

网络出版时间: 2017-7-20 23:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170720.2354.031.html>

◇技术与方法◇

小型猪非体外循环冠状动脉旁路移植模型的建立

郑远彪¹, 张锐¹, 韦俊², 彭素云³, 许盼盼³, 葛建军¹

摘要 选取 12 头巴马小型猪, 取下 10~15 cm 自体大隐静脉, 远心端与主动脉端侧吻合, 近心端与冠脉前降支中远段端侧吻合, 存活 4 周, 观察术中血流动力学及内环境的稳定性, 观察术后 4 周的静脉桥内膜、中膜增生情况。12 头小型猪经过试验后有 11 头存活, 术中血流动力学稳定, 内环境稳定, 术后 4 周静脉桥内膜及中膜增生明显。自体大隐静脉远心端吻合至主动脉或左锁骨下动脉, 近心端吻合至冠脉前降支中远段的小型猪冠脉旁路移植模型方法确实有效, 具有可重复性及可操作性。

关键词 非体外循环; 冠状动脉旁路移植术; 猪模型

中图分类号 R 654.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)09-1395-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.09.031

在冠状动脉旁路移植术 (coronary artery bypass grafting, CABG) 后, 血压、血管张力、剪切力、静脉桥的走行等都会影响静脉动脉化和静脉桥血管的再狭窄的进程。为研究此问题, 已经有不少学者成功建造了大鼠、家兔和狗颈外静脉-颈内动脉吻合模型、小型猪的大隐静脉-颈内动脉模型、小型猪的乳内动脉-冠状动脉回旋支吻合模型^[1-3]。但是, 在临床实践中, 静脉桥血管的走行也并非像单纯的动静脉吻合模型那样笔直。其次, 静脉动脉化的过程中因静脉所处位置的不同而承受的动脉循环压力各异。1986 年, Weaver et al^[4] 用血管铸型技术把猪与人类和其他动物冠状动脉分布做对比研究, 发现猪心在冠状动脉解剖和心脏特殊区域 (结构) 的血供分布与人类心脏十分相似。因此, 若成功建立猪的冠状动脉旁路移植模型, 那么, 静脉动脉化及静脉桥再狭窄的过程将与人的 CABG 手术有很大的相似性。该实验目的是通过获取猪的大隐静脉, 完成不

停跳下左锁骨下动脉至前降支的旁路移植, 并探讨其可行性及有效性, 为临床研究静脉桥再狭窄机制和预防策略进一步提供支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择实验用巴马小型猪, 雌雄不拘, 25~30 kg, 共 12 只, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 经安徽医科大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验主要设备及用品 高频电刀 1 台, 负压吸引器 1 台, 呼吸机 1 台, 心电监护仪 1 台, 喉镜设备 1 套, 心脏外科搭桥器械 1 套, 组织剪 1 把, 组织钳 4 把, 组织镊 2 把, 蚊式弯止血钳 6 把, 6-0 及 7-0 pro-lene 线, 普通丝线。舒泰 50 (替来拉明 + 唑拉西泮)、盐酸赛拉嗪注射液、丙泊酚注射液、肝素钠注射液、青霉素钠、碘伏、动静脉留置针等。

1.3 实验过程

1.3.1 实验前准备 普通饲料适应性喂养 1 周, 术前禁食 12 h, 禁水 4 h。手术前称重 3 次, 取平均值。准备手术器械, 调试设备, 手术室温度保持在 25℃, 计算麻醉药物剂量, 准备多巴胺、利多卡因、肾上腺素等常规抢救药品。

1.3.2 麻醉及动脉监测 麻醉: 予以舒泰 50 2.5 mg/kg 肌注, 盐酸赛拉嗪 2 mg/kg 肌注, 进行麻醉诱导, 猪平稳倒地后予以快速备皮。予以静脉留置针穿刺耳缘静脉并注射丙泊酚 20 mg, 阿托品 0.3 mg。麻醉后立即行气管插管并连接呼吸机, 呼吸机 (LP10) 参数设置为: 吸入氧浓度 60%, 通气频率 20 次/min, 潮气量 8~10 ml/kg。动脉监测: 于猪后腿第二关节内侧感触股动脉搏动, 切开皮肤, 分离鞘膜, 将动脉穿刺针缓慢置入动脉并固定, 连接动脉换能器, 校零后监测并记录血压。

1.3.3 获取大隐静脉 麻醉成功后, 以碘伏消毒右后腿, 铺无菌巾单和洞巾。于右后腿背侧关节外侧行纵切口, 组织剪剪开皮下筋膜, 并钝性分离皮下组织, 即肉眼可见暗紫色粗长的大隐静脉 (图 1A、B), 血管镊轻提血管外鞘膜并用组织剪剪开小缺口, 组

2017-05-08 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81470530)

作者单位: ¹安徽医科大学附属省立医院心脏外科, 合肥 230001

²皖南医学院第一附属医院胸心外科, 芜湖 241001

³安徽医科大学第一附属医院心脏外科, 合肥 230022

作者简介: 郑远彪, 男, 硕士研究生;

葛建军, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: aygejianjun@163.com

织钳暴露视野,用组织剪扩大切口并剪开全程血管外鞘膜。用蚊式血管钳在静脉外侧分离结缔组织,用蚊式钳将无菌橡皮筋送入静脉后方,牵起大隐静脉,左手轻提橡皮筋帮助暴露,右手持组织剪逐步游离整段大隐静脉。游离过程中,用0号或1号丝线结扎大隐静脉属支,所有属支结扎完成后用血管钳夹闭大隐静脉远心端,沿血管钳边缘剪断静脉,将钝性针头置入血管内,结扎,缓慢逐步注射肝素生理盐水(250 ml 生理盐水加肝素12 500 U)观察血管通畅性及有无破损。血管钳夹闭近心端大隐静脉,按相同方法剪断血管,再次打水冲洗静脉管腔,完好后置入肝素生理盐水中保存,将取出的大隐静脉剪下一段并用10%中性甲醛固定,待手术后做病理HE染色检查。

1.3.4 正中开胸搭桥 胸骨正中区域常规消毒铺巾,20号刀片纵行切开皮肤层,电刀逐层切开皮下层,胸骨外肌肉层,胸骨劈刀纵劈胸骨。剪开并悬吊心包,静推2.0 mg/kg 肝素。在下腔静脉与左上肺静脉之间缝一根牵引线并缝纱布条,悬吊并充分暴露心脏。侧壁钳试夹主动脉,待血压、心率及氧饱和度稳定,用打孔器修整主动脉侧孔,6-0 prolene 线将大隐静脉远心端吻合至主动脉(图1C),轻柔松开侧壁钳,经主动脉或左锁骨下动脉血管吻合口排气后打结固定。暴露左前降支中远段靶血管位置,心表固定器固定,小圆刀片钝性分离表面组织,冠脉尖刀切开并分别予以前向剪刀、回头剪扩大后放入2.0 mm 分流栓,二氧化碳吹管辅助暴露视野。7-0 prolene 线连续缝合将大隐静脉近心端端侧吻合至前降支靶血管处(图1D),吻合后检查有无漏血,5-0 prolene 线结扎近心端冠脉前降支。观察心脏收缩与舒张,探查术野及各吻合口有无活动性出血。置入小儿心包引流管一根,接负压吸引球。待心率及血压稳定,血气正常后,钢丝固定胸骨,逐层关胸。

1.3.5 术中管理 耳缘静脉留置针顺利置入后,予以青霉素钠480万单位快速静滴。补充电解质(0.9%生理盐水500 ml + 1 g 氯化钾 + 1.25 g 硫酸镁)。术中每1 h 追加一次舒泰50,剂量为麻醉诱导

剂量的1/3,追加1次肝素2 000 U,术中微量泵泵入10 mg/ml 丙泊酚(6~8 ml/h 泵入)维持麻醉。术中密切监测血流动力学及内环境变化。

1.3.6 术后监护及术后护理 术后密切监测72 h,早期进食困难,静脉补液2 000 ml,拔除引流管后返回普通饲养房常规饲养。抗感染予以青霉素钠480万单位静脉滴注,1次/d。镇痛予以喂养镇痛剂布洛芬片,抗凝予以阿司匹林肠溶片50 mg 混匀于食物中口服,1次/d。

1.3.7 术后静脉取材及标本制备 术后4周,予以舒泰50 2.5 mg/kg 肌注,盐酸赛拉嗪2 mg/kg 肌注进行麻醉诱导,完毕后行气管插管,呼吸机辅助呼吸。按原手术切口开胸,仔细分离黏连的心包,找到静脉桥血管,通过右心耳注射肝素使之肝素化,注射高钾液使猪心脏停搏,侧壁钳夹住主动脉或左锁骨下动脉,完整取下包含吻合口在内的近端静脉桥血管,远端用6-0 prolene 线结扎冠脉前降支远段,按同样方法取下包含吻合口的远段静脉桥血管。10%中性甲醛固定,经过脱水透明、浸蜡、包埋处理后制作成蜡块,切片、贴片后经过HE染色,与术前大隐静脉相比较内膜增生变化。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用配对样本均数t检验,检验标准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术中血流动力学观察 实验中12头巴马小型猪,有2头术中出现室颤,一头除颤后存活,另外一头死亡。其余小型猪术中血流动力学稳定、氧饱和度正常(表1)。手术前后血压、心率及氧饱和度差异无统计学意义。

2.2 术中内环境观察 本实验着重观察麻醉后及拔除气管插管前两个时刻内环境稳态,通过统计分析,手术前后内环境主要指标基本稳定,差异无统计学意义;乳酸手术前后差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

表1 术中血流动力学检测及统计分析($n = 11 \bar{x} \pm s$)

项目	麻醉后	与大动脉吻合时	与冠脉吻合时	关胸前	t 值	P 值
收缩压(Kpa)	16.34 ± 1.29	12.45 ± 1.39	13.57 ± 1.46	15.91 ± 1.24	1.363	0.203
舒张压(Kpa)	8.37 ± 1.47	7.77 ± 1.78	8.59 ± 0.92	8.27 ± 1.03	0.301	0.770
心率(次/min)	106.60 ± 14.33	96.18 ± 15.59	86.55 ± 12.01	107.55 ± 10.70	-0.332	0.747
SPO ₂ (%)	98.91 ± 1.22	98.09 ± 2.17	98.91 ± 1.38	99.36 ± 0.81	-1.000	0.341

2.3 形态学观察 实验小猪 12 头,存活 11 头。4 周后,开胸取出大隐静脉桥血管,肉眼可见桥血管通畅,管腔明显扩张,血管周围组织粘连。光镜下可见术后桥血管的内膜和中膜都有明显增厚,同样倍数视野下,难以测及内膜厚度,基底膜完整,细胞排列不规则,见图 2。

表 2 术中内环境监测及统计学分析 ($n=11$ $\bar{x} \pm s$)

项目	麻醉后	拔除器官插管前	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
pH 值	7.38 ± 0.04	7.39 ± 0.84	-0.101	0.921
PaO ₂ (Kpa)	13.14 ± 0.44	12.90 ± 0.40	1.552	0.152
PaCO ₂ (Kpa)	4.92 ± 0.40	5.34 ± 0.77	-1.638	0.132
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	23.61 ± 1.31	24.75 ± 2.15	-1.691	0.122
Na (mmol/L)	142.18 ± 5.34	143.00 ± 5.10	-0.382	0.710
K (mmol/L)	4.83 ± 0.44	4.34 ± 0.57	1.859	0.093
乳酸 (mmol/L)	0.66 ± 0.16	1.59 ± 0.33	-8.330	<0.001
血红蛋白 (g/L)	110.18 ± 8.73	96.18 ± 7.88	4.889	0.010

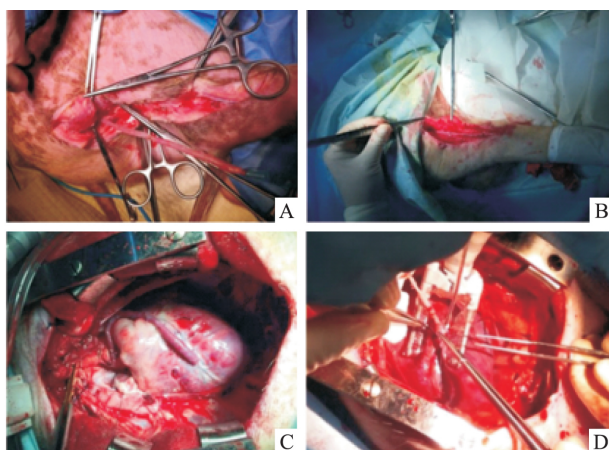


图 1 术中主要步骤图

A、B: 获取大隐静脉; C: 与升主动脉吻合; D: 与冠状动脉前降支吻合

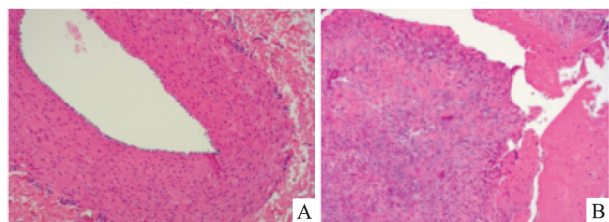


图 2 静脉桥血管光镜下形态学分析 HE × 100

A: 术前; B: 术后 4 周

3 讨论

随着经济水平的提高和人口老龄化的发展,我国冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病率正逐步上升。CABG 是治疗冠心病最有效的方法之一^[5]。在

临床工作中,需要进行 CABG 手术的患者常常是多支冠脉病变,自体大隐静脉具有长度足够、获取容易等特点而一直被作为桥血管的主要材料^[6]。但是,据报道^[7],冠脉搭桥术后大隐静脉桥 1 年闭塞率约 20%,10 年的闭塞率为 60%,如何提高静脉桥血管的通畅率仍然是目前困扰该领域的一大难题。

在解决这项难题的过程中,国内外研究者建造了各种动物模型作为工具来研究。首先,有研究者曾运用袖口技术建立大鼠颈外静脉-颈动脉吻合模型,袖口技术与普通缝合方法相比,具有简单高效,成功率高,模型可以复制的优点^[8]。在静脉桥内膜和中膜的增生程度方面,两种方法无明显差异^[9],而且有研究^[10]表明,袖口缝合技术在兔静脉桥的吻合模型上的应用也取得了有效成果。但是,因为种群的差异,人的动静脉管腔和管壁与大鼠、兔的血管差异性较大。在临床的冠脉搭桥手术中,外科医师普遍采用聚丙烯线连续吻合血管,因此,其吻合方法和实验数据对临床的指导意义可能需要更深入研究。其次,选择合适的靶血管和桥血管方面,大鼠^[11]、兔^[2-3]等动物多被采用的是动静脉旁路吻合模型,移植静脉多取自颈外静脉;小型实验猪等大动物,研究^[11-12]较多的是取自体大隐静脉与颈动脉吻合模型。也有研究者曾报道将小型猪大隐静脉分别与冠状动脉回旋支远端和升主动脉相吻合,但是少有详细阐述和评价此类模型的过程和稳定性的报道,也未见后续相关研究^[13]。

本次实验中,选择巴马小型猪作为建模动物,优点如下:①在心血管系统的解剖和生理方面,猪与其他动物相比,更接近于人类,尤其是冠脉系统,与人类有 90% 的相似度^[14-15];②较大鼠、兔和狗等动物而言,猪的大隐静脉的管腔大小和管壁厚度都与人更接近,其中膜和内膜大多数细胞由平滑肌细胞构成^[16]。在本实验中,在猪心脏上进行冠脉与大隐静脉近心端端侧吻合,静脉远心端与左锁骨下动脉端侧吻合,较颈动脉-大隐静脉吻合难度要大,但是其与临床 CABG 手术的高度相似性是其其他模型不能比拟的。

成功建立本模型需要注意以下几点:①猪的冠脉少有分支,操作中一旦缺血时间较长,难有侧支血流建立,容易诱发心肌梗死,产生室性心律失常,术中若发现心率低于 60 次/min 或高于 160 次/min,在远端吻合前出现血压波动超过 1.33 Kpa、氧饱和度持续低于 95% 应该警惕,可予以利多卡因 1~2 mg/kg 静脉注射并予以心脏表面少量浸润,预防室

性心律失常。猪心较容易发生室颤,行远端吻合前视个体差异可以予以冠脉缺血预适应处理,若出现室颤,应该立即电除颤,电能量设置为5焦耳。在吻合过程中,可以先吻合近端,再与远端的冠脉相吻合,结扎冠脉前降支近端时应该在静脉桥血管完全吻合完毕后且血流动力学稳定状态下进行;②术中血压监测十分重要,但是猪的四肢肌肉本身较发达,股动脉位置较深,全麻之后,血压会稍下降,直接穿刺很困难。本实验中采用直接切开穿刺,操作简单、用时少且成功率高,在猪麻醉后能尽快监测动态血压,从而对于血管活性药物的应用有很强的指导性;③猪的血液粘滞度较高,动脉穿刺成功后需要立即予以肝素水冲洗管腔;术中若出现血栓形成,容易出现心梗,一旦因心梗而出现室颤,除颤成功率较低。因此开胸后立即予以肝素2.0~2.5 mg/kg,测激活全血凝固时间(activated clotting time of whole blood, ACT)在300 s左右,术中每隔1 h追加1次,1次约2 000 U;④术后需要予以镇痛药(200 mg/次,口服,1次/d)及抗血栓药物(阿司匹林肠溶片50 mg,口服,1次/d)。术后前3 d难以进食,需要补液约2 000 ml/d,未进食进水前可予以肝素钠静滴抗凝(5 000 U加500 ml生理盐水,静滴2次/d)。

综上所述,本动物模型能达到建模要求。术中血流动力学和内环境比较稳定,术后成活率高,静脉桥血管通畅。术后4周静脉桥血管内膜增厚明显,可以说明静脉桥血管所处的“生理环境”与人的CABG术后状态类似。此模型还有很大的改进之处和研究空间。首先,猪的个体差异性不可避免,术前可以通过心脏彩超对猪的心肌运动功能进行评估,通过主动脉CT血管造影了解猪的术后不同时间点血流的通畅性。此外,该模型有助于进一步研究血管外局部用药、血管外支持物乃至药物支架等对抑制静脉内膜的再狭窄等问题,由于该模型已经较接近于人的冠脉搭桥模型,因此所获得的数据将更有说服力。

参考文献

[1] Borin T F, Miyakawa A A, Cardoso L, et al. Apoptosis, cell proliferation and modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21cip1 in vascular remodelling during vein arterialization in the rat[J]. *Int J Exp Pathol* 2009, 90(3):328-37.
 [2] Berceli S A, Jiang Z, Klingman N V, et al. Differential expres-

sion and activity of matrix metalloproteinases during flow-modulated vein graft remodeling[J]. *J Vasc Surg* 2004, 39(5):1084-90.
 [3] 胡佳心,王侃,阮新民. 冠状动脉搭桥术后静脉桥再狭窄动物模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志* 2016, 24(2):198-202.
 [4] Weaver M E, Pantely G A, Bristow J D, et al. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man[J]. *Cardiovasc Res*, 1986, 20(12):907-17.
 [5] Heidari M M, Foruzannia S K, Khatami M, et al. Apolipoprotein gene polymorphism in Iranian coronary atherosclerosis patients candidate for coronary artery bypass graft[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(7):841-4.
 [6] Wi J H, Joo H C, Youn Y N, et al. Comparison of radial artery and saphenous vein composite Y grafts during off-pump coronary artery bypass[J]. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 46(4):265-73.
 [7] Une D, Kulik A, Voisine P, et al. Correlates of saphenous vein graft hyperplasia and occlusion 1 year after coronary artery bypass grafting: analysis from the CASCADE randomized trial[J]. *Circulation*, 2013, 128(11 Suppl 1):S213-8.
 [8] Xu Q. Mouse models of arteriosclerosis-from arterial injuries to vascular grafts[J]. *Am J Pathol* 2004, 165(1):1-10.
 [9] 赵智伟,葛建军,周正春,等. 改良cuff法和间断缝合法在静脉桥狭窄模型中的应用[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(4):474-6.
 [10] Bai H Z, Sawa Y, Zhang W D, et al. Gene transfer to vein graft wall by HVJ-liposome method: time course and localization of gene expression[J]. *Ann Thorac Surg*, 1998, 66(3):814-9.
 [11] Murphy G J, Johnson T W, Chamberlain M H, et al. Short-and long-term effects of cytochalasin D, paclitaxel and rapamycin on wall thickening in experimental porcine vein grafts[J]. *Cardiovasc Res* 2007, 73(3):607-17.
 [12] Bloor J, Shukla N, Smith F C, et al. Folic acid administration reduces neointimal thickening, augments neovasa vasorum formation and reduces oxidative stress in saphenous vein grafts from pigs used as a model of diabetes[J]. *Diabetologia* 2010, 53(5):980-8.
 [13] 鲍春荣,梅举,丁芳宝,等. 局部应用雷帕霉素抑制CABG后移植静脉内膜增生[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2008, 28(10):1242-4.
 [14] Suzuki Y, Yeung A C, Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:195483.
 [15] 钱鑫,田毅,崔永春,等. 巴马和贵州小型猪在冠状动脉支架评价中的应用[J]. *实验动物科学* 2011, 28(4):33-6.
 [16] Shi Y, O'Brien J E Jr, Mannion J D, et al. Remodeling of autologous saphenous vein grafts. The role of perivascular myofibroblasts[J]. *Circulation*, 1997, 95(12):2684-93.

Establishment of off-pump coronary artery bypass grafting in experimental miniature pig model

Zheng Yuanbiao¹, Zhang Rui¹, Wei Jun², et al

(¹Dept of Cardiovascular Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Cardiothoracic, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001)

Abstract 12 Guangxi Bama miniature pigs were selected and the operation began with unilateral lateral autologous saphenous vein harvest for a length of 10 ~ 15 cm. Then reversed saphenous vein underwent proximal anastomosis to the ascending aorta followed by distal to anterior descending branch with a continuous suture. Intraoperative hemodynamics and internal environment were recorded. The pigs were euthanized and grafts were removed for observation of intimal hyperplasia and medial thickening four weeks later. 11 of 12 swine operated on survived and all grafts remained patent. Intraoperative hemodynamics stability and internal environment homeostasis were achieved. Pathological section demonstrated a significant development of intimal hyperplasia and medial thickening. This study demonstrates the repeatability and appropriateness of establishment of off-pump coronary artery bypass grafting in a swine model for vein graft intimal hyperplasia and medial thickening. These data support progression toward further study of prophylactic therapy to improve vein graft patency.

Key words off-pump; coronary artery bypass grafting; miniature pig model

(上接第 1394 页)

Efficacy and risk factors of cardiac valve replacement surgery in the medium term for patients with giant left ventricular

Tang Yong, Fan Yangming, Ge Jianjun

(Dept of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To explore the effect of cardiac valve replacement surgery in the medium term on patients with giant left ventricular and its related risk factors. **Methods** Retrospective analysis the clinical data of 82 cases of valvular heart disease with giant left ventricle underwent heart valve replacement surgery. To compare the size and function of heart between preoperation and postoperation, and explore the relevant risk factors affecting the prognosis. **Results** The left atrial diameter, left ventricular end diastolic diameter, and left ventricular systolic diameter (LVESD) were decreased after the operation, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference between left ventricular ejection fraction and left ventricular shortening rate. But the NYHA classification showed significant difference ($P < 0.05$). The risk factors related to the prognosis of patients were preoperative LVESD value ≥ 6.0 cm, heart function NYHA classification in grade IV, postoperative unuse of ACEI drugs or β -blockers ($P < 0.05$). **Conclusion** The perioperative mortality is low in patients with valvular heart disease and giant left ventricle after heart valve replacement surgery. The curative effect is satisfactory, the shape and size of the heart in the medium term have obvious reverse remodeling process, and the cardiac function is also improved. Preoperative LVESD value ≥ 6.0 cm, heart function NYHA classification in grade IV, postoperative unuse of ACEI drugs or β -blockers are the major risk factors affecting prognosis of patients.

Key words valvular heart disease; giant left ventricle; heart valve replacement; curative effect; risk factors