

郝琰琰,布威麦热姆·热杰普,向晨莹,等. 1 日龄乳鼠心肌梗死模型制备及标准化评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (5): 36-43.

Hao YY, Buweimairemu · RJP, Xiang CY, et al. Preparation and standardized assessment of a myocardial infarction model in 1-day-old suckling mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 36-43.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.005

1 日龄乳鼠心肌梗死模型制备及标准化评估

郝琰琰¹,布威麦热姆·热杰普²,向晨莹³,韩国玲¹,刘维静¹,
刘俊¹,聂宇³,廉虹^{3*},王玉瑶^{1*}

(1.山西医科大学基础医学院,生物化学与分子生物学教研室,太原 030001;
2.新疆医科大学第一附属医院,心脏外科 乌鲁木齐 830011;
3.北京协和医学院,中国医学科学院阜外医院,国家心血管病中心,心血管疾病国家重点实验室,北京 100037)

【摘要】 目的 优化新生 1 d 乳鼠急性心肌梗死手术细节,建立稳定的模型并进行标准化评估。方法 出生 1 日龄 (postnatal 1 day,P1) CD1 小鼠实施三组手术操作:第一组,冠状动脉左前降支 (left anterior descending,LAD) 结扎(左心耳缘下方 1 mm,宽度为 1 mm,结扎深度<0.5 mm)为标准深度结扎组 (standard myocardial infarction, SMI);第二组,LAD 结扎位置和宽度不变,结扎深度>0.5 mm 为深度结扎组 (deep MI,DMI);第三组,只开胸不进行 LAD 结扎组为假手术组 (Sham)。通过 TTC、伊文思蓝-TTC 染色明确 LAD 结扎是否成功;术后 3、7、14、21、28 d 通过 HE 染色和 Masson 染色评估 P1 小鼠 LAD 结扎的心肌组织损伤、纤维化和再生程度;术后 28 d 通过超声心动图检测小鼠心脏结构和功能变化。**结果** 首先详细描述了 P1 乳鼠心肌梗死模型构建过程,通过实现 LAD 暴露、结扎、术后护理等过程提供了一种稳定再生和高存活率的 MI 程序。术后 1 d 通过 TTC、伊文思蓝-TTC 染色确定了 SMI 模型结扎成功,术后 28 d 超声心动图发现与假手术组相比,LVEF、LVFS、LVIDd 和 LVIDs 无统计学差异,说明心脏结构和功能基本恢复正常,术后 3、7、14、21、28 d Masson 染色发现,SMI 组心脏组织纤维化面积分别为 15.67%、3.34%、2.99%、2.73%、1.11%,说明术后 28 d 心肌梗死面积几乎完全恢复;DMI 组与 SMI 组相比,小鼠存活率降低了 35.71% (SMI 为 85.71%,DMI 为 50%),术后 28 d 超声结果显示,LVEF、LVFS 分别降低了 (17.25±6.03)%、(11.37±4.06)%,LVIDd、LVIDs 分别升高 (0.46±0.15)%、(0.69±0.20)% ($P<0.05$),纤维化面积 DMI 组为 SMI 组 6 倍,说明>0.5 mm 的深度结扎,心脏无法实现术后 28 d 的完全再生修复。**结论** 本研究详细描述了 1 日龄小鼠标准急性心肌梗死模型建立过程,通过 TTC、伊文思蓝-TTC 染色、心脏超声、Masson 染色方法评估了术后不同时间点心肌梗死面积、心脏结构、功能以及纤维化程度;同时明确>0.5 mm 的深度结扎,心脏无法实现术后 28 d 的完全修复;本研究为建立稳定可靠的 1 日龄小鼠急性心肌梗死模型以及手术评估提供了参考数据。

【关键词】 乳鼠;心肌梗死;冠状动脉左前降支;模型评估

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0036-08

Preparation and standardized assessment of a myocardial infarction model in 1-day-old suckling mice

HAO Yanyan¹, BUWEIMAIREMU · Rejiepu², XIANG Chenying³, HAN Guoling¹, LIU Weijing¹, LIU Jun¹,
NIE Yu³, LIAN Hong^{3*}, WANG Yuyao^{1*}

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81900343);山西省重点研发计划项目 (201903D321091)。

[作者简介] 郝琰琰 (1997—),女,硕士研究生,研究方向:心脏再生。E-mail: 18834186244@163.com

[通信作者] 王玉瑶 (1981—),女,博士,副教授,研究方向:心脏再生。E-mail: wyybio@163.com

廉虹 (1982—),女,博士,助理研究员,研究方向:心血管疾病与心肌再生。E-mail: lianhong@fuwaihospital.org

* 共同通信作者

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China. 2. Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011. 3. State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037)

[Abstract] Objective Optimization of the surgical details of acute myocardial infarction in neonatal 1-day-old mammary mice, and establishment standardized assessment of a stable model. **Methods** Postnatal day 1 (P1) CD1 mice were subjected to three sets of surgical manipulations. Coronary artery left anterior descending (LAD) ligation (1 mm below the left auricular border, 1 mm in width, and <0.5 mm ligation depth) was performed in the standard myocardial infarction (SMI) group. The LAD ligation position and width remained unchanged with a >0.5 mm ligation depth in the deep ligation group (Deep MI, DMI). Only the chest was opened without LAD ligation in the sham surgery group (Sham). The success of LAD ligation was verified by TTC and Evans blue-TTC staining. The extent of myocardial tissue damage, fibrosis, and regeneration of LAD ligation was assessed by HE and Masson staining at 3, 7, 14, 21 and 28 days after surgery. Structural and functional changes of mouse hearts were assessed by echocardiography at 28 days after surgery. **Results** It describes the process of establishing a P1 neonatal mouse myocardial infarction model in detail and provides stable regeneration and a high survival rate of MI through realization of LAD exposure, ligation, postoperative care, and other processes. Successful ligation of the SMI model was determined by TTC and Evans blue-TTC staining at 1 day postoperatively. Echocardiography at 28 days postoperatively revealed no statistical difference in LVEF, LVFS, LVIDd, or LVIDs compared with the Sham group, indicating that the heart structure and function were restored to normal. Masson staining at 3, 7, 14, 21 and 28 days postoperatively revealed that tissue fibrosis had occurred in 15.67%, 3.34%, 2.99%, 2.73% and 1.11% of the heart area, respectively, in the SMI group, indicating almost complete recovery of the myocardial infarct area at 28 days postoperatively. The survival rate of the DMI group was reduced by 35.71% compared with the SMI group (85.71% for SMI and 50% for DMI). Ultrasound at 28 days postoperatively showed reduction in LVEF (17.25 ± 6.03), LVFS (11.37 ± 4.06), increases in LVIDd (0.46 ± 0.15), and LVIDs (0.69 ± 0.20) ($P < 0.05$). The fibrotic area was six times larger in the DMI group than in the SMI group, indicating that complete regenerative repair at 28 days postoperatively could not be achieved with a ligation depth of >0.5 mm. **Conclusions** This study describes in detail the process of establishing a standard acute myocardial infarction model in 1-day-old mice, and evaluated the infarct size and cardiac structure, function, and fibrosis at various time points after surgery by TTC, Evans blue-TTC staining, cardiac ultrasound, and Masson staining. It was clear that complete cardiac repair at 28 days after surgery cannot be achieved with a ligation depth of >0.5 mm. These data provide a reference to establish a stable and reliable model of acute myocardial infarction in 1-day-old mice for surgical evaluation.

[Keywords] mammary mice; myocardial infarction; left anterior descending branch of the coronary artery; model evaluation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心力衰竭是心血管疾病的主要死亡原因之一。心脏损伤致使心肌细胞大量丢失,当心肌细胞数量减少到一定程度时,就会被纤维瘢痕不可逆替代,出现心室重塑、心功能障碍,最终导致心力衰竭^[1]。心肌梗死后造成的心室重构是导致心力衰竭的重要因素^[2]。冠状动脉左前降支(left anterior descending, LAD)结扎导致流向心脏的血流量减少,致使心肌缺氧引起心肌梗死,与普通人类心肌梗死损伤的病理学特征类似^[3]。成年哺乳动物心脏在损伤后无法再生是心血管医学的主要障碍,究其原因成年哺乳动物心脏损伤后的心肌细胞补充不足以恢复受损心脏的收缩功能^[4]。在缺乏有意义的再生能力情况下,成年哺乳动物心脏经历一系列

病理重塑事件,包括纤维化瘢痕组织替换坏死心肌组织、存活心肌病理性肥大,最终导致心脏收缩功能障碍^[5]。

与成年小鼠不同的是,新生小鼠在心脏损伤后有限的时间内能够完全再生,新生小鼠模型是研究哺乳动物心脏再生和理解心肌细胞增殖能力分子机制的有力工具^[6]。Porrello 等^[7]和向晨莹等^[8]将 1 日龄小鼠 LAD 结扎,成功构建了 1 日龄小鼠的心肌梗死模型。然而,由于不同实验室手术细节的差异,结扎 LAD 诱导的新生小鼠心脏再生现象仍未进行标准化。本研究详细描述了 1 日龄小鼠标准急性心肌梗死模型建立过程,通过 TTC、伊文思蓝-TTC 染色、心脏超声和 Masson 染色方法评估了术后不同

时间点心肌梗死面积、心脏结构、功能以及纤维化程度,为建立稳定可靠的 1 日龄小鼠急性心肌梗死模型以及手术评估提供了参考数据。本研究,我们通过麻醉、固定、开胸、结扎、关胸以及术后护理,缩短手术时间等方法提供了一种具有稳定再生和高存活率的优化心肌梗死(myocardial infarction, MI)程序,并总结了评估 MI 手术后的心肌再生方法^[9-10]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

52 只出生 1 d(1.2~1.5 g,误差<10%)的 SPF 级别 CD1 小鼠购买自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011],不区分雌雄。小鼠的模型制作以及取材均在中国医学科学院阜外医院国家心血管病中心 E 座屏障设施内进行[SYXK(京)2022-0020]。动物实验中涉及的动物所有操作程序符合 3R 原则,已得到中国医学科学院阜外医院实验动物管理和使用委员会的批准(FW-2022-0053)。

1.2 主要试剂与仪器

Masson 染色试剂盒(Sigma);伊文思蓝-TTC 染色(Sigma);体式显微镜(Zeiss,德国);全自动组织脱水机(Leica,德国);烤片机(Leica,德国);荧光共聚焦显微镜(Zeiss,德国);全自动扫片机(Zeiss,德国);普通 PCR 仪(Bio-Rad,美国);小动物超声系统(Vevo2100, Visual Sonics)。

1.3 实验方法

1.3.1 新生小鼠心肌梗死模型类型

出生 1 日龄(postnatal 1 day, P1)小鼠实施三种类型的手术操作:标准深度结扎组(SMI)为标准化冠状动脉左前降支结扎位置应为左心耳缘下方 1 mm,宽度为 1 mm,结扎深度<0.5 mm;深度结扎组(DMI)为 LAD 结扎位置和宽度不变,结扎深度>0.5 mm 进行结扎;假手术组(Sham)为只开胸不进行 LAD 结扎。

1.3.2 心脏组织标本的收集与处理

根据实验所需标本时间点从动物房中取出小鼠,将小鼠麻醉或采取安乐死。用眼科剪打开胸腔,摘取心脏,经过 MI 手术操作的小鼠在摘取心脏时要注意心脏与胸壁粘连,不可粗暴扯拽心脏而导致心脏破裂,应仔细修剪。PBS 冲洗后用灭菌卫生纸吸取组织表面附着的水滴,4%多聚甲醛常温固定

3~5 d。固定完成后,在流水中冲洗 1 h,尽可能把组织中的固定液置换出来,然后组织脱水、石蜡包埋。调整 Leica 切片机的切片厚度为 5 μm ,MI 后 3 d 和 7 d 的组织从结扎部位到心尖以每层 100 μm 的间隔连续切片,术后 14、21、28 d 的组织从结扎部位到心尖以每层 200 μm 的间隔连续切片。

1.3.3 TTC 染色

TTC 是一种脂溶性光敏感复合物,可用来检测哺乳动物组织的缺血梗塞。检测机制在于 TTC 本身可作为一种氧化还原指示剂,活细胞内的脱氢酶(尤其是线粒体内的琥珀酸脱氢酶)可以将 TTC 还原为红色甲臢化合物 TPF。对于缺血梗塞组织,因组织坏死脱氢酶活力丧失呈现苍白色,而正常组织呈深红色。TTC 常用的染色浓度为 2%(w/v),也可根据组织类型做浓度的适当调整。结扎冠状动脉左前降支 24 h 后,迅速取出心脏;挤压心脏将血液泵出,PBS 冲洗干净后用吸水纸擦拭;-20℃冰箱冷冻 15 min 至心脏变硬,便于切片;用刀片自心尖向心底沿房室沟方向切成 1 mm 厚切片;由于小鼠心脏较小,较容易变软,可将心脏模具和刀片提前放入冰冻切片机冷却,然后进行切片。迅速将切片置于 5 mL 37℃ 2% pH=7.4 的 TTC 磷酸缓冲液中,孵育箱摇晃 15 min,使其均匀接触到染色液。体视镜下拍照或多聚甲醛固定 24 h 后拍照。

1.3.4 伊文思蓝-TTC 染色

伊文思蓝属于一种常用的偶氮染料制剂,在血液中与血浆白蛋白有很高的亲和力。将进行 MI 手术的小鼠胸腔打开,暴露心脏,将伊文思蓝染液注入右心室(由于 P1 乳鼠动脉、静脉较细,较难注射伊文思蓝,可将伊文思蓝注射入右心室),心脏跳动 10 min 左右,待伊文思蓝染液进行一个或多个肺循环进入心脏血管;迅速取出心脏,挤压心脏,PBS 冲洗干净后使用吸水纸吸干心脏表面水渍;后续方法同 TTC 染色。

1.3.5 Masson 染色

Masson 染色可以选择性地显示胶原纤维和肌纤维。该法染色原理与阴离子染料分子的大小和组织的渗透有关,分子的大小由分子量来体现,小分子量易穿透结构致密、渗透性低的组织,而大分子量则只能进入结构疏松的、渗透性高的组织。然而,淡绿或苯胺蓝的分子量很大,因此 Masson 染色后肌纤维呈红色,胶原纤维呈绿色或蓝色。主要用于区分胶原纤维和肌纤维。

将心脏组织切片放在烤片机上 68℃ 烘烤 45 min 防止脱片;自动脱蜡机脱蜡及水化;将切片放入 2.5% 重铬酸钾中浸泡 12~18 h,重铬酸钾为亮橙红色,若发黑发暗表示时间过长;将切片从重铬酸钾中取出后放在自来水下流水冲洗 5 次;苏木精染色 5 min,入自来水洗,至水无颜色;苏木素染色之前观察表面是否氧化成膜,若有则用吸水纸吸去;1% 的盐酸乙醇分化 1 s 后用水冲洗,自来水返蓝,至切片为亮蓝色。显微镜下观察细胞核为蓝色,而细胞浆未着色最佳丽春红染色 5 min,入自来水洗,至水无颜色(丽春红为水溶性,不可洗太久);磷钼酸染色 5 min,自来水洗 1 遍,不可浸泡在水中,镜下观察心肌细胞组织为红色,组织间隙、血管周围等结缔组织为无色(磷钼酸不要晃动,结晶影响染色效果);苯胺蓝染色 10~20 s 或更少;显微镜下观察染色效果,细胞间隙、血管周围等结缔组织染色为蓝色,组织染色对比清晰;依次 70%、80%、90% 乙醇和无水乙醇浸泡 30 s 脱水;二甲苯浸泡 3 min,2 次;中性树胶封片。蔡司扫片机进行图像采集。

统计方法:心脏组织每层切片中梗死区域占总面积的百分比,计算 5 层切片的平均值得出每个心脏的梗死面积占总面积的百分比。

1.3.6 苏木精-伊红(HE)染色

苏木精染液为碱性,主要使细胞核内的染色质与胞质内的核酸着紫蓝色;伊红为酸性染料,主要使细胞质和细胞外基质中的成分着红色。

1.3.7 心脏超声心动图评价

术后 28 d 抓住小鼠颈背部皮肤固定小鼠,均匀涂抹脱毛膏于小鼠胸前区,然后用纸巾擦去毛发及多余脱毛膏。将被异氟烷气麻的小鼠仰卧位固定在超声仪的操作台上,用胶带固定其四肢。以 1% 异氟烷维持麻醉。采用 Vevo2100 超声仪取左心室短轴横切面,胸骨旁短轴切面以左心室乳头肌水平的切面为标志点,用 M 型超声模式记录,利用软件计算实验组与对照组左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF),左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS),左心室舒张末期内径(left ventricular diameter in diastole, LVIDd),左心室收缩末期内径(left ventricular diameter during systolic contraction, LVIDs),并作统计学分析。

1.4 统计学方法

所有指标进行正态性分析,符合正态分布的数

据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 判定差异存在统计学意义。统计采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件包分析。

2 结果

2.1 心肌梗死模型建立

2.1.1 麻醉

将 1 日龄乳鼠埋入碎冰中 3~4 min 后,小鼠四肢活动停止、呼吸减缓,通过按压四肢判断麻醉深度,即按压四肢不会引起全身任何部位的活动即为适宜程度的麻醉。注意事项:如果麻醉时间过短小鼠容易苏醒,心脏跳动剧烈,不易结扎且出血较多;如果麻醉时间过长小鼠心脏跳动缓慢,较难寻找 LAD,且不易苏醒。

2.1.2 固定

右侧卧位 45°~60°,用胶带固定小鼠手术体位,以便获得更好的手术视野。注意事项:如果体位偏左,手术视野中肺暴露过多,不易观察到 LAD;如果体位偏右 LAD 寻找较困难。

2.1.3 开胸

开胸后的操作均在体式显微镜下进行(图 1A、1B)。由于皮肤、肌肉包被,不易找到第四肋间隙,可通过如下方法定位开胸位置:右边“人”字形血管分支点(a 点)平齐对应 b 点血管,以 b 点血管中线将皮肤剪开(图 1C),打开为第四肋间隙。依次缓慢剪开皮肤、软组织、肌肉及肋间隙,用显微镊轻轻夹起少量心包,并于左心耳下撕开,不可多次拨动心耳,容易造成大量出血。显微镊适当撑开肋间隙,充分暴露手术视野。用显微镊缓慢撑开肋间隙,不可较快暴力撕扯,容易造成大量出血。

2.1.4 结扎

用持针器持取 10-0 丝线沿左心耳下缘约 1 mm 处结扎冠状动脉左前降支。体视镜下可清晰观察到小鼠冠状动脉左主干及其分叉(一“人”字形血管),冠状动脉左回旋支于左心耳下沿着左侧房室沟绕到心脏后方,冠状动脉左前降支于左心耳下从左主干发出,沿着左心室前表面心外膜下向心尖部走行。LAD 位于左心耳缘下方 1 mm 处,宽度为 1 mm, <0.5 mm 深度进行结扎,即图 1D 中白色箭头位置。进行结扎,拉紧线结,结扎后血管闭塞,心脏表面不可见,即证明结扎成功。严格按照上述步骤进行操作,模型成功率为 96%。假手术组模型在不结扎 LAD 的基础上完成上述步骤。注意事项:结扎

太浅梗死太小,且容易把心脏拉破;结扎太深会将室腔划破造成出血太多(图 1E)^[7]。由于暗红色的静脉较多,在显微镜下找到隐约可见的 LAD 是成功构建模型的关键。

2.1.5 关胸

8-0 丝线缝合肋间隙、皮肤。进行缝合时可将胶带松弛,防止皮肤拉扯损伤。整个手术过程应在 5 min 内完成。

2.1.6 复温

37℃ 加热,数分钟后小鼠自然苏醒。

2.1.7 术后护理

将小鼠放回母鼠笼内,手术完成。由于母鼠靠气味辨认小鼠,如果小鼠出血较多,母鼠可能食仔。可用棉棒蘸少量水将小鼠伤口处血迹擦拭干净,将母鼠尿液洒到小鼠身上,或者用垫料将其包裹以遮盖血的气味,将树枝或者瓜子放进鼠笼。观察到母鼠会叼小鼠,此时母鼠会喂养小鼠。如果术后发现母婴相残,母亲立即开始杀死手术后返回巢穴的幼崽。将术后小鼠转移给具有年龄匹配幼崽的代孕母亲可以提高其存活率。

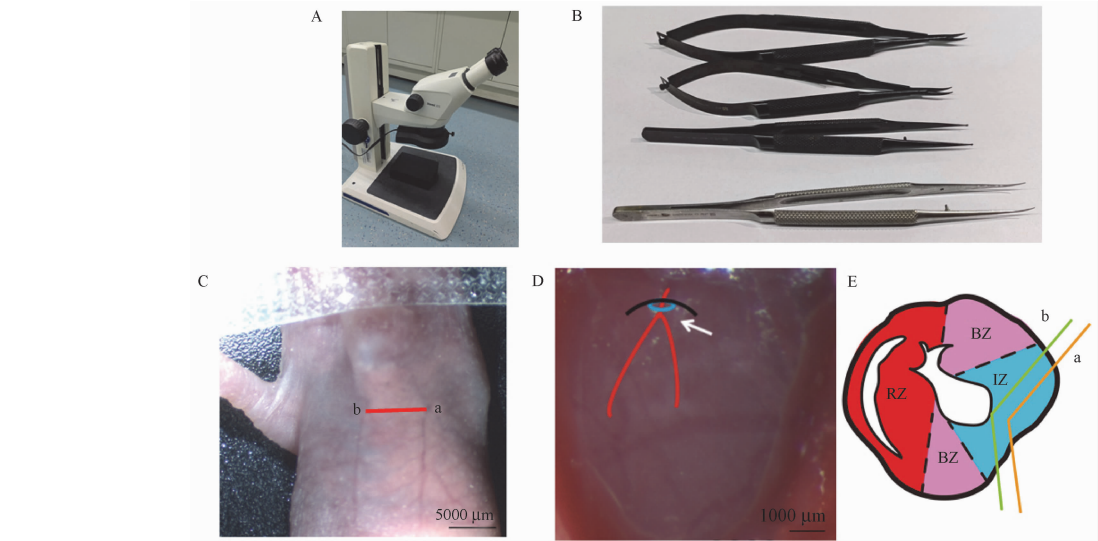
2.2 TTC 染色和伊文思蓝-TTC 染色

SMI 组小鼠术后 1 d 进行解剖,观察结扎线位

于心耳下方约 1 mm 处(图 2A)。SMI 组 LAD 结扎后 1 d,TTC 染色可明显看到苍白色的梗死区,梗死边缘区为砖红色,非梗死区为红色(图 2B);伊文思蓝-TTC 双染后可看到分界清晰的苍白色的梗死区、砖红色的梗死边缘区和蓝色的正常血流灌注区(图 2C),两种方法均说明 LAD 成功结扎。

2.3 SMI 组小鼠术后 28 d 完全再生,心脏功能恢复

为评估缺血损伤后新生小鼠心脏不同时间点的再生能力,对 LAD 结扎后 3、7、14、21、28 d 通过 HE 染色检测心肌组织损伤程度。结果显示,术后 3 d 心脏梗死区有大量炎症细胞,随着心脏的恢复,炎症和梗死面积随后逐渐减少,28 d 心脏几乎完全再生(图 3A)。Masson 染色结果显示术后 3、7、14、21、28 d 纤维化区域占心脏总面积的 15.67%、3.34%、2.99%、2.73%、1.11% ($P<0.01$) (图 3B、3C)。术后 28 d 超声心动图结果显示,与假手术组相比较,SMI 组 LVEF、LVFS 分别降低了 (2.13 ± 5.32)%、(1.92 ± 4.06)%,LVIDd、LVIDs 分别降低了 (0.09 ± 0.17)%、增加了 (0.00 ± 0.22)% (图 3D、3E),但均无统计学意义 ($P>0.05$),说明 SMI 组小鼠心脏组织术后 28 d 结构和功能基本恢复至正常。



注:A:体视镜;B:显微剪刀、持针钳、显微镊;C:新生小鼠 MI 开胸位置;D:P1 小鼠显微镜下心脏 LAD 结扎位置示意图;E:描绘了心肌梗死后的心脏横截面示意图及心脏 LAD 结扎深度,突出显示了用于量化的缺血区域(IZ)、边界区域(BZ)和偏远区域(RZ)。a:DMI 的 LAD 结扎深度;b:SMI 的 LAD 结扎深度。

图 1 心肌梗死模型建立

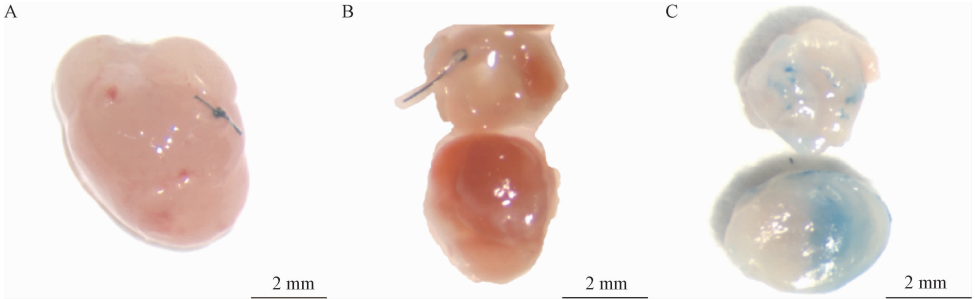
Note. A, Body mirror. B, Micro scissors, needle holding forceps, micro tweezers. C, MI chest opening position of newborn mice. D, P1 Schematic diagram of LAD ligation position in mouse heart under microscope. E. It depicts the cross-sectional sketch map of the heart after myocardial infarction and the ligation depth of LAD in the heart, highlighting the ischemic region (IZ), border region (BZ) and remote region (RZ) for quantification. a, The LAD ligation depth of DMI. b, The LAD ligation depth of SMI.

Figure 1 Establishment of myocardial infarction model

2.4 DMI 组小鼠术后 28 d 不能完全再生

为了验证深度结扎 LAD 后是否仍能够实现心梗术后 28 d 的完全再生,在结扎位置和宽度不变(左心耳缘下方 1 mm,宽度为 1 mm)的基础上,结扎深度>0.5 mm,其他操作不变,以此来验证结扎深度

对后期心肌再生恢复的作用。结果见图 4,对比 SMI 小鼠,DMI 的小鼠存活率显著低于 DMI 的小鼠,假手术组 7 只小鼠全部存活,SMI 小鼠 35 只死亡 5 只,存活率为 85.71%,DMI 小鼠 10 只死亡 5 只,存活率为 50%,与 SMI 组小鼠相比,DMI 小鼠存活率

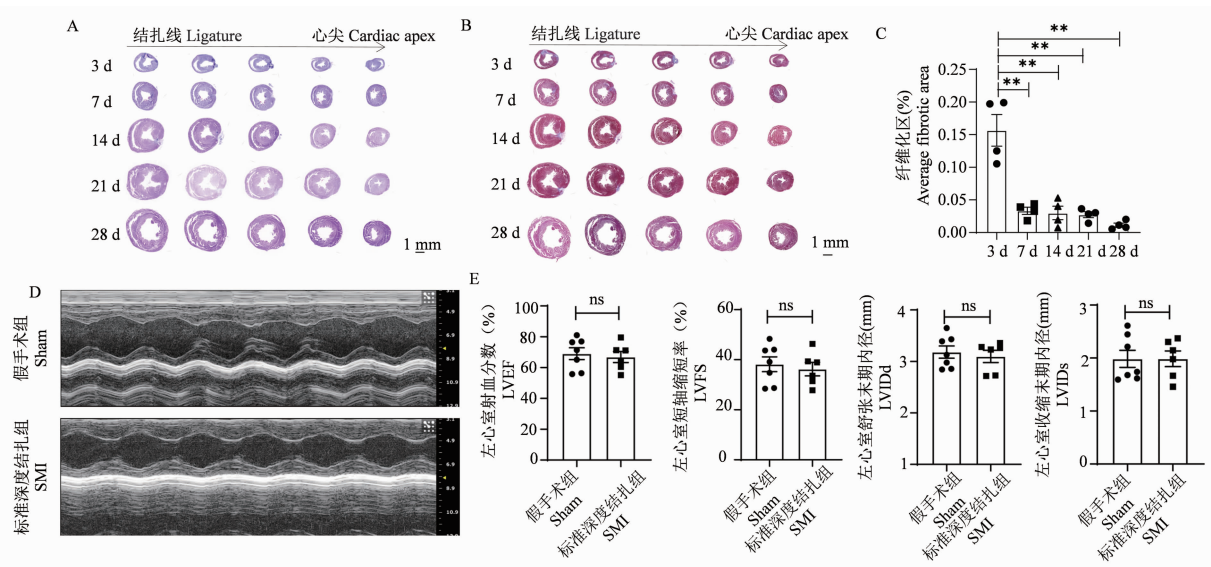


注:A:P1 的新生小鼠心脏结扎后的全幅图像;B:在 LAD 结扎后第 1 天结扎进行 TTC 染色,显示了每个心脏的基底和顶部截面。红色染色显示存活心肌,苍白色区域为心肌坏死,梗死边缘区为砖红色;C:在 LAD 结扎后第 1 天结扎进行伊文思蓝-TTC 染色。苍白色为心肌梗死区、红色为梗死边缘区和蓝色的正常血流灌注区。

图 2 TTC 染色和伊文思蓝-TTC 染色

Note. A, Full image of P1 newborn mice after cardiac ligation. B, TTC staining was performed on the first day after LAD ligation. The basal and top sections of each heart are shown. Red staining showed viable myocardium, pale area was myocardial necrosis, and infarct border area was brick red. C, On the first day after LAD ligation, the ligature was stained with Evans blue-TTC. The pale color is the myocardial infarction area, the red color is the infarct border area and the blue normal blood flow perfusion area.

Figure 2 TTC and Evans blue-TTC

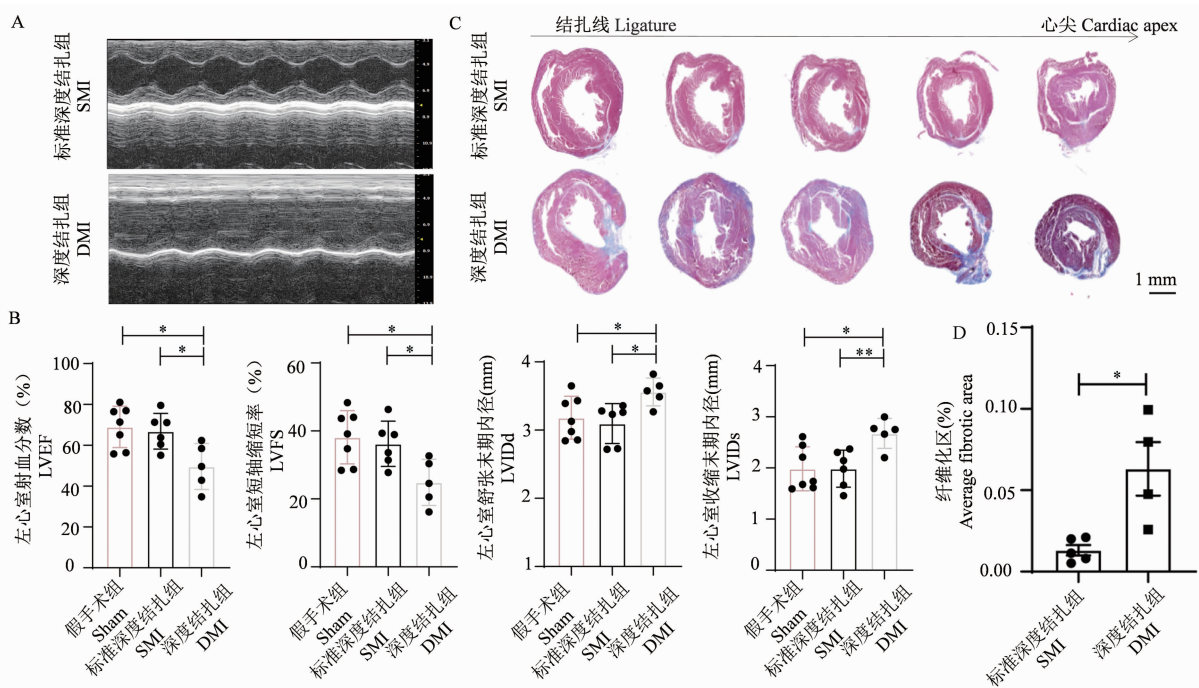


注:A:小鼠 MI 后 3、7、14、21、28 d 通过 HE 染色检测心肌组织损伤程度;B:P1 小鼠 MI 后 3、7、14、21、28 d 通过 Masson 染色检测心肌纤维化程度($n=4$);C:瘢痕面积量化。与 3 d 相比, $**P<0.01$;D:假手术组和 SMI 组超声心动图;E:LVEF、LVFS、LVIDd、LVIDs (Sham 组 $n=7$, SMI 组 $n=6$),与 Sham 组相比, $^{ns}P>0.05$ 。

图 3 SMI 组小鼠术后 28 d 完全再生,心脏功能恢复

Note. A, The degree of myocardial tissue damage was detected by HE staining at 3, 7, 14, 21 and 28 days after MI. B, At 3, 7, 14, 21 and 28 days after MI, the P1 mice were examined for myocardial fibrosis by Masson staining ($n=4$). C, The scar area was quantified. Compared to 3 days, $**P<0.01$. D, Echocardiography in Sham group and SMI group; E: LVEF, LVFS, LVIDd, LVIDs (Sham group $n=7$, SMI group $n=6$). Compared to Sham group, $^{ns}P>0.05$.

Figure 3 Complete regeneration and cardiac function recovery of mice in SMI group 28 days after operation



注:A:超声心动图分析 P1 小鼠 SMI 和 DMI 组小鼠在术后 28 d 心功能变化;B:LVEF、LVFS、LVIDd、LVIDs(Sham 组 $n=7$, SMI 组 $n=6$, DMI 组 $n=6$);C:DMI 组小鼠术后 28 d 心肌纤维化程度大于 SMI 组;D:瘢痕面积量化。与 SMI 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 4 DMI 组小鼠术后 28 d 不能完全再生

Note. A, Echocardiography was used to analyze the changes of cardiac function of P1 mice in SMI and DMI groups 28 days after operation. B, LVEF, LVFS, LVIDd, LVIDs (Sham group $n=7$, SMI group $n=6$, DMI group $n=5$). C, The degree of myocardial fibrosis was greater in the DMI group of mice at 28 days postoperatively than SMI group. D, The scar area was quantified. Compared to SMI group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 4 DMI group mice could not regenerate completely 28 days after operation

降低了 35.71%。超声结果发现 DMI 的小鼠 LVEF、LVFS 分别降低了 $(17.25 \pm 6.03)\%$ 、 $(11.37 \pm 4.07)\%$, LVIDd、LVIDs 分别升高了 $(0.46 \pm 0.15)\%$ 、 $(0.69 \pm 0.20)\%$ (图 4A、4B),均有统计学差异($P<0.05$)。DMI 组小鼠发生透壁性梗死,致使心功能降低且导致心室扩张,Masson 染色发现 DMI 的小鼠在 MI 后 28 d 时仍存在较大纤维化,DMI 组纤维化面积为 SMI 组 6 倍(SMI 组为 1.31%,DMI 组为 6.31%, $P<0.05$),说明左心耳缘下方 1 mm,宽度为 1 mm,结扎深度 >0.5 mm 时,心脏无法实现术后 28 d 的完全再生修复(图 4C、4D)。

3 讨论

近年来心血管疾病患病率和死亡率持续上升^[11],已经成为危害人类健康的重要因素。内源性心脏再生是世界范围内主要的科学问题和医学目标。冠状动脉结扎模型模拟了一种心肌梗死疾病过程,为研究哺乳动物内源性心脏再生机制提供了良好动物模型^[12-14]。出生后不同年龄段小鼠 MI 已

成为心血管研究的基本模型之一,尽管这种新生小鼠心脏模型自 2012 年推出以来已被广泛使用,由于不同术者手术细节的差异,结扎 LAD 诱导的新生小鼠心脏再生还未进行标准化^[15]。我们通过量化 P1MI 后 3、7、14、21、28 d 的梗死程度,为新生小鼠心脏 MI 损伤模型提供了数据以供参考。Cai 等^[16]使用非人灵长类动物恒河猴作为心肌梗死患者的替代模型,对 2~3 岁的恒河猴进行 LAD 结扎以建立急性心肌梗死,通过改变冠状动脉的结扎位置,产生不同大小的心肌梗死区域,以研究心脏储备与心肌梗死面积之间的关系。随后我们进行深度结扎,以此来验证结扎深度对后期心肌再生恢复的作用,发现 DMI 组小鼠发生透壁性梗死,致使心功能降低且导致心室扩张。

为确定心梗模型是否构建成功,新生小鼠结扎术后 1 d 可通过 TTC 染色和伊文思蓝-TTC 双染较快观察到结扎是否成功。伊文思蓝-TTC 双染能够更直接观察到梗死区域、梗死周边区和远端区^[17]。由于 P1 乳鼠动脉、静脉较细,注射伊文思蓝困难,

所以 TTC 染色更方便,同时也能观察到梗死区域。为检测心肌组织损伤程度和纤维化程度,可用 HE 染色和 Masson 染色两种染色方法评估,HE 染色能较快看到有无梗死区域,但是容易非特异性结合杂点,梗死区和未梗死区颜色对比不明显,不容易辨别。Masson 染色能更直观地看到梗死区域和非梗死区域^[18]。

本研究更为细节地描述了 1 日龄小鼠标准急性心肌梗死模型建立过程,总结了各个步骤操作时的注意事项,并在此基础上创新了开胸寻找 LAD 的方法,避免了术者花费较多的时间进行摸索。之后通过 TTC、伊文思蓝-TTC 染色、心脏超声和 Masson 染色方法评估了术后不同时间点心肌梗死面积、心脏结构、功能以及纤维化程度,为建立稳定可靠的 1 日龄小鼠急性心肌梗死模型标准化以及手术评估提供了参考数据。

虽然显微操作条件下构建小鼠 MI 模型有建模稳定、重复性好等优点,但其对操作者实验技能与经验要求较高,在显微镜下找到 LAD 成为构建模型的关键,实验人员在练习构建模型期间,应对心脏解剖结构,尤其是动脉和静脉进行深入研究,对小鼠左前降支各种变异有足够预判,才能较快掌握构建模型的方法^[19-20]。综上所述,构建稳定可靠的小鼠 MI 模型是进行后续各项科学研究的基石,故操作者应熟练掌握并适应显微镜视野下的操作技能,为后续的科学研究打好基础^[21]。

参考文献:

[1] Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy [J]. Circulation, 2000, 101(25): 2981-2988.

[2] Bugg D, Bailey LRJ, Bretherton RC, et al. MBNL1 drives dynamic transitions between fibroblasts and myofibroblasts in cardiac wound healing [J]. Cell Stem Cell, 2022, 29(3): 419-433. e10.

[3] Wang H, Paulsen MJ, Hironaka CE, et al. Natural heart regeneration in a neonatal rat myocardial infarction model [J]. Cells, 2020, 9(1): 229.

[4] Garbern JC, Lee RT. Heart regeneration: 20 years of progress and renewed optimism [J]. Dev Cell, 2022, 57(4): 424-439.

[5] Haubner BJ, Adamowicz-Brice M, Khadayate S, et al. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction [J]. Aging, 2012, 4(12): 966-977.

[6] Das S, Goldstone AB, Wang H, et al. A unique collateral artery

development program promotes neonatal heart regeneration [J]. Cell, 2019, 176(5): 1128-1142. e18.

[7] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(1): 187-192.

[8] 向晨晔, 聂宇. 新生小鼠心肌再生:模型与机制 [J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(4): 838-849.

[9] Li Y, Feng J, Song S, et al. gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. Circulation, 2020, 142(10): 967-982.

[10] Li Y, Feng J, Li Y, et al. Achieving stable myocardial regeneration after apical resection in neonatal mice [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6500-6504.

[11] 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.

[12] Wang Z, Cui M, Shah AM, et al. Mechanistic basis of neonatal heart regeneration revealed by transcriptome and histone modification profiling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(37): 18455-18465.

[13] Wang Y, Li Y, Feng J, et al. Myd88 promotes Cardiomyocyte proliferation and Neonatal Heart regeneration [J]. Theranostics, 2020, 10(20): 9100-9112.

[14] 刘维静, 聂宇, 廉虹, 等. 小鼠出生后早期心脏成纤维细胞数量及性状变化研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 28-35.

[15] Liu C, Wang L, Wang X, et al. A complete heart regeneration model with inflammation as a key component [J]. Exp Anim, 2021, 70(4): 479-487.

[16] Cai J, Sun X, Han P, et al. The effect of myocardial infarct size on cardiac reserve in Rhesus monkeys [J]. Cardiovasc Toxicol, 2014, 14(4): 309-315.

[17] Lee TL, Lai TC, Lin SR, et al. Conditioned medium from adipose-derived stem cells attenuates ischemia/reperfusion-induced cardiac injury through the microRNA-221/222/PUMA/ETS-1 pathway [J]. Theranostics, 2021, 11(7): 3131-3149.

[18] Tao G, Kahr PC, Morikawa Y, et al. Pitx2 promotes heart repair by activating the antioxidant response after cardiac injury [J]. Nature, 2016, 534(7605): 119-123.

[19] Moore A, Goerne H, Rajiah P, et al. Acute myocardial infarct [J]. Radiol Clin North Am, 2019, 57(1): 45-55.

[20] 陈哲璇, 叶永才, 谭伟江, 等. 麻醉镇痛管理在实验猪开胸心梗造模手术中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(6): 123-128, 134.

[21] 余烱, 杨帆, 蒋磊, 等. 显微操作条件下小鼠急性心肌梗死模型的建立与评估 [J]. 岭南心血管病杂志, 2019, 25(3): 346-351.