖结构差异、明显的心脏兴奋和收缩力以及代谢大小依赖性差异的限制^[17-19]。本研究选用中国小型猪作为 MI/RI 模型的研究对象,其体型较小,与人类各脏器指数、心血管解剖结构、生理功能、冠状动脉侧支循环、血液生化指标及载脂蛋白等方面有许多共同之处^[20]。病理上,小型猪由于冠状动脉狭窄导致的心肌缺血所表现的心肌组织病理改变以及心血管系统的病理生理变化与人类相比,病程相似,病变接近,且小型猪冠脉系统侧支数量少、心肌缺血后血管再生能力不强,以此构建模型稳定性强、可重复性高,是除灵长类动物的首选用于建立心血管疾病模型的哺乳动物^[13]。

国内外研究常采用滇南小耳猪^[21]、贵州小型猪^[22]等中华小型猪为 MI/RI 的研究对象,通过开胸结扎法^[23]、经颈动脉微球栓塞法^[13]、经股动脉微球

栓塞法^[24]、闭胸球囊栓塞法^[25]、经皮植入支架法^[26]等构建 MI/RI 模型。本研究中所采用的闭胸介入冠状动脉球囊栓塞诱导的小型猪 MI/RI 模型的方法耗时短、可动态观察、模型损伤小,且更符合临床心肌梗患者生理状态和发病过程,是心血管领域研究 MI/RI 的常用方法^[13,19,27-31]。心肌缺血时间的长短是影响 MI/RI 后心肌梗死面积、心脏功能以及预后的关键决定因素,目前 MI/RI 模型常见的缺血时间为 30~90 min^[32-36]。然而对小型猪 MI/RI 最佳缺血时间的研究甚少,且未见系统地比较小型猪缺血 30~90 min MI/RI 模型的相关报道。因此,本研究采用介入冠状动脉球囊栓塞构建小型猪 MI/RI 模型,探讨不同缺血时间对小型猪 MI/RI 的影响,明确小型猪 MI/RI 模型最佳缺血时间。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级中国实验小型猪 29 头,雌雄不限,体重(28.0±3.0) kg,由北京北七家美乐养殖场提供[SCXK(京)2018-0004]。在中国中医科学院西苑医院屏障环境实验动物中心进行动物实验操作及饲养[SYXK(京)2018-0018]。实验动物在单独的笼子里适应 1 周,在此期间给予正常的猪饲料,自由饮用自来水。本研究方案经中国中医科学院西苑医院动物管理委员会批准后开展实验(2020XLC007-2),实验动物处置均遵循“3R”原则给予实验动物人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠,德国进口分装,北京化学试剂公司,批号:020402;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 购自美国 Amresco 公司,批号 4319B320;伊文思蓝(Evans blue)和硫磺素 S(Thioflavin S)均购自美国 Sigma 公司,批号分别为:00801KHV、SLBG6223V;肌酸激酶同工酶(CK-MB)(批号:211230)和乳酸脱氢酶(LDH)(批号:103424)测定试剂盒,均由日本和光纯药工业株式会社提供;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,批号分别为:11152122、080621220415。

Power Lab 多导生理记录仪购自澳大利亚 AD Instruments 公司;快速交换 PTCA 球囊扩张导管(管径=1.3:1)由美国 Boston 公司提供;自制 30 点体表心电图;BV Pulsera 型 C 型臂 X 光机和 M4735A

型体外除颤监护仪均购自荷兰飞利浦公司;导引导丝,6F Cordis 血管造影导管和球囊,均购自 Cordis 公司;MPIAS-500 型多媒体彩色病理图文分析系统购自北京正恒博诚科技发展有限公司;Vivid S5 彩色超声诊断仪购自美国 GE 公司;LABOSPECT003 型全自动生化分析仪购自日本 Hitachi 公司。

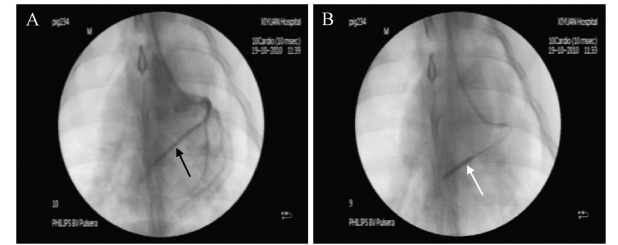
1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

29 只中国小型猪随机分为 4 组:(1)假手术(Sham)组(6 只);(2)缺血 30 min(ischemia, Isc 30 min)组(7 只);(3)缺血 60 min(Isc 60 min)组(7 只);(4)缺血 90 min(Isc 90 min)组(9 只)。

1.3.2 中国小型猪心肌缺血再灌注模型制备

小型猪采用 30 mg/kg 戊巴比妥钠由耳静脉注射麻醉,由颈前部分离右侧颈总动脉,向心插入 6F 动脉鞘管,200 U/kg 肝素钠由鞘管注入动脉进行全身肝素化。C 型臂 X 光机引导下,将 6F 35 L 型右冠导引导管插入左冠状动脉开口,选择性的将造影剂注入冠状动脉,使冠状动脉解剖及走行显影。冠脉造影后,透视下送入导引导丝置于左冠状动脉前降支(LAD)中部,快速交换 PTCA 球囊扩张导管经导引导丝进入 LAD 中部,视情况给球囊(LAD 直径:球囊扩张后直径 1.3:1)打压 8~12 ATM,根据实验分组不同,球囊压力持续 30 min、60 min 或 90 min(图 1)。各组缺血时间到后撤除导引导丝、快速交换 PTCA 球囊扩张导管及导引导管,待再灌注后 3 h 处死动物取材。术中连续心电监护,记录小型猪在缺血期间及再灌后的心室颤动(室颤)次数(ventricular fibrillation, VF)和电压除颤次数。假手术组动物仅行冠脉造影,不进行缺血再灌注操作,



注:A:冠脉造影;B:球囊扩张。黑色箭头指示的为 LAD,白色箭头指示的为扩张的球囊。

图 1 冠状动脉微球栓塞示意图

Note. A, Coronary angiography. B, Balloon inflation. The black arrow shows the LAD, and the white arrow shows the dilated balloon.

Figure 1 Schematic diagram of coronary artery balloon inflation occlusion

其余步骤同上。

1.3.3 心电图检测 ST 段改变

将 30 点固定式体表心电图电极(30 个标测点)置于小型猪体表,描记体表心电图(BS-ECG),数据记录于 Power Lab 多导生理记录仪^[37-39]。计算心肌缺血程度(Σ -ST)及心肌缺血范围(N-ST)^[37]。测定时间点为:术前,再灌前即刻,再灌注 1 h、2 h、3 h。

1.3.4 超声心动图检测心功能

于术前,再灌前即刻,再灌注 1 h、2 h、3 h 行超声心动图检查。小型猪麻醉后选取仰卧位,于右前胸部涂抹超声耦合剂,采用 3 S 型心脏探头(1.5~2.6 MHz),在肋骨间取左室长轴切面应用 M 型超声,记录左心室运动曲线并测量左心室射血分数(EF)及左心室短轴缩短率(FS)。

1.3.5 血清 CK-MB 及 LDH 含量检测

各组分别于术前,再灌前即刻,再灌注 1 h、2 h、3 h 于颈静脉取血,室温静置 1 h 后,3000 r/min、4℃离心 10 min,取上清,全自动生化分析仪检测 CK-MB 及 LDH 活性。

1.3.6 血清 SOD 活性及 MDA 含量检测

各组分别于术前,再灌前即刻,再灌注 1 h、2 h、3 h 于颈静脉取血,室温静置 1 h 后,3000 r/min、4℃离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书测定 SOD 活性及 MDA 含量。

1.3.7 心肌 TTC-伊文思蓝染色

各组动物在再灌注 3 h 后,动物气管插管,开胸暴露冠脉前降支,于 LAD 球囊阻断位置穿一棉线,经颈静脉注入 6%硫磺素 S(1 mL/kg),约 1 min 后结扎 LAD,于心尖位置向心室内注入 2%伊文思蓝(1 mL/kg),静待 10 s,心肌组织出现蓝染时快速摘取心脏。生理盐水冲洗干净,减去心脏附着组织,在左心室 LAD 结扎线下均匀横切 5 片,厚 4~5 mm,置于 365 nm 荧光下拍摄 5 片心肌正、反面图像。拍

摄后将心脏切片放入 TTC 染液,37℃水浴箱避光染色 15 min,采用 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统,拍摄 5 片心肌正、反面图像。采用 MPIAS-500 多媒体病理图文分析系统描记心室总面积、缺血区面积、梗死区面积及无复流面积(硫磺素不着色),计算心肌缺血率=心肌缺血面积/心肌面积×100%、心肌梗死率=心肌梗死面积/心肌缺血面积×100%、心肌无复流率=心肌无复流面积/心肌缺血面积×100%。

1.4 统计学方法

实验结果以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS 20.0 统计软件分析,采用单因素方差分析方法进行统计推断,方差齐用 Tukey HSD 检验,方差不齐则用 Tamhane's T2 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同缺血再灌注时间对室颤与除颤次数的影响

假手术组动物在实验过程中未见室颤,其余各组动物在心肌缺血和再灌注后均出现了不同程度的室速和室颤,缺血期的室颤均在冠脉球囊栓塞 15~30 min 内发现,再灌注后的室颤 78.94%发生于再灌注后的前 10 min,21.05%出现于再灌注后的 2~3 h(均在缺血 90 min 组),及时电击除颤可纠正室颤的发生,但仍有一部分动物因除颤无效而死亡。模型组总死亡率 13.0%;缺血 30 min 组($n=7$)未见动物死亡;缺血 60 min 组死亡率 14.3%($n=7$,1 只死亡);缺血 90 min 组死亡率 22.2%($n=9$,2 只死亡),为三组中最高。缺血 60 min 组除颤次数较假手术组明显增加($P<0.05$),室颤发生及除颤次数与缺血 30 min 组相比,未见统计学差异($P>0.05$);缺血 90 min 组较其余各组室颤次数及除颤次数均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 2、图 3。

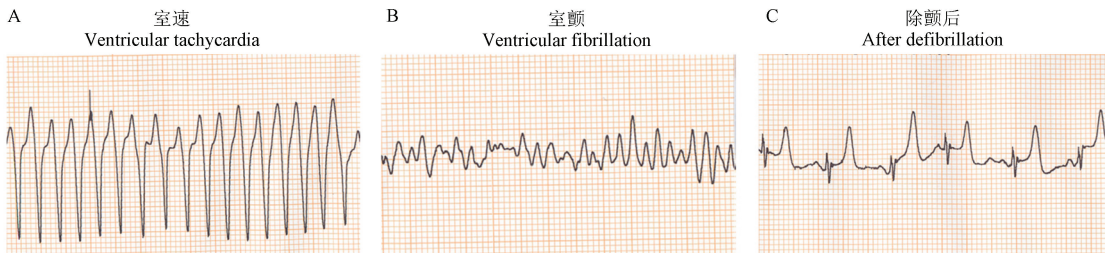
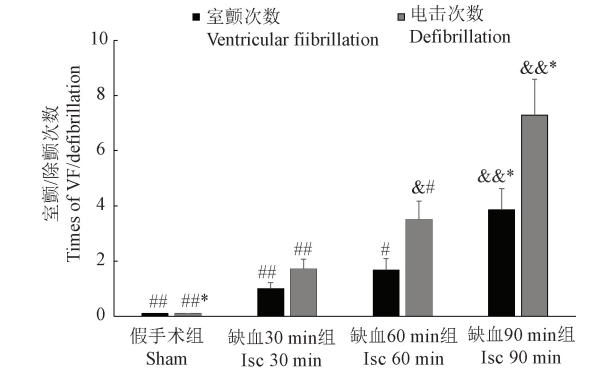


图 2 小型猪心电图变化
Figure 2 Changes of electrocardiogram in swines

2.2 不同缺血再灌注时间对心电图 ST 段改变的影响

各模型组动物在心肌缺血时均显示出心电图 ST 段显著升高,与假手术组比较,反映心肌缺血程度的 Σ -ST 及反映心肌缺血范围的 N-ST 在再灌注前,三个模型组均显著增加 ($P<0.01$),提示造模成功;再灌注后随着时间推移心电图 ST 段逐渐降低,



注:与假手术组比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$;与缺血 60 min 组比较, * $P<0.05$;与缺血 90 min 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图3 各组室颤及除颤次数($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)
Note. Compared with Sham group, & $P<0.05$, && $P<0.01$. Compared with Isc 60 min group, * $P<0.05$. Compared with Isc 90 min group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Number of VF and defibrillation in different groups

三个模型组再灌注 1 h 时较假手术组 Σ -ST 及 N-ST 明显增多 ($P<0.05, P<0.01$),再灌注 3 h 四组之间未见统计学差异 ($P>0.05$),见表 1。

缺血 60 min 组动物再灌注 2 h、3 h 时 Σ -ST 及 N-ST 较再灌注 1 h 时均显著减少 ($P<0.01$);缺血 90 min 组动物再灌注 3 h 时 N-ST 较再灌注 1 h 时明显减少 ($P<0.05$),见表 1。

2.3 不同缺血再灌注时间对超声心动图变化的影响

超声心动图显示,随缺血再灌注时间推移各模型组动物心功能均呈现出不同程度的降低,再灌注前三个模型组较假手术组左心室射血分数 (EF)、左心室短轴缩短率 (FS) 均降低,其中缺血 90 min 组较假手术组降低显著 ($P<0.01$)。缺血 30 min 组和缺血 60 min 组动物再灌注 3 h 时 EF 值较缺血前下降约 30.0%~31.8%;缺血 90 min 组动物再灌注 3 h 时 EF 值较缺血前下降约 47%,与假手术组、缺血 30 min 组、缺血 60 min 组比较 EF 值降低显著 ($P<0.01$)。三组动物 FS 值再灌注后 3 h 较缺血前分别下降约 40.0% (缺血 30 min 组, $n=7$)、45% (缺血 60 min 组, $n=6$)、56% (缺血 90 min 组, $n=7$),且缺血 90 min 组较假手术组、缺血 30 min 组 FS 值显著降低 ($P<0.01$),较缺血 60 min 组亦降低 ($P>0.05$),见图 4。

表 1 各组心电图 ST 段变化($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)
Table 1 ST segment changes of electrocardiogram (ECG) in different groups

指标 Index	组别 Groups	缺血前 Pre-operation	再灌前 Pre-reperfusion	再灌后 Repfusion		
				1 h	2 h	3 h
Σ -ST (mV)	假手术组 Sham	1.97 $\pm$ 0.20	3.50 $\pm$ 0.60 ^{***}	3.43 $\pm$ 0.42 ^{**#}	2.40 $\pm$ 0.20 [#]	2.13 $\pm$ 0.25
	缺血 30 min 组 Isc 30 min	1.50 $\pm$ 0.10	145.57 $\pm$ 21.73 ^{&&}	68.11 $\pm$ 20.86 ^{&}	33.04 $\pm$ 9.13	24.51 $\pm$ 10.51
	缺血 60 min 组 Isc 60 min	2.10 $\pm$ 0.27	126.33 $\pm$ 21.84 ^{&&}	57.95 $\pm$ 9.11 ^{$\Delta\Delta\Delta$}	23.27 $\pm$ 3.94	11.20 $\pm$ 5.40
	缺血 90 min 组 Isc 90 min	1.74 $\pm$ 0.27	129.93 $\pm$ 76.11 ^{&&}	76.11 $\pm$ 14.52 ^{&&}	40.34 $\pm$ 13.67 ^{&}	20.89 $\pm$ 13.62
N-ST (N)	假手术组 Sham	9.00 $\pm$ 0.93	14.17 $\pm$ 1.93 ^{**#}	12.33 $\pm$ 0.99 ^{**#}	10.33 $\pm$ 0.71 [#]	8.50 $\pm$ 0.56
	缺血 30 min 组 Isc 30 min	7.29 $\pm$ 0.36	29.71 $\pm$ 0.29 ^{&&}	25.00 $\pm$ 2.47 ^{&&}	20.57 $\pm$ 3.40	14.71 $\pm$ 3.10
	缺血 60 min 组 Isc 60 min	9.00 $\pm$ 0.45	29.67 $\pm$ 0.21 ^{&&}	28.00 $\pm$ 0.63 ^{&&\Delta\Delta}	20.17 $\pm$ 2.67	12.83 $\pm$ 2.55
	缺血 90 min 组 Isc 90 min	7.71 $\pm$ 0.89	29.29 $\pm$ 0.57 ^{&&}	26.71 $\pm$ 1.87 ^{&&\Delta}	22.00 $\pm$ 2.30 ^{&&}	15.56 $\pm$ 3.71

注:与假手术组比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$;与缺血 60 min 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与缺血 90 min 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与再灌注 2 h 相比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与再灌注 3 h 相比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。
Note. Compared with Sham group, & $P<0.05$, && $P<0.01$. Compared with Isc 60 min group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with Isc 90 min group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with reperfusion 2 h, $\Delta\Delta$ $P<0.01$. Compared with reperfusion 3 h, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$.

缺血 60 min 组再灌注 3 h 较再灌注 1 h 时 FS 值明显降低($P<0.05$),再灌注 3 h 时与再灌注 2 h 比较亦有降低,但未见统计学意义($P>0.05$)。缺血 90 min 组再灌注 2 h、3 h 时较再灌注 1 h 时 EF 值、FS 值均显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),见图 4。

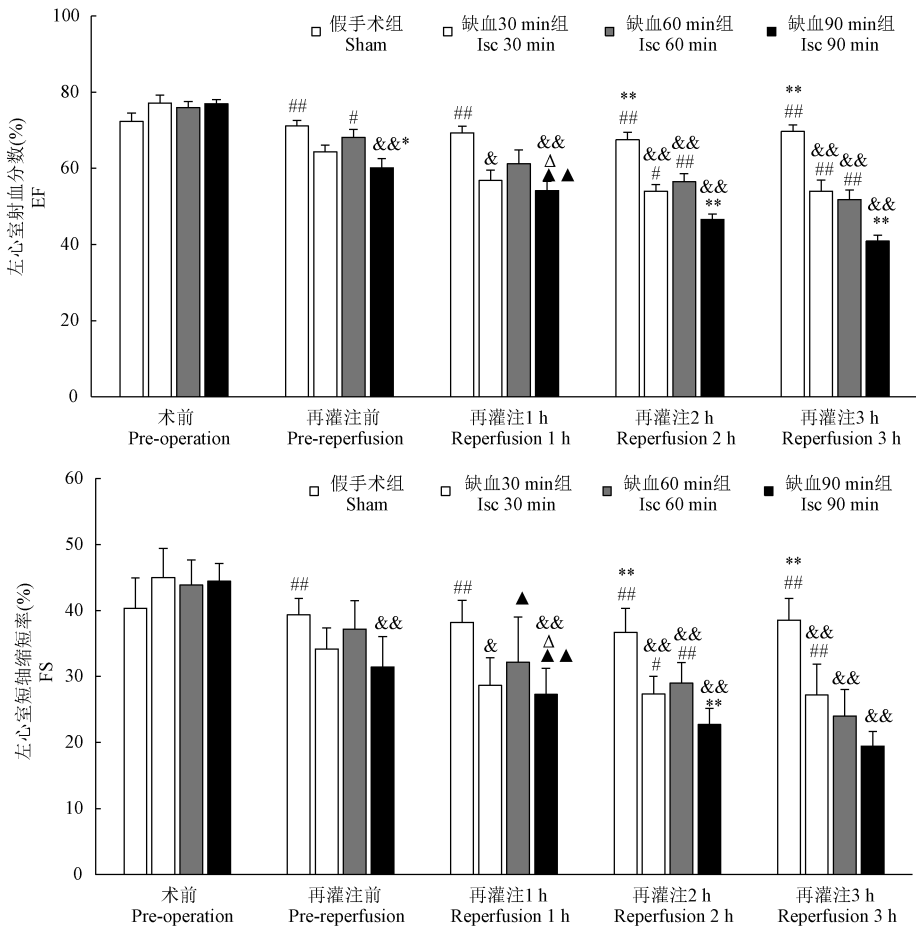
2.4 不同缺血再灌注时间对心肌梗死及无复流面积变化的影响

假手术组动物未见心肌梗死及无复流区域,各模型组小型猪心肌组织颜色明显变浅(心肌缺血病理表现),心肌缺血率(缺血区/心室面积)、心肌梗死率(梗死区/缺血区)及心肌无复流率(无复流/缺血区)均较假手术组显著增加($P<0.01$)。缺血 30 min 组的缺血区/心室面积、梗死区/缺血区较缺血 60 min、90 min 组略低,但各组间未见统计学意义(P

>0.05)。三模型组间无复流/缺血区比值亦未见明显统计学意义($P>0.05$),见图 5、图 6。

2.5 不同缺血再灌注时间对血清 CK-MB、LDH、SOD、MDA 的影响

假手术组动物血清 CK-MB、LDH、SOD 活性及 MDA 含量随缺血/再灌注时间推移未见明显变化趋势(表 2),模型组动物血清 CK-MB 及 LDH 活性随时间推移总体呈上升趋势,再灌注 2 h、3 h 时缺血 60 min 组和缺血 90 min 组 CK-MB、LDH 活性较假手术组明显上升($P<0.05$, $P<0.01$)。各模型组动物血清 SOD 活性随再灌注时间推移呈降低趋势,缺血 30 min 组和缺血 60 min 组再灌注 2 h 时较假手术组明显升高($P<0.05$)。各模型组动物血清 MDA 含量未见显著变化,各组间未见差异($P>0.05$)。

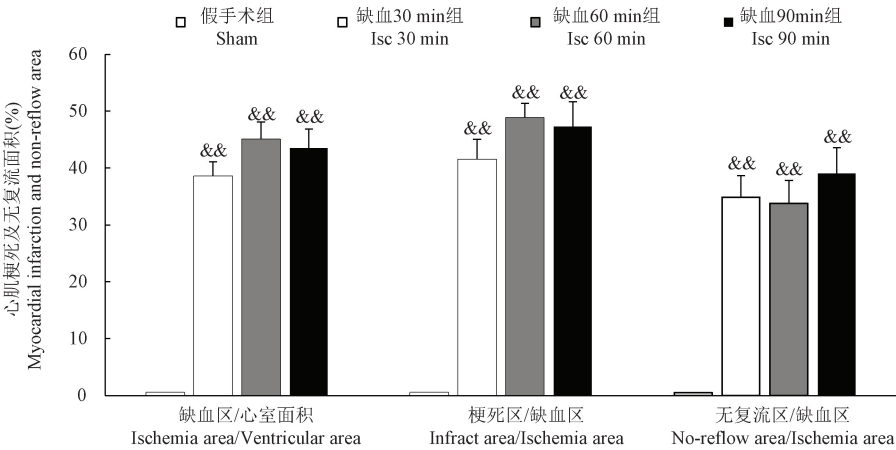


注:与假手术组比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$;与缺血 60 min 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与缺血 90 min 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与再灌注 2 h 相比较, ^ $P<0.05$;与再灌注 3 h 相比较, ^^ $P<0.01$ 。

图 4 各组超声心动图变化($\bar{x}\pm s$, $n=6\sim7$)

Note. Compared with Sham group, & $P<0.05$, && $P<0.01$. Compared with Isc 60 min group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with Isc 90 min group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with reperfusion 2 h, ^ $P<0.05$. Compared with reperfusion 3 h, ^^ $P<0.01$.

Figure 4 Changes of ECG in different groups



注:与假手术组比较, && $P<0.01$ 。

图 5 各组心肌梗死及无复流面积变化($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)

Note. Compared with Sham group, && $P<0.01$.

Figure 5 Changes of myocardial infarction and no-reflow area in different groups

表 2 各组血清 CK-MB、LDH、SOD、MDA 含量/活性变化($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)

Table 2 Changes in serum CK-MB, LDH, SOD and MDA levels/activities in different groups

指标 Index	组别 Groups	缺血前 Pre-operation	再灌前 Pre-reperfusion	再灌后 Reperfusion		
				1 h	2 h	3 h
CK-MB (U/L)	假手术组 Sham	259.80±80.37	267.00±74.25	233.60±53.01	209.40±47.46 [#]	188.20±41.44 ^{*##}
	缺血 30 min 组 Isc 30 min	246.17±64.65	268.83±78.11	424.17±195.80	499.67±165.53	488.00±140.34
	缺血 60 min 组 Isc 60 min	287.17±89.72	293.67±38.92	478.83±192.13	542.17±204.12	561.00±174.55 ^{&}
	缺血 90 min 组 Isc 90 min	231.83±64.26	291.83±97.24	506.17±212.08	634.17±283.36 ^{&}	616.33±261.40 ^{&&}
LDH (U/L)	假手术组 Sham	438.67±65.17	428.83±146.96	418.83±118.80 [#]	427.50±118.16 ^{*##}	438.00±119.32 ^{*##}
	缺血 30 min 组 Isc 30 min	449.50±79.85	429.00±86.18	793.33±460.76	1039.67±448.90	1166.33±392.03
	缺血 60 min 组 Isc 60 min	483.33±68.41	479.83±40.81	1119.17±554.84	1490.00±672.90 ^{&}	1701.00±573.31 ^{&&}
	缺血 90 min 组 Isc 90 min	554.33±114.14	642.33±272.42	1214.83±570.69 ^{&}	1593.50±757.33 ^{&&}	1701.00±733.21 ^{&&}
SOD (U/mL)	假手术组 Sham	22.16±2.00	20.99±1.54	19.76±1.67	17.84±1.08 [*]	18.16±4.90
	缺血 30 min 组 Isc 30 min	22.17±2.38	22.27±2.19	21.63±2.17	20.99±0.50 ^{&}	22.11±2.25
	缺血 60 min 组 Isc 60 min	21.15±1.48	21.15±1.96	20.24±2.06	20.46±1.97 ^{&}	19.01±1.95
	缺血 90 min 组 Isc 90 min	20.56±1.62	20.08±1.39	20.78±1.78	19.60±2.03	18.91±2.67
MDA (μmol/L)	假手术组 Sham	17.14±1.89	16.67±0.72	16.76±0.43	17.29±2.00	20.05±7.42
	缺血 30 min 组 Isc 30 min	18.90±1.79	17.90±1.70	17.67±1.56	18.19±1.52	18.33±1.96
	缺血 60 min 组 Isc 60 min	18.00±1.53	18.34±2.96	17.68±1.57	18.58±2.31	18.00±1.76
	缺血 90 min 组 Isc 90 min	18.90±2.17	16.43±0.56	18.48±3.66	16.76±0.56	17.33±1.91

注:与假手术组比较, & $P<0.05$, && $P<0.01$;与缺血 60 min 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与缺血 90 min 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

Note. Compared with Sham group, & $P<0.05$, && $P<0.01$. Compared with Isc 60 min group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with Isc 90 min group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

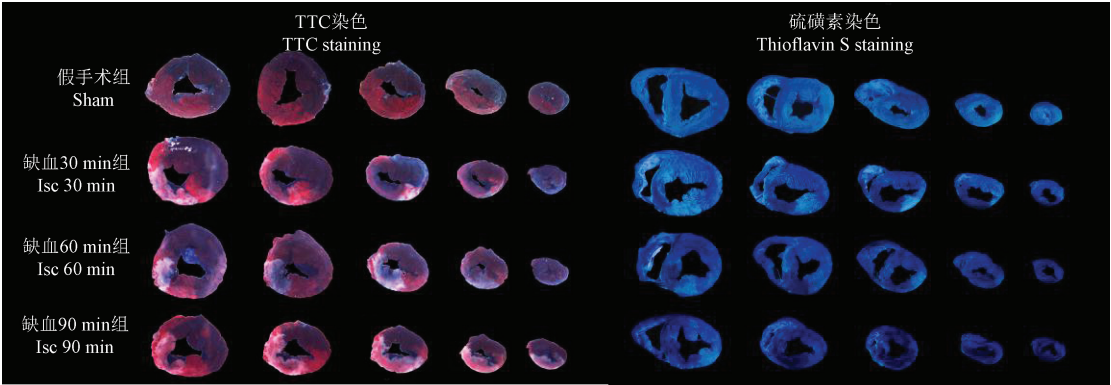


图 6 各组心肌染色($\bar{x}\pm s, n=6\sim 7$)
Figure 6 Myocardial staining in different group

3 讨论

心肌缺血再灌注损伤可分为两个阶段:一方面,心肌缺血会导致心肌细胞膜通透性增加,细胞内超微结构损伤,代谢能力受到抑制,心脏收缩功能障碍;另一方面,再灌注可能会导致细胞产生大量氧自由基,细胞内钙离子超载,甚者会引起心肌细胞坏死、凋亡^[40-41]。再灌注后功能恢复的时间和水平一定程度上取决于缺血时间,缺血较短时间后及时给予再灌注可以使受抑制的能量代谢得以恢复。实验研究中心肌缺血再灌注时间的选择范围较宽,有缺血 1 h、2 h、3 h、6 h、12 h、24 h 等,甚至更长。应依据药物种类、作用机制、研究目的等的不同选择再灌注时间,国内外构建 MI/RI 小型猪模型的研究中一般选用再灌注 2 h 或 3 h,而评价药物对 MI/RI 的治疗效果时多选用 24 h 及以上再灌注时间^[27,30,42-45]。

在本项研究中,通过小型猪冠状动脉球囊栓塞诱导心肌缺血 30 min、60 min 和 90 min 并再灌注 3 h 的研究发现,与假手术组相比,各模型组动物室颤及除颤次数明显增加、心电图显示心肌缺血程度及范围显著增加、心肌梗死及无复流面积显著增加,提示本模型构建成功、稳定。心电图 ST 段抬高是急性心肌梗死的典型表现,本研究造模过程全程实施心电图监测,冠脉球囊栓塞后出现心脏远端心室肌由红色转为苍白色,同时心电图示 ST 段抬高,提示造模成功。临床研究中亦发现再灌注后急性心肌梗死患者心电图 ST 段回落时间越短、回落情况越好,左心室功能改善情况越佳^[46-47]。本研究发现再灌注 3 h 与再灌注 2 h 在心电图 Σ -ST、N-ST 回落及 EF 值、FS 值降低方面较再灌注 1 h 差异明显,且

再灌注 3 h 降低更显著($P<0.05, P<0.01$)。在心肌染色中使用 TTC/伊文思蓝双重染色以及硫磺素 S 染色的方法,可以区分缺血区、梗死区、无复流区和正常心肌区,从而能够对心肌梗死情况进行更全面的评价。

本研究结果显示,中国小型猪心肌缺血 90 min 组再灌注前较假手术组 EF 值和 FS 值显著降低,但是 3 种不同的诱导因素(缺血时间长短)之间在心电图缺血性改变、心肌组织 TTC/伊文思蓝、硫磺素染色、心肌酶(LDH 和 CK-MB 活性)方面并无显著性变化。且缺血 90 min 组动物由于心肌缺血时间较长,使室性心动过速、室颤的发生率以及胸前电击除颤次数增加,死亡率达 22.2%;缺血 60 min 组死亡率仅 14.3%;缺血 30 min 组则全部存活。因此选用心肌缺血 30 min、60 min 更为合适。有学者曾经报道,心肌短暂缺血(<20 min)再灌注后会发生可逆的功能障碍,长时间的心肌缺血(>20 min)会立即导致心内膜下心肌坏死,而当心肌缺血时间延长至 60 min 时,缺血区域心内膜下绝大部分心肌已经坏死^[48]。同时有学者对犬心肌缺血再灌注时间进行研究,结果显示心肌缺血 30~40 min 时,不可逆转的超微结构变化与缺血 24 h 的变化几乎相同^[49]。可见,缺血 30 min 已对心肌造成较为严重甚至不可逆性的损伤,在结构等方面也表现出与更长缺血时间的相似性,且死亡率更低,应为首选缺血时间。综上,通过心导管介入球囊阻断冠脉前降支一段时间后再灌注可以构建中国小型猪心肌缺血再灌注损伤模型,缺血时间 30 min 后的再灌注 3 h 条件下动物可以建立死亡率较低、病理变化明显的动物模型,是进一步开展心肌缺血再灌注损伤防治研究的较适合的方法。

参考文献:

- [1] 邓泓博, 朱文杰, 李磊, 等. 急性心肌梗死患者急诊行冠状动脉旁路移植术后院内死亡的危险因素分析 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2022, 29(8): 1008-1013.
- [2] 栾飞, 雷紫琴, 彭利霞, 等. 基于“温通心阳”功效的桂枝和肉桂配方颗粒对大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型保护作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(3): 725-735.
- [3] Vincent A, Covinhas A, Barrère C, et al. Acute and long-term cardioprotective effects of the Traditional Chinese Medicine MLC901 against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14701.
- [4] Deng J. Advanced research on the regulated necrosis mechanism in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Int J Cardiol, 2021, 334: 97-101.
- [5] Gao D, Jing S, Zhang Q, et al. Pterostilbene protects against acute renal ischemia reperfusion injury and inhibits oxidative stress, inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in rats via the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 1029-1035.
- [6] Binder A, Ali A, Chawla R, et al. Myocardial protection from ischemia-reperfusion injury post coronary revascularization [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2015, 13(9): 1045-1057.
- [7] Lecour S, Bøtker HE, Condorelli G, et al. ESC working group cellular biology of the heart: position paper: improving the preclinical assessment of novel cardioprotective therapies [J]. Cardiovasc Res, 2014, 104(3): 399-411.
- [8] Lecour S, Andreadou I, Bøtker HE, et al. IMproving preclinical assessment of cardioprotective therapies (IMPACT) criteria: guidelines of the EU-CARDIOPROTECTION COST action [J]. Basic Res Cardiol, 2021, 116(1): 52.
- [9] Perrin S. Preclinical research: make mouse studies work [J]. Nature, 2014, 507(7493): 423-425.
- [10] Hausenloy DJ, Chilian W, Crea F, et al. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection [J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(7): 1143-1155.
- [11] Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities [J]. Heart, 2016, 102(5): 341-348.
- [12] 游永刚, 徐永清, 郭远发. 基础医学研究向临床实践转化存在的问题与对策 [J]. 医学与哲学, 2009, 30(15): 69-71.
- [13] 王丽平. 经皮冠脉栓塞法建立猪心肌梗死模型及缺血修饰白蛋白的动态观察 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2015.
- [14] 李永慧, 朱琳, 寇毅英, 等. 八味沉香散对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2022, 44(9): 3027-3030.
- [15] 罗超飞, 吴超, 金世云, 等. 溶血磷脂酸对小鼠离体心脏缺血/再灌注损伤及 T RPV1 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(3): 417-421.
- [16] Ren J, Li C, Liu Y, et al. Protective effect of dexmedetomidine against myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. Acta Cir Bras, 2018, 33(1): 22-30.
- [17] Wang S, Wang Y, Cheng H, et al. The networks of noncoding RNAs and their direct molecular targets in myocardial infarction [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(8): 3194-3208.
- [18] Poomani MS, Mariappan I, Perumal R, et al. Mesenchymal stem cell (MSCs) therapy for ischemic heart disease: a promising frontier [J]. Glob Heart, 2022, 17(1): 19.
- [19] Milani-Nejad N, Janssen PM. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages [J]. Pharmacol Ther, 2014, 141(3): 235-249.
- [20] 韩同磊, 孙羽东, 秦锋, 等. 动脉粥样硬化动物模型的研究进展 [J]. 血管与腔内血管外科杂志, 2017, 3(5): 962-967.
- [21] 马国铃, 杨茂东, 刘演龙, 等. 心肌肌球蛋白结合蛋白 C 在急性心肌梗死、心肌缺血再灌注损伤模型猪中的表达及意义 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2022, 30(11): 57-62, 69.
- [22] 刘新峰, 李应龙, 曾宪春, 等. MR T2mapping 成像评估介入栓塞法制备的急性心肌缺血模型心肌组织特征 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2020, 17(1): 43-46.
- [23] Sala-Mercado JA, Wider J, Undyala VV, et al. Profound cardioprotection with chloramphenicol succinate in the swine model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Circulation, 2010, 122(11): S179-S184.
- [24] Issa ZF, Rosenberger J, Groh WJ, et al. Ischemic ventricular arrhythmias during heart failure: a canine model to replicate clinical events [J]. Heart Rhythm, 2005, 2(9): 979-983.
- [25] Zhai X, Han W, Wang M, et al. Exogenous supplemental NAD⁺ protect myocardium against myocardial ischemic/reperfusion injury in swine model [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 6066-6074.
- [26] Rissanen TT, Nurro J, Halonen PJ, et al. The bottleneck stent model for chronic myocardial ischemia and heart failure in pigs [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 305(9): H1297-H1308.
- [27] Yang P, Li JH, Li AL, et al. Garlicin post-conditioning suppresses adhesion molecules in a Porcine model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(1): 31-36.
- [28] Liu J, Zhu H, Zheng Y, et al. Cardioprotection of recombinant human MG53 protein in a porcine model of ischemia and reperfusion injury [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 80: 10-19.
- [29] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对猪心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(3): 384-386.
- [30] 姚玉斯, 曾智桓, 赵艳群, 等. 麝香通心滴丸改善猪心肌缺血再灌注后冠脉微循环和心功能 [J]. 南方医科大学学报, 2020, 40(6): 899-906.
- [31] Penna C, Andreadou I, Aragno M, et al. Effect of hyperglycaemia and diabetes on acute myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection by ischaemic conditioning protocols [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(23): 5312-5335.

- [32] 刘杜霞, 姜一, 孔秀梅, 等. 麻花秦艽乙酸乙酯部位对心肌缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(4): 107-112.
- [33] Conklin DJ, Guo Y, Nystoriak MA, et al. TRPA1 channel contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2019, 316(4): H889-H899.
- [34] 杨天睿, 苗云波, 张荣平, 等. 实验树鼯心肌缺血再灌注离体模型的构建 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38(2): 205-210.
- [35] 张海涛, 康晟, 王春玥, 等. 通心络对猪急性心肌缺血再灌注晚期微血管内皮屏障损伤的治疗作用 [J]. 山东医药, 2020, 60(28): 33-36.
- [36] 任建勋, 李磊, 尹云泽, 等. 通脉养心丸对小型猪心肌缺血再灌注损伤后期气阴两虚证的干预作用 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1612-1616.
- [37] 李磊, 林成仁, 任建勋, 等. 小型猪痰瘀互结证冠心病证候诊断研究 [J]. 世界中医药, 2013(10): 1132-1136.
- [38] 李欣志, 马晓斌, 李磊, 等. 小型猪冠心病模型痰瘀互结证候诊断与评分 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(11): 825-827.
- [39] 刘建勋, 于震, 李欣志. 疾病模型动物拟临床研究概念的形成及其应用——自体血栓法制备小型猪心肌缺血模型的研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5): 207-209.
- [40] 杨天睿, 苗云波, 张彤, 等. 停灌与再灌注时间对心肌缺血再灌注损伤程度的影响研究 [J]. 中国全科医学, 2018, 21(11): 1310-1314.
- [41] Fischesser DM, Bo B, Benton RP, et al. Controlling reperfusion injury with controlled reperfusion: historical perspectives and new paradigms [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2021, 26(6): 504-523.
- [42] 白玉花, 辛颖. 心肌缺血再灌注损伤模型建立方法的研究进展 [J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2015(3): 251-256.
- [43] Ghaleh B, Thireau J, Cazorla O, et al. Cardioprotective effect of sonic hedgehog ligand in pig models of ischemia reperfusion [J]. Theranostics, 2020, 10(9): 4006-4016.
- [44] Malka A, Meerkin D, Barac YD, et al. TVP1022: a novel cardioprotective drug attenuates left ventricular remodeling after ischemia/reperfusion in pigs [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2015, 66(2): 214-222.
- [45] 贾非凡. 双参宁心胶囊调控线粒体自噬抗小型猪心肌缺血再灌注损伤机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- [46] 黄晓婷. 急性心肌梗死患者心电图 ST 段回落时间与预后的关系分析 [J]. 基层医学论坛, 2021, 25(10): 1426-1427.
- [47] 魏蓉蓉, 王剑琼, 陈双礼. 急性心肌梗死患者心电图 ST 段回落时间与预后的关系分析 [J]. 心电与循环, 2020, 39(4): 379-381.
- [48] Heyndrickx GR. Early reperfusion phenomena [J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2006, 10(3): 236-241.
- [49] Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Circ Res, 2013, 113(4): 428-438.

[收稿日期]2022-11-12