缺血预处理制备急性心肌梗死动物模型

赵 亮[1],杨爱军[2],李晓辉[1],文 灿[2],张天飞[2] (1. 解放军白求恩国际和平医院胸心外科,河北 石家庄 050200;2. 第三军医大学基础部外科应用解剖与手术学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨犬急性心肌梗死动物模型的制备方法,提高模型制备的成功率。**方法** 健康杂种犬 20 只,分为为直接结扎冠状动脉左前降支组和缺血预处理后结扎组,制备犬急性心肌梗死模型。**结果** 直接结扎组死亡率为 40% (4/10),2 只死于术中室颤,2 只死于术后心衰。缺血预处理组死亡率为 10% (1/10),死于气胸。心脏超声检查显示 2 组犬术后心功能明显下降,心室腔扩大,其中以直接结扎组更为明显。**结论** 心律失常、心功能衰竭和气胸是围术期死亡的主要原因。缺血预处理后结扎冠状动脉可降低室性心律失常和术后心衰的发生,从而提高构建犬心肌梗死模型的安全性。

[关键词] 犬;心肌梗死;动物模型

[中国分类号] R654.2;R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)01-0031-03

Establishing acute myocardial infarction animal models after ischemic preconditioning

ZHAO Liang, YANG Ai-jun, LI Xiao-hui, WEN Can, ZHANG Tian-fei (Department of thoracic-cardiovascular surgery, Bethune international peace hospital of PLA, Shijiazhuang Hebei 050200, China)

Abstract: Objective To investigate the methods to improve the success rate of the acute myocardial infarction animal models. **Methods** 20 healthy dogs were divided into the direct ligation group and the ischemic precondition group. The left anterior descending artery of the direct ligation group were ligated to establish the acute myocardial infarction model without ischemic precondition while the ischemic precondition group were ligated after ischemic precondition. **Results** The mortality of the direct ligation group was 40% (4/10), with two dogs died of intraoperative ventricular fibrillation and two died in the postoperative heart failure. The mortality of the ischemic precondition group was 10% (1/10), of which one died of pneumothorax. Echocardiography showed there were canine cardiac function decrease and ventricular cavity expansion in the two groups. And it is much more obvious in the direct ligation group. **Conclusion** Ventricular arrhythmia, heart failure and pneumothorax are the leading causes of perioperative death. Ischemic precondition before the ligation could reduce the occurrence of ventricular arrhythmias and heart failure after coronary ligation and improve the security of building a dog myocardial infarction model.

Keywords: dog; myocardial infarction; animal models

随着急性心肌梗死日益成为人类生命健康的常见疾病[1],人们通过制备动物心肌梗死模型为研究发病机制、病理变化,以及新药物、新技术治疗提供实验基础。选用大型动物如犬、猪、家兔等制备模型,操作相对方便,且利于活体观察、监测,以及病理、分子生物学等实验研究[2]。对于制作动物心肌梗死模型,冠状动脉结扎法是较为确切的一种方法。但构建犬的急性心肌梗死模型的死亡率高达 25% 左右[3-4],且对于怎样提高建立犬心肌梗死模型的成功率以及术后评价少有研究,因此本文对此进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

选用健康杂种犬 20 只,体质量 18 ~ 20 kg,年龄 2 ~ 3 岁,按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。主要试剂与仪器有戊巴比妥钠注射液(北京化学试剂公司),利多卡因注射液(华北制药集团制剂有限公司),40% 分析纯甲醛(北京化学试剂公司),彩色超声诊断系统(Vivid S5 美国 GE),动物呼吸机(上海医用电子仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 麻醉与术前准备 铁夹固定犬颈部及犬后肢,经胫前静脉注射 3% 戊巴比妥钠注射液,注药剂量 1 mL/kg,注药速度先快后慢。家犬出现睫毛反射消失、四肢肌张力下降时停止给药。进行脱毛、气管插管、固定四肢、静脉置管,滴注青霉素钠 320 万单位生理盐水 100 mL。将 3 根电极分别固定于两上肢与右下肢,连接到心电监护系统上,连续描记标准的Ⅱ导联心电图。皮肤消毒、铺单,接麻醉呼吸机,调整呼吸参数为吸呼比 1∶1.5,呼吸频率为 16 次/分,潮气量为 15 mL/kg。

1.2.2 手术方法 实验犬取右侧卧位,第 4 肋间水平切口,即距肩胛下角的下一肋间,前止于胸骨左缘 2 cm 处,避免损伤胸廓内动脉。切开皮肤、皮下及肌层,再次确认肋间隙,进胸,暴露,在膈神经前 1 cm、主动脉心包返折下 1.5 cm 提起心包,用纱布制成的"花生米"向前、向下推离附在心包上的壁层胸膜,保护对侧胸膜,避免破损。纵行剪开心包,将心包悬吊在胸

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.2013010014

[收稿日期] 2012-07-5 [修回日期] 2012-07-30

壁,暴露左前降支动脉,在第 1 分支以远 1.5 cm 处用显微镊提起覆盖在左前降支动、静脉的心外膜,小圆刀轻轻划开。提起划开的外膜,钝头针在血管和心肌的间隙穿过,绕 4 号丝线。结扎前降支动脉前静脉注射利多卡因 1 mg/kg。缺血预处理:丝线穿入长约 5 cm 的白色胶管(头皮针管),收紧丝线阻断冠脉血流 10 min,放开 5 min,反复 3 次,进行缺血预处理。去除胶管,结扎前降支动脉。一般在数分钟冠脉供应区室壁局部变白,随后颜色变为暗红,Ⅱ导联心电图波形出现 ST 段弓背向上抬高、T 波高尖。模型制备满意,开胸观察 30 min 后,逐层关闭胸腔,肌层、皮下和皮肤采用连续缝合的方式缝合。第 5 肋间置胸腔引流管(深静脉留置针),关胸后抽至负压夹闭。待犬自主呼吸稳定后断开呼吸机,顺次拔除气管插管。实验犬苏醒后 5~6 h 内严密观察犬的呼吸状况,反复抽气 2~3 次,如无气体引出、听诊双肺呼吸音清晰,则拔除引流管,预留线打结。如胸腔引流管内反复有气体引出,则应注意切口是否缝合严密,是否有气体经切口进入胸腔。如有向胸腔内漏气,则需进一步处理,避免形成张力性气胸。生命体征稳定后,送回饲养室。每天观察精神、饮食、活动及手术切口情况。术后 3 d 每天肌注青霉素钠 160 万单位。

1.2.3 心脏超声评价 术前 1 d 与术后 2 周对犬进行心脏超声检查,取胸骨旁短轴观切面,记录反映左心室功能的射血分数(ejection fraction, EF),缩短分数(fractional shortening, FS),以及反映左心室腔大小的左室收缩末直径(left ventricular end systolic dimension, LVESD) ,舒张末直径(left ventricular end dilation dimension, LVEDD)。

1.2.4 病理学观察 术后 2 周 10% 高钾液 20 mL 处死所有犬,迅速取出心脏标本,10% 福尔马林液固定心室肌肉组织,石蜡包埋,制成 4 μm 切片,HE 染色观察。

1.2.5 统计分析 采用 SPSS 13.0 软件分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组犬术前、术后心功能比较,使用配对设计 t 检验分析数据的显著性差异,$P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 术后存活情况

两组犬死亡率为25%(5/20),直接结扎组 2 只术中死于难复律性室颤,另外 2 只术后出现精神、饮食差,呼吸急促,考虑死于心衰;缺血预处理 1 只术后出现室颤心律,给予电除颤后心脏恢复窦性心律;1 只术后第 2 天死于气胸,尸检两侧肺塌陷明显,考虑不排除切口漏气至张力性气胸伴右侧胸膜小破损。直接结扎组主要死因为心源性,死亡率高于缺血预处理组。

2.2 无创心功能检测

直接结扎组和缺血预处理组术前心功能比较,$P > 0.05$ 无统计学差异。术后 2 周的心功能与术前 1 d 相比射血分数和短轴缩短率明显减低,心功能有明显下降;左心室舒张末直径和收缩末直径明显变长,心室腔明显扩大。缺血预处理组术后心功能、心室结构变化好于直接结扎组,$P < 0.05$,有统计学意义,见表 1。

表 1 冠脉结扎术前、术后犬心脏结构和功能的心脏彩超结果比较($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	EF (%)		FS (%)		LVESD (cm)		LVEDD (cm)	
	术前 1 d	术后 2 周	术前 1 d	术后 2 周	术前 1 d	术后 2 周	术前 1 d	术后 2 周
直接结扎组	63.7 ± 3.2	47.2 ± 2.2*	28.1 ± 2.9	22.6 ± 2.3*	2.83 ± 0.17	3.77 ± 0.16*	3.58 ± 0.21	4.65 ± 0.22*
缺血预处理组	64.3 ± 2.6	49.8 ± 1.7*#	28.5 ± 1.7	24.9 ± 2.4*#	2.76 ± 0.21	3.50 ± 0.14*#	3.61 ± 0.19	4.32 ± 0.16*#

*:与术前 1 d 比较,$P < 0.05$;#:与术后直接结扎组比较,$P < 0.05$

2.3 心肌组织病理形态学

2 组犬术后 2 周离体心脏左室前壁变薄、局部膨隆,未见明确的室壁瘤形成。心肌组织常规 HE 染色后,在显微镜下可见细胞水肿明显,毛细血管充血、渗出,有炎症细胞浸润;坏死区域心肌纤维排列紊乱,肌丝断裂溶解,细胞核固缩碎裂。

3 讨论

犬易于饲养,生命力强,与人有相似的心脏和冠脉结构,相对猪、羊等大型动物,实验成本较低,麻醉管理简单,手术耐受好,可采用大型仪器,如超声、磁共振等仪器设备进行实验后实时动态评估,常被用来制备急性心肌梗死的动物模型。开胸、直视下冠脉结扎法构建心肌梗死模型经济、确实、可靠[2],但模型制备的死亡率高,难复律性室颤和心功能衰竭是围术期的主要死亡原因,死亡率约为 25% 左右[3-4]。临床研究发现缺血预处理可明显减少心肌梗死面积、死亡率,室性、室上性心律失常的发生率[5]。实验研究发现缺血预处理可增加心肌对缺血、缺氧的耐受,同时提高了心肌的室颤阈值,降低了心肌的易颤性和/或增加了心肌的电稳定性[6]。本实验缺血预处理组术中室性心律失常和术后心功能情况好于直接结扎组,缺血预处理对于构建急性心肌梗死犬模型具有保护作用。

气胸是围术期死亡的另一个重要原因。保护右侧胸膜和左肺对于预防气胸很重要。犬的纵隔结构不清晰,左右侧壁层胸膜极薄,紧贴在一起,在心包前区有交叉、重叠。在切开心包前,钝性推开胸膜可有效避免胸膜破裂。进胸时避免损伤左肺,可先用钝器将胸膜穿破,造成气胸使肺塌陷;开胸后可用湿纱布遮挡肺叶,避免锐器损伤。犬的胸壁肌层较薄,连续缝合肌层、皮肤切口能有效避免气体从切口进入胸腔。留置胸腔引流管,利于术后气胸的检查、护理。

成功的麻醉是制备心肌梗死模型的前提[7]。静脉注射 3% 戊巴比妥钠即可达到满意的全麻效果[8]。戊

巴比妥为白色结晶性颗粒或粉末,有引湿性,极易溶于水,但久置易分解,加热分解更快,过量给药会产生呼吸抑制。剂量控制在 1 mL/kg(30 mg/kg)左右,采用“先快后慢”的注药速度,观察犬对药物的反应程度“宁浅勿深”,术中每次 1 mL,以少量多次的方式追加药物,避免由于药物浓度改变或因犬的个体差异导致麻醉药物过量的情况发生[9]。

冠脉套线、结扎是模型制备的难点。犬的冠脉较人的细小,有 2 支静脉伴行,左前降支于较深较窄的前室间沟内,外面包裹心外膜,部分分布于左心室前壁,侧枝丰富,且多肌桥;犬的左室 95% 由左前降支供血。结扎的部位选在紧靠前降支第 1 分支以远 1.5 cm 处,避开肌桥段。如位置紧靠起始部,结扎后左室近乎失去全部供血;如位置靠近远端,由于侧枝丰富不会造成局部心肌梗死。套结扎线前,切开包裹血管的心外膜,“钝头”针紧贴心肌表面,试探性穿过血管和心肌间的间隙,避免使用暴力,易损伤伴行静脉;避免使用尖细的弯针直接缝扎。如缝扎深度不够,可能直接损伤冠状动脉或伴行静脉,造成出血;如果缝得过深,可能造成心室撕裂。

[参考文献]

[1] 臧凤荣,温佳滨. 100 例老年冠心病临床分析[J]. 局解手术学杂志,2002,11(3):299 – 300.

[2] 李佩玲,赵 丽,谢秀丽,等. 结扎血管法制作犬急性心肌梗死模型的优势[J]. 山西医药杂志,2011,40(10):974 – 975.

[3] 刘 超,赵文增,罗 鸿. 犬急性心肌梗死模型的改进[J]. 重庆医学,2006,35(9):823 – 825.

[4] Mathieu M, El Oumeiri B, Touihri K, et al. Ventricular-arterial uncoupling in heart failure with preserved ejection fraction after myocardial infarction in dogs-invasive versus echocardiographic evaluation[J]. BMC Cardiovasc Disord,2010,29(10):32 – 41.

[5] 叶生明,马波江,张玉碧. 缺血预处理与急性心肌梗死预后关系的探讨[J]. 心脏杂志,2000,12(2):162.

[6] 夏 强,陆 源,沈岳良,等. 缺血预处理的抗心律失常作用[J]. 中国病理生理杂志,1996,12(3):274 – 277.

[7] 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.

[8] 王天龙,刘 通,张天飞,等. 戊巴比妥钠在教学用犬麻醉中的应用[J]. 局解手术学杂志,2008,17(2):141 – 142.

[9] 周小林,雷 艳,侯晓宇,等. 手术教学中动物犬的麻醉效果观察[J]. 局解手术学杂志,2010,19(6):541.

(编辑:魏 源)

(上接第 30 页)

所在的问题主要为,用药指征过宽、疗程偏长、品种选择不够恰当等问题。我们认为,加强抗抗生素范应用的监管力度和抗生素临床应用监测,对临床医师进行必要的培训,定期分析临床各科室抗生素使用情况,有针对性进行抗菌药物专项点评并及时采取切实可行的干预措施,同时与临床医师进行良好的沟通,这样才能建立合理用药的长效机制,确保围手术期预防应用抗生素逐步走向合理[15-17]。

[参考文献]

[1] 朴明玉. 我院 160 例住院患者抗菌药物使用调查分析[J]. 中国民族民间医药杂志,2011,20(16):49 – 49.

[2] 邓燕芬. Ⅰ类切口手术围手术期预防性应用抗菌药物调查分析[J]. 中国医药科学,2011,1(15):14 – 16.

[3] 黄成华,薛 均. 医院感染现患率调查与分析[J]. 局解手术学杂志,2011,20(4):376 – 377.

[4] 刘双喜,高新云,罗晓明,等. 围手术期预防性使用抗生素情况调查及管理[J]. 局解手术学杂志,2010,19(6):480 – 481.

[5] Jiang K, Huang W, Yang XN, et al. Present and future of prophylactic antibiotics for severe acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol,2012,18(3):279 – 284.

[6] Li JF, Lai DD, Zhang XD, et al. Meta-analysis of the effectiveness of prophylactic antibiotics in the prevention of postoperative complications after tension-free hernioplasty[J]. Can J Surg,2012,55(1):27 – 32.

[7] 谢 婷, 冯璐璐,刘瑞媛, 等. 以 P-糖蛋白为靶点的肿瘤多药耐药逆转剂[J]. 生命的化学,2010(5):699 – 703.

[8] 李玉莹,马武开. 中医药逆转白血病多药耐药细胞的研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(10):906 – 907.

[9] 高新云,罗晓明,施安娜,等. 手术切口感染病原菌分析及管理策略[J]. 局解手术学杂志,2010,19(6):496 – 497.

[10] 周旭美,刘晓梅. 我院 142 例外科围手术期患者抗菌药物应用分析[J]. 中国药房,2008,19(26):2018.

[11] 张抗怀,黄泰康,王 娜,等. 某教学医院外科围术期患者抗菌药物预防性应用情况及其影响因素研究[J]. 中国药房,2011,22(6):493.

[12] Jeppsson B, Mangell P, Thorlacius H. Use of probiotics as prophylaxis for postoperative infections[J]. Nutrients,2011,3(5):604 – 612.

[13] Pepper C, Lo S, Toma A. Prospective study of the risk of not using prophylactic antibiotics in nasal packing for epistaxis[J]. J Laryngol Otol,2012,126(3):257 – 259.

[14] Chosidow O, Le Cleach L. Prophylactic antibiotics for the prevention of cellulitis (erysipelas) of the leg. A commentary[J]. Br J Dermatol,2012,166(1):6.

[15] Setiawan B. The role of prophylactic antibiotics in preventing perioperative infection[J]. Acta Med Indones,2011,43(4):262 – 266.

[16] Bonten MJ. Antibiotics do more than cause resistance[J]. Ned Tijdschr Geneeskd,2011,155(46):A4124.

[17] 邓明影,史天陆,姜 玲,等. 围手术期预防用抗菌药物合理性评价指标筛选方法的探讨[J]. 中国药房,2011,22(33):3159 – 3162.

(编辑:杨爱军)