

大鼠冠心病心肌梗死模型制备的新方法^①

张世田¹, 庞路路², 冯悦², 宁晚玲², 黄岑汉¹, 王露瑶¹, 黄小珊², 唐汉庆^{1②}

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 93625430@qq.com;

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200)

摘要: **目的** 通过结扎大鼠左心室回旋支末梢血管, 探索一种制作大鼠心肌梗死模型的新方法。 **方法** 将 90 只 SD 大鼠随机分为对照组(10 只)和模型组(80 只), 大鼠经腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后, 颈部行气管切开插管术, 呼吸机维持呼吸。对照组只开胸不结扎; 模型组开胸结扎左心室回旋支末梢血管, 术后笼中饲养 4 周, 观察大鼠形态、行为学、呼吸改变, 心电图、梗死心肌表现, 组织病理学 HE 切片, 并对其成活率进行统计, 描述模型制作成功的标准。 **结果** 经过上述方法造模后, 模型组大鼠形态、行为学、呼吸改变符合冠心病心力衰竭特征, 心电图表现符合冠心病心肌梗死的动态演变过程, 梗死心肌表现符合心肌梗死室壁瘤特征, 组织病理 HE 染色示心肌坏死符合冠心病心肌梗死特征。且术后成活率(即造模成功率)达到 83.75%, 各项指标符合临床冠心病心肌梗死标准。 **结论** 结扎大鼠左心室回旋支末梢制作大鼠心肌梗死模型, 方法简单、稳定快速, 造模成功率高、可控性好, 与临床冠心病心肌梗死相似度高, 是一种理想的造模新方法。

关键词: 大鼠; 心肌梗死; 模型; 动物; 左心室回旋支

中图分类号: R542.2⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2017)03-0179-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2017.03.005

A new method for preparation the rat models of myocardial infarction with coronary heart disease

Zhang Shitian¹, Pang Lulu², Feng Yue², Ning Wanling², Huang Cenhan¹,
Wang Luyao¹, Huang Xiaoshan², Tang Hanqing¹

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: 93625430@qq.com; 2. Guangxi University of Chinese

Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore a new method for establishing rat models of myocardial infarction (MI) by ligating peripheral vessels of left circumflex branch in the left ventricular. **Methods** Ninety SD rats were randomly divided into a control group ($n=10$) and a model group ($n=80$). After the rats were anesthetized by intraperitoneal injection with 10% chloral hydrate, a tracheotomy for tracheal intubation via neck was performed. The respiratory ventilator was used to keep respiration. The thoracotomy without ligation was performed for rats of control group. The thoracotomy was performed for ligating peripheral vessels of left circumflex branch in rats of model group. The rats were fed in cage for 4 weeks after operation. The rats morphological, behavior, respiratory changes, electrocardiogram, infarcted myocardium presentation, histopathological HE slices were observed and the survival rate was recorded. The criteria for success models were described.

Results After modeling, the morphological, behavioral and respiratory changes of the rats were consistent with the characteristics of heart failure of coronary heart disease. The ECG showed the dynamic evolution of myocardial infarction (MI) of coronary heart disease. Infarcted myocardium presentations was consistent with myocardial aneurysm of MI, and histopathological HE staining showed myocardium necrosis was consistent with the characteristics of MI of coronary heart disease, and the post-operative survival rate (success rate of

① 基金项目: 国家自然科学基金项目(81460658); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻 1347003-4)

② 通信作者, E-mail: phdtanghanqing@163.com

modeling) reached to 83.75%. Each index was consistent with standards of clinical MI of coronary heart disease. **Conclusion** Establishing the rat models of myocardial infarction by ligating peripheral vessels of left circumflex branch in the left ventricular is simple, stable and rapid. The success rate of modeling is high and the controllability is good, which has high similarity to myocardial infarction of clinical coronary heart disease. It is an ideal modeling method.

Key words: rats; myocardial infarction; models, animal; left circumflex branch in left ventricular

大鼠心肌梗死模型是研究冠心病心肌梗死发病机制及相关药物药理作用的常用动物疾病模型,结扎大鼠左冠状动脉前降支造模是许多文献记载比较多的一种手术方法^[1],但经解剖多只大鼠发现,左心室回旋支与前降支相比,其走行明显,左心末梢分支分布广泛,变异小,此处结扎便于操作、可控性好,我们在既往大鼠心肌梗死模型制作的基础上简化操作步骤,采用结扎大鼠左心室回旋支末梢血管来制作心肌梗死模型,通过分析观察相关指标,与临床冠心病心肌梗死相比较,判定该模型的制作效果,探索制作大鼠心肌梗死模型的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物、药品、手术器械和消耗品 SD大鼠90只,SPF级,雄性,日龄90d,体重250~280g,由右江民族医学院实验动物中心提供,动物许可证号[SCXK-2012-0003]。随机抽取10只大鼠作为假手术对照组(只开胸不结扎),其余80只作为模型组(结扎左心室回旋支末梢血管)。生理盐水、碘伏、75%酒精、10%的水合氯醛、青霉素。持针器,镊子,手术剪,开口器(回形针自制或开睑器),蚊氏止血钳,注射器(1ml、5ml),缝合针(O,1/2,4×6、6×14),手术缝合线(6-0,4-0),无菌纱布,棉棒,备皮工具(手术剪或理发器),大鼠解剖板,小手术无影灯。心电图机(上海光电医用电子仪器有限公司 ECG-6511),动物呼吸机(上海玉研科学仪器有限公司 V-100型)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备

1.2.1.1 麻醉^[2] 术前给大鼠称重,按照0.35ml/100g,用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,1~2min之后,判断大鼠意识和麻醉程度,然后在解剖板上固定大鼠四肢,四肢连接心电图机,记录Ⅱ导联心电图。

1.2.1.2 术前准备 手术器械酒精常规消毒,用备皮工具于气管切开部位和开胸部位备皮,碘伏常规手术区域消毒。

1.2.1.3 气管插管 用手术剪在大鼠颈部正中做一纵行1cm切口(切口尽量要小),逐层分离皮肤浅筋膜、筋膜下组织(注意保护甲状腺组织,以防不利于切口缝合)、颈前肌肉,暴露气管,用两把小的止血钳固定气管,用大号注射器针头开口或者眼科剪在第2、第3

软骨环处做一横向切口(切口尽量要小于气管插管,以防漏气),行气管插管(可用静脉留置针做气管插管,以便调节深度),达到合适的深度,打开调整好的呼吸机(频率80次/min,吸呼比1:1,潮气量3~4ml/100g),插管用胶布固定(不用手术线固定),切口敷以生理盐水纱布保护伤口。

1.2.1.4 开胸结扎^[3] 气管插管后,在心脏波动最明显处,胸骨左缘1cm处作纵行切口,逐层钝性分离胸大肌和前锯肌,暴露3、4肋间,顺肋间隙方向用止血钳钝性分离至胸腔,用开口器(回形针自制或开睑器)撑开两肋骨,看到柔软海绵状的肺脏和跳动的的心脏,如果不在结扎部位,可剪断附近肋骨,寻找结扎部位。用镊子剥离心包膜,用湿生理盐水棉签分离心脏附近心包及肺组织,寻找左心回旋支主干及其末梢,用手指挤压胸廓固定心脏,用6-0号手术缝合线结扎包含末梢血管的心肌组织(宽度和深度约0.10cm×0.15cm),结扎心肌周围颜色变暗,留线在心脏。

1.2.1.5 闭胸,缝合气管 用4-0线迅速缝合肋骨,并挤压排除胸腔内空气,缝合肌肉和皮肤,消毒切口。拔出气管插管,逐层缝合气管前肌和皮肤,消毒手术切口(造模总过程约20min)。

1.2.1.6 术后处理^[4] 术后完成Ⅱ导联心电图记录,肌内注射10万U青霉素预防感染,标号后将大鼠放普通环境笼中室温饲养,待其苏醒。

1.2.1.7 造模成功的标准 ①术中冠脉结扎明确。②出现明显的形态学表现、气促、呼吸困难等心衰症状。③心电图检测有急性缺血坏死(ST段抬高)、2周后有陈旧性梗死心电图(病理性Q波)动态演变表现。④解剖大鼠发现结扎部位心肌缺血坏死明显。该标准的各项表现和指标符合临床冠心病心肌梗死的临床特征。

1.2.2 观察、取材、记录 观察并记录手术后大鼠的形态、行为学、呼吸情况。分别记录大鼠结扎前、结扎5min后、结扎16d后不同时间段心电图表现。解剖大鼠,观察心肌梗死情况。取梗死部位组织做病理学HE染色切片。统计大鼠成活率。

2 结果

2.1 大鼠形态、行为学、呼吸情况 正常对照组大鼠精神状态相对较好,活动自如,毛色光滑柔顺、舌苔四

肢粉红,呼吸正常。模型组大鼠精神状态差,活动度明显减弱,出现抱团、消瘦现象,毛色发黄、粗糙、松散、光泽度差,舌苔较以前变暗,四肢轻度发绀,进食、饮水较以前减少,呼吸急促、肺部可闻及明显的干湿啰音。其症状与临床冠心病急性心肌梗死、心力衰竭症状相似。

2.2 大鼠心电图表现 大鼠心电图选取 II 导联进行分析,模型组结扎前心电图与对照组正常心电图相同(见图 1),以“M”型为主,结扎 5 min 后出现明显 ST 段抬高,心肌缺血心电图表现(见图 2)。结扎 16 d 后:电压基本恢复至正常,但心肌出现陈旧性坏死病理性 Q 波表现(见图 3)。心电图表现与冠心病心肌梗死的动态演变过程相似。

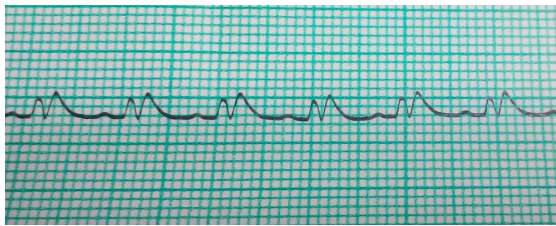


图 1 大鼠正常心电图[50mm/s ECG HUM 20mm/V(×1)]

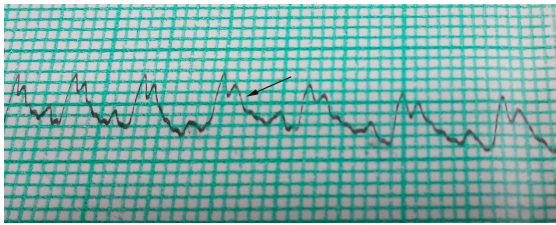


图 2 大鼠冠脉结扎 5 min 后心电图
[50mm/s ECG HUM 20mm/V(×1)]
注:图中箭头表示 ST 段抬高

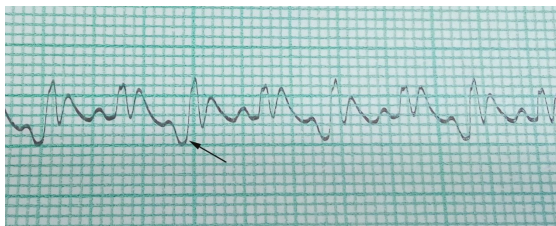


图 3 大鼠冠脉结扎 16 d 后心电图
[50mm/s ECG HUM 20mm/V(×1)]
注:图中箭头表示病理性 Q 波

2.3 心肌坏死情况观察 造模 4 周后解剖大鼠心脏,对照组未见心肌坏死表现,模型组肉眼观察可见白色浑浊样坏死组织(见图 4):白色黏膜由坏死组织、纤维化组织及瘢痕组织混合而成,向外膨出明显,并与周围胸壁黏膜组织粘连,结扎线头被黏膜组织包埋,部分室

壁因坏死溶解变薄、塌陷或膨出,形成心肌室壁瘤,部分与周围组织粘连(见图 5),与梗死后综合征相似,梗死部位、梗死面积的大小与结扎相关血管部位有关。

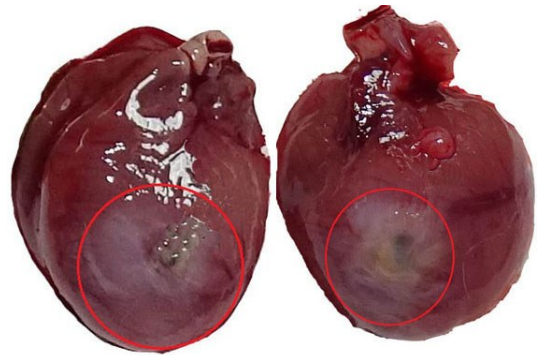


图 4 模型组大鼠心脏图
注:圈内为坏死心肌组织

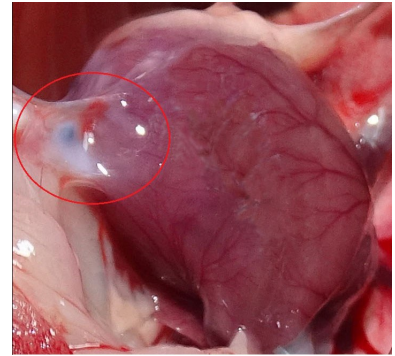


图 5 心肌梗死大鼠心脏与胸壁粘连图
注:圈内为坏死心肌与胸壁粘连

2.4 梗死区组织病理学 HE 染色 大鼠心肌组织 HE 染色,假手术对照组心肌病理切片(见图 6A)显示心脏横纹肌结构完整、清晰、排列整齐、染色均一,未见溶解、坏死和炎症细胞浸润。模型组心肌坏死区心肌染色变淡,心肌纤维排列紊乱(见图 6B)伴有明显溶解坏死,胞核变小、无序排列,纤维组织增生,炎症细胞浸润明显,组织病理切片示心肌坏死符合冠心病心肌梗死特征。

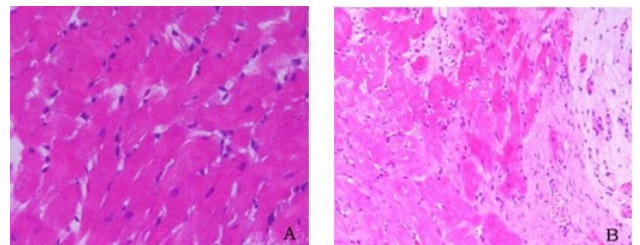


图 6 大鼠心肌组织 HE 染色(HE, ×200)
注:A:假手术对照组大鼠;B:模型组大鼠

2.5 大鼠成活率/造模成功率 手术4周后,正常对照组大鼠未见死亡;模型组80只大鼠,死亡13只,成活率(即造模成功率)83.75%。手术后前5d死亡8只,死亡率最高,之后大鼠精神状态稳定,呼吸、活动度、进食、饮水较以前好转,死亡明显减少,切口缝线大鼠可自行拆除,术口达到Ⅰ级愈合。

3 讨论

动物实验是医学实验研究的前沿,动物疾病模型是现代医学研究人类疾病发生机制、揭示疾病发展规律及评价药物作用研究的重要工具,建立稳定可靠、统一规范、重复性好的动物疾病模型是开展实验研究的前提。

目前,大鼠急性心肌梗死、心肌缺血及心肌梗死再灌注模型的制备,多以结扎左冠状动脉前降支为主^[5-7],而结扎大鼠左心回旋支,尚无相关文献报道。解剖多只大鼠发现(见图7A),左冠状动脉位于左心耳和肺动脉圆锥之间,有3个相对较细的分支,中间分支为前降支,变异性较大,个别走行隐匿不清晰,不便于结扎,很多采用盲扎法^[8-9],定位模糊,容易误判,如结扎不到位,梗死不明显,容易导致造模失败或成功率较低。根据解剖多只大鼠并参考大鼠冠脉的走行(见图7B)可知,左心室回旋支主干粗大、清晰,分支走行明显,末梢分支广且主要为左心室供血,供血面积广,便于结扎控制梗死面积,若结扎此动脉末梢血管,其梗死部位、面积及心功能等方面更容易控制,因此,选择结扎左心室回旋支末梢血管造模具有一定的意义。

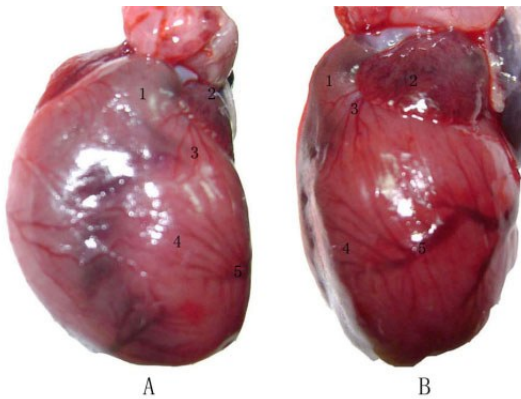


图7 大鼠心脏解剖图

注:A:心脏腹面;B心脏侧面;1.肺动脉圆锥(Pulmonary conus);2.左心耳(Left atrium);3.左冠状动脉(Left coronary artery);4.左心室(Left ventricle);5.左心室回旋支(Left circumflex)

本实验采取改进后的方法,结扎大鼠左心室回旋支末梢制作大鼠心肌梗死模型,操作简便,可控性好;

不用剪断肋骨,开口小,损伤小;不需将心脏挤到胸腔外操作,避免过度牵拉心脏、大血管,减少肺脏损伤^[10],胸腔内即可完成结扎,操作简单,干扰因素少,感染机会小,根据结扎的部位和分支控制梗死面积。手术成功率为100%。术后4周大鼠成活率(即造模成功率)为83.75%,明显高于滕小梅等^[3]报道的结扎左冠状动脉前降支(存活率71.4%),实验过程中大鼠死亡的原因可能为结扎后梗死面积过大,无法代偿,心衰、呼衰死亡或伤口污染、裂开,感染死亡。

通过以上实验结果分析可知,采用改进后的方法结扎大鼠左心室回旋支末梢制作大鼠心肌缺血模型,操作简便易行、稳定快速,成功率高,可控性好,感染机会小且术后动物存活率高,与结扎左冠状动脉前降支相比具有一定的优势,符合临床冠心病心肌梗死的标准,能够达到冠心病心肌梗死疾病模型的要求和目的,是制作冠心病心肌梗死大鼠模型的一种新方法。

参考文献:

- [1] 周文武,林玲,陈军,等.冠脉结扎法制做大鼠心肌缺血模型[J].中国实验动物学报,2004,12(4):36-40.
- [2] 李贻奎,宁可永,梁嵘,等.大鼠冠状动脉结扎心肌缺血模型方法的改进[J].中国新药杂志,2005,14(4):427-428.
- [3] 滕小梅,贺继刚,沈振亚.直视下冠状动脉结扎法制作大鼠心肌缺血模型初步探讨[J].浙江临床医学,2013,15(2):184-186.
- [4] 张凯,谢世阳,王幼平,等.冠脉结扎法建立大鼠急性心肌梗死模型方法的探讨[J].中国中医急症,2014,23(8):1397-1399,1402.
- [5] Luo L, Chen B, Huang Y, et al. Cardioprotective activity of placental growth factor combined with oral supplementation of L-arginine in a rat model of acute myocardial infarction[J]. Drug Des Devel Ther,2016,10:3483-3492.
- [6] Ortiz V D, de Castro A L, Campos C, et al. Effects of thyroid hormones on aortic tissue after myocardial infarction in rats[J]. Eur J Pharmacol,2016,791:788-793.
- [7] Pongkan W, Pintana H, Jaiwongkam T, et al. Vildagliptin reduces cardiac ischemic-reperfusion injury in obese orchietomized rats[J]. J Endocrinol,2016,231(1):81-95.
- [8] 余惠珍,高洁,郑熙,等.冠脉结扎法在大鼠急性心肌梗死模型制作中的应用[J].中国心血管病研究,2016,14(8):752-754,768.
- [9] 闫奎坡,朱翠玲,孙彦琴,等.两种冠状动脉结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型比较[J].国际心血管病杂志,2016,43(2):107-109.
- [10] 杨文慧,郭涛,杨莉,等.大鼠急性心肌梗死模型的建立[J].中国老年学杂志,2015,35(21):6019-6021.

收稿日期:2017-04-11;修回日期:2017-05-11