·论　著·

新型心肌梗死大鼠模型制备方法的建立和模型鉴定*

裴之俊,李伏燕,陈义加,王俊杰,李　薇,吴瑞敏,杨　怡(湖北医药学院附属太和医院 PET 中心,湖北十堰　442000)

【摘要】 目的　建立可用于制备心肌梗死大鼠模型的新方法。**方法**　异氟醚气体麻醉 Sprague-Dawley 大鼠后,钝性分离肋间肌,结扎左冠状动脉前降支,制备心肌梗死大鼠模型。以仅穿刺不结扎左冠状动脉前降支的方法制备假手术大鼠模型。术后采用小动物心电图仪、血流动力学分析仪、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色及苏木素-伊红(HE)染色鉴定心肌梗死大鼠模型。**结果**　心肌梗死大鼠模型及假手术大鼠模型存活率均为 80.0%。心肌梗死模型组大鼠术后第 2、7 天心电图检查可见 ST 段明显抬高。血流动力学检测结果显示,心肌梗死模型组大鼠颈总动脉收缩压和舒张压,左心室收缩压,以及左心室压力上升和下降最大速率均较假手术模型组均明显降低,心率和左心室舒张末压则明显增加($P<0.05$)。TTC 染色显示梗死心肌与正常心肌色差明显,坏死心肌呈白色。HE 染色显示梗死心肌细胞肿胀、排列紊乱,出现空泡,甚至断裂,部分断裂心肌细胞间隙见炎症细胞浸润。**结论**　建立的方法效果理想且操作简单,适用于心肌梗死大鼠模型的制备。

【关键词】 心肌梗死;　动物模型;　大鼠;　冠状动脉

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.07.025　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2015)07-0937-03

Establishment and assessment of rat model of myocardial infarction*

PEI Zhi-jun, LI Fu-yan, CHEN Yi-jia, WANG Jun-jie, LI Wei, WU Rui-min, YANG Yi (PET Center, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, *China)*

【Abstract】 Objective　To establish a new, fast and efficient preparation method of myocardial infarction model. **Methods**　Sprague-Dawley rats were anesthetized by using isoflurane gas, then myocardial infarction models were prepared by ligation of ramus descendens anterior arteriae coronaria sinistrae, after bluntly separation of intercostal muscle. Sham operation rat models were prepared by punctuation, not ligation, of ramus descendens anterior arteriae coronaria sinistrae. Small animal electrocardiograph, hemodynamic analyzer, 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining and hematoxylin-eosin (HE) staining were used to identify myocardial infarction models. **Results**　Survival rates of myocardial infarction models and sham operation models were both 80.0%. Electrocardiograph analysis indicated that ST segment was raised apparently in myocardial infarction models on 2 and 7 days after operation. Hemodynamic detection indicated that diastolic blood pressure, systolic blood pressure, left ventricular systolic pressure and max ascending and descending rate of left ventricular pressure in myocardial infarction models were lower than sham operation models, but heart rate and heart ventricle end diastolic pressure were higher ($P<0.05$). TTC staining showed that the color of infracted myocardium was white, which was obviously different with normal myocardium, HE staining showed that infracted cardiac muscle cells were swelling, disorderly arranged, with cavity or even break, and inflammatory cell infiltration could be found within intercellular spaces of fractured cardiac muscle cells. **Conclusion**　Preparation method, constructed in this research, could be efficient and easily performed to establish myocardial infarction models.

【Key words】 myocardial infarction;　experimental model;　rat;　coronary artery

随着人们生活习惯的改变及胆固醇摄入量的增加,缺血性心血管疾病发病率逐年增加。由于临床研究难以对缺血性心血管疾病的病理、生理改变进行分析,因此需要开展大量的基础研究[1]。此外,可用于缺血性心血管疾病治疗的各种新方法,如激光心肌血管重建、细胞移植再生治疗、基因治疗等,也需要通过动物实验分析其安全性、疗效、作用机制等[2]。因此,心血管疾病动物模型不但可以用于心缺血性心血管疾病发病机制及预防的基础研究,同时也是研究新型治疗方法的基础。传统的心肌梗死动物模型制备方法,例如 Johns 法,主要采用冠状动脉左前降支结扎法,已得以广泛应用,但仍然存在耗时长、操作步骤繁琐、动物存活率低等弊端[3-4]。本研究对传统的 Johns 法进行了改进,并以改进后的方法制备 Sprague-Dawley (SD)大鼠心肌梗死模型。现将研究结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　实验动物　清洁级成年雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(221.5±23.4)g,由湖北医药学院实验动物中心提供。将 30 只 SD 大鼠随机分为心肌梗死模型组(20 只)和假手术模型组(10 只)。

1.2　仪器与试剂　BL2420E 型生物信号采集与处理系统购自成都泰盟科技有限公司,ECGenie 型小动物心电图机购自美国 Mouse Specifics 公司。异氟醚、苏木素-伊红(HE)染色剂、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)购自美国 Sigma 公司,中性树

*　**基金项目:**国家自然科学青年基金资助项目(81401447)。

作者简介:裴之俊,男,主治医师,博士,主要从事分子影像学及干细胞治疗研究。

胶购自中药化学试剂公司，Hochest33342 购自浙江杭州碧云天生物技术研究所。

1.3　方法

1.3.1　动物模型制备　心肌梗死动物模型的制备主要采用 Johns 法，同时参考 Fisbein 等[5]、Pfeffer 等[6] 和 Tarnavski 等[7]提出的制备方法。心肌梗死模型组制备方法：采用小动物气体麻醉箱对 SD 大鼠进行异氟醚预麻醉，完全麻醉后接气体麻醉呼吸面罩，仰卧位固定于手术台；胸前皮肤去毛、消毒，顺肋间隙方向于胸骨左旁第 3～4 肋间切开皮肤，切口长约 2 cm，同时切开深、浅筋膜，钝性分离胸大肌和前锯肌，显露肋骨，充分止血后，由第 4 肋间入胸，钝性分离肋间肌，用止血钳轻轻分离心包膜，迅速开胸挤出心脏，用 5-0 无创缝合针结扎左冠状动脉前降支，迅速归回心脏；撤去气体麻醉面罩，用止血钳夹住胸前创口，进行心脏按压直至大鼠恢复自主呼吸；逐层缝合胸壁。假手术模型组制备方法：用 5-0 无创缝合针穿行大鼠肺动脉圆锥与左心耳下缘交界的左冠状动脉前降支，不打结；其余操作过程与心肌梗死模型组相同。采用小动物心电图仪于术后第 2、7 天行三导联心电图检测。

1.3.2　术后处理　术后向大鼠腹腔内注射 50 万单位青霉素用于预防感染；采用台灯照射的方法进行保温，保温时间 6 h。术后给予大鼠正常饮食，清洁饮水，饮水每天更换，饲养笼内垫料每 3 天更换 1 次。

1.3.3　血流动力学检测　心肌梗死模型组和假手术模型组大鼠饲养 1 周后，以 3%戊巴比妥钠按 50 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉，保持呼吸道通畅，进行气管切开并插管；沿原切口进胸，0.3%肝素钠生理盐水溶液抗凝，将 2F 聚乙烯导管自心尖插入左心室腔内心底方向，连接压力换能器和生物信号采集与处理系统；导入血流动力学检测系统，记录左心室压力（LVP）曲线，分别获取左心室收缩压（LVSP）、左心室舒张末压（LVEDP）、颈总动脉收缩压（SBP）和舒张压（DBP）检测结果，同时将 LVP 电信号同步输入微分器，记录曲线，计算 LVP 上升和下降的最大速率（±dp/dtmax）等参数。

1.3.4　TTC 染色及 HE 染色　术后 4 周，采用尾静脉注射 10%氯化钾（KCl）的方法处死大鼠，取出心脏，观察外形特征后沿中线切开。取部分心脏组织置 37 ℃恒温箱，于 10 mL 1%TTC 磷酸缓冲液（pH＝7.4）中孵育 10 min 后取出，于 35%～40%甲醛溶液中固定 1 h 以加强染色对比效果，待色差明显后，取出左心室断面，将切面展平。另取部分心脏组织，4%多聚甲醛固定后石蜡包埋、切片，切片厚度 3 μm，行 HE 染色，中性树胶封片；显微镜下观察并照相。

1.4　统计学处理　采用 SPSS20.0 软件进行数据处理和统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间均数比较采用 t 检验。$P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　一般情况　心肌梗死模型组入组 SD 大鼠 20 只，术中心跳骤停和室颤死亡 2 只，麻醉过量死亡 1 只，术后 2 周死亡 1 只，剩余 16 只大鼠存活 4 周，存活率 80.0%。假手术模型组入组 SD 大鼠 10 只，术中心跳骤停死亡 2 只，剩余 8 只大鼠存活 4 周，存活率 80.0%。

2.2　心电图检测结果　心肌梗死模型组大鼠术后第 2、7 天心电图可见 ST 段明显抬高。假手术模型组大鼠术后第 2、7 天心电图未见明显异常。心肌梗死模型组大鼠心电图检测结果见图 1。

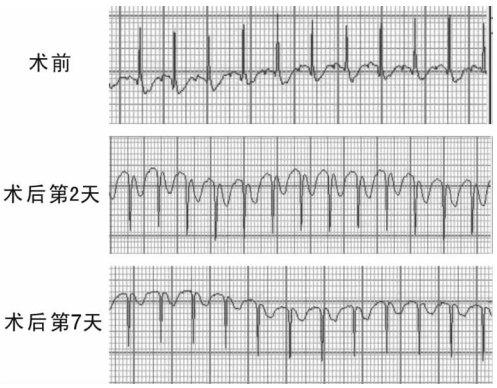
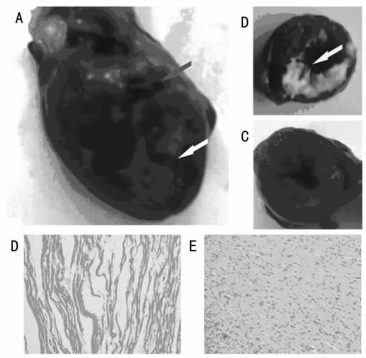


图 1　心肌梗死模型组大鼠心电图检测结果

2.3　血流动力学检测结果　术后 1 周血流动力学检测结果见表 1。心肌梗死模型组大鼠 DBP、SBP、LVSP 和 ±dp/dtmax 均低于假手术模型组，心率和 LVEDP 则明显升高，各指标检测结果组间比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4　TTC 染色及 HE 染色结果　心肌梗死模型组大鼠心肌色泽变白，局部心肌运动减弱（见图 2A）。TTC 染色可见梗死心肌、正常心肌色差明显，坏死心肌呈白色，未坏死心肌呈红色（见图 2B 及图 2C）。HE 染色可见正常心肌细胞呈梭形，紧密、规则排列（见图 2D）；梗死心肌细胞肿胀、排列紊乱，出现空泡，甚至断裂，部分断裂心肌细胞间隙见炎症细胞浸润（见图 2E）。



A 为术后心脏外观（上方箭头所示为结扎区，下方箭头所示为梗死区）；B 为梗死心肌 TTC 染色（箭头所示坏死心肌，呈白色）；C 为正常心肌 TTC 染色；D 为正常心肌 HE 染色（200×）；E 为梗死心肌 HE 染色（200×）。

图 2　TTC 染色及 HE 染色结果

表 1　各研究组大鼠血流动力学检测结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)	心率 (次/分钟)	LVSP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	+dp/dtmax (mm Hg)	−dp/dtmax (mm Hg)
心肌梗死模型组	16	115.1±1.2*	62.3±2.2*	416±21*	111.2±3.7*	12.4±2.1*	3.14±0.19*	3.49±0.28*
假手术模型组	8	154.2±2.8	121.1±1.9	321±17	191.1±2.6	1.6±0.3	5.59±0.49	6.18±0.21

注：与假手术模型组比较，* $P<0.05$。

3 讨　论

心肌梗死动物模型不仅可用于缺血性心血管疾病发病机制的研究,更有助于开展新型治疗方法相关基础研究。可用于制备心肌梗死动物模型的方法较多,但各有利弊。本研究以 Johns 法为基础,参考其他学者提出的制备方法进行了适当改进,在大鼠自主呼吸条件下迅速开胸,挤出心脏后结扎冠状动脉前降支。与 Johns 法相比,本方法具有操作简单、创伤小、重复性好、成功率高等优点。手术过程中采用异氟醚气体麻醉,不仅确保了手术安全进行,而且有助于大鼠在术后尽快苏醒,在一定程度上能够避免麻醉过深导致大鼠死亡。传统方法采用戊巴比妥钠按 30～50 mg/kg 的剂量进行深度麻醉,有可能导致呼吸道分泌物过多,引起气道堵塞和呼吸抑制。采用异氟醚气体进行麻醉时,大鼠在停止麻醉后极短时间内即可苏醒,促进了自主呼吸能力的恢复,也增加了大鼠的存活率。

本研究采用钝性分离的方法于第 4 肋间暴露心脏,不剪断肋骨,创伤小,保持了大鼠胸部正常的解剖结构,不影响其功能,有利于术后迅速恢复。同时,手术过程中心脏完全暴露于体外,手术视野大,便于结扎。传统的心肌梗死动物模型制备方法通常是在呼吸机支持下开胸后结扎冠状动脉左前降支,手术过程相对繁琐,需插管后开胸手术,耗时长,且技术要求高,难于掌握。此外,采用该方法对动物的创伤较大,心脏往往产生移位,易导致血流动力混乱和心律失常等并发症。采用传统方法制备模型动物时,手术操作及术后护理等因素对大鼠的存活率影响较大,如气管切开、气管插管、面罩呼吸等。虽然术中采用呼吸机辅助呼吸可维持大鼠开胸后的正常呼吸,但需要进行气管插管,增加了创伤和分泌物的产生,容易造成窒息。而且,经口气管插管相对较难,也增加手术时间和术中麻醉风险。

除麻醉方法、手术方案外,术中细节及处理、术后护理等因素对心肌梗死动物模型的制备也比较重要。(1)手术创口不易过大,需要保证较快的分离速度;(2)心脏暴露时间直接影响大鼠存活率,因此应尽可能缩短开胸时间;(3)结扎冠状动脉应迅速、准确,不可力度过大,尽量一次结扎成功,多次结扎可引起心律失常、失血过多等;(4)术中应保持动物体温,必要时可采用灯光照射保温的方法;(5)术中注意消毒,包括手术器械及术区消毒等;(6)术后可注射青霉素预防感染。在动物模型制备过程中,只有完善各项准备工作,认真处理好每项问题,才能增加手术成功率。

制备心肌梗死动物模型是开展心肌梗死发病机制和预防基础研究,以及研究新型治疗方法的第一步,采用快捷、安全的方法制备动物模型,并提高动物存活率尤为重要。本研究建立的方法效果理想且操作简单,适用于心肌梗死动物模型的制备。

参考文献

[1] Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, et al. Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction[J]. Circulation, 2013, 127(2): 213-223.

[2] Lilyanna S, Martinez EC, Vu TD, et al. Cord lining-mesenchymal stem cells graft supplemented with an omental flap induces myocardial revascularization and ameliorates cardiac dysfunction in a rat model of chronic ischemic heart failure[J]. Tissue Eng Part A, 2013, 19(11/12): 1303-1015.

[3] 张玉玲,周淑娴,雷娟,等. 血管紧张素Ⅱ-1 型受体拮抗剂对心肌梗死大鼠骨桥蛋白表达及胶原沉积的影响[J]. 中国循环杂志,2007,22(4):307-310.

[4] Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. A method of coronary occlusion in small animals [J]. Ann Surg, 1954, 140(5): 675-682.

[5] Fisbein MC, Melecan D, Marko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution[J]. Am J Pathol, 1978, 90(1): 57-70.

[6] Pfeffer MA, Pfeffer M, Fisbein MC, et al. Myocardial infarct and ventricular function in rats[J]. Circ Res, 1979, 44(4): 503-512.

[7] Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, et al. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies[J]. Physiol Genomics, 2004, 16(3): 349-360.

(收稿日期:2014-10-15　修回日期:2014-12-21)

(上接第 936 页)

者而言,根除 HP 的治疗有较大的益处,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 王莹. 功能性消化不良与幽门螺杆菌感染的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(13):2748-2749.

[2] 孙欢欢. 功能性消化不良的治疗进展[J]. 医学综述,2013,19(21):3937-3941.

[3] 赵卡冰,杨云生. 罗马Ⅱ与罗马Ⅲ诊断标准的比较与体会[J]. 临床消化病杂志,2010,22(1):3-5.

[4] 罗金波. 功能性消化不良发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(22):3431-3434.

[5] 孙佃军. 幽门螺杆菌感染与儿童功能性消化不良的相关分析[J]. 临床儿科杂志,2011,29(4):395.

[6] 赵煜,刘风林,甄丽娜,等. 幽门螺杆菌感染对儿童功能性消化不良胃电参数的影响[J]. 天津医药,2014,56(1):20-23.

[7] 樊荣荣,盛剑秋,武子涛,等. 功能性消化不良患者中幽门螺杆菌感染与胃蛋白酶原水平相关性研究[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2013,22(12):1205-1206.

[8] 杜颖,戴宁. 世界胃肠病学组织全球指南--发展中国家幽门螺杆菌感染[J]. 胃肠病学,2011,16(7):423-428.

[9] 谢昆华,唐尚伟,邓达玲. 功能性消化不良伴焦虑与幽门螺杆菌感染关系的研究[J]. 广西医学,2012,34(3):381-382.

[10] 夏菁,孙涛,孙涛. 幽门螺杆菌感染与功能性胃肠疾病的相关性研究[J]. 中国医药导报,2011,8(18):184-185.

(收稿日期:2014-08-18　修回日期:2014-12-19)