

2 吴刚, 路明. 老年心律失常 208 例临床分析 [J]. 河北医学, 2003, 9(1): 28 - 30

3 张新红. 冠心病心律失常患者的护理 [J]. 中国实用医药, 2014, 9(27): 218 - 219

4 刘志超, 唐倩, 王保和. 参松养心胶囊抗心律失常作用机制研究进展 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(5): 923 - 926

5 胡昊, 唐海沁, 李洁华, 等. 参松养心胶囊抗心律失常的疗效和安全性系统评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2011, 11(2): 168 - 173

6 罗艳丽. 参松养心胶囊联合美托洛尔缓释片治疗老年冠心病心律失常的效果研究 [J]. 临床医学, 2016, 36(9): 117 - 119

7 陈智, 冯小坚, 徐细平. 参松养心胶囊联合美托洛尔缓释片治疗老年冠心病心律失常疗效分析 [J]. 中国社区医师, 2015, 31(14): 90 - 92

8 董修祿. 参松养心胶囊联合美托洛尔缓释片治疗老年冠心病心律失常疗效观察 [J]. 基层医学论坛, 2016, 20(27): 3771 - 3772

9 张晨, 王美玲, 马华, 等. 参松养心胶囊联合美托洛尔缓释片治疗老年冠心病心律失常疗效观察 [J]. 临床荟萃, 2014, 29(8): 861 - 865

10 周利平, 李洪. 参松养心胶囊联合美托洛尔治疗冠心病合并频发室性早搏的临床疗效研究 [J]. 中国民族民间医药, 2011, 20(5): 102 - 105

11 马尔旦·乌布利. 参松养心胶囊联合美托洛尔治疗老年冠心病心律失常患者 40 例 [J]. 中国社区医师, 2018, 34(27): 91 - 93

12 侯明桥, 张春媛, 邱玲. 参松养心胶囊联合美托洛尔治疗老年冠心病心律失常患者的效果观察 [J]. 疑难病杂志, 2015, 14(5): 508 - 510

13 周静. 参松养心胶囊治疗老年冠心病心律失常的效果探讨 [J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(15): 180 - 182

14 魏铁彬. 观察参松养心胶囊联合美托洛尔缓释片治疗老年冠心病心律失常疗效 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(24): 41 - 42

15 张新昌. 老年冠心病心律失常患者行参松养心胶囊联合美托洛尔治疗的临床价值探究 [J]. 首都食品与医药, 2018, 25(18): 57 - 58

16 于丽丽. 老年冠心病心律失常应用参松养心胶囊联合美托洛尔缓释片治疗的效果观察 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(93): 18369 - 18372

17 谢咏镰. 中西医结合治疗老年冠心病心律失常效果分析 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(1): 52 - 53

18 徐庭山. 抗心律失常药物的分类及应用 [J]. 医学综述, 2009, 15(14): 2185 - 2188

19 刘万里, 黄鹤, 李君, 等. 参松养心胶囊联合美托洛尔治疗室性早搏的 Meta 分析 [J]. 心血管康复医学杂志, 2015, 24(1): 79 - 84

(收稿日期: 2018 - 11 - 03)

(修回日期: 2018 - 12 - 07)

新型微血管仪在妊娠大鼠动脉功能下调机制研究中的应用

林 晨 王铭伟 张再重 林 楠 杨为锦 吴伟航 王 瑜

摘 要 目的 介绍一种新型微小血管舒缩功能检测仪在研究妊娠期大鼠微小动脉功能下调机制中的应用。方法 采用该仪器测量未孕的雌性大鼠和怀孕雌性大鼠的腹主动脉的舒缩功能, 与传统方法比较, 并采用该仪器测量传统仪器无法测量的大鼠子宫动脉的舒张与收缩功能。结果 与传统方法比较, 新型检血管功能测量仪在测量大鼠腹主动脉的舒张和收缩功能的研究中, 导出的曲线与传统方法导出的曲线差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。采用两种方法测得的妊娠大鼠腹主动脉对于乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) 的舒张反应均小于未孕大鼠, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。采用新型测量仪检测两组大鼠的子宫动脉对于氯化钾 (potassium chloride, KCl) 的收缩反应差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。采用新型仪器测得的妊娠大鼠的子宫动脉对于 ACh 诱导的舒张反应小于未孕大鼠, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。采用新型仪器测量过的微小动脉内膜均无损伤, 而采用传统仪器测量过的动脉内膜有不同程度的损伤。结论 该新型血管功能测量仪不仅可取代传统血管舒缩功能测量仪器, 且测量的微小动脉口径范围更加广泛。

关键词 血管功能 腹主动脉 子宫动脉 妊娠高血压综合征 舒张

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.018

A Novel Instrument Applied for Mechanism Study of Micro - arterial Function Down - regulation in Rats during Pregnancy. Lin Chen,

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2017J01327); 全军医学科技重点基金资助项目 (CNJ15J004); 军事医学后勤科研项目 (CLB18J035)
 作者单位: 350025 福州, 中国人民解放军联勤保障部队第 900 医院普通外科、福建医科大学福总临床医学院、厦门大学附属东方医院普通外科

通讯作者: 王瑜, 主任医师, 电子信箱: flyfishwang@hotmail.com

Wang Mingwei, Zhang Zaizhong, et al. Department of General Surgery, 900 Hospital of The Joint Logistics Team, PLA, Fujian 350025, China

Abstract Objective To introduce a novel microvascular testing instrument which is applied to measure the relaxation and contraction function of micro - vessels in the study of the mechanism of micro - arterial function down - regulation in rats during pregnancy. **Methods** The relaxation and contraction function of abdominal aorta in pregnant and virgin rats were measured by the novel instrument. The micro - vessels were tested by prevalent apparatus as well. Furthermore, the function of uterine arteries which were incapable of being tested by prevalent apparatus was measured by the novel instrument. **Results** In the function study of abdominal aorta measured by the new instrument and the prevalent apparatus, the curve graphs derived through the two methods were similar and there were no statistical differences between them ($P > 0.05$). The relaxation response of the abdominal aorta in pregnant rats mediated by ACh was less than that in the virgin rats ($P < 0.05$). The contraction response of uterine arteries to KCl in the two groups indicated no differences ($P > 0.05$) measured by previous two instruments. The relaxation response of uterine arteries to ACh in pregnant rats measured by the novel instrument was less than that in virgin rats and there were statistical differences ($P < 0.05$). The arterial intima measured by the novel instrument showed no damage under microscopy. On the other side, the intima of arterioles tested by prevalent instrument was found injured to varying degrees. **Conclusion** The novel instrument is expected to take the place of prevalent apparatus due to the enhanced features to measure the diameter of arterioles in a wider range.

Key words Vascular function; Abdominal aorta; Uterine artery; Pregnancy - induced hypertension; Relaxation

以妊娠高血压综合征为代表的妊娠期疾病是导致孕产妇和围生期胎儿死亡的主要原因之一,血管功能下调在其中扮演重要角色,临近子宫的微小动脉功能改变尤具研究价值^[1-3]。目前测量微小动脉舒缩功能的主流方法是用细金属丝挂钩勾住血管环,并通过张力转换器将金属丝传导的牵张力进行换算来表达血管环舒缩变化^[3-5]。然而受限于金属丝的口径以及硬度,现有方法对微小动脉舒张与收缩功能的测量仅仅局限于口径大于 300 μm 的微小血管,当靶血管的口径小于 300 μm ,用现有的技术手段很难测量。在本研究中,笔者采用自主研发的新型双针套接式微小动脉舒缩功能测试仪对大鼠微小动脉舒缩功能进行测量,成功测得口径小于 300 μm 的大鼠子宫动脉功能,为妊高症血管功能改变的机制研究提供了更多实验依据。

材料与方法

1. 材料:(1)双针套接式微血管功能测量装置:由恒温浴槽、可伸缩软针、固定软针、恒温浴槽进水口、出水口等五部分构成。装置主体为树脂材料,采用 3D 打印而成,长 8cm,宽 5cm,高 2cm,恒温浴槽长 5cm,宽 3cm,高 2cm,出水口直径 0.3cm,固定软针以及可伸缩软针为 pet 高分子材料制成,主体长度 4cm,主体外径 0.15cm,尖端长度 0.5cm,尖端直径 200 μm ;软针外接输液管道和夹闭器,可经由软针向血管腔内输注液体,夹闭器夹闭后可使血管腔形成闭合腔,其内液体不与外接相交通。(2)实验动物:清洁级 12 周龄雌性未孕以及妊娠的 Sprague - Dawley

(SD)大鼠,健康,体质量 200 \pm 20g,由福州总医院比较医学科提供。传统 610 M 型多通道血管张力测定仪(含 2 根直径 80 μm 的不锈钢丝挂钩,丹麦 DMT 公司),恒温浴槽购自宁波江南仪器厂,JH - 280425 张力换能器由福建医科大学生理实验室提供。其他组件包括倒置显微镜、摄像机、监视器、示波器记录仪、光源,均由尼康公司提供。试剂氯化钾(potassium chloride, KCl)、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)由厦门鹿茸公司提供。

2. 动物分组及实验设计:实验动物分 A、B 两组, A 组为 12 周龄雌性未孕 SD 大鼠, B 组为 12 周龄雌性妊娠大鼠,妊娠时间 18 天,每组大鼠 8 ~ 10 只。两组大鼠的腹主动脉舒缩功能采用新型双针套接式测量仪和传统金属丝挂钩式测量仪分别测量,明确对于同组大鼠的腹主动脉舒缩功能,采用新型测试仪与传统仪器是否有差异;同时将采用相同测量仪器检测的不同组的大鼠腹主动脉舒缩功能做比较,明确不同组的大鼠腹主动脉的舒缩功能是否发生变化,如果有差异,两种仪器测得的差异趋势是否一致。两组大鼠的子宫动脉无法采用传统测量仪测量,仅采用新型微小动脉测试仪测量,明确不同组大鼠子宫动脉的舒缩功能是否发生变化,如果存在差异,这种差异与两组大鼠腹主动脉功能的差异趋势是否一致。

3. 大鼠离体动脉血管环制备以及装置的连接:大鼠处死,取肾动脉开口水平至髂动脉分叉处之间的腹主动脉管段,长度约 3mm,同时取大鼠自子宫中央区向外侧第 2 个胚胎所属的子宫动脉的血管段^[6],长度

约 3mm, 血管段浸入 4℃ 的 Krebs 液保存备用。采用新型仪器测量时, 将制备好的离体动脉段浸泡于仪器的 37℃ 恒温水浴槽内, 置于显微镜的视野中心, 血管段一端首先用精细显微外科镊套接在固定软针尖端上, 用 10-0 眼科尼龙单丝将其固定, 从固定软针向血管腔内缓慢注入 Krebs 液, 直至将血管腔中的血液以及杂质完全去除, 血管段另一端朝向可伸缩软针尖端, 将可伸缩软针推向血管段的游离端, 直至可伸缩软针尖端也套入血管段, 用 10-0 眼科尼龙单丝固定此端。将连接可伸缩软针的输液管外接到输液袋上, 袋中静水压保持在 90mmHg。

4. 检测步骤: 动脉收缩功能检测: 采用 51mmol/L 氯化钾溶液 (51mmol/L KCl) 刺激动脉段/环 2min, 绘制时间 - 收缩百分比曲线; 动脉舒张功能检测: 采用 3×10^{-7} mol/L 的 NE 预收缩 5min, 待血管的收缩达到平台值并趋于稳定后依次加入浓度梯度为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 的 ACh 溶液, 绘制剂量 - 舒张曲线^[7,8]。每只大鼠的腹主动脉段均取两份, 一份采用传统仪器测量, 一份采用新型仪器测量, 比较两种方法测得的动脉舒张、收缩功能曲线。大鼠的子宫动脉仅采用新型仪器测量。

5. 组织学检测: 将测量后的血管段/环制成石蜡切片, 苏木素 - 伊红 (haematoxylin - eosin, HE) 染色

后, 在光学显微镜下观察血管壁的完整性以及血管内膜情况。

6. 血管舒缩程度计算公式: 血管收缩百分比 = $[(\text{静息直径} - \text{收缩直径}) / \text{静息直径}] \times 100\%$; 血管舒张百分比 = $[(\text{舒张直径} - \text{NE 预收缩直径}) / (\text{静息直径} - \text{NE 预收缩直径})] \times 100\%$ ^[6,7]。

7. 统计学方法: 采用 Graphpad 5.0 统计学软件包对数据进行统计分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间差异采用 *t* 检验比较, 多组间均数比较选用多因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 腹主动脉舒张功能检测结果: 采用传统方法导出的 A 组大鼠与 B 组大鼠腹主动脉的 ACh 舒张百分比曲线差异有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组的腹主动脉对于 ACh 的舒张反应小于 A 组 (图 1A)。采用新型仪器导出的 A 组与 B 组大鼠腹主动脉的 ACh 舒张百分比曲线差异有统计学意义 ($P < 0.05$), B 组大鼠的腹主动脉对于 ACh 的舒张反应小于 A 组 (图 1B)。采用两种方法导出的 A 组大鼠腹主动脉在不同浓度梯度 ACh 作用下的剂量 - 舒张百分比曲线相近, 差异无统计学意义 ($P = 0.645$, 图 1C)。同样, 采用两种方法导出的 B 组大鼠腹主动脉的 ACh 舒张百分比曲线相近, 差异无统计学意义 ($P = 0.793$, 图 1D)。

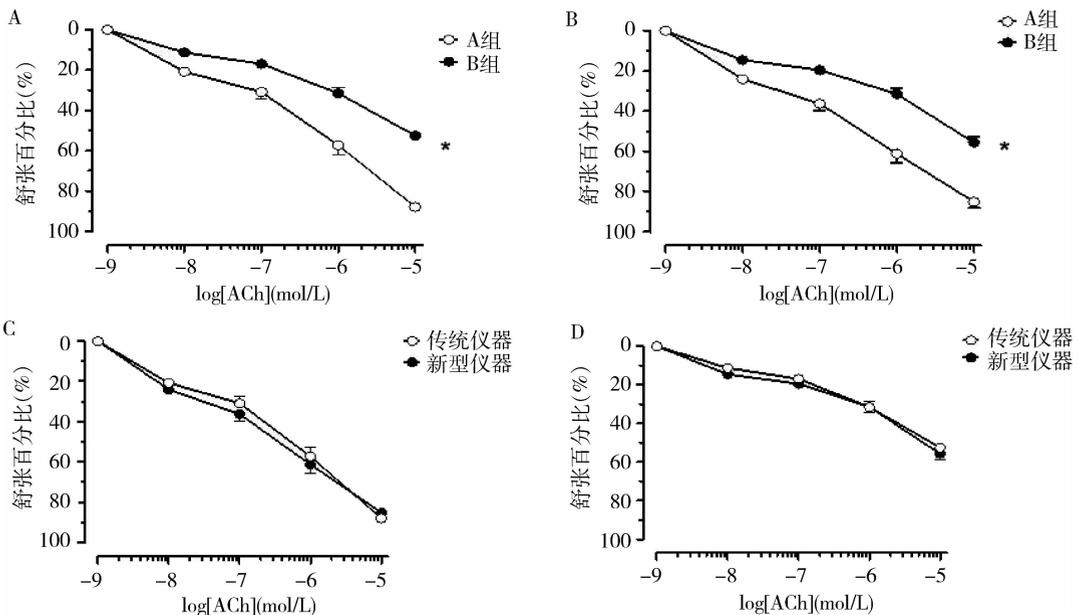


图 1 腹主动脉舒张功能测量

A. 采用传统仪器测量大鼠腹主动脉舒张功能; B. 采用新型仪器测量大鼠腹主动脉舒张功能;
C. 两种方法绘制的 A 组大鼠腹主动脉剂量 - 舒张曲线比较; D. 两种方法绘制的 B 组大鼠腹主动脉剂量 - 舒张曲线比较

2. 腹主动脉收缩功能检测结果:采用传统仪器导出的A、B组大鼠腹主动脉对于KCl的时间-收缩百分比曲线差异无统计学意义($P=0.993$,图2A)。采用新型仪器导出的两组大鼠腹主动脉对于KCl的时间-收缩百分比曲线比较差异无统计学意义($P=$

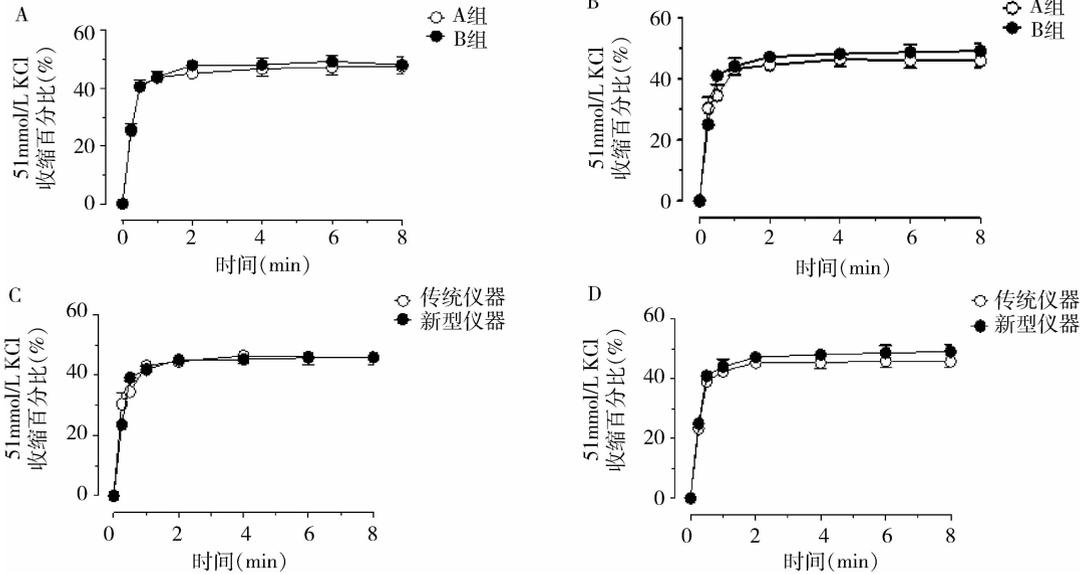
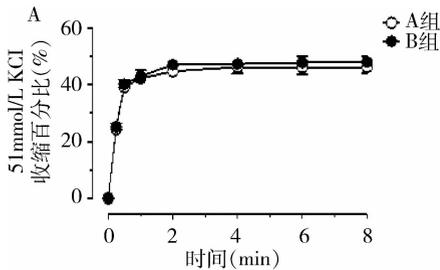


图2 腹主动脉收缩功能测量

A. 采用传统仪器测量大鼠腹主动脉收缩功能; B. 采用新型仪器测量大鼠腹主动脉收缩功能; C. 两种方法绘制的A组大鼠腹主动脉时间-收缩曲线比较; D. 两种方法绘制的B组大鼠腹主动脉时间-收缩曲线比较

3. 子宫动脉收缩功能检测结果:采用新型仪器导出的两组大鼠子宫动脉对于KCl的时间-收缩百分比反应曲线相近,差异无统计学意义($P=0.999$,图3A)。



4. 子宫动脉舒张功能检测结果:采用新型仪器导出的两组大鼠子宫动脉的ACh的舒张百分比曲线比较,差异有统计学意义($P<0.05$),B组大鼠的子宫动脉对于ACh的舒张反应小于A组(图3B)。

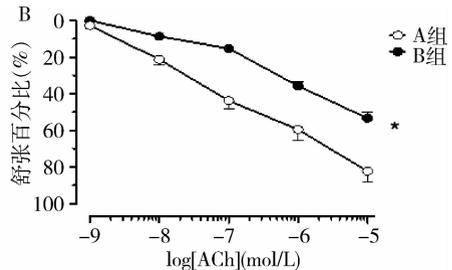


图3 子宫动脉舒张功能测量

A. 采用新型仪器测量大鼠子宫动脉收缩功能; B. 采用新型仪器测量大鼠子宫动脉舒张功能

5. 组织学评估:采用新型仪器检测过的大鼠腹主动脉(图4A、图4C)以及子宫动脉(图4E、图4F),血管壁完整,未发现内膜损伤;而采用传统仪器测量的大鼠腹主动脉(图4B、图4D)可发现血管内膜甚至血管平滑肌的损伤。

讨 论

微小动脉的功能改变可能直接影响下游靶器官,

因此在研究中更多采用外周微小动脉而不是中央大动脉作为靶器官功能改变的上游研究对象^[9,10]。传统的双金属丝挂钩式微小动脉功能测量装置存在如下缺陷:(1)忽略了血管口径和血管壁的厚度差异,对血管环各部分所造成的牵拉程度不一致,得到的数据无法真实的反应实际情况^[1,11-13]。(2)传统检测仪的金属丝直径约100 μm 左右,易对血管内膜造成

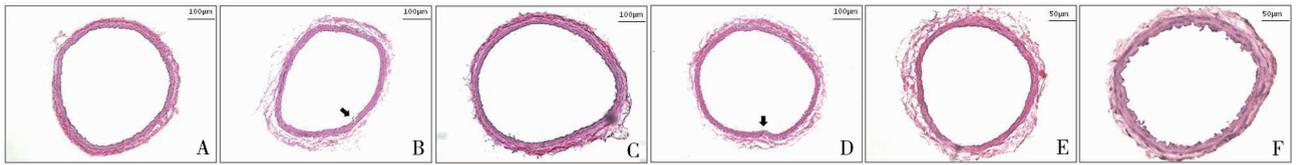


图4 组织学评价

A. 采用新型仪器测量的 A 组大鼠腹主动脉; B. 采用传统仪器测量的 A 组大鼠腹主动脉; C. 采用新型仪器测量的 B 组大鼠腹主动脉; D. 采用传统仪器测量的 B 组大鼠腹主动脉; E. 采用新型仪器测量的 A 组大鼠子宫动脉; F. 采用新型仪器测量的 B 组大鼠子宫动脉

损伤,当被测动脉内径小于 $300\mu\text{m}$ 时,很难将两根金属丝同时穿入血管环^[8-12]。若缩小金属丝口径,过细的金属丝无法承受血管环的拉力。(3)忽略了血管腔内血压对血管内壁的影响。(4)在装置内,血管腔内外的生物活性液是相交通的,施加干预时,无法分辨干预因素是对外膜起效还是对内膜起效。(5)金属丝本身的性质差异有可能影响实验的结果^[14-16]。

采用双针套接式微血管测量装置可以不受上述因素影响,其优势如下:(1)可精确模拟生理或病理状态的血管腔内血压,并可自由调整被测血管的前负荷。(2)可测量口径 $300\mu\text{m}$ 以下的微小动脉。本实验中被测量的微小动脉的最小口径为 $230\mu\text{m}$ 。套接软针头组件可以根据被测血管的口径进行个体化更换。(3)采用本装置进行实验时,操作仅限于血管段的两端,中间段被测血管的内膜不会受到损伤。(4)血管腔内的生物活性液与恒温浴槽内的生物液不相交通,可以对被测血管的外膜和内膜独立施加干预因素。

本研究显示,妊娠期大鼠,不论子宫动脉还是腹主动脉,对于 ACh 介导的舒张性均小于未孕的大鼠,提示在妊娠状态下,大鼠动脉对 ACh 诱导的内皮依赖性舒张明显降低,间接说明在妊娠状态下,大鼠血管内皮舒张功能下调,更易引发妊娠期高血压。比较腹主动脉和子宫动脉,妊娠期 ACh 诱导的内皮依赖性舒张差异无统计学意义。既往研究报道在缺血、缺氧的妊娠大鼠模型中,大鼠主动脉对于 ACh 诱导的舒张功能显著下降,提示缺血、缺氧状态导致了血管内皮舒张功能障碍,从而进一步加剧妊高症的发展^[17]。而本研究结果提示,妊娠状态本身也许就是妊高症的独立诱因。对于 KCl 诱导的收缩,不论是腹主动脉还是子宫动脉,两组均未表现出差异,提示在妊娠期,KCl 介导的电压门钙通道可能未受影响,或者有其他通路代偿了该通路的功能。本研究将同组的大鼠腹主动脉用两种方法测量,不管是对于 KCl 诱

导的时间-收缩曲线,还是 ACh 诱导的剂量-舒张曲线,两种方法测得的结果比较差异无统计学意义,提示新的测量方法与已认可的传统方法比较,差异无统计学意义。同时,采用同种测量方法测量不同组的大鼠腹主动脉,对于传统测量方法已测得的差异,采用新测量仪器同样可测出相同趋势的差异。对于口径小于 $300\mu\text{m}$ 的微小血管在妊娠期血管内皮舒张功能改变的报道鲜见。笔者选取口径为 $200\sim 300\mu\text{m}$ 的大鼠子宫动脉作为研究对象,用新型仪器绘制其对 KCl 及 ACh 的反应曲线,结果显示雌性大鼠子宫动脉对于 ACh 介导的内皮舒张功能在妊娠期显著下调,填补了此领域空白。

当然,本研究也存在不足之处:(1)测量指标有限。在后继的研究中,笔者还将加入左旋硝基精氨酸甲酯(L-NAME)、吲哚美辛(indomethacin)等干预因素,使实验趋向系统性^[10,13,18,19]。(2)选取的微小动脉较单一。

综上所述,本研究所述的双针套接式微小动脉测量装置不仅可以代替传统的微小动脉测量仪,还可以测量传统仪器无法测量的口径更小的微小动脉,拥有广泛的应用前景,有望成为临床以及药理实验中测量血管功能的主流装置。

参考文献

- 刘沙, 萧明第, 薛松, 等. 介绍一种离体血管环的实验装置和方法[J]. 医学研究生学报, 2002, 15(3):199-200
- Lopez BL, Snyder JW, Birenbaum DS, et al. N-acetylcysteine enhances endothelium-dependent vasorelaxation in the isolated rat mesenteric artery[J]. Ann Emerg Med, 1998, 32(4):405-410
- Davies EL, Bell JS, Bhattacharya S. Preeclampsia and preterm delivery: a population-based case-control study[J]. Hypertens Pregnancy, 2016, 35(4):510-519
- 洪锐, 孙圆圆, 金景玉, 等. 2, 3-吲哚酮对大鼠离体胸主动脉舒缩功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8):1179-1180
- 张志华, 王晨阳, 刘佳, 等. 利拉鲁肽对糖尿病大鼠肠系膜动脉舒缩功能的影响[J]. 疑难病杂志, 2016, 15(9):951-954
- Li W, Mata KM, Mazzuca MQ, et al. Altered matrix metalloprotein-