

# 长期体外反搏对犬急性心肌梗死心肌侧支循环的影响

伍贵富, 杜志民, 胡承恒, 梁宏, 郑振声, 马虹

(中山大学附属第一医院心内科, 广东广州 510080)

**摘要:** 【目的】探讨长期体外反搏对冠脉侧支循环的影响及其功能意义。【方法】雄性 Beagle 犬 12 只被随机等量分入对照组和反搏组。心导管法建立定向冠脉闭塞模型。反搏组每日反搏 1 h, 持续 6 周。定量冠脉造影比较两组犬的冠脉侧支循环, 抗  $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin)抗体和抗 VIII 因子相关抗原(F VIII-rAg)抗体免疫组化法标记心血管平滑肌细胞和血管内皮细胞。 $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  核素心肌扫描检测心肌血流灌注。心室造影评价心室射血功能和心室壁运动能力。【结果】①反搏组犬有 5 例, 对照组有 3 例, 可见闭塞血管远端出现程度不等的侧支循环, 反搏组犬侧支血管开放密度比对照组大。6 周后, 反搏组缺血心肌内,  $\alpha$ -actin 染色, F VIII-rAg 染色标记的微血管, 数量显著高于对照组。 $\alpha$ -actin 免疫染色发现, 反搏组犬的缺血心肌组织内, 许多口径不同的微血管分布于心肌纤维之间, 数量明显多于对照组犬; 可见许多 F VIII-rAg 染色阳性细胞; 血管内皮形态不一; 许多血管仅由单个内皮细胞构成。②反搏组犬经过 28~30 h 的反搏治疗, 其左心功能明显改善, 左室射血分数(LVEF)从  $0.38 \pm 0.07$  增至  $0.52 \pm 0.15$  ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ ), 反映心室壁运动的 Cortina 计分从  $14.4 \pm 3.5$  下降至  $9.1 \pm 2.8$  ( $n=6$ ,  $P < 0.05$ )。对照组犬的心功能和心室壁局部运动能力都没有明显改善, LVEF 值略有下降。③比较两组心肌放射性缺损分数(DS)6 周后的变化率, 反搏组下降了  $1.5\% \pm 0.4\%$ , 对照组增加了  $1.7\% \pm 0.6\%$  ( $P < 0.05$ )。【结论】长期体外反搏能促进侧支循环的形成并最终发育成熟, 使心肌的结构和功能获得保护。

**关键词:** 反搏术; 冠状动脉闭塞; 侧支循环; 心室功能; 犬

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)06-0411-03

## Effects of Long-term External Counterpulsation on Coronary Collaterals in Dogs with Acute Coronary Occlusion

WU Gui-fu, DU Zhi-min, HU Cheng-heng, LIANG Hong, ZHENG Zhen-sheng, MA Hong. (Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract** 【Objective】To explore the effect of long-term EECP on coronary collaterals and angiogenesis and its physiological roles in canine model with acute coronary occlusion 【Methods】Twelve male Beagle dogs were randomly allocated to EECP ( $n=6$ ) and control group ( $n=6$ ). Experimental coronary occlusion was developed with catheterization for all animals. EECP was given 1h/d 28~30 h totally for each dog in EECP group in 6 weeks. The selective coronary angiography was performed for evaluation of coronary collaterals. For the purpose of full visualization and understanding of coronary angiogenesis, the vascular endothelial cells and smooth muscle cells were specifically stained and labeled by anti-Factor VIII-related antigen and anti- $\alpha$ -actin respectively. Myocardial perfusion was measured by  $^{99m}\text{Tc-MIBI}$  SPECT scanning 【Result】①After 6 weeks repeated angiography demonstrated that 5 dogs in EECP and 3 dogs in control group showed coronary collaterals to a certain extent. After EECP there were more microvessels in infarct region than in the control by immunohistochemical analysis with Factor VIII-related antigen and  $\alpha$ -actin staining. The numbers of microvessels per high-power field significantly increased in the EECP group compared to the control. These vessels were morphologically indistinguishable from the normal myocardium and most of them were 5 to  $10\mu\text{m}$  in diameter and were believed to be at various stages of angiogenic development. ②After long-term EECP, LVEF improved significantly ( $0.52 \pm 0.15$  vs  $0.38 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ) and Cortina scores decreased from  $14.4 \pm 3.5$  to  $9.1 \pm 2.8$  ( $P < 0.05$ ) in EECP group. There were no obvious changes observed in control dogs. ③Myocardial perfusion measure was significantly improved in 5 of six canines with the mean defect scores(DS) decreased by  $1.5\% \pm 0.4\%$ , while only one of the six in the control group presenting a slight amelioration and the mean DS had an increase of  $1.7\% \pm 0.6\%$ . 【Conclusion】Long-term external counterpulsation may promote the development of coronary collaterals and angiogenesis in experimental coronary occlusion, thereby, improve myocardial function by restoration of coronary perfusion flow to a certain extent.

**Key words:** counterpulsation; coronary occlusion; collateral circulation; ventricular function; dog

既往的一些急性动物实验证实, 体外反搏治疗后, 心肌缺血犬的心功能有明显的改善, 表现为心

收稿日期: 2001-10-29

基金项目: 国家“九五攻关”基金资助项目(96-906-02-12); 中美辅助循环研究基金资助项目(040)

作者简介: 伍贵富(1963-), 男, 四川资阳人, 博士, 讲师; 郑振声, 导师, 卫生部辅助循环重点实验室。

输出量增加和左室舒张末压(LVEDP)降低和心肌收缩能力加强,其作用机制可能与反搏增加冠脉灌注血流,缩小心肌梗死范围,遏制氧自由基对心肌细胞的损伤和降低脂质过氧化反应等有关<sup>[1]</sup>。急性冠状动脉闭塞后长期接受体外反搏治疗的实验动物,其冠脉侧支循环的改变及其功能意义如何,迄今没有报道。本文利用比格犬(Beagle)慢性体外反搏动物实验模型,研究长期体外反搏后冠脉侧支循环和新生血管形成的改变,并考查其功能意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

X线心血管造影及数字处理系统(PHILIPS), SPECT(GA-7200/DI, Toshiba), Kontron IBAS 2.0全自动图像分析及分析软件,<sup>99m</sup>Tc-MIBI, 小鼠抗 $\alpha$ -actin和兔抗VIII因子相关抗原(F VIII-r-Ag)单克隆抗体。

### 1.2 建模与反搏

雄性Beagle犬12只,年龄8个月至1岁。采用心导管术建立急性冠脉闭塞动物模型<sup>[2]</sup>。模型稳定3d后,12只犬被随机分入体外反搏组和对照组,每组6只,体质量分别为(14.0 $\pm$ 3.5)kg和(14.3 $\pm$ 2.6)kg。按作者以前建立的慢性体外反搏动物实验方法反搏<sup>[3]</sup>,总时间约28~30h,两组动物的观察期均为6周。

### 1.3 冠脉造影

选择性冠脉造影比较治疗前后两组动物侧支循环形成的情况。

### 1.4 心肌微血管和侧支循环的观查

实验第6周结束时,快速静脉推注100g/L KCl 20mL处死动物。开胸摘取心脏,分别在冠脉内栓子的远端和近端区域切取缺血/梗死和正常心肌组织,石蜡包埋,切片(片厚4 $\mu$ m)。分别采用抗 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actin)抗体和抗VIII因子相关抗原(F VIII-r-Ag)抗体标记血管平滑肌细胞和血管内皮细胞,并在低倍和高倍显微镜下观察不同视野中反搏组和对照组犬缺血心肌组织 $\alpha$ -actin和F VIII-r-Ag免疫染色阳性细胞的分布及范围,同时观察 $\alpha$ -actin和F VIII-r-Ag免疫染色的阳性区域。凡着色呈环状结构并有一中心腔存在的区域视为一条微血管,计算5个高倍视野(200 $\times$ )内微血管数目的均值(支/高倍视野)。

### 1.5 左心功能及左室壁局部运动能力的测定

每只犬达实验终点时均接受左心室造影,造影

参数与第一次造影时相同。由专人对造影资料进行自动分析,分别计算左室射血分数(LVEF)和Cortina评分(反映左室壁各节段运动能力)。

### 1.6 <sup>99m</sup>锝心肌断层显像(<sup>99m</sup>Tc-MIBI)

每只犬在急性冠脉闭塞模型建立成功后第4~6天,以及第6周结束进行<sup>99m</sup>Tc-MIBI心肌断层扫描。在静脉注射<sup>99m</sup>Tc-MIBI(剂量7.4MBq即20mCi)之前3h,先给实验犬喂饲纯牛奶400mL。心肌扫描过程中仍用30g/L戊巴比妥钠1mL/kg经腹腔内麻醉。每6mm采集一幅心肌断层图像,共采图30幅。计算心肌总体积( $V_t$ )和放射性缺损的体积( $V_d$ ),以缺损分数(defect scores,  $DS = V_d / V_t \times 100\%$ )判断心肌缺血的程度。

### 1.7 统计分析

计量资料的描述为 $\bar{x} \pm s$ ,心肌微血管数目比较和反映心室壁运动能力的Cortina计分均采用Mann-Whitney秩和检验,以 $\alpha$ (单侧)=0.05判断统计学显著性。统计软件为SPSS9.0/Win95。

## 2 结果

### 2.1 冠状侧支循环和心肌微血管的观察

冠脉造影发现,反搏组犬中有5例,对照组有3例出现侧支循环供应闭塞远端血管。但反搏组犬侧支血管开放的数量比对照组丰富。组织病理学观察显示,反搏犬在经过28~30h的体外反搏治疗后,在其缺血心肌组织内,无论是 $\alpha$ -actin染色还是F VIII-r-Ag染色标记微血管,微血管的数量都显著高于对照组( $\alpha$ -actin: 11.8 $\pm$ 5.3支/高倍视野 vs 3.4 $\pm$ 1.2支/高倍视野,  $P < 0.05$ ; F VIII-r-Ag: 15.2 $\pm$ 6.3支/高倍视野 vs 4.9 $\pm$ 2.1支/高倍视野,  $P < 0.05$ )。

### 2.2 心脏功能的观察

冠脉内栓子植入致冠脉闭塞后30min,两组犬左心室心肌收缩能力明显减弱。至第6周实验结束时,体外反搏组犬经过约28~30h的反搏治疗,其左心功能明显改善,LVEF从0.38 $\pm$ 0.07增至0.52 $\pm$ 0.15( $n=6$ ,  $P < 0.05$ ),反映心室壁运动的Cortina计分从14.4 $\pm$ 3.5下降至9.1 $\pm$ 2.8( $n=6$ ,  $P < 0.05$ )。与此同时,对照组犬的心功能则没有明显改善的趋势,甚至LVEF值略有下降(0.35 $\pm$ 0.07 vs 0.33 $\pm$ 0.05,  $P > 0.05$ ),其Cortina积分前后变化不大(13.8 $\pm$ 4.1 vs 12.7 $\pm$ 3.8,  $P > 0.05$ )。

### 2.3 <sup>99m</sup>锝心肌断层显像(<sup>99m</sup>Tc-MIBI)

实验结束时,反搏组犬中有5例心肌缺血明显

改善,而对照组犬心肌缺血有改善者仅1例。比较反搏组对对照组心肌治疗前后放射性缺损分数的变化率,结果反搏组犬在6周后,其 $DS$ 值下降了 $1.5\% \pm 0.4\%$ ,而对照组则增加了 $1.7\% \pm 0.6\%$ ,两组比较 $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

现代心肌组织病理学研究证实,心肌梗死灶的边缘,甚至梗死的中心区域内,仍会有部分处于存活状态的心肌;该部分心肌的结构和功能的损害是否可以逆转,取决于心肌血流再灌注开始的时间以及侧支循环代偿的程度<sup>[4,9]</sup>。对于心肌梗死的慢性期仍需尽量恢复血流供应,其中侧支血管的形成、开放及其数量是影响病人受累心肌组织病理转归和临床预后的重要因素<sup>[9]</sup>。体外反搏治疗尤其对缺血心肌大有裨益。一方面,由于心肌血供约80%发生于舒张期,舒张压升高以后,冠脉灌注压增加,心肌血液增多,因此心肌缺血、缺氧的状态得到改善;另一方面,收缩压下降减轻了心室的射血阻抗,心肌耗能耗氧减少,代谢改善,从而有利于心肌功能的恢复,提高心输出量。

早在70年代,Watson等<sup>[7]</sup>用核素 $^{141}\text{Cs}$ 静脉注射,观察到体外反搏可使犬实验性心肌梗死区的侧支区血流增加29%。结扎犬左冠脉前降支30 min后连续反搏6 h,可使缺血心肌区域单位面积的毛细血管数目和管径明显增加。Huang等在急性犬心肌梗死区内3个取材部位(心内膜、肌层、心外膜)的毛细血管密度均显著大于对照组,并且发现反搏组的毛细血管间吻合丰富,而对照组心肌的毛细血管间吻合较稀少,但该实验的反搏总时间也仅为140 min。本实验中,犬接受体外反搏的总时间长达28~30 h,比较接近临床体外反搏的常用治疗方案。免疫组化染色及图像分析均证实,反搏组微血管的数量显著多于对照组。

长期体外反搏促进冠状动脉侧支循环形成和开放的机制,可能与下列因素有关:①体外反搏促进动脉舒张压的升高,在心肌缺血、缺氧状态得到改善的同时,冠脉压力梯度增加。②体外反搏显著增加了血流量和血流速度,并对血管内膜形成增强的血流切应力,有利于侧支血管的生长。③体外反搏促进了侧支血管和侧支循环的维持,因为血流形成的机械力(含切应力)对形成中的侧支血管起铸型作用,使增生的血管内皮细胞和平滑肌细胞按照

血管的形状和结构排列<sup>[9]</sup>。侧支血管的形成有赖于足够的血流刺激,血流量增大,则血管腔扩大<sup>[9,10]</sup>。有研究认为,无论循环中的生长因子的水平如何,动脉内血流的状态在很大程度上决定了血管内皮细胞的命运。换言之,血流切应力降低,则意味着血管内皮的凋亡和衰退<sup>[10]</sup>。④反搏过程中形成的高脉动血流对血管内皮细胞产生了较高的剪切应力,通过复杂的生物力学信号转导,使内皮细胞分泌、释放多种血管生物活性因子,如血管内皮生长因子(VEGF),可促进内皮细胞和平滑肌细胞的增值,促进新生血管的形成(另文发表)。

总之,体外反搏治疗形成的脉动血流,不仅改善了心肌的缺血、缺氧状态,增加了冠脉间的压力梯度,同时也增加了侧支血管内的血流,在整个侧支血管和侧支循环的形成过程中,长达30 h左右的反搏治疗,不仅能促进侧支循环的形成和开放,更有利于侧支血管的维持并最终发育成熟为具有功能意义的血流代偿通道,使心肌的结构和功能获得一定程度的保护。

(感谢卫生部辅助循环实验室方典秋、钱月桃、伍富军、戴刚等老师的大力协助)

#### 参考文献:

- [1] 吴坤莹,赵克森,姜勇,等. 体外反搏对休克犬血中SOD和MDA的影响[J]. 中华创伤杂志, 1994, 10(1): 7.
- [2] WU G F, Du Z M, Hu C H, et al. A novel catheter-based canine model of coronary occlusion in Beagle dogs[J]. Chinese Medical J (English version), 2000, 113(suppl): 78.
- [3] 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): 92.
- [4] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 630.
- [5] Piro F R, di-Gioia C R, Gallo P. Is apoptosis a diagnostic marker of acute myocardial infarction? [J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(6): 827.
- [6] James T N. Apoptosis in cardiac disease[J]. Am J Med, 1999, 107(6): 606.
- [7] Watson J T, Platt M R, Rogers D E. Similarities in coronary flow between external counterpulsation and intra-aortic balloon pumping[J]. Am J Physiol, 1976, 230(6): 1616.
- [8] Pries A R, Secomb T W. Design principles of vascular beds[J]. Circ Res, 1995, 77(5): 1017.
- [9] Skalak T C, Price R J. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling[J]. Microcirculation, 1996, 3: 143.
- [10] Zanins C K, Zatina M A. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis[J]. J Vasc Surg, 1987, 5(4): 413.

(编辑 刘清海)