

李清禹,杨浩然,贾伟伟,等. 不同剂量异丙肾上腺素致大鼠急性心肌损伤模型的制备及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 71-75,114.

Li QY, Yang HR, Jia WW, et al. Preparation and evaluation of an acute myocardial injury model induced by different doses of isoproterenol in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 71-75,114.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 010

不同剂量异丙肾上腺素致大鼠急性心肌损伤模型的制备及评价

李清禹¹,杨浩然¹,贾伟伟¹,任 珊¹,张宇航¹,帅智峰²,林 岩^{1*}

(1.齐齐哈尔医学院基础医学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2.齐齐哈尔医学院病理学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

【摘要】 目的 研究不同剂量异丙肾上腺素对大鼠心功能和病理形态损伤的影响。**方法** SD 大鼠随机分为四组,即 Control 组,低剂量模型组(25 mg/kg),中剂量模型组(50 mg/kg),高剂量模型组(100 mg/kg)。模型组颈部多点皮下注射不同剂量异丙肾上腺素连续 2 d,Control 组注射等量生理盐水。最后一次给药 24 h 后描计心电图(ECG)检测 QRS 间期,P 波时程与波幅;TTC 染色检测心肌梗死面积,HE 染色观察心肌组织病理形态。**结果** 与正常对照组比较,不同剂量模型组大鼠心重及左室重均明显升高($P < 0.01$);ECG 显示,高剂量模型组 P 波时程增加($P < 0.01$),低剂量模型组与高剂量模型组 P 波波幅增加($P < 0.05, P < 0.01$),同时有心律不齐的心电图表现。TTC 染色和 HE 染色均有心肌损伤的病理改变。**结论** 模型组大鼠心肌组织均有不同程度损伤,高剂量模型组心肌损伤最严重,为缺血/梗死类心脏疾病的动物模型制备和相关机制研究提供依据。

【关键词】 心肌缺血;异丙肾上腺素;心电图;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0071-05

Preparation and evaluation of an acute myocardial injury model induced by different doses of isoproterenol in rats

LI Qingyu¹, YANG Haoran¹, JIA Weiwei¹, REN Shan¹, ZHANG Yuhang¹, SHUAI Zhifeng², LIN Yan^{1*}

(1. Qiqihar Medical University of Basic Medicine, Qiqihar 161006, China.

2. Qiqihar Medical University of Pathology, Qiqihar 161006)

【Abstract】 Objective To study the effects of different doses of isoproterenol (ISO) on cardiac function and pathological morphology in rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into Control, low-dose model (ISO 25 mg/kg), medium-dose model (ISO 50 mg/kg), and high-dose model (ISO 100 mg/kg) groups. In the model group, different doses of ISO were injected subcutaneously at multiple points in the neck for two consecutive days whereas the Control group received the same volume of saline. Changes in heart rate, QRS interval, duration and amplitude of P-waves were detected by electrocardiogram (ECG). The myocardial infarct size was detected by TTC staining and the pathological morphology of myocardial tissues was observed by HE staining 24 hours after the last administration. **Results** Compared with the Control group, the heart and left ventricular weights of rats in different dose model groups were significantly increased ($P < 0.01$) and the ECG of rats showed that the P-wave duration in the high-dose model group was increased

[基金项目] 黑龙江省 2019 年大学生创新创业训练计划项目(201911230004);黑龙江省 2020 年大学生创新创业训练计划项目(202011230017)。

[作者简介] 李清禹(1999—),男,主要从事临床医学研究。E-mail:540643953@qq.com

[通信作者] 林岩(1975—),女,教授,硕士生导师,主要从事心血管疾病预防发病机制研究。E-mail:863838107@qq.com

($P < 0.01$), the P-wave amplitude in the low-dose and high-dose model groups was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively) and arrhythmia was present. TTC staining and HE staining showed pathological changes related to myocardial injury. **Conclusions** Different degrees of damage were observed in myocardial tissues of the model groups and the most serious myocardial injury was observed in the high-dose model group. This study provides a basis for animal model development and research of the mechanisms of ischemic/infarct heart disease.

【Keywords】 myocardial ischemia; isoproterenol; electrocardiogram; rats

随着全球人口老龄化的加剧,心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)已成为严重的公共卫生问题^[1-2],迫切需要进一步的基础和临床研究以应对 CVD 的严峻挑战。CVD 的发生常伴有心肌缺血性损伤,成功制备心肌缺血损伤动物模型是研究心肌梗死类疾病病理机制和药物治疗的重要环节。因此,建立与人的心肌缺血症状接近的动物模型尤为重要。常用的模型制备方法有手术法、药物诱导法等^[3]。手术法的操作较为复杂,大鼠的个体差异和术者的水平参差不齐等因素往往导致大鼠存活率及造模成功率下降^[4-5]。药物诱导法对大鼠的损伤较小,具有实验周期短、对实验人员的要求较低等优势。异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)可激动心脏 β_1 受体使心肌产生正性作用,导致血管强烈舒张引起舒张压明显下降,进而导致冠状动脉灌注不足,使大鼠持续产生心功能障碍和左心室扩张,ISO 心肌缺血模型是诱导心肌损伤的一种简单、无创、经济、快速的模型^[6]。国内外通常使用中等剂量 ISO 10 ~ 120 mg/kg 连续两次或多次皮下注射方式和高剂量 ISO 150 ~ 400 mg/kg 以单次剂量或连续两次施用的方式制备急性心肌损伤模型,高剂量 ISO 制备模型的实验动物死亡率较高^[7]。另外,有研究表明短时间内通过皮下和腹腔注射 ISO 所引起的心肌损伤差异不大^[8]。所以本实验采用皮下注射的方式给予大鼠中等剂量的 ISO 制备急性心肌损伤模型。通过评价不同剂量 ISO 对大鼠左室功能的影响,以建立简单易行的大鼠急性心肌损伤模型,为研究人员选择合适的造模方法提供参考和借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠共 32 只,雄性,8~10 周龄,体重 230~250 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[SCXK(辽)2015-0001],实验环境为齐齐哈尔医学院动物实验中心屏障环境动物实验室[SYXK(黑)2016-001]。实验设计经齐齐哈尔医学院医学实验动物伦理委员会评审通过(QMU-AECC-2019-53),

按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

ISO(美国 sigma 公司 WXBC3929V);氯化钠注射液(河北天成药业 C17010901);TTC 试剂盒(北京蓝博斯特生物 CT29142210)。泰盟 BL-420S 生物信号采集与分析系统、抗干扰鼠台(成都泰盟);转轮式切片机(Leica Biosystems);组织研磨刀(德国 IKA)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组与模型建立

将大鼠随机分为 4 组,每组 8 只:正常对照组、高剂量模型组、中剂量模型组、低剂量模型组。采用颈部皮下多点注射 ISO 的方法复制心肌损伤动物模型,高、中、低剂量模型组皮下注射 ISO 剂量分别为 100 mg/kg, 50 mg/kg 和 25 mg/kg,每天 1 次,连续 2 d,最后一次给药 24 h 后麻醉大鼠做心电图检测,Control 组给予等量的生理盐水。

1.3.2 各组大鼠心电图检测

大鼠麻醉后固定于抗干扰鼠台,将三个针形电极扎入大鼠皮下右上肢,右下肢,左下肢相应位置,连接泰盟 BL-420S 生物信号采集系统,选择对应通道,输入信号为心电图,待波形稳定后连续描记大鼠 II 导联心电图 2 min^[9]。

1.3.3 各组大鼠 TTC 染测量心肌梗死面积

大鼠麻醉后,开胸取出心脏,剪下右心室,将左心室心肌横切切成 2~3 mm 薄片,置于 1% TTC 磷酸缓冲液中染色,37℃ 恒温水浴 5~10 min,取出放入 10% 甲醛溶液中固定,正常心肌组织染呈红色,梗死区呈白色^[10]。

1.3.4 苏木精-伊红(HE)染色观察心肌组织病理学形态

参照文献方法^[11]操作,取大鼠心肌组织置于 4% 多聚甲醛中保存,常规制备石蜡组织切片,苏木精-伊红染色后,固定封片,光学显微镜观察各组大鼠心肌组织病理变化。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 15.0 软件进行统计与分析。计量资

料用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,单因素方差分析用于比较组间差距。 $P<0.05$ 差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、心重和左室重比较

不同剂量模型组与正常对照组比较,大鼠心重及左室重均明显升高,差异均由统计学意义($P<0.01$),见表 1。

2.2 各组大鼠心电图(ECG)结果比较

分别测定实验开始前和最后一次给药 24 h 后大鼠Ⅱ导联心电图,每只动物测定十个心电周期,手动测量 ECG 各参数。结果见下表 2,图 1。检测结果表明,大鼠个体间心电图结果差异较大,与 Control 组相比,高剂量模型组的 P 波时程增加($P<0.01$),低剂量模型组与高剂量模型组 P 波波幅增加($P<0.05,P<0.01$),同时大鼠出现了心律不齐的心电图表现。

2.3 各组大鼠心肌组织氯化三苯基四氮唑(TTC)染色结果比较

TTC 染色后存活心肌被染为红色,梗死区因不着色而呈现白色。染色结果显示高剂量模型组与对照组相比白色区面积明显增大,中剂量模型组和低剂量模型组白色区面积相对较小,以上结果表明各模型组大鼠心肌均有不同程度损伤,其中高剂量模型组损伤最为严重,结果见图 2。

2.4 各组大鼠心肌组织 HE 染色比较

HE 染色显示,对照组大鼠心肌组织结构清晰,横纹排列整齐,细胞核卵圆居中。不同剂量模型组心肌组织出现病理性色素沉着,部分细胞核出现固缩、溶解、碎裂;出现炎症反应带,炎症细胞浸润,以心肌内膜面尤为严重;中剂量模型组与高剂量模型组部分出现坏死,见图 3。

3 讨论

心肌损伤、缺血梗死是临床多种心血管疾病的主要病因,成功制备心肌损伤动物模型是研究心肌梗死类疾病病理机制和药物治疗的重要环节。ISO 可引起舒张压明显下降,冠脉灌注压下降,心肌细胞缺血缺氧,通过氧化应激, Ca^{2+} 超载,细胞自噬与凋亡等多种因素造成心肌细胞损伤^[12]。心肌缺血、压力负荷过重或交感神经过度兴奋等多种原因均导致心肌损伤,从而引起心肌结构和功能的异常,最终导致心室收缩功能或舒张功能发生障碍^[13]。超声心动图、核磁共振、左心室插管以及心脏称重等均可用于大鼠心脏功能的测定,心电图是临床检查中诊断心率失常、心肌受损的重要方法之一,因此通过无创性的心电图检测评价大鼠心脏损伤具备一定的协助诊断价值^[14]。

本实验结果表明,大鼠麻醉状态下心电图和人体心电图有相似之处,有明显的 P 波和 QRS 波群,但大鼠心率比较快,心室波形没有明显的 ST 段。

表 1 不同剂量异丙肾上腺素对大鼠体重、心重和左室重的影响($n=8$)
Table 1 Effect of different dose of ISO on the body weight, heart weight and left ventricle weight in rats

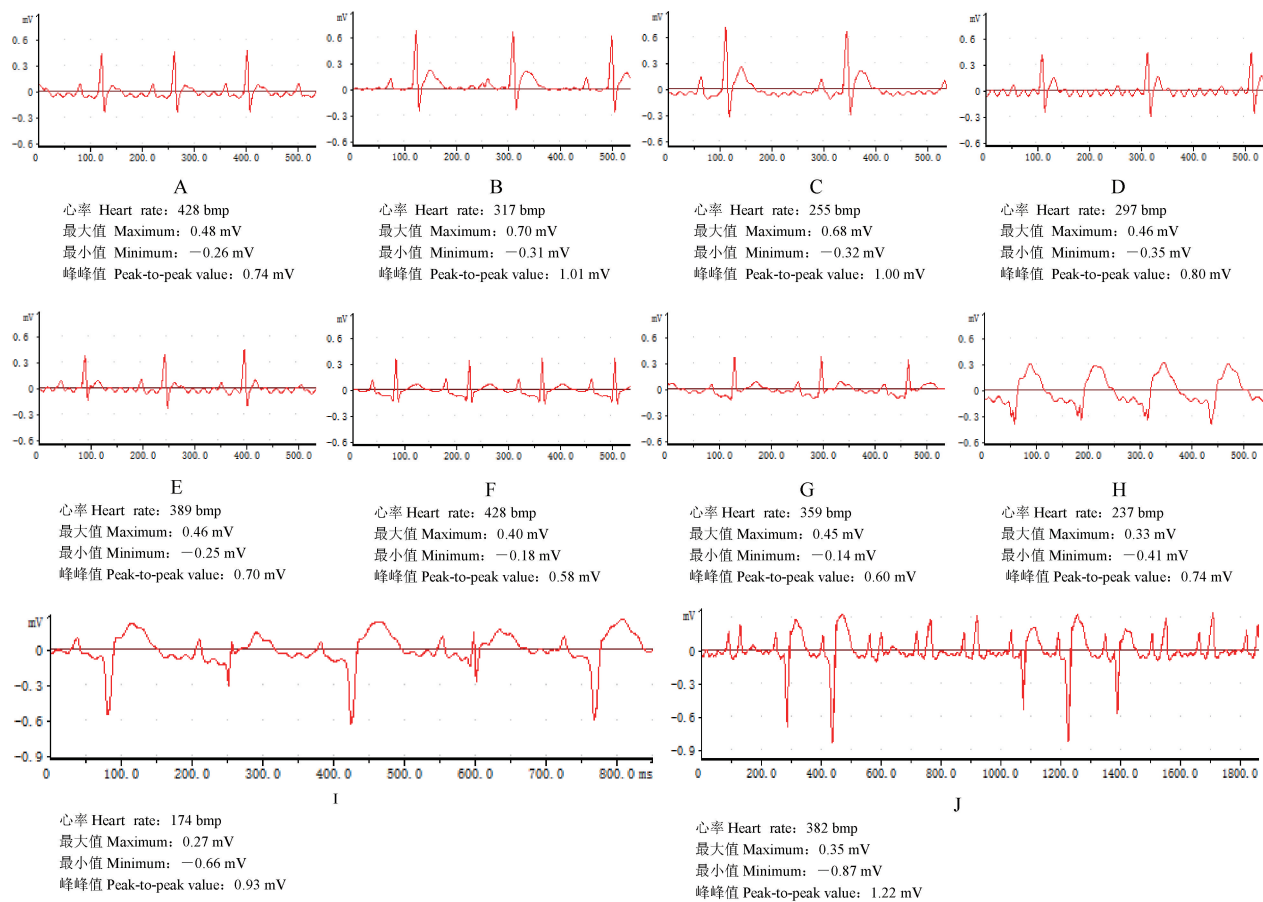
分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	体重 (g) Body weight	心脏重量 (g) Heart weight	左心室重量 (g) Left ventricle weight
对照组 Control group	0	218.25±19.01	0.63±0.07	0.44±0.33
低剂量组 Model-L group	25	213.83±14.34	0.81±0.08**	0.57±0.06**
中剂量组 Model-M group	50	225.13±10.37	0.81±0.05**	0.54±0.05**
高剂量组 Model-H group	100	211.71±15.30	0.83±0.06**	0.57±0.06**

注:与空白组相比,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, ** $P<0.01$.

表 2 不同剂量异丙肾上腺素对大鼠心电图的影响($n=8$)
Table 2 Effect of different dose of ISO on ECG in rats

分组 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	心率 (bpm) Heart rate	P 波时限 (ms) Duration of P wave	P 波振幅 (mV) Amplitude of P wave	QRS 间期 (ms) QRS Interval
对照组 Control group	0	304.12±13.51	15.04±1.69	0.08±0.02	22.97±2.56
低剂量组 Model-L group	25	336.94±15.48	15.40±1.69	0.15±0.04**	19.25±2.98
中剂量组 Model-M group	50	351.76±20.62*	16.48±1.84	0.10±0.02	26.62±5.54
高剂量组 Model-H group	100	352.07±18.73*	18.63±1.21**	0.13±0.01*	25.23±1.64

注:与空白组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

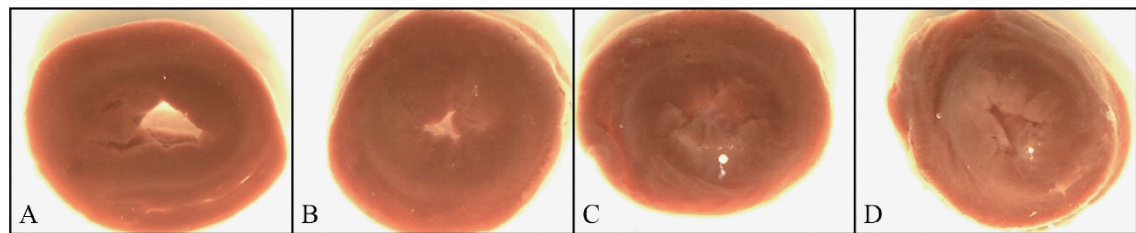


注:A:对照组建模前;B:低剂量组建模前;C:中剂量组建模前;D:高剂量组建模前;E:空白组建模后;F:低剂量组建模后;G:中剂量组建模后;H:高剂量组建模后;I:低剂量组心律失常;J:高剂量组心律失常。

图 1 不同剂量异丙肾上腺素作用前后大鼠心电图

Note. A, Control before modeling. B, Model-L before modeling. C, Model-M group before modeling. D, Model-H before modeling. E, Control after modeling. F, Model-L after modeling. G, Model-M after modeling. H, Model-H after modeling. I, Model-L, arrhythmia. J, Model-H, arrhythmia.

Figure 1 Electrocardiogram of rats before and after the action of different dose of isoproterenol



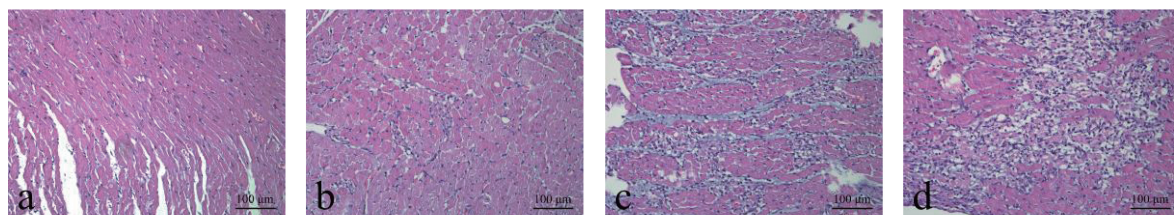
注:A:对照组;B:低剂量组;C:中剂量组;D:高剂量组。

图 2 不同剂量异丙肾上腺素作用大鼠心肌组织 TTC 染色

Note. A, Control group. B, Model-L group. C, Model-M group. D, Model-H group.

Figure 2 TTC staining of ventricular tissue of rats treated by different dose of isoproterenol

与正常对照组比较,不同剂量模型组大鼠心重及左室重均明显升高,实验开始前各组大鼠心电图均正常,与 Control 组相比,高剂量模型组的 P 波时程增加,低剂量模型组与高剂量模型组 P 波波幅增加,同时大鼠出现了心律不齐的心电图表现。P 波振幅增加表明右房扩大,P 波时程增加表明左房扩大,两者同时增加表明双房扩大,同时结合心重和左室重测量结果,表明大鼠处于代偿性心脏肥大。TTC 是一种脂溶性光敏感复合物,常用作染色剂检测哺乳动物组织的缺血梗塞,它与组织中脱氢酶反应产生



注:a;对照组;b:低剂量组;c:中剂量组;d:高剂量组

图3 不同剂量异丙肾上腺素作用大鼠心肌组织 HE 染色

Note. a, Control group. b, Model-L group. c, Model-M group. d, Model-H group.

Figure 3 HE staining of ventricular tissue of rats treated by different dose of isoproterenol

红色的脂溶性物质,但梗死组织中脱氢酶活性下降不能与其反应,故不被染色呈苍白色^[15]。TTC 染色结合 HE 染色结果发现,中剂量和高剂量模型组心肌细胞损伤严重,出现心肌细胞坏死,炎细胞浸润及心肌梗死等损伤性表现。上述研究结果表明实验中高剂量、中剂量和低剂量模型大鼠心肌均有不同程度损伤,高剂量模型组心肌损伤最严重。

目前国内外有多种方法用来制备急性心肌损伤模型,例如低温冷冻法、冠脉微栓塞法、药物诱导法(ISO、阿霉素),最常用的便是外科手术结扎法^[16]。以往的研究报道,外科手术结扎法的实验动物死亡率可达 30%~40%,并且在麻醉、气管插管、开胸体位、冠脉结扎位置及术后护理等各个环节的操作均影响造模的成功率^[17]。冷冻法的操作相对简单,死亡率相对较低,模型复制的稳定性较高,但心肌梗死位置更集中在心外膜,不能很好的模拟临床上患者的发病机制^[18]。冠脉微栓塞法虽不进行外科手术,但以往只应用于大型实验动物心肌损伤的制备,大鼠等小型实验动物应用较少,实验难度大,对研究人员的要求较高^[19]。阿霉素诱导的大鼠心肌损伤模型在给药剂量、给药方式和给药时间上国内外尚未统一,若腹腔注射药物,则大鼠胃肠道症状明显,生存率较低^[20-21]。本实验使用 ISO 皮下注射法避免了气管插管和冠脉结扎等手术操作对大鼠造成的创伤和感染,实验周期短。实验人员仅需掌握相关的基础操作和控制药物的剂量便可复制大鼠急性心肌损伤模型。有较高的实用性、可靠性和较低的实验动物死亡率,造模成功率高^[22]。不足在于不能人为控制大鼠心肌损伤部位,不能满足一些需要精确定位实验的造模需求。另外本实验局限性是没有评估大鼠超声心动图、血流动力学和生化参数的改变,期望相关的实验人员能够进行进一步的研究。ISO 诱导的大鼠急性心肌损伤模型不仅简单且效果可靠,希望此模型能为后续关于缺

血/梗死类心脏疾病的相关机制研究提供依据和指导。

参考文献:

- [1] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.中国心血管病报告 2018 概要[J].中国循环杂志,2019,34(3):209-220.
- [2] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2020, 141(9): e139-e596.
- [3] Rai V, Sharma P, Agrawal S, et al. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research [J]. Mol Cell Biochem, 2017, 424(1-2): 123-145.
- [4] 曹珏,李贻奎,陈孟清,等.大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展[J].中国比较医学杂志,2017,27(10):96-100.
- [5] De Villiers C, Riley PR. Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion [J]. Dis Model Mech, 2020, 13(11): dmm046565.
- [6] Shukla SK, Sharma SB, Singh UR. β -Adrenoreceptor agonist isoproterenol alters oxidative status, inflammatory signaling, injury markers and apoptotic cell death in myocardium of rats [J]. Indian J Clin Biochem, 2015, 30(1): 27-34.
- [7] 梁娟,刘越,尹新华.异丙肾上腺素所致心肌损伤动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2019,27(1):110-114.
- [8] George JC, Liner A, Hoit BD. Isoproterenol-induced myocardial injury: a systematic comparison of subcutaneous versus intraperitoneal delivery in a rat model [J]. Echocardiography, 2010, 27(6): 716-721.
- [9] 曹海涛,王晨阳,华川,等.压力负荷型慢性心衰大鼠的心电图特征[J].中国比较医学杂志,2016,26(9):61-63,75.
- [10] 杨涛涛,肖颖,奚赛飞,等.大鼠心肌梗死模型构建和评价方法的改良[J].中国比较医学杂志,2014,24(2):46-51,4.
- [11] Katare PB, Bagul PK, Dinda AK, et al. Toll-Like receptor 4 inhibition improves oxidative stress and mitochondrial health in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. Front Immunol, 2017, 22(8): 719.

(下转第 114 页)