

大鼠心肌缺血再灌注损伤后无复流模型的制备

韦星, 张冯迪, 阳玉中, 谭凤梅, 颜姝, 陈娟

(南华大学心血管疾病研究所 湖南省动脉粥样硬化化学重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 动物模型; 心肌无复流; 缺血再灌注损伤

[摘要] **目的** 制备大鼠心肌缺血再灌注损伤后无复流模型, 探讨建立模型过程中的关键点, 为该疾病模型的成功复制提供参考。**方法** 选取 20 只 SD 大鼠, 随机分成无复流组 ($n=15$) 和假手术组 ($n=5$)。无复流组结扎冠状动脉左前降支 45 min 后再灌注 120 min; 假手术组只穿线不结扎。在再灌注末予硫磺素 S 活体染色确定无复流区, 同时监测大鼠呼吸及心电图变化。**结果** 20 只大鼠全部存活, 且心电图在心肌缺血期均出现心率加快、II 导联 ST 段抬高; 恢复心肌灌注后, ST 段下降 < 30%; 硫磺素 S 染色显示出无复流区域。**结论** 该方法可成功复制无复流动物模型, 且模型制作方法成功率高, 动物存活率也高。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

The establishment of rat model of no-reflow after myocardial ischemia-reperfusion injury

WEI Xing, ZHANG Feng-Di, YANG Yu-Zhong, TAN Feng-Mei, YAN Shu, CHEN Juan

(Institute of Cardiovascular Disease & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Animal model; Myocardial no-reflow; Ischemia-reperfusion injury

[ABSTRACT] **Aim** To prepare the no-reflow model after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and to explore the key points in the establishment of the model, so as to provide reference for the successful replication of the disease model. **Methods** Twenty SD rats were randomly divided into no-reflow group ($n=15$) and sham group ($n=5$). In the no-reflow group, the left anterior descending artery (LAD) was ligated 45 min and then perfused 120 min. The sham group rats underwent the same surgical procedures except that LAD was not ligated. At the end of reperfusion, thioflavin S staining was performed to determine the area of no-reflow (ANR), while monitoring the changes of respiration and electrocardiogram (ECG) in rats. **Results** Twenty rats were all survived, at the selected condition of ischemia and reperfusion time, all the rats in the no-reflow group showed obviously myocardial no-reflow phenomenon. After no-reflow model was established, the heart rate accelerated and ST segment elevation increased in the ischemic stage. Along with a progress of reperfusion, the heart rate and amplitude increased first and then decreased, while the increase values of ST segment drop less than 30%. **Conclusion** The method can successfully replicate the animal model of no-reflow and the method has high success rate and high animal survival rate.

目前临床上治疗急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的主要方法是采取经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 来恢复再灌注, 以减少心肌梗死的面积和改善临床预后^[1-2]。虽然相关梗死动脉的再灌注是挽救存活心肌的必要条件, 但是恢复冠状动脉血流的过程中可以导致心肌损伤和心肌细胞凋亡^[3]。

无复流现象是指心肌缺血重新恢复血流使血管再通后, 仍存在心肌组织低灌注状态的现象, 现在也有很多学者提出无复流的本质是因为心肌微循环灌注障碍。再灌注无复流发生后可无症状或出现持续性心痛和 ST 段抬高^[4-5]。无复流是急性心肌梗死后的一个独立的临床预测指标, 并与心力衰竭和死亡率的增加有关^[6]。研究表明这种常见

[收稿日期] 2017-03-09

[修回日期] 2017-05-24

[基金项目] 湖南省科技厅项目 (2010FJ4086)

[作者简介] 韦星, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 wxing8139@163.com。

而严重的无复流现象的并发症甚至抵消了 PCI 所能带来的好处,在临床上引起心内科医师的高度重视。但是无复流的发生机制尚不完全清楚,由于无复流现象的基础和临床研究的相对局限性,较好的成功复制无复流动物模型可以为无复流的发病机制及病理生理研究提供重要的依据。本研究应用 SD 大鼠作为模型动物,探讨建立无复流动物模型中的关键点,为其能较为成功地复制提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 8 周龄雄性 SD 大鼠 20 只,SPF 级,体重 300 ± 20 g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,实验前进行适应性饲养 5~10 天。饲养条件:室温 $20^{\circ}\text{C}\sim 25^{\circ}\text{C}$,每笼 4 只,普通饮食喂养,自由饮水,实验前一晚禁食禁饮。实验动物均符合国家卫生研究所颁布的《实验动物管理和使用指南》。

1.2 大鼠无复流模型的制作

1.2.1 称重、麻醉、固定 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 ($30\sim 40$ mg/kg),待大鼠完全麻醉后,将大鼠以仰卧位固定于可控温度的动物实验台上,置入肛温温度计维持大鼠体温在 37°C 左右。手术过程中同步心电监护大鼠生命体征。备皮,行气管插管,启动呼吸机,呼吸机的参数需调整到生理参数。前期大量实验证明,调节潮气量为 10 mL,频率 75 次/分时可达到理想状态。实验过程中应随时观察大鼠的呼吸,根据个体状况随时做出调整,当大鼠无呼吸抵抗和呼吸机节律相同时可以准备开胸。

1.2.2 开胸 备皮消毒手术视野,在胸骨左缘 2~4 肋间做纵行切口,长约 4 cm,暴露胸大肌,逐层钝性分离胸部肌肉,以充分暴露肌肉下的肋骨及肋间隙,这个过程一定要小心避免损伤血管。分离第二肋、第三肋后从中间剪断肋骨,利用自制拉钩拉开肋骨断段,充分暴露心包,注意不要损伤肺叶。及时用纱布吸掉渗出的血液或体液,以保持手术视野的清晰。

1.2.3 结扎冠状动脉左前降支 45 min 小心剪开心包膜并分离,将心底脂肪去除,充分暴露心脏,找到左心耳和肺动脉圆锥。将带缝线的小圆针(4-0)自左心室侧穿入,针尖距离约 2~4 mm,进针深度 1~2 mm,穿过约 1/3 层心肌从肺动脉圆锥侧穿出。假手术组心脏只穿线不结扎。无复流组大鼠结扎冠状动脉左前降支时,需要借助约 0.5 cm 长小塑料软管垫在结扎动脉上方辅助结扎,打个活结,结扎力度以

看到软管有塌陷为准,切勿用力过度以免割破心脏^[7],这里是构建本模型的重点难点。结扎后若观察到左心室前壁发绀,可初步判断结扎冠状动脉左前降支成功,借助白炽灯更容易观察出此种变化。同时心电图上可以观察到 ST 段抬高和(或)T 波高耸,然后用三角针将皮肤连带下方的肌肉缝合。

1.2.4 再灌注 结扎 45 min 后,剪开皮肤缝线,再次用自制拉钩打开胸腔,暴露心脏。找到冠状动脉左前降支结扎线后,松开活结并取出小塑料软管使血管再通,恢复灌注 120 min。

1.2.5 心脏在体染色 再灌注结束后,从肾静脉注射 6% 硫磺素 S 0.4 mL,待血液循环 10 s 后,原位结扎冠状动脉左前降支,再次从肾静脉慢慢注入 2% Evens blue 0.4 mL,看到心脏变深蓝即为染色成功。在肾静脉注射染色剂时,用动脉夹固定进针部位以防止脱出,同时注意避免过度晃动,以免扎穿血管。迅速处死大鼠,夹闭心底血管后剪下心脏,放到装有 30 mL KCl 溶液中使心脏停跳,再放入生理盐水的培养皿中洗净。同时,剪除心底的结缔组织及右心房、右心室。将剩余的左心室用滤纸吸干后放到干净的培养皿中,再放入 -80°C 冰箱中冷冻约 10 min^[8]。取出心脏,用刀片沿心脏长轴将心脏切成 5 片,厚度约 2 mm,并按顺序、按方向在培养皿中排列好。然后放在 365 nm 紫外线透射仪中观察硫磺素 S 荧光,并记录结果。取出培养皿,在普通光照下观察 Evens blue 染色情况,蓝染的区域为非缺血区,未蓝染的区域为缺血区,即危险区域^[9]。然后将切片心脏置于装有现配的 2% TTC 溶液的小烧杯中,并用玻片压住心脏切片以维持切片平整,再将烧杯置于 37°C 水浴箱中孵育 15 min,期间每 5 min 翻动一次标本,以充分染色。梗死心肌会因为酶活性丧失无法与 TTC 发生反应而呈现苍白色,非梗死心肌则呈砖红色。TTC 染色完成后,将心脏切片置于 10% 甲醛中固定 24 h,可增强梗死区和非梗死区颜色对比以便于观察^[6],次日在普通光照下观察 TTC 染色情况。

2 结果

2.1 模型的建立

20 只 SD 大鼠全部存活,无复流组大鼠心肌都出现了明显的无复流现象,建模成功率为 100%。Evens blue 染色显示:假手术组全心蓝染(图 1A);无复流组箭头所示的蓝染区为非缺血区,其余区域为缺血区(图 1B)。硫磺素 S 染色显示:假手术组未出现无复

流区域(图 1C);无复流组箭头所示的无荧光相对暗区为无复流区(图 1D),其余的明亮蓝绿色荧光区域为血液恢复灌注区(图 1D)。TTC 染色显示:假手术

组未出现梗死区(图 1E);无复流组箭头所示的灰白色区域为梗死区,其余区域为未梗死区(图 1F)。

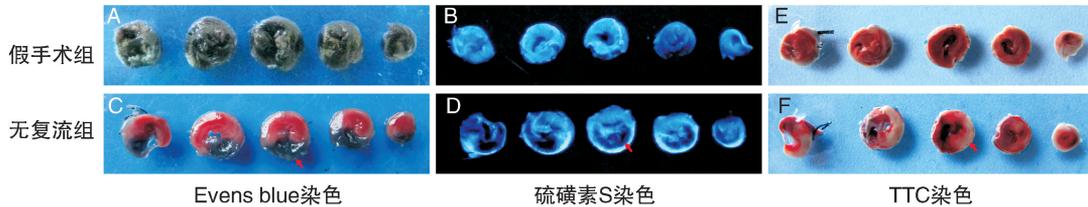


图 1. 大鼠心脏组织染色

Figure 1. Rat heart tissue staining

2.2 心电图监测

实验过程中记录大鼠术前、开胸后心电图,并在冠状动脉左前降支结扎后和再灌注后每隔 5 min 记录一次心电图。假手术组 ST 段及 T 波未见明显变化;无复流组心肌缺血后,可见 ST 段弓背抬高,

在再灌注后出现回落,但仍然持续较高且回落速度缓慢,ST 段下降<30%。如果心肌组织得到完全再灌注,抬高的 ST 段应该逐渐回落到基线,若再灌注开始后 ST 段持续抬高或者回落不明显则提示无复流的发生(图 2)。

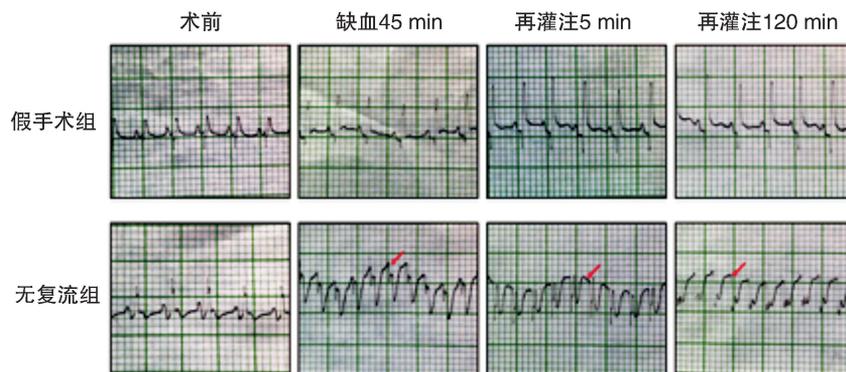


图 2. 大鼠心电图 II 导联的变化

Figure 2. Changes of electrocardiogram II lead in rats

3 讨论

文献报道心肌梗死患者急诊行 PCI 时无复流的发生率高达 5%~50%^[10],如何防治无复流是提高这类患者手术疗效和改善预后的关键。由于无复流现象在基础和临床研究中相对局限,其发生机制尚不完全清楚,建立理想的无复流动物模型意义重大。

本模型制作采用 SD 大鼠,相对较大的动物如猪、狗而言成本较低,且有广泛的转基因鼠可供选择,还有大量针对其生理特性而设计的仪器,如大鼠呼吸机、心电图仪等可供使用,这都是其他动物所不具备的优点。但是大鼠心脏较小,对手术操作技能要求较高,特别是在定位结扎冠状动脉左前降支时难度较大。采用结扎冠状动脉左前降支制备

大鼠无复流动物模型是模拟临床急性或慢性心脏病的经典方法^[11]。制备过程行开胸手术时,易发生各种意外及并发症最终导致大鼠死亡,为避免缺血和再灌注损伤事件的发生本研究在手术方式上做出了许多优化,并总结出了一些实验过程中需要特别注意的事项及关键点。

预实验使用了水合氯醛、乌拉坦和戊巴比妥钠三种麻醉药,其中水合氯醛极易引起呼吸抑制、痰液增多而致大鼠死亡;而乌拉坦由于药物毒性强,大鼠麻醉后不给予任何处理的情况下很难苏醒;所以最后选择总体状况比较好的戊巴比妥钠。实验过程中全程监测大鼠的生命体征,根据大鼠个体情况调整呼吸机的潮气量和呼吸频率,并注意维持大鼠体温在 37℃ 左右,过高过低都会影响到实验结

果。开胸缺血再灌过程是本实验的重点,冠状动脉左前降支起始端在左心耳和肺动脉圆锥交界处,通常呈鲜红色且强有力的搏动,注意与伴行静脉区分以免结扎错血管。值得注意的是,由于冠状动脉左前降支较难精确定位且个体差异很大,导致容易出现结扎位置不当从而影响实验进程。经过前期大量的预实验我们总结出在不确定冠状动脉左前降支位置时,结扎点尽可能选择在左心耳下方 1~2 mm 处。结扎时进针太深易扎入左心室而太浅又易损伤冠状动脉左前降支,还要注意避免进针过宽而穿透右侧较薄弱的右室壁而造成心脏出血。进针时可以借助无齿镊轻轻夹住心底部以固定心脏,但不可用力过度且每次夹尽量不要超过 5 s 以免造成心脏缺血而影响实验结果。如果在术中不慎损伤冠状动脉左前降支,应立即找到出血点进行紧急止血,若不能有效止血,建议予以大鼠安乐死,因为其无法耐受后期的缺血再灌染色等过程。

本实验之所以选择自制拉钩来暴露手术视野,因其相对小动物扩胸器而言能有效地减少损伤及出血量。术后行关胸时尽量抽出胸腔内气体,避免气胸的形成。同时可避免心电图的基线大幅度波动,减少胸腔体温的散失。关闭胸腔时抽净胸腔内残余气体是影响实验成败的一个关键点,因其关胸后胸腔内残余过多的气体可能会造成大鼠出现腹式呼吸,导致其呼吸频率逐渐减慢。染色剂注入可以选择颈静脉、肾静脉、尾静脉等,根据实验的情况进行适当的选择。本实验最终选择容易辨认且能快速分离的肾静脉注入染色剂,是由于再灌结束后需取大量血液的同时并保证心脏在染色期间仍能维持强有力的搏动。硫磺素 S 染色对诊断实验性无复流的敏感性及其特异性均较高,血流恢复的心肌因结合了硫磺素 S 会因荧光激发呈现出明亮的蓝绿色,而无复流区则因无硫磺素 S 而对荧光无反应。由于荧光会迅速衰减,从硫磺素 S 染色到记录结果需尽量在心脏离体 30 min 内完成且注意避光以免荧光剂分解。TTC 染色试剂采取现配现用并严格避光,染色过程中用玻片压住心脏切片,每 5 min 翻面,能防止心脏切片卷曲又能充分染色。为了增强梗死区和非梗死区颜色对比便于观察,再将其放入 10% 甲醛中固定,24 h 后记录结果。

本研究所描述的模型制作方法与其他文献报道相比有以下优点:存活率高,没有出现实验过程动物死亡情况,建模成功率高达 100%,所有无复流

组大鼠均出现明显的无复流现象。另外,掌握这种技术需要较熟练的外科技术,这只能通过不断实践来获得。综上所述,在进行手术时特别需要注意方案中提到的地方,将大幅度改善动物的存活率以及提高实验结果的可靠性。一旦掌握了这种手术方法,能较好的成功复制无复流动物模型。

[参考文献]

- [1] Sabin P, Koshy AG, Gupta PN, et al. Predictors of no-reflow during primary angioplasty for acute myocardial infarction, from Medical College Hospital, Trivandrum [J]. *Indian Heart J*, 2017, 69 (Suppl 1): S34-S45.
- [2] 邓长金, 金露萍, 成威, 等. 血栓抽吸对老年急性 ST 段抬高型心肌梗死患者直接 PCI 术的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(9): 923-926.
- [3] Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting myocardial reperfusion injury: the search continues[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373 (11): 1 073-075.
- [4] Lim SY. No-reflow phenomenon by intracoronary thrombus in acute myocardial infarction[J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(1): 38-44.
- [5] Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: state of the art[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2015, 108 (12): 661-674.
- [6] Gupta S, Gupta MM. No reflow phenomenon in percutaneous coronary interventions in ST-segment elevation myocardial infarction[J]. *Indian Heart J*, 2016, 68(4): 539-551.
- [7] Kim SC, Boehm O, Meyer R, et al. A murine closed-chest model of myocardial ischemia and reperfusion [J]. *J Vis Exp*, 2012, 65: e3896.
- [8] Xu Z, Alloush J, Beck E, et al. A murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury through ligation of the left anterior descending artery [J]. *J Vis Exp*, 2014, 86, doi: 10.3791/51329.
- [9] Cozzi E, Hazarika S, Stallings HR, et al. Ultrafine particulate matter exposure augments ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 291 (2): H894-H903.
- [10] Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54(4): 281-292.
- [11] Borst O, Ochmann C, Schonberger T, et al. Methods employed for induction and analysis of experimental myocardial infarction in mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(1): 1-12.

(此文编辑 文玉珊)