

小型猪急性心肌梗死模型建立过程中电风暴的不同处理方法比较

李拥军¹, 汤涌², 陈龙¹, 潘啸东¹, 陈中璞¹, 汤成春¹, 章晓国¹, 马根山^{1*}

(¹东南大学附属中大医院心血管内科, 江苏 南京 210009; ²东南大学第二附属医院心内科, 江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**比较小型猪急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)模型建立过程中心室电活动极度不稳定所导致的心室电风暴(ventricular electrical storm, VES)的不同处理方法的疗效。**方法:**小型猪32只,分为4组:A组(未干预组)7只、B组(胺碘酮干预组)8只、C组(美托洛尔干预组)8只、D组(胺碘酮联合美托洛尔干预组)9只。各组均在氯胺酮及戊巴比妥钠全麻下采用球囊封堵法封堵前降支中远段,缺血预适应3~4次、持续封堵60 min、再灌注30 min建立AMI模型。**结果:**4组中3只意外死亡,缺血预适应期、持续封堵期、再灌注期4组动物均出现室性心律失常,B、C、D3组与A组相比有减少趋势但无统计学差异($P > 0.05$);4组动物VES比较,B、C2组与A组相比有减少趋势但无统计学差异,D组与A组相比明显减少,差异显著($P = 0.005$);4组死亡情况比较,各组与A组相比无统计学差异;缺血预适应期与再灌注期易于发生心律失常、VES及死亡,但不同时期室性心律失常的发生差异并不显著($P > 0.05$)。**结论:**AMI模型建立过程易于发生VES导致实验动物死亡;胺碘酮联合美托洛尔可有效抑制猪AMI模型建立中电风暴的发生,提高建模成功率。

[关键词] 心肌梗死;动物模型;电风暴

[中图分类号] R543.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)09-1173-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140905

Comparison of different treatment methods for electrical storms during establishment swine model of acute myocardial infarction

Li Yongjun¹, Tang Yong², Chen Long¹, Pan Xiaodong¹, Chen Zhongpu¹, Tang Chengchun¹, Zhang Xiaoguo¹, Ma Genshan^{1*}

(¹Department of Cardiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009; ²Department of Cardiology, the Second Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** The aim of this study was to compare different treatment methods for ventricular electrical storm (VES) during establishment of swine model of acute myocardial infarction (AMI). **Methods:** Thirty-two swine were divided into four groups. Group A, sham group with 7 swine, saline was given by ear vein; group B, 8 swine, amiodarone was given; group C, 8 swine, metoprolol was given; group D, 9 swine, amiodarone and metoprolol were given simultaneously. After anesthesia, each of those groups were implanted with balloons in the mid-distal left anterior descending artery, by inflating or deflating the balloons, ischemic preconditioning was performed 3 or 4 times, then sustained occlusion of LAD for 60 min, at last reperfusion performed for 30 min. **Results:** There were 3 unexpected deaths in the 4 groups. Various arrhythmias occurred during ischemic preconditioning, sustained occlusion and reperfusion period. Compared with group A, there was a decreasing trend of various arrhythmias in groups B, C and D, but the difference was not significant ($P > 0.05$). Compared with group A, there was a decreasing trend of VES in groups B and C, but the difference was not significant ($P > 0.05$), but group D deceased significantly ($P = 0.005$). Correspondingly, compared with group A, there was a decreasing trend of death due to VES in groups B, C and D, but the difference was not significant ($P > 0.05$). There were no significant difference of ventricular arrhythmias during ischemic preconditioning, sustained occlusion and reperfusion. Deaths due to VES were increased during ischemic preconditioning and reperfusion compared with sustained occlusion, but the difference was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion:** VES and deaths due to VES are more likely to occur during AMI. Combination of amiodarone and metoprolol can effectively reduce the occurrence of VES and deaths due to VES in the swine model of AMI.

[基金项目] 江苏省医学重点人才基金项目(RC2007103)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: magenshan@hotmail.com

[Key words] myocardial infarction; animal model; electrical storms

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(09): 1173-1178]

心肌梗死的动物模型是研究人心肌梗死病理生理机制以及治疗方法的重要工具。猪的心脏解剖结构、冠状动脉分布以及心脏/体重比与人类相似,具有其他小型实验动物所不具备的优势,同时其冠脉侧支血管分布较少,不易形成侧支循环,因此成为建立心肌梗死模型良好的选择。但猪冠状动脉侧支少,心肌、心脏传导系统对缺血耐受性差,封堵冠状动脉特别是前降支(left anterior descending artery, LAD)后极易引起大范围急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)和各种恶性心律失常,导致死亡率较高^[1],限制了模型的建立与应用。这种由于心肌梗死后心室电活动极度不稳定所导致的恶性心律失常,亦即心室电风暴(ventricular electrical storm, VES)是导致心源性猝死的重要机制^[2]。如何抑制VES,减少恶性心律失常的发生,提高AMI模型建立的成功率是研究者关注的重要问题之一。本研究旨在探讨不同处理方法对AMI模型建立过程中不同阶段VES的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

由东南大学实验动物中心提供健康小型雌性家猪,普通清洁级,体重20~30 kg,共32只,并获得东南大学动物伦理委员会批准,研究小组成员具有实验动物资质。

人用6F动脉鞘管(桡动脉、股动脉)、冠状动脉造影J型导丝(0.035 in)、BMW指引导丝(0.014 in)、JR 4.0(Johnson & Johnson公司,美国)、EBU 3.5指引导管、压力泵、压力传感器等(Medtronic公司,美国)、2.0 mm × 15.0 mm球囊(Johnson & Johnson、Medtronic、Abbott公司,美国)。SIEMENS数字减影血管造影机、多导生理监护仪。氯胺酮注射液(福建古田药业有限公司);戊巴比妥钠(美国Sigma-Aldrich上海贸易有限公司),用生理盐水配置成3%戊巴比妥钠溶液,过滤消毒备用;胺碘酮注射液(杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司)、美托洛尔注射液(Astra Zeneca公司,英国)。除颤仪、急救药品。

1.2 方法

1.2.1 麻醉

基础麻醉:禁食8 h后,肌肉注射氯胺酮10~15

mg/kg。维持麻醉:迅速在猪耳静脉建立静脉通路置入留置针,连接三通管,静脉注射3%戊巴比妥钠8~10 ml。术中根据肢体活动情况每20~30 min重复静脉注射3%戊巴比妥钠8~10 ml。鼻导管持续吸氧。

1.2.2 实验动物分组

实验动物建模过程分为缺血预适应期、持续封堵期、再灌注期3个阶段。根据给予的不同处理措施将实验动物分为4组,A组(未干预组)7只,缺血预适应同时只给予肝素,维持静脉通道,直至实验结束;B组(胺碘酮干预组)8只,缺血预适应同时给予胺碘酮1 mg/min持续泵入,至实验结束;C组(美托洛尔干预组)8只,缺血预适应期、持续封堵期、再灌注期静脉间断推注美托洛尔3~5 mg,共3次;D组(胺碘酮联合美托洛尔干预组)9只,缺血预适应同时给予胺碘酮1 mg/min持续泵入,并在缺血预适应期、持续封堵期、再灌注期静脉间断推注美托洛尔3~5 mg,共3次。观察4组在缺血预适应期、持续封堵期、再灌注期室性心律失常,特别是VES的发生情况及实验动物死亡情况。由于本研究持续时间较长,大型动物获得不易,而且A组动物死亡较多,同时研究所需AMI模型动物总数等导致分组欠均匀。

1.2.3 AMI模型的建立过程

动物取仰卧位,绷带固定四肢于操作台上。双侧腹股沟部、前胸部及四肢备皮,贴好监护电极,常规消毒后铺巾,经皮穿刺股动脉置入6F动脉鞘管。经鞘管注射肝素100 U/kg,后每隔50 min追加肝素1 000 U。用0.035 in J型导丝引导送入JR 4.0或EBU 3.5指引导管,回撤导丝,旋转指引导管至左冠状动脉开口,送入BMW指引导丝至LAD远端,沿BMW导丝送入2.0 mm × 15.0 mm球囊至LAD中远端。以0.5~2.0 atm充盈球囊,造影观察球囊远端血流已阻断,持续5~10 min后释放压力,再灌注5 min行缺血预适应,共3~4次。后连续予0.5~2.0 atm充盈球囊封堵LAD 60 min,之后回撤球囊予再灌注30 min。术中连续行电生理监测及主动脉内压力监测。随时记录心电图变化。术后切开皮肤分离组织,结扎穿刺动脉,逐层缝合术区伤口,每天肌肉注射青霉素800万U,共3 d。

1.2.4 模型建立成功的判断标准

根据本中心既往猪 AMI 模型建立的经验,模型建立成功的即刻判断标准可依据:①球囊充盈后冠脉造影显示 LAD 球囊封堵的远端血管无造影剂充盈,即无血流,并维持 60 min 以上;②电生理监测仪显示胸部导联 ST 段抬高。后期判断可依据:①存活动物 1 周后均行 3.0T MRI 检查;②后期实验动物死后取心肌组织行病理学检查。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用似然 χ^2 检验;组间比较采用率的两两比较方法进行。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

32 只动物参加 AMI 模型的建立,其中 A 组 1

只动物在缺血预适应阶段因肝素过量导致内脏大出血死亡;B 组 1 只动物在持续封堵期因 LAD 破裂、心包填塞致死;D 组 1 只动物于再灌注期因麻醉意外死亡。在建模过程的缺血预适应期、持续封堵期以及再灌注期发生了各种类型的心律失常(表 1,图 1)和 VES(表 2,图 2),VES 导致了部分实验动物的死亡。

A、B、D 组意外死亡的动物均发生了室性心律失常,纳入表 1 的统计,而未发生 VES 的则不纳入表 2 的统计,意外死亡动物未计入表 3 的 VES 死亡统计。

通过不同鉴定方法,21 只动物成功建立了心肌梗死模型。早期鉴定方法:①球囊封堵时,造影提示 LAD 远端未显影;②多导生理监护见心电图胸导联 ST 段抬高(图 3)。后期鉴定方法:①MRI 延迟增强

表 1 各组不同时间段发生室性心律失常情况

Table 1 Ventricular arrhythmia in each group in different periods

组别	缺血预适应期	持续封堵期	再灌注期	合计	P 值 [#]
A 组	3/7	2/4	2/4	7/7	1.000
B 组	3/8	1/7	3/6	7/8	0.444
C 组	2/8	1/8	3/8	6/8	0.837
D 组	1/9	1/9	2/8	4/9	0.653
合计	9/32	5/28	12/26	24/32	0.082
P 值 [#]	0.505	0.597	0.811	0.062	

#:似然比卡方检验。“/”前为发生心律失常的动物数,“/”后为动物总数。

表 2 各组不同时间段 VES 发生情况

Table 2 VES in each group in different periods

组别	缺血预适应期	持续封堵期	再灌注期	合计 [*]	P 值 [#]
A 组	2/7	1/5	2/4	5/7	0.647
B 组	1/8	0/7	1/6	2/8	0.733
C 组	1/8	0/8	1/8	2/8	1.000
D 组	0/9	0/9	0/8	0/9	-
合计	4/32	1/29	4/26	9/32	0.335
P 值 [#]	0.330	0.172	0.301	0.013	-

#:似然比卡方检验。*:合计中两两比较,只有 A 与 D 组比较有统计学意义($P=0.005$)。“/”前为发生 VES 的动物数,“/”后为动物总数。

显像可见梗死区对比剂滞留(图 4);②病理学鉴定:大体标本可见心尖部及部分左心室的坏死区(图 5)。后期心肌组织 TTC 染色及 HE 染色均提示部分心肌组织坏死。

3 讨论

VES 又称交感风暴、儿茶酚胺风暴、电风暴,是由于心室电活动极度不稳定所导致的最危重的恶性心律失常,是患者或实验动物心源性猝死的重要机制^[2]。2006 年 ACC/AHA/ESC“室性心律失常的诊疗

和心源性猝死预防指南”^[3]指出 24 h 内自发 2 次或 2 次以上的伴血流动力学不稳定的室速和(或)室颤即为 VES。

猪作为研究 AMI 的大型实验动物具有其他动物所不具备的独特优势。但由于猪冠状动脉侧枝少,对缺血耐受性差,建模过程中易于发生 VES,从而导致较高的死亡率^[2]。与人不同,实验动物猪一旦 VES 发生,即使反复电复律也难以挽救其生命^[4]。AMI 模型特别是 LAD 闭塞所致的前壁 AMI 模型建立过程中发生的 VES,是限制模型建立及应用的重

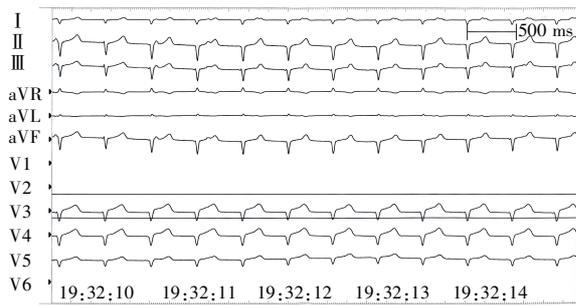


图 1 造模过程中发生的加速性室性自主心律

Figure 1 Accelerated idioventricular rhythm occurred during AMI

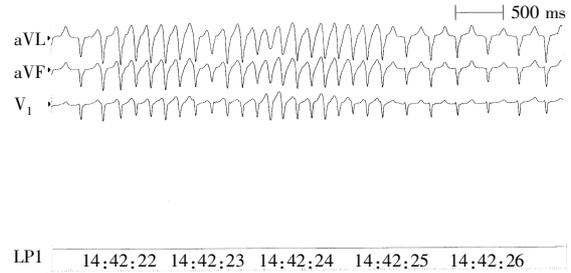


图 2 造模过程中室颤发生

Figure 2 Ventricular fibrillation occurred during AMI

表 3 各组不同时间段 VES 导致实验动物死亡情况

Table 3 VES-induced swine death in each group at different periods

组别	缺血预适应期	持续封堵期	再灌注期	合计	P 值 #
A	2/6	0/4	2/4	4/7	0.473
B	1/8	0/6	1/5	2/8	0.719
C	1/8	0/7	1/7	2/8	1.000
D	0/9	0/8	0/8	0/9	-
合计	4/31	0/25	4/24	8/32	-
P 值 #	0.329	-	0.238	0.070	-

#:似然比卡方检验。“/”前为因 VES 死亡的动物数,“/”后为动物总数。

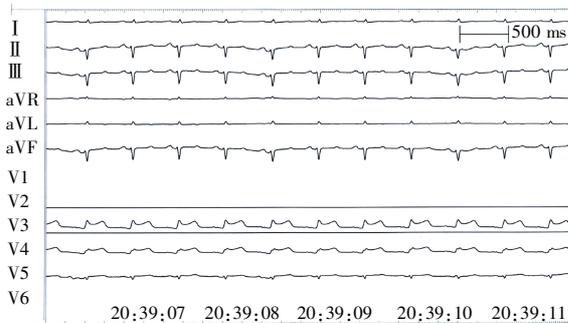


图 3 球囊封堵后心电图可见 ST 段抬高型心肌梗死发生

Figure 3 ST-segment elevation myocardial infarction after balloon occlusion by ECG



图 4 MRI 矢状面延迟增强显像提示左室前壁对比剂滞留 (白色箭头所示)

Figure 4 Contrast agent retention in left ventricular interior by MRI delayed enhanced imagine

要原因。目前 VES 病因和发病机制尚未完全明了,多数学者认为器质性心脏病、药物(多巴酚丁胺、肾上腺素、异丙肾上腺素)、电解质紊乱、除颤器置入等均有诱发电风暴发生的可能。交感神经过度兴奋、β受体反应性增高、传导系统传导异常、其他原因导致的心肌细胞电活动紊乱等是目前公认的发病机制。本研究是将健康小型猪的前降支封堵后人为造成 AMI,动物心脏缺少早期缺血预适应的过程,虽然在封堵初期已经给予 3 次缺血预适应,但仍易于发生

VES。心肌灌注不充分及梗死区域面积大时,室性心律失常发生的可能性非常大。而在梗死早期心肌缺血与灌注不均衡,心内膜和心外膜的不应期分散,形成多重折返波,同时缺血能够增加浦肯野细胞的自律性,增加自发放电,可引起室性心动过速或室颤的发生。AMI 后再灌注时心肌组织已发生结构性变化,坏死心肌组织、缺血心肌组织与正常心肌组织并存,此时心室电活动极度不稳定,极易发生 VES。同时梗死过程中交感神经过度兴奋,大量儿茶酚胺释

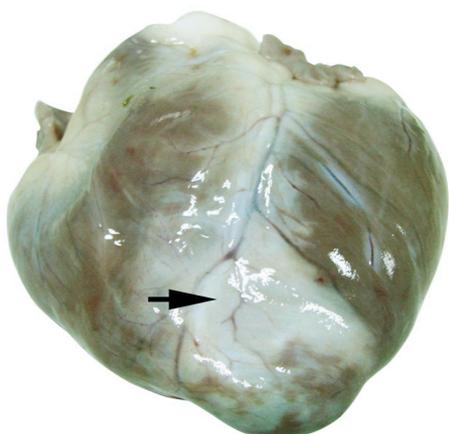


图 5 心脏大体标本显示三角区域梗死区呈灰白色(黑色箭头所示)

Figure 5 Gross specimen showed that cardiac infarct zone was gray and pale triangle area

放,儿茶酚胺浓度短期可增加100~1 000倍,细胞膜离子通道结构改变,大量的钠离子、钙离子内流,钾离子外流,从而使心室肌异常电活动增加,室颤阈值下降,复极相异常,继而引发室性心律失常,特别是恶性室性心律失常^[5-6]。而心律失常又可引起心肌及大脑的缺血,中枢交感进一步兴奋,形成恶性循环,造成VES的反复发作。

如何预防VES的发生、减少死亡率是建立猪AMI模型的关键。基于以上机制,抑制交感神经活性、降低 β 受体反应性可能是预防和减少VES发生的重要步骤。

早在1989年Riva发现在大鼠缺血前10 min或再灌注前2 min静脉注射胺碘酮,可减少缺血期间室性心律失常,减少再灌注致命性和非致命性室性心律失常。Kowey^[2]总结1996年以前的3个临床研究认为静脉注射胺碘酮可有效抑制重症患者VES的发生。多中心研究证实对于利多卡因、普鲁卡因等药物无效的顽固性VES,静脉注射胺碘酮可有效减少室颤的发生,提高24 h生存率^[7]。汤成春等^[8]早期开胸结扎法建立猪AMI模型时发现持续静脉滴注利多卡因可减少VES发生,但仍有动物发生VES导致建模失败。本课题组在封堵前降支同时静脉注射150 mg胺碘酮,9只实验动物4只出现短阵室速,无1例出现室颤。20世纪80年代初期,研究发现 β 受体阻滞剂可将实验动物的室颤阈值提高6倍。 β 受体阻滞剂抗心室颤动作用的关键是阻断了中枢 β 受体,产生中枢介导性保护作用可降低交感神经的张力,降低血浆中去甲肾上腺素水平,增

加心脏迷走神经的兴奋性。2006年ACC/AHA/ESC“室性心律失常的诊疗和心源性猝死预防指南”^[4]及临床研究表明治疗人VES的唯一有效方法就是静脉注射 β 受体阻滞剂,这在我国临床工作中也得到证实^[9-11]。本研究发现缺血预适应期、持续封堵期、再灌注期4组动物均出现室性心律失常,B、C、D3组与A组相比有减少趋势但无统计学差异($P > 0.05$);B组动物缺血预适应期即开始静脉给予胺碘酮,与A组比较虽然没有统计学差异,但无论是心律失常、VES还是死亡情况,均有下降趋势。C组动物在封堵前降支同时静脉注射美托洛尔,与A、B两组相比较虽然没有统计学差异,但抑制交感兴奋,减慢心率,减少VES的发生趋势较明显。Van Herendael等^[12]研究证实胺碘酮与 β 受体阻滞剂合用是抑制置入型心律转复除颤器放电和治疗VES最有效的药物;与之相似,本研究显示D组动物静脉联用胺碘酮与 β 受体阻滞剂可有效抑制AMI模型建立过程中VES的发生,虽然与B、C两组比较无统计学差异,但与A组比较差异明显($P = 0.005$)。相应的,各组死亡情况的比较也显示联用胺碘酮与 β 受体阻滞剂的D组死亡较A组减少,虽未达统计学差异,但趋势已明显($P = 0.070$)。同时,本研究发现,建模过程中缺血预适应期、持续封堵期及再灌注期相比较,缺血预适应期与再灌注期易于发生心律失常、VES及死亡,但与持续封堵期相比差异并不显著。

本研究显示无论是室性心律失常、VES还是死亡情况,B、C组与A组比较虽有改善趋势,但尚未显示出显著性差异,可能与样本量不够大有关。另外发现本研究动物死亡、VES发生与既往报道并不完全一致,原因可能是:①研究小组成员从未参加过本中心既往猪AMI建模过程,虽然已咨询过既往建模小组成员,但建模过程中仍在细节上出现问题,导致3只动物意外死亡(肝素过量、心包填塞、麻醉过量);②整个建模过程实验动物均为自主呼吸而非呼吸机辅助呼吸,可能会造成整个机体包括心脏的缺氧,建模时可能易于发生VES;③猪的左主干较人细小,JR4、EBU 3.5为人用指引导管,进入左主干后导致冠脉供血相对下降,血流速度相对下降,心肌组织相对缺血,甚至可能导致冠脉内血栓形成,也是造成VES易发的可能原因;④LAD封堵的位置可能偏高,封堵位置越高,造成梗死面积越大,发生VES的概率越高。

通过不同处理方法的比较,发现静脉联用胺碘酮与 β 受体阻滞剂可有效抑制AMI模型建立过程

中 VES 的发生,从而减少实验动物的死亡,提高建模成功率,为进一步研究提供良好研究基础。

[参考文献]

- [1] Reek S, Bicknell JL, Walcott GP, et al. Inducibility of sustained ventricular tachycardia in a closed-chest ovine model of myocardial infarction[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 1999, 22(4Pt1):605-614
- [2] Kowey PR. An overview of antiarrhythmic drug management of electrical storm [J]. Can J Cardiol, 1996, 12 (Suppl B):3B-8B; discussion 27B-28B
- [3] Zipes DP, Camm AJ, Borggrefe M, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: A report of the American college of cardiology/American heart association task force and the European society of cardiology committee for practice guidelines (writing committee to develop guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death): Developed in collaboration with the European heart rhythm association and the heart rhythm society[J]. Circulation, 2006, 114(10):e385-484
- [4] Suzuki M, Asano H, Tanaka H, et al. Development and evaluation of a new canine myocardial infarction model using a closed-chest injection of thrombogenic material [J]. Jpn Circ J, 1999, 63(11):900-905
- [5] Tsuji Y. Electrical storm and calcium signaling: A review [J]. J Electrocardiol, 2011, 44(6):725-729
- [6] Tsuji Y, Heijman J, Nattel S, et al. Electrical storm: Recent pathophysiological insights and therapeutic consequences [J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(2):133
- [7] Levine JH, Massumi A, Scheinman MM, et al. Intravenous amiodarone for recurrent sustained hypotensive ventricular tachyarrhythmias. Intravenous amiodarone multicenter trial group [J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 27(1):67-75
- [8] 汤成春, 马根山, 黄俊, 等. 提高开胸结扎法建立猪心肌梗死模型成功率探讨 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2009, 29(6):779-783
- [9] 丁超, 郭洁, 王冬梅, 等. 艾司洛尔治疗急性冠脉综合征心室电风暴的临床疗效 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2013, 5(4):358-359
- [10] 罗延宏. 胺碘酮联合 β 受体阻滞剂治疗恶性室性心律失常疗效观察 [J]. 河北医药, 2010, 32(22):3173-3174
- [11] 王丽英. 胺碘酮联合艾司洛尔治疗老年室性心律失常的疗效 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(2):178-179
- [12] Van Herendael H, Dorian P. Amiodarone for the treatment and prevention of ventricular fibrillation and ventricular tachycardia [J]. Vasc Health Risk Manag, 2010, 6(2):465-472

[收稿日期] 2013-12-23

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmunjmuedu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
审理情况。