

·动物模型研究·

大鼠心肌缺血再灌注后心肌梗死面积和无复流面积的动态变化及其相关性的初步研究

张金艳, 李贻奎, 李峰杰, 李少春, 赵 乐, 郝 伟, 翁维良 (中国中医科学院西苑医院实验研究中心, 北京市中药药理重点实验室, 北京 100091)

摘要: **目的** 研究大鼠心肌缺血再灌注后无复流现象中心肌梗死面积和无复流面积的动态变化及其相关性。**方法** 采用健康雄性 Wistar 大鼠, 分两批进行实验。第 1 批实验, 固定再灌注时间为 2 h, 将大鼠随机分为 4 组: ①缺血 2 h 组, ②缺血 3 h 组, ③缺血 4 h 组, ④假手术组。第 2 批实验, 固定缺血时间为 4 h, 大鼠随机分为 6 组: ①再灌注 2 h 组, ②再灌注 4 h 组, ③再灌注 8 h 组, ④再灌注 24 h 组, ⑤再灌注 3 d 组, ⑥假手术组。缺血再灌注组结扎冠状动脉左前降支一定时间后再灌注, 假手术组只穿线不结扎。分别用硫磺素 S 和硝基四氮唑蓝(N-BT)染色评估心肌无复流面积和梗死面积。**结果** 所有缺血再灌注组均出现明显的心肌无复流现象。心肌梗死面积和无复流面积随缺血时间的延长而扩大, 缺血 2 h, 即可见明显的心肌无复流现象, 无复流区与血液灌注区界限明确; 缺血 3 h, 可见明显心肌梗死, 但界限不清; 缺血 4 h 梗死区与未梗死区界限清晰。再灌注 8 h 内, 心肌梗死面积和无复流面积随再灌注时间的延长明显扩大、延展, 无复流面积略大于梗死面积; 再灌注 8 h 后, 心肌梗死的扩展速度进入平台期, 而无复流面积则呈逐渐减少趋势; 再灌注 3 d 后, 心肌梗死和无复流区域基本重合, 二者面积趋于一致。**结论** 在本研究选定的缺血时间和再灌注时间的条件下, 心肌缺血再灌注模型大鼠的心肌无复流发生率是 100%, 可作为心肌无复流模型使用。心肌梗死面积和无复流面积随缺血时间和再灌注时间的延长而扩大, 并均在再灌注 8 h 达峰值; 此后梗死面积基本固定, 而无复流现象出现部分恢复和改善。

关键词: 心肌缺血; 再灌注; 无复流; 无复流面积; 动态变化

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0227-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.029

Dynamic Changes of Myocardial Infarction Area and Non-reflow Area and Their Correlation in Rats Suffering from Myocardial Ischemia and Reperfusion

ZHANG Jinyan, LI Yikui, LI Fengjie, LI Shaochun, ZHAO Le, Haowei, WENG Weiliang (Xiuyan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Beijing 100091, China)

Abstract: **Objective** To investigate the dynamic changes of myocardial infarction area and non-reflow area and their correlation in rats suffering from myocardial ischemia and reperfusion. **Methods** Healthy male Wistar rats were used for 2 independent experiments. In the first experiment, 2-hour reperfusion was fixed, and rats were randomly divided into 4 groups, namely 2-hour myocardial ischemia group, 3-hour myocardial ischemia group, 4-hour myocardial ischemia group, and sham operation group. In the second experiment, 4-hour ischemia was fixed, and rats were randomly divided into 6 groups, namely 2-hour reperfusion group, 4-hour reperfusion group, 8-hour reperfusion group, 24-hour reperfusion group, 3-day reperfusion group, and sham operation group. Myocardial ischemia was induced by

收稿日期: 2013-12-23

作者简介: 张金艳, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理学。Email: jinyanz@163.com。

基金项目: 中国博士后特别资助项目(2012T50202)。

ligation of left anterior descending coronary artery, and the rats were subjected to ischemia for a certain time followed by reperfusion. The rats in the sham operation group did not undergo occlusion of the coronary artery. The myocardial non-reflow area and infarction area were assessed by thioflavin S and nitroterazolium blue chloride, respectively.

Results All the ischemia/reperfusion groups showed significant myocardial non-reflow phenomenon. The myocardial infarction area and no-reflow area extended with ischemic duration. After ischemia for 2 hours, myocardial non-reflow phenomenon was obvious, and the boundary between non-reflow area and blood perfusion area was clear. After ischemia for 3 hours, myocardial infarction was obvious, but the boundary was not clear, and the limit became clear until ischemia lasted for 8 hours. During the reperfusion for 8 hours, myocardial infarction area and non-reflow area extended with the prolongation of reperfusion, and the non-reflow area was slightly larger than the infarction area. After reperfusion for 8 hours, infarct expansion sped into the platform, and non-reflow area gradually reduced. And after reperfusion for 3 days, myocardial infarction area and non-reflow area basically overlapped, and the two areas almost became the same. **Conclusion** After appropriate ischemia time and reperfusion time, the occurrence rate of no reflow is 100 % in myocardial ischemia/reperfusion rat model, and the model can be used as myocardial non-reflow model. The myocardial infarction area and non-reflow area extend with the prolongation of ischemia/reperfusion time, and reach the peak after reperfusion for 8 hours. And then, the infarction area basically becomes steady, and non-reflow area is reduced and improved partly.

Keywords: Myocardial ischemia; Reperfusion; No reflow; Non-reflow area; Dynamic changes

急性经皮冠状动脉介入(PCI)及溶栓治疗已成为急性心肌梗死(AMI)最重要的再灌注治疗方法,其目的是使因血栓堵塞的冠状动脉迅速再通,并实现心肌组织的有效再灌注^[1]。然而大量研究发现^[2-3],冠状动脉再通后,仍然有部分患者的缺血心肌组织不能得到有效灌注,甚至无灌注,表现为心肌微循环水平血流受限,冠状动脉造影显示血流明显减慢、心电图ST段回落不良以及临床持续性胸痛,这一现象被称为无复流。文献报道^[4-5]心肌梗死急诊PCI时无复流的发生率高达15%~30%,且与广泛而严重的心肌损害、进行性的左室扩张以及充血性心力衰竭等不良临床结局密切相关。目前,无复流的发生机制尚不完全清楚,对无复流现象的基础和临床研究也相对较少。本研究应用心肌缺血再灌注大鼠模型,研究无复流现象的发生条件,并进一步探索无复流现象中心肌梗死面积和无复流面积的动态变化及其相关性。

1 材料与方法

1.1 动物 健康Wistar大鼠,雄性,SPF级,体质量200~220 g,北京华阜康科技股份有限公司,许可证编号:SCXK(京)2009-0007。

1.2 药品及试剂 氯化硝基四氮唑蓝(N-BT)、水合氯醛,国药集团化学试剂有限公司,批号分别为F20050421, T20050609; 硫磺素S,美国Sigma公

司,批号:SLBG4212V。

1.3 仪器及设备 DT-2000型电子天平,美国双杰兄弟有限公司; MPIDS-500多媒体彩色病理图像分析系统,北京空海公司。

1.4 模型复制 大鼠按10 mL·kg⁻¹腹腔注射3.5%水合氯醛麻醉,仰卧固定于大鼠板上。在大鼠左侧第4、5肋间切口,打开胸腔,撕开心包,轻压胸廓挤出心脏,于左心耳下2 mm的冠状动脉左前降支下穿线,血管与结扎线之间垫一长约0.5~1 cm的软硅胶管,用0号手术线结扎冠脉,立即将心脏放回胸腔,以动脉夹夹闭切口,假手术动物只穿线不结扎。结扎后2 h、3 h或4 h,剪断硅胶管,实施再灌注2 h、4 h、8 h、24 h或3 d。各组大鼠均于再灌注结束后,自股静脉注射6%硫磺素S 1 mL·kg⁻¹。

1.5 分组 分两批进行实验。第1批实验,固定再灌注时间为2 h,将大鼠分为4组,每组10只:①缺血2 h组,②缺血3 h组,③缺血4 h组,④假手术组。第2批实验,固定缺血时间为4 h,将大鼠分为6组,每组10只:①再灌注2 h组,②再灌注4 h组,③再灌注8 h组,④再灌注24 h组,⑤再灌注3 d组,⑥假手术组。

1.6 指标检测

1.6.1 心肌无复流面积 注射硫磺素S 1 min后立即处死大鼠,取出心脏,用生理盐水冲洗心腔残留的

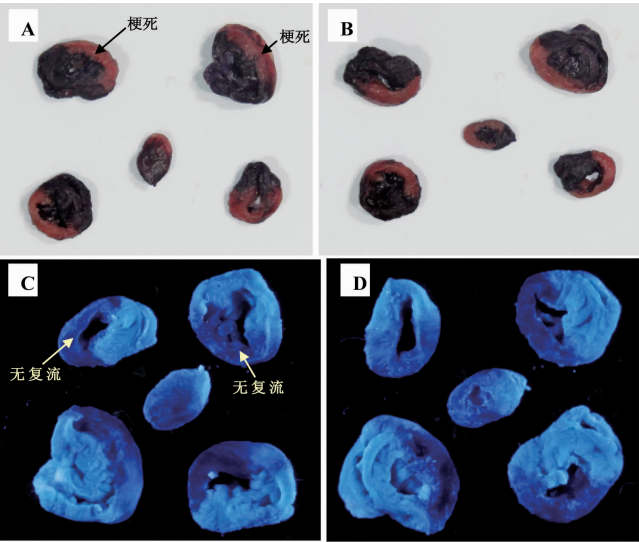
血液，用滤纸吸干多余液体后称质量；自结扎线下平行冠状动脉沟均匀地将心室部分切成等厚 5 片，分别称质量后，将心脏切片置于薄层色谱仪的暗箱中，于 365 nm 波长光源下，观察荧光，数码相机拍照，分别获得 5 片心肌的正、反面图像，用多媒体彩色病理图像分析系统测量每片心肌两侧的无复流区(硫磺素不着色，呈暗黑色)和复流区(硫磺素着色，呈明亮的蓝绿色)，计算无复流区占心室面积和全心面积的百分比。

1.6.2 心肌梗死面积 上述处理结束后，将心脏切片置于 0.2 % N-BT 染液中，常温避光染色 2 ~ 3 min；用扫描仪分别扫描 5 片心肌的正、反面，获得扫描图像，用多媒体彩色病理图像分析系统测量每片心肌两侧的梗死区(N-BT 非染色区，呈灰白色)和非梗死区(N-BT 染色区，呈蓝黑色)面积，计算心室肌总面积、梗塞区总面积以及梗塞区面积占心室面积和全心面积的百分比。

1.7 统计学处理方法 数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间比较采用单因素方差分析，方差齐性用 Student-Newman-Keuls 检验，方差不齐用 Tamhane's T2 检验。显著性水平 $P < 0.05$ 。

2 结果

所有接受缺血 / 再灌注手术大鼠的心肌均出现了明显的无复流现象，见图 1。

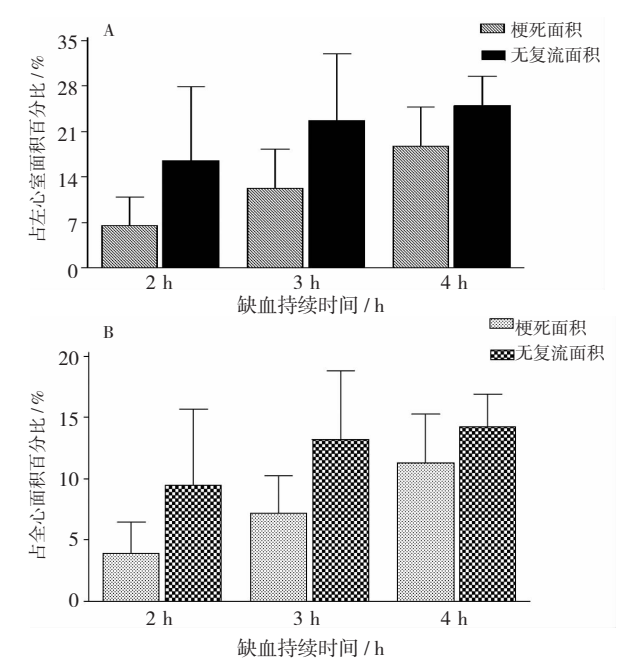


A、B 为 N-BT 染色的心肌切片照片，箭头所示灰白色区域为梗死区，其余区域为未梗死区；C、D 为硫磺素染色的心肌切片照片，箭头所示黑色区域为无复流区，其余亮色区域为血液灌注区。

图 1 大鼠心肌缺血 4 h 再灌注 8 h 后心肌梗死和无复流区域的心肌图片

Figure 1 The myocardial image of rat suffering from a 8-hour-myocardial ischemia and a 4-hour-myocardial reperfusion

第 1 批实验中，固定再灌注时间为 2 h。当缺血时间分别为 2 h、3 h 或 4 h 时，心肌梗死面积和无复流面积均随缺血时间的延长出现明显的扩大、延展趋势。其中，当缺血时间为 2 h 时，即可看见心肌发生明显无复流现象，复流区和血液灌注区界限清晰，但心肌梗死隐约可见，梗死区与未梗死区无明显界限；当缺血时间为 3 h 时，无复流面积增大，出现明显心肌梗死，心肌梗死区与未梗死区界限较缺血 2 h 组明显，但仍然较模糊，非梗死区到梗死区的颜色呈渐变状态；当缺血时间为 4 h 时，无复流面积进一步增大，心肌梗死区与未梗死区界限清晰、明确，见图 2。



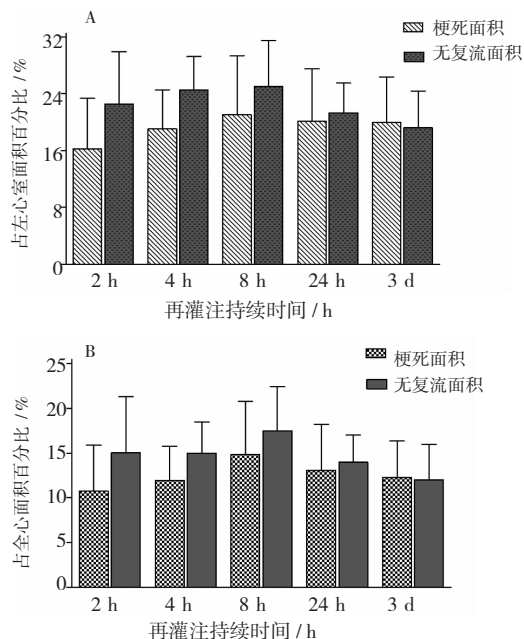
A. 心肌梗死面积和无复流面积占左心室面积的百分比；B. 心肌梗死面积和无复流面积占全面积的百分比。

图 2 大鼠心肌缺血再灌注 2 h 后心肌梗死面积和无复流面积随缺血时间延长的动态变化

Figure 2 Dynamic changes of myocardial infarction area and no-reflow area with the duration of ischemia in rat suffering from different period of myocardial ischemia and a 2-hour-myocardial reperfusion

第 2 批实验中，固定缺血时间为 4 h。再灌注 2~8 h 期间内，心肌梗死面积和无复流面积均随再灌注时间的延长表现出较明显的扩大、延展趋势，同一只动物心肌梗死和无复流区域在很大程度上重叠，但并不完全重合，无复流面积略大于心肌梗死面积；再灌注 8 h 后，心肌梗死面积的扩展速度进入平台期，再灌注 24 h 及 3 d 后的心肌梗死面积与再灌注 8 h 后相比无明显变化；而心肌无复流面积则在再

灌注 8 h 后出现逐渐减少的趋势,提示心肌的无复流症状在再灌注 8 h 后能够部分地自然恢复和改善,见图 3。



A. 心肌梗死面积和无复流面积占左心室面积的百分比; B. 心肌梗死面积和无复流面积占全心面积的百分比

图3 大鼠心肌缺血 4 h 再灌注后心肌梗死面积和无复流面积随再灌注时间延长的动态变化

Figure 3 Dynamic changes of myocardial infarction area and no-reflow area with the duration of reperfusion in rat suffering from a 4-hour-myocardial ischemia and different period of myocardial reperfusion

3 讨论

PCI 术后的心肌组织无复流已成为当今急性心肌梗死再灌注治疗不能实现“心肌有效再灌注”的主要原因和最大障碍,如何防治无复流被认为是提高这类患者手术疗效、改善预后的关键。目前,无复流的发生机制尚未完全明确,对无复流现象的基础研究也相对较少。因此,建立理想的无复流动物模型,并探索无复流在发病过程中的动态变化规律意义重大。

无复流动物模型的制备普遍采用心肌缺血再灌注的方法,但冠脉结扎缺血时间和再灌注时间有多种,例如缺血时间有 30 min^[6]、45 min^[7]、60 min^[8-9]、90 min^[10]、2 h^[11]、3 h^[12]、4 h^[13],再灌注时间有 15 min^[14]、60 min^[15]、90 min^[16]、2 h^[17]、3 h^[18];也未见对模型动物心肌梗死面积和无复流面积的动态变化及二者相关性研究的报道。本研究结果显示,所有缺血再灌注组的大鼠心肌均出现明显无复流现象,

其发生率是 100%,这和人类 PCI 术后无复流现象的发生率为 15%~30%有所不同,同时提示,只要缺血和再灌注时间均合适,心肌缺血再灌注模型即可作为心肌无复流模型使用。此外,心肌无复流面积和梗死面积随缺血时间的延长而扩大、延展,提示缺血时间越长,心肌损害越严重,对于急性心肌梗死病人,抢救速度是至关重要的。研究结果还显示,再灌注 8 h 内,大鼠的心肌梗死面积和无复流面积均随再灌注时间的延长而扩大、延展,同一只动物心肌梗死和无复流区域在很大程度上重叠,但不完全重合,无复流面积略大于梗死面积;再灌注 8 h 后,心肌梗死的扩展速度进入平台期,而无复流面积则开始逐渐减少;再灌注 3 d 后心肌无复流面积和梗死面积大小基本相同。提示再灌注 8 h 内,心肌的损伤是不断发展、恶化的,并存在部分无血液灌注的心肌尚未梗死,而部分心肌梗死的区域可能仍然有血液灌注的情况,因此,心肌无复流和梗死区域面积并不完全重合,且相应面积均呈逐步增大趋势;再灌注 8 h 后,以前濒临死亡的心肌细胞基本全部死亡,心肌梗死面积达到峰值,而无复流现象则随着部分心肌的代偿性血运重建,出现部分恢复和改善,致使再灌注 3 d 后心肌无复流和梗死区域基本重合,相应面积大小基本相同。

参考文献:

- [1] 沈青青,肖文良. 冠状动脉介入术无复流现象的药物治疗进展[J]. 心脏杂志, 2011, 23(3): 403-405.
- [2] Jaffe R, Charron T, Puley G, et al. Microvascular obstruction and the no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention[J]. Circulation, 2008, 117(24): 3152-3156.
- [3] 杨跃进,赵京林,荆志成,等. 中药通心络对猪急性心肌梗死再灌注后无复流的影响[J]. 中华医学杂志, 2005, 185(13): 883-888.
- [4] 张红雨,王佩显,曹艳君. 冠状动脉无复流的防治进展[J]. 临床荟萃, 2010, 25(7): 635-638.
- [5] Zhang XP, Li ZJ, Zhang J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2000, 8: 351-357.
- [6] 吴大盈. 缺血再灌注大鼠心肌微循环障碍中纤维蛋白表达的研究[D]. 武汉:华中科技大学同济医学院附属协和医院, 2010: 5.
- [7] 邵靓. 不同剂量阿托伐他汀改善大鼠炎症相关无复流缺血再灌注大鼠的前向血流的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2011: 13.
- [8] 潘坤颖,刘千萍,周欣,等. 大鼠心肌解剖无复流现象中性粒细胞的浸润和 GDF-15 的动态表达[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(1): 155-157.
- [9] 马清华,张英杰,焦慧. 缬沙坦对大鼠心肌缺血再灌注后无复流的

(下转第 235 页)