论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0406-04

一种新的非人工通气兔心肌梗死模型的制作

蒋清安,何国祥,刘建平,苗 莉,景 涛 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 在非人工通气的情况下建立心肌梗死实验动物模型。方法 15只健康中国家兔非人工通气,经胸骨正中切口剪开胸骨和心包。其中10只于左室主支起点与心尖连线的中点位置结扎左冠脉左室支,作为冠脉结扎组;另5只开胸后假结扎冠脉作为假结扎组。4周后处死,观测其心电图和心脏组织学特征、去甲肾上腺素激发实验分析心功能。结果 与冠脉假结扎组比较,冠脉结扎组其ECG和组织学特征均表现为心肌梗死;评定心脏收缩功能的指标LVSP、$+dp/dt_{max}$和$t\text{-}dp/dt_{max}$,冠脉结扎组降低和缩短;评定心脏舒张功能的指标于冠脉结扎组LVEDP升高,而$-dp/dt_{max}$降低。结论 兔心肌梗死模型的制作可以通过非人工通气、有效、简便和实用的方法建立。

关键词:家兔;疾病模型;心肌梗死;非人工通气

中图法分类号:R-332;R542.22 文献标识码:A

A novel rabbit model of myocardial infarction without endotracheal intubation

JIANG Qing-an, HE Guo-xiang, LIU Jian-ping, MIAO Li, JING Tao (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop a myocardial infarction model in rabbits without endotracheal intubation. Methods A total of 15 Chinese rabbits of both sexes and (2.18 ± 0.19) kg in weight were subjected. The sternum was carefully incised along the midline to avoid injury to the parietal pleura without endotracheal intubation. The major branch of the left coronary artery of 10 rabbits used as coronary artery ligation group was then ligated. Five rabbits with sham ligating the coronary artery were used as control. After 4 weeks, cardiac functional analyses by noradrenalin challenge and histopathological analyses were performed. Results Compared with the coronary artery sham-ligation group, the coronary artery ligation group all presented to myocardial infarction through ECG and histologic characteristics. Cardiac functional analyses by noradrenalin after 4 weeks showed the parameters on cardiac systolic function in the coronary artery ligation group got worse significantly, that is to say LVSP and $+dp/dt_{max}$ increased, while $t\text{-}dp/dt_{max}$ shorten. Meanwhile, cardiac diastolic function got worse significantly. LVEDP rose, and $-dp/dt_{max}$ dropped. Conclusion A new method established a chronic rabbit model of myocardial infarction without the need for endotracheal intubation.

Key words: rabbits; myocardial Infarction; disease models; intubation

建立慢性心肌缺血实验动物模型在生理学、药理学、心脏病学等的研究中颇为重要。尽管猪、犬等大动物心肌梗死模型具有较多优点,但操作繁琐,对手术技能要求较高,死亡率高,且购买、饲养及术后护理等费用昂贵[1]。相比之下,小动物具有手术操作简单,费用低廉,容易收集到大样本数据。常见的慢性心肌缺血实验小动物模型中,兔与大鼠、小鼠相比,手术操作相对容易,兔心冠脉的天然侧支循环很少(与人、猪相似),同时冠脉阻断后致命的心律失常及死亡发生率低[2]。但常规的兔开胸手术为避免气胸的发生,需气管插管、呼吸机人工通气。本研究根据兔心在胸腔的解剖学位置特征,参照Fuita法[3],在非人工通气的情况下建立心肌梗死实验动物模型,观测其心电图、血流动力学等参数及心脏组织学特征,探索这种模型制作的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 健康中国家兔15只,雌雄各半,

基金项目:国家自然科学基金(30470452)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470452)

作者简介:蒋清安,男,湖北省利川市人,博士,主治医师,主要从事冠心病发病机制与防治方面的研究,电话:13985008910,E-mail:jiangqingan22@163.com

通信作者:何国祥,电话:(023)68754268,E-mail:yyxnk@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-11-30 修回日期:2008-01-04

体质量(2.18 ± 0.19) kg，由我校实验动物中心提供。分为 2 组，10 只开胸心脏冠脉左室支结扎作为冠脉结扎组，5 只开胸后不结扎冠脉作为假手术组。

1.1.2　主要试剂、仪器及材料　　动物麻醉及 Masson 三色染色等试剂均为国产分析纯配制；RM6280 多导生理记录仪（四川成都仪器厂）；Olympus BX4 1 显微图像采集系统（英国伦敦 Olympus Optical 公司）；E00240 小儿 7.5 cm 胸骨牵开器（上海医疗器械集团有限公司手术器械厂）。

1.2　实验方法

1.2.1　麻醉及心电图的监测　　家兔经腹腔注入速眠新Ⅱ注射液(0.3 ml/kg)麻醉，不用气管插管和呼吸机，保持兔自然呼吸状态，仰卧位固定于手术台肢体反射消失后仰卧固定于持续加热的手术台上，通过肛温监测维持体温为 39 ℃，同时用儿童面罩以 200 ml/min 流量给氧，面罩只需松罩在兔面部，以免产生正压通气。四个针型电极刺入皮下分别固定于四肢，并连接于 RM6280 多导生理记录仪连续监测 6 肢体导联心电图(ECG)。

1.2.2　胸壁正中切口开胸结扎冠状动脉　　参照 Fujita 法[3]。家兔仰卧位固定于手术台，剪除胸前区毛，碘伏消毒。为避免气胸的发生，严格沿胸骨正中从剑突处开始剪开胸骨直至颈静脉切迹，用儿童开胸器撑开胸骨以利手术视野的充分暴露，暴露纵隔及心脏，两侧胸膜完整，兔呼吸平稳。固定心包于胸骨，纵行剪开心包，用棉签轻轻上抬心脏显露支配左心室和心尖血供的左冠状动脉主支及室间沟。冠脉结扎组于左室主支起点与心尖连线的中点位置(左心耳下 7 ~ 10 mm 处)用 4-0 线结扎左冠脉左室支。心电图示Ⅱ、Ⅲ、aVF 等肢体导联 ST 段抬高(图 1)，左心室前壁及心尖部颜色变暗，搏动减弱，表明左室支完全结扎。心包不缝，逐层关胸。耳缘静脉推注青霉素 10 万 U。假手术组左室支下心肌缝线，但不结扎，其余同冠脉结扎组。整个手术过程约 25 min。术后连续 3 d 每日肌注青霉素 80 万 U，每日 1 次。同时与术前一样给予普通饲养。4 周后心电图检查示冠脉结扎组相关导联均存在病理性 Q 波或 T 波倒置，而假手术组则无，证明模型成功。

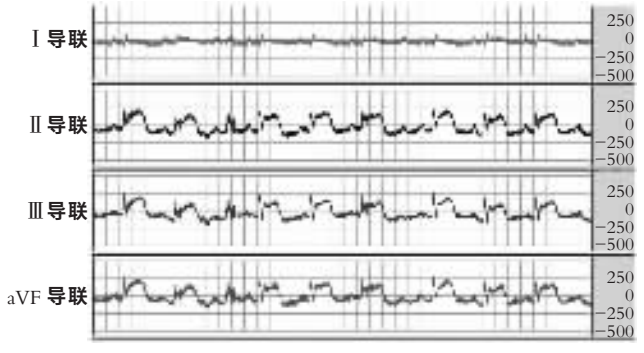


图 1　冠脉左室支结扎后 5 min 肢导联 ECG

1.2.3　去甲肾上腺素激发实验(noradrenaline challenge test)心功能分析[4]　　术后 4 周仍然存活的家兔经耳缘静脉注入 25% 的氨基甲酸乙酯麻醉，肢体反射消失后仰卧固定于持续加热的手术台上，通过肛温监测维持体温为 39 ℃，同时用儿童面罩以 200 ml/min 流量给氧，面罩只需松罩在兔面部，以免产生正压通气。四个针型电极刺入皮下分别固定于四肢，并连接于 RM6280 多导生理记录仪连续监测 6 肢体导联心电图(ECG)。分离暴露右侧颈动脉，左心室插入尾端连接压力换能器的 3F 微导管通过 RM6280 多导生理记录仪监测左心室压。

左心室压力电信号通过 RM6280 多导生理记录仪自带的分析软件(USB3.5 版)进行取样、存储、微分等数字分析。为检测心功能，进行去甲肾上腺素激发实验。0.01% 去甲肾上腺素生理盐水经耳缘静脉滴注，每 5 分钟滴速增加 1 次，滴速(μg/kg/min)分别为 0、1、4、8、12、16，记录每种滴速情况下评定心脏收缩功能的指标：最大心率(HR_{max})、左室收缩压(LVSP)、左室内压最大上升速率($+dp/dt_{max}$)、心电图 R 波顶点至 dp/dt 曲线升支峰顶的时间间隔($t\text{-}dp/dt_{max}$)，评定心脏舒张功能的指标左心室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大下降速率($-dp/dt_{max}$)。

1.2.4　组织学检查　　测完左心室压力数据后，经导管内注射肝素 2 000 U 及 30 mmol/L 氯化钾使心脏停于舒张期，经胸骨正中切口开胸，小心分离与心肌黏连的组织，连同主动脉弓一起完整摘除心脏。心脏经肝素生理盐水冲洗，随后 10% 中性甲醛以 80 mmHg 灌注 10 min。继续 10% 中性甲醛固定 48 h 以上，修剪后将心脏横切成 6 个厚片，常规石蜡包埋，用 Masson 三色剂(Masson 's trichrome reagean)染色。染色结果，胶原纤维(及瘢痕心肌)呈蓝色，弹力纤维呈棕色，肌纤维、纤维蛋白、红细胞呈红色，细胞核呈清晰的蓝黑色[5]。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用析因设计的两因素多水平方差分析。

2　结果

2.1　存活率、ECG 及组织学表现

除外 1 只分别死于麻醉过量和气胸外，9 只兔进行冠脉结扎，手术时胸腔出血少，视野清晰，围手术期(术后约 12 h)死亡 2 只，死亡率 22.2%。观察过程中 2 只兔分别在 9、20 d 时死亡，尸检除左室前侧壁和(或)室间隔前壁或右室前壁梗死外，9 d 死亡者见心包呈干酪样脓性心包积液表现，另 1 只见心包、胸腹腔积液，心脏扩大明显。

9 只兔进行冠脉结扎后约 5 min ECG 检测示均有Ⅱ、Ⅲ、aVF 等肢体导联 ST 段抬高，冠脉结扎组 5 只(50%)存活至实验终点者Ⅱ、Ⅲ、aVF 等肢体相关导联均存在病理性 Q 波或 T 波倒置。而冠脉假结扎组则无上述 ECG 特征。

5 只存活至实验终点，均存在左室前侧壁梗死，左室支结扎部位以下，见沿左室支走行左室心肌呈灰白色，条形分布，形状不规则，梗死灶主要在左室前侧壁及心尖部，部分梗死灶波及到室间隔及右室前壁。光镜下瘢痕区胶原纤维呈蓝色。冠脉假手术组 5 只兔均存活，心脏大体及光镜观察，心肌无梗死。见图 2、3。

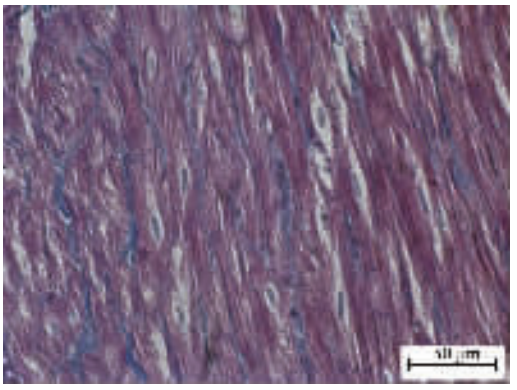


图2 假手术组结扎后4周心脏组织学观察 （Masson三色染色）

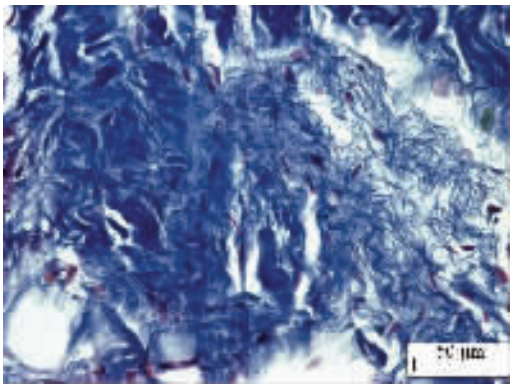
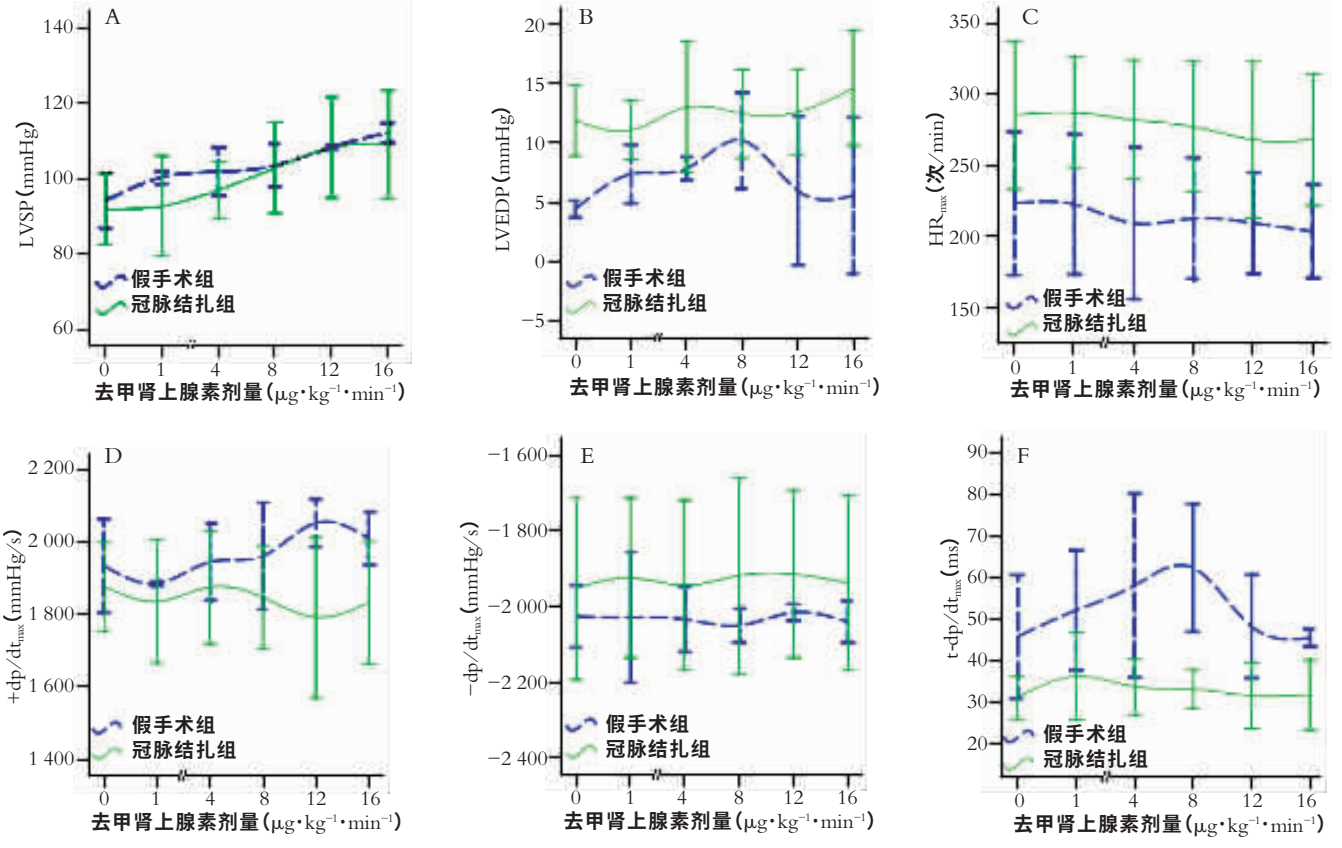


图3 冠脉结扎组结扎后4周心脏组织学观察 （Masson三色染色）



A：LVSP；B：LVEDP；C：HR_{max}；D：$+dp/dt_{max}$；E：$-dp/dt_{max}$；F：$t\text{-}dp/dt_{max}$

图4 去甲肾上腺素激发实验检测兔心肌梗死模型心功能变化

2.2 去甲肾上腺素激发实验心功能改变

评定心脏收缩功能的指标LVSP、$+dp/dt_{max}$和$t\text{-}dp/dt_{max}$，冠脉结扎组较假手术组降低和缩短（分别 $F=47.465$，$P=0.041$；$F=12.722$，$P=0.016$；$F=51.619$，$P=0.001$），提示冠脉结扎后当压力负荷增加时左心室收缩功能出现受损，而HR_{max}冠脉结扎组较假手术组明显增加（$F=11\,401.364$，$P=0.000$），表明冠脉结扎后心率储备减少。冠脉结扎后评定心脏舒张功能的指标LVEDP升高（$F=31.351$，$P=0.003$）、而$-dp/dt_{max}$降低（$F=173.264$，$P=0.000$），提示冠脉结扎后左心室舒张功能也受损（图4）。

3 讨论

最理想的模型应该是实验结果最贴近临床，即自然清醒状态下形成的缺血心脏整体模型，通常将一个酪蛋白塑料组成的具有吸水性的Ameriod缩窄器套置在小型猪心脏冠状动脉回旋支的起始部造成冠状动脉逐渐狭窄致最后完全闭塞[1]。但这种模型比较费时、费力，操作繁琐，对手术技能要求较高，到实验终点时动物生存率仅为40%，故限制了其广泛应用[6]。由于麻醉状态下局部心肌缺血模型的制作日益成熟、标准

化，且动物管理简单、成本低廉，故这种模型仍有不可替代的一席之地，其中兔心肌梗死模型较为广泛。

在兔心肌梗死模型制作手术操作过程中，由于胸膜的切开而出现气胸，因而常必需气管插管进行人工通气，否则会出现致命性的循环损害。然而，最麻烦的问题莫过于气管插管。其口腔解剖复杂，很大的门切牙，活动度相当受限的下颌骨以致妨碍了声门的清晰识别[7]。为克服这些解剖结构上给气管插管带来的困难，已报道了多种改进的插管技术[8]。然而，兔的胸腔解剖较之其他模型动物具有独特的优势，其纵隔将左右胸膜隔开、使之互不相通，肺被肋胸膜和肺胸膜隔开[9]。因而，开胸打开心包膜进行心脏实验操作时，只要不损伤由膈胸膜和纵隔胸膜组成的纵隔膜，则不会破坏胸膜腔，也就不必要进行人工呼吸，从而，省掉了气管插管的麻烦。国内已有学者[10, 11]不用气管插管和呼吸机，家兔经胸骨左缘切口开胸，切断左侧第 3 ~ 4 肋软骨，保持胸膜腔完整，缝扎左室支，成功地建立心肌梗死模型。但是这种操作常常损伤肋间动脉致胸腔积血，不仅影响手术视野的清晰暴露，而且常常因失血导致血流动力学参数的不稳定，不利于生理指标的检测和术后恢复。由于兔的壁层胸膜与胸骨没有粘连，胸骨正中动脉血管较少，因此沿胸骨正中切口开胸完全可避免气胸的发生，同时减少术中出血。国外已有兔不经气管插管同时也维持了自然呼吸，且血气分析各项参数平稳正常的开胸手术报道[3, 4]。

本研究经有创血流动力学监测、心电图及病理检查证实心肌梗死存在，表明本法成功建立了兔心肌梗死模型。传统人工通气心肌梗死模型其围手术期死亡率相当高，尤其是小动物可高达 35% ~ 50%[12, 13]，本实验死亡率为 22.2%；慢性死亡率国外报道为 29.4%，而本研究为 28.5%（2/7），二者相近。故本研究造模术主要在于降低急性期死亡率。关于冠状动脉结扎的位置，何智明等[10]研究认为，结扎部位离冠状动脉起源处越近，所结扎的冠状动脉血管愈粗，肉眼易分辨，结扎容易，但有相当高的心律失常和死亡率；反之，结扎部位离冠状动脉起源处愈远，所结扎冠状动脉愈细，动物死亡率降低，但肉眼冠状动脉难以分辨，手术不易操作。通过比较 ECG 变化、组织学缺血范围以及生存率，认为左室支结扎部位适宜在左室支距离左心耳缘下 5 ~ 10 mm，其缺血部位固定，缺血范围大小适宜，可比性强。本研究发现于左室主支起点与心尖连线的中点位置正是距约左心耳下 7 ~ 10 mm 处，因而本研究选择左室支结扎位置统一为左室主支起点与心尖连线的中点位置，以使实验结果有较强的可比性。本研究之所以将实验的终点定为 4 周，是因为已有研究表明兔心肌梗死 4 周时系损伤愈合进程中组织学变化的高峰时期[14]。

参考文献：

[1] 方厚华. 医学实验模型动物[M]. 北京：军事医学出版社，2002：12.

[2] Lee B H, Kim W H, Choi M J, *et al*. Chronic heart failure model in rabbits based on the concept of the bifurcation/trifurcation coronary artery branching pattern[J]. Artif Organs, 2002, 26(4): 360 - 365.

[3] Fujita M, Morimoto Y, Ishihara M, *et al*. A new rabbit model of myocardial infarction without endotracheal intubation[J]. J Surg Res, 2004, 116(1): 124 - 128.

[4] Fujita M, Ishihara M, Morimoto Y, *et al*. Efficacy of photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 in a rabbit model of chronic myocardial infarction[J]. J Surg Res, 2005, 126(1): 27 - 33.

[5] 梁晓俐. 病理学基础与实验技术[M]. 北京：军事医学科学出版社，2004：144 - 146.

[6] Accord R E, van-Suylen R J, van-Brakel T J, *et al*. Post-mortem histologic evaluation of microwave lesions after epicardial pulmonary vein isolation for atrial fibrillation[J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(3): 881 - 887.

[7] Irazuzta J, Hopkins J, Gunnoe P, *et al*. Simple method of multipurpose airway access through percutaneous tracheostomy in rabbits (Oryctolagus cuniculus)[J]. Lab Anim Sci, 1997, 47(4): 411 - 413.

[8] Worthley S G, Roque M, Helft G, *et al*. Rapid oral endotracheal intubation with a fibre-optic scope in rabbits: a simple and reliable technique[J]. Lab Anim, 2000, 34(2): 199 - 201.

[9] 邹移海，徐志伟，苏钢强. 21 世纪高等医学院校教材——实验动物学[M]. 北京：科学技术出版社，2004：96.

[10] 何智明，陈东风，邹香云，等. 家兔心肌缺血模型与冠状动脉左室支解剖特点关系[J]. 中国临床解剖学杂志，1994，12(1)：54 - 56.

[11] 李国营，田素民，于连发，等. 兔心肌缺血及缺血再灌注模型的制备[J]. 解剖学研究，2002，24(3)：237 - 238.

[12] Lindsey M L, Gannon J, Aikawa M, *et al*. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction[J]. Circulation, 2002, 105(6): 753 - 758.

[13] Ho H K, Jang J J, Kaji S, *et al*. Developmental endothelial locus-1 (Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia[J]. Circulation, 2004, 109(10): 1314 - 1319.

[14] Gelpi R J, Morales C, Cohen M V, *et al*. Xanthine oxidase contributes to preconditioning's preservation of left ventricular developed pressure in isolated rat heart: developed pressure may not be an appropriate end-point for studies of preconditioning[J]. Basic Res Cardiol, 2002, 97(1): 40 - 46.

（编辑　邓强庭）