

王兆博,潘熠,林谦,等. 基于慢性心肌缺血小鼠模型探究心电图 T 波低平的电生理机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 54-62.

Wang ZB, Pan Y, Lin Q, et al. Exploring the electrophysiological mechanisms of T-wave flattening in electrocardiogram in the mouse model of chronic myocardial ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 54-62.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.06.007

# 基于慢性心肌缺血小鼠模型探究心电图 T 波低平的电生理机制

王兆博<sup>1#</sup>, 潘熠<sup>1#</sup>, 林谦<sup>1\*</sup>, 钟菊迎<sup>2\*</sup>

(1.北京中医药大学东直门医院,心血管内科一区,北京 100700;2.中国中医科学院,医学实验中心,北京 100700)

**【摘要】** 目的 建立通过稳定的冠心病慢性心肌缺血小鼠模型,初步阐述缺血状态下 T 波低平的电生理原理。方法 将 APOE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为模型组和降脂药 (lipid-lowering drug, LLD) 组,高脂饮食喂养 3 个月,同时设立 C57BL/6J 小鼠作为空白组。检测造模前后小鼠心电图变化,通过核素 PET/CT 扫描评估心脏血流灌注情况,使用主动脉苏木伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和油红 O 染色评估斑块动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 病理。同时,分离小鼠心肌细胞并记录心肌细胞动作电位。结果 高脂喂养 3 个月后模型组小鼠的胆固醇 (cholesterol, CHO) 和低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL-C) 显著升高,同时主动脉出现脂质斑块。LLD 组病变减少,空白组无斑块。心肌核素扫描显示模型组小鼠的心肌血流灌注显著低于 LLD 组和空白组。小鼠心电图显示模型组和 LLD 组的 T/QRS 显著降低,空白组无明显改变。记录心肌细胞动作电位发现,缺血的内层心肌细胞复极速率增加,内外电位差减小是 T 波低平的主要电生理机制。结论 APOE<sup>-/-</sup>小鼠可用于慢性心肌缺血小鼠模型,缺血状态下内层心肌复极速率的增加可能是心电图 T 波降低的主要原因。

**【关键词】** 冠心病;慢性心肌缺血;小鼠心电图;T 波低平

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 06-0054-09

## Exploring the electrophysiological mechanisms of T-wave flattening in electrocardiogram in the mouse model of chronic myocardial ischemia

WANG Zhaobo<sup>1#</sup>, PAN Yi<sup>1#</sup>, LIN Qian<sup>1\*</sup>, ZHONG Juying<sup>2\*</sup>

(1. First District of Cardiovascular Medicine, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China.  
2. Experimental Research Center of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

**【Abstract】 Objective** To establish a stable mouse model of chronic myocardial ischemia in coronary artery disease and preliminarily elucidate the electrophysiological mechanisms of T-wave flattening under ischemic conditions. **Methods** APOE<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into a model group and a lipid-lowering drug (LLD) group and subjected to a high-fat diet for 3 months. C57BL/6J mice fed a normal diet were used as the control group. Electrocardiograms were used to assess the mice before and after modeling, and cardiac perfusion was evaluated via nuclear PET/CT scans. Hematoxylin-eosin and oil red O staining were employed to assess pathological atherosclerosis (AS) plaque formation. Mouse myocardial cells were isolated, and action potentials were recorded. **Results** After modeling, mice in the model group exhibited a significant increase in cholesterol (CHO) and low-density lipoprotein C (LDL-C), along with the

**【基金项目】** 中国医学科学院自主课题资助项目 (zz2019015);高水平重点学科 (404053502)。

**【作者简介】** 王兆博 (1991—),男,博士,研究方向:心血管疾病的中西医结合治疗研究。E-mail:954172498@qq.com

潘熠 (1989—),女,硕士,研究方向:心血管疾病的中西医结合治疗研究。E-mail:287568160@qq.com <sup>#</sup>共同第一作者

**【通信作者】** 钟菊迎 (1981—),女,副研究员,研究方向:中医药心血管实验研究。E-mail:zhongjuying@hotmail.com

林谦 (1964—),女,主任医师,博士生导师,研究方向:心血管临床及研究。E-mail:bigbiglinqian@163.com

\* 共同通信作者

appearance of lipid plaques in the aorta. Lesions in the LLD group were noticeably reduced, and no plaques formed in the control group. Myocardial nuclear scans revealed impaired blood perfusion in the hearts of the model group mice that was significantly lower than that in the LLD and control groups. The electrocardiograms indicated a significant reduction in T/QRS in both the model and LLD groups, with no significant changes observed in the control group. Myocardial cell action potential recordings revealed an accelerated repolarization rate in the inner-layer myocardial cells under ischemia, and a reduction in the inner-to-outer potential difference was identified as the primary electrophysiological mechanism underlying T-wave flattening. **Conclusions** APOE<sup>-/-</sup> mice can be used to establish a model of chronic myocardial ischemia. The increased repolarization rate of inner-layer myocardial cells is likely to be the main cause of T-wave flattening in electrocardiograms under ischemic conditions.

**[ Keywords ]** coronary artery disease; chronic myocardial ischaemia; mouse electrocardiogram; T-wave flattening

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

尽管近年在治疗方面取得了很多进展,冠心病仍是全世界最主要的死亡原因之一<sup>[1-2]</sup>。随着科技的发展,近些年涌现了大量先进的诊疗手段<sup>[3]</sup>,但心电图凭借其简便、廉价的巨大优势仍是心血管疾病诊疗中最常用的检查手段之一<sup>[4-5]</sup>。冠心病心肌缺血常伴随着不同程度的心电图 QRS 波至 T 波起点区域(QRS to T-wave region, ST)改变,由于缺血心肌的部位和程度不同主要存在 3 种形式:ST 弓背样抬高、ST 压低及 T 波低平<sup>[6]</sup>。其中 ST 抬高和压低是急性透壁、内膜下心梗的主要心电图表现,T 波低平则多出现在慢性心肌缺血状态下。目前急性心肌梗死的电生理研究比较充分,在严重缺血的心肌细胞会出现内外离子梯度的改变,除极静息电位高于复极后电位,因此出现了心电图 ST 抬高。而在慢性心肌缺血中常见的 T 波低平则缺少充分的电生理机制阐释<sup>[7]</sup>。其中一个重要原因是尚缺少可靠易行的慢性心肌缺血小动物模型。目前实验中常通过结扎大、小鼠前降支冠脉进行心肌缺血造模<sup>[8]</sup>,但这种急性心肌梗死或严重缺血的病理状态与慢性心肌缺血存在较大差异<sup>[9]</sup>。对 T 波低平的认识更多依据体外缺氧细胞模型的实验结果,这也是 T 波低平了解不够深入的重要原因。为了更加深入阐述缺血心肌 T 波低平的病理生理过程,本实验依靠成熟的动脉粥样硬化 APOE<sup>-/-</sup>小鼠建立了可靠易行的慢性心肌缺血动物模型,结合既往相关研究成果对慢性心肌缺血 T 波低平进行了研究和阐述。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

APOE<sup>-/-</sup>及 C57BL/6J 雄性小鼠共 43 只无病原体(specific pathogen free, SPF)级,来自北京斯贝福

生物技术有限公司[SCXK(京)2019-0010],6 周龄,体重(19±2)g。所有小鼠均饲养在中国科学院医学实验中心的动物房中[SYXK(京)2019-0030],温度为(24±2)℃,湿度(50±10)%。10 只雄性 C57BL/6J 小鼠作为空白组,喂食普通饲料 3 个月。其余 33 只雄性 APOE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为模型组(20 只)和降脂药(lipid-lowering drug, LLD)组(13 只)(阿托伐他汀+依折麦布+阿利西尤单抗),喂食高脂饲料 3 个月。实验通过了中国中医科学院医学实验中心动物伦理审查(ERCCACMS11-2209-03)。所有实验动物饲养和实验过程中遵循 3R 原则给予人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

氟-18 代脱氧葡萄糖(Fluoro-18-deoxyglucose, 18F-FDG)(华大原子制药有限公司,上海, F221221);阿托伐他汀钙片(DN9900,规格:每片 10 mg,辉瑞制药有限公司);其他药物为依折麦布(W021856,每片 10 mg,默沙东制药有限公司);阿利西尤单抗注射液(CW1785,1.0 mL:75 mg,赛诺菲生物制药有限公司);高脂饲料(H10141,北京华富康生物技术有限公司)。

十二导联心电图仪(ECG-3303B,中国三瑞);正电子发射断层显像/X 线计算机体层成像(positron emission tomography/computed tomography, PET/CT)仪(Supernova PET/CT, SNPC-303,中国平生);高速冷冻离心机(5942000091,德国 Eppendorf);冰冻切片机(RM2016,上海徠卡仪器有限公司);光学显微镜(Nikon Eclipse E100,日本 Nikon);全景扫描仪(OLYMPUS-BX61VS,日本 OLYMPUS)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 HE 染色

在麻醉状态下处死小鼠,剥离并包埋心脏,使

用恒温冷冻切片机在主动脉窦和主动脉近端制作冷冻切片(10 nm)。切片在苏木精中浸泡 10 min,然后在 4%多聚甲醛中固定 10 min。用蒸馏水冲洗后,用 1%盐酸分核。切片用伊红溶液染色,用 85%、90%、95%和 100%乙醇脱水,然后用滴入式凝胶封片。最后,使用全景扫描仪对切片进行扫描。

### 1.3.2 油红染色

将切片在 60%异丙醇中浸泡 1 min,然后立即放入密闭容器中的油红染色浴中浸泡 15 min(主动脉浸润 1 h)。在 60%异丙醇中浸泡 5 min(主动脉在 60%异丙醇中浸泡过夜并保存在多聚甲醛中)。在苏木精染色液中保留 30 s。

### 1.3.3 小鼠心电图

在本研究中,实验员对十二导联心电图仪做了小幅度改动,在每个导联上连接针灸针。四肢导联的连接方式与人类相同,但由于胸腔面积较小,只能固定 3 个胸导联:V1 导联(正中线,平第五肋骨)、V2 导联(左锁骨中线,平第五肋骨)和 V3 导联(左腋前线,平第五肋骨)。将导联水平刺入小鼠皮下 3 mm 处,心电图参数设置为 20 ms/mV 及 50 ms/s。分别在小鼠造模前和造模后记录心电图。由于小鼠体表面积小,导联位置的微小差异产生的影响比人类大得多,因此保持位置的一致性非常重要。此外,大多数小鼠的 AVL 导联没有明显的 QRS 波和 T 波,这可能是由于心电图向量的方向与房室导联垂直,因此本研究没有对此导联进行统计分析。

### 1.3.4 心肌核素 PET/CT 扫描

实验前小鼠禁食 12 h(不禁水),吸入 2%异氟醚/氧气进行气体麻醉,钝性剥离腹股沟处的表皮和粘膜,暴露髂静脉,注射 100 mL 18F-FDG(约 10 MBq)。如果注射失败,可在对侧髂静脉再次注射。

注射示踪剂 30 min 后,使用 PET/CT 扫描仪每隔 15 min 进行 1 次粗扫描,以动态观察示踪剂在心脏中的吸收情况。在心脏摄取峰值 15 min 后进行 15 min 静态 PET 图像扫描,并在 Cruiser 软件(1.1.6.4 版)的帮助下采用三维有序子集(OSEM3D)算法重建图像。利用 Avatar 软件(1.7.6.4 版)测量 18F-FDG 摄取量,并以标准化摄取值(standard uptake value, SUV)表示。

### 1.3.5 心肌动作电位

台式液(100 mL):NaCl 137 mg、KCl 5.4 mg、CaCl<sub>2</sub> 1.8 mg、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33 mg、MgCl<sub>2</sub> 1.0 mg、HEPES 10 mg、Glucose 10 mg。用 NaOH 将溶液 pH

调整至 7.4。Buffer A:台式液 80 mL+100 mg 牛磺酸+80 mg of BDM+10 μL×0.1 mol CaCl<sub>2</sub>; Buffer E:取 40 mL Buffer A+20 mg collagenase II; Buffer S:取 20 mL Buffer A+200 mg BSA。

在麻醉状态下取出小鼠心脏,放入预冷的台式液中,去除多余组织,在插管底部结扎主动脉。以恒定速率(灌注速率 3 mL/min,蠕动泵速度:10 r/min)灌注心脏约 2 min,然后抽出残留血液。用 Buffer A 对心脏灌注 5 min,使心脏完全停止跳动。用氧气饱和的 Buffer E 40 mL 进行灌注。2 min 后开始循环流动,整个消化过程中压力不超过 40 mmHg。用注射器注入 1 mL Buffer S,冲洗心脏中的消化酶。将左心室剪开放入 Buffer S 中,用小刀切割心肌组织并轻轻吹打以加速分离,用 80 目筛网过滤,然后将细胞悬液吸入离心管中,以 500 r/min 的转速离心 30 s,将细胞重悬于 Buffer S 中。钙重新悬浮分 3 次进行,弃上清液,加入下一浓度的钙溶液,1/3 Ca<sup>2+</sup>静置 10 min(1/3 含钙质台式溶液+2/3 Buffer S),2/3 Ca<sup>2+</sup>静置 6 min,全钙台式溶液静置 6 min。灌注后,不取出心脏。左手用眼科镊子轻轻夹起心室肌外层,用眼科剪刀剪下心室肌内层。取出心脏,用眼科剪刀沿心室中部横轴剪开心室肌外层。将上述心肌组织放入台式待切液中,吹干、过滤,室温培养 1~2 h,即可得到内外层心肌细胞。

电极液(100 mL):NaCl 876.6 mg、KCl 40.257 mg、CaCl<sub>2</sub> 19.98 mg、MgCl<sub>2</sub> 9.522 mg、D-Glu 270.24 mg、HEPES 357.45 mg、H<sub>2</sub>O 100 mL。电极内液 100 mL:KCl 1117.5 mg、MgCl<sub>2</sub> 47.61 mg、CaCl<sub>2</sub> 22.20 mg、EGTA 190.175 mg、HEPES 238.3 mg、Na<sub>2</sub>ATP 275.575 mg、H<sub>2</sub>O 100 mL。在电流钳模式下,给予 5 ms 宽、900 mA 的电流刺激,记录外层和内层心肌细胞的动作电位。

## 1.4 统计学方法

使用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。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(ANOVA)进行统计。各组数据不符合正态分布或未通过方差齐性检验时,采用非参数检验进行统计学分析。 $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

## 2 结果

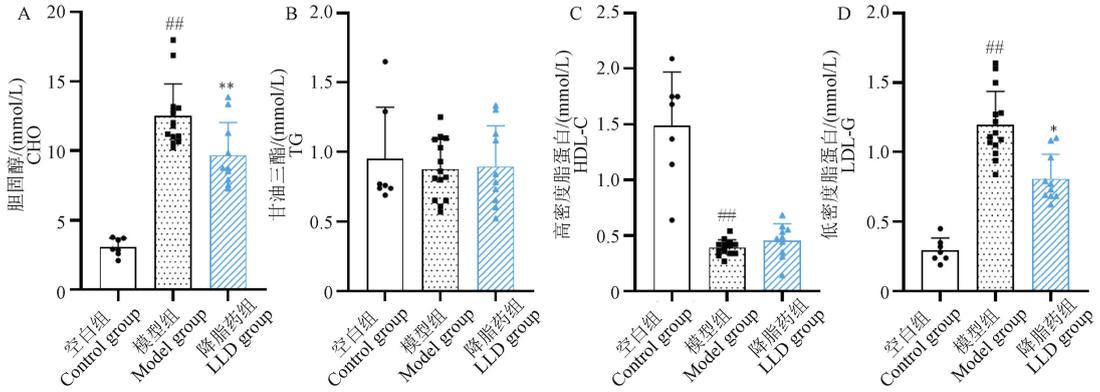
### 2.1 血脂与模型建立

高脂喂养 3 个月后,模型组的 CHO 及 LDL-C

显著高于空白组, 高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL-C) 显著低于空白组。降脂药的应用有效降低了 CHO、LDL-C, 同时升高了 HDL-C 水

平。但是也发现三组的甘油三酯 (triglyceride, TG) 差异不大, 见图 1。

如图2所示, 模型组小鼠的主动脉出现明显的

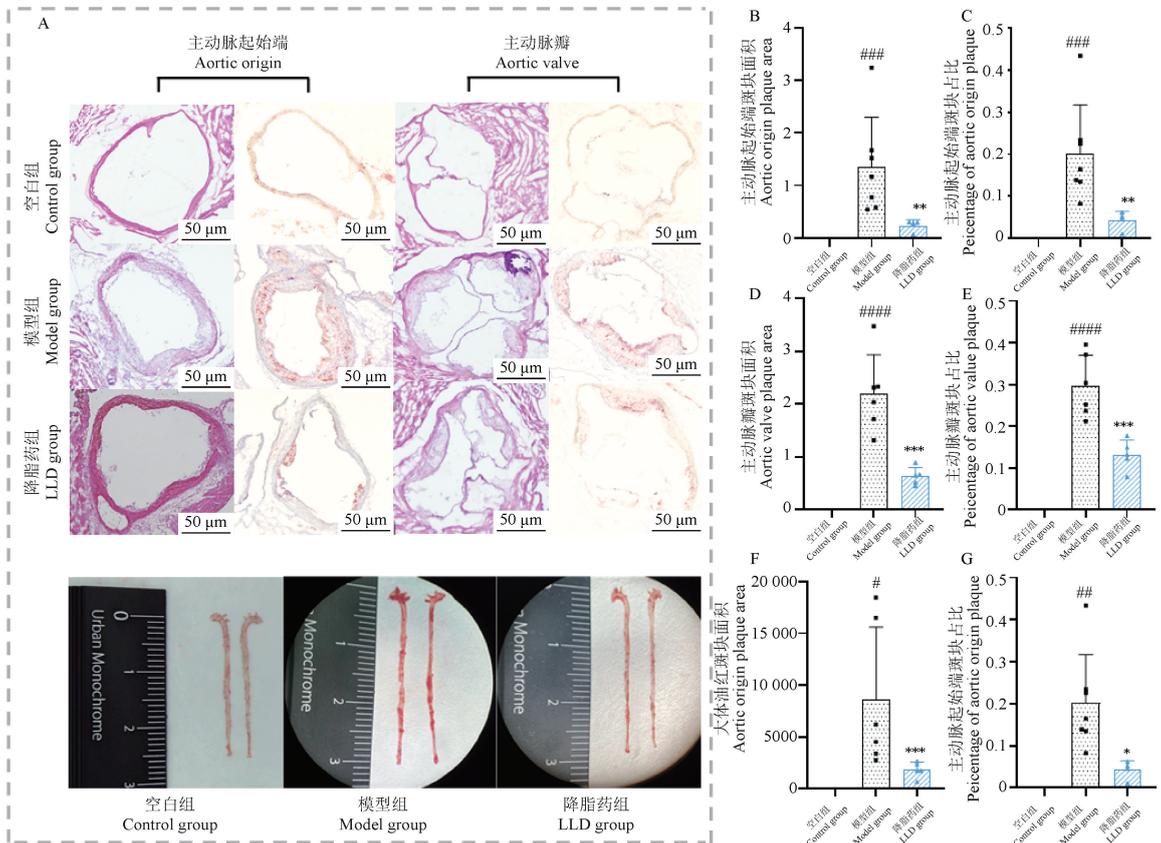


注: 与空白组相比, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 1 血脂水平

Note. Compared with the control group, <sup>##</sup> $P < 0.01$ . Compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ .

Figure 1 Blood lipids



注: A: 主动脉开口、主动脉瓣及整个主动脉的病理染色 (HE 及油红)。B~G: 主动脉开口、主动脉瓣及整个主动脉斑块的面积及占比。与空白组相比, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$ , <sup>####</sup> $P < 0.0001$ ; 与模型组相比, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

图 2 动脉粥样硬化病理

Note. A, Pathological staining (HE and oil red) of the aortic opening, aortic valve and whole aorta. B~G, Plaque area and percentage of aortic opening, aortic valve and whole aorta. Compared with the control group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$ , <sup>####</sup> $P < 0.0001$ . Compared with the model group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ .

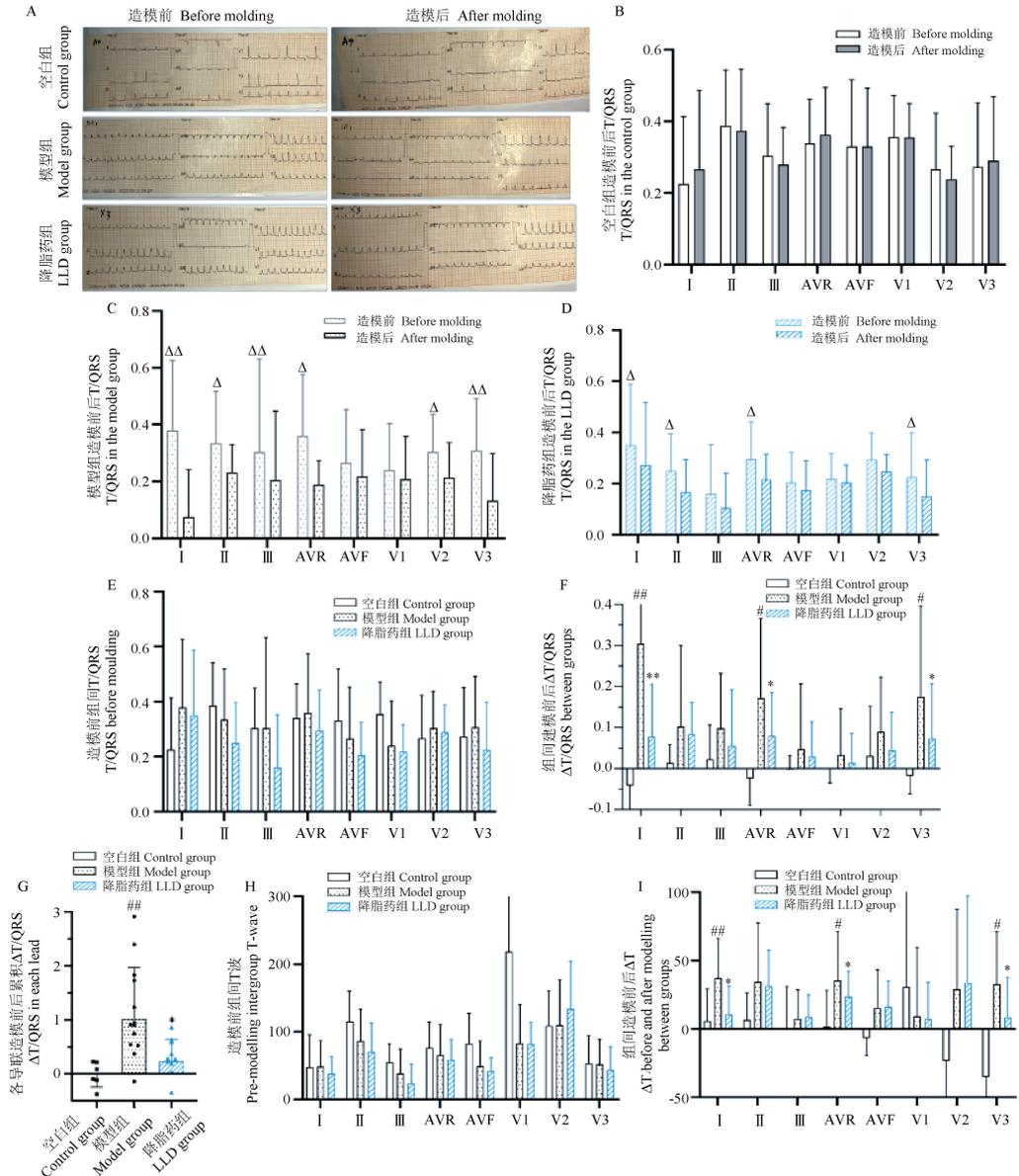
Figure 2 Pathology of atherosclerosis

脂质斑块,而在主动脉弓和肾动脉分支中更为明显。在显微镜下可以看到模型组小鼠冠状动脉成为瓷白色,而空白组冠状动脉是透明的且很难辨别的。本研究随机选取了多个样品,对主动脉的起始端(在血管周围可见少量的心肌和心耳组织)和主动脉窦进行了 HE 和油红染色。在空白组中,没有发现斑块形成。模型组的血管壁明显增厚,周围有

许多炎症细胞,血管的内膜形成了大量的脂质斑块。相比之下,降脂药组的病变明显减少,这也说明高血脂是斑块形成的重要诱因之一。

## 2.2 小鼠心电图

心电图 T 及 T/QRS 趋势相近,但 T 波出现不稳定的情况,这主要是导联连接位置的细小变化引起的(图 3A、3H、3I)。T/QRS 则更加稳定,与人类心



注:电传导方向与此导联垂直导致“AVL”导联的波形不明显,因此未进行统计分析。A:各别造模前后心电图;B~I:造模前后各心电图导联的 T/QRS 及  $\Delta T/QRS$ 。造模前后比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与空白组相比,  $\# P < 0.05$ ,  $\#\# P < 0.01$ ;与模型组相比,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ 。

图 3 小鼠心电图

Note. Waveforms in the “AVL” lead are not obvious due to the direction of electrical conduction being perpendicular to this lead, and therefore were not statistically analysed. A, ECG before and after molding in each group. B~I, T/QRS and  $\Delta T/QRS$  in each ECG lead before and after molding. Comparing before and after molding,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ . Compared with the control group,  $\# P < 0.05$ ,  $\#\# P < 0.01$ . Compared with the model group,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ .

Figure 3 Electrocardiogram of mice

心电图分析相似, T/QRS 是对结果误差的纠正。在造模前各组之间的 T/QRS 是没有显著差异的(图 3E), 此外空白组在普通饮食喂养 3 个月后 T/QRS 亦无显著变化(图 3B), 模型和降脂药组的多数导联在造模后出现 T/QRS 的显著降低(图 3C、3D)。本实验关注了造模前后 T/QRS 的变化(组间  $\Delta T/QRS$  的比较, 此“ $\Delta$ ”为疗前 T/QRS 与疗后作差, 值越大代表 T 波压低越明显)。在部分导联中模型组  $\Delta T/QRS$  显著高于空白组, 本研究对不同导联  $\Delta T/QRS$  进行了整合分析, 结果显示模型组显著高于空白组, 同时降脂药显著改善了模型组压低的 T 波(图 3A、3F、3G)。

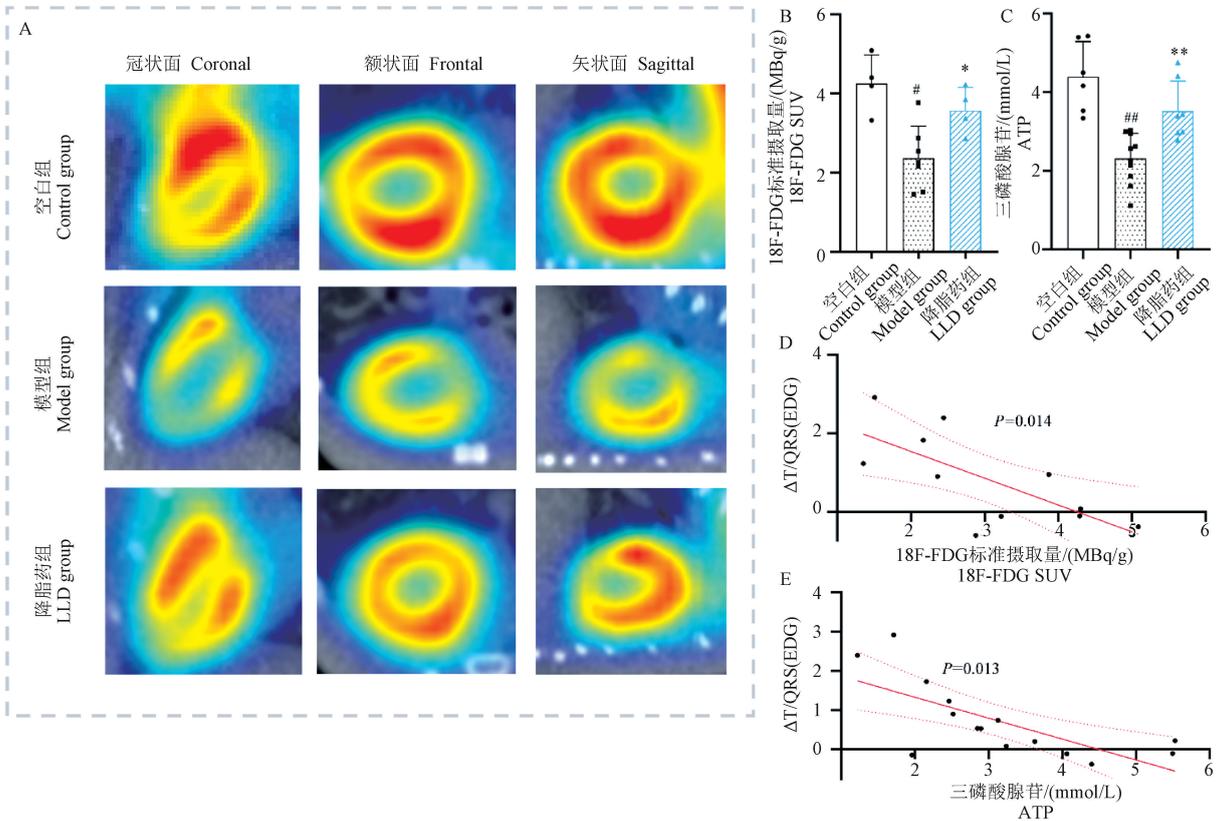
### 2.3 心肌核素灌注-PET/CT 扫描

在本研究中, 模型组心肌组织三磷酸腺苷

(adenosine triphosphate, ATP) 含量明显低于空白组 ( $P < 0.01$ ), 而降脂药组心肌 ATP 含量显著高于模型组, 说明降脂药有效改善了模型组心肌缺血状态(图 4C、4E)。在核素灌注扫描的实验中我们发现模型组心肌在不同部位的核素摄取有缺陷, 核素摄取显著降低, 说明其出现了心肌血流灌注障碍, 而降脂药组显著增加了模型组的血流灌注量 ( $P < 0.05$ )(图 4A、4B、4D)。

### 2.4 心肌细胞膜电位

本实验通过膜片钳技术对内层和外层心肌细胞膜电位进行了测量。结果显示小鼠内层与外层心肌动作电位差异明显, 内层心肌细胞的复极过程更加缓慢(主要因为内层心肌细胞 3 期更为平缓), 这与人类心肌细胞的电生理活动相似(图 5A)。当

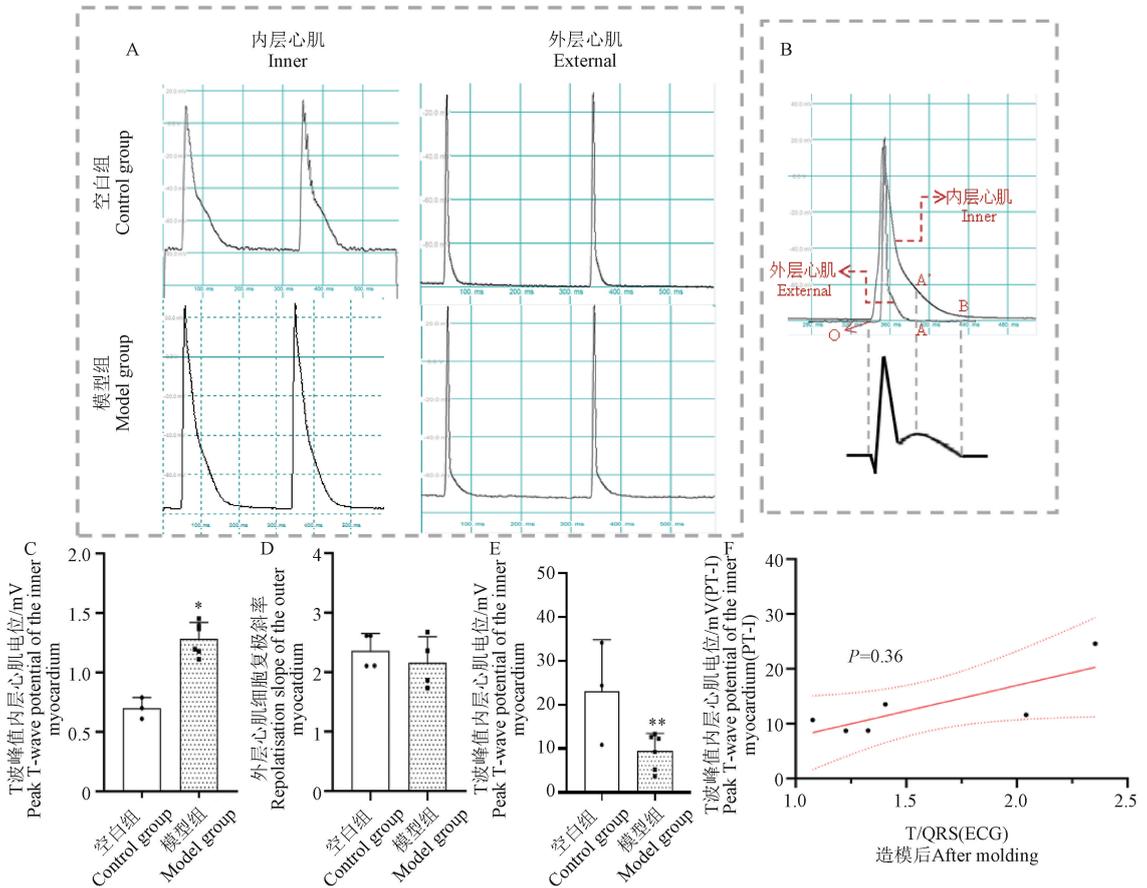


注: A: 对比空白组, 模型组小鼠心肌出现明显的核素摄取量减低, 同时出现灌注缺损的情况, 这说明模型组心肌血流灌注出现了障碍; B: 18F-FDG 标准摄取量; C: ATP 含量; D~E: 相关性分析显示核素灌注量(及心肌 ATP 含量)与 T 波压低程度成线性关系。与空白组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与模型组相比,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ 。

图 4 心肌核素灌注-CT/PET 扫描及 ATP 含量

Note. A, In contrast to the control and LLD group, the myocardium of the model group mice showed markedly reduced nuclide uptake and concomitant perfusion deficits, which suggests that myocardial perfusion was impaired in the model group. B, 18F-FDG SUV. C, ATP content. D~E, Correlation analysis shows a linear relationship between the amount of nuclide perfusion (and myocardial ATP content) and the degree of T-wave depression. Compared with the control group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ . Compared with the model group,  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ .

Figure 4 Myocardial nuclide-CT/PET and ATP content



注: A: 对比空白组, 模型组内层心肌细胞复极速率显著升高, 而外层心肌的差异则不明显; B~F: 内外层心肌细胞形成的电位差是 T 波产生的主要原因, 外层心肌腹肌完成时 (A) 这种差异最大 (A-A'), 也是 T 波的最高峰 ( $P_{T-1}$ )。与空白组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 5 内、外层心肌细胞膜电位

Note. A, Compared with the control group, the repolarisation rate of the inner cardiomyocytes was significantly higher in the model group, whereas the difference in the outer myocardium was not significant. B~F, Potential difference formed by the inner and outer cardiomyocytes is the main cause of T-wave generation, and this difference is greatest at the completion of the ventricular myocardium of the outer layer (A) (A-A'), which is also the highest value of the T-wave ( $P_{T-1}$ ). Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 5 Membrane potential of inner and outer cardiomyocytes

外层心肌恢复静息电位时, 内外层的电位差最大, 此时也是 T 波的最高点。由于此时外层心肌恢复静息, 内层心肌的电位决定了 T 波的高度 (图 5B)。因此我们对此时间点小鼠内层心肌细胞电位 (potential of the inner myocardium at the peak of T-wave,  $P_{T-1}$ ) 进行了测量, 结果显示模型组的  $P_{T-1}$  显著小于空白组, 同时模型组内层心肌的复极斜率显著高于空白组, 同时两组外层心肌细胞复极斜率差异不大 (图 5A~5E)。此外, Spearman 相关性分析显示各样本的 T 波与  $P_{T-1}$  存在高度关联性, 这也验证了我们上述提出的假说和此缺血模型的科学性 (图 5F)。

### 3 讨论

为了研究心肌缺血状态下 T 波低平的原因, 本

实验设计了慢性心肌缺血的小鼠模型。一直以来高脂喂养 APOE<sup>-/-</sup> 小鼠是成熟的动脉粥样硬化造模方法<sup>[10-11]</sup>, 本实验验证通过长时间的高脂喂养, APOE<sup>-/-</sup> 小鼠同样可以成为可靠的慢性心肌缺血模型。

在前期实验中单独使用阿托伐他汀无法有效降低模型组的血脂, 因此我们将三联降脂疗法 (阿托伐他汀+依折麦布+阿利西尤单抗) 作为阳性对照方案。高脂饲养 3 个月后, 模型组小鼠的血脂 (CHO、LDL-C) 显著高于空白组。模型组的主动脉及冠状动脉因长有脂质斑块而变成非透明的瓷白色, 同时主动脉窦开口处也附着明显的白色斑块, 这种脂质斑块在油红染色下呈现红色。空白组的动脉是透明的, 其冠状动脉很难辨认的, 同时血管

壁未见斑块形成。降脂药显著降低了 APOE<sup>-/-</sup> 小鼠的 CHO 和 LDL-C 水平,也大幅度减少了模型小鼠主动脉上的脂质斑块。本实验对小鼠进行了心肌核素-PET/CT 扫描,我们发现模型组小鼠心肌出现了灌注不足及缺损的情况,这是血流灌注障碍引起的,而空白组和 LLD 组小鼠的血流灌注则更加充盈。这说明模型组小鼠已经出现了心肌缺血的情况,而降脂药有效改善了血流灌注障碍。

### 3.1 小鼠心电图

和人类相比,小鼠心电图存在更加明显的个体差异,仅在造模后进行心电图评价是不足以反应疾病程度的,而造模前后“T 波”的变化值更加具有意义。因此,本实验对每个样本均进行了造模前及造模后的评价。对比造模前,多数模型小鼠会出现“T 波”压低的现象,空白组小鼠在饲养 3 个月没有明显的“T 波”变化。模型组心电图整体  $\Delta T/QRS$  显著高于空白组。上述实验结果说明模型组在造模后“T 波”压低更加明显。三联降脂药的应用不仅大幅度降低了模型组小鼠的血脂水平,也显著减少了主动脉斑块的形成,同时也改善了模型组小鼠“T 波”压低的情况。Spearman 相关性分析显示  $\Delta T/QRS$  与血脂(CHO、LDL-C、HDL-C)及 AS 病变存在线性关系。

### 3.2 心肌缺血与 T 波低平

T 波是由心室复极化产生的,心肌去极化是从内层扩散到外层心肌的,如图中实线箭头所示。然而外层心肌(Epi)动作电位的持续时间比内层心肌(Endo)细胞更短,虽然外层心肌细胞是最后去极化的,但他们先完成复极化的过程。因此,在大多数导联中 T 波并不是倒置的。T 波的持续时间比 QRS 波长,这是因为去极化涉及到高速的浦肯野系统,从而在整个心室快速传导动作电位,而复极化的传导则不涉及这个路径,因此复极需要更多的时间。

人类外层心肌复极速度显著快于内层心肌,内、外层心肌复极电位出现了差异,因此形成了 T 波<sup>[12]</sup>。当外层心肌完成复极时电位差最大,此时也是 T 波的峰值,而当内层心肌继续完成复极,T 波也逐渐消失<sup>[13-15]</sup>。本实验运用膜片钳技术记录了小鼠内层及外层心肌的动作电位。与人类不同,小鼠心肌缺少明显的平台期,因此在小鼠心电图上我们看不到 ST 段。但小鼠内层心肌复极速率同样小于外层,因此小鼠心电图上也出现了“T 波”。

T 波是因为内、外层心肌电位差形成的,将心肌

作为一个整体去研究和阐释显然是不恰当的。本实验中模型组小鼠内层心肌动作电位出现了明显的外层化,其复极的速率明显高于空白组,更快的复极速率意味着内层心肌更低的电位。然而,模型与空白组的外层心肌复极斜率差异并不明显,这在各样本中均有相似的结果。内外层电位差的减少导致小鼠“T 波”出现了压低的情况。单纯用内层心肌比外层更容易缺血来解释内外层心肌的差异是不充分的<sup>[16]</sup>。另一种可能的原因是离子通道分布的差异导致内层心肌复极速率对缺血更加敏感,也具有更容易变化的动作电位。

心肌复极速率的增加与 ATP 依赖型 K 离子通道(ATP-dependent K<sup>+</sup> channels, K<sub>ATP</sub>)的激活关系密切。缺血导致组织氧分压的下降,细胞内 ATP 水平下降<sup>[17]</sup>。当 ATP 下降时, K<sub>ATP</sub> 通道打开,允许 K<sup>+</sup> 离开细胞,这加速了心肌细胞复极化的过程。此外,ATP 的减少可能会降低 Na/K-ATP 泵的活性,导致细胞外 K<sup>+</sup> 的积累和静息电位的升高<sup>[18]</sup>。对于缺血心肌的自我保护及维持心肌膜电位稳定, K<sub>ATP</sub> 是一种重要的调节机制。

此外,在缺血状态下儿茶酚胺从神经末梢和细胞中大量释放,葡萄糖氧化受到抑制,糖酵解受到刺激,乳酸产量增加<sup>[19]</sup>。糖酵解活性及内环境 pH 值是细胞外 K<sup>+</sup> 水平主要影响因素,在缺血状态下,以往的动态平衡被打破,细胞外出现 K<sup>+</sup> 累积<sup>[20]</sup>。当细胞外 K<sup>+</sup> 水平升高时,细胞电导性增加,依靠电压激活的电流如 I<sub>K1</sub> 通道、I<sub>Kr</sub> 和 I<sub>to</sub> 以及 K<sup>+</sup> 配体通道如 K<sub>ACh</sub>、K<sub>AA</sub> 和 K<sub>Na</sub> 都增加了电导性,这带来了更多的外向电流<sup>[21]</sup>。

### 3.3 ST 抬高与压低

心电图可以通过 ST 段的变化来为缺血提供额外的证据。QRS 结束和 T 波开始之间的部分通常是等电的(心电图记录为 0 mV)。如果冠状动脉血流不足以满足运动时心脏增加的氧气需求,心肌就会缺氧,ST 段就会出现变化<sup>[14]</sup>。

ST 段抬高通常是严重的心肌缺血的标志,并发生在大多数急性心肌梗死中。这是 AS 斑块破裂导致冠状动脉完全阻塞并随后形成血栓所引起的。这种心肌梗死常伴随心脏酶含量升高(如肌钙蛋白),并被称为 ST 段抬高心肌梗死(ST elevation myocardial infarction, STEMI)。在 ST 段抬高的情况下,通常是心肌的透壁梗死<sup>[11]</sup>。因为他无法维持正常的离子梯度,该缺血组织的静息电位高于正常电

位(去极化状态)。由于是透壁心梗,内外层坏死心肌不具有电位差,但其电位高于周围正常心肌,其方向远离电极,因此在心电图上记录为负电压(在 T 波结束和 QRS 开始之间)。而当整个心室应该去极化后,心电图基线电压为零(在 QRS 与 T 波之间),电极就会记录一个基线电压。因其高于复极后的静息负值电压,因此心电图上显示为 ST 的相对抬高。类似的理论可以应用于对 ST 压低的解释。

心内膜下缺血导致心室壁该区域的静息电位升高,并形成朝向电极片的正向电位,这也被成为舒张期损伤电流。当内外层心肌去极化之后进入平台期,内外层电压相同(电压差为 0),并在心电图上形成 0 mV 的基线。但此时 0 mV 的基线相对于复极后升高的电位处于相对负值,因此 ST 段会形成相对的凹陷状下移<sup>[16]</sup>。

综上所述,本实验说明常用于动脉粥样硬化的 APOE<sup>-/-</sup>小鼠也可用于建立稳定的慢性心肌缺血小鼠模型。而小鼠心电图与人类一样可以用来评价心肌血供状态,其“T 波”与人类相似同样可以成为评价心肌缺血的重要标志。通过对小鼠心肌细胞膜电位的测量证实“T 波”的高低与复极时内、外层心肌电位差有关,但外层心肌动作电位受缺血影响不明显,而内层心肌复极速率增加可导致心肌内外电位差减少,是缺血状态下“T 波”压低的主要原因。

#### 参考文献:

[ 1 ] GOLDSBOROUGH E 3rd, TASDIGHI E, BLAHA M J. Assessment of cardiovascular disease risk: a 2023 update [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2023, 34(4): 162-173.

[ 2 ] MORISHITA T, TAKADA D, SHIN J H, et al. Impact of policy alterations on elective percutaneous coronary interventions in Japan [J]. *Heart*, 2023, 109(8): 612-618.

[ 3 ] 晋晓丽, 于力, 王岚. 早发冠心病 PCI 术后发生不良心血管事件的危险因素分析 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2023, 15(6): 737-739.

JIN X L, YU L, WANG L. Risk factors of adverse cardiovascular events in patients with premature coronary artery disease after percutaneous coronary intervention [J]. *Chin J Evid Based Cardiovasc Med*, 2023, 15(6): 737-739.

[ 4 ] LIEW R. Electrocardiogram-based predictors of sudden cardiac death in patients with coronary artery disease [J]. *Clin Cardiol*, 2011, 34(8): 466-473.

[ 5 ] GOULD K L, JOHNSON N P, BATEMAN T M, et al. Anatomic versus physiologic assessment of coronary artery disease. Role of coronary flow reserve, fractional flow reserve, and positron emission tomography imaging in revascularization decision-making [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(18): 1639-1653.

[ 6 ] KLABUNDE R E. Cardiac electrophysiology: normal and

ischemic ionic currents and the ECG [J]. *Adv Physiol Educ*, 2017, 41(1): 29-37.

[ 7 ] GOLDMAN S, RAYA T E. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure [J]. *J Card Fail*, 1995, 1(2): 169-177.

[ 8 ] 张世田, 庞路路, 唐汉庆, 等. 大鼠心肌缺血模型制备方法的比较及改进浅析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(7): 98-101.

ZHANG S T, PANG L L, TANG H Q, et al. Comparison and improvement of the methods for establishment of rat models of myocardial ischemia [J]. *Chin J Comp Med*, 2017, 27(7): 98-101.

[ 9 ] KUMAR D, HACKER T A, BUCK J, et al. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation [J]. *Coron Artery Dis*, 2005, 16(1): 41-44.

[ 10 ] SIMON F, LARENA-AVELLANEDA A, WIPPER S. Experimental atherosclerosis research on large and small animal models in vascular surgery [J]. *J Vasc Res*, 2022, 59(4): 221-228.

[ 11 ] ZHAO Y, QU H, WANG Y, et al. Small rodent models of atherosclerosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110426.

[ 12 ] FORD T J, CORCORAN D, BERRY C. Stable coronary syndromes: pathophysiology, diagnostic advances and therapeutic need [J]. *Heart*, 2018, 104(4): 284-292.

[ 13 ] BARTOS D C, GRANDI E, RIPPLINGER C M. Ion channels in the heart [J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(3): 1423-1464.

[ 14 ] LI D, LI C Y, YONG A C, et al. Source of electrocardiographic ST changes in subendocardial ischemia [J]. *Circ Res*, 1998, 82(9): 957-970.

[ 15 ] NERBONNE J M, KASS R S. Molecular physiology of cardiac repolarization [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(4): 1205-1253.

[ 16 ] KJEKSHUS J K. Mechanism for flow distribution in normal and ischemic myocardium during increased ventricular preload in the dog [J]. *Circ Res*, 1973, 33(5): 489-499.

[ 17 ] CARMELIET E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(3): 917-1017.

[ 18 ] KLÉBER A G. Resting membrane potential, extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts [J]. *Circ Res*, 1983, 52(4): 442-450.

[ 19 ] SCHÖMIG A, FISCHER S, KURZ T, et al. Nonexocytotic release of endogenous noradrenaline in the ischemic and anoxic rat heart: mechanism and metabolic requirements [J]. *Circ Res*, 1987, 60(2): 194-205.

[ 20 ] GWILT M, NORTON B, HENDERSON C G. Pharmacological studies of K<sup>+</sup> loss from ischaemic myocardium *in vitro*: roles of ATP-dependent K<sup>+</sup> channels and lactate-coupled efflux [J]. *Eur J Pharmacol*, 1993, 236(1): 107-112.

[ 21 ] CARMELIET E. Induction and removal of inward-going rectification in sheep cardiac Purkinje fibres [J]. *J Physiol*, 1982, 327: 285-308.