

一种快捷小鼠心肌梗死模型的建立

石洪涛, 王颖, 张俊蒙, 王绿娅, 杜杰

(首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所, 心血管重塑
相关疾病省部共建教育部重点实验室, 北京市 100029)

[关键词] 小鼠; 快捷; 动物模型; 心肌梗死

[摘要] **目的** 建立一种快速高效不需要通气辅助呼吸的小鼠心肌梗死模型制作方法, 并对制作过程中的技巧细节进行分析。**方法** 40只 C57/B6 雄性小鼠, 随机分成手术组(25只)和对照组(15只), 于麻醉状态下在左侧第3, 4肋间隙挤出心脏, 手术组结扎冠状动脉左前降支建立小鼠心肌梗死模型; 对照组不结扎冠状动脉, 其余操作与手术组相同。28天后, 心脏超声系统进行心功能测定对比, 解剖进行形态对比和病理染色对比心肌梗死和纤维化。**结果** 至术后第28天, 手术组心肌梗死小鼠的生存率80%, 对照组的小鼠生存率100%。超声检测显示28天后手术组小鼠心功能明显降低, 与对照组相比, 手术组心室明显扩大, 左心室舒张期末内径由 3.52 ± 0.10 mm 扩大到 4.65 ± 0.08 mm ($P < 0.0001$), 左心室收缩期末内径由 2.60 ± 0.19 mm 扩大到 4.36 ± 0.13 mm ($P < 0.0001$); 左心室射血分数由 $66.70\% \pm 1.41\%$ 下降到 $29.70\% \pm 1.64\%$ ($P < 0.0001$), 左心室缩短分数由 $35.90\% \pm 1.01\%$ 下降到 $14.20\% \pm 0.80\%$ ($P < 0.0001$)。肉眼可见手术组小鼠心脏左心室心腔变大, 心室壁明显变薄, 梗死面积可达 $45.10\% \pm 1.53\%$; HE、免疫组织化学、Masson 病理染色可见有明显纤维瘢痕形成, 有大量炎细胞浸润。**结论** 此种方法制备心肌梗死模型高效快捷, 动物死亡率低, 结果明显, 是一种较好的方法。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Establishment of Murine Model of Myocardial Infarction by a Rapid and Efficient Procedure

SHI Hong-Tao, WANG Ying, ZHANG Jun-Meng, WANG Lu-Ya, and DU Jie

(Key Laboratory of Remodeling-Related Cardiovascular Diseases, Capital Medical University, Ministry of Education, and Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to the Capital Medical University, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Mouse; Rapid and Efficient; Animal Model; Myocardial Infarction

[ABSTRACT] **Aim** To introduce a rapid and efficient model of myocardial infarction (MI) without the requirement of ventilation in the mouse and comprehensively describe its details. **Methods** 40 Male BABL/C6 mice were divided into 2 groups: new method MI (15) and new method Sham (25). In the new method, hearts of total 40 mice were manually exposed through a small incision of the left fourth intercostal space without intubation. In group of MI, the left anterior descending coronary artery was ligated. Hearts from group of Sham were without ligation. This novel MI procedure is rapid, with an average procedure time of 60 ± 15 seconds. We compared the difference between MI and Sham post 28 days with analysis of echocardiography, morphology and pathology. **Results** Survival rate of group MI was 80% and group Sham was 100% 28 days after surgery with our method. The echocardiography showed that the heart function of the mice with 28-day post-MI was markedly impaired. The LVIDd and LVIDs were significantly increased from 3.52 ± 0.10 mm and 2.60 ± 0.19 mm to 4.65 ± 0.08 mm and 4.36 ± 0.13 mm ($P < 0.0001$), while LVEF and LVFS were decreased significantly $66.70\% \pm 1.41\%$ and $35.90\% \pm 1.01\%$ vs $29.70\% \pm 1.64\%$ and $14.20\% \pm 0.80\%$, $P < 0.0001$, respectively. Anatomical analysis of hearts with 28-day post-MI showed enlarged left ventricles and thin ventricular walls.

[收稿日期] 2011-10-12

[基金项目] 国家自然科学基金杰出青年科学基金(30888004), 国家重点基础研究发展计划(2009CB522205)

[作者简介] 石洪涛, 硕士研究生, 研究方向为心血管重塑机制, E-mail 为 hongtaoshi@126.com。王颖, 博士, 研究方向为心血管重塑, E-mail 为 kuangkuangw@gmail.com。通讯作者杜杰, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为高血压发生及其危害, 心肌纤维化, 心血管重塑, 肿瘤血管新生, E-mail 为 jiedu@yahoo.com。

The infarct size reached to $45.10\% \pm 1.53\%$. Hematoxylin eosin (HE), Immunohistochemistry (IHC) and masson trichrome (Masson) staining confirmed plenty of macrophages infiltration and fibrosis formation. **Conclusion** This new rapid method of MI in mice represents a more efficient model of myocardial ischemic injury.

随着人口老龄化的加剧,以及社会生活水平、生活方式的改变,冠心病的发病率和死亡率在人类疾病谱中已经越来越高,对冠心病的研究倍受人们的关注。实验动物模型又是进行研究的必要条件,因此,心肌梗死模型建立的成功与否将直接影响到心肌梗死研究的成败。以往模型的制备主要是在家兔、猪等大中型动物身上进行,近年来应用大鼠的情况越来越多。小鼠便于饲养,繁殖能力强,而且当今转基因研究中,基因的敲除大都是小鼠身上进行的,因此应用小鼠建立心肌梗死模型,尤其在相关基因敲除小鼠身上建立模型,将对我们的研究提供很大的应用价值^[1]。目前国内对于小鼠心肌梗死模型的建立研究较少,而且现有报道的方法过于复杂、费时。基于小鼠心肌梗死模型制作的最新研究^[2],本文致力于介绍引进一种简洁实用快速的小鼠心肌梗死建模方法。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF 级 BALB/C 雄性小鼠 40 只,9 周龄,体重 25 ± 5 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。手术在北京市心肺血管疾病研究所屏障动物室进行,严格按照实验动物使用的 3R 原则。

1.2 手术器械、试剂

3-0 和 6-0 polypropylene 缝线,显微外科手术器械,小动物超声系统 (Visual Sonics Vevo770),小动物气体麻醉机 (XGI-8, Gas Anesthesia System),冷光源 (Nikon, MODEL C-F1230),自制固定板,2% 异氟烷,75% 酒精。

1.3 术前准备

开启小动物气体麻醉机,将小鼠放入气体麻醉机 chamber 中,待小鼠全身放松昏迷后,将小鼠取出,固定在自制鼠板上,用胶布固定小鼠呈自然仰卧位。小鼠鼻腔始终置于气体麻醉机的面罩之中,维持麻醉状态。整个手术过程不需要气管插管给予小鼠维持通气。

1.4 手术方法

手术过程如图 1 所示。(1)将应用异氟烷麻醉

后的小鼠仰卧固定在鼠板上。(2)酒精消毒小鼠切口部位皮毛。(3)~(4)在小鼠心脏部位第 3,4 肋间隙位置沿着腋窝与胸骨下端连线做一 1.5 cm 的切口。(5)~(6)用 3-0proline 丝线打一荷包松结备用。(7)~(8)钝性分离胸大肌肉与肋骨外肌肉。(9)~(10)于第 3-4 肋间穿破肋间隙,左手迅速将心脏挤出,剥开心包。在光源下,于左心耳右缘可见左冠状动脉。(11)~(12)以左心耳下缘水平线为标志,在线下 2 mm 处以 6-0 proline 丝线结扎冠状动脉,进针深度 1 mm 左右,避免刺破心脏。(13)~(14)结扎完毕,可见左心室前壁颜色由鲜红变为暗紫至苍白色,快速将心脏推入胸腔。(15)~(16)挤出胸内气体,打紧荷包关胸。摘除麻醉面罩。整个过程在 1 分钟之内完成。面罩摘除后,小鼠会在 3~5 分钟内苏醒(图 1 和图 2)。

1.5 超声心动图检测

术后 28 天将小鼠以 1% 异氟烷吸入麻醉后仰卧位固定,取胸骨旁长轴和短轴观切面。

M 型超声模式下记录左心室舒张期末内径 (LV internal diameters of diastole, LVIDd) 和左心室收缩期末内径 (LV internal diameters of systole, LVIDs),以及反映心室收缩功能的左心室射血分数 (LV ejection fraction, LVEF) 和左心室缩短分数 (LV fractional shortening, LVFS)。

1.6 形态及病理分析

术后 28 天分析完心功能后,1% 戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 麻醉所有小鼠,开胸肉眼观察心脏形态。用肝素钠生理盐水灌洗心脏。摘取心脏,并从心脏中部垂直与心脏长轴横切,之后行石蜡包埋。自心底向心尖以 5 μ m 厚度切片。TTC 染色,梗死区域最大位置处取梗死区的周长与左心室的周长作比值,统计梗死区域面积;HE、Masson 染色及 Mac-2 免疫组织化学染色观察。

1.7 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有分析采用 SPSS 16.0 软件,手术前后心功能比较使用配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

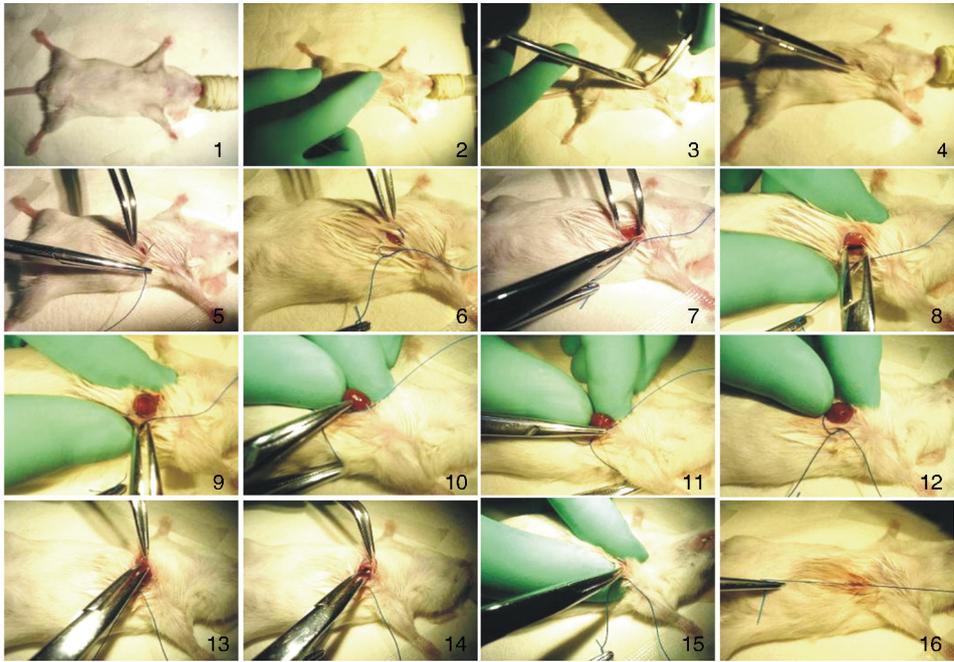


图 1. 小鼠心肌梗死模型制作过程示意图

Figure 1. Captures of procedure of murine myocardial infarction model

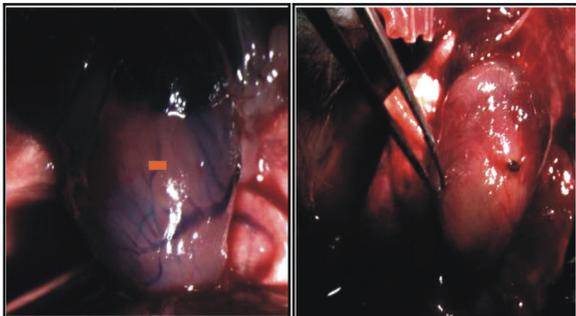


图 2. 小鼠左冠状动脉位置以及结扎部位显示图 伊文思蓝灌注小鼠心脏可更清晰见左冠状动脉前降支(橙色显示),结扎位置如图所示。结扎血管后,左心室壁颜色变为苍白。

Figure 2. Demonstration of the left anterior descending coronary artery and the ligation site

2 结果

2.1 小鼠术后存活情况

手术组小鼠冠状动脉结扎术中早期死亡率为 7.5%, 死亡原因:(1) 由于挤心脏过程中器械误触破血管导致出血死亡(1/40);(2) 由于进针过深穿破心脏引起失血性休克而死亡(1/40);(3) 由于挤胸腔排气不完全导致气胸而死亡(1/40)。术后 1 周内又有 2 只死亡, 解剖发现是左心室壁破裂所致。至术后 4 周时间手术组存活小鼠 20 只, 存活率为 80%, 对照组存活率为 100%。

2.2 心功能检测结果

超声心动图检测显示, 术后 4 周存活的手术组小鼠左心室舒张期末内径和左心室收缩期末内径明显较对照组升高(均 $P < 0.0001$), 左心室射血分数和左心室缩短分数明显降低(均 $P < 0.0001$)。提示手术组与对照组相比心脏功能有显著下降(图 3 和表 1)。

表 1. 手术组与对照组超声检测结果比较

Table 1. Outcomes of cardiac function in MI group compared with sham group

测量指标	对照组 (n = 15)	手术组 (n = 20)
LVIDd (mm)	3.52 ± 0.10	4.65 ± 0.08 ^a
LVIDs (mm)	2.60 ± 0.19	4.36 ± 0.13 ^a
LVEF	66.70% ± 1.41%	29.70% ± 1.64% ^a
LVFS	35.90% ± 1.01%	14.20% ± 0.80% ^a

a 为 $P < 0.0001$, 与对照比较。

2.3 心肌组织病理形态学检测结果

术后 28 天处死的小鼠, 开胸后肉眼可见小鼠心脏整体体积变大, 左心室壁变薄, 几乎透明。心脏组织切片, TTC 染色可见缺血坏死区域显著。梗死区域梗死面积可达 45.10% ± 1.53% (图 4)。常规 HE 染色后, 与正常小鼠心肌组织比, 术后 28 天小

鼠心肌组织在显微镜下可见其呈区域性变性坏死, 病变区肌纤维排列紊乱, 肌纤维肿胀, 局部肌纤维溶解, 空泡样变, 较多心肌细胞嗜酸性增强, 少量心肌细胞核固缩深染, 细胞核固缩碎裂, 有炎症细胞浸润, 周围纤维肉芽组织增生, 坏死心肌为纤维组织取代, 局灶性脂肪组织浸润, Mac-2 染色可见梗死部位有大量巨噬细胞浸润(图 5)。术后 4 周小鼠 Masson 染色可见心肌坏死区域纤维化显著(图 5)。

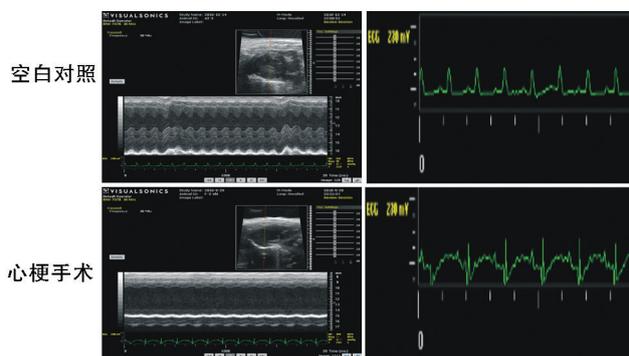


图 3. 超声心动图监测图

Figure 3. Monitor of cardiac function with echocardiography

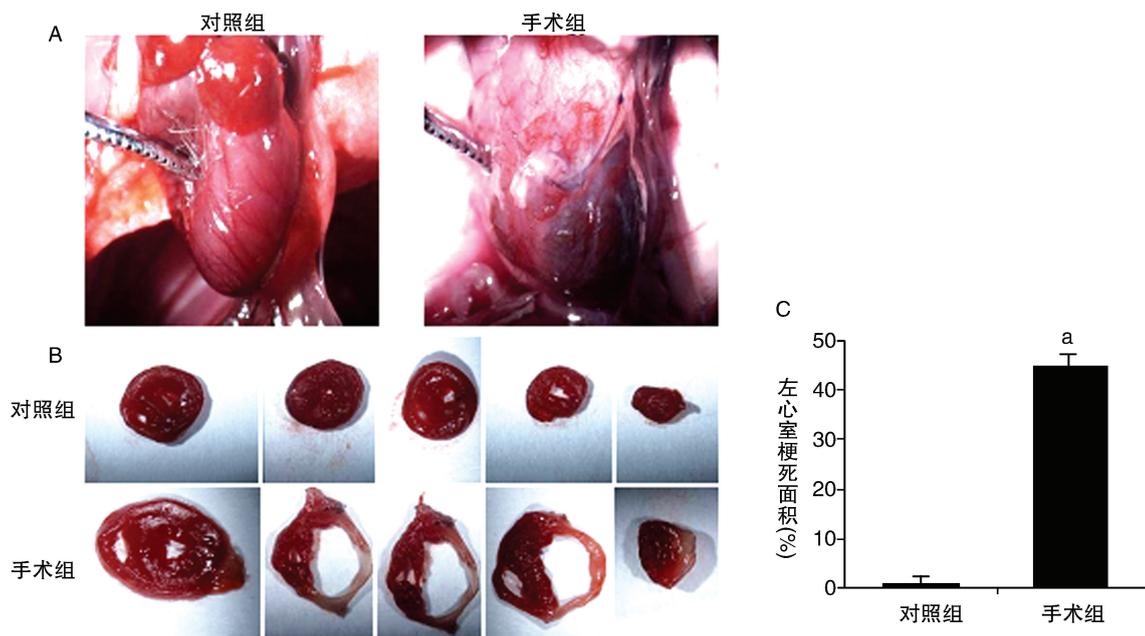


图 4. 心脏心肌梗死前后形态学变化 A 为心脏大体状况, 箭头示梗死区域; B 为心脏沿着长轴横切片, TTC 染色可见缺血坏死区域(苍白色区域)显著(箭头); C 为梗死面积统计。a 为 $P < 0.0001$, 与对照组比较。

Figure 4. Morphologic changes of heart after MI operation

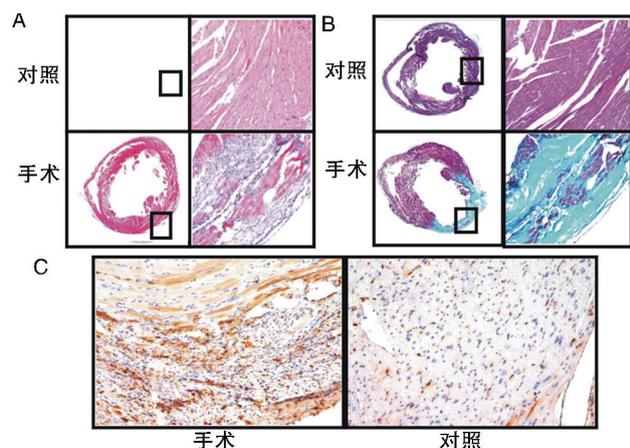


图 5. 手术 4 周后心脏病理染色结果 A 为 HE 染色, B 为 Masson 染色, C 为巨噬细胞免疫组织化学染色。

Figure 5. Comparison of sectioned tissues stained with HE, Masson and Mac-2

3 讨论

冠心病是严重威胁人类健康的重要疾病之一。目前, 目前对此类疾病的研究及相关药理学实验主要建立在心肌梗死动物模型基础上, 因此构建一种稳定、可复制、快捷高效和经济的心肌梗死动物模型是研究的必要条件。目前用于建立心肌梗塞模型的常用实验动物主要有: 猪、犬、兔、羊、小鼠及大鼠等^[3]。由于小鼠存在大量基因背景清楚的纯化品系, 且随着转基因和基因敲除小鼠技术的成熟, 加之小鼠体重轻, 繁殖力强, 周期短, 饲养成本低, 因此, 小鼠越来越多得被应用于心肌梗死实验的研究。国内目前建立心肌梗死动物模型的方法主要有: 结冠脉扎法、球囊堵塞法、栓塞法、血栓形成法、冷冻法、及 Ameriod 环套扎法等。其中冠状动脉结

扎法是应用最广泛的手段^[4-7]。但是无论哪种方法,目前国内的心肌梗死动物模型的建立都需要借助呼吸机才能完成^[8]。尤其是小鼠体型小,气管插管借助呼吸机来维持手术过程中小鼠的呼吸,需要耗费大量的时间,其中插管,常规开胸结扎冠状动脉,拔管的时间包括在内,建立一只模型小鼠需要 $25 \pm 5 \text{ min}$ ^[2]。而且极易导致小鼠的死亡。我们的制作方法不需要呼吸机,无需插管,手术时间快,心脏暴露时间短,手术造成的损伤小,成活率高,简约高效,更适合大样本研究。

与传统心肌梗死模型建立方法相比,本方法最大的特点是简洁高效。由于简洁的手术过程和无需呼吸机进行插管维持通气,大大缩短了建立模型所需要的时间。现在制作一只心肌梗死模型平均需要 $< 1.5 \text{ min}$ 时间。效率是常规方法的20倍。娴熟的技巧和丰富的经验是我们能够如此快速地建立一只成功模型的关键。我们已经建立了大于1500只小鼠模型,进行相关的实验研究。

此方法的另一个特点是,能够有效地减少手术过程对组织和心脏的损伤。由于我们手术操作简单,手术时间短,减少了胸腔开口以及心脏暴露的时间,能够将手术的创伤程度降低到最大限度,有利于术后小鼠的恢复,不但提高了生存率而且能有效排除人为手术对小鼠心脏造成的其他影响。

对于操作者而言,娴熟的手法和快速度是保证模型建立成功的关键。经过3个月时间的练习,我的手术速度达到每只 $< 1.5 \text{ min}$ 。我们相信,经过一定时间的训练和技巧摸索,每个人都可以成功地按此方法建立稳定高效的小鼠心肌梗死模型。经过摸索和提炼,操作者发现手术过程中的关键技巧细节主要有四点:胸腔开口时保证胸肌的完整性。胸肌的完整性与否对于术后胸腔的封闭性很重要。完整的胸肌可以严密盖住切口,维持术后胸腔的负压。皮肤切开后,左手持弯镊垂直提起切口胸骨侧的皮肤,可以很清晰地看到小鼠胸大肌与胸小肌的交界线。右手持蚊式止血钳沿着交界线钝性分离两下,大体分开两块肌肉。然后在交界线处沿与胸小肌走行垂直的方向夹紧胸小肌,稍提起。之后左手用弯镊穿进胸大肌,胸小肌交界处分离开胸小肌与肋骨,暴露出肋骨第三、四间隙。此时各个肌肉都是完整的。流畅地将心脏从胸腔中顺利挤出体外。暴露出肋骨第三、四间隙之后,左手继续持弯镊撑着胸小肌,右手中的蚊式止血钳松开胸小肌,在小鼠腋前线与肋骨第三、四间隙交界处穿破胸腔,深度1 cm(可有效撑开心包,不伤及血管),撑开止血钳1~2 cm。

左手松开弯镊,用左手食指,拇指夹住小鼠胸部两侧,将心脏迅速挤出胸腔开口。挤心脏时候切勿用力过大,尽量不要触及左肺,以免弄断肋骨和挤破肺脏。心脏在体外的时间不要超过30 s。这要求快速寻找到冠状动脉,在一致的位置上行穿针结扎,使模型比较均一,具体见方法中的描述。关闭胸腔前有效地将腔内气体挤出体外。将心脏推进胸腔后,右手持文式止血钳稍提起胸小肌,确保胸腔内外相通,左手迅速沿与切口垂直方向挤压胸腔,将胸腔内气体排出,打紧荷包缝合。

模型制作过程中,气胸、血胸是导致小鼠死亡的主要因素,尤其对于初学者。因此要有效地预防气胸,血胸的形成。手术过程中手法力度柔和,切勿粗暴,保持肌肉的完整。最后关胸结扎荷包之前务必挤走胸内的大部分气体,挤气时要确保切口保持开放,使胸腔与外界相通。经过一定量的练习(1500只),我们以已经能够有效地防止术后气胸,血胸的出现。

本模型制作方法,实验结果明显,与常规方法结果一致。但是手术不需用呼吸机,手术过程简单快速,且小鼠死亡率低。本方法高效快捷,造模时间短,节约成本,又可减少动物死亡,可广泛应用于心肌梗死方面的研究,极大地提高实验进程。

[参考文献]

- [1] Gondo Y, Fukumura R, Murata T, et al. Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics[J]. *BMB Rep*, 2009, 42(6): 315-323.
- [2] Gao Erhe, Lei YH, Shang XY, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse [J]. *Circ Res*, published online, 2010,107(12): 1 445-453.
- [3] 刘建, 范慧敏, 汪进益, 等. 小鼠心梗模型的建立与无创评价[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(3): 196-198.
- [4] Ahn D, Cheng L, Moon C, et al. Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286: H1 201-207.
- [5] Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, et al. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 74: 29-38.
- [6] van den Bos EJ, Mees BM, de Waard MC, et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289: H1 291-300.
- [7] Most P, Seifert H, Gao E, et al. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2006, 114: 1 258-268.
- [8] 赵宏光, 单根法. 心肌梗塞动物模型的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(1): 41-44.