



小型猪慢性心肌缺血模型的建立与无创遥测技术的应用

陈民利, 潘永明, 陈亮, 徐孝平, 王德军, 杨玉伟,
陈方明, 蔡月琴, 徐剑钦, 朱科燕

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所, 杭州 310053)

【摘要】 为建立小型猪慢性心肌缺血模型和应用无创遥测技术的评价方法, 本研究采用维生素 D₃ 和异丙肾上腺素复合高脂饮食的方法建立了小型猪慢性心肌缺血模型; 并利用无创遥测技术对小型猪慢性心肌缺血模型的症状进行检测与评价, 同时对五指山小型猪、巴马小型猪和西藏小型猪的运输应激和高脂诱导发生动脉粥样硬化 (AS) 的危险因素进行评估。建立了巴马小型猪慢性心肌缺血模型与评价技术规范, 明确了无创遥测技术可用于心肌缺血模型的症状检测和评价, 界定了小型猪运输应激后需 4 周以上的适应恢复期。并发现了高脂环境下五指山小型猪、巴马小型猪和西藏小型猪发生高血脂、高血压、高胰岛素血症等 AS 危险因素的不同特征, 这为小型猪在心血管疾病研究中的选择和应用提供参考。

【关键词】 小型猪; 慢性心肌缺血; 无创遥测技术; 动脉粥样硬化; 心率变异性; 适应恢复期

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0016-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.006

Establishment of chronic myocardial ischemia model in minipigs and application of noninvasive telemetry technique

CHEN Min-li, PAN Yong-ming, CHEN Liang, XU Xiao-ping, WANG De-jun,
YANG Yu-wei, CHEN Fang-ming, CAI Yue-qin, XU Jian-qin, ZHU Ke-yan

(Laboratory Animal Research Center/ Comparative Medical Research Institute, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 In order to establish the minipig model of chronic myocardial ischemia and apply non-invasive telemetry technique, the minipig model of chronic myocardial ischemia was made induced by Vitamin D₃, isoproterenol and combined with high fat diet, and the non-invasive telemetry technique was used to detect and evaluate the symptoms of minipig model of chronic myocardial ischemia. Moreover, the effects of transport stress and the risk factors of atherosclerosis (AS) induced by high fat diet among Wuzhishan minipigs, Bama minipigs and Tibetan minipigs were also evaluated. Our study has successfully established the Bama minipig model of chronic myocardial ischemia and the technical specification for evaluation. The non-invasive telemetry technique can be used to detect and evaluate the symptoms of chronic myocardial ischemia model, and defines minipigs at least need to keep for more than 4 weeks after transport stress to adaptive recovery period. In addition, the different characteristics of AS risk factors such as hyperlipidemia, hypertension and hyperinsulinemia were observed in Wuzhishan minipigs, Bama minipigs and Tibetan minipigs in high fat environment, and this provides a reference for the selection and application of minipigs in the research of cardiovascular diseases.

【Key words】 Minipig; Chronic myocardial ischemia; Non-invasive telemetry technique; Atherosclerosis; Heart rate variability; Adaptive recovery period

[基金项目] 省部共建科研基金 (WKJ2009-2-032); 浙江中医药大学比较医学创新团队 (XTD201301)。

[通讯作者] 陈民利 (1963 -), 女, 教授, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: cmli991@aliyun.com

1 研究背景

心血管疾病是严重危害人民健康的常见病、多发病之一。冠状动脉性心脏病又称缺血性心脏病,简称冠心病,是一种严重的心血管系统疾病,已成为死亡的主要原因之一。随着我国的改革开放,经济迅猛发展,人们的生活水平、方式、节奏、社会和心理压力都发生了改变,缺血性心脏病的发病率与病死率逐年增加,危险因素水平仍在不断增高,主要表现在人口老龄化加剧、人群血清总胆固醇水平增高、高血压患病率在增加、吸烟仍很普遍,预示了我国人群冠心病发病危险的巨大的“冰山底座”^[1]。因此,对缺血性心脏病的治疗一直是人们所关注的热点之一。特别是冠心病心绞痛的发病机制受到世人的瞩目,找出对缺血性心脏病行之有效的防治手段已是需要迫切解决的问题。

1.1 心肌缺血动物模型的建立是研究该疾病病理机制和治疗药物疗效评价的关键环节。

几十年来,药理学工作者在探索心肌缺血损伤机理及研究药理作用的同时,建立了不同水平的动物模型,如在体、离体及细胞水平心肌缺血模型。在体动物心肌缺血模型有药物造模和手术造模两大类^[2-4],但目前建立的心肌缺血模型多为冠状动脉结扎法、药物注射方法等,均是借助物理、化学方法使血管急性阻塞造成心肌急性缺血,与心肌缺血临床发病机制有很大差异。并存在选择模型局限、单一及不尽完善等问题,如存在方法学问题、动物种属问题、干扰因素问题、模型的稳定性和可靠性问题,模型的评价和观察指标的检测问题。如现有的手术造模大多需要复杂的开胸手术,对动物损伤大,制备心肌缺血模型的方法有些为慢性机械压迫冠状动脉方法,也需要复杂的开胸手术,对动物亦有一定的影响,干扰生理和病理功能。其中采用较多的是在猪冠状动脉左旋支或降支上采用 Ameriod 缩窄环进行缩窄冠状动脉造成心肌缺血,但该方法与慢性心肌缺血模型形成的病理机制不是很理想^[5],其缩窄环不可逆转,对新药研究评价中药物有效性评价带来一定的差异,因此,迫切寻找一种理想的与临床疾病发生符合程度高的动物模型^[6]。本项目利用猪在心血管形态学、生理学和 AS 易感性方面与人类最为接近的特点^[7],结合心肌缺血模型的药物注射方法,用高脂饮食的方法,造成猪慢性心肌缺血,并用异丙肾上腺素注射加强心肌缺血的敏感性,可模拟临床上突发性冠心病的诱发,建立与临床发生相似、稳定性和重复性好的小型猪慢性心肌缺血模型。

1.2 疾病动物模型病理症状的检测手段和评价技术是模型得到应用的关键技术。

动物心肌缺血模型的检测手段大多为心电图、心功能、生化检测、心肌组织病理检查,主要用于急性实验研究,其检测手段极为局限,且必须在麻醉、束缚下进行,只能短时间检测,既受麻醉、操作和手术的影响,又受时间的局限性,而心肌组织病理检查在动物处死后进行,动物不能存活使药物治疗的观察受到限制,无法进一步观察疾病症状的发展过程,使用量大、动物个体差异大、实验的可靠性低。因此迫切需要寻找能在清醒状态下的有效的检测手段。动态心电图检测和心率变异性分析(HRV)是临床心血管领域中非创伤性检查的重要诊断手段之一,HRV 为评估心脏自主神经活动的客观指标,可评价和预测冠心病患者冠状动脉病变范围和严重程度及冠脉痉挛严重性^[8]。根据临床进行动态心电图检测和心率变异性分析的诊断手段,国际上广泛应用利用遥测技术进行动物在清醒状态下的检测,以减少对动物的反复麻醉、捆绑、导线连接等操作,减少由于实验操作而引起血压、心率和体温等生理参数的变化,保证实验数据的可靠性^[9-11];使用遥测技术可连续记录动物的生理信号,观察药物的起效和毒性发生的时间,确保动物的生理病理机制和药物评价结果;同时,不用处死动物,避免了动物福利受损问题,达到“减少、代替、优化”的“3R”原则;QT 延长对心肌缺血疾病中具有重要的病理意义,是预测心肌缺血的重要指标,使用遥测技术可在动物清醒状态下连续监测分析 QT 的变化,可有效评价药物对心肌缺血疾病的有效性^[12,13]。本项目利用无创遥测技术,对动物进行清醒状态下的动态心电图检测和心率变异性分析,并以血清酶、心肌代谢和血液流变等血液生化指标进行辅助评价,建立猪慢性心肌缺血模型的动态检测和评价技术规范。

2 研究目的

针对以往猪慢性心肌缺血模型制作的不足,本研究首先以高脂血症导致 AS、引起冠状动脉梗阻或狭窄的机理,采用高脂饮食的方法,造成猪慢性心肌缺血,并用异丙肾上腺素注射加强心肌缺血的敏感性,模拟临床上突发性冠心病的诱发,建立小型猪慢性心肌缺血模型。该研究模型避免了手术损伤,与临床发生相似,稳定性和重复性好,影响因素少,比较适合于冠心病的防治研究和新药药效学的评价研究。同时应用无创遥测技术进行心肌缺血模型的症状检测和评价,在清醒状态下进行长时间

连续的动态心电图检测和心率变异性分析,在一定程度上能反映出模型动物病理改变的发生、发展过程,并结合心肌酶、血脂、自由基、心肌能量代谢、血液凝聚性及电解质指标等血液生化指标进行辅助评价研究,为小型猪慢性心肌缺血模型的评价技术规范的建立提供依据。

考虑到国内一些小型猪在心血管疾病应用中可能存在特殊性,本研究有目的地选择了五指山小型猪、巴马小型猪、西藏小型猪,探讨了这 3 种小型猪发生高血脂、高血压、高胰岛素血症等 AS 危险因素的不同特征。并利用无创遥测技术结合血液生化指标评估这 3 种小型猪的运输应激反应情况,界定小型猪的运输应激后的适应恢复期,为小型猪在生物医学领域中的实际应用提供基础。

3 创新点

以维生素 D3 和异丙肾上腺素复合高脂饮食诱导,率先建立了非外科手术方式的巴马小型猪慢性心肌缺血模型,并建立了小型猪慢性心肌缺血模型的评价技术规范,确定了无创遥测技术可用于心肌缺血模型的症状检测和评价,而心肌酶、心肌能量代谢及电解质等血液生化指标可作为辅助评价手段。同时,界定出了小型猪在运输应激后应至少维持 4 周以上的适应恢复期,并发现了五指山小型猪、巴马小型猪、西藏小型猪的 AS 模型特点及其发生 AS 危险因素的不同特征。

4 讨论

本项目建立的小型猪慢性心肌缺血模型,既模拟了人类在高脂环境下 AS 的形成过程,符合人类慢性心肌缺血的过程,具有血液粘滞、脂质代谢、心肌酶代谢异常和 AS 的特点,又模拟了临床上应激引起的突发性冠心病事件,其病症、病程特点与人类发生 AS 和冠心病突发事件引起缺血性心肌病类似,且避免了手术造模的损伤,模型稳定性和重复性好,影响因素少,是比较理想的、适合于冠心病的防治研究和新药药效学的评价研究的小型猪慢性心肌缺血模型。

本项目结合无创生理遥测技术和 HRV 分析手段,以血清酶、心肌代谢和血液流变等辅助评价指标,建立了猪慢性心肌缺血模型的动态检测和评价技术规范。利用遥测技术,可同时检测多种指标的优势,可减少了不同试验次数,并可使各项指标之间的关联性增强。该模型可进行较长时间连续动态观察的特点,使得试验结果更完整,并具有系统性。在一定程度上能反映出模型动物病理改变

的发生、发展过程,反映出药物治疗的作用环节和作用特点。

本项目还对五指山小型猪、巴马小型猪和西藏小型猪的运输应激进行了评估,界定出了小型猪在运输应激后应至少维持 4 周以上的适应恢复期,为小型猪的实际应用和动物福利评估提供参考和技术方法。并探讨了五指山小型猪、巴马小型猪、西藏小型猪的发生 AS 的危险因素的不同特征,为这 3 种小型猪在心血管疾病研究中的选择和应用提供了参考,也为我国各品种小型猪在生物医学研究领域的开发应用提供了研究思路和技术方法。

参考文献:

- [1] 张海澄,郭继鸿. 冠心病流行病学与一级预防[J]. 中国实用内科杂志, 2002, 22(8):449-451.
- [2] Hoffmann U, Millea R, Enzweiler C, et al. Acute myocardial infarction: Contrast enhanced multi-detector row CT in a porcine model [J]. Radiology, 2004, 231(3): 697-701.
- [3] 吕雄文,陈卫东,金涌,等. 卡托普利和低剂量阿司匹林相互作用对大鼠实验性心肌缺血及肝微粒体酶活性的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(1): 104-109.
- [4] 季晓平,张运,葛志明,等. 慢性心肌冬眠动物模型的建立[J]. 山东医科大学学报, 2001, 39(6):517-519.
- [5] Radke PW, Heintgreen A, Frass OM, et al. Evaluation of the Porcine Ameroid Constrictor Model of Chronic Myocardial Ischemia for Therapeutic Angiogenesis Studies [J]. Endothelium, 2006, 13(1):25-33.
- [6] 祝曙光,熊利华,谢鸿发,等. 小型猪慢性缺血性心脏病模型的建立[J]. 中国临床康复, 2006, 10(20):46-48.
- [7] Spetzger U, Reul J, Weis J, et al. Microsurgically produced bifurcation aneurysms in a rabbit model for endovascular coil embolization[J]. J Neurosurg, 1996, 85(3):488-495.
- [8] 许宜冠,周胜华,沈向前,等. 冠心病患者冠状动脉病变与心率变异性的关系[J]. 临床心电学杂志, 2005, 14(2):92-95.
- [9] Chiueh CC, Kopin IJ. Hyperresponsivity of spontaneously hypertensive rat to indirect measurement of blood pressure [J]. Am J Physiol, 1978, 234(6):690-695.
- [10] Clement JG, Mills P, Brockway B. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice [J]. J Pharm Meth, 1989, 21(2):129-140.
- [11] Livezey GT, Miller JM, Vogel WH. Plasma norepinephrine, epinephrine and corticosterone stress responses to restraint in individual male and female rats and their correlations [J]. Neurosci Lett, 1985, 62(1):51-56.
- [12] Yang HT, Ogilvie RW, Terjung RL. Exercise training enhances basic fibroblast growth factor-induced collateral blood flow [J]. Am J Physiol, 1998, 274(6 Pt 2):2053-2061.
- [13] Dan M. Roden, 李辉. 药物导致的 QT 间期延长[J]. 中国心血管杂志, 2008, 13(1):74-75.

[收稿日期]2016-11-14