

冠状动脉结扎法致大鼠心肌纤维化模型的建立方法探讨

龙雨, 邓娟娟, 曹楚珩, 罗尧岳

(湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208)

[摘要] 目的:探讨采用冠状动脉结扎法建立大鼠心肌纤维化(Myocardial Fibrosis, MF)模型的方法,以期为临床防治MF提供实验基础。方法:术前进行包括对实验动物、药物、仪器和器械的准备;手术操作过程按照麻醉、消毒、连接呼吸机、心电图监测、开胸、结扎、关胸、脱机、术后处理的步骤;手术过程要求无菌操作,保护实验动物肺脏,观察其呼吸及恢复自主呼吸时间,注意结扎手法,预防感染。造模是否成功可通过HE染色观察心脏组织病理学变化、Masson染色显微镜下进行左室心肌胶原容积分数检测、心脏组织HYP、TGF- β 1含量检测来确定。结论:规范冠状动脉结扎法建立大鼠MF模型的步骤,完善每个细节,对提高实验大鼠存活率及造模成功率具有重要的意义。

[关键词] 心肌纤维化;大鼠模型;冠状动脉结扎法;实验方法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.06.077

A discussion on the method for establishing a rat model of myocardial fibrosis using coronary artery ligation

LONG Yu, DENG Juan-juan, CAO Chu-heng, LUO Yao-yue

(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the method for establishing a rat model of myocardial fibrosis (MF) using coronary artery ligation, and to provide an experimental basis for clinical prevention and treatment of MF. Methods: Preoperative preparations included experimental animals, drugs, instruments, and devices. The surgery followed the steps of anesthesia, disinfection, connection with a respirator, ECG monitoring, thoracotomy, ligation, closure of the thoracic cavity, ventilator weaning, and postoperative treatment. The surgery required aseptic operation and protection of the lungs. Respiration and time to the recovery of spontaneous breathing were observed. Ligation was performed carefully, and related measures were adopted to prevent infection. In order to determine whether the model was established successfully, HE staining was used to observe cardiac histopathological changes, and Masson staining was used to measure collagen volume fraction in the left ventricle and the content of hydroxyproline (HYP) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in cardiac tissue under a microscope. Conclusion: Standardization of the steps for establishing a rat model of MF using coronary artery ligation and perfection of each detail help to improve the survival rate of experimental rats and the success rate of model establishment.

Key words: myocardial fibrosis; rat model; coronary artery ligation; experimental method

心肌纤维化(MF)是指由各种原因导致心肌间质心肌成纤维细胞(CFs)增殖、细胞外基质沉积、细胞死亡以及血管再生。病理状态下CFs通过增殖、分泌细胞外基质蛋白等引起心脏纤维胶原积聚、胶原组成成分改变、空间结构排列紊乱,从而导致心肌纤维化。建立大鼠MF模型的方法很多,如:压力超负荷诱导的MF模型(自发性高血压模型、肾血管性模型、腹主动脉部分缩窄模型、外源性诱导模型)、免疫损伤诱导的MF模型(心肌自身抗原诱导模型、回输激活的自身免疫细胞诱导模型)、缺血诱导的MF模型(冠状动脉结扎模型、药物诱导模型、自发性坏死模型)、高糖诱导的

MF模型等^[1]。目前较为常用的即为冠状动脉结扎法致缺血诱导的MF模型。规范冠状动脉结扎法建立大鼠MF模型的步骤,完善每个细节,对提高大鼠存活率及造模成功率有着重要的意义。

1 术前准备

1.1 动物 SPF级SD大鼠,雄性,体质量250~270g。术前大鼠需适应性喂养3~5d,如无异常方可进行实验,术前1d禁食、禁水。

1.2 药物 10%的水合氯醛:现配现用,避光;注射用青霉素钠:溶于灭菌注射用水;盐酸利多卡因注射液;75%乙醇;

基金项目:湖南省教育厅科学研究重点项目(编号:15A144);教育部博士点科研基金(编号:20134323120007)

第一作者:龙雨,女,2015级硕士研究生,研究方向:心血管疾病的中西医结合防治

通讯作者:罗尧岳,男,医学博士,硕士研究生导师,研究方向:心血管疾病的中西医结合防治, E-mail:943629127@qq.com

络合碘。

1.3 仪器 小动物呼吸机、生物机能实验系统。

1.4 器械 眼科剪(弯剪、直剪各1个);显微持针器2个;小有齿弯镊、直镊各2个;小号弯钳2个;小止血钳2个;眼睑撑开器1个;三角形缝针1包(1/2弧度 6×14);黑色医用缝合丝线1盒(3-0);带针无损伤缝合线1盒(6-0);注射器若干(1mL、2.5mL、5mL、10mL、20mL);无菌纱布、无菌棉签若干。术前器械需75%乙醇浸泡30min,无菌纱布擦干后紫外线下照射4~6h。

2 操作步骤

2.1 麻醉 大鼠称重后,10%水合氯醛3.5mL/kg进行腹腔麻醉,固定于手术板上。

2.2 消毒 颈部正中及左侧胸部剪毛、备皮,常规络合碘消毒;

2.3 连接呼吸机 眼科直剪于颈部正中胸骨上缘1cm处做一纵行切口,长度约1cm,逐层钝性分离后暴露气管,于第2、3软骨环处横开一小口,行气管插管,深度约为1cm,连接呼吸机,调节呼吸频率为90次/min,呼吸比为1:2,潮气量约为30mL左右,观察大鼠胸廓起伏,与呼吸机一致并稳定后即可行下一步骤。

2.4 心电图监测 分别将生物机能实验系统的黑色、红色、白色电极插入大鼠的右后肢、左后肢及右前肢内侧皮下,观察心电图是否正常及稳定。

2.5 开胸 用眼科直剪沿左侧胸前肌肉走向由胸骨下段左侧缘向左腋下方向剪开皮肤,逐层分离皮下结缔组织和肌肉,在左侧心脏搏动最明显处(约3、4肋间),用小弯镊钝性分离肋间肌直至进入胸腔,在开口处放入眼睑撑开器,将3、4肋向两侧钝性拉开并固定,暴露心脏(力量不宜过大,以免损伤肋骨)。

2.6 结扎 用2把小弯镊扯破心包膜,调整心脏暴露位置,结扎前于心脏表面滴1~2滴盐酸利多卡因注射液预防心律失常,左手用小弯镊将左心耳轻轻拨开,肺动脉圆锥与左心耳交界处的下方2mm处^[2],即左前降支近端处,右手持迅速以带针6-0无损伤缝合线由左心耳下方2mm处进针,肺动脉圆锥处出针结扎血管,进针深度约1mm,宽度约2mm。结扎后观察左心室局部染色变暗,心脏运动减弱,心电图显示Ⅱ导联ST段弓背上抬 >0.1 mv,或T波高尖,即表示结扎成功。

2.7 关胸 修剪3、4肋间肌肉,用3-0医用缝合线经第3肋上缘及第4肋下缘缝合肋间肌,缝合后立即用20mL注射器抽出胸腔内气体以恢复胸腔负压,然后逐层缝合肌肉及皮肤,缝合后伤口表面涂擦青霉素预防感染。

2.8 脱机 拔除气管插管,以6-0无损伤缝合线闭合气管,大鼠恢复自主呼吸后,3-0医用缝合线逐层缝合颈部肌肉及皮肤,缝合后伤口表面涂擦青霉素预防感染。

2.9 术后处理 术后保暖,注意卫生清洁,连续青霉素肌肉注射7d,20万U/d,预防感染。

3 讨 论

3.1 结果鉴定 造模是否成功可通过HE染色观察心脏组织病理学变化、Masson染色显微镜下进行左室心肌胶原容积分数检测、心脏组织羟脯氨酸含量检测、心脏组织转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)表达检测等来确定。有研究表明大鼠冠状动脉结扎后心肌见胶原生成增多,心肌组织TGF- $\beta 1$ 表达显著增高,第42天达到高峰,在第49天及第56天心肌纤维化减轻,因此可将大鼠心肌纤维化实验研究的周期拟定为42d^[3]。

3.2 注意事项 细节决定成败,实验过程中每一个细节的疏忽均有可能导致实验的失败,虽然大鼠生命力较为顽强,但是在冠状动脉结扎法建立大鼠MF模型的过程中仍有很多细节需要操作者多加注意,如果任何一个环节操作不规范都可能导致大鼠的死亡。

3.2.1 无菌操作 术前除无菌缝合线、无菌纱布、无菌棉签等之外,所有手术器械均需进行彻底消毒灭菌,术中注意保护无菌区,分离肋间肌前可用75%乙醇清洗手术器械,去除血液及毛发。以上均可减少术后感染几率。

3.2.2 保护肺脏 术中保护肺脏是影响大鼠存活率的重中之重。分离肋间肌时虽是钝性分离,但仍要注意肺脏的位置,以免弯镊夹伤肺叶,放置眼睑撑开器、结扎、缝合肋间肌以及注射器抽气恢复胸腔内负压时同样要注意保护肺脏。若术中肺叶阻挡视野可用棉签轻轻拨开后再行操作,缝合肋间肌时可用小弯钳提起肋骨进行缝合。

3.2.3 观察呼吸 术中应随时注意大鼠胸廓起伏的频率及深度,以免呼吸机堵塞导致大鼠死亡,可以说呼吸机是否通畅是大鼠是否成活的关键。

3.2.4 结扎 结扎时进针不宜过深,以免穿透心肌导致出血。另外,结扎时应注意力度的大小,若结扎过紧可能导致血管完全闭塞或勒断心肌,影响大鼠存活率,若结扎过松则无法有效促进纤维化的形成。建议结扎的第1针稍松,第2针可适当加大力度。

3.2.5 恢复自主呼吸 因整个造模过程大概需时30~40min,时间较长,所以脱机后大鼠可能无法恢复自主呼吸,可进行胸外按压以及反复脱机试验,直至大鼠自主呼吸恢复。如仍不能恢复,则可延长呼吸机辅助呼吸时间。

3.2.6 预防感染 术中除注意无菌操作外,可反复用青霉素涂擦伤口,术后需坚持使用抗生素肌肉注射预防感染。另外,术后需注意及时更换垫料,7d内可每天更换1次,此做法可有效降低大鼠术后感染风险。

参考文献

- [1] 李萌,吕仕超,吴美芳,等. 不同原因诱导的心肌纤维化动物模型的建立[J]. 医学研究生学报,2014,27(3):330-334.
- [2] 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(6):202-205.
- [3] 李娟,丁永芳,葛海燕,等. 冠状动脉结扎致心肌纤维化大鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报,2012,20(5):1-4.

(收稿日期:2017-11-08)