

## 建立大鼠心肌梗死模型时如何选择结扎位点和控制心肌梗死面积

侯予龙<sup>1\*</sup>, 郭伟<sup>1</sup>, 杨志健<sup>2</sup>, 赵建强<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属淮安第一医院胸心外科, 江苏 淮安 223300; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院心脏科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**研究不同结扎位点对大鼠心肌梗死面积的影响,寻找有效、准确建立心肌梗死模型的方法。**方法:**实验组建模前通过直视解剖显露大鼠心脏冠状动脉前降支,明确肺动脉圆锥与左心耳右缘之间交点和心尖的假想连线为大鼠冠状动脉前降支走行标志,选择在此连线上左心室最高点为缝扎位点建立大鼠心肌梗死模型( $n=58$ )。对照组按传统方法建立大鼠心梗模型( $n=38$ )。建模后,观察大鼠心电图和超声心动图改变,对比 2 组大鼠建模成功率;氯化三苯四唑(TTC法)检测比较 2 组大鼠心肌梗死面积。**结果:**建模后心电图示:实验组建模成功率明显高于对照组(88.9% vs 65.5%,  $P < 0.01$ )。TTC 法检测结果显示:实验组中心肌梗死面积在中等梗死面积范围内的大鼠只数明显高于对照组(40 只 vs 11 只,  $P < 0.01$ )。**结论:**直视下显露大鼠心脏冠状动脉前降支,有助于准确识别冠状动脉前降支结扎位点,控制心肌梗死面积,提高建模成功率。

**[关键词]** 心肌梗死面积;左冠状动脉前降支;氯化三苯四唑;多普勒超声心动图

**[中图分类号]** R654.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)10-1469-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20151032

## How to determine the position of ligation and control infarct size in a established rat myocardial infarction model

Hou Yulong<sup>1\*</sup>, Guo Wei<sup>1</sup>, Yang Zhijian<sup>2</sup>, Zhao Jianqiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, Huai'an First People's Hospital, NJMU, Huai'an 223300; <sup>2</sup>Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** The aim of the study was to determine the position of ligation and control infarct size in the establishing of a rat myocardial infarction model (MI). **Methods:** Experimental group models ( $n=58$ ) were produced by the ligation of left anterior descending coronary artery in left ventricular peak point along a line connecting the insertion of the left auricular appendage with the apex of the heart. MI control group ( $n=38$ ) was produced by using the conventional method. Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was performed to compare infarct size (IS, %) in two groups, and electrocardiogram (ECG) and echocardiography changes were observed also. **Results:** ECG monitoring showed that the success rate of the experimental group was significantly higher than that of the control group (88.9% vs 65.5%,  $P < 0.05$ ). Moreover, there were 40 rats had medium-size infarction among experimental group detected by TTC. In contrast, only 11 rats had medium-size infarction among control group. It did differ significantly among rats with medium MI ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Accurately identify anterior descending coronary artery ligation site could help control the myocardial infarct size and improve the success rate of establishing myocardial infarction model.

**[Key words]** myocardial infarction size; left anterior descending coronary artery; triphenyltetrazolium chloride; doppler echocardiography

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1469-1473]

大鼠心肌梗死实验模型已被广泛用于心肌梗死后的发展、修复和治疗的研究。通过开胸结扎不

同部位冠状动脉建立急性心肌梗死模型是一个相对简单、经济和可行的方法。通过该方法建立的心肌梗死面积变异较大,梗死面积在 8%~65%<sup>[1]</sup>。建模后梗死面积变化过大降低了模型的均一性和增加了统计学误差,因此,准确控制梗死面积是成功建立模型至关重要的因素<sup>[2]</sup>。本研究通过建模前解剖

**[基金项目]** 江苏省博士后科研资助计划(1201079C);南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJMU237)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: hyllymhly@163.com

显露大鼠心脏冠状动脉前降支,明确建立大鼠心肌梗死模型如何选择前降支的具体结扎部位,以控制心肌梗死面积,提高建模成功率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

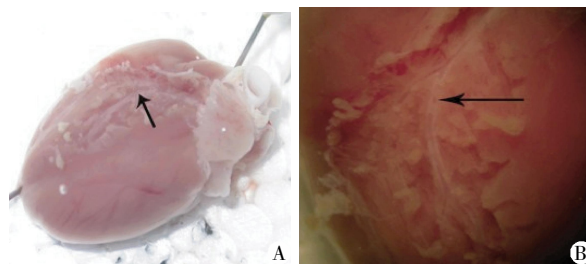
ALC-V8型动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司);胸外科手术器械(上海医疗器械一厂);GE VIVID7心脏超声诊断仪(GE公司,美国);RM6240多导生理信号采集处理系统(成都仪器厂);BL-420E生物信号采集与处理系统(成都泰盟电子科技有限公司);Dumont 55 INOX镊子(Dumont公司,瑞士);7-0带针缝合线(上海浦东金环医疗用品有限公司);1号、0号、3-0丝线(上海医用缝合线厂)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 建模

实验组58只大鼠称重后腹腔注射10%水合氯醛(4 mL/kg)进行麻醉,仰卧位固定于手术板上,将鼠头略向后仰,用台灯照射鼠的颈部,一手用镊子将鼠的舌头向外牵拉,另一手用带管芯的18G头皮静脉针软管(剪去尖端)轻轻向上挑舌根,看见不断开合的声门,待声门开放的时候,匀速将插管送入声门,拔出管芯。插管成功后,用胶布将插管固定在大鼠上颌和头部。气管插管与小动物呼吸机连接,潮气量3 mL/100 g,呼吸频率90次/min,呼吸比1:1。连接RM6240多道生理信号采集处理系统,记录心电图。胸部备皮,碘伏消毒,铺盖无菌洞巾。在左侧胸壁以心尖搏动最强点为中心,作一弧形切口,前起胸骨左缘,切口长约2.0 cm。由第5肋间钝性分离肋间肌,剪开胸膜,进入胸腔,用自制拉钩撑开胸腔。小心提起心包并剪开,轻压右侧胸腔,充分暴露心脏、血管。用棉签轻轻拨开肺,以肺动脉圆锥与左心耳右缘之间交点和心尖的假想连线为大鼠冠状动脉前降支走行标志(图1A、B),选择在此连线上左心室最高点(约为此连线的中下1/3处)为缝扎位点,以6-0缝线结扎前降支,进针深度1.0~1.5 mm,宽约2 mm。缝扎的方向和左心耳的下缘平行。结扎成功标志为左心室前壁及心尖周围心肌组织颜色苍白、晦暗或青紫和运动减弱(图2A、B),心电图显示II导联ST段弓背向上抬高。待循环稳定,加大潮气量排除胸腔内残气,将呼吸机的回气管道夹闭,使肺复张,预置胸腔引流管,然后收紧缝线、打结,逐层缝合肌肉、皮肤,逐层关胸。关胸完毕后通过胸腔引

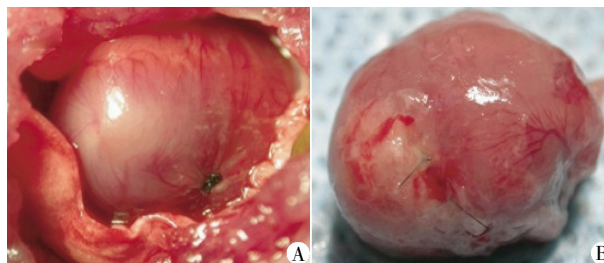
流管再次抽吸而排出胸腔内残余的气体和血液后,拔除胸腔引流管,待大鼠自主呼吸恢复后,脱机,拔出气管内插管,用棉签清除呼吸道的分泌物。



A: 前降支解剖走行;B 前降支局部观。箭头示前降支。

图1 大鼠心脏冠状动脉前降支的解剖显露

Figure 1 Different anatomy images of LAD in rat heart



A: 前降支结扎后;B 前降支结扎4周后。

图2 大鼠前降支结扎后心肌改变

Figure 2 Myocardial changes in rats after myocardial infarction

对照组38只大鼠按照文献方法<sup>[3]</sup>建立心肌梗死模型。麻醉同前。由第5肋间进入胸腔,暴露心脏,在肺动脉圆锥与左心耳右缘之间交点和心尖连线上距离左心耳2.0 mm结扎前降支。

#### 1.2.2 心电图检查

插管成功后,连接RM6240多导生理信号采集处理系统,记录II导联心电图:左下肢(正极),右上肢(负极)和右下肢(参考极)。I导联心电图:左上肢(正极),右上肢(负极)和右下肢(参考极)。4周后复查心电图。

#### 1.2.3 多普勒超声心动图检查

按照文献<sup>[4-5]</sup>的方法检测。建模成功大鼠4周后行多普勒超声心动图检查心室腔大小、心肌运动及室壁厚度。麻醉(方法同前)后,大鼠左侧卧位,前胸壁备皮,分别经基底部(二尖瓣水平短轴切面)、乳头肌水平和心尖水平取左室二维短轴观,同时记录M型扫描。

#### 1.2.4 氯化三苯四唑(TTC法)检测心肌梗死面积

4周后麻醉大鼠,行腹部正中切开,暴露下腔静脉,经下腔静脉插管注入2.5 mL 2%的伊文思蓝(Evans blue),10 min后注入10%氯化钾0.4 mL,心脏停

跳后取出心脏,冰 PBS 冲洗,剔除血管脂肪等非心肌组织切除左右心房,用吸水纸吸去水分,将标本置于-20℃冻存 5 min 后,从心尖至心底依次横切成 2 mm 厚的心室组织切片,每个心脏切 6 片标本。肉眼可见有灌注部位心肌呈现蓝色,梗死部位无染色。切片用彩色扫描仪(Microtek SP-II 扫描仪)扫描,图像输入电脑保存。用 Imagepro Plus5.0 图像分析软件分析心肌梗死区面积占整片心肌切面的百分比。心肌梗死面积(%)=左心室组织切片梗死区面积/左心室组织切片总面积 ×100%。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件包分析。数据以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间均数的比较采用 *t* 检验,两组间率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

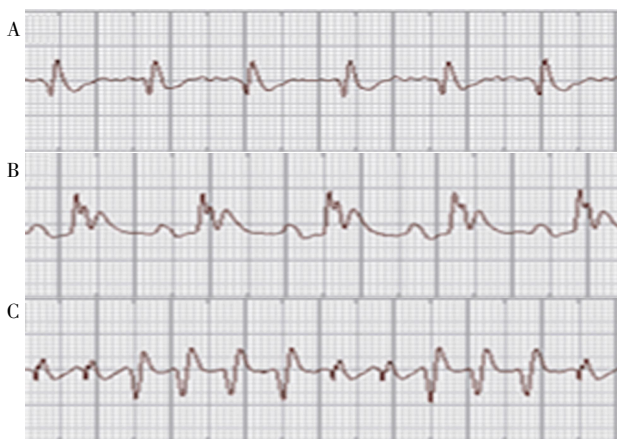
## 2 结果

### 2.1 动物的一般情况

实验组大鼠 58 只,术中 2 只死于室颤和肺水肿,术后死亡 2 只,死亡率 6.9%。对照组 38 只大鼠,术中死亡 6 只(2 只死于大面积心梗,4 只死于室颤和肺水肿),术后死亡 3 只,死亡率 23.7%。实验组大鼠死亡率明显低于对照组( $P < 0.01$ )。

### 2.2 心电图

建模前后监测心电图改变(图 3A)。心脏冠脉前降支被结扎后心电图肢导联即显示 R 波振幅明显升高,ST 段弓背向上抬高等改变。但 1 周后复查心



A: 前降支结扎前;B: 前降支结扎后,心电图集出现 ST 段抬高,弓背向上;C: 前降支结扎后 1 周心电图仅显示心律失常,ST 段恢复正常。

图 3 前降支结扎前后心电图改变

Figure 3 The changes of ECG after coronary arterial ligation

电图,实验组 54 只存活大鼠中有 48 只显示有病理性 Q 波(图 3B),6 只心电图 ST 段正常,未见病理性 Q 波(图 3C)。对照组 29 只存活大鼠中有 10 只心电图未见病理性 Q 波,ST 段恢复正常。实验组建模成功率为 88.9%,对照组建模成功率为 65.5%,两组比较  $P < 0.01$ ,差异有统计学意义。

### 2.3 超声心动图检查

4 周后取实验组与对照组存活大鼠分别经基底(二尖瓣水平短轴切面)、乳头肌水平和心尖水平取左室二维短轴行超声心动图检测。二维图像见心肌梗死大鼠左室腔扩大,左室前壁出现节段性运动减弱、消失及反向运动等现象,梗死区局部有心肌强回声,室壁变薄。

### 2.4 TTC 法检测心肌梗死面积

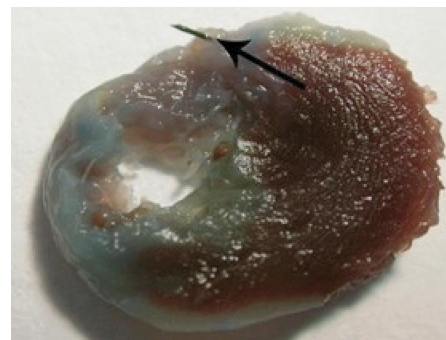
用 TTC 法(图 4)检测心肌梗死面积,结果见表 1。按文献<sup>[1,4]</sup>心肌梗死面积分类标准,实验组中有 40 只大鼠(建模成功大鼠的 83.3%)心肌梗死面积在中等梗死面积(30.0%~40.0%)范围内,而对照组中仅有 11 只大鼠(建模成功大鼠的 57.9%)心肌的梗死面积在中等范围内,实验组与对照组比较  $P < 0.01$ ,差异有统计学意义。

## 3 讨论

理想的心肌梗死模型应该符合临床缺血性心肌梗死的病理过程,模型制作要方便,可重复性强。实验性心肌梗死模型制作方法有多种,如冠状动脉

表 1 TTC 法检测心肌梗死面积结果

Table 1 The results of infarct sizes measured by TTC			
	实验组(n=58)	对照组(n=38)	P 值
梗死面积范围(%)	31.5~45.8	11.6~57.0	$P < 0.01$
平均梗死面积(%)	$39.2 \pm 4.9$	$36.5 \pm 13.4$	$P > 0.05$
中等梗死面积范围	40(83.3)	11(57.9)	$P < 0.01$
内大鼠数[n(%)]			



非染色部位是心肌梗死部位。箭头示结扎部位。

图 4 TTC 染色心肌切片

Figure 4 Gross photographs of TTC-stained slices

结扎法、冠状动脉注射药物法、经皮冠状动脉内栓塞法等<sup>[6-8]</sup>。其中冠状动脉结扎法制作的模型与临床心肌梗死分布范围相对一致,病理生理、生化改变与临床心肌梗死相似<sup>[9-10]</sup>,因而在动物实验中经常采用开胸冠状动脉结扎方法制作大鼠心肌梗死模型。

早期国外多采用 Johns 法<sup>[11]</sup>制作动物心梗模型,在自主呼吸条件下,手术死亡率极高。此后 Fisbein 等<sup>[12]</sup>和 Pfefer 等<sup>[13]</sup>在 Johns 法的基础上略加改进,应用小动物呼吸机维持呼吸,明显提高了动物的存活率。气道的建立可采用气管切开插管和直视下经口腔气管插管两种方法<sup>[14]</sup>。本研究采用气管插管连接小动物呼吸机支持呼吸,为开胸后冠状动脉结扎赢得较长时间。

许多文献<sup>[1,12-13,15]</sup>中关于前降支结扎部位的描述主要为:①用无菌棉签小心拨开左心耳,可见呈“鸦爪状”分布的冠状动脉及其分支;②以冠状静脉为标记进行结扎;③结扎处距离左心耳下缘 2~3 mm。文献中关于结扎位置的描述普遍存在解剖定位不具体、过于简单且不同文献间定位方法存在差异。结扎部位错误可导致建模失败结扎部位变异较大(结扎位置过高或过低),最终导致心肌梗死面积不均一。心肌梗死面积过大可导致大鼠死亡率较高,梗死面积过小增加了人为误差,使实验结果可信度下降。由于大鼠左冠状动脉表面覆盖薄层心肌,实验中难以分离,肉眼仅可见冠状动脉左主干及前降支起始部,且肉眼可见的左冠状静脉不与前降支伴行,因而在实验中难以准确定位冠状动脉前降支缝扎位点。如在左前降支起始部结扎会导致大面积心肌梗死,从而增加模型死亡率。如靠近心尖处结扎,大鼠死亡率虽低,但是心梗面积过小,也使模型成功率降低<sup>[1]</sup>。如以冠状静脉为标记进行结扎,由于冠状静脉在左心耳右缘处与前降支走行已经分离,也难以结扎到前降支。

目前,国内外文献<sup>[12,15-16]</sup>等还没有关于大鼠冠状动脉前降支解剖位置的报道。本文首次采用直视下解剖分离显露冠状动脉左主干及前降支,明确其解剖位置及走行后选择位点进行结扎。解剖结果显示可以把肺动脉圆锥与左心耳右缘之间交点和心尖的假想连线认为是大鼠冠状动脉前降支走行标志。在此连线上选择距左心室最高点作为缝扎位点,结扎后发现结扎部位以下的左室前壁失去原有光泽而显苍白色或青紫色,收缩力降低或消失,心电图逐渐出现 ST 段弓背向上抬高,1 周后复查心电图示病理性 Q 波,4 周后超声心动图显示心梗后梗

死区心肌运动减弱,出现局部运动失常、室壁变薄和左室腔扩张,证实心肌梗死模型制备成功。实验组采用上述方法建立心梗模型,成功率为 88.9%。采用文献方法建模的对照组,术前均没有采用直视下解剖分离显露冠状动脉左主干及前降支,建模成功率为 65.5%,并且发现对照组 29 只大鼠中有 10 只术后心电图有缺血改变,但 1 周后复查心电图恢复正常。这是由于心肌组织缝扎后的损伤而不是心肌梗死造成了 ST 段的抬高,术后随着损伤的修复,心电图也恢复正常。这种缝扎损伤引起的早期心电图改变常会使术者误以为建模成功,也导致对照组建模成功率减低。本实验结果证明通过直视下解剖分离显露冠状动脉左主干及前降支,明确其解剖位置及走行后选择位点进行结扎能够准确定位冠状动脉前降支,提高建模成功率,并且可重复性强。

心梗后用 TTC 法染色是经典的检测梗死面积的方法,本研究在建模前后采用 TTC 法检测梗死面积,发现实验组 83.3% 大鼠心肌梗死面积在中等梗死面积范围,而对照组中仅有 57.9% 大鼠心肌的梗死面积在中等范围。结果表明实验组建模均一性良好,有更均一的梗死面积,实验组较对照组建模方法更有利于控制梗死面积。

对照组大鼠死亡率及建模成功率和文献<sup>[3-5,17]</sup>的结果相似,而实验组与对照组相比死亡率降低,建模成功率明显增加。经验表明直视下解剖分离显露冠状动脉左主干及前降支,熟悉其解剖位置及走行后再进行心肌梗死模型的建立,可以更明确地选取结扎位点,有利于控制心肌梗死面积,提高建模成功率,从而成功地改良了大鼠心肌梗死模型建立的方法。由于心肌梗死模型应用广泛,提高建模成功率能够减少实验误差,有利于模型建立后的进一步实验研究,为研究缺血性心肌病提供了可靠的技术平台。

#### [参考文献]

- [1] Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, et al. Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction [J]. *Exp Physiol*, 2004, 89(4): 497-505
- [2] Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, et al. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography [J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2005, 18(5): 454-460
- [3] Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, et al. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and

- method of infarct sizing[J]. *Am J Physiol*,1994,267(6pt2):2383-2290
- [4] dos Santos L, Mello AF, Antonio EL, et al. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications[J]. *Braz J Med Biol Res*,2008,41(3):199-201
- [5] Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats[J]. *Braz J Med Biol Res*,2006,39(5):687-695
- [6] Miya Y, Kanda T, Tamura J, et al. A new murine model of coronary artery thrombosis and role of interleukin-8 in the development of coronary thrombosis[J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*,2000,108(1-2):108-115
- [7] Kellar RS, Landeen LK, Shepherd BR, et al. Scaffold-based three-dimensional human fibroblast culture provides a structural matrix that supports angiogenesis in infarcted heart tissue[J]. *Circulation*,2001,104(17):2063-2068
- [8] Kellar RS, Landeen LK, Shepherd BR, et al. Scaffold-based three-dimensional human fibroblast culture provides a structural matrix that supports angiogenesis in infarcted heart tissue[J]. *Circulation*,2001,104(17):2063-2068
- [9] Li RK, Weisel RD, Mickle DA, et al. Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2000,119(1):62-68
- [10] Moainie SL, Gorman JH 3rd, Guy TS, et al. An ovine model of postinfarction dilated cardiomyopathy[J]. *Ann Thorac Surg*,2002,74(3):753-760
- [11] Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals[J]. *Ann Surg*,1954,140(5):675-682
- [12] Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution [J]. *Am J Pathol*,1978,90(1):57-70
- [13] Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats[J]. *Circ Res*,1979,44(4):503-512
- [14] Rivard AL, Simura KJ, Mohammed S, et al. Rat intubation and ventilation for surgical research[J]. *J Invest Surg*,2006,19(4):267-274
- [15] Bhindi R, Witting PK, McMahon AC, et al. Rat models of myocardial infarction. Pathogenetic insights and clinical relevance[J]. *Thromb Haemost*,2006,96(5):602-610
- [16] Park SW, Lee SY, Park SJ, et al. Quantitative assessment of infarct size in vivo by myocardial contrast echocardiography in a murine acute myocardial infarction model[J]. *Int J Cardiol*,2004,97(3):393-398
- [17] Chen X, Cui K, Xiu J, et al. Evaluation and simplified measurement of infarct size by myocardial contrast echocardiography in a rat model of myocardial infarction [J]. *Int J Cardiovasc Imaging*,2009,25(7):713-716
- [收稿日期]2015-02-23

(上接第 1456 页)

- (227):2-5
- [2] 薛春雨,邢新,郭伶俐,等.鼻唇沟皮瓣的分类及其在鼻部创面修复中的应用[J].*中国美容整形外科杂志*,2010,21(1):20-23
- [3] 马莉,李小静.鼻唇沟皮瓣的研究进展[J].*安徽医科大学学报*,2011,46(12):1295-1296
- [4] Zilinsky I, Alcalay J, Jacobs D, et al. The versatility of the nasolabial flap enhanced by the delay procedure [J]. *Dermatol Surg*,2001,27(2):161-164
- [5] 林松柏,曾融生.双侧鼻唇沟肌皮瓣修复口底大面积缺损的临床研究[J].*中山大学学报:医学科学版*,2007,28(6):699-701
- [6] 雷明辉,王俊,鄧克谦.鼻唇沟瓣修复颌面部恶性肿瘤术后缺损的临床观察[J].*中国美容医学*,2011,20(8):1230-1231
- [7] 卢新华,刘海涛,徐拥军,等.面动脉为蒂的鼻唇沟岛状皮瓣修复口腔颌面部软组织缺损 17 例分析[J].*中国口腔颌面外科杂志*,2006,4(5):345-348
- [8] 姚兴伟,于成涌,刘艳红,等.鼻唇沟局部皮瓣修复唇颊部缺损 23 例报告[J].*内蒙古医学杂志*,2010,42(5):603-604
- [9] Varghese BT, Sebastian P, Cherian T, et al. Nasolabial flaps in oral reconstruction: an analysis of 224 cases [J]. *Br J Plas Surg*,2001,54(6):499-503
- [10] Chitlangia P, Kumuran E, Sabitha KS. Use of Nasolabial flap in intra and extraoral reconstruction; Our experience with 40 cases [J]. *J Maxillofac Oral Surg*,2012,11(4):451-454
- [11] 陈怡,蒋斌,韩靛.鼻唇沟皮瓣在口腔癌术后缺损中的临床应用[J].*齐齐哈尔医学院学报*,2012,33(19):2614-2615
- [收稿日期] 2015-04-23