

利用定量加压充气球囊制备大鼠心肌缺血再灌注损伤模型

许士进, 何淑芳, 金世云, 胡军, 张野

摘要 雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 20 只: 假手术组 (SHAM 组)、球囊缺血再灌注组 (SI/R 组)、经典缺血再灌注组 (I/R 组)。3 组均在冠状动脉左前降支下穿线, SHAM 组仅将未充气的球囊固定于穿线处; SI/R 组固定球囊后, 通过加压泵对球囊充气 and 放气建立缺血再灌注损伤模型; I/R 组采用传统的造模方法。记录血流动力学和心电图的特异性改变, 再灌注 2 h 后取心脏进行 TTC 染色测心肌梗死面积。结果显示, SI/R 和 I/R 组均可造成显著心肌缺血, 两组死亡率和心肌梗死体积 (IS/ARR) 的差异无统计学意义。

关键词 动物模型; 心脏; 缺血再灌注; 充气; 球囊

中图分类号 R 654.2; R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1180-04

2015-04-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81471145)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院麻醉科, 合肥 230601

作者简介: 许士进, 男, 硕士研究生;

张野, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangye_hassan@sina.com

心肌缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是指心肌组织在经历较长时间缺血后, 当恢复血流灌注时反而使心肌缺血后损伤加重的病理生理现象^[1]。心肌 IRI 的防治及机制研究已成为目前心血管领域的热点问题。大鼠以其冠状动脉侧支循环少、心肌坏死出现早、重复性、稳定性好, 成为制作心肌 IRI 模型的首选实验动物^[2]。目前制备大鼠心肌 IRI 的经典方法为推管法^[3], 但反复推管操作易损伤心肌和冠状血管, 且无法满足核磁共振 (MRI) 成像^[4]、心肌灌注断层显像^[5]等新技术在进行动物心肌 IRI 研究时对实时、远程操控的要求。该研究利用定量加压充气球囊制备心肌 IRI 模型, 并可通过与延长管连接实施实时远程操作, 模型成功率高、损伤小、操作方便。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄健康雄性清洁级 SD 大

- [3] Lutz M B, Kukutsch N, Ogilvie A L, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow [J]. J Immunol Methods, 1999, 223(1): 77-92.
- [4] 李闻颖, 邓锋, 王豫蓉, 等. 不同浓度粒巨噬细胞集落刺激因子在未成熟树突状细胞培养中的效果研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(4): 424-7.
- [5] 王晓婧, 梅晓冬. 不同浓度粒巨噬细胞集落刺激因子及白介素-4 对树突状细胞体外诱导培养的影响 [J]. 中国临床保健杂志, 2014, 17(2): 157-9.

- [6] 张安莉, 仇超, 徐建青. 淋巴细胞膜分子 CD160 结构与功能的研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(4): 380-4.
- [7] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. Annual Review of Immunology, 2009, 27: 165-97.
- [8] 邓琼, 胡何节, 方征东, 等. CD83⁺ 成熟树突状细胞和 CD11b⁺ 耐受性树突状细胞在人颈动脉粥样硬化病变中的分布 [J]. 中国临床保健杂志, 2014, 17(1): 45-7.
- [9] Steinman R M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity [J]. Annu Rev Immunol, 1991, 9: 271-96.

A culture system for dendritic cells induced from murine bone marrow *in vitro*

Liu Zhenming, Hu Hejie, Fang Zhengdong, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract To establish a culture system for dendritic cells (DCs) induced from murine bone marrow *in vitro*. Compared with mature DCs, fewer spines were observed in immature DCs under microscopy. The expressions of cell surface molecules in immature DCs were significantly lower than those of mature DCs. MLR indicated T cells proliferation capacities of same-reaction ratio in immature DCs were significantly lower than those in mature DCs. The methods of culturing DCs established by us can be used in the future experiment.

Key words mice; dendritic cells; cell culture

鼠 60 只, 200 ~ 300 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。室内温度 20 ~ 25 °C。

1.2 主要试剂 戊巴比妥钠(使用浓度为 3%, 生理盐水溶解, 由安徽医科大学第二附属医院中心实验室提供); 伊文斯兰(批号: 20110909024, 北京绿生源有限公司, 使用浓度 0.25%, 生理盐水溶解); 氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium, TTC, 批号: 129K1867V, 美国 Sigma 公司, 使用浓度为 100 mmol/L, 溶于磷酸盐缓冲液 pH = 7.4)。

1.3 主要仪器 动物呼吸机(ALC-V9 型, 上海奥尔科特生物科技有限公司); 生物机能系统(BL-420S 型, 成都泰盟生物科技有限公司)。

1.4 定量加压充气球囊 采用尼龙(PA 12) 材料, 通过料管拉伸、球囊成型、前端封头等技术制成直径 4 mm、长度 15 mm 的可扩充球囊, 通过与球囊连接的延长管利用定量加压泵给球囊加压充气(球囊委托江苏常美医疗器械有限公司定制, 定量加压泵由安徽医科大学第二附属医院介入科提供)。

1.5 方法

1.5.1 实验分组与处理 将雄性 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 20 只: 假手术组(SHAM 组)、球囊缺血再灌注组(SI/R 组)、经典缺血再灌注组(I/R 组)。大鼠用 3% 的戊巴比妥 2 ml/kg 腹腔注射, 麻醉后仰卧固定于鼠板上, 连接生物机能实验系统, 记录心电图。气管切开, 置入气管导管, 连接小动物呼吸机, 潮气量 3 ml/100 g, 频率 60 ~ 80 次/min。颈内动脉穿刺置管, 连接压力传感器, 测动脉血压。股静脉穿刺置管, 用微量泵进行补液[乳酸钠林格氏液 0.1 ml/(kg · h)]。于胸骨左侧约 0.5 cm, 第 3、4 肋间处打开胸腔, 无齿镊撕破心包膜, 使心脏充分暴露。在左心耳与肺动脉圆锥之间找到与左冠状动脉伴行的左心大静脉, 在左心耳下方 2 mm 处以 5-0 无损伤缝合针穿线, 进针深度为 1.0 ~ 1.5 mm, 宽度为 2 ~ 3 mm。SHAM 组穿线后, 用结扎线将未充气的球囊松紧适宜的固定于穿线处, 且不影响冠脉血流, 整个实验过程中不对球囊进行充气。SI/R 组穿线后, 用结扎线将未充气的球囊松紧适宜的固定于穿线处, 稳定 20 min 后, 用与球囊相连的定量加压泵对球囊进行快速充气, 使球囊压力迅速达到并固定于 200 kPa, 此时扩张的球囊压迫冠状动脉, 阻断动脉血流, 造成缺血; 缺血 30 min 后, 通过加压泵迅速抽尽球囊气体, 恢复冠脉血流。I/R 组在稳定 20 min 后, 用推管法结扎冠状动脉, 即将结扎线的两端通过一硬塑管, 用血管钳向下推动硬塑管压向冠状动脉, 夹紧

结扎线阻断冠脉血流; 缺血 30 min 后, 松开结扎线实现再灌注。

1.5.2 血流动力学检测 分别记录各组在稳定 20 min 后(基础值)、缺血 30 min 后和再灌注 2 h 后的心率(heart rate, HR) 和平均动脉压(mean arterial pressure, MAP), 计算 HR 和 MAP 乘积(rate pressure product, RPP)。

1.5.3 心肌梗死面积检测 再灌注 2 h 后, 取出心脏, 剔除非心脏组织, 置于 Langendorff 上用 K-H 液灌注 5 min(37 °C), 冲洗出心肌内残留血液, 重新结扎左冠状动脉, 并从主动脉注入 0.25% Evan 蓝溶液, 后置于 -80 °C 冰箱速冻 1 ~ 2 h。将冰冻的心脏放入心肌切槽, 由心尖到结扎冠脉的线结处平切 2 mm 厚的心肌 5 ~ 6 片。置于 1% TTC 溶液中, 37 °C (pH = 7.4) 温孵 15 min, 取出置于 10% 福尔马林室温固定 12 h。染色后缺血危险区呈红色, 梗死区为白色, 用图像分析软件(Imaging J 1.38e) 计算左心室体积(left ventricle, LV)、右心室体积(right ventricle, RV)、缺血危险区体积(area at risk, AAR) 和梗死区体积(infarct size, IS), 再算出 LV + RV, 用 IS/AAR 表示心肌梗死体积。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 分析; 血流动力学数据采用重复测量资料的方差分析; 死亡率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 死亡率比较 SHAM 组 20 只大鼠均存活, SI/R 组 20 只大鼠中有 1 只大鼠于缺血时因心律失常死亡, 2 只大鼠于再灌注时因心力衰竭死亡; I/R 组 20 只大鼠中有 2 只大鼠于缺血时因心律失常死亡, 2 只大鼠于再灌注时因心力衰竭死亡。SI/R 组和 I/R 组相比死亡率差异无统计学意义(0.15 vs 0.20, $\chi^2 = 0.173$, $P > 0.05$)。

2.2 心肌血供和心电图 ST 段变化情况 心脏直视下, SHAM 组手术前后心肌血供无明显变化; SI/R 组和 I/R 组在冠状动脉左前降支结扎后, 左室前壁紫绀, 再灌注后紫绀消失。SHAM 组手术前后心电图无明显变化; SI/R 组和 I/R 组在冠状动脉左前降支结扎后 QRS 波群增宽, ST 段均较结扎前明显抬高。见图 1。且 SI/R 组和 I/R 组均在缺血后 10 min 左右及再灌注即刻出现明显的心律失常, 以一过性室性早搏、室性心动过速为主。

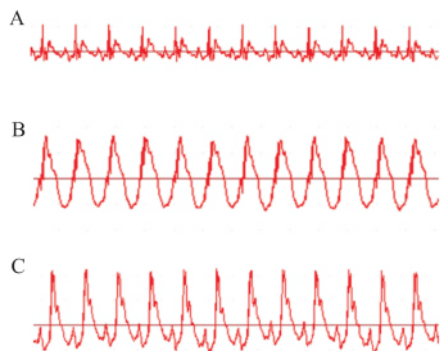


图1 各组缺血后心电图变化
A: SHAM 组; B: SI/R 组; C: I/R 组

2.3 血流动力学指标 与基础值相比, SI/R 组在缺血 30 min 和再灌注 2 h 时的 MAP 和 RPP 以及 I/R 组在缺血 30 min 和再灌注 2 h 时的 MAP 和 RPP 均显著降低 ($F = 21.540, 10.488, 35.975, 16.534$, $P < 0.01$); 与 SHAM 组相比, SI/R 组在缺血 30 min 和再灌注 2 h 时的 MAP 和 RPP 以及 I/R 组在缺血 30 min 和再灌注 2 h 时的 MAP 和 RPP 也显著降低 ($F = 21.148, 10.810, 15.449, 7.949$, $P < 0.01$)。见表 1。

表1 血流动力学指标 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

项目	SHAM 组	SI/R 组	I/R 组
HR(次/min)			
基础值	369 ± 30	365 ± 29	361 ± 29
缺血 30 min	360 ± 31	350 ± 32	347 ± 26
再灌注 2 h	356 ± 28	337 ± 29	340 ± 23
MAP(kPa)			
基础值	12.786 ± 1.33	12.369 ± 1.064	12.768 ± 1.064
缺血 30 min	12.369 ± 1.197	8.645 ± 0.931 ***	9.443 ± 1.197 ***
再灌注 2 h	11.837 ± 0.532	9.842 ± 0.798 ***	10.374 ± 0.931 ***
RPP[kPa/(min · 1000)]			
基础值	4.655 ± 0.798	4.522 ± 0.665	4.655 ± 0.798
缺血 30 min	4.522 ± 0.798	2.926 ± 0.532 ***	3.325 ± 0.665 ***
再灌注 2 h	4.256 ± 0.532	3.325 ± 0.532 ***	3.458 ± 0.532 ***

与基础值比较: * $P < 0.01$; 与 SHAM 组比较: ** $P < 0.01$

2.4 心肌梗死体积测定 各组间比较, LV + RV、AAR 体积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SHAM 组未见梗死。与 I/R 组相比, SI/R 组的 IS 体积 (cm^3) (0.26 ± 0.05 vs 0.27 ± 0.04 , $P > 0.05$) 和 IS/AAR (0.491 ± 0.083 vs 0.506 ± 0.091 , $P > 0.05$) 比较差异均无统计学意义。见图 2。

3 讨论

冠状动脉左前降支是左心供血的最主要血管,

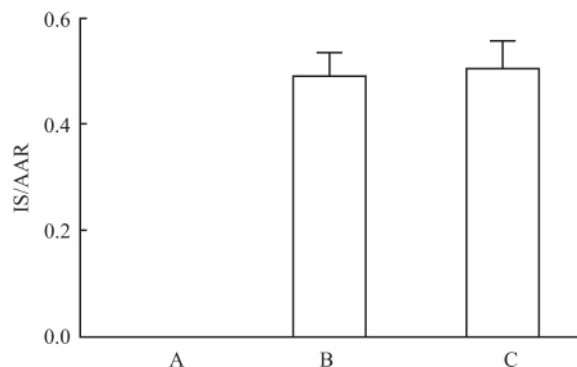
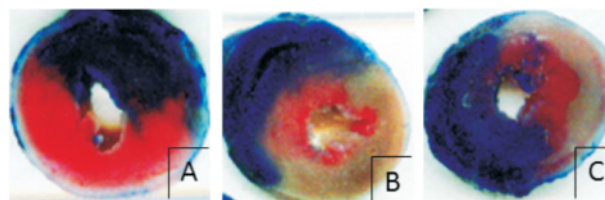


图2 各组心肌梗死体积

A: SHAM 组; B: SI/R 组; C: I/R 组; 红色为缺血危险区心肌组织; 白色为梗死心肌组织

结扎后可导致室间隔、左室前壁心肌缺血、梗死, 因此成为研究心肌 IRI 最常用的血管。随着对心肌 IRI 研究的不断深入, 以及新技术的应用, 对心肌 IRI 的造模方法也提出了新的要求。

以往的大鼠心肌 IRI 的造模方法主要可归纳为压管法^[6]和推管法^[3]两大类, 然而以上两种方法在“压管”和“推管”时, 所用的硅胶管和硬塑管均与心脏表面接触, 大鼠心脏搏动时, 管与心脏摩擦, 易损伤心脏和血管。目前缺血预处理^[7]以及后处理^[8]对抗 IRI 的机制研究已成为心肌保护研究的重点和热点。然而传统方法在进行预处理和后处理时均需在胸腔内反复进行结扎与再灌注的操作, 不仅费时费事, 影响模型复制的成功率, 而且会加重对心脏及冠脉的损伤。本实验采用定量加压充气球囊复制大鼠心肌 IRI 模型, 充气后可见大鼠心肌左室前壁迅速紫绀, 心电图 ST 段明显抬高; 再灌注后紫绀迅速消失, 出现明显的心律失常。两者的死亡率及心肌梗死面积差异无统计学意义。以上结果表明球囊法是一种稳定可靠的复制大鼠心肌 IRI 的方法, 且和传统的压管法及推管法相比, 操作简便, 对心脏及冠脉损伤小, 通过与球囊相连的定量加压泵可实现球囊的快速充气和放气, 有利于进行预处理及后处理等相关操作, 并可固定球囊压力实现实验操作的量化。

近年来, 核磁共振扫描^[9]、心肌灌注断层扫描^[10]等新技术已经越来越多地应用于动物实验的

研究。然而,传统的造模方法已无法适应这些新技术对于 IRI 模型制备过程中实时及远程操控的要求。Pohlmann et al^[9] 利用与肾动、静脉固定在一起的注水球囊制备肾脏 IRI 模型,从而获得了肾脏在缺血再灌注过程中的实时功能 MRI 图像。赵秀梅等^[11] 和周汝娟等^[12] 先后成功利用球囊垫扎法制作大鼠心肌 IRI 模型,但实验中使用的球囊均为医用冠状动脉成形术的球囊导管,价格昂贵,或回收使用易致交叉感染;此外,这类球囊内均含有金属标记物,不能用于高磁场环境。本实验使用定制的定量加压充气球囊,制作成本低,质量可靠,可以成功制备大鼠心肌 IRI,适合用于动物实验研究。通过在球囊与加压泵之间添加延长连接管,可以实时、远程实施缺血再灌注或预处理操作,将会满足在普通或 MRI、断层扫描等特殊实验条件下进行动物 IRI 研究的要求。

参考文献

- [1] Yellon D M, Hausenloy D J. Myocardial reperfusion injury [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(11): 1121-35.
- [2] 饶先伟,叶泽兵. 人参皂苷 Rg2 后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *现代医院*, 2013, 13(8): 18-20.
- [3] Zhang Y, Irwin M G, Wong T M. Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart [J]. *Anesthesiology*, 2004, 101(4): 918-23.
- [4] Zhao F, Williams M, Meng X, et al. Pain fMRI in rat cervical spinal cord: an echo planar imaging evaluation of sensitivity of BOLD and blood volume-weighted fMRI [J]. *Neuroimage*, 2009, 44(2): 349-62.
- [5] Mewton N, Rapacchi S, Augeul L, et al. Determination of the myocardial area at risk with pre-versus post-reperfusion imaging techniques in the pig model [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(6): 1247-57.
- [6] 刘付平,姚宏伟,李俊. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进[J]. *安徽医科大学学报*, 2003, 38(3): 234-36.
- [7] Yang X, Cohen M V, Downey J M. Mechanism of cardioprotection by early ischemic preconditioning [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010, 24(3): 225-34.
- [8] Buelna-Chontal M, Guevara-Chávez J G, Silva-Palacios A, et al. Nrf2-regulated antioxidant response is activated by protein kinase C in postconditioned rat hearts [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 74: 145-56.
- [9] Pohlmann A, Hentschel J, Fechner M, et al. High temporal resolution parametric MRI monitoring of the initial ischemia/reperfusion phase in experimental acute kidney injury [J]. *PloS One*, 2013, 8(2): e57411.
- [10] Mahnken A H, Klotz E, Pietsch H, et al. Quantitative whole heart stress perfusion CT imaging as noninvasive assessment of hemodynamics in coronary artery stenosis: preliminary animal experience [J]. *Invest Radiol*, 2010, 45(6): 298-305.
- [11] 赵秀梅,孙胜,刘秀华. 垫扎球囊法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型[J]. *中国微循环*, 2007, 11(3): 206-8.
- [12] 周汝娟,王修珍. 球囊垫扎法实施缺血后适应对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *蚌埠医学院学报*, 2012, 37(8): 880-3.

Establishment of rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury by using a quantitative inflating saccule

Xu Shijin, He Shufang, Jin Shiyun, et al

(Dept of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Adult male SD rats were randomly divided into three groups, 20 rats in each group: Sham operation group (SHAM group), saccule ischemia-reperfusion group (SI/R group), classical ischemia-reperfusion group (I/R group). A 5-0 silk thread was passed around the left anterior descending coronary artery of rat heart in all of the three groups. In SHAM group, the saccule was fixed on the artery without inflation. In SI/R group, the fixed saccule was inflated and then deflated to induce myocardium ischemia and reperfusion by using a pressure pump. In I/R group, the classical method was used to establish the model. Hemodynamic parameters and electrocardiographic changes were recorded during the experiment. Infarct size (IS), as a percentage of the area at risk (AAR), was determined by 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) staining at the end of reperfusion. The results showed regional ischemia was induced in both SI/R and I/R groups, and there was no statistically significant difference between SI/R and I/R groups regarding animal mortality and infarct size (IS/AAR).

Key words animal model; heart; ischemia-reperfusion; inflation; saccule