论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0314-04

无呼吸机支持反复冷冻法建立大鼠急性心肌梗死模型

赵文萍,刘 刚,郑 晔,刘坤申 (河北医科大学第一医院心血管内科,石家庄 050031)

提 要: 目的 探讨建立无呼吸机支持,短时间反复冷冻法制作大鼠急性心肌梗死(AMI)模型方法。**方法** 将60只Wistar大鼠(雄雌各半),按照总共冷冻损伤时间随机分3组:15 s组(5 s/次,共3次);25 s组(5 s/次,共5次);40 s组(5 s/次,共8次),各20只。胸骨左缘前外侧第4肋间进入胸腔充分暴露心脏,用浸入液氮之直径6 mm铜充分接触左室游离壁,持续时间5 s/次,随即闭合胸腔,待自主呼吸恢复正常后,按分组情况再次原位反复共3、5次或8次进行心肌冷冻损伤。观察术中、术后28 d内大鼠存活率及术后28 d行病理切片Masson染色计算梗死面积。**结果** ①3组病理学检测均为透壁梗死,面积超过20%,心肌坏死完全且边界清楚。②15 s组存活率(16/20)较40 s组(5/20)高($P<0.05$),但其梗死面积(28.277 5±5.192 6)%较40 s组梗死面积(37.768 0±10.564 4)%小($P<0.05$)。③25 s组存活率(9/20)($P>0.05$)和梗死面积(31.380 0±6.496 0)% ($P>0.05$)与其他2组比较无明显差异。④40 s组梗死面积变化范围较其他2组大,且存活率较低。25 s组较15 s组操作繁琐且死亡有增多趋势。**结论** 无呼吸机支持、短时间、反复3次超低温冷冻左室游离壁15 s可以建立稳定的大鼠AMI模型。

关键词: 呼吸机支持;冷冻法;动物模型;急性心肌梗死

中图法分类号: R-332;R363.123;R542.22 **文献标识码:** A

A pilot study of using spurt, repeated cryoinjury and off-ventilator to establish rat model of acute myocardial infarction

ZHAO Wen-ping, LIU Gang, ZHENG Ye, LIU Kun-shen (Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: Objective To explore a new method of establishing rat model of acute myocardial infarction by off ventilator support, spurt and repeated cryoinjury. **Methods** Sixty Wistar rats with male and female in half were randomized into three experimental groups according to cryoinjury time with 20 rats in each group: 15-second group (cryoinjury for 5 s each time, three times in total), 25-second group (5 s each time, five times in total) and 40-second group (5 s each time, eight times in total). The heart was exposed through a 1.0- to 1.5-cm left lateral thoracotomy. Cryoinjury of the LV free wall (LVFW) was performed by applying for 5 s a round copper probe of 6-mm in diameter immersed in liquid nitrogen for 5 min to reach −190 ℃, then the thoracic cavity was closed immediately. When the rats' breath restored, the cryoinjury of the LVFW *in situ* was repeatedly to ensure a transmural injury according to the protocol. The survival rate during operation and in 28 days after operation was observed. Also infarct size was observed by heart pathological section stained with Masson's trichrome on day 28 after operation. **Results** Infarct size in all three groups was larger than 20% signified by transmural injury, and completely myocardiolysis and distinct infarct boundary were observed. The survival rate was 16/20 in 15-second group, 5/20 in 40-second group ($P<0.05$) and the infarct size was (28.277 5±5.192 6)% in 15-second group, (37.768 0±10.564 4)% in 40-second group ($P<0.05$). The survival rate and infarct size in 25-second group was 9/20 and (31.380 0±6.496 0)% ($P>0.05$ *vs* 15-second group and 40-second group). The infarct size in 40-second group was

基金项目: 河北省自然科学基金(C2005000698)

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2005000698)

作者简介: 赵文萍(1968-),女,河北省保定市人,博士研究生,副主任医师,主要从事冠心病、心力衰竭方面的研究。电话:(0311)85917032, E-mail: heartfailure1@yahoo.com.cn

通讯作者: 刘坤申,电话:(0311)85917033,E-mail: heartfailure1@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-07-06;**修回日期:** 2006-11-18

larger than the other two groups (standard deviation: 10.564 4% *vs* 5.192 6%, 6.496 0% in 15, 25-second group, respectively) and its survival rate was lowest. The procedure of 25-second group was more complicated and had a tendency of higher death rate than that in 15-second group. **Conclusion** Using spurt, repeated ultra low temperature cryoinjury for 15 s may be an ideal method to establish the rat model of acute myocardial infarction.

Key words: ventilator support; cryoinjury; animal model; acute myocardial infarction

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)动物模型开发与应用,是研究人类AMI诊断及治疗的基础,对于研究人类慢性充血性心力衰竭病理生理、如何促进心肌细胞再生及改善心室重塑具有重要价值。结扎冠状动脉法已有60余年历史[1],1943年Harris和Rojas[2]首次报道开胸结扎犬及猴冠状动脉前降支建立急性心肌缺血、梗死动物模型,但至今尚没有一种理论上使得MAI面积、心功能改变较为恒定的方法,而且在操作中,麻醉和呼吸机使用不当、肺损伤及左冠状动脉结扎过高等原因,易造成动物死亡或制模失败[3,4]。因此,提高制模成功率,制模结果相似和一致且可重复性高,为AMI制模难题。冷冻法是近几年来研究AMI后心肌再生常用的制模方法[3,4],但全部使用呼吸机支持,操作复杂、死亡率高。因此,我们在研究螺内酯及其他治疗心衰有效药物长时间干预对大鼠AMI后心室重塑影响预实验阶段,借鉴经典冷冻方法[5,6]探索制作了理想而稳定的模型-透壁梗死、固定足够梗死面积并低死亡率。本研究旨在探讨使用无呼吸机支持,短时间反复冷冻法建立大鼠AMI模型的方法。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

Wistar大鼠60只,雄雌各半,体质量200~220 g,由河北医科大学实验动物中心提供。按照总共冷冻时间随机分3组:①15 s组(5 s/次,共3次),20只;②25 s组(5 s/次,共5次),20只;③40 s组(5 s/次,共8次),20只。

1.2　AMI模型制备

大鼠称重,10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔内注射,麻醉后仰卧固定于手术台板上。严格掌握麻醉剂剂量,使其麻醉程度较浅,防止缺氧造成麻醉程度加深,甚至呼吸停止死亡。手术野左前胸部皮肤去毛,碘酒酒精消毒铺消毒巾。

胸骨左缘0.5~1.0 cm扪及心脏搏动处纵行剪开皮肤约2.5 cm,逐层钝性分离皮下组织、肌肉。左侧第4肋间前外侧止血钳钝性刺破胸腔进胸,弯头止血钳小心迅速撑开1.0~1.5 cm胸壁破损口,既保证充分显露心包便于以后用镊子撕开心包、挤出心脏操作,又不损伤肋骨保证撤出止血钳后胸廓随即完全闭合。撤出止血钳迅速用右手拇指和食指由背侧向前胸侧挤压胸廓2~3次,使胸腔内气体从切口处充分排出,利于肺复张。由于肋间外肌和胸大肌的覆盖胸廓即呈密闭状态,再用弯头止血钳夹闭皮肤肌肉层避免呼吸死腔的形成,确保胸廓密闭。2~4 s后大鼠自主呼吸恢复,暂缓以后操作1 min待其低氧状态进一步恢复。

再次原位进入胸腔,即可充分显露心脏,2位操作者左手挤压胸廓和剑突下部位将心脏轻轻挤出后,用已浸入液氮内5 min直径6 mm铜质金属棒(长度:6.4 cm,质量:14 g,温度:-197 ℃)充分接触左室游离壁,持续时间5 s后迅速将心脏复位,再次用右手拇指和食指由背侧向前胸侧挤压胸廓2~3次,使胸腔内气体从切口处排出后密闭胸廓,用弯头止血钳夹闭皮肤肌肉层同时按摩胸廓辅助大鼠迅速恢复自主呼吸,观察1~2 min。如无异常,再次原位打开胸腔,观察心尖左室冷冻部位,是否失去原有光泽呈暗灰色或青紫色,收缩力是否降低或消失。按分组规定,上述手法原位反复冷冻数次。

待呼吸平稳后将肌肉层缝合,注意镊子夹持、缝合肋间外肌和胸大肌时不要掀开肌肉层,防止暴露直通胸腔破损伤口。在密闭缝合肌肉层之前再次用右手拇指和食指由背侧向前胸侧挤压胸廓1次,以确保胸腔内气体最大限度排出。缝合皮肤,待大鼠苏醒后雌雄分笼饲养28 d。以上手术均在无菌条件下进行,术后肌内注射青霉素钠2×10^5 U/d,连续5 d抗感染。严格按照以上规程执行操作,以保证金属棒低温温度、冷冻时间和其他条件的一致性。

1.3　方法与检测指标

检测术中、麻醉苏醒前及术后28 d大鼠存活情况。

梗死面积测定:术后28 d,腹腔注射10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉后开腹、开胸,下腔静脉注入10% KCl 2~3 ml,使心脏停搏于舒张期。经升主动脉向冠状动脉内灌注10%多聚甲醛20~30 min后置于10%多聚甲醛保存。沿左室游离壁圆形瘢痕直径垂直于长轴将左室一分为二,心尖部分石蜡包埋,4 μm厚截面标本病理切片Masson染色。河北医科大学基础医学院解剖教研室HEC显微镜微机图像分析系统(江苏捷达软件公司研制)测定疤痕弧长及心内、外膜周长,同一标本、同一测量者每次3遍测量值之间变异系数0.8%,不同次数测量均值之间变异系数1.0%,而不同测量者测量均值间的变异系数1.2%。计算:梗死面积=(疤痕内周弧长+外周弧长)/(左室内周弧长+外周弧长)×100%。

1.4　统计学分析

采用SPSS 11.0软件包,计数资料多组间比较用R×C表χ^2检验,两两比较χ^2分割法。计量资料数据呈正态分布,以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较用方差分析。

2　结果

2.1　术中、麻醉苏醒前及术后28 d大鼠存活情况

3组大鼠存活率:15 s组和40 s组之间大鼠存活率有显著

差别,15 s 组大鼠存活率较高($P<0.05$),15 s 组和 25 s 组、25 s 组和 40 s 组比较无显著性差异($P>0.05$)。见表 1

表 1 3 组大鼠术中和术后 28 d 存活数比较

组别	存活(只)	死亡(只)	合计(只)
15 s 组	16[a]	4	20
25 s 组	9	11	20
40 s 组	5	15	20
合计	30	30	60

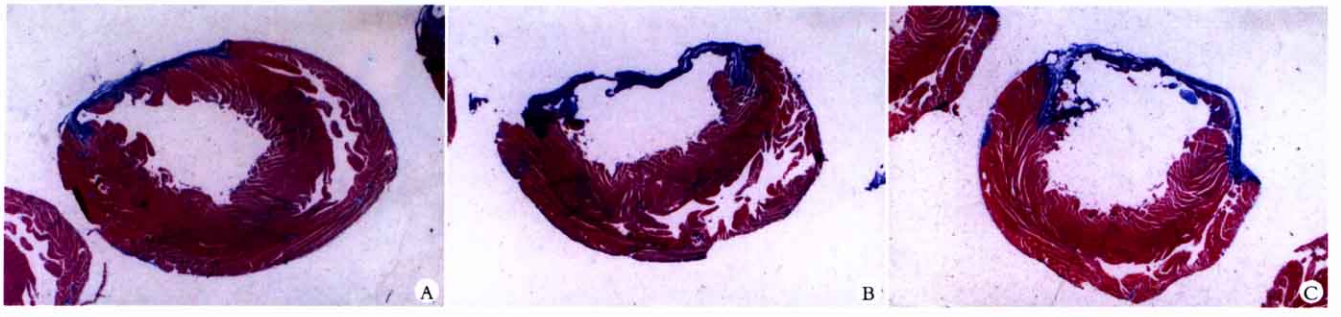
a: $P<0.05$,与 40 s 组比较

术中和术后 28 d 死亡原因如下:术中呼吸停止(15 s 组:1 例;25 s 组:4 例;40 s 组:9 例);术中心、肺损伤(15 s 组:3 例;25 s 组:5 例;40 s组:5 例);其他(15 s 组:0 例;25 s 组:2 例;40 s 组:1 例)。

2.2 心脏标本病理分析

2.2.1 3 组大鼠术后 28 d 病理结果 见图 1。

2.2.2 3 组大鼠术后 28 d 梗死面积比较 资料呈正态分布且方差齐,15 s 组较 40 s 组梗死面积小[(28.277 5 ± 5.192 6)%与(37.768 0 ± 10.564 4)%,$P<0.05$],15 s 组和 25 s组[(31.380 0 ±6.496 0)%]、25 s 组和 40 s 组分别比较无显著性差异($P>0.05$)。



A: 15 s 组; B: 25 s 组; C: 40 s 组

图 1 术后 28 d 3 组大鼠心脏横切面 梗死区疤痕呈蓝色 (Masson ×2.5)

3 讨论

AMI 是心肌发生的不可逆性坏死,通常在冠状动脉主干管壁原有损伤处或粥样硬化斑块破裂处形成血栓,如缺血严重且持久则发生 AMI。梗死范围取决于缺血程度、阻塞动脉供应心肌区域、侧支血流情况和接受该动脉供应组织需氧量。目前国内外用于心力衰竭研究动物模型大体通过 4 类方法获得:(1)冠状动脉结扎:20 世纪 50 年代采用 Johns 法[7](即在自主呼吸下开胸挤出心脏行冠状动脉结扎)制备长期存活 AMI 模型基本成熟。经典 Olivetti 方法[8]使用呼吸机辅助通气结扎冠状动脉前降支造成恒定面积 AMI,其成功与否受到多种因素影响:① 左主干高位结扎梗死范围大,易发生室颤,致死率高;低位结扎侧支循环开通,不易形成明确梗死灶,与正常组织无明确界限。② 结扎大鼠左冠脉,当梗死面积超过 20% 时就可出现明显心衰[9],随结扎部位高低可造成个体之间梗死面积大小不等,心功能改变差异较大。模型间齐同性、稳定性差,不具有可控制性和对实验结果的可预见性,势必会影响对治疗 AMI 不同方法评价的准确性[10]。③ 麻醉程度过深或过浅、呼吸机管理不善导致动物窒息和肺损伤,死亡率高,但不采用人工呼吸需在极短时间内完成操作,技术要求高难以掌握。(2)药物注射:异丙肾上腺素静滴或腹腔注射复制模型冠状动脉选择性差,心肌弥漫性损伤且以心内膜下病变为主。(3)冠状动脉堵闭法[11]:需大型实验动物如猪等,成本及技术要求高。(4)心外膜直接冷冻法:液氮冷冻损伤法心电图变化与冠状动脉结扎法相似;二者梗死面积均随着时间延长有增长趋势,大鼠 6 周时面积较 2 周时明显增大并可继续扩大至术后 4 ~ 8 周;利用 TUNEL 染色和 DNA 电泳法研究显示:冷冻中心区以细胞坏死为主,冷冻后细胞凋亡参与冷冻损伤范围扩展,与结扎冠状动脉造成 AMI 慢性心衰模型机制基本一致。以上提示大鼠心肌冷冻损伤后同样也经历与临床 AMI 接近的心室重构过程,能较好反应病理过程[12]。

经典冷冻损伤模型[5,6]采用呼吸机辅助通气,用 -190 ℃液氮冷却椭圆形金属探头(直径 8 ~ 10 mm)于左室游离壁接触冷冻,同一部位反复 10 次(1 min/次)确保透壁梗死,但长时间开胸暴露心脏,须使用呼吸机确保氧气供应,呼吸道并发症发生率高、撤机困难、造模时间长且操作繁琐。我们期望能够建立一种能使生理紊乱降低到最低限度而且操作简便的模型[13]。我们参照经典模型选用导热好的铜棒,制作出稳定梗死面积较为一致的模型。3 组中,15 s 组更符合稳定 AMI 模型要求(透壁梗死、固定梗死面积、低死亡率),40 s 组梗死面积不固定且死亡率高,25 s 组较 15 s 组操作繁琐且死亡有增多趋势。我们这一研究为建立 AMI 模型提供了一个新思路,为准确、可定量评价不同疗法治疗 AMI 疗效提供了有效手段。

参考文献：

[1] Moainie S L, Gorman J H, 3rd., Gut S Y, *et al*. An ovine model of postinfarction dilated cardiomyopathy[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 74(3): 753-760.

[2] Harris A S, Rojas A G. The initiation of ventricular fibrillation due to coronary occlusion[J]. Exp Med Surg, 1943, 1: 105-122.

[3] 李　保，马业新，解　军，等. 大鼠心肌梗死模型制备的改进[J]. 山西医科大学学报，2005，36(1)：11-12.

[4] 周文武，林　玲，陈　军，等. 冠脉结扎法制做大鼠心肌缺血模型[J]. 中国实验动物学报，2004，12(4)：226-230.

[5] Yau T M, Fung K, Weisel R D, *et al*. Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells[J]. Circulation, 2001, 104(12 Suppl 1): I218-I222.

[6] 唐　滔，胡建国，杨进福，等. 骨髓间充质干细胞移植对大鼠心肌梗死后细胞凋亡的作用[J]. 中南大学学报：医学版，2004，29(3)：274-278.

[7] Johns T, Olson B J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals[J]. Ann Surg, 1954, 140(5): 675-682.

[8] Olivetti G, Capasso J M, Meggs L G, *et al*. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. Circ Res, 1996, 68(3): 856-869.

[9] Mulder P, Richard V, Derumeaux G, *et al*. Role of endogenous endothelin chronic heart failure: effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling[J]. Circulation, 1997, 96(6): 1976-1982.

[10] 卫洪超，何庚戌，胡盛寿，等. 建立一种标准化急性心肌梗死动物模型[J]. 中华实验外科杂志，2005，22(7)：876-878.

[11] 卢新政，王连生，黄　峻，等. 冠状动脉堵闭法建立猪心肌梗死模型[J]. 中国动脉硬化杂志，2004，12(2)：218-220.

[12] 于天骅，刘　静. 最新低温治疗技术的研究进展及其评价[J]. 中国医疗器械杂志，2004，28(5)：350-355，367.

[13] 刘国辉，刘志跃. 实验性心肌梗死动物模型复制方法研究进展[J]. 实验动物科学与管理，2005，22(4)：36-39.

（编辑　龙　亮）

（上接310页）

发现感染椎间隙压力增高，有炎性水肿、瘢痕组织及坏死椎间盘组织，用刮匙彻底刮除，无菌生理盐水反复冲洗，术后负压引流，大剂量抗生素治疗。术后当天肌肉痉挛消失，疼痛减轻，体温正常。全部患者均于术后3个月痊愈。

3　讨论

3.1　椎间盘炎的病因

外伤及手术操作不当是细菌感染的主要原因。手术不但破坏了椎体与间盘间的软骨终板这一屏障，而且导致了椎体骨松质的暴露出血。血肿的形成和纤维环组织残余又成了细菌的良好培养基，使细菌得以繁殖和生长，从而引起发热、血沉增快、血象高、细菌培养阳性、C反应蛋白增高等表现。文献[1]报道因手术造成的这类病例占0.75%～3%。椎间盘组织的Ⅰ、Ⅱ型胶原、糖蛋白及软骨终板基质是潜在自身抗原，淋巴细胞对其极度敏感，可激发细胞的免疫应答，进而产生体液免疫反应。有些椎间盘炎正是因手术导致纤维环的破裂，使椎间盘的抗原成分与血液密切接触，产生自身免疫应答，抗原抗体免疫复合物的形成吸收大量炎性细胞产生自身免疫反应性炎症而出现一系列的症状。

3.2　椎间盘炎的临床特点

腰椎间盘术后原有的神经根性刺激征减轻或消失后，腰部又出现难以忍受的痉挛性疼痛，且多伴有下肢的放射性痛、夜间加剧，甚至不用止痛药难以入眠，常因轻微的震动而诱发疼痛，腰肌痉挛，不敢翻身，有些同时伴有低热和腹胀[2]，血沉增快，C反应蛋白增高而血象正常。影像学方面的特点与颈椎间盘炎相似，早期(4周内)X线表现不明显，6～8周后可出现椎间隙狭窄，椎体表面纹理模糊，软骨面下骨质疏松，进一步导致椎体边缘不规则破坏，随着时间延长渐而出现硬化性改变，使间隙融合，曲度变直。CT及MRI则可更清晰、更早地发现这些病理变化，对早期诊断及治疗提供可靠的依据。

3.3　椎间盘炎的治疗

无论是保守治疗，还是手术治疗，一般预后良好。在治疗方法的选择上还存在不同观点[3]。我们认为除严重的感染所致的椎间盘炎外，一般均采取保守治疗。包括大剂量应用广谱抗生素，最好进行药敏试验选择抗生素，牵引制动，卧床休息，以促进炎症的局限和消退，同时配合支持对症处理。有些经观察与治疗后，病情无好转，血沉及C反应蛋白变化不大，高热不退，全身症状恶化者，可能系硬膜外脓肿形成所致，应积极行病灶清除术，以避免感染物穿破硬膜引起脑膜炎等并发症。在病灶清除的同时，为增加脊柱的稳定性可同时行植骨融合术。椎间隙感染是一种少见的病变，多于术后发生，其余如血源性感染、局部感染蔓延所致者较少。只要掌握其两大特点，即血沉增快和剧烈的腰腿痛，再结合影像学及化验检查就能做出诊断，以便尽早进行治疗，避免后遗症的发生。

3.4　腰椎间盘感染的预防

术前严格消毒，术中严格无菌操作；手术前后应用抗生素治疗；对免疫功能低下，如合并慢性结缔组织性疾病，应视为相对禁忌证；术中切除椎间盘髓核组织时，避免损伤终板或对正常纤维环的破坏。怀疑多节段突出者，在探查为轻度膨出的或正常椎间盘者，尽量不要切除；取出髓核后椎间隙可注射抗生素预防感染；术中安置及术后拔除血浆引流管时应严格无菌操作，术后保持引流管通畅，减少椎管内积血；置硬膜外麻醉管位置不能离切口太近，拔管严格消毒后用无菌敷料覆盖。

关键词：椎间盘炎；腰椎间盘摘除术；诊断；治疗

中图法分类号：R681.53　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 余文昌，杨建勇，庄文权. 术后腰椎间盘炎的诊疗进展[J]. 影像诊断与介入放射学，2002，4(11)：244-246.

[2] 胡钟旭，张　璇. 腰椎间盘炎的治疗方法探讨[J]. 医学文选，2004，23(5)：592-593.

[3] 李　晶，吕国华，康意军，等. 术后重症腰椎间盘炎治疗方法的比较[J]. 中华骨科杂志，2002，22(2)：69-71.

（编辑　张大春）