

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0939-04

· 实验研究 ·

大鼠急性心肌梗死模型的建立

李应东, 赵信科, 李子佳, 陈雪娟, 刘凯

(甘肃中医学院附属医院心血管内科, 甘肃省兰州市 730000)

[关键词] 心肌梗死; 结扎术/方法; 大鼠; 动物疾病模型

[摘要] **目的** 建立大鼠急性心肌梗死实验模型。**方法** 采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉、直视下经口腔气管插管、开胸行冠脉左前降支结扎法, 术后给予呼吸道管理; 并进行心电图、心肌酶谱、病理组织学和坏死心肌组织学定量检查来证实。**结果** 40只模型组大鼠中, 死亡6只, 模型制备成功率85%。大鼠术后30min心电图肢体导联ST段弓背向上抬高, 出现病理性Q波; 结扎前降支血管后24h和40h时间点, 模型组肌酸激酶同工酶、血清乳酸脱氢酶、乳酸脱氢酶同工酶较假手术组明显高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 在60h时间点血清乳酸脱氢酶、乳酸脱氢酶同工酶亦升高($P < 0.05$); 组织切片镜下观察病变区心肌细胞排列紊乱、疏松, 细胞核固缩、碎裂; 模型组心肌梗死与左心室湿重比值较假手术组明显高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 该心肌梗死动物模型构建方法简单, 创伤轻, 成功率高, 结果可靠。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Establishment of Rats Model of Acute Myocardial Infarction

LI Ying-Dong, ZHAO Xin-Ke, LI Zi-Jia, CHEN Xue-Juan, and LIU Kai

(Division of Cardiology, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Ligation Methods; Rat; Animal Disease Model

[ABSTRACT] **Aim** To make an animal model of acute myocardial infarction in rats. **Methods** Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium solution, oral tracheal intubation under direct vision, the operating rats' ribcage, the left anterior descending coronary artery (LAD) was ligated. After the surgery, rat's respiratory tract was cleared. ECG, cardiac enzyme levels, pathological organization and measuring the infarct size were applied.

Results 6 of 40 rats died during the surgery, the success rate was 85%. Thirty minutes after operation, Wistar rats' ECG showed the ST segment elevated and the pathological Q wave appeared. MB isoenzyme of creatine kinase (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), LDH1 was compared in myocardial infarction group and sham-operation group before ligation of LAD. CK-MB, LDH, LDH1 in myocardial infarction group increased significantly than those in sham-operation group 24 h, 40 h after occlusion ($P < 0.05$). LDH and LDH1 also increased significantly at 60 h ($P < 0.05$); Observing the histological section under the light microscope, it was found that pathological cardiac muscle cells were arranged in disorder and cell nucleus pyknosis and chip occurred. ischemic myocardium weight / left ventricle wet weight was also significantly greater in myocardial infarction group than sham-operation group 40 h, 60 h and 21 days after occlusion ($P < 0.01$).

Conclusion This showed that the technique was easy to operate with small wound, high success rate and credibility.

急性心肌梗死是威胁人类生命的重大疾病, 其模型的开发应用, 是研究人类心肌梗死病理、诊断乃至治疗的基础, 对于人类研究心肌梗死具有重要价值^[1]。大鼠作为研究心血管疾病的动物模型已得到公认^[2]。目前心肌梗死模型的制备主要采用药物法、结扎法、微创法和介入法等, 开胸式冠脉结扎法操作简单, 结扎部位固定, 形成梗死可靠, 是制作

心肌梗死模型的最常用方法^[3]。本实验用 Wistar 大鼠为实验动物, 用冠状动脉结扎法建立心肌梗死动物模型, 并通过功能性指标 (心电图), 生化指标 (血清心肌酶谱), 病理组织学和坏死心肌组织学定量检查反应心梗的发生, 以便在此基础上, 进一步探讨各种心肌梗死治疗方法的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

Wistar 大鼠 64 只 (SPF 级), 体重 240 ± 20 g 由甘肃中医学院科研实验动物中心提供 (合格证号为 SCXK(甘)2004-0006)。实验场所甘肃中医学院科研实验中心 SPF 级动物实验室。将 64 只雄性

[收稿日期] 2010-06-22 [修回日期] 2010-11-10

[基金项目] 甘肃省科技重大专项资助项目 (20090289)

[作者简介] 李应东, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 省级重点学科带头人, 甘肃省中西医结合学会常务理事, 研究方向为中西医结合治疗心血管疾病, Email 为 lydj12@163.com。赵信科, 硕士, 住院医师, 研究方向为心血管疾病的研究, Email 为 zxcd412@163.com。李子佳, 硕士, 住院医师, 研究方向为心血管疾病的研究, Email 为 119268014@qq.com。

Wistar大鼠依体质量编号后随机分成 2 组 (实验终点 21 天), 其中假手术组 24 只, 模型组 40 只。

1.2 主要仪器及试剂

硝基四氮唑蓝 (上海, 批号: 20090902)、PBS (博士德公司), 血清乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、乳酸脱氢酶同工酶 (LDH 1)、肌酸激酶同工酶 (MB isoenzyme of creatine kinase, CK-MB) (华美生工), 美国亚培全自动生化分析仪, PowerLab/16 SP 生理记录仪、Chart 软件, BM 笔记本电脑、小动物呼吸机 (型号: HD-22), XST-①温控式大鼠解剖台 (南京泉水教学仪器厂), Sartorius 读数分析天平 (美国, 型号: BP1218)、手术器械、无损伤缝合针、戊巴比妥钠、青霉素钠和生理盐水等。

1.3 模型的制备

大鼠称重后 3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg 体重, 配制成 3% 的浓度后, 按 100 mg 体重, 1/6 mL 麻药给药) 腹腔注射麻醉, 实验过程中需要维持麻醉追加戊巴比妥钠。麻药起效后, 仰卧位固定大鼠四肢及头部胸部及颈部备皮。将小动物手术台头端向上抬起, 使呈 45°~60° 仰角, 灯光照射颈部, 助手向上及向腹侧牵引大鼠舌尖部, 术者用小压舌板轻轻向上挑起舌根, 可见大鼠声带随呼吸开启及闭合, 在开启的瞬间, 迅速插入气管插管 (气管插管为大鼠灌胃器改制), 用镊子柄对准气管插管, 可见镊子柄上有水汽随呼吸一闪一闪, 说明气管插管在气管内。放平手术台, 迅速联结动物人工呼吸机进行人工呼吸 (吸气与呼气比为 1: 1, 潮气量为 30 mL/kg 通气频率 70 次/分)。

在人工呼吸下, 在胸骨左缘触及心脏搏动处纵行切开皮肤约 3 cm, 上界为两前肢后缘边线, 下界为第 5 肋间, 依次切开皮肤、浅筋膜, 并用止血钳钝性分离胸大肌和前锯肌交界处, 在靠胸骨缘处用止血钳钝性分离第 3 和第 4 肋间, 撑开肋间暴露心脏, 用镊子提起心包壁层, 再用眼科小剪刀小心剪开心包, 暴露心脏、血管, 用力挤压胸部及腹部至动物心脏显露于胸腔外。心脏显露于胸腔外, 棉签棒向上推开胸腺就可清楚找到左冠状静脉, 在左心耳下缘与肺动脉圆锥间距主动脉根部约 3 mm 处, 以左冠状静脉主干为标志, 于左心耳根部下方 2 mm 以外进针; 以 7-0 眼科无创缝合针穿过左冠状动脉前降支深部肌层, 进针深度 0.3~0.5 mm, 在肺动脉圆锥旁出针。

小心打结并观察心电图动态变化, 以肢体导联出现 ST 段上抬 0.2 mV 以上并伴对应导联改变, 同时肉眼观察结扎区域变白, 持续半小时以上作为模

型成功的标志。如一次结扎不成功, 可重复结扎。

仔细检查心脏无出血时迅速将心脏复位关胸, 用 1 号丝线先间断缝合肌肉 (包括胸大肌、前锯肌和肋间肌同时缝合), 最后一针先穿针打虚结, 通过此间隙插入 5 mL 去针头注射器用于胸腔抽吸, 边抽吸边打结使胸腔恢复负压, 然后缝合皮肤。

术后 1 h 停止人工呼吸, 拔出气管插管, 并在 25°C 条件下苏醒, 肌肉注射青霉素 40 万 u。手术全过程为无菌操作, 术后不需拆线。

假手术组大鼠进行颈部切开, 气管插管, 开胸, 前降支下缝线等过程均同造模组, 只是不进行左冠状动脉结扎。

1.4 观察项目

1.4.1 心电图检测 采用标准肢体导联, 对模型组 40 只大鼠在 LAD 结扎前后即刻监测, 观察心电图变化及病理性 Q 波出现与否。

1.4.2 血清心肌酶谱 采用股动脉取血的方法, 分别在 24 h 和 60 h 时, 每次从假手术组、模型组随机选出 6 只, 取血 5 mL 放到抗凝管中并立即送检。按照试剂盒说明, 采用全自动生化分析仪测定 LDH、LDH 1 和 CK-MB。

1.4.3 心肌组织病理检查 处死假手术组 5 只 (开胸术后第 21 天) 和模型组 5 只 (结扎术后第 21 天) 大鼠, 取出心脏并快速、准确切取穿线下区、结扎下区组织 (不超过 1 cm 大小), 置入 10% 福尔马林固定液中, 固定后行组织修整、洗涤、酒精逐级脱水, 二甲苯置换出组织块中的酒精, 石蜡包埋, 切片切成 4 μm 的薄片, HE 染色, 封片, 光镜观察。

1.4.4 心肌梗死范围测定 取出冰箱冻存的模型组大鼠 (结扎术后第 40 h、60 h 和 21 天 3 个时点) 心脏, 将心脏沿纵轴有心尖到心底切成约 2 mm 的薄片, 在 37°C 与 0.1% 的 NBT (氯化硝基四氮唑蓝) 溶液孵育 10 min, 正常心肌细胞被染为蓝色, 梗死区不被染色而呈粉白色。称白色梗死区边缘切除梗死部分心肌并称量, 以梗死心肌与全左心室心肌重量的百分比表示梗死范围。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 模型的建立

假手术组共 24 只, 无死亡; 模型组共 40 只大鼠, 死亡 6 只, 成功制备 34 只, 制备成功率为 85.0%, 其中 2 只因在术后呼吸道阻塞抢救无效死

亡, 4只因心律失常而致死亡。小心打结并观察心电图动态变化, 以肢体导联出现 ST段上抬. 02 mV以上并伴对应导联改变, 同时肉眼观察结扎区域变白, 持续半小时以上作为模型成功的标志。

2.2 心电图监测

模型组 40只大鼠结扎前心电图均正常, 阻断后即刻有 29只大鼠肢体导联 ST段弓背向抬高 0.2~0.5 mV, 与 T波融合成单相曲线; 0.5 h后有 34只实验大鼠可见肢体导联 ST段抬高 0.5~1.0 mV; 2

h后仍有 6只大鼠心电图变化不典型(图 1)。

2.3 血清心肌酶

结扎后 24 h模型组 CK-MB、LDH、LDH1较假手术组均明显增高 ($P < 0.05$); 结扎后 40 h模型组 CK-MB、LDH、LDH1较假手术组均明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 差异有统计学意义; 结扎后 60 h模型组 LDH 和 LDH1较假手术组明显增高 ($P < 0.01$), 两组 CK-MB差异无显著性。

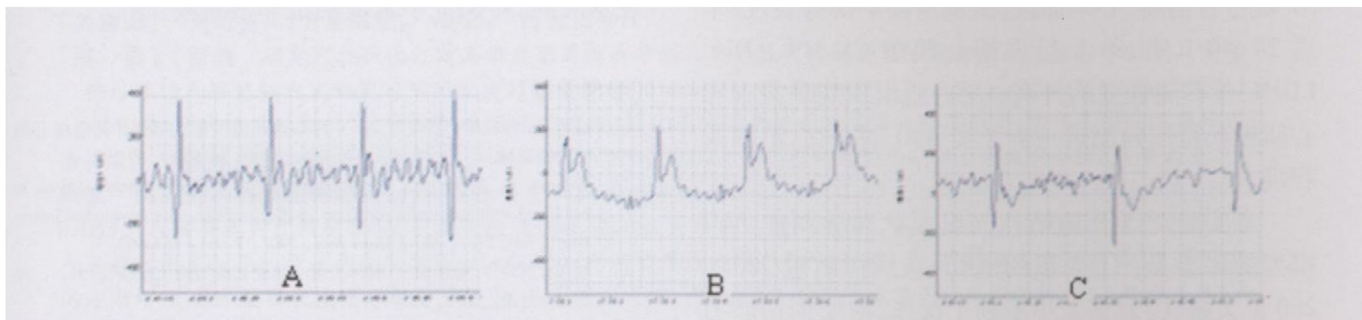


图 1 大鼠心电图监测 A 为 ST段抬高不明显, B 为 ST段呈弓背向抬高, C 为 T波倒置。

表 1 心肌酶学变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$ U/L)

分 组	24 h	40 h	60 h
CK-MB			
假手术组	892.3 ± 105.6 ^a	775 ± 120.5 ^a	624.4 ± 67.5
模型组	1432.0 ± 81.3	1987.4 ± 53.2	727.8 ± 91.3
LDH			
假手术组	854.5 ± 153.2 ^a	723 ± 112 ^a	704.4 ± 169.5 ^a
模型组	1021.0 ± 123.4	2026.4 ± 212.3	2894.0 ± 183.4
LDH1			
假手术组	29.2 ± 13.2 ^a	35.8 ± 15.3 ^a	24.4 ± 21.2 ^a
模型组	41.5 ± 8.5	87.2 ± 19	102.0 ± 26.7

a为 $P < 0.05$ 与模型组比较。

2.4 心肌组织病理检查

假手术组大鼠 5只, 病理切片均显示心肌细胞结构基本正常, 粗细肌丝排列整齐有序, 清晰完整, 肌节整齐, 证实无心肌梗死发生(图 2A); 模型组大鼠 5只, 病理切片均显示心肌细胞空泡变性, 仅见内皮细胞核, 心肌纤维多溶解坏死; 间质血管高度扩张充血, 证实发生心肌梗死(图 2B)。

2.5 心肌梗死范围检测

取出冰箱冻存的假手术组和模型组大鼠(分别在开胸后和结扎术后第 40、60 h 和 21天每时间点随机选出 5只)心脏, 应用 NBT 染色, 计算梗死心肌重量占全左心室心肌重的百分比。与假手术组相比, 模型组在 40、60 h 和 21天心肌梗死范围均明显

增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 表明模型组梗死范围较广。与模型组 40 h 时相比, 模型组 21天心肌梗死范围明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.01$; 表 2), 表明模型组梗死范围随时间推移而增大。

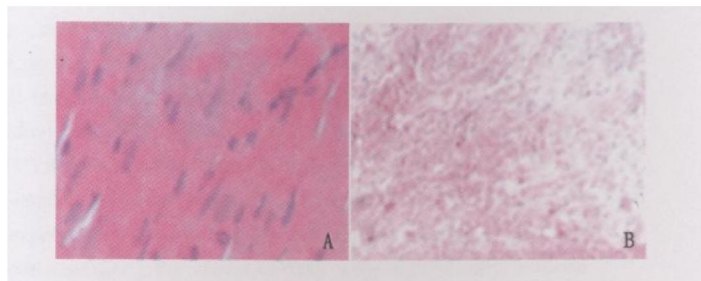


图 2 大鼠心肌病理变化光镜图 ($\times 100$) A 为无心肌梗死, B 为心肌梗死。

表 2 心肌梗死范围变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	40 h	60 h	21 d
假手术组	1.34% ± 0.16%	1.25% ± 0.34%	0.96% ± 0.09%
模型组	7.74% ± 2.16% ^a	11.43% ± 3.15% ^a	15.50% ± 5.02% ^{ab}

a为 $P < 0.01$ 与假手术组比较; b为 $P < 0.01$ 与模型组 40 h 时比较。

3 讨论

本法制作大鼠 MI 模型与文献报道相比有以下优点: (1) 存活率高, 本实验 24 h 内存活率高达 95.0%, 高于文献报道的 24 h 存活率 83.0%^[4]; (2) 预实验使用麻醉药有乙醚、乌拉坦、10% 水合氯醛和 3% 戊巴比妥钠, 总体观察戊巴比妥对血压和

心律失常影响比较小,此结果与文献报道基本相符^[5]; (3)文献报道^[6]人工呼吸的方法均为气管切开插管,本方法难度较大、易出血、手术并发症多。本实验采用直视下经口腔气管插管,方法简便,不需要气管切开,手术无创伤; (4)关闭胸腔时,一定要胸腔抽吸,边抽吸边打结使胸腔恢复负压状态,否则,容易肺不张。(5)通过较全面的评估标准显示模型制备是成功的,手术永久结扎 LAD,左室前壁楔形区域心肌颜色变为暗红色、ECG 示胸前区导联 ST 段弓背抬高、心率加快、出现室性早搏等表现;术后 24、40 h 和 60 h 后血清心肌酶 CK-MB、LDH、LDH 1 有不同程度的升高;用心肌组织病理检查和心肌梗死范围检测进一步证实 AM I 的存在、范围及程度。

本实验对于开胸结扎大鼠冠状动脉制作 AM I 模型的体会是: 大鼠的选择: 选用体质量 200~260 g 大鼠,因动物太小不利于操作,耐受创伤能力较低,而体质量及年龄过大的则不利于术后生存期的观察,且年龄过大者凝血功能下降。④麻醉程度: 以呼吸心率平稳,眼角膜反射消失,口腔肌群松弛为好,不易过深,否则易致动物死亡。④直视下经口腔气管插管: 为无创伤性插管方法,使得呼吸道感染及机体的损伤大幅度下降。确保插管在气管内并固

定好,有时因在实验过程中大鼠的挣扎以使其掉出。

肺损伤: 因受大鼠肺脏的解剖位置所决定,有时将心脏大部分覆盖,因此在结扎冠脉时需拉开肺组织,应特别注意手法以免伤及肺组织。 结扎部位选择: 以左冠状静脉主干为标志,于左心耳根部下方 2mm 以外进针。切勿以冠状动脉为标志,因其细有时看不到。 防止术后气胸: 因术后无法使用胸腔闭式引流,所以在术后行关胸时尽量抽出胸腔内气体,避免气胸的形成。⑧实验动物级别、实验条件和手术时间,对保证手术成功也非常重要。

[参考文献]

- [1] 赵慧强,韩雅玲,王守力,等. 置入铜丝缠绕型支架制作猪急性心肌梗死模型[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(3): 189-192
 - [2] Bollano E, Bergh CH, Kjellström C, et al. Growth hormone alone or combined with metoprolol preserves cardiac function after myocardial infarction in rats[J]. *Eur J Heart Fail* 2001, 3(6): 651-660
 - [3] 刘振,刘玲玲,杨延桐. 两种大鼠心肌梗死模型比较研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(4): 19-25
 - [4] 朱彦博,张于娟,李金,等. 大鼠心肌梗死模型的建立[J]. 苏州大学(医学版), 2008, 28(6): 944-946
 - [5] 许丹,张春米,李霞,等. 制作大鼠急性心肌梗死模型的实验分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2006, 9(2): 190-191
 - [6] 苏晓琳,张健,梁艳虹,等. 老年大鼠急性心肌梗死模型的制备[J]. 心肺血管病杂志, 2009, 28(4): 282-284
- (此文编辑 李小玲)