

犬心肌梗死模型制备的改进

周大燕¹, 屈宗杰¹, 姜蓉², 黄晶³

(1. 重庆市第五人民医院心内科, 重庆市 400062; 2. 重庆医科大学组胚教研室, 重庆市 400016;

3. 重庆医科大学附属第二医院心内科, 重庆市 400010)

[关键词] 心肌梗死; 动物模型; 犬

[摘要] **目的** 改进制备犬心肌梗死模型的方法, 形成透壁性心肌梗死。**方法** 健康成年杂种犬 16 只, 随机分为对照组($n=8$)和实验组($n=8$); 对照组结扎左冠状动脉前降支, 实验组结扎左冠状动脉前降支及第一对角支, 建立心肌梗死模型。6 周后, 进行心脏大体形态及组织病理学观察。**结果** 犬术后 6 周, 对照组存活 6 只, 存活率为 75.0%, 实验组存活 5 只, 存活率为 62.5%, 两组存活率无统计学差异($P=0.590$)。对照组存活的 6 只犬中, 有 2 只犬大体及组织病理观察均见明显的心肌梗死区, 而另外 4 只犬大体观察未见明显的心肌梗死区, 组织病理观察可见梗死灶; 实验组存活的 5 只犬大体及组织病理观察均可见明显的心肌梗死区; 两组形成透壁性心肌梗死的犬只数有统计学差异($P=0.022$)。**结论** 结扎犬左冠状动脉前降支及第一对角支, 能形成透壁性心肌梗死, 是一种制备心肌梗死模型的有效可靠方法。

[中图分类号] R-332

[文献标识码] A

Improvement of Myocardial Infarction Model in Dog

ZHOU Da-Yan¹, QU Zong-Jie¹, JIANG Rong², and HUANG Jing³

(1. Department of Cardiology, The Fifth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400062, China; 2. Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Animal Model; Dog

[ABSTRACT] **Aim** To improve the method of making myocardial infarction models in dogs and to form transmural myocardial infarction. **Methods** 16 healthy adult mongrel dogs were randomly divided into control group ($n=8$) and experimental group ($n=8$). The myocardial infarction was established. In control group, the left anterior descending coronary artery was ligated. While in experimental group, the left anterior descending coronary artery and first diagonal branch were ligated. After 6 weeks, cardiac general morphology and histopathology were observed. **Results** After 6 weeks, there were 6 dogs survived in control group and 5 dogs survived in experimental group, and the survival rates were 75.0% and 62.5% respectively. There was no statistically significant difference at survival rate in two groups ($P=0.590$). Of the survived 6 dogs in the control group, there were 2 dogs that myocardial infarction could be seen clearly by cardiac general morphology and histopathology; Of the other 4 dogs, there was no myocardial infarction by cardiac general morphology, but micro-infarction was observed by histopathology. Of the survived 5 dogs in the experimental group, myocardial infarction could be observed clearly by cardiac general morphology and histopathology in all dogs. There was significant difference in the dog number of transmural myocardial infarction in two groups ($P=0.022$). **Conclusion** The ligation of the left anterior descending coronary artery and first diagonal branch in dog can form transmural myocardial infarction, which is an effective and reliable method for preparation of myocardial infarction model.

心肌梗死是严重危害人类健康的心血管疾病, 也是主要致死因素之一^[1]。在心血管疾病研究中,

[收稿日期] 2014-11-18

[修回日期] 2015-01-08

[作者简介] 周大燕, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的再血管化治疗, E-mail 为 zdymary@163.com。通讯作者屈宗杰, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治, E-mail 为 quzongjie1979@sina.com.cn。姜蓉, 本科, 实验师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

心肌梗死模型被广泛应用于发病机制及药物治疗等研究。犬的冠状动脉存在较多功能性侧支循环血管,犬前降支或回旋支的低位结扎,心肌坏死不完全,不易于形成透壁性心肌梗死,而结扎位置过高,心室颤动的发生率则较高,从而影响模型的成功率^[2]。本研究在制作犬心肌梗死模型时,对犬心肌梗死模型加以改进,在结扎犬左冠状动脉前降支的同时结扎第一对角支,并评价该方法建立心肌梗死模型的有效性。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂和仪器

健康成年杂种犬 16 只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不限,体重 9~13 kg;戊巴比妥钠(北京化学试剂公司);4%多聚甲醛(武汉博士德生物工程有限公司);RM6240B 型多导生理记录仪(成都仪器厂);呼吸机(德国 Drager 公司)。

1.2 动物分组及处理

16 只犬随机分为对照组和实验组,每组 8 只。3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉,气管插管,连接呼吸机和多导生理记录仪。经左胸第四肋间开胸,用扩张器撑开肋间,剪开心包,暴露左心室,心肌梗死的制作采用 3-0 号无创伤丝线结扎冠状动脉。对照组冠状动脉的结扎部位为左冠状动脉前降支分出第一对角支后约 1 cm 处。实验组结扎部位包括左冠状动脉前降支分出第一对角支后约 1 cm 处和第一对角支距分叉处约 1 cm 处,造成左心室前壁、心尖及部分侧壁的急性心肌梗死。结扎后两组的局部心肌由红色变为暗紫色,同时可见心肌收缩能力减弱,心电图可见 ST 段弓背抬高。之后缝合心包,逐层关胸,负压抽气,待有自主呼吸时脱机。两组术后肌肉注射青霉素每天 2000 kU,连续 5 天,继续喂养至术后 6 周。

1.3 心肌大体标本观察

犬到观察终点后(术后 6 周),用 3%戊巴比妥麻醉犬,经颈动脉注入 10%氯化钾 10 mL 使心脏停跳于舒张期,迅速开胸取出心脏,用冰生理盐水冲洗,解剖心脏,肉眼大体观察有无心肌梗死灶,有无透壁性心肌梗死,即心肌梗死累及心室壁全层,从心内膜及心外膜面观察梗死灶,同时从心肌组织的横断面观察心肌膜是否有梗死灶。

1.4 组织学检查

①组织切片:肉眼大体观察后,选择梗死区心肌全层组织、交界区心肌全层组织,用 4%多聚甲醛固

定 24~48 h 后做组织切片。②苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色:石蜡切片脱蜡至水,做常规 HE 染色,在光学显微镜下观察心肌梗死、血管新生等情况。③Masson 染色:4%多聚甲醛固定后,石蜡包埋,做常规 Masson 染色;Masson 染色切片在光学显微镜下观察,胶原纤维染成蓝色,肌纤维染成红色。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 16.0 软件进行分析。采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 犬死亡率

16 只犬共有 5 只死亡,其中对照组死亡 2 只,实验组死亡 3 只,总死亡率 31.25%。死亡原因主要为恶性心律失常、心力衰竭、气胸或呼吸衰竭等。对照组存活 6 只,存活率为 75.0%,实验组存活 5 只,存活率为 62.5%,两组存活率无统计学差异($P = 0.590$)。

2.2 心电图改变

结扎犬左冠状动脉前降支后心电图出现 J 点上移,ST 段弓背抬高(图 1)。

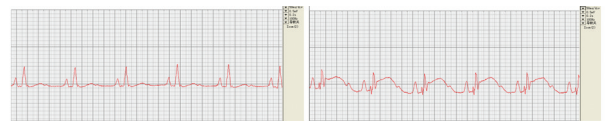


图 1. 冠状动脉结扎前后心电图变化 左图为冠状动脉结扎前,右图为冠状动脉结扎后。

Figure 1. Changes of electrocardiogram before and after coronary artery ligation

2.3 心脏大体标本观察

对照组存活的 6 只犬中,有 2 只犬心外膜面可见明显的心肌梗死区,即结扎线以下左心室心肌呈苍白色,局部室壁显著变薄,左心室腔扩张,而心内膜面可见明显的灰白色纤维瘢痕,心肌横断面可见全层心肌纤维瘢痕;另外 4 只犬大体观察心内膜面、心外膜面及心肌横断面均未见明显的心肌梗死区。实验组存活的 5 只犬,大体标本观察,心内膜面、心外膜面及心肌横断面均可见明显的心肌梗死区(图 2)。两组形成透壁性心肌梗死的犬只数有统计学差异($P = 0.022$)。

2.4 HE 染色

两组透壁性心肌梗死犬心肌 HE 染色,均可见心肌全层心肌梗死,梗死区心肌细胞被胶原纤维广泛替代,肌纤维排列紊乱,肌丝断裂,细胞核固缩、

碎裂,间质充血水肿,大量炎性细胞浸润,交界区部分心肌细胞增生肥大,同时间质可见新生的血管。

而对照组的 4 只非透壁性心肌梗死犬心肌 HE 染色,可见多个散在梗死灶(图 3)。



图 2. 心内膜面大体标本 左图为对照组,右图为实验组;↑所示为纤维瘢痕。

Figure 2. Specimen of endocardial surface in control group and experimental group

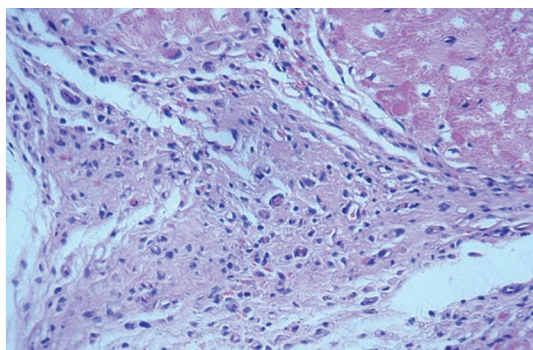
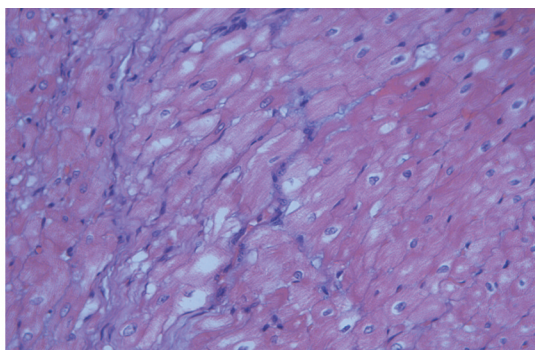


图 3. HE 染色(×400) 左图为对照组,右图为实验组。

Figure 3. Hematoxylin-eosin staining in control group and experimental group(×400)

2.5 Masson 染色

Masson 染色显示,两组梗死区及其周围可见红色的心肌纤维被排列紊乱的蓝色胶原纤维所替代,

同时可见血管。实验组梗死面积及纤维增生较对照组明显(图 4)。

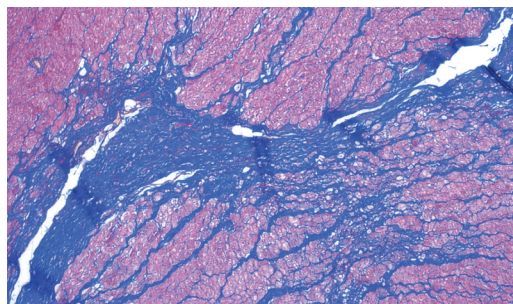
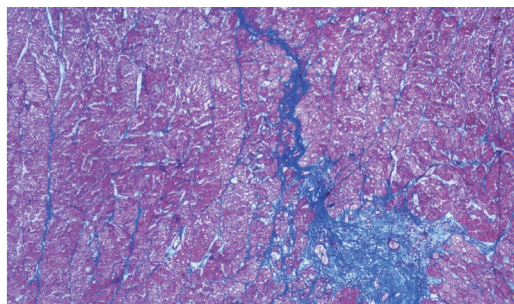


图 4. Masson 染色(×100) 左图为对照组,右图为实验组。

Figure 4. Masson staining in control group and experimental group (×100)

3 讨论

结扎动物冠状动脉是制备心肌梗死模型的最常用方法,比较简便易行。建立犬心肌梗死模型的

方法较多,常用的有冠状动脉夹闭法、冠状动脉内阻塞法、诱导冠状动脉内栓塞或血栓形成的各种方法及冷冻法等^[3-6]。这些方法所致心肌梗死模型随机性较大,或梗死发生率太低,或致死性心室颤动

发生率较高。本实验采用开胸永久性结扎冠状动脉,导致心肌梗死,此方法操作简单,结扎部位固定,形成了透壁性心肌梗死。本研究中,结扎冠状动脉后即可见局部心肌由红色变为暗紫色或苍白色,同时心肌收缩能力减弱,心电图可见 ST 段弓背抬高;实验结束后,犬心脏大体标本可见梗死心肌呈苍白色,局部心肌显著变薄,左心室腔扩张,而心内膜面及心肌横断面可见明显的纤维瘢痕,同时心肌组织病理切片显示全层心肌组织呈坏死性改变,进一步证实了透壁性心肌梗死的存在。

心肌梗死面积大小与冠状动脉结扎部位的高低、心脏侧枝循环的建立以及心室重构的严重程度密切相关。冠状动脉结扎部位较高,容易导致大面积心肌梗死,从而导致犬死亡;冠状动脉结扎部位较低,由于犬的侧枝循环相对丰富,因而不能有效地建立心肌梗死模型。为避免高位冠状动脉结扎导致的高死亡率及低位冠状动脉结扎心肌梗死发生率低的不足,我们针对犬心脏侧支循环丰富的特点,参照有关文献^[7-10],在实验中改进了制备犬心肌梗死模型的方法,即采用的结扎部位包括左冠状动脉前降支和第一对角支。此种方法避免了单纯结扎法(即只结扎左冠状动脉前降支或回旋支)因侧支循环再通导致的缺血区域迅速恢复血供及功能,从而可以造成可靠的透壁性心肌梗死。通过心脏大体观察、HE 染色及 Masson 染色显示,此种结扎方法可形成左心室前壁、心尖及部分侧壁的透壁性心肌梗死。本研究结果表明,结扎犬左冠状动脉前降支和第一对角支的改良法能形成相对固定的透壁性心肌梗死区,心肌梗死发生率为 100%,较好地心血管疾病研究提供了基础,为进一步研究梗死后心室重构的机制提供了可靠的动物模型。

犬死亡主要发生在术中及术后 48 h 内,尤其术后 24 h 内;主要死亡原因为心律失常和心力衰竭,本实验中有 4 只犬因此死亡,占总死亡数的 80%;其次是气胸,占 20%。对于心律失常而言,主要发生在手术中,即结扎冠状动脉后,因此选择适当的结扎部位就相当重要,结扎部位较高,容易导致大面积心肌梗死,从而发生心室颤动或心力衰竭而死亡。本实验中采用的结扎部位包括左冠状动脉前降支中段和第一对角支,以造成左心室前壁、心尖及部分侧壁的心肌梗死。此结扎方法,既不会造成大面积心肌梗死,又能保证形成透壁性心肌梗死,因而是一种有效可行的方法。

通过本实验,对于开胸结扎犬冠状动脉制作心

肌梗死模型,我们的体会有:①麻醉程度:术前一定要准确称重动物,计算出戊巴比妥的合适用量,否则,可能麻醉过深,动物容易死亡,而麻醉过浅,术中难以操作,而术中追加戊巴比妥的量亦不好掌握。②结扎部位:距离冠状动脉左主干过远,即结扎部位过低,不易形成透壁性心肌梗死;而距离冠状动脉左主干过近,动物死亡率过高。本实验中结扎部位位于左冠状动脉前降支分出第一对角支后 1 cm,同时结扎第一对角支(距分叉处约 1 cm),既能保证模型的成功率,又减少了死亡率。③防止术后气胸:犬无法使用胸腔闭式引流,因此术后关胸时,需要抽净胸腔内气体,以免气胸形成,导致犬死亡。

本研究初步探讨了结扎犬左冠状动脉前降支和第一对角支制备透壁性心肌梗死模型的方法,研究结果表明该方法较科学、简单,是一种有效可靠的方法。

[参考文献]

- [1] Dabrowski MJ. Is further improvement of the treatment of acute coronary syndromes still possible? [J]. Postep Kardiol Inter, 2013, 9 (1): 41-44.
- [2] Jugdutt BI. The dog model of left ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. J Card Fail, 2002, 8 (6 Suppl): S472-S475.
- [3] 孙慧君, 范江霖. 心肌梗死动物模型研究的最新进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(1): 115-115.
- [4] 张清阳, 邓又斌, 刘冰冰, 等. 超声心动图引导下闭胸制备犬急性内膜下心肌缺血和梗死模型[J]. 中国超声医学杂志, 2007, 23(5): 330-333.
- [5] 李可, 刘卫金, 邹利光, 等. 闭胸式冠状动脉插管法建立犬急性心肌缺血模型[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(16): 1630-631.
- [6] Dixon JA, Spinale FG. Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice[J]. Circ Heart Fail, 2009, 2(3): 262-271.
- [7] 吴胜东, 葛建军, 周正春, 等. 犬心肌梗死模型的制备及评价[J]. 武警医学, 2007, 18(1): 22-25.
- [8] 王永, 吴继雄, 曹浩, 等. 开胸结扎犬冠状动脉建立急性心肌梗死动物模型的研究[J]. 山东医药, 2008, 48(1): 47-48.
- [9] Nie SP, Wang X, Qiao SB, et al. Improved myocardial perfusion and cardiac function by controlled-release basic fibroblast growth factor using fibrin glue in a canine infarct model[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(12): 895-904.
- [10] Wang Z, Yu L, Wang S, et al. Chronic intermittent low-level transcutaneous electrical stimulation of auricular branch of vagus nerve improves left ventricular remodeling in conscious dogs with healed myocardial infarction[J]. Circ Heart Fail, 2014, 7(6): 1014-021.

(此文编辑 曾学清)