

# 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

沈成兴<sup>1</sup>, 梁春<sup>1</sup>, 陈良龙<sup>1</sup>, 钱菊英<sup>2</sup>, 王克强<sup>2</sup>, 陈灏珠<sup>3</sup>, 葛均波<sup>3</sup>

(1. 东南大学附属中大医院心内科, 江苏省南京市 210009;

2. 复旦大学附属中山医院, 3. 上海市心血管研究所, 上海市 200032)

[关键词] 医学实验动物学; 冠状动脉微栓塞模型的建立; HBFP 染色; 微球; 月桂酸钠; 微梗死

[摘要] 目的 建立新的在体大鼠冠状动脉微栓塞模型。方法 成年 SD 大鼠随机分为正常对照组 ( $n=6$ )、月桂酸钠组 ( $n=54$ ) 及微球组 ( $n=27$ ), 微球组依所注射微球的数量进一步分为 500、1 000 和 3 000 个/次 3 个亚组 ( $n=9$ ); 大鼠麻醉后开胸, 夹闭主动脉后经左心室内注射 200  $\mu\text{g}$  月桂酸钠或 42  $\mu\text{m}$  的微球达冠状动脉, 以注射生理盐水为对照; 分别采用病理切片、超声心动图和彩色微粒子测量技术, 观察各组大鼠心肌内微血栓和微梗死形成, 以及心功能和心肌局部血流量的变化。结果 经左心室内注射 200  $\mu\text{g}$  月桂酸钠后 1 h, 大鼠心肌微小动脉内即有微血栓形成, 3 h 以后达高峰, 血栓形成率高达 66.4%  $\pm$  18.8%, 在此后的 12~72 h 逐渐降低。与微球组相比, 所形成的微血栓中不但有血小板及纤维蛋白的聚集, 而且还伴有内皮损伤及较严重的炎细胞浸润; 二者所形成的微梗死灶皆为楔形呈局灶性分布, 但月桂酸钠组梗死部位炎症反应较重。月桂酸钠组所形成的微梗死面积、心功能和心肌局部血流量的下降程度与单次注射 1 000 个微球相似。结论 经冠状动脉内注射月桂酸钠可成功构建大鼠冠状动脉微栓塞模型, 其最佳剂量和时间点分别为 200  $\mu\text{g}$  和 3 h, 与机械性的塑料微球栓塞相比, 在病理发病机制上比较贴近于临床, 可作为冠状动脉微栓塞微循环研究的理想的动物模型。

[中图分类号] R-332

[文献标识码] A

## The Establishment of A New Model of Rat Coronary Microthrombosis by Coronary Sodium Laurate Injection

SHEN Cheng-Xing, LIANG Chun, CHEN Liang-Long, QIAN Ju-Ying, WANG Ke-Qiang, CHEN Hao-Zhu, and GE Jun-Bo  
(Cardiovascular Department of Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[KEY WORDS] Microsphere; Sodium Laurate; Microinfarction; Microthrombosis; Coronary Artery

[ABSTRACT] **Aim** To establish a new model of coronary microthrombosis model in rats. **Methods** A total of 87 male Sprague-Dawley rats were used in this study. Rats were anesthetized with ketamine and divided into sham group ( $n=6$ ), sodium laurate group ( $n=54$ ) and microspheres group ( $n=27$ ). In sodium laurate (SL) group, 200  $\mu\text{g}$  of sodium laurate was injected into the coronary artery while in microspheres (MS) group, different amount of microspheres (42  $\mu\text{m}$  in diameter) were injected into the coronary artery, the sham group was injected saline instead. The thrombus induction and consequent of myocardial dysfunction were examined by histopathological analyses and non-radiative microspheres. **Results** One hour after SL injection, there is microthrombus in coronary artery and reaches a peak three hours after the injection (66.4%  $\pm$  18.8%). Microscopic examination of Carstairs Stain sections ( $n=8$ ) revealed that microthrombi containing fibrin strands obstructed the perforating arteries in the myocardium. Multiple small myocardial infarcts were observed in the heart. Multiple microinfarctlets were observed and a more severe inflammatory reaction was seen in SL group. LVEF was also decreased in SL group which is comparable to the injection of 1000 microspheres. **Conclusions** Coronary microthrombosis model was successfully induced after injection of SL into the coronary artery. The model is useful for the investigation of the pathophysiology of coronary microthrombosis.

冠状动脉微栓塞是引起冠状动脉微循环障碍的最主要原因, 深入研究微栓塞的病理发病机制及防治措施具有重要的临床意义。目前所采用的心肌微栓塞动物模型主要采取塑料或脂质微球机械堵塞的方法, 且多是在猪等大动物身上进行<sup>[1,2]</sup>, 不但操作复杂, 费用昂贵, 而且不能真实地反映微血栓本身所导致微循环障碍的病理生理特征。为此, 我们尝试

采用经冠状动脉内注射月桂酸钠的方法, 在损伤大鼠冠状动脉血管内皮的基础上, 使血小板聚集, 诱导微血栓形成, 从而为微栓塞致冠状动脉微循环障碍的研究提供了一种经济实用且贴近临床的新的动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和器材

月桂酸钠(sodium laurate, SL)为美国 Sigma 公司产品; 氯胺酮为上海中西药业股份有限公司产品; 彩

[收稿日期] 2004-07-21

[修回日期] 2005-03-20

[作者简介] 沈成兴, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的机理及防治。

色微球: 42  $\mu\text{m}$ ,  $2 \times 10^5/\text{mL}$ ; E-Z trac。PE-50 和 PE-10 管由德国伍尔兹堡胡凯博士馈赠; 生物光学显微镜为 Olympus BH-2 型; 超声心动图为 Hewlett Packard Sonos 5500 型。

## 1.2 实验动物及分组

采用清洁级健康雄性 SD 大鼠 87 只, 体重 250~330 g, 由中科院上海实验动物中心提供。随机分为正常对照组 ( $n=6$ )、微血栓组(月桂酸钠组)及微球组, 其中微血栓组 54 只, 预试验结果证实以 200  $\mu\text{g}$  月桂酸钠注射效果最佳, 故本研究中的剂量均为 200  $\mu\text{g}$ , 根据所注射月桂酸钠的不同时间段进一步分为 1、2、3、12、24 和 72 h 6 个亚组, 每亚组 9 只; 微球组 27 只, 依所注射微球的数量分为 500 个/次 (MS1 组)、1 000 个/次 (MS2 组) 及 3 000 个/次 (MS3 组) 3 个亚组, 每亚组 9 只; 观察大鼠存活、心率及一般状况。

## 1.3 实验方法

SD 大鼠以氯胺酮腹腔注射 (100 mg/kg) 麻醉后, 气管切开, 插管连接呼吸机, 左前外侧中心切口进胸, 分离主动脉并用血管夹夹闭主动脉后, 迅速以微量注射器从心尖部直接向左心室注入 0.2 mL (1 g/L) 月桂酸钠 (微血栓组) 或 42  $\mu\text{m}$  不同剂量的微球 (微球组); 夹闭 20 s 后, 松开血管夹, 心跳稳定后逐层关胸。待呼吸平稳后, 拔除气管插管, 术毕腹腔注射 80 万单位青霉素, 普通饲养。

## 1.4 观察指标

**1.4.1 病理学及微血栓微梗死的观察** 分别于不同时间段处死大鼠, 取左心室乳头肌段心肌, 10% 福尔马林固定。连续切片观察血栓体积 ( $n=3$ )。自大鼠左心乳头肌附近始, 连续切片, 4  $\mu\text{m}$ /张, 每个心肌组织共切片 100 张; ④每隔 2 mm 切片 4 张, 从左心室中段始, 前后共取 3 段, 每标本切 12 张, 分作 HE、CARSTAIRS 和 HBFP 染色。微血栓计数以每张切片中微血栓的阳性比例及每张切片中的微血栓数量来表示; 通过图像处理软件计算心肌早期损伤面积占总面积的比值。

**1.4.2 心功能的变化** 分别于术后第 1、3 及 7 天, 超声心动图测量大鼠 LVEF, 探头频率为 12 MHz。所有超声心动图检查均由一位具有丰富超声心动图检查经验的专科医生进行。

**1.4.3 心肌局部血流量的测定** 将到达各观察点的 SD 大鼠麻醉后, 经左股动脉将 PE-50 导管插管至腹主动脉中段, 结扎动脉远心端, 导管连接定量抽血泵 (LDB-H 型电子蠕动泵); 再游离左心耳, 将充分震

荡、混匀的微粒子用微量注射器左心耳内注射 0.2 mL ( $2.5 \times 10^9/\text{L}$ ); 在注射前 10 s 同时用定量抽血泵以 1 mL/min 的恒速抽血, 共 70 s, 收集约 1.2 mL 血液, 肝素抗凝后,  $-70^\circ\text{C}$  冰箱中保存; 取左心室心尖部心肌, 称重后冰箱中保存, 分别计数各标本中的彩色微粒子数。公式为心肌局部相对血流量 (myocardial blood flow, MBF) =  $(\text{Cm} \times \text{Qr})/\text{Cr}$ , Cm 为每克组织中微粒子数, Qr 为定量泵抽血的速率, Cr 为血样中的微粒子数。

## 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用双侧  $t$  检验, 多组间比较采用 ANOVA 分析。  $P < 0.05$  为有显著性差异。

# 2 结果

## 2.1 实验动物的一般情况

各组间动物的体重和心率无显著性差异。其中微血栓组死亡 11 只, 微球组死亡 5 只, 主要死于麻醉过量、大出血、心律失常等; 余下 43 只微血栓组分别为术后 1 h 组 7 只、3 h 组 9 只、12 h 组 6 只、24 h 组 6 只及 72 h 组 6 只; 微球组 22 只, 其中 MS1 组 8 只、MS2 组 8 只及 MS3 组 6 只。

## 2.2 大鼠心肌内微血栓的形成

显微镜下 HE 染色见大鼠心肌微小动脉内 (150  $\mu\text{m}$  以下) 有微血栓形成, 血栓周边伴较多炎性细胞浸润; 血栓多以红细胞为主, 呈红色血栓; CARSTAIRS 染色进一步证实血栓中有呈灰兰色到浅蓝色的血小板存在, 而心肌较大动脉血管内无明显血栓形成 (图 1A、1B 和 1C, Figure 1A, 1B and 1C)。经冠状动脉内注射 200  $\mu\text{g}$  月桂酸钠后 1 h, 大鼠心肌微小动脉内即有微血栓形成, 血栓形成率为  $12.1\% \pm 4.5\%$ , 3 h 以后达高峰, 血栓形成率高达  $66.4\% \pm 18.8\%$ , 在此后的 12~24 h 逐渐降低, 72 h 又恢复至注射月桂酸钠 1 h 后的水平 (图 2, Figure 2)。

## 2.3 各组大鼠心肌微梗死面积的比较

HBFP 染色证实注射月桂酸钠和微球后均可导致大鼠心肌内局灶性梗死, 多为楔形呈局灶性分布, 周边见心肌水肿、变性 (图 1D 和 1E, Figure 1D and 1E); 其中月桂酸钠组 ( $8.61\% \pm 4.7\%$ ) 与 MS2 组 ( $7.2\% \pm 3.3\%$ ) 微梗死比例类似 ( $P > 0.05$ ), 但高于 MS1 组 ( $4.82\% \pm 2.7\%$ ,  $P < 0.001$ ), 却明显少于 MS3 组 ( $17.6\% \pm 7.4\%$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 3 (Figure 3)。

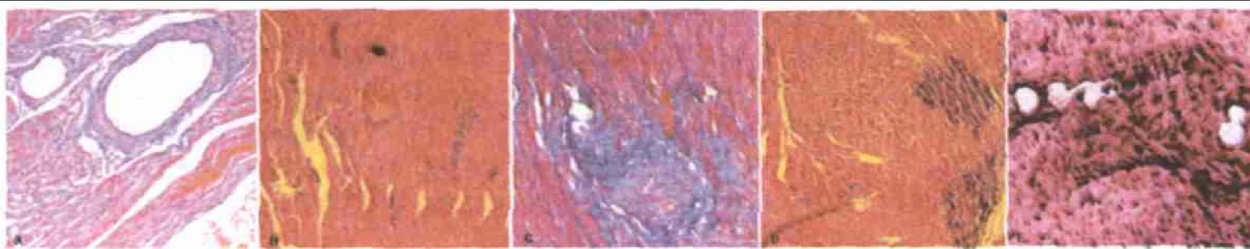


图 1. 冠状动脉的病理学观察 A 为正常血管腔, B 为 HE 染色示管腔内血栓, C 为 CARSTAIR 染色示血栓内富含血小板及纤维蛋白原, D 为 HBFP 染色示局灶性梗死形成, E 为 42  $\mu$ m 微球注射后形成的局灶性心肌梗死。

Figure 1. Coronary artery by histopathological analyses

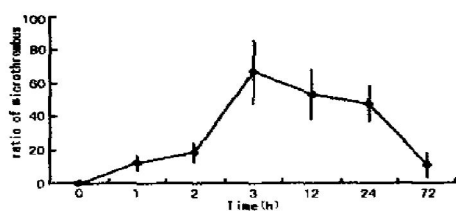


图 2. 血栓形成与月桂酸钠注射后的时间关系

Figure 2. Time correlation of microthrombosis after sodium laurate injected

#### 2.4 各组大鼠心功能的变化

与对照组相比, 术后月桂酸钠组射血分数明显降低( $P < 0.01$ ), 而 MS1 和 MS2 组射血分数虽降低, 但统计学意义。在各组中, 以 MS3 组射血分数下降最为显著, 多数大鼠发生急性心功能衰竭, 这可能与此组注射磁珠数量较多且心肌梗死面积较大有关(表 1, Table 1)。

表 1. 各组大鼠心功能的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Changes of myocardial function of rats in the groups

时间 (天)	对照组 ( $n = 6$ )	SL ( $n = 7$ )	MS1 ( $n = 6$ )	MS2 ( $n = 6$ )	MS3 ( $n = 6$ )
1	96.33 $\pm$ 2.21	78.16 $\pm$ 9.23 <sup>a</sup>	84.71 $\pm$ 3.03	80.70 $\pm$ 3.41	46.28 $\pm$ 5.46
3	98.16 $\pm$ 1.53	82.67 $\pm$ 5.58 <sup>a</sup>	88.83 $\pm$ 2.79	85.55 $\pm$ 3.33	44.16 $\pm$ 3.98
7	98.55 $\pm$ 1.29	79.57 $\pm$ 4.76 <sup>a</sup>	91.60 $\pm$ 2.77	84.60 $\pm$ 4.78	52.75 $\pm$ 4.59

a:  $P < 0.001$ , 与对照组及 MS3 组相比。

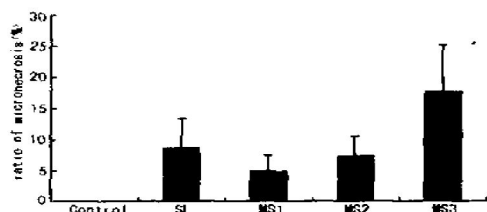


图 4. 月桂酸钠组与微球组心肌局部血流比较

Figure 4. Comparison of myocardial blood flow between sodium laurate group and microspheres group

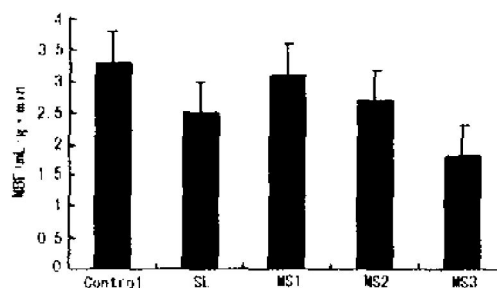


图 3. 月桂酸钠组与微球组心肌微梗死面积的比较

Figure 3. Comparison of myocardial microinfarction between sodium laurate group and microspheres group

#### 2.5 各组大鼠心肌局部血流量的变化

月桂酸钠及 MS2 组的大鼠局部心肌血流量明显低于正常对照组( $P < 0.01$ ); 在各组中, 以 MS3 组大鼠局部心肌血流量下降最为显著(图 4, Figure 4)。

### 3 讨论

冠状动脉介入治疗及动脉粥样硬化斑块破裂后的碎片是引起冠状动脉微栓塞的主要原因, 而后者会造成心肌局部的微梗死<sup>[3]</sup>。微梗死虽然可没有明显的临床症状, 但反复大量的微栓塞在造成心肌微血管床大量丢失的同时, 微梗死的面积也在逐渐扩大, 是引起心律失常、猝死、心肌纤维化及心衰发病

的重要机制之一。病理研究发现,在急性冠状动脉综合症猝死的患者中,心肌微循环中微栓子的发现率可高达 79%<sup>[4]</sup>。内皮功能异常,血小板的粘附聚集以及炎症反应在冠状动脉微血栓及微循环障碍的发生机制中起至关重要的作用。

目前临床上对心肌微循环障碍的观察主要依赖多普勒导丝对冠状动脉血流和冠状动脉血流储备的检测来判断。基础研究主要在猪等大动物身上进行,多用机械堵塞的方法,常用塑料或脂质微球,直径从 20~40  $\mu\text{m}$ ,甚至 900  $\mu\text{m}$  不等<sup>[1,2]</sup>,通过微导管注射到冠状动脉远端,堵塞心肌微血管形成微栓塞。此模型操作复杂,条件要求高,且费用昂贵,更重要的是不能很好的模拟由于内皮损伤,继发血小板粘附聚集以及炎症反应形成微血栓这一病理生理过程。月桂酸钠常被用于制造外周动脉的血栓栓塞模型<sup>[5,6]</sup>,来评价研究抗血小板及抗血栓类药物的疗效及机理。这是因为月桂酸钠有强烈的内皮损伤作用,可造成血管内皮的脱落,甚至穿孔;注射 1 mL (1 g/L) 月桂酸钠可以造成下肢动脉内皮损伤、血栓形成,并进一步发生坏疽<sup>[7,8]</sup>。根据月桂酸钠这一特性,我们尝试用于制造冠状动脉微血栓模型。首先在预实验中,探讨了月桂酸钠的剂量与冠状动脉内微栓塞发生的关系,发现经冠状动脉内注射 100  $\mu\text{g}$  月桂酸钠几乎没有栓子形成,而 300  $\mu\text{g}$  时虽有栓子形成,但大鼠的死亡率过高,200  $\mu\text{g}$  是较理想的剂量。其次探讨了不同时间段 200  $\mu\text{g}$  月桂酸钠与冠状动脉内微栓塞发生的关系,发现注射后 1 h,于大鼠心肌微小动脉内即有微血栓形成,3 h 以后达高峰,在此后的 12~24 h 逐渐降低,72 h 又恢复至注射月桂酸钠 1 h 后的水平。病理证实所形成的微血栓中有血小板及纤维蛋白的聚集,主要在血管直径为 150  $\mu\text{m}$  左右的微血管内。所形成的梗死灶多为楔形呈局灶性分布,周边见炎症细胞浸润。这与临床微栓塞致冠状动脉微循环障碍的病理生理特征一致。

为进一步验证本模型的可靠性,特选用 42  $\mu\text{m}$

的塑料微球冠状动脉内注射,造成大鼠冠状动脉微栓塞模型做为对照组。病理结果发现注射月桂酸钠所造成的微栓塞,HE 染色示血管内皮损伤以及炎症细胞浸润的程度明显高于微球注射组;所形成的微梗死面积与单次注射 1 000 个直径为 42  $\mu\text{m}$  的塑料微球相似,均同时伴心功能和心肌局部血流量的下降。

综上所述,经冠状动脉内注射月桂酸钠可成功构建大鼠冠状动脉微栓塞致微循环障碍的动物模型,其最佳剂量和时间点分别为 200  $\mu\text{g}$  和 3 h,在所导致的微梗死面积、心功能和心肌局部血流量的改变方面,与单次注射 1 000 个微球相似。此模型具有经济实用,以及与临床冠状动脉微栓塞致微循环障碍的病理生理发生有一定的相似,可作为研究冠状动脉微栓塞致微循环障碍理想的动物模型。

#### [参考文献]

- [1] Weber KT, Malinin TI, Dennison BH, Fuqua JM Jr, Speaker DM, Hastings FW. Experimental myocardial ischemia and infarction: Production of diffuse myocardial lesions in unanesthetized calves. *Am J Cardiol*, 1972, **29**: 793-802
- [2] Monroe RG, LaFarge CG, Gamble WJ, Kumar AE, Manasek FJ. Left ventricular performance and coronary flow after coronary embolization with plastic microspheres. *J Clin Invest*, 1971, **50**: 1 656-665
- [3] Ito H, Taniyama Y, Iwakura K, Higashino Y, Fujii K, Minamino T. Intravenous nicorandil can preserve microvascular integrity and myocardial viability in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **33**: 654-660
- [4] Heusch G, Schulz R, Baumgart D, Haude M, Erbel R. Coronary microembolization. *Prog Cardiovasc Dis*, 2001, **44** (3): 217-230
- [5] Ashida S, Ishihara M, Ogawa H, Abiko Y. Protective effect of ticlopidine on experimentally induced peripheral arterial occlusive disease in rats. *Thromb Res*, 1980, **18**: 55-67
- [6] Shirakura S, Higo K, Takeda M, Karasawa A. Antithrombotic effects of KW-3635, a thromboxane A<sub>2</sub>-receptor antagonist, in guinea pigs. *Jpn J Pharmacol*, 1994, **65** (2): 93-98
- [7] Adachi H, Irie T, Uekama K, Manako T, Yano T, Saita M. Inhibitory effect of prostaglandin E<sub>1</sub> on laurate-induced peripheral vascular occlusive sequelae in rabbits: optimized topical formulation with betacyclodextrin derivative and penetration enhancer HPE-101. *J Pharm Pharmacol*, 1992, **44** (12): 1 033-035
- [8] Goto J, Araki H, Otomo S, Aihara H. A comparison of the effect of Lipo PGE<sub>1</sub> and other related compounds on experimental peripheral arterial occlusive disease in rats. *Drugs Exp Clin Res*, 1986, **12** (11): 917-921

(此文编辑 文玉珊)