

王平安,杨珂伟,王静,等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的改良方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(1): 104-108.
Wang PA, Yang KW, Wang J, et al. An improved method for establishing a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J].
Chin J Comp Med, 2020, 30(1): 104-108.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.01.017

大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的改良方法

王平安,杨珂伟,王 静,焦 成*

(武汉华联科生物技术有限公司,武汉 430206)

【摘要】 目的 综合评估大鼠心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)模型建立的改良方法。**方法** 将45只SD大鼠随机分为3组:快速操作组、常规开胸组和改良组,每组15只。分别采用快速操作、常规开胸造模及改良方法进行大鼠心肌缺血再灌注手术造模,收集大鼠心脏进行TTC+伊文思蓝染色观察,分别从造模成功率、大鼠存活率、心肌损伤情况三方面进行分析比较。**结果** 与快速造模和开胸造模组相比,改良方法造模的成功率、成活率均有所提高,且心肌梗死面积厚度统一。**结论** 心肌缺血再灌注损伤模型构建方法改良后的可行性较高,可推广应用。

【关键词】 心肌缺血再灌注损伤;改良方法;心肌梗死;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 01-0104-05

An improved method for establishing a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury

WANG Pingan, YANG Kewei, WANG Jing, JIAO Cheng*
(Wuhan Myhalic Biotechnology Co., Ltd., Wuhan 430206, China)

【Abstract】 Objective Comprehensive evaluation of an improved method of inducing myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** Forty-five SD rats were randomly divided into three groups: fast operation group, conventional thoracotomy group, and improved group ($n=15$ in each group). Rat models of MIRI were established by rapid operation, routine thoracotomy, and the improved method, respectively. TTC+Evans blue staining was used to observe rat hearts. The degree of injury was analyzed and compared regarding three aspects: success rate of modeling, survival rate of rats, and myocardial injury. **Results** Compared with the fast operation group and conventional thoracotomy group, the success rate and survival rate with the improved method were improved, and the area and thickness of myocardial infarction were the same. **Conclusions** The improved method of MIRI modeling is feasible and can be popularized.

【Keywords】 myocardial ischemia-reperfusion injury; improved method; myocardial infarction; rat

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)严重危害着全球人类的健康,成为主要死亡原因之一^[1]。目前,人们公认的对AMI最有效的治疗

方法是冠状动脉再灌注,但也伴随着再灌注损伤的问题^[2]。对于心肌缺血再灌注损伤的研究成为了全球的热点问题之一。大鼠心肌缺血再灌注损伤

[作者简介]王平安(1988—),女,硕士。E-mail: pinganw1988@163.com

[通信作者]焦成(1982—),男。E-mail: 1079281406@qq.com

(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 造模后大鼠的成活率及造模成功率是制约模拟临床心血管、药理药效等方面研究的关键因素之一,但构建一套标准的、可持续操作的心肌缺血模型的制约因素却有很多^[3-4]。快速操作法和常规开胸法是 MIRI 造模的两种常用方法,但存在开胸时间短对实验操作技术要求高、术中出血、气胸等因素导致模型成功率低下,因此,本研究对 MIRI 造模进行改良优化,并与这两种常用的方法进行比较,从模型构建成功率、大鼠存活率和心肌缺血损伤等方面探讨改良式造模操作的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 45 只,8 周龄,体重 280~300 g,由华中农业大学动物实验中心提供[SCXK(鄂)2015-0018]。本次研究实验动物的饲养、建模等均在 SPF 级屏障环境动物房实验操作间进行[SYXK(鄂)2018-0104],实验动物的使用遵循了 3R 原则。所有实验操作均获得武汉华联科生物技术有限公司实验动物福利伦理委员会的审批(批准号:HJK-20190218-01)。

1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司;TTC 染色剂、伊文思蓝染液均购自武汉华联科生物技术有限公司。呼吸机购自北京北瑞未来分析仪器有限公司;体视显微镜购自舜宇光学科技;心电图机购自广州市三锐电子科技有限公司;数码相机购自日本 Nikon 公司;小动物撑开器购自海德创业(北京)生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及模型构建

45 只 SD 大鼠随机分为 3 组:快速操作组、常规开胸组、改良组,每组 15 只。大鼠适应性饲养 1 周,自由进食,昼夜均衡,温度 23℃~26℃,湿度(50±5)%,术前 12 h 禁食不禁水。

快速操作组:依据文献报道^[5],采用不使用呼吸机快速造模方式进行造模。3%的戊巴比妥钠腹腔注射剂量 1.5 mL/kg 腹腔注射^[6],止血钳快速分开 3~4 肋间,挤出心脏快速结扎送回胸腔。用止血钳把皮肤夹住闭胸后观察心电图变化,成功标准 T 波高耸或倒置,缺血 30 min 后松开止血钳,抽出扎线再灌注。快速缝合胸腔及皮肤。

常规开胸组:依据文献报道^[7],采用开胸造模方式进行造模。大鼠麻醉后接呼吸机,常规开口剪断 2 根肋骨,打开胸腔充分暴露心脏后行结扎,在左心耳下方 3~4 mm 处左冠状动脉与后降支分叉处用现代标准代码 5-0 无创伤丝线穿过左冠脉降支,进针深度 0.2~0.4 mm,结扎后 30 min 后再灌注,闭胸缝合。

改良组:3%的戊巴比妥钠腹腔注射剂量 1.5 mL/kg 腹腔注射,颈部及胸腔毛发剪除消毒,颈部中间开口 1 cm,胸骨舌骨肌止血钳钝性分离暴露气管,显微剪刀切开小口,开口不宜过大,插入呼吸机插管,呼吸机参数:(呼吸频率:90 次/min;呼吸比:1:2;潮气量:11 cc)生理盐水棉球盖住创口。于第 3、4 肋骨间(可手按胸腔感知心脏跳动最明显位置)皮肤开口 1 cm,下行处有一条小静脉可两端止血钳夹住 10 s,剪刀剪断,肋间开小口 0.5 cm(图 1a)。2 个撑开器上下左右以肋骨配合撑开,可见心脏,止血钳挑开心包膜,再夹住胸腺部位固定,另一只手持针(5-0 缝合线,3×8 圆针)左心耳下方 3 mm 处进针(图 1b)。深度 1 mm,宽度 2 mm(图 1c)扎针进线后在上方放一根线径 0.53 mm,长 5 cm 鱼线,活结结扎(图 1d 和图 1e)。缝合闭胸,30 min 后轻抽鱼线再灌注(图 1f)。以上 3 组术后给予 80 万青霉素 0.5 mL/只抗炎。分别于实验后 24 h 和 1 周取材心脏。

1.3.2 观测指标

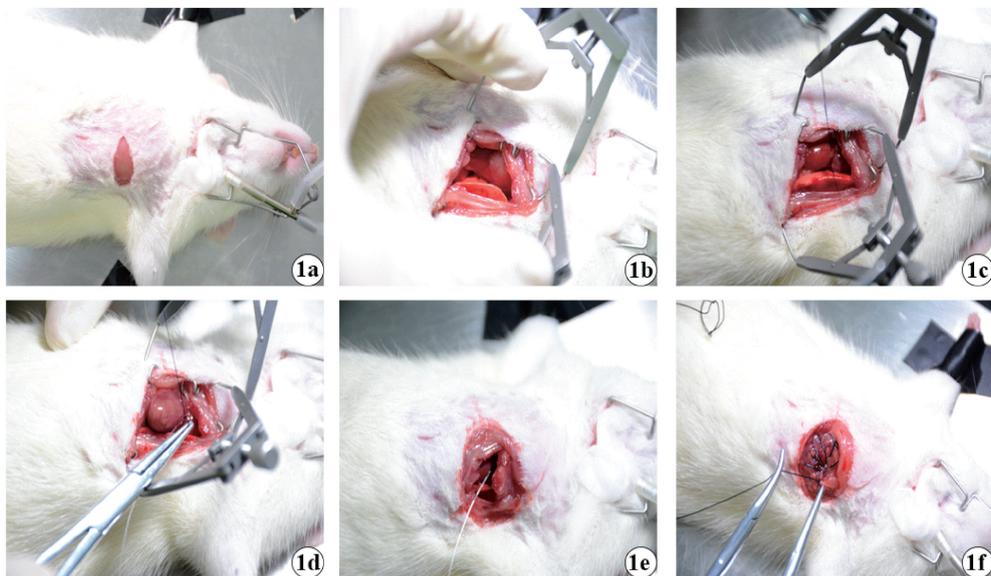
通过测量 II 导联心电图同步监测大鼠结扎 30 min 后的心电图表现,并与术前标准的 II 导联心电图比较,观察大鼠心电图有无再灌注心律失常现象。

1.3.3 心脏 TTC+伊文思蓝染色

缺血再灌注 24 h 和 1 周结束后,右侧颈内静脉内注入 1%伊文思蓝 1 mL。待鼠口唇蓝染后,取下心脏,剔除心房心耳,-20℃速冻约 20 min,便于切片。平行房室沟将左室切成 1.5~2 mm 厚的切片。切片入 TTC 染液(2%)避光浸染,30℃避光孵育 15~30 min,边孵育边观察样本颜色变化。切片入 10%中性福尔马林中固定 24 h。吸干组织表面液体,并将组织表面多余的染色液冲洗掉,此时可肉眼观察并立即拍照。

1.4 统计学方法

采用统计软件 SPSS 22.0 进行统计学分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

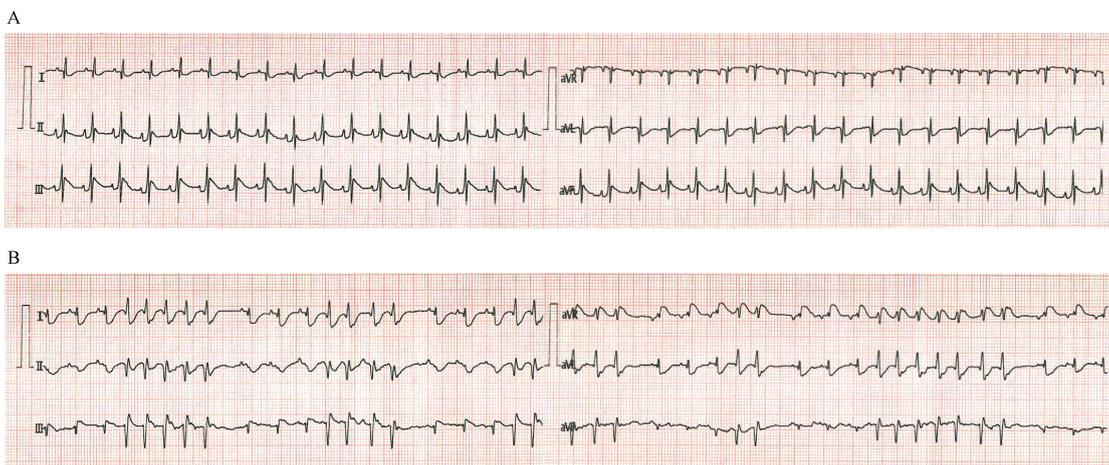


注:a:第3、4肋骨间皮肤开口1 cm;b:2个撑开器撑开切口,暴露心脏;c~d:左心耳下方3 mm处垫鱼线,活结结扎;e~f:撤撑开器,缝合切口。

图1 大鼠MIRI造模改良方法

Note. a, 1 cm skin opening between the 3rd and 4th ribs. b, Two surgical spreaders were used to open the incision and expose the heart. c-d, Ligation of a loose knot 3 mm below the left auricle with a fishline. e-f, Remove the spreader and suture the incision.

Figure 1 An improved method for establishing a rat model of MIRI



注:A:结扎前大鼠心电图;B:结扎后大鼠心电图。

图2 结扎前后大鼠心电图变化

Note. A, Electrocardiogram in rats before ligation. B, Electrocardiogram in rats after ligation.

Figure 2 Changes of electrocardiogram in rats before and after ligation

2 结果

2.1 造模成功心电图表现

大鼠结扎后心电图ST段出现抬高,表现出心律失常现象,提示心肌缺血再灌注大鼠模型构建成功,见图2。

2.2 模型存活率和成功率比较

记录三组大鼠的存活和造模成功情况,比较各组间的存活率和造模成功率:快速操作组7只大鼠死亡,存活率为53.33%,3只造模失败,造模成功率为33.33%;常规开胸组5只大鼠死亡,存活率为66.67%,2只造模失败,造模成功率为53.33%;改良组2只大鼠死亡,存活率和造模成功率均为86.67%。

2.3 MIRI 大鼠心肌损伤的病理情况比较

采用 TTC+伊文思蓝染色对三种方式造模 24 h 及 1 周后各组大鼠心肌缺血、梗死面积进行观察。如图 3 所示,造模 24 h 及 1 周后,快速操作组大鼠受手术视野结扎位置所限,缺血梗死面积不统一,快速操作组大鼠受灌注材料方法不同的影响,缺血梗死面积厚度不统一,而改良组大鼠由于手术视野开阔,结扎位置统一,缺血梗死面积较为统一。

3 讨论

AMI 在发达国家有着“头号杀手”的称号,而随着我国经济的快速发展以及生活方式的西化,使得我国 AMI 的发病率和死亡率呈现出逐年递增的趋势^[8]。当心肌缺血时,其代谢模式和超微结构均发生变化,恢复缺血部分的血流量是常用的治疗策略,然而,当血流量恢复时则易导致 MIRI 的发生^[9]。MIRI 的概念是由 Jennings 等^[10]根据组织细胞缺血后获得血液再灌注时,组织细胞缺血所造成的损伤并未得到减轻和恢复,反而加重的病理变化而首次提出的。MIRI 动物模型的成功建立可为 MIRI 的临床治疗以及药物开发提供实验基础,MIRI 动物模型的构建研究具有重大的意义,其构建方法多样,但也存在着相应的局限性。

快速操作法及常规开胸造模是目前广泛应用于心肌缺血再灌注模型的造模方法,具有操作较快、方便、视野开阔等优点,但由于快速操作法对于单人手术操作而言要求较高,胸腔外挤出心脏快速结扎时需快速操作,在开胸后 2 min 内完成挤出心脏、穿线等过程,且缺血时闭胸难度大,较难将胸腔

完全封闭,易气胸导致大鼠死亡。在实际操作过程中难度较大,不用呼吸机协助死亡率较高。而常规开胸法因剪断肋骨开口不整齐,在术后的缝合难度大,缝合线稍紧胸腔坍塌压迫肺呼吸,导致呼吸困难,易气胸,且缺血梗死面积较不一致,为后续的指导临床研究、药效评价、细胞治疗等研究带来诸多不利因素。因此,需要寻找一个快速、高成功率、低死亡率的造模方法。

用于构建 MIRI 模型的实验动物种类较多,根据接近人体病理生理的原则对实验动物进行选择,在进化关系上接近人类,基因背景清楚、繁殖周期短、模型重复率高的大鼠在模型制备上具有一定的优势^[11]。本次研究选择 SD 大鼠作为 MIRI 模型构建的实验动物,在以往造模方法的操作上进行改良,并与上述两种常用方法进行比较。相较于传统方法,经改良后的再灌注在出血量、创伤、呼吸顺畅、手术视野、操作难度等方面均有较大改善。因开口由二个撑开器配合撑开胸腔,动静脉小血管没有被切断,出血量微乎其微,垫鱼线缩短了再灌注时的解线再缝合时间,避免二次麻醉导致大鼠生理机能受损,达到了术后最好状态。闭胸缝合后胸腔完整度很好,避免出现死腔空腔保证了成功率及成活率,在缺血梗死面积及位置也较为统一。

综上所述,本实验主要对大鼠心肌缺血再灌注模型制备过程中进行改进,与快速操作组和常规开胸组相比,具有更高的造模存活率及成功率,对后期心肌缺血再灌注的模型构建具有重要的指导意义。

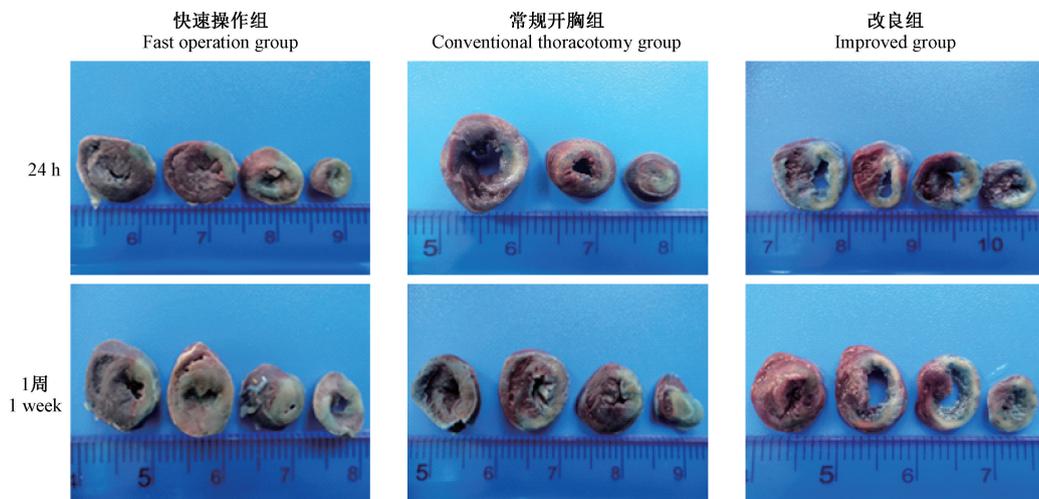


图 3 TTC+伊文思蓝染色观察造模后大鼠心肌缺血、梗死面积

Figure 3 Observation of myocardial ischemia and infarct size in rats by TTC+Evans blue staining

参考文献:

- [1] 张卫强, 王涛, 张志明, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进与评判[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3):311-316.
- [2] 刘付平, 姚宏伟, 李俊. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(3): 234-236.
- [3] 关雷, 金英, 王永安. 心肌缺血再灌注损伤动物模型建立的主要影响因素[J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(6):423-425+430.
- [4] 张东, 贾连群, 杨关林, 等. 急慢性心肌缺血动物模型造模方法研究简况[J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(5):75-77.
- [5] 李晓民, 汪克明, 刘婧, 等. 大鼠心肌缺血再灌注模型的有效复制方法[J]. 中国心血管病研究, 2007, 5(6):463-464.
- [6] 李陶奎, 赵乐, 何萍, 等. 提高结扎冠状动脉在体大鼠心肌梗死模型制作速度和质量的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7):948-950.
- [7] 吕铁伟, 田杰, 江德勤, 等. 急性心肌梗死动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(3): 166-169.
- [8] 陈可冀, 张敏州, 霍勇. 急性心肌梗死中西医结合诊疗专家共识[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(6):641-645.
- [9] Su HH, Chu YC, Liao JM, et al. *Phellinus linteus* mycelium alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury through autophagic regulation [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 175.
- [10] Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog [J]. *Arch Pathol*, 1960, 70: 68-78.
- [11] 侯梦梦, 邢冬梅, 刘璇, 等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的关键性问题[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(6):323-326.
- [收稿日期] 2019-06-26
-
- (上接第 98 页)
- [6] 董诚, 荣瑞章, 王晓宁, 等. 我国实验动物基础设施建设研究[J]. 实验动物科学, 2008, 25(3):34-38.
- [7] Liu Z, Cai Y, Wang Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell*, 2018, 172(4): 881-887.e7.
- [8] 张连峰. 我国常用实验动物资源的现状及对未来发展的思考[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10-11):39-44.
- [9] 黄韧, 薛成, 程树军, 等. 实验动物信息学与中国实验动物数据信息网建设[J]. 中国实验动物学杂志, 2010, 10(3):61-64.
- [10] Chen Z, Wang J, Bao L, et al. Human monoclonal antibodies targeting the haemagglutinin glycoprotein can neutralize H7N9 influenza virus [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6714.
- [11] Bao D, Ma Y, Zhang X, et al. Preliminary characterization of a leptin receptor knockout rat created by CRISPR/Cas9 system [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15942.
- [12] Liu Z, Li X, Zhang JT, et al. Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2 [J]. *Nature*, 2016, 530(7588): 98-102.
- [13] 贾敬敦. 动物种业科技创新战略研究报告[M]. 科学出版社, 2015.
- [14] 李继平, 金剑, 秦川. 实验动物在医学创新研究与发展中的作用[J]. 中国医药导报, 2014, 11(31):152-155.
- [收稿日期] 2018-10-24