



大鼠急性心肌梗死模型制备方法研究进展

曹 珏^{1,3}, 李贻奎², 陈孟倩¹, 姚魁武^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091;
3. 北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 急性心肌梗死是危害人类生命的重大疾病之一。心肌梗死动物模型对研究人类心肌梗死的病理生理变化、诊断和治疗有着重要意义。目前心肌梗死动物模型的制备主要存在动物存活率低、繁琐复杂等问题。近年来, 针对心肌梗死动物模型制备方法研究取得一些进展, 在模型动物存活率、模型动物合格率、制备模型速度等方面具有一定的提高。该文就急性心肌梗死模型的制备方法及相关研究现状进行分析, 结合实际因素以期简化模型制备过程, 提高科研人员的造模水平, 从而为医学研究提供稳定可靠的急性心肌梗死模型来源。

【关键词】 大鼠; 急性心肌梗死模型; 自主呼吸; 冠脉结扎; 麻醉; 检测指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0096-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.10.019

Research progress on preparation of rat models of acute myocardial infarction

CAO Jue^{1,3}, LI Yi-kui², CHEN Meng-qian¹, YAO Kui-wu^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Xiuyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091; 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

【Abstract】 Acute myocardial infarction is one of the major causes of death in the world. Research on animal models of myocardial infarction has a great significance in improving the pathophysiology, diagnosis and treatment of human myocardial infarction. At present, problems such as low survival rate and complicated preparation still exist. In recent years, some progress has been made in the preparation of animal myocardial infarction models, which can improve the survival rate, qualified rate and speed. This paper analyzes the preparation of rat models of acute myocardial infarction and related research, combined with actual factors to simplify the process of preparation and improve the skills of scientific researchers, so as to provide a source of stable and reliable acute myocardial infarction models for medical research.

【Key words】 Rat; Acute myocardial infarction model; Spontaneous breathing; Coronary artery ligation; Anaesthesia; Detection indicator

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是全世界病死率较高的疾病之一。诱导受损的心肌细胞再生成为治疗急性心肌梗死的重要临床目标, 而标准化的动物模型是心肌细胞再生医学研究的基础^[1,2]。因为大鼠急性心肌梗死模型与临

床 AMI 病理生理过程有一定的相似性, 模型的存活时间较长、变异性低、可重复性高、相对稳定性好以及价格适宜、易于饲养等优点突出, 是模型制备及研究的良好动物模型来源^[3]。虽然大鼠造模有上述诸多优点, 加之众多科研工作者对造模方法做了

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81173449)。

[作者简介] 曹珏(1992 -), 男, 研究生, 专业: 中医心血管病。

[通讯作者] 姚魁武, E-mail: yaokuiwu@126.com

大量的研究与探讨,但在实际制作过程中依然存在如下问题:大鼠本身的个体差异明显,存在手术过程中不耐受的现象;手术者的水平参差不齐,对大鼠的处理流程存在差异,相应地导致制备时间增加,造成手术者精力及体能的消耗随之增加,难以保证造模操作的连贯完整。以上因素都会导致大鼠的存活率及造模成功率下降。所以将其用于心血管事件及心肌细胞再生医学的机制的研究依旧有很大的挑战和难度。该文通过近年来对大鼠 AMI 模型建立的总结和制备过程重点环节的研究探讨,为标准化 AMI 大鼠模型的制备方法提供切实可信的改进方案,提高模型的生存率和造模成功率,降低制备过程的难度提供参考。

1 关于是否建立人工气道选择

过去认为呼吸支持可以提高实验模型的生存率,经典的 Jones^[4]法造模是在大鼠自主呼吸条件下为其佩戴呼吸面罩,连通动物呼吸机持续正压通气为大鼠提供呼吸支持。之后国内外众多的科研学者也在对 Jones 法进行改良,很多造模方法中也经常把动物呼吸机作为实验必备的仪器之一;王学文等^[2]、杨文慧等^[5]选用经口直视插管接通动物呼吸机为 AMI 大鼠模型支持呼吸,在确定大鼠呼吸频率与呼吸机一致后,对呼吸机进行设定:容量控制模式,呼吸频率为每分钟 50~75 次,吸呼比为 1:1,潮气量为 10~15 mL/250 g 体重;刘宇等^[6]、赵传艳等^[7]采用在气管第 2、3 或 4、5 软骨环处切开,进行深度 1.0 cm 插管并接通动物呼吸机的方式支持呼吸;Ilayaraja 等^[8]采用两种插管方案:第一种为在大鼠颈部提供光源,在光源下经口插管;第二种为在颈部正中做出 5 mm 的切口,并在立体显微镜注视下将管针插入气管内,两种方案均需接通呼吸机,设定潮气量为小鼠体重(g)的 3 倍 + 155 μ L,设定频率每分钟 120 次。但在实际制备过程中对呼吸机的参数设定需要消耗时间,如选用无创的呼吸面罩通气,死腔样通气效应^[7]明显,可能导致大鼠体内 CO₂ 蓄积,而且操作过程中无法监测气道内压力,为调节气道内压力以防止气道压过高造成的肺损伤带来困难;而在改良的方法中如大鼠进行有创气管插管,不论是经口直视插管还是气管切开插管,即便是熟练的操作者,成功建立有创通气所需时间仍在 10 min 以上,难度很大。同时在大鼠颈部周围进行有创操作的创伤很大,1 次插管失败后反复插

管易造成喉头水肿,难度的提升增加了实验过程所需时间,同样延长了麻醉时间,这很大程度上是增加了大鼠模型的死亡率。而且购置呼吸机和相关器械也增加了科研成本。从而有部分学者将目光转向非人工通气条件下^[9,10]制备大鼠 AMI 模型。在摒弃动物呼吸机、大鼠完全自主呼吸的条件下,模型的生存率依然没有下降。李贻奎等^[10]、闫奎坡等^[11]按照是否在动物呼吸机条件下制备的 AMI 模型进行分组比较,发现实验动物生存率及造模成功率未见明显差异。而在非人工通气条件下最突出的优势在于简化实验过程,缩短手术过程所需时间,加快模型制作速度,显著提高造模效率;同时相比于气管插管这一有创操作,降低了大鼠呼吸道的损伤程度,保护其机体生理结构以利于其术后呼吸功能恢复和生存;且降低了大鼠的应激反应,也免去在拔管后清除呼吸道分泌物及进行缝合气道的操作。

2 冠状动脉结扎手术方式的选择

结扎冠状动脉是制备 AMI 动物模型最主要的方法, Jones 法中对大鼠心脏左冠状动脉(left coronary artery, LCA)有详细的描述。结扎 LCA 使其闭塞,造成心肌缺血,与临床上心肌缺血及心肌梗时实际发病过程有相似之处。此方法能保证结扎位置和深度固定,控制心肌缺血的程度以增加造模成功率,以便日后进行心电图检测和组织染色检查等指标的测定。目前制备大鼠 AMI 模型存在死亡率高,操作难度大,模型质量难以保证,制备方法掌握起来比较困难等实际问题。手术操作失败的原因主要是手术过程长,结扎位置过高导致恶性心律失常^[12]发生。参照国内学者的方法^[2,10],在非人工通气条件下于胸骨左缘第 4、5 肋间隙皮肤处剪开切口,用止血钳沿胸骨左缘第 4 肋间穿入胸腔,钝性分离胸大肌和前锯肌,剥离心包,充分暴露术野,并轻压胸廓挤出心脏;于左心耳下缘 2 mm 处用 0 号手术线结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD),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^[13],结扎后立即将心脏放回,迅速排出胸腔内气体,对合、捏紧并缝合皮肤。该方法使得心脏挤出时心尖上翘,肺自然被推到一边,减少因手术操作对肺造成的损伤^[14]。手术过程的创口较小,对大鼠胸部的解剖结构影响较小,可使其结构功能迅速

恢复,便于开胸取材。Gao 等^[15]对大鼠在非人工通气条件下的冠脉结扎及传统呼吸机模式下开胸结扎进行对比,结果发现操作时间上前者平均(1.22 ± 0.05) min,后者则平均(23.2 ± 0.6) min,操作过程的时间因为未建立人工气道而缩短,使大鼠的组织器官暴露于外界的时间缩短;术中大鼠死亡率前者为 3%,后者为 15.9%;心律失常的发生率在前者中明显低于后者;前者在炎症指标的检测中依然占有优势,在术后 24 h 及 7 d 的两次检测下,肿瘤坏死因子(TNF- α)及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)在前者血液中含量显著低于后者;在造模后 28 d 前者的生存率也较后者高近 20%;同时 LAD 结扎的位置可以满足 AMI 模型标准。手术过程的简化及较小的切口可以减轻手术对大鼠机体的损伤,提高其生存率及造模成功率。手术者掌握此方法的关键的是熟悉大鼠心脏的解剖和冠脉的走行,快速准确定位并结扎 LAD,相信经过不断对解剖基础的夯实和实际操作的重复杂,熟练掌握操作技术并不困难。

3 麻醉方式的选择

动物实验中对实验动物麻醉是很重要的环节,科研人员对麻醉是否了解对于制备动物模型具有非常大的影响。模型制作过程当中经常可以遇到麻醉过浅而使手术过程中断,或者整个手术过程较长,麻醉过深造成模型的死亡的情况。理想的麻醉既要保证动物在可耐受的条件下完成手术操作,又要使其在手术后尽快苏醒以降低死亡率。目前国内的麻醉剂研究中,汪新亮等^[16]把水合氯醛、氯胺酮、丙泊酚进行对比研究,发现麻醉起效时间由快到慢依次为氯胺酮、丙泊酚、水合氯醛,麻醉维持时间由短到长依次为水合氯醛、丙泊酚、氯胺酮;麻醉致死量由高到低依次为氯胺酮、丙泊酚、水合氯醛;麻醉剂量安全线比较中水合氯醛较丙泊酚和氯胺酮高将近 10 倍。李少春等^[17]对不同浓度水合氯醛对老年及青年大鼠的麻醉效果进行比较,结果发现不同年龄的大鼠对水合氯醛敏感程度不同:老年大鼠较正常剂量低的剂量才能既能保证理想的麻醉效果,又可降低死亡率;在不同浓度的水合氯醛对大鼠麻醉效果比较中,达到深度麻醉所需时间低浓度组短于高浓度组,大鼠苏醒或出现反应低浓度组快于高浓度组。在大鼠 AMI 造模过程中,对麻醉剂选用要求尽量安全、有效、廉价,通常把水合氯醛作

为造模的麻醉剂,但依然要注意的是大鼠的年龄、体重在麻醉剂用量上的区分,并且要与科研人员的自身情况结合考虑。国外研究证实^[18,19],水合氯醛即便是以极低的浓度(36 mg/mL)用于大鼠麻醉也会导致大鼠出现多发性肝坏死、腹膜炎及全身毒性,从而引起模型质量下降。在手术操作时间过长的情况下,达到良好的麻醉效果增加麻醉剂用量,势必会增加动物死亡的风险。所以对科研人员和手术者来说,优化手术设计、简化手术操作也很重要。前文提到的手术方法的优化可以保证手术过程时间缩短,从而减少麻醉剂用量,降低对动物的影响和死亡率。而关于哪种麻醉药物和哪种剂量最适合的问题还存有争议,需结合具体的实验因素来决定,关于这方面的问题还有待进一步研究考证。

4 检测指标的探讨

关于大鼠 AMI 模型制作完成后选取何种检测方法以及选用何种检测指标来判定模型制备成功与否是一个值得探讨的问题。在实验中经常被用于检测的方法包括心电图、血清生物标志物及超声心动图,每一种方法都有其重要的诊断意义,但又有其不足的方面。心电图作为一种判定 AMI 形成的方法,因其操作简便易行,记录方便而被广泛应用于实验中。将大鼠 LAD 结扎后主要造成左心室前壁缺血,何涛等^[20]通过观察记录结扎后大鼠肢、胸导联心电图发现 J 点偏移在 I、aVL、V2、V5 导联抬高,T 波振幅的幅值在 I、aVL 导联增大,基本可以明确 AMI 大鼠的梗死部位是左心室,且梗死程度并未因观察时间的不同而有所变化。心电图是判断 AMI 的重要方法,但是问题局限在普通心电图很难对 AMI 的位置及范围进行精确的定位与评价,如心肌梗死区域较小导联的连接部位出现偏移时易出现假阴性结果,Bonilha 等^[21]在研究中指出,坏死性 Q 波形成大于 1 mm 在大面积 AMI 大鼠和小面积 AMI 大鼠中存在率相当(92%,96%),Q 波的深度与小面积 AMI 相关性无从体现,同时心电图波形的记录易受外界因素干扰导致信息不准确。血清生物标志物在诊断 AMI 时有愈发重要的参考价值,灵敏度高、特异性强的标志物是研究者最希望发现并使用的。目前常用来检测的 AMI 相关性的标志物包括心型脂肪酸结合蛋白(heart-type fatty acid binding protein, H-FABP)、血清同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)与心肌肌钙蛋白 T(cardiac

tropoin T, cTn-T), 标志物的检测同样存在时间窗的问题, 国内学者^[22-24]的研究表明, 对大鼠结扎 LAD 后, H-FABP 在血清中的含量 1 h 已经升高, 3 h 达到高峰, 9 h 依然可以维持; 而血清 HCY 的含量 1 h 有升高趋势, 3 h 达到高峰, 且一直维持到术后 12 h; cTn-T 在血清中的含量 3 h 开始升高, 6 h 达到高峰, 且一直到术后 7 d 持续存在。以上三种标志物均能对 AMI 进行早期判断, 其中对 H-FABP 的研究中还发现, 其在血清中的含量与 AMI 程度呈正相关性; cTn-T 为心肌细胞所特有, 心肌特异性强, 为临床最新诊断 AMI 阳性的最重要指标之一; 还有研究^[25]认为 HCY 可以用于评估 AMI 的预后。但问题在于这些高敏感性和高特异性的研究指标对 AMI 的梗死程度进行准确的定量分析十分有限, 对时间窗的把握也有一定的要求, 通常将多种标志物进行结合分析更有价值。随着影像学技术的发展, 超声心动图 (ultrasound cardiogram, UCG) 在动态观察心脏结构、心脏顺应性及心功能等方面发挥了许多不可替代的作用, 同时在监测模型的时效性方面有着不可比拟的优势, 也利于纵向观察心肌梗后心室重塑的动态变化, 为当前临床分析和动物实验研究提供了可靠的参考价值。Benavides-Vallve 等^[26]在研究中得到左室收缩和舒张状态下的面积变化分数 (fractional area change, FAC) 可用于 AMI 的评价, 变化分数下降即可证明 AMI, 并且在 7 d 后 FAC 基本保持稳定。黄颖等^[27], 胡珍等^[28], 林蔚等^[29]研究表明 AMI 主要影响的心功能指标为收缩末期左室内径 (left ventricular end systolic diameter, LVESD)、收缩末期左室容积 (left ventricular end systolic volume, LVESV)、射血分数 (ejection fraction, EF)、短轴缩短率 (fractional shortening, FS) 及每搏输出量 (stroke volume, SV) 明显下降, 因而判定 AMI 急性期对心脏的收缩功能影响较大, 对舒张功能无显著影响; 同时通过能良好反映心肌做功的 Tei 指数的变化幅度也可进行对左室功能的判断与评价。目前在基础研究中 UCG 评价心功能的最佳指标存疑, 关于其标准的制定所进行的相关研究不多; 此外技术本身也存在着一定的限制性, 仍存在进一步探讨和研究的空间。因此对大鼠 AMI 模型从诸如电生理、酶学、形态及功能等多角度、多方面的考察仍然十分必要, 通过技术的更新及科学工作者相关认知水平的提升, 更多有价值的信息会被发现和研究。

5 总结与展望

标准化的 AMI 动物模型是研究心血管事件和心肌细胞再生医学机制的基础, 当前的研究进展中可以看到, 模型的制备过程有简单化的趋势。非人工通气条件下手术者摆脱了呼吸机的限制, 节省了制备模型的时间, 节约物力和财力成本, 同样降低了手术者制作水平的门槛。缩短手术操作时间对于保证手术者状态和动物状态的稳定较为有利。麻醉剂用量也因整体手术过程时间缩短而减少, 对动物的影响和死亡率降低有显著的作用。在检测方面, B 超检测方法的使用, 极大的推进了对心梗模型的评价方式, 尤其在无创、定量、动态等方面有显著的优势。该模型的制备在近年来取得明显进展, 有诸多方面的提高, 但是现有的制备方法、麻醉药物的选择、检测指标等方面仍有待进一步探索, 这也是一代代科研工作者所不断追求的动力源泉。

参考文献:

- [1] Kim JH, Hong SJ, Park CY, et al. Intramyocardial adipose-derived stem cell transplantation increases pericardial fat with recovery of myocardial function after acute myocardial infarction [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0158067.
- [2] 王学文, 徐善慧, 张宁坤, 等. 改良冠脉结扎法提高大鼠心梗模型存活率方法探讨 [J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(11): 931-934.
- [3] 张伟, 许静, 汤小江, 等. 大鼠急性心肌梗死模型建立的影响因素 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2016, 37(2): 209-214.
- [4] Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction: A method of coronary occlusion in small animals [J]. Ann Surg, 1954, 140(5): 675-682.
- [5] 杨文慧, 郭涛, 杨莉, 等. 大鼠急性心肌梗死模型的建立 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 11(21): 6019-6021.
- [6] 刘宇, 杨娟, 韦婷, 等. 改良冠脉结扎法大鼠心肌缺血模型的制备 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 202-205.
- [7] 赵传艳, 王昕. 制备心肌梗死大鼠模型方法的改进 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(18): 2886-2891.
- [8] Muthuramu I, Lox M, Jacobs F, et al. Permanent ligation of the left anterior descending coronary artery in mice: a model of post-myocardial infarction remodelling and heart failure [J]. J Vis Exp, 2014, (94): e52206.
- [9] 魏峰, 张静, 韩克, 等. 非人工通气下大鼠急性心肌梗死模型的建立 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2010, 31(6): 699-702.
- [10] 李贻奎, 赵乐, 何萍, 等. 提高结扎冠状动脉在体大鼠心肌梗死模型制作速度和质量的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(7): 948-950.

- [11] 闫奎坡,朱翠玲,孙彦琴,等. 两种冠状动脉结扎法制作大鼠急性心肌梗死模型的比较[J]. 国际心血管病杂志,2016,43(2):107-109.
- [12] 王勇,高大中,殷跃辉,等. 大鼠心肌梗死模型建立方法选择及心电图表现[J]. 中国实验动物学报,2011,19:525-529.
- [13] 侯予龙,郭伟,杨志健,等. 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[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(10):1469-1473.
- [14] 陈学娟,范金茹,廖建萍,等. 冠脉结扎法大鼠心肌梗死模型的改进[J]. 中国中医急症,2014,23(10):1806-1807.
- [15] Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse[J]. Circ Res,2010,107:1445-1453.
- [16] 汪新亮,刘彤云. 三种常用动物实验麻醉药对小白鼠麻醉效果比较分析[J]. 医学信息,2015,28(19):56-57.
- [17] 李少春,马丽娜,李峰杰,等. 不同浓度水合氯醛对大鼠的麻醉作用比较[J]. 中国药业,2014,23(19):22-23.
- [18] Hüske C, Sander SE, Hamam M, et al. Towards optimized anesthesia protocols for stereotactic surgery in rats: Analgesic, stress and general health effects of injectable anesthetics. A comparison of a recommended complete reversal anesthesia with traditional chloral hydrate monoanesthesia[J]. Brain Res,2016,1642:364-375.
- [19] Zhang J, Grindstaff RD, Thai SF, et al. Chloral hydrate decreases gap junction communication in rat liver epithelial cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2011,27(3):207-216.
- [20] 何涛,张小华,罗园柳. 开胸制备大鼠心肌梗死模型操作过程中同步肢胸导联心电图变化[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(15):1235-1238.
- [21] Bonilha AM, Saraiva RM, Kanashiro RM, et al. A routine electrocardiogram cannot be used to determine the size of myocardial infarction in the rat[J]. Braz J Med Biol Res. 2005,38(4):615-619.
- [22] 李峰杰,段昌令,张金艳,等. 心型脂肪酸结合蛋白与大鼠心肌损伤的相关性及其动态变化规律[J]. 中国药业,2013,22(19):14-16.
- [23] 李峰杰,张金艳,李贻奎. HCY 与大鼠心肌损伤相关性及其动态变化规律[J]. 世界中西医结合杂志,2013,8(8):775-777.
- [24] 李贻奎,李峰杰,张萍,等. 大鼠心肌梗死模型心肌钙蛋白 T 动态变化规律研究[J]. 中国药理学通报,2012,28(10):1356-1359.
- [25] 黄永存,于玲,王艳萍,等. 急性心肌梗溶栓治疗后同型半胱氨酸水平及预后的观察[J]. 临床药物经济学,2013,11(2):112-114.
- [26] Benavides-Valle C, Corbacho D, Iglesias-Garcia O, et al. New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction[J]. PLoS One. 2012,7(7): e41691.
- [27] 黄颖,李贻奎,崔海峰,等. 高频率超声影像在急性心肌梗死大鼠心功能评价中的应用[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(8):676-679.
- [28] 胡珍,陈景瑞,魏静,等. 冠状动脉结扎制备大鼠心肌梗死模型及评价实验研究[J]. 天津中医药,2016,33(2):90-95.
- [29] 林蔚,孟凡玲,赵静,等. 超声心动图对大鼠急性心肌梗死的评价作用[J]. 中国超声医学杂志,2012,28(1):9-12.

[收稿日期] 2017-02-27

专家问答

问:活体成像的最新进展

答:最新的活体成像技术是可以获得实时定量的影像,比如进行实时的药物动力学分析。目前随着 CCD 等级的提升,采集足够信号所需的时间越来越短,几乎已经可以做到实时动态。这样的新技术可以促使人们从以往做得较多的肿瘤学实验转向神经学研究,比如,今年全国要开启的“脑科学计划”;另外就是可以进行清醒动物实验,比如阿茨海默症、帕金森综合症这些动物模型,以往都是在大鼠被麻醉的状态下进行信号采集,但其实麻醉因素会造成很大的实验差异,如果能够在大鼠清醒状态下开展实验,效果和意义都会好很多,这类实验需求也会越来越多。

(感谢第四军医大学 师长宏 教授和冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 王志宇 先生的解答)