

## 在体评价犬和猪冠状动脉内皮细胞的功能

柳俊<sup>1</sup>, 马虹<sup>1</sup>, 何建桂<sup>1</sup>, 靳亚非<sup>1</sup>, 刘磊<sup>2</sup>, 戴刚<sup>2</sup>, 钱月桃<sup>2</sup>, 郑振声<sup>2</sup>  
(中山大学 1. 附属第一医院内科, 2. 卫生部辅助循环重点实验室, 广东广州 510080)

**摘要:** 【目的】在体观察缺血再灌注对犬冠状动脉内皮细胞功能的影响以及猪冠状动脉对血管活性药物的反应性。【方法】动脉麻醉后开胸、心包吊床, 之后分离冠状动脉左前降支。犬作第一对角支插管, 猪作冠状动脉左回旋支插管。犬冠状动脉左前降支缺血 30 min 后再灌注 60 min, 猪不作缺血再灌注。分别向冠状动脉内注射乙酰胆碱和硝酸甘油, 以注药后平均冠状动脉血流量变化的百分率来评价冠状动脉内皮细胞依赖性和非依赖性的舒张功能。【结果】注乙酰胆碱后, 基线状态下犬平均冠状动脉血流量从  $(17 \pm 4)$  mL/min 升至  $(41 \pm 12)$  mL/min ( $P < 0.05$ ); 但缺血再灌注后舒血管反应幅度降低, 其中再灌注 15 min 时间点平均冠状动脉血流量增幅水平明显低于基线增幅水平 ( $42\% \pm 54\%$  vs  $87\% \pm 57\%$ ,  $P < 0.05$ )。注乙酰胆碱后, 基线状态下猪平均冠状动脉血流量在  $(11 \pm 3)$  s 内从  $(21 \pm 11)$  mL/min 迅速降至  $(12 \pm 8)$  mL/min, 在  $(42 \pm 10)$  s 内又回升至  $(23 \pm 13)$  mL/min。硝酸甘油使基线状态下犬平均冠状动脉血流量从  $(18 \pm 5)$  mL/min 升至  $(40 \pm 22)$  mL/min ( $P < 0.05$ )。猪的冠状动脉也呈类似反应。【结论】乙酰胆碱引起犬冠状动脉呈舒血管反应, 缺血再灌注使犬冠状动脉内皮细胞功能明显受损。猪冠状动脉对乙酰胆碱呈先收缩后舒张的“双向反应”。硝酸甘油则引起犬或猪的冠状动脉均呈舒张反应。

关键词: 内皮; 血管; 冠状动脉疾病; 再灌注损伤; 犬科; 猪

中图分类号: R329.3-33; R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-0408-05

## Evaluation of Coronary Endothelial Function of Canines and Porcins *in Vivo*

LIU Jun, MA Hong, HE Jian-gui, JIN Ya-fei, LIU Lei, DAI Gang, QIAN Yue-tao, ZHENG Zhen-sheng  
(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital and Key Lab of Health on Assisted Circulation, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To observe the effect of ischemia and reperfusion on coronary endothelial function in canines and reactivity of porcine coronary arteries to vasomotors *in vivo*. 【Methods】After being anaesthetized, animals were performed thoracotomy and pericardial cradle, then the left anterior descending arteries (LADs) were dissected free from the adjacent tissues. The first diagonal branches of LADs in canines and the left circumflex arteries in porcins were catheterized. Canines but not porcins were subjected to 30 minutes of regional ischemia of LAD followed by 60 minutes of reperfusion. Percentage change from baseline LAD flow after acetylcholine and nitroglycerin injection were used to evaluate endothelial-dependent and -independent relaxant function of coronary arteries respectively. 【Results】Acetylcholine made baseline average LAD flow in canines increase from  $(17 \pm 4)$  mL/min to  $(41 \pm 12)$  mL/min ( $P < 0.05$ ), but these responses were blunted after ischemia and reperfusion injury. Percentage increases of average LAD flow at 15 minutes during reperfusion

收稿日期: 2003-06-17

基金项目: 国家“十五”攻关课题分题基金资助项目 (2001BA706B07), 2003 年度广东省科技计划基金资助项目 (2003C30610)

作者简介: 柳俊 (1965 - ), 男, 湖南长沙人, 博士, 副主任医师. E-mail: LiuJun.cliff@163.net

were markedly less than that before ischemia ( $142 \pm 54\%$  vs  $87 \pm 57\%$ ,  $P < 0.05$ ). In porcines, the baseline average LAD flow decreased quickly from  $(21 \pm 11)$  mL/min to  $(12 \pm 8)$  mL/min at  $(11 \pm 3)$  s after acetylcholine infusion, which followed by an increase to  $(23 \pm 13)$  mL/min at  $(42 \pm 10)$  s. However, nitroglycerin induced LADs relaxant showing baseline average LAD flow in canines increased from  $(18 \pm 5)$  mL/min to  $(40 \pm 22)$  mL/min ( $P < 0.05$ ). Similar reactivity happened in porcines as well. **【Conclusion】** Acetylcholine induced LADs in canines relaxant, which was blunted after ischemia and reperfusion implying coronary endothelial dysfunction significantly. In LADs of porcines, acetylcholine infusion evoked a biphasic response consisting of constriction followed by vasodilation. However, nitroglycerin induced LADs relaxant both in canines and porcines.

**Key words:** endothelial cell ; coronary artery disease ; ischemia and reperfusion injury ; canine ; porcine

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5)408 - 412]

有关心肌缺血再灌注损伤的研究由来已久,但在该种病理生理过程中,冠状动脉(以下简称冠脉)的结构和功能才是直接影响心肌结构和功能的重要部分,至今只有为数不多的研究是针对缺血再灌注影响冠脉内皮细胞功能和冠脉血管反应性<sup>[1,2]</sup>的。我室有关辅助循环对心肌缺血、失血性休克、心肺复苏等效应机制的基础系列研究中,犬一直被作为主要的实验动物;因为猪这一种属与临床更为接近,故近年来猪也逐渐成为了研究内皮细胞功能障碍的主要实验用动物<sup>[3]</sup>。为进一步研究辅助循环对在体动脉内皮细胞功能的影响打好基础,本文在成功建立在体评价冠脉内皮细胞功能的动物实验模型基础上,观察了缺血再灌注对犬冠脉内皮功能的影响,同时还观察了基础状态下猪冠脉对血管活性药物的反应性,现将资料报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物选择

健康成年杂种犬 12 条,性别不拘,体质量 20 ~ 25 kg,购自中山大学中山医学院实验动物中心。新生同窝雄性猪 3 月龄,体质量 27 ~ 32 kg,共 6 只,购自广东农业科技研究所实验动物中心。

### 1.2 缺血再灌注对犬冠脉左前降支内皮细胞形态和功能的影响

犬被麻醉后经会厌直接气管插管,机械呼吸。分离双侧颈动脉和右侧颈静脉,穿刺右颈动脉用于记录主动脉压,穿刺右颈静脉用于抽取血标本或输液。自左第 5 肋间暴露心脏和大血管,作心包吊床,小心游离长约 1.5 ~ 2 cm 的冠脉左前降支,勾挂直

径为 2.0 mm 的磁流量探头以测量平均冠脉血流量;用相同方法(磁流量探头直径为 4 mm)同步记录左颈动脉平均血流量。成功穿刺第一对角支后,将套针送至冠脉左前降支主干以注射血管活性药物乙酰胆碱和硝酸甘油。所有导管的位置均被固定直至实验结束时为止。

各项操作完成后让犬至少稳定 15 ~ 30 min,然后用无损伤止血钳钳夹犬冠脉左前降支 30 min,再灌注 60 min。分别于缺血前,再灌注 15 min、30 min 和 60 min 时向犬冠脉左前降支主干中输注乙酰胆碱 10  $\mu$ g/0.2 mL 或硝酸甘油 15  $\mu$ g/0.2 mL 达 10 s 以上,两药注射相隔至少在 5 min 以上。以注药后最大平均冠脉血流量增加的百分率来判别冠脉的舒张功能。同步记录缺血前和再灌注后各时点注射乙酰胆碱和硝酸甘油后的平均心率、主动脉压、颈动脉血流量和冠脉血流量。出现再灌注心律失常时按常规处理,动脉血压降低者予多巴胺和阿拉明静滴,尽量使平均动脉压达到缺血前水平。

实验结束后,用 10 g/L 氯化钾快速静脉注射处死实验犬。离断心脏置于冰块上,按电镜检查要求取材,将冠脉左前降支/左回旋支主干和其下游 2 ~ 3 级小冠脉分支分别送透视和扫描电镜检查。

### 1.3 猪冠脉左前降支对血管活性药物的反应性

猪被麻醉后必需作气管切开才能机械通气,需要穿刺冠脉左回旋支才能建立注药途径,其余实验步骤与犬的一致。本研究中未做猪冠脉缺血再灌注损伤实验,仅观察了基础状态下猪冠脉左前降支对乙酰胆碱和硝酸甘油的反应性。

### 1.4 统计学处理

采用方差分析。统计软件采用 SPSS 10.0。

## 2 结果

### 2.1 犬平均心率、动脉压和颈动脉血流量的变化

整个实验过程中 4 个时间点的平均心率、动脉压和颈动脉血流量的变化均无显著性差异,见表 1。每一时间点注乙酰胆碱和硝酸甘油前后平均心率、动脉压和颈动脉血流量的变化差异无显著性(资料未列出)( $P > 0.05$ )。

表 1 实验过程中犬平均心率、颈动脉血流量和动脉压的变化

Table 1 The changes of average heart rate, carotid flow, and aortic pressure in canines during experiment

The time of ischemia and reperfusion	Observed index		
	Heart rate (min <sup>-1</sup> )	Carotid flow (mL/min)	Aortic pressure (mmHg)
Before ischemia	158 ± 21	185 ± 38	96 ± 21
Reperfusion 15 min	153 ± 24	179 ± 28	95 ± 20
Reperfusion 30 min	157 ± 23	181 ± 17	100 ± 16
Reperfusion 60 min	154 ± 25	181 ± 14	97 ± 16

$P > 0.05$

### 2.2 犬冠脉左前降支急性缺血再灌注前后对乙酰胆碱和硝酸甘油的反应性

注乙酰胆碱或硝酸甘油后,犬冠脉左前降支均呈舒血管反应,见图 1。整个实验过程中基础状态下平均冠脉血流量无显著性变化( $P > 0.05$ ),但缺血再灌注后 3 个时间点注血管活性药物后平均冠脉血流量降低,其中再灌注 60 min 点注乙酰胆碱和硝酸甘油后的平均冠脉血流量比缺血前注药后的水平低,差异有显著性( $P < 0.05$ ),见表 2。若将每一时间点注乙酰胆碱后平均冠脉血流量变化换算成血流量增加百分率,结果再灌注 15 min 时间点的增幅水平明显低于缺血前的增幅水平( $142\% \pm 54\%$  vs  $87\% \pm 57\%$ ,  $P < 0.05$ );余时间点冠脉血流量增幅水平的降低幅度差异无显著性( $P > 0.05$ ),见表 3。注硝酸甘油后冠脉血流量变化规律基本上与注乙酰胆碱后冠脉血流量变化规律相似。

### 2.3 犬冠脉和分支在电镜下的表现

10 例冠脉左前降支主干透视电镜结果显示,内皮细胞细胞凋亡或细胞溶解 7 例,内皮细胞完全脱落 3 例,见图 2;5 例冠脉左回旋支的内膜面基本正常。6 例冠脉左前降支主干下游小冠脉分支透视

电镜结果显示,内皮细胞明显肿胀,部分可见白细胞附着,见图 3。3 例冠脉左回旋支小冠脉分支的内膜其内皮细胞基本正常。

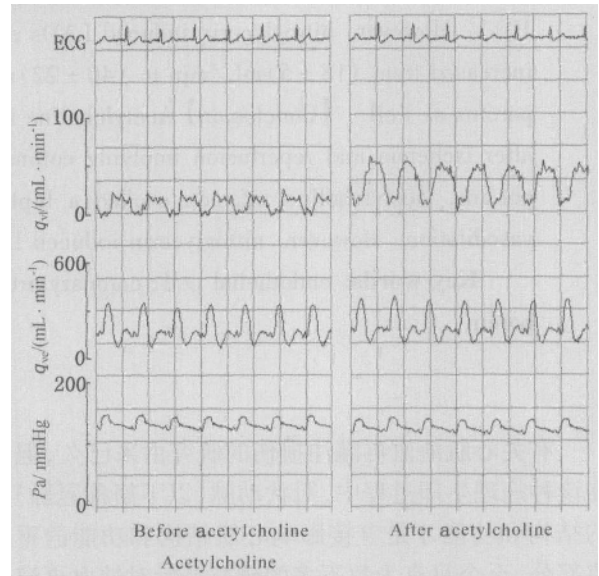


图 1 注射乙酰胆碱前、后犬平均冠脉血流量变化

Fig. 1 The changes of average LAD flow in a canine before and after acetylcholine infusion

It showed the LAD flow increased after acetylcholine infusion;  $q_a$ : LAD flow volume;  $q_w$ : Carotid flow volume;  $P_a$ : Aortic pressure

表 2 注血管活性药物前后犬平均冠脉血流量

Table 2 The changes of average LAD flow in canines before and after vasomotor drugs infusion mL/min

The time of ischemia and reperfusion	Vasomotor drugs infusion			
	Before ACh	After ACh	Before NG	After NG
Before ischemia	17 ± 4	41 ± 12	18 ± 5	40 ± 22
Reperfusion 15 min	18 ± 8	33 ± 15	18 ± 8	30 ± 17
Reperfusion 30 min	17 ± 6	35 ± 15	17 ± 5	33 ± 12
Reperfusion 60 min	16 ± 5	31 ± 7 <sup>1)</sup>	17 ± 5	27 ± 9 <sup>1)</sup>

ACh: acetylcholine; NG: nitroglycerin

1) Compared with LAD flow after vasomotor drugs infusion before ischemia,  $P < 0.05$

表 3 注血管活性药物前后犬平均冠脉血流量增幅

Table 3 The percentage increases of average LAD flow in canines before and after vasomotor drugs infusion %

The time of ischemia and reperfusion	Vasomotor drugs infusion	
	After ACh	After NG
Before ischemia	142 ± 54	111 ± 70
Reperfusion 15 min	87 ± 57 <sup>1)</sup>	73 ± 74 <sup>1)</sup>
Reperfusion 30 min	117 ± 62	103 ± 68
Reperfusion 60 min	101 ± 48	73 ± 54

1) Compared with the percent increases of average LAD flow before vasomotor drugs infusion,  $P < 0.05$



图 2 1 例犬 LAD 主干内膜透射电镜下的改变

Fig.2 Changes of LAD intima in a canine under scenographic electron microscopy (×6 000)

Endothelial cell injury with complete detachment from the underlying sub-endothelium

### 2.4 猪基础状态下冠脉左前降支对乙酰胆碱和硝酸甘油的反应性

与犬明显不同的是,乙酰胆碱触发猪的冠脉左前降支呈先收缩后舒张的“双相反向”。表现为注乙

酰胆碱后左前降支血流量在一定时间内(达谷时间)迅速降低,继之呈持续的舒血管反应,冠脉左前降支血流量达峰值(达峰时间)后逐渐回降,见表 4 和图 4。注硝酸甘油后,冠脉左前降支仍呈舒血管反应。

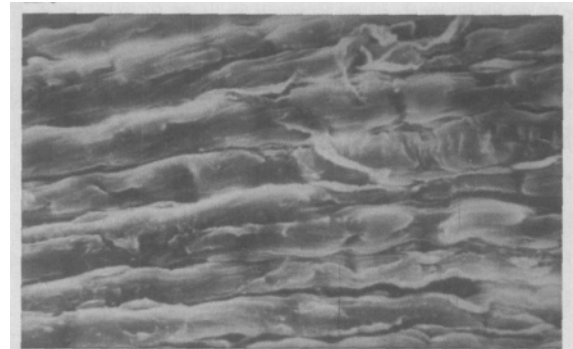


图 3 1 例犬 LAD 主干下游小冠脉内膜扫描电镜下的改变

Fig.3 Changes of arteriole intima in a canine under scanning electron microscopy (×1 000)

Endothelial cells swelling and shape changed

表 4 注乙酰胆碱猪的主要血流动力学参数变化

Table 4 The changes of hemodynamic indexes in porcines after acetylcholine infusion

Observed indexes	Time from ACh infusion (s)	Heart rate (min <sup>-1</sup> )	Aortic pressure (mmHg)	Average LAD flow (mL/min)	Peak LAD flow (mL/min)
Basic level		127 ± 25	92 ± 22	21 ± 11	28 ± 16
LAD constriction	The time to tip	12 ± 3			
	Measure for index	128 ± 26	80 ± 16	12 ± 8 <sup>1)</sup>	16 ± 10 <sup>1)</sup>
LAD dilation	The time to tip	42 ± 10			
	Measure for index	117 ± 15	71 ± 8 <sup>1)</sup>	23 ± 13 <sup>2)</sup>	33 ± 20 <sup>2)</sup>
Duration of response of ACh	> 156 ± 84				

1) Compared with the basic level, P < 0.05; 2) Compared with the level measured at LAD constriction, P < 0.05

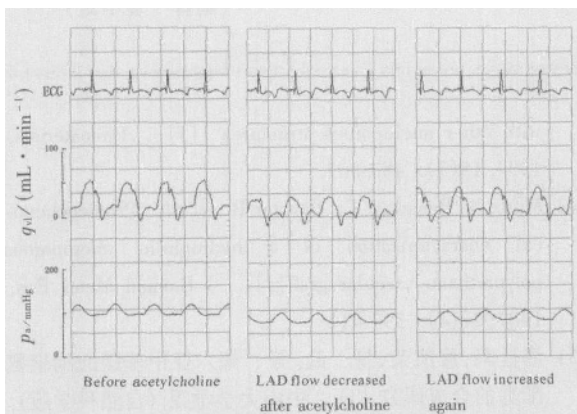


图 4 注乙酰胆碱前、后猪平均冠脉血流量的动态改变

Fig.4 The changes of average LAD flow in a porcine before and after acetylcholine infusion

## 3 讨 论

血管具有内皮细胞依赖性和内皮细胞非依赖

性的舒张反应,其中内皮细胞依赖性的舒血管反应性是目前基础和临床研究中评价内皮细胞功能的“经典”指标。本研究中,犬于心脏缺血再灌注后,乙酰胆碱引起冠脉左前降支的舒血管反应降低,透视和扫描电镜均提示冠脉内皮细胞有损伤。与常用离体犬冠脉血管环所作的实验结果不同的是,本研究中注硝酸甘油后冠脉血流量增加的幅度同样也有降低,表明内皮细胞非依赖性的舒张功能同样也受到损伤,这可能与缺血再灌注引起冠脉微循环中阻力血管张力增高、血管内血栓形成或白细胞停滞、内皮细胞肿胀或心肌肿胀引起外在性压力导致微血管梗阻等因素有关<sup>[4,5]</sup>。犬是常被用作在体研究与内皮细胞功能有关的冠脉血流动力学问题的动物种属,我室对体外反搏提高血流剪切应力所带来的效应机制进行了系列研究<sup>[6]</sup>,本实验所做的工作为本室进一步评价体外反搏是否具有逆转冠脉内

皮细胞功能障碍的效果奠定了必要的实验基础。

本实验还发现猪与犬的冠脉对乙酰胆碱的反应性显著不同,表现为猪冠脉左前降支对注入的乙酰胆碱呈先收缩后舒张的“双向反应”。这种反应是乙酰胆碱迅速直接作用于血管平滑肌使其收缩,尔后很快便被内皮细胞释放的一氧化氮引起血管平滑肌舒张所致,前者是内皮细胞非依赖性的,后者是内皮细胞依赖性的。Lockowandt 等<sup>[7]</sup>认为,猪冠脉对乙酰胆碱表现出“双向反应”中的舒血管部分才是评价猪冠脉内皮细胞功能有无受损的重点部分,即使是行缺血再灌注损伤实验时也是如此,应引起注意。猪和犬的冠脉对乙酰胆碱的反应性不同是因动物种属不同所致<sup>[7,8]</sup>。

在犬和猪这两种活体动物身上作类似实验研究过程中我们还发现:①犬经会厌行直接气管插管相当容易,而猪通常需要作气管切开才能插管接人工机械呼吸机,因为猪麻醉后会厌紧闭气管开口处;②开胸手术时犬取右侧卧位;而猪往往要取稍向右倾的仰卧位同时要咬断左侧第 5 肋骨才能充分暴露心脏;③犬的心率常在 150/min 或以上,冠脉粗大显露好,逆第一对角支插管相对容易,但手术游离冠脉时易出血;而猪的心率常在 120/min 或以下,冠脉细小且显露不佳,手术游离冠脉时易发生收缩反应,往往需要作冠脉左旋支插管作为注药管。推测这些差异可能与这两种动物平常生活习性不同有关。掌握这些特点,在实验中便能做到的放矢,缩短手术所需时间,减少不必要的动物死亡。

参考文献:

- [1] Kim Y D, Chen B, Beauregard J, et al. 17-Estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion[J]. *Circulation*, 1996, 94 (1): 2901-8.
- [2] Martorana P A, Ruetten H, Goebel B, et al. Ramiprilat prevents the development of acute coronary endothelial dysfunction in the dog[J]. *Basic Res Cardiol*, 1999, 94 (4): 238-45.
- [3] Verdouw P D, van den Doel M A, de Zeeuw S, et al. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes[J]. *Cardiovascular Research*, 1998, 39 (1): 121-35.
- [4] Gavin J B, Maxwell L, Edgar S G. Microvascular involvement in cardiac pathology[J]. *J Mol Coll Cardiol*, 1998, 30 (12): 2531-40.
- [5] Reffelmann T, Kloner R A. "No-reflow" phenomenon: basic science and clinical correlates[J]. *Heart*, 2002, 87 (2): 162-8.
- [6] 伍贵富, 刘磊, 郑振声, 等. 清醒犬慢性体外反搏实验方法的建立和评价[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22 (2): 93-6.
- [7] Lockowandt U, Liska J, Franco-Cereceda A. Short ischemia causes endothelial dysfunction in porcine coronary vessels in an *in vivo* model[J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71 (1): 265-9.
- [8] Hashimoto M, Ishida Y, Sakuma I, et al. Notes on the acetylcholine-induced relaxation of porcine coronary arteries[J]. *Life Sci*, 1994, 54 (8): 525-31.

(编辑 黄小延)

(上接第 407 页 from page 407)

人工血管径向顺应性研究和临床应用提供了一个新的工具。

参考文献:

- [1] Zidi M, Cheref M. Mechanical analysis of a prototype of small diameter vascular prosthesis: numerical simulations [J]. *Comput Biol Med*, 2003, 33(1): 65-75.
- [2] Hsu S H, Helen K. On matching compliance between canine carotid arteries and polyurethane graft [J]. *Artificial Organs*, 1997, 21(12): 1247-54.
- [3] Zhang Z, King M W, Guidoin R, et al. Morphological physical and chemical evaluation of the vascugraft arterial prosthesis: comparison of a novel polyurethane device

with other microporous structures [J]. *Biomaterials*, 1994, 15(7): 483-501.

- [4] Martz H, Beaudoin G, Paynter R, et al. Physicochemical characterization of a hydrophilic microporous polyurethane vascular graft[J]. *J Biomed Mater Res*, 1987, 21(4): 399-412.
- [5] 潘仕荣, 廖凯荣, 易武, 等. 聚六亚甲基碳酸酯聚氨酯脲的合成研究 [J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2003, 42(4): 34-7.
- [6] Seifalian A M, Salacinski H J, Tiwari A, et al. *in vivo* biostability of a poly(carbonate-urea) urethane graft[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(14): 2549-57.

(编辑 黄小延)