

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.32.024

套线技术制备小鼠心肌缺血/再灌注损伤模型*

贾中申, 蒋智, 李安洁, 吴玥婷, 韦方[△]

(贵州医科大学附属医院心内科, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 提高小鼠心肌缺血再灌注损伤(I/R)模型的手术速度和可靠性。**方法** 比较3种模型技术的手术时间和小鼠存活率,检测术后白细胞计数和血清IL-6水平评估炎症反应,用TTC/Evans blue染色评估梗死面积,用压力导管检测左心室舒张末压和压力变化速率评估心功能。传统技术在气管插管呼吸机辅助通气支持下开胸结扎、松开左冠状动脉(LCA);新型技术用异氟烷吸入麻醉,经胸壁挤出心脏活结结扎LCA,抽开活结松开LCA;套线技术同样经胸壁挤出心脏,但用方结同时结扎LCA及1根2-0尼龙线,之后抽出该尼龙线松开LCA。**结果** 与传统技术比较,新型技术和套线技术总手术时间明显缩短($P < 0.01$),血白细胞计数和血清IL-6水平降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),小鼠存活率提高($P < 0.05$);与新型技术比较,套线技术简化手术操作并缩短总手术时间($P < 0.01$)。3组小鼠心肌梗死面积和心功能差异无统计学意义($P > 0.05$),但套线组和传统组的变异系数低于快速组。**结论** 套线技术降低手术难度,较新型技术进一步缩短手术时间并提高了小鼠I/R模型的稳定性。

[关键词] 心肌梗死;心肌缺血;心肌再灌注损伤;动物模型;小鼠,近交C57BL

[中图分类号] R-331

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)32-4546-04

Preparation of myocardial ischemia/reperfusion injury model by overlapping line in mice*

Jia Zhongshen, Jiang Zhi, Li Anjie, Wu Yueting, Wei Fang[△]

(Department of Cardiology, the Affiliated People's Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To improve the operation speed and reliability of the myocardial ischemia/reperfusion injury (I/R) model in mice. **Methods** The operative time and the survival rate of the three models were compared. The postoperative leukocyte count and serum IL-6 level were detected to evaluate the inflammatory response. The infarct size was assessed by TTC/Evans blue staining. The left ventricular end diastolic pressure and the pressure change rate were measured by a pressure catheter for the evaluation of cardiac function. In traditional method, open chest surgery was performed to ligate and loose the left coronary artery (LCA) under the assistance of intubation and ventilation. In novel method, isoflurane was used for anesthesia, and then heart was squeezed out of the chest to ligate and loose LCA with a slipknot. In overlapping line method, the heart was also squeezed out, but a square knot was performed to ligate LCA and a 2-0 nylon together, and then the nylon thread was drew out to loose LCA. **Results** Compared with traditional method, the novel method and overlapping line method had significant short operation time ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), less white blood cell count and serum IL-6 concentration ($P < 0.05$) and higher mice survival rate ($P < 0.01$); compared with novel method, the overlapping line method further simplified the reperfusion procedure and decreased total procedure time ($P < 0.01$). There was no significant difference in cardiac infarct size and cardiac function by using the three methods ($P > 0.05$), but the overlapping line method had less coefficient of variation compared to novel method. **Conclusion** Compared with the novel method, the overlapping line method reduces the operation difficulty, shortens the operation time and improves the stability of I/R model.

[Key words] myocardial infarction; myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; animal model; mice, inbred C57BL

急性心肌梗死是威胁我国人民健康的重要疾病^[1]。急诊再灌注治疗可有效减少心肌梗死面积^[2],但再灌注后缺血心肌的损伤反而可能进一步加重,即心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, I/R)^[3]。如何防治I/R保护缺血心肌已成为急性心肌梗死治疗中亟待解决的问题^[4]。深入理解I/R发病机制,积极寻找治疗靶点并设计相应药物对进一步改善急性心肌梗死患者的预后具有重要意义^[5],而I/R动物模型的成功建立是基础研究的基础^[6]。小鼠在基因水平与人类具有高度同源性^[7],易饲养,繁殖快,饲养费用低,个体差异小,是基础研究中重要的疾病模型动物^[8]。传统技术制作小鼠I/R模型需在气管插管呼吸机辅助通气下开胸结扎左冠状动脉(LCA),待缺血时间后松开LCA再灌注^[9]。该手术步骤繁琐、耗时,模型死亡率高。近年来报道了新型小鼠I/R手术技术,在面罩吸入麻醉下将心脏挤出胸腔,用活结结扎LCA,再松开活结再灌注^[10]。活结结扎是该技术的关键步骤,但活结

的松紧程度完全依赖术者经验和手感;如活结过紧可能无法松开再灌注;如活结过松可能提前松开再灌注。如术者训练不足,可导致原始数据离散度过大,对解释实验结果造成极大困扰,不能准确揭示干预措施对I/R的影响。本研究用套线法克服了新型技术的难点,使再灌注时间点更加可靠,手术时间进一步缩短,模型结果更加稳定。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 清洁级雄性C57/B6小鼠,8~12周龄,体重25g左右,来源于成都达硕实验动物有限公司[SCXK(川)2015-2016],依托贵州医科大学附属医院临床研究中心[SCXK(黔)2012-0001],严格遵守实验动物3R原则。160只小鼠分为对照组10只,传统组、新型组和套线组各50只。

1.2 主要仪器和试剂 小动物麻醉机、小动物呼吸机(瑞沃德,中国深圳),异氟烷(玉研生物,中国上海),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)试剂(Sigma,美国),Evans blue (Sigma,美

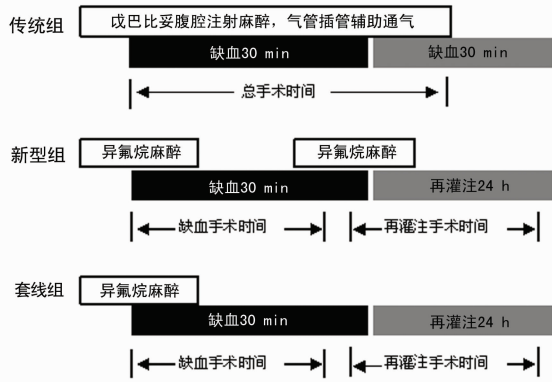
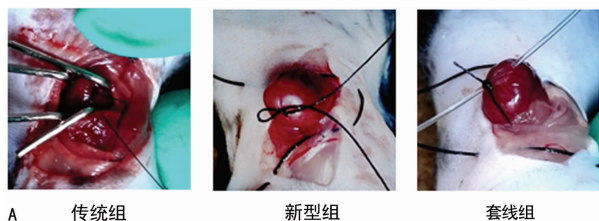
* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金资助项目(81460050);贵州省科技厅科学技术基金[黔科合J字(2014)2112号]。作者简介:贾中申(1988—),住院医师,硕士,主要从事心肌保护方面的研究。△ 通信作者,E-mail:weifanggzsy@qq.com。

国),6-0 圆针丝线(Sharpoin,美国),4-0 三角针编织线、2-0 尼龙线(金环,中国上海),戊巴比妥(普博斯生物,中国北京),小鼠白细胞介素-6(IL-6) ELISA 试剂盒(博士德,中国武汉),0.9 F 光纤压力导管、换能器(FISO,加拿大),多通道生理信号记录仪、LabScribe 软件(iWorx,美国)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠 I/R 模型手术方法 (1)对照组:不进行手术操作。(2)传统组:用 1%戊巴比妥钠溶液(0.055 mL/10 g)腹腔注射麻醉,经口气管插管连接小动物呼吸机辅助通气(100 次/分,潮气量 0.5 mL,吸呼比 2:1)^[11],沿胸骨左缘 4、5 肋间逐层剪开胸壁分离心包暴露 LCA,在距肺动脉根部下缘 2 mm 用活结结扎 LCA,持续呼吸机辅助通气 30 min 后抽松活结^[12]。(3)新型组:用 2%异氟烷吸入麻醉,沿剑突至左侧腋窝将皮肤剪开,钝性分离胸大肌、胸小肌,用血管钳从第 4~5 肋间心尖搏动最强处插入胸腔,撑开肋间隙将心脏挤出,于肺动脉根部下方 2 mm 用活结结扎 LCA,将心脏送回胸腔,活结线头留在胸腔外,荷包缝合皮肤,30 min 后再次麻醉后抽松活结^[10,13]。(4)套线组:同新型组,但挤出心脏后用方结将 LCA 和 1 根 5 cm 的 2-0 尼龙线一起结扎,尼龙线两端留于胸腔外,荷包缝合皮肤,30 min 后直接抽出尼龙线。见图 1A。

1.3.2 手术计时 从麻醉开始至结扎 LCA 后完成缝合皮肤为缺血手术时间,再次麻醉至松开 LCA 后完成缝合皮肤为再灌注手术时间,总手术时间=缺血手术时间+再灌注手术时间(图 1B)。



A:3 种技术结扎 LCA 的关键手术步骤;B:手术步骤及计时方案示意图

图 1 手术方法及研究设计

1.3.3 TTC/Evans blue 染色 小鼠麻醉后于原位再次结扎 LCA,经升主动脉灌注 2% Evans blue 溶液,剪下心脏于-20℃冰冻 15 min,沿长轴间隔 1 mm 切片,PBS 洗净后浸入 37℃ 2% TTC 溶液 20 min,4%多聚甲醛溶液固定 10 min,压平、拍照。用 image pro plus 软件分别计算各切片的左心室面积(LV)、AAR 面积和 IA 面积。非蓝染区域为危险区(AAR),白色区域为梗死区(IA)。梗死面积(IA/AAR%)=IA 总和/AAR 总和×100%危险区面积(AAR/LV%)=AAR 总和/LV 总和×100%^[14]。

1.3.4 白细胞计数 用 1 mL 注射器(含 100 U 肝素)穿刺心

脏采血放入 EP 管中^[15],用 Beckman AcT 5 diff 全自动血细胞分析仪测定白细胞计数。

1.3.5 血清 IL-6 测定 小鼠血样 4℃ 8 000 r/min 离心 10 min,取上层血清用 ELISA 法测定 IL-6 浓度,按说明书操作(博士德,中国)。

1.3.6 心脏血流动力学检测 连接压力导管、换能器、多通道生理信号记录仪和电脑,设置采样频率 5 000 Hz,校零。小鼠用异氟烷吸入麻醉,将 0.9 F 光纤压力导管经右颈动脉送入左心室记录压力波形,用 LabScribe 计算心率(HR)、左心室舒张末压(LVEDP)及左心室压力变化最大速率(dp/dtmax)和最小速率(dp/dtmin)^[16]。

1.4 统计学处理 结果用 SPSS17.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素生存分析用 Kaplan-Meier 法,组间比较用 Logrank 法,两组数据比较用独立样本 t 检验,3 组以上数据比较用单因素方差分析,组间比较用 Bonferroni 检验,方差不齐用 Tamhane's t^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同粗细尼龙线比较 测试了 4-0、3-0 和 2-0 尼龙线,用方结结扎 LCA 和尼龙线后立即抽出尼龙线,24 h 后行心脏 TTC/Evans blue 染色(图 2)。4-0 和 3-0 尼龙线抽出后方结仍可继续阻断 LCA 使心肌持续缺血坏死变薄(白色区域),而 2-0 尼龙线抽出后未见明显坏死区,LCA 可恢复有效血流使心肌存活(红色区域),在方结内至少预留 0.07~0.09 mm²(2-0 线直径为 0.300~0.339 mm)才能在抽线后使 LCA 恢复有效血液灌注。

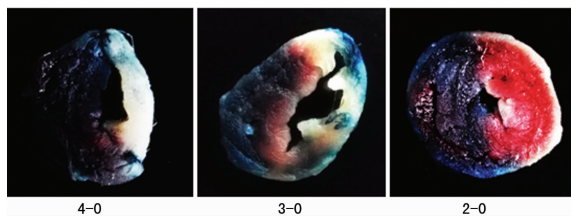
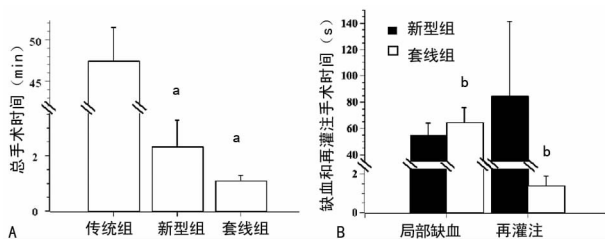


图 2 套线技术应用不同规格尼龙线对再灌注的影响

2.2 手术时间比较 因无需气管插管、逐层开胸、逐层缝合等手术操作,新型组和套线组总手术时间较传统组缩短($P < 0.01$),见图 3A。与新型组比较,尽管套线组缺血手术时间增加($P < 0.01$),但再灌注手术操作简化,再灌注手术时间缩短($P < 0.01$),总手术时间缩短($P < 0.01$),见图 3B。



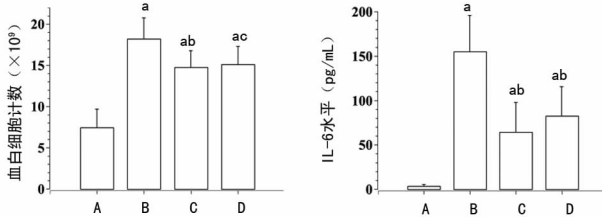
a: $P < 0.01$,与传统组比较;b: $P < 0.01$,与新型组比较

图 3 3 种技术手术时间

2.3 炎症反应比较 与对照组比较,3 组 I/R 小鼠术后 24 h 血白细胞计数和血浆 IL-6 水平均升高($P < 0.01$),见图 4。但与传统组比较,新型组和套线组小鼠术后血白细胞计数和血浆 IL-6 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$)。新型组和套线组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

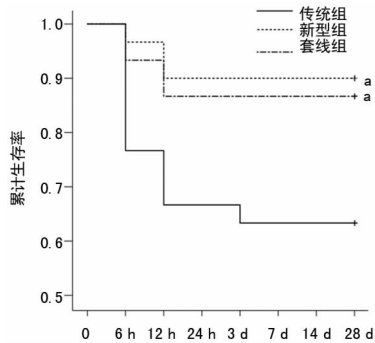
2.4 存活率比较 术后 24 h 新型组小鼠存活率高于传统组($P < 0.05$),套线组存活率亦较传统组有升高趋势($P = 0.065$);术后 28 d 新型组及套线组小鼠存活率较传统组高

($P < 0.05$), 见图 5。术后 24 h 至 28 d 新型组与套线组存活率差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: 对照组; B: 传统组; C: 新型组; D: 套线组; a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, 与传统组比较

图 4 3 种技术对炎性反应的影响



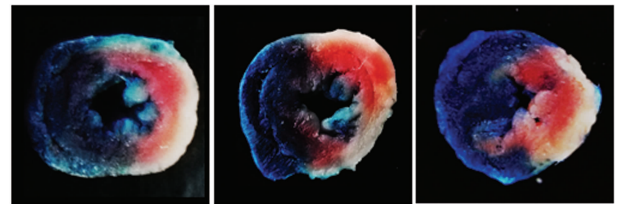
a: $P < 0.05$, 与传统组小鼠术后 28 d 累计生存率比较

图 5 3 种技术对生存率的影响

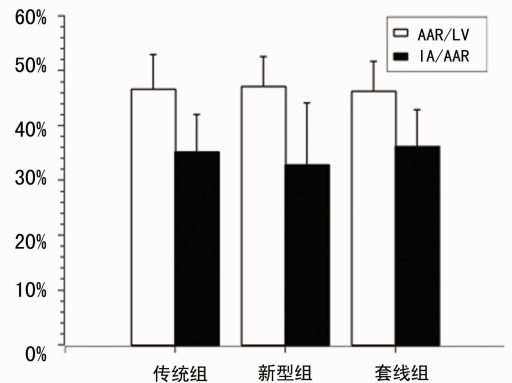
2.5 梗死面积比较 术后 24 h 心脏 TTC/evans blue 染色(图 6A)显示 3 组 I/R 小鼠心脏危险区面积差异不明显(图 6B), 提示结扎 LCA 引起的缺血面积一致, 梗死面积差异不明显(图 6B)。但传统组和套线组梗死面积变异系数(CV)明显小于新

型组(19.4% vs. 34.7%; 18.3% vs. 34.7%)。

2.6 血流动力学比较 术后 1 周 4 组小鼠 HR 差异无统计学意义, 提示麻醉深度一致。与对照组小鼠比较, 3 组 I/R 小鼠 LVEDP 升高, dP/dtmax 和 dP/dtmin 绝对值降低, 提示心功能受损, 组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。与新型组比较, 传统组和套线组心功能指标 CV 更小(表 1), 传统技术和套线技术制备模型的心功能离散度小。



A 传统组 新型组 套线组



A: 术后 24 h 小鼠心脏 TTC/evans blue 染色; B: 危险区面积和梗死面积

图 6 3 种技术对梗死面积的影响

表 1 3 种技术对心脏血流动力学的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	HR(次/分)	CV(%)	LVEDP (mm Hg)	CV(%)	dP/dtmax (mm Hg/s)	CV(%)	dP/dtmin (mm Hg/s)	CV(%)
对照组	494 ± 57	11.6	3.4 ± 1.6	46.4	7 909 ± 528	6.7	7 787 ± 521	6.7
传统组	472 ± 54	11.5	7.8 ± 3.2 ^a	41.5	5 891 ± 513 ^a	8.7	5 780 ± 497 ^a	8.6
新型组	463 ± 52	11.3	8.7 ± 4.5 ^b	51.1	6 016 ± 987 ^a	16.4	5 920 ± 981 ^a	16.6
套线组	477 ± 43	9.0	7.7 ± 3.2 ^a	41.7	5 878 ± 472 ^a	8.0	5 773 ± 479 ^a	8.3

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨 论

套线技术创伤小、存活率高, 再灌注手术操作较新型技术简便可靠, 总手术时间进一步缩短, 制备的 I/R 小鼠梗死面积和心功能指标更加稳定。

本研究用术后 24 h 血白细胞计数和血浆 IL-6 浓度评估术后炎症反应^[17], 研究结果提示新型技术和套线技术较传统技术显著减低炎症反应。除 I/R 外, 麻醉方式^[18], 手术创伤, 气管插管呼吸机介导气道损伤^[19], 术后感染、出血、疼痛^[20], 均可引起严重全身炎症反应。传统技术腹腔注射麻醉通常难以控制麻醉深度和时间, 需气管插管呼吸机辅助通气支持, 逐层剪开皮肤、肌肉、胸壁, 损伤左侧胸膜, 长时间暴露胸腔内脏器, 感染、出血风险高。而新型技术和套线技术采用吸入麻醉, 易控制麻醉深度和时间, 无需气管插管, 保留胸肌, 直接从肋间破入心包腔挤出心脏, 不损伤胸膜, 脏器暴露时间短, 出血、感染风险低。

传统技术和新型技术均用 Sharpoint 6-0 丝线活结结扎 LCA。笔者的经验是传统技术小鼠持续麻醉开胸, 能保证活结结扎紧 LCA, 但新型技术将心脏送回胸腔后缝合皮肤, 活结随心

脏搏动与邻近脏器摩擦可能松开, 小鼠醒后活动可能拉扯留于体外线头使活结松开, 影响 I/R 可靠程度。套线技术用方结同时结扎 LCA 和 1 根 2-0 尼龙线阻断 LCA 血流, 30 min 后从体外抽出 2-0 尼龙线使 LCA 再灌注。与新型技术比较有如下优势: (1) 方结牢固不松脱, LCA 血流阻断可靠; (2) 尼龙线表面光滑易抽出, LCA 再灌注可靠; (3) 套入、抽出尼龙线技术简单, 活结技术需大量训练积累经验和手感。本研究显示套线技术的梗死面积和心功能指标较新型技术离散度更小, 数据更加集中, 有利于减少研究样本量, 节省时间和经费。

本研究均为单人手术计时, 尽管增加套入尼龙线操作延长小鼠心肌缺血手术时间, 但术者稍加练习均能在 30 s 内完成胸腔外心脏手术, 手术即刻死亡率与新型技术比较无显著差异。如有助手配合在结扎 LCA 时送入尼龙线, 缺血手术时间与新型技术相当。另一方面, 新型技术再灌注手术操作需再次麻醉小鼠, 抽松活结同样依赖手感, 部分模型需剪开皮肤线结操作方能松开活结, 但套线技术无需麻醉小鼠可直接抽出尼龙线, 大大简化再灌注手术步骤, 总手术时间较新型技术缩短近 50%。

总之, 本文套线法改良小鼠 I/R 模型技术和现有造模技术

相比快速高效,存活率高,技术难度降低,造模结果稳定,值得推广应用,尤其应用珍贵小鼠和昂贵实验耗材的基础研究更具优势。

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J]. 中国循环杂志,2015,30(7):617-622.
- [2] 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组. 中国经皮冠状动脉介入治疗指南(2016)[J]. 中华心血管病杂志,2016,44(5):382-400.
- [3] Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting myocardial reperfusion injury—the search continues[J]. *New Engl J Med*, 2015,373(11):1073-1075.
- [4] 叶明,吴辉. 心肌缺血再灌注损伤的研究新进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2016,18(4):434-437.
- [5] Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015,65(14):1454-1471.
- [6] 孟增慧,杨承志,田爱炬,等. 小鼠心肌缺血再灌注损伤模型制备及心肌梗死面积评价方法学比较[J]. 中国心血管杂志,2014,19(2):123-127.
- [7] 方福德. 实验动物学的前沿领域—小鼠基因组的研究[J]. 中国比较医学杂志,2001,11(1):5-8.
- [8] Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the american heart association[J]. *Circ Res*, 2012,111(1):131-150.
- [9] 范谦,王跃民,马新亮,等. 小鼠心肌缺血/再灌注模型制备方法的改良[J]. 心脏杂志,2004,16(6):584-584.
- [10] 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(12):1445-1453.

- [11] 刘建,范慧敏,汪进益,等. 小鼠心梗模型的建立与无创评价[J]. 中国实验动物学报,2010,18(3):196-198.
- [12] Hu X, Wu R, Jiang Z, et al. Leptin signaling is required for augmented therapeutic properties of mesenchymal stem cells conferred by hypoxia preconditioning[J]. *Stem Cells*, 2014,32(10):2702-2713.
- [13] 石洪涛,王颖,张俊蒙,等. 一种快捷小鼠心肌梗死模型的建立[J]. 中国动脉硬化杂志,2012,20(3):212-216.
- [14] 蒋智,贾中申,吴玥婷,等. EdCC 通过 MEK-ERK 信号通路减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(2):221-227.
- [15] 吴晓晴,郝晨霞. 160 只小鼠心脏采血的操作体会[J]. 实验动物科学. 2004,21(1):53-54.
- [16] 张健发,马依彤,杨毅宁,等. 小鼠心肌缺血后适应模型的建立及其相关影响因素[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(10):576-580.
- [17] 张静静,嵇富海,孟晓文,等. 右美托咪定对大鼠心肌缺血再灌注时炎症反应的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2016,36(5):633-634.
- [18] 刘秋晨,张驰,施春花,等. 不同麻醉药对小鼠缺氧耐受性的影响及机制研究[J]. 中国医药科学,2013,3(18):29-31.
- [19] 武前枝,倪琛琛,张志红. 机械通气对小鼠肺损伤的初步研究[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(7):805-808.
- [20] 钟琦,陈畅,张宗泽,等. 内皮型一氧化氮合酶在机械通气相关性肺损伤小鼠炎症反应中的作用:基因敲除法[J]. 中华麻醉学杂志,2015,35(1):40-43.

(收稿日期:2017-04-08 修回日期:2017-06-17)

(上接第 4545 页)

- [2] Novara G, Artibani W, Barber MD, et al. Updated systematic and meta-analysis of the comparative data on colposuspensions, pubovaginal slings, and midurethral tapes in the surgical treatment of female stress urinary incontinence[J]. *Eur Urol*, 2010,58(2):218-238.
- [3] Delorme E. Transobturator urethral suspension: miniinvasive procedure in the treatment of stress urinary incontinence in women[J]. *Prog Urol*, 2001,11(6):1306-1313.
- [4] Naumann G, Hagemeyer T, Zachmann S, et al. Long-term outcomes of the ajust adjustable single-incision sling for the treatment of stress urinary incontinence[J]. *Int Urogynecol J*, 2013,24(2):231-239.
- [5] 王巍,朱兰,郎景和,等. 阴道单切口可调节 Ajust™ 吊带治疗女性压力性尿失禁中期随访研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2015,31(8):741-744.
- [6] Natale F, Dati S, Penna CL, et al. Single incision sling (Ajust™) for the treatment of female stress urinary incontinence: 2-year follow-up [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014,182(1):48-52.
- [7] 陈慧兴,吕坚伟,冷静,等. TVT 与 TVT-O 治疗女性压力性尿失禁的疗效和并发症比较[J]. 上海交通大学学报(医学版),2012,32(4):412-415.

- [8] Petros PE, Richardson PA. Midurethral Tissue Fixation System sling, a 'micromethod' for cure of stress incontinence, preliminary report[J]. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 2005,45(5):372-375.
- [9] Grigoriadis C, Bakas P, Derpapas A, et al. Tension-free vaginal tape obturator versus Ajust adjustable single incision sling procedure in women with urodynamic stress urinary incontinence[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013,170(2):563-566.
- [10] 苗娅莉,孙秀丽,杨欣,等. 阴道单切口可调节无张力尿道中段悬吊术治疗压力性尿失禁近期疗效评价[J]. 中国妇产科临床杂志,2013,14(5):410-412.
- [11] Naumann G, Hagemeyer T, Zachmann S, et al. Long-term outcomes of times of the Ajust Adjustable Single-Incision Sling for the treatment of stress urinary incontinence [J]. *Int Urogynecol J*, 2013,24(2):231-239.
- [12] Nilsson CG, Palva K, Rezapour M, et al. Eleven years prospective follow-up of the tension-free vaginal tape procedure for treatment of stress urinary incontinence[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2008,19(8):1043-1047.

(收稿日期:2017-04-15 修回日期:2017-08-21)