论著

文章编号:1000-5404(2011)11-1148-04

结扎不同冠脉建立兔急性心肌梗死模型的特点比较

曹桂秋[1],穆玉明[1],曾倩倩[1],李艳红[1],姜 涛[2] (830011 乌鲁木齐,新疆医科大学第一附属医院:超声医学中心[1],实验动物科学研究部[2])

【摘要】 目的 对结扎不同冠脉分支制备兔急性心肌梗死模型的方法进行对比研究,并探讨其在科研应用中的意义。**方法** 选择30只新西兰大白兔,随机分为2组,非人工通气状态下,分别结扎左前降支(left anterior descending,LAD)及左旋支的粗大恒定分支左室支(left ventricular branch,LVB),并于结扎前及结扎后30 min、24 h、1周行心电图及心肌酶检测,结扎前及结扎后24 h、1周经静脉行心肌超声造影(myocardial contrast echocardiography,MCE)检查,结扎后1周行冠脉造影及血液动力学指标检测,随即处死动物留取左室标本称重并进行氯化三苯四氮唑(TTC)染色测定梗死面积。**结果** ①冠脉结扎术后30 min两组心电图ST均明显抬高,24 h后LAD组即明显回落($P<0.05$),1周后差异更为明显($P<0.01$)。②术后1周冠脉造影证实LAD组81.8%近中段闭塞,LVB组100%近中段闭塞,差异无统计学意义($P>0.05$)。③造模1周后两组收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP)、左心室压力最大上升和下降速率(maximum rate of rise and descend of left ventricular pressure,$\pm dp/dt_{max}$)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure,LVEDP)、射血分数(ejection factor,EF)均较术前明显减低($P<0.05$),左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension,LVEDD)较术前增大,LVB组较LAD组变化更为明显($P<0.05$),尤以$A\times\beta$最为显著($P<0.01$)。④TTC染色后计算LAD组心梗面积小于LVB组($P<0.05$),且心梗前后心肌灌注指标$A\times\beta$变化值与$\pm dp/dt_{max}$、心梗面积呈显著正相关($r=0.62$、0.55、0.80,$P<0.05$)。**结论** 结扎LVB建立的兔急性心肌梗死模型梗死面积理想,范围稳定可靠,可用于长期随访观察的急性心肌梗死相关研究,而结扎LAD则更适用于急性再灌注或侧支循环实验观察。

【关键词】 冠状动脉;急性心肌梗死;模型;动物

【中图法分类号】 R-332;R542.22;R654.2 **【文献标志码】** A

Establishment of rabbit acute myocardial infarction model by ligating different coronary arteries

Cao Guiqiu[1], Mu Yuming[1], Zeng Qianqian[1], Li Yanhong[1], Jiang Tao[2] ([1] Center of Ultrasonic Medicine, [2]Department of Laboratory Animals, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region, 830011, China)

【Abstract】 **Objective** To compare the method for establishing rabbit acute myocardial infarction (AMI) models by ligating different branches of coronary arteries. **Methods** Thirty New Zealand white rabbits were randomly divided into two groups with their left anterior descending branch ligated (LAD group) or their left ventricular branch ligated (LVB group). The animals underwent ECG and their creatinase level was measured before and 30 min, 24 h and 1 week after ligation. The animals received myocardial contrast echocardiography (MCE) before and 24 h and 1 week after ligation followed by coronary arteriography, and their hemodynamic indications were detected 1 week after ligation. The animals were sacrificed and left ventricular tissue samples were taken for the measurement of the infarct size (IS) with triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. **Results** The ST segment on ECG of the two groups was significantly elevated 30 min after ligation, declined significantly in LAD group 24 h after ligation ($P<0.05$) and more significantly 1 week after ligation ($P<0.01$). Coronary arteriography showed that 81.8% and 100% of middle coronary artery segment were occluded in LAD group and LVB group, respectively, 1 week after ligation ($P>0.05$). The systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), maximal elevation and decline rates of left ventricular pressure (LVEDP), $\pm dp/dt_{max}$, and ejection factor (EF) in both groups were significantly lower while the left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD) was significantly higher in LVB group than in LAD group 1 week after ligation than before ligation ($P<0.05$). TTC staining showed that the IS was smaller in LAD group than in LVB group ($P<0.05$) and the variance of $A\times\beta$ was positively correlated with the $\pm dp/dt_{max}$ and IS ($r=0.62$, 0.55, and 0.80, $P<0.05$). **Conclusion** The infarct size is ideal, stable and reliable in the rabbit AMI

【基金项目】 新疆维吾尔自治区自然科学基金(200821145)

【通信作者】 穆玉明,E-mail:mym1234@126.com

model established by ligating the LVB, and can thus be used in observation of AMI during long-term follow-up. The rabbit AMI model established by ligating the LAD is more suitable for observing acute reperfusion and collateral circulation.

[Key words] coronary artery; acute myocardial infarction; animal model

Supported by the Natural Science Foudation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (200821145). Corresponding author: Mu Yuming, E-mail: mym1234@126.com

随着冠心病的患病率日益增高,急性心肌梗死引起科研人员的重视,由此,动物急性心肌梗死模型的建立也日渐成为大家研究的重点之一。由于兔具有独特的双胸膜腔结构,人们往往首选开胸结扎冠脉法来模拟心梗,然而兔冠脉特点与人类及其他动物有所不同,故对于常规结扎左前降支(left anterior descending, LAD)或结扎明显粗大的左旋支之恒定分支左室支(left ventricular branch, LVB),目前尚无统一定论[1-2]。本研究应用冠脉造影结合心肌超声造影技术(myocardial contrast echocardiography, MCE),通过对分别结扎LAD及LVB造成急性心肌梗死的30只兔的梗死情况、心功能指标及其相关性等进行比较,旨在通过较为科学的手段探讨结扎不同冠脉在建立兔急性心肌梗死模型中的意义,为科研提供更可靠的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 新西兰大白兔30只,购自新疆医科大学实验动物中心,雌雄各半,体质量2.0~2.8 kg,随机数字表法分为LAD组和LVB组(每组15只)。

1.1.2 设备、仪器及试剂 美国GE数字减影血管造影C臂机,4F动脉鞘及各型造影导管,BMW导丝,2.7F微导管;美国GE IE33心脏超声检查仪,QLabT图像分析软件,声诺维(SnoVue,意大利博莱科公司生产)。

1.2 兔急性心肌梗死模型制备

参照Fujita法[3],氯胺酮(25 mg/kg)耳缘静脉麻醉,保持兔自然呼吸状态,仰卧位固定于手术台,术区备皮,碘伏消毒,取胸骨左侧切口切断左侧第3~4肋软骨,用开胸器撑开,暴露纵隔及心脏,保持两侧胸膜完整,纵行切开心包,充分暴露左冠状动脉,用5-0外科Prolene线分别于距左冠状动脉开口5 mm处缝扎LAD(LAD组)及于左室支起点与心尖连线的中上1/3位置缝扎LVB(LVB组),留1 cm线头作标记,观察左心室及心尖部颜色变暗,搏动减弱,表明缝扎完全,随后心包不缝,逐层关胸,缝合切口,术后3 d肌注先锋霉素V针(0.25 g/d)。动态检查兔体表心电图和血肌钙蛋白T(troponin T, cTnT)、心肌酶证实成功建立心肌梗死模型。

1.3 模型监测及评价

1.3.1 心电图监测 各实验兔四肢及前胸皮下插入针式电极,分别于结扎冠脉前、结扎冠脉后30 min、24 h、1周行常规心电图检测。

1.3.2 冠脉造影及血液动力学检查 在拥有数字减影血管造影C臂机的导管室进行。于造模成功后1周将兔氯胺酮耳缘静脉麻醉后,分离股动脉行冠脉造影检查,并进行TIMI血流分级。造影完毕后,将通过压力换能器连接32导电生理记录仪的导管置于主动脉处,测定动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)和平均动脉压(mean arterial blood pressure, MAP),然后进入左心室腔测左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左室压最大上升和下降速率(maximum rate of rise and descend of left ventricular pressure,, $\pm dp/dt_{max}$)。所有实验兔均于结扎冠脉前分离右侧颈总动脉进行上述指标检测。

1.3.3 心肌超声造影检查 分别于实验前、心梗模型建立后24 h、1周进行。保持兔清醒状态,四肢固定,经耳缘经脉匀速缓慢注射声诺维超声微泡造影剂(0.3 ml/kg),继以生理盐水1 ml冲洗。取胸骨旁乳头肌水平短轴观,心肌显像稳定后触发闪烁显像,发射高机械指数脉冲瞬间完全破坏心肌内造影剂微泡,随即仪器自动转换为低机械指数状态观察造影剂的再充盈过程,取闪烁后10~15个心动周期的电影回放存入磁盘,以供脱机分析所有图像。将感兴趣区(5 mm×5 mm)置于每一心肌节段的中央,QLab分析软件定量测定感兴趣区造影剂浓度,得出平台期强度A,代表微血管密度,再充盈速度β,代表心肌血流速度,根据指数函数拟合公式 $y = A(1 - \exp\beta t)$,系统自动计算出代表心肌血流量的A×β值,以反映缺血梗死区局部心肌血流灌注。

1.3.4 梗死面积计算 造模1周,血液动力学检测完毕后,从导管中快速推注10%氯化钾注射液(2 ml/kg),使心脏停搏于舒张期。立即取下心脏,保留左室,称量后横切5片,浸泡在2% TTC溶液中,置于37℃孵箱中15 min,而后取出照相,将不着色心肌切下称量,测量梗死区域占左室心肌面积与质量的百分比。

1.4 统计学分析

统计分析用SPSS 15.0软件进行,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用构成比率表示,计量资料组间比较采用 t 检验,组内比较采用配对 t 检验及方差分析,计数资料比较用 χ^2 检验,相关分析采用简单直线相关。

2 结果

2.1 成模率、存活率及手术观察

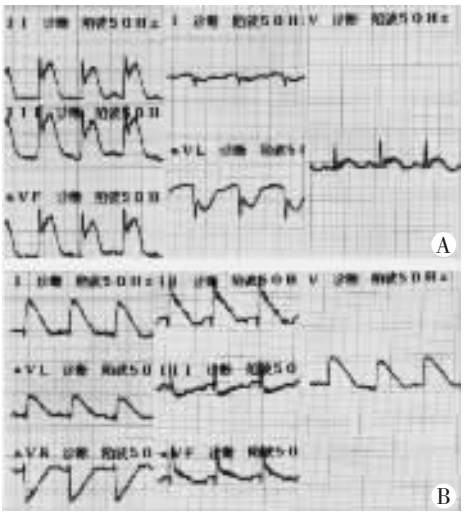
LAD组:手术后14只存活,心电图及心肌酶证实78.6%(11/14)成功建立心梗模型,均存活至实验终点,但术中观察结扎冠脉后左室心肌搏动减弱范围较局限。LVB组:手术后13只存活,92.3%(12/13)成功建模,其中3只于围手术期死亡,余9只(81.8%)存活至实验终点,术中观察结扎冠脉后即刻左室大部及心尖部均明显搏动减弱,颜色变暗。观察两组间成模率、存活率存在差异,但经检验无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 心电图(electrocardiogram, ECG)演变

两组术前ECG均正常。LAD组:结扎冠脉后71.4%兔(10/14)出现心电图改变,主要以II、III、avF抬高或压低为主,胸导变化较局限,其中20.0%(2/10)为一过性改变,关胸后基

本恢复正常，另有20%（2/10）1周后复查恢复正常。50%（5/10）于实验终点前出现病理性Q波（图1A）。LVB组：结扎冠脉后83.3%（10/12）出现心电图改变，多见Ⅰ、avL及全胸导均抬高，其中50.0%（5/10）Ⅱ、Ⅲ、avF亦明显抬高，70%（7/10）24 h内出现病理性Q波（图1B）。

两组术后各时点ST平均值均较术前明显抬高（$P<0.05$），两组间比较，术后30min各导联ST抬高平均值差异无统计学意义，而术后24h及术后1周LAD组与LVB组相比均趋向好转（$P<0.05$）（表1）。



A：LAD组；B：LVB组

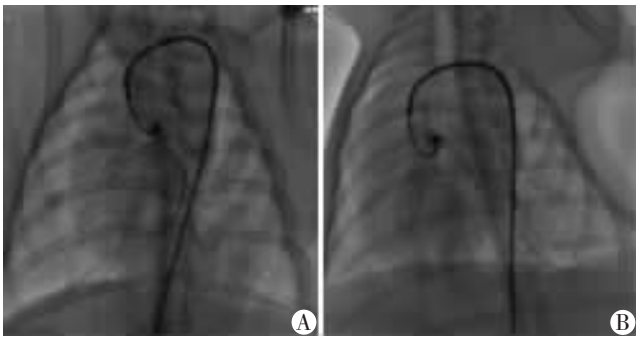
图1 两组兔冠状动脉结扎后心电图表现

表1 两组兔结扎冠脉后不同时间点ECG比较（$\bar{x}\pm s$）

各导联ST抬高平均值（mV）	结扎后30 min	结扎后24 h	结扎后1周
LAD组（$n=11$）	0.27±0.13	0.15±0.15	0.07±0.10
LVB组（$n=9$）	0.32±0.08	0.29±0.10	0.24±0.12
t值	−0.912	−2.433	−3.601
P值	0.374	0.026	0.002

2.3 冠脉造影结果比较

结扎冠脉1周后，LAD组81.8%（9/11）兔行冠脉造影检查证实为LAD近中段闭塞，TIMI血流0～2极。LVB组100%（9/9）冠脉造影证实为LVB近中段闭塞，TIMI血流0～1极。两组间似有不同，但差异无统计学意义。见图2。



A：LAD组；B：LVB组

图2 两组兔结扎后的冠状动脉造影表现

2.4 心功能及血液动力学指标比较

两组术后24 h LVEDD、EF等超声造影指标与术前相比差异无统计学意义，但A×β较术前已有减低（$P<0.05$），且LVB组较LAD组更低（$P<0.05$）。造模1周后两组SBP、DBP、±dp/dt_{max}、LVEDP、EF较术前明显减低（$P<0.01$），LVEDD较术前增大，LVB组较LAD组变化更为明显（$P<0.05$），尤以A×β最为显著（$P<0.01$），但E/A值两组内及两组间差异均无统计学意义（$P>0.05$）（表2，表3，图3）。

表2 2组兔心肌超声造影测量指标比较（$\bar{x}\pm s$）

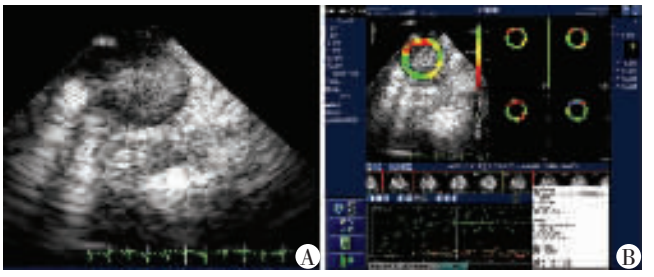
组别	LVEDD（mm）	EF	E/A	A×β（dB/s）
LAD组（$n=11$）				
术前	11.54±2.11	0.62±0.06	1.70±0.22	33.61±1.59
术后24 h	12.35±1.14	0.56±0.03	1.68±0.12	12.23±1.01[a]
术后1周	14.97±1.34[a]	0.50±0.08[a]	1.72±0.16	3.75±2.12[a]
LVB组（$n=9$）				
术前	12.01±1.40	0.66±0.03	1.66±0.18	28.88±3.01
术后24h	13.14±1.20	0.55±0.06	1.68±0.21	8.46±0.91[ab]
术后1周	16.36±3.01[ab]	0.46±0.17[ab]	1.58±0.31	1.51±1.77[ac]

a：$P<0.01$，与术前比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与LAD组比较

表3 2组兔有创血流动力学测量指标比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	SBP（mmHg）	DBP（mmHg）	+dp/dt_{max}（mmHg/s）	−dp/dt_{max}（mmHg/s）	LVEDP（mmHg）
LAD组	11					
术前		119.98±2.31	90.91±0.85	3481.22±127.03	−2962.83±210.14	−10.22±0.61
术后1周		114.55±2.55[a]	86.34±1.23[a]	2622.48±103.50[a]	−2247.17±140.01[a]	20.34±2.40[a]
LVB组	9					
术前		119.84±1.40	90.87±0.97	3527.18±218.15	−3267.15±244.23	−15.21±0.23
术后1周		111.97±2.94[ab]	84.89±1.00[ab]	1903.51±244.02[ab]	−1623.34±395.01[ab]	27.01±3.41[ab]

a：$P<0.01$，与术前比较；b：$P<0.05$，与LAD组比较



A：急性心肌梗死后左室前壁造影剂明显充盈缺损；B：心肌梗死后兔MCE分析 红色曲线下面积明显减小

图3 急性心肌梗死模型兔心肌超声造影表现及分析

2.5 心梗面积测量及相关性分析

TTC染色后计算梗死面积及重量发现，LAD组梗死面积及梗死心肌质量百分率分别为（23.41±4.43）%、（8.20±2.42）%；LVB组分别为（36.32±5.21）%（13.30±0.56）%。LAD组心梗面积较LVB组小（$P<0.05$），且多数局限于左室前壁或室间隔局部，LVB组则多为左室广泛前壁及侧壁累及。两组资料合并后，以心梗前后心肌灌注指标A×β变化值为应变量，分别以兔体重、心梗前后LVDD、EF、SBP、DBP、±dp/dt_{max}、LVEDP变化值、心梗面积百分率等为自变量，进行简单线性相关分析，结果提示心梗局部心肌的血流灌注降低与体质量、SBP变化、DBP变化、LVDD变化值均无明显相关，与±dp/dt_{max}、心梗面积百分率呈显著正相关（$r=0.62, 0.55, 0.80$，$P<0.05$），与EF变化值、LVEDP变化值呈微弱正相关（$r=0.20$，$P<0.05$）。图4。



图 4 兔心梗后左室横断面 TTC 染色大体观察

3 讨论

由于兔具有价廉、易饲养等优点，目前，兔急性心肌梗死模型已广泛应用于科研[4]。既往的研究多采用传统的结扎冠脉 LAD 法复制兔急性心肌梗死模型，但兔 LAD 变异大，成模率极不稳定。有报道发现结扎 LVB 可造成较大范围心肌梗死，但未进行相关心功能等综合指标评价[5]。本研究通过急性心梗“金标准”冠脉造影检查，结合心肌超声造影技术，分别对结扎 LAD 和 LVB 后的成模情况、左室收缩功能、血液动力学指标、缺血心肌局部血流灌注等进行比较。

本研究冠脉造影发现，兔冠脉侧支循环极为丰富，LAD 短小，多终止于前室间沟上 1/3，供血范围有限，LVB 发自于左旋支主干，相当于人类心左缘支，粗大、行程长，直达心尖或绕过心尖与右冠状动脉吻合，供应左心大部。开胸结扎相应冠脉时发现，LAD 与心大静脉伴行，深埋于肌层，体表不易分辨，难以避开心大静脉而单独结扎，而 LVB 粗大、浅表，肉眼极易分辨，结扎后心肌搏动减弱明显，范围广泛，证实了既往的研究结果[6]。

本实验起点时 LAD 组建模率 78.6%，LVB 组建模率为 92.3%，两者有所差异，但尚无统计学意义。结扎冠脉 30min 时两组心电图各导联 ST 抬高的平均值无差异，24h 后 LAD 组 ST 段抬高即已部分恢复（$P<0.05$），至梗死 1 周后，LAD 组均存活，LVB 组存活率仅为 81.8%，复查心电图及进行冠脉造影检查，LAD 组 81.8% LAD 近中段闭塞，50% 心电图出现病理性 Q 波，梗死面积 23.41%，LVB 组 100% 冠脉闭塞，70% 心电图出现病理性 Q 波，梗死面积 36.32%，冠脉闭塞率相近，但梗死面积间差异具有明显统计学意义（$P<0.05$）。以上结果证实，两组近期成模率均较高，但 LAD 组梗死范围较小，梗死 1 周后心电图改变逐渐恢复，考虑原因为 LAD 短小深埋，变异大，单纯结扎动脉主干较为困难，多为一过性缺血，侧支循环易代偿，提示结扎 LAD 适于进行短期急性缺血再灌注或侧支循环实验观察。结扎 LVB 组梗死范围较大，且较稳定，但存活率较低，原因为 LVB 粗大表浅，易于分辨，走形恒定，供血范围广，提示其适合用于长期随访观察的实验造模。实验结束后肉眼及病理证实建模成功的实验兔中，冠脉造影发现 LVB 组全部为 LVB 近中段闭塞，而 LAD 组仅 81.8%（9/11）为 LAD 近中段闭塞，考虑可能为远端或分支结扎所致，亦与兔 LAD 特殊解剖走形及变异有关。

以往对于心功能的检测依赖于 M 型超声心动图进行，对于体积较小的动物，由于内膜显示不清而影响测量准确性[7]。MCE 是近几年发展的一种影像新技术，通过静脉注射超声微泡造影剂，改善心内膜边界的识别及局部室壁运动的识别，从而提高 EF 等心功能指标测量的准确性，同时 MCE 可用于实时精确评估缺血心肌局部的血流灌注[8-9]。本研究通过 MCE 技术测量了两组心梗前及 24h、1 周后的心功能指标发现，两组术后 24 h 各超声心功能指标尚无差异，但 LVB 组的反映局部心肌血流灌注指标 A×β 值已明显低于 LAD 组（$P<0.05$），术后 1 周两组 LVEDD、EF、A×β、SBP、DBP、$\pm dp/dt_{max}$ 等各指标均较术前明显减低（$P<0.05$），但 LVA 组较 LAD 组降低更为明显（$P<0.05$），尤以 A×β 最为显著（$P<0.01$），提示结扎 LVB 建立的心梗模型更为可靠，而心梗前后心肌灌注指标 A×β 变化值与 $\pm dp/dt_{max}$、心梗面积百分率呈显著正相关，提示 MCE 测量 A×β 可能作为评估建立心梗模型的可靠指标之一。

由上可见，结扎 LVB 建立的兔急性心肌梗死模型虽围手术期死亡率较高，但梗死面积理想，范围稳定可靠，可用于长期随访观察的急性心肌梗死相关研究。结扎 LAD 在短期内与结扎 LVB 效果相当，更适用于急性心肌再灌注或侧支循环的实验观察。MCE 测量 A×β 可用于早期评估局部心肌缺血梗死情况。

参考文献：

[1] Gu J, Wang Y, Li J, *et al*. Proteomic analysis of left ventricular tissues following intermittent myocardial ischemia during coronary collateralization in rabbits[J]. Int J Cardiol, 2009, 131(3): 326-335.

[2] Gao F F, Shi G G, Zheng J H, *et al*. Protective effects of N-n-butyl haloperidol iodide on myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits [J]. Chin J Physiol, 2004, 47(2): 61-66.

[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] 王元会，励建安，顾劲扬，等. 心肌周缺血频率对兔冠状动脉侧支循环生成的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志，2006，28(1)：5-9.

[5] 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.

[6] 张嘉宁，顾为望，许乙凯. 结扎兔冠状动脉前降支与左室支的急性心肌梗塞比较[J]. 中国实验动物学报，1997，5(2)：103-107.

[7] Miszalski-Jamka T, Kuntz-Hehner S, Schmidt H, *et al*. Myocardial contrast echocardiography enhances long-term prognostic value of supine bicycle stress two-dimensional echocardiography [J]. J Am Soc Echocardiogr, 2009, 22(11): 1220-1227.

[8] Kiessling F, Huppert J, Palmowski M. Functional and molecular ultrasound imaging: concepts and contrast agents [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(5): 627-642.

[9] Wada H, Yasu T, Kotsuka H, *et al*. Evaluation of transmural myocardial perfusion by ultra-harmonic myocardial contrast echocardiography in reperfused acute myocardial infarction [J]. Circ J, 2005, 69(9): 1041-1046.

（收稿 2010-11-16 修回 2010-12-26）
（编辑 吴培红）