



# 大鼠心肌缺血再灌注实验技巧的经验总结

黄婷<sup>1,2</sup>, 李绍旦<sup>2</sup>, 杨明会<sup>2\*</sup>, 刘毅<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国人民解放军总医院, 北京 100853)

**【摘要】** 大鼠心肌缺血再灌注造模是一个极其精细的实验过程, 在动物实验中, 初学者难免会遇到阻碍, 笔者有幸进行了整个实验的操作, 现就本类实验的经验及遇到的一些挫折进行分享。

**【关键词】** 大鼠; 实验经验; 心肌缺血再灌注

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 09-0080-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.09.015

## Experience and skills in the establishment of rat model of myocardial ischemia and reperfusion

HUANG Ting<sup>1,2</sup>, LI Shao-dan<sup>2</sup>, YANG Ming-hui<sup>2\*</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**【Abstract】** The establishment of rat model of myocardial ischemia and reperfusion is a very sophisticated experimental process. During animal experiments, beginners always meet with troubles inevitably. The authors of this paper have conducted a great deal of this type of experiments for years, and intend to share some experience and lessons with colleagues.

**【Key words】** Rats; Experience and lessons during experiments; Myocardial ischemia and reperfusion

《中国心血管病报告 2016》指出, 心血管病占居民疾病死亡构成的 40% 以上, 为我国居民的首位死因。心血管病发病因素日益增多, 已成为重大的公共卫生问题, 防治心血管病刻不容缓<sup>[1]</sup>。有统计表明, 在现在的医学研究中, 动物实验占有重要的地位。心血管疾病的防治研究中, 大鼠缺血再灌注的模型较常见, 笔者有幸进行了此类实验, 并在其造模过程中有着长时间的摸索。现将自己对大鼠缺血再灌注实验技巧的认识简单介绍。

### 1 实验前的知识储备

实验前进行必要基础知识的积累, 查阅研究课题相关文献, 了解实验大体过程, 确定需要观察与检测的实验指标, 分层列出表单, 如: 从三个层面考虑: 组织器官水平检测指标、细胞水平检测指标、分子水平检测指标等; 根据指标查阅相关检测方法, 选择可行实验检测方法, 推测所需实验标本; 依据实验所需数据, 完成初步预实验设计(参考表 1、表 2); 了解大鼠解剖结构, 将大鼠造模步骤熟记于心, 进行练习。

【基金项目】国家重点基础研究发展计划(973 计划)(编号:2012CB518601)。

【作者简介】黄婷(1990-), 女, 2015 级在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗老年病。E-mail: 834349733@qq.com

【通讯作者】杨明会(1962-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合基础与临床。E-mail: ymh9651@sina.com

**表 1** 预实验设计  
**Tab.1** Design of the preliminary experiment

时间 Time	操作 Operation
第 1 天 1st day	灌胃 A 组 12 只 Intragastrical gavage in 12 rats in the group A
第 2 天 2nd day	灌胃 A + B 组 24 只 Intragastrical gavage in 12 rats in the groups A and B, respectively
第 3 天 3rd day	灌胃 A + B + C 组 36 只 Intragastrical gavage in 12 rats in the groups A, B and C, respectively
.....	.....
几周后 Several weeks later	器材准备 + 取材 Preparation of experimental equipment and animal sampling
取材第 1 天 1st day of sampling	各组 3 只取材 Sampling from 3 rats in each group
取材第 2 天 2nd day of sampling	各组 3 只取材 Sampling from 3 rats in each group
.....	.....

**表 2** 数据记录  
**Tab.2** Records of experimental data

大鼠编号 Identity of rats	体重/g Weight	结扎时间 Time of ligation	缺血心电图 Electrocardiogram of ischemia	再灌时间 Time of reperfusion	取材时间 Time of sampling	取材前心电图 Electrocardiogram before sampling	所取标本 Tissue samples	备注 Notes
TA	301	09:10	√	10:10	12:10	√	心脏 + 血 Heart + blood	—
TB	311	09:30	×	10:30	12:30	×	—	09:35 死亡 Dead at 09:35
TC	306	10:00	√	11:00	13:00	√	心脏 + 血 Heart + blood	—

## 2 实验前的技术准备

实验涉及大鼠饲养、灌胃、麻醉、造模、取材、检测<sup>[2]</sup>。

一般实验室大鼠由专门的饲养员来饲养。

大鼠的灌胃操作包括大鼠的捉拿、固定、灌胃器插入与推注<sup>[3]</sup>。全程操作注意避免被大鼠抓咬,保证安全。订购完毕的实验大鼠,不可急于灌胃,需要预适应 3 d;灌胃过程保持以柔克刚的理念,忌激惹大鼠,被激惹的大鼠需暂时放回鼠笼,待其平静后再操作;若强行灌胃,容易将液体灌入肺或气管,导致大鼠死亡。灌胃过程中若遇阻力,可能是插入气管内,应立即退针,停留片刻再操作。在进行药物的推注时一定要缓慢,特别是粘稠中药的推注,推注过快,大鼠容易死亡。很多灌胃液比较粘稠,容易粘在管壁上,需及时更换灌胃器。为减少大鼠的死亡率,确保实验可以按时完成,灌胃的操作练习,笔者建议隔天练习半小时,大约一周时间熟练运用。

大鼠的麻醉一般选用腹腔注射,具体操作参照文献<sup>[4]</sup>。麻药注射量宁少勿过,麻过的大鼠造模操

作过程中心肺耐受性降低,死亡率偏高<sup>[5]</sup>。麻醉效果的评价:用指甲掐捏大鼠的四肢趾甲末端,大鼠轻微的抽动,若抽动较强烈或观察到大鼠胡须抖动有力,则麻醉不足,可以适量补充 0.1~0.2 mL 麻药,隔 3~5 min 观察效果。

## 3 心肌缺血再灌注实验的操作

根据参考文献<sup>[6]</sup>进行大鼠心肌缺血再灌注的造模操作,再灌注时,连接呼吸机,将活结第一层解开,顺着白线方向轻微抖动,待出现松动感后抽出白线,再灌成功标志:缺血部位心肌颜色恢复,抬高的 ST 段下降 50% 以上。

造模过程注意事项:① 操作时注意室温,冬天需在室内加用简易取暖器,以保持温度在 23℃ 左右,温度过低,大鼠耐受性下降,死亡率则升高。切记,操作时要轻柔,不可激怒大鼠。② 在呼吸面罩固定后,要使头颈部保持在一条直线上,轻微牵拉鼠舌,用干净棉签擦除口咽分泌物,以免堵塞气道;开胸前,一定保证呼吸机是正常运行模式;笔者在实验时偶有发现呼吸机接触不良,呼吸面罩漏气

等,导致后续操作难以进行。此外,开胸时,要尽量采用微创思想,缩小皮肤开口,减少组织损伤。③剥离心包膜时,心包膜不可全部剥脱,需保留部分心包膜限制心脏的活动,否则心脏跳动太剧烈,影响进针。④在血管结扎时尽可能做到精准,避免回针,较少出血和心脏损伤;切记结扎前放置 5 号白线。血管的结扎程度以结扎下部心肌组织颜色变白为标志,切记不可结扎过紧,以免再灌注时反复松解困难,损伤血管。笔者在结扎血管时发现有些大鼠的心脏是右位心,会出现有些血管纤细不清,有些血管不规则等情况,此时操作更应如履薄冰。在胸腔关闭前注意将胸腔内的空气挤压或抽离,减少胸腔压力。胸腔关闭时,笔者建议使用符合大鼠胸部曲线的弯止血钳,夹闭胸腔时应检查是否漏气。⑤心肌缺血造模完成后,大鼠的摆放应注意:观察其呼吸道是否通畅,头颈部在一条直线;避免止血钳悬空,增加胸腔负担。严密观察大鼠的呼吸情况,及早判断大鼠的预后;有些大鼠心肌缺血后,损伤较重,呼吸气息微弱,胸腔起伏不规则,死亡率较高。⑥再灌后,心脏损伤会不同程度的加重,笔者建议封闭胸腔后仍呼吸机维持 10~15 min。⑦整个操作过程熟练掌握,缩短操作时间,避免血管损伤,减少出血;笔者建议造模大鼠的体重为(300±10)g,其造模成功率较高。

大鼠的取材,一般包括摘取心脏和腹主动脉取血。心脏摘取时,应及时、迅速,避免锐利器械碰触心肌组织,多余组织的分离需在冰块上进行,以免组织蛋白酶失活。心脏后期的保存一定预先查阅相关文献,免得保存失误,导致实验失败。腹主动脉的取血,注意在大鼠心脏跳动的状态下抽血,否则血管干瘪,即使抽出血也易凝固堵塞针头,且离心时大多会出现白色絮状物,导致血清分离不达标;取血时,手要稳,不要着急,避免扎透血管导致大出血,取血失败。

标本的检测有定量、定性等,各有不同。笔者仅提醒大家:各检测技术应取材前熟知,明确标本的保存,如:涉及血清蛋白酶的检测时,需将同一标本分装在多个冻存管,保存在-80℃,每次检测仅取一份,避免反复解冻,蛋白酶失活。检测试剂按照说明书保存,否则影响实验结果。

正式实验前,务必进行预实验,根据预实验结果,查阅相关文献及请教专业老师,调整实验方案,减少反复实验。

## 4 结论

在实验研究中,忌急于求成,每个步骤的操作略粗糙迅速,终前功尽弃;在大鼠开胸后,拉钩器勿伤及肺组织,以免影响呼吸功能,死亡率明显提高。造模时,常遇到大鼠心脏左冠状动脉血管不是一支粗血管而是很多细小的血管分支,此时建议别选单一的细小血管结扎,将整丛血管一起结扎较容易些,可减少心脏出血的风险。取材时,若大鼠在造模操作过程中出血较多,则腹主动脉取血时抽血较少,离心后的血清更少,无法完成该标本相关检测。ELISA 法检测血清蛋白酶时,标本暴露在外界时间较长,酶容易失活,建议使用冰袋控制标本周围的温度。

心血管疾病的实验研究可以更好地认识和解释临床现象,为溶栓、冠脉搭桥术和经皮冠脉腔内成形术提供最佳方案,辅助药物预处理的应用<sup>[7]</sup>。因此笔者总结了大鼠缺血再灌注模型实验过程中的一些经验教训,让类似实验的操作者可以减少失误。因笔者实验技能及时间限制,仍存在诸多操作注意事项未摸索,希望同事们能总结更多操作经验以应用于实验。

## 参考文献:

- [1] 高晓津,杨进刚,杨跃进,等. 中国急性心肌梗死患者心血管危险因素分析[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(3): 206-210.
- [2] 侯梦梦,邢冬梅,刘璇,等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型建立的关键性问题[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(6): 323-326.
- [3] 张晓丹. 大鼠灌胃技巧的经验总结[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(55): 237.
- [4] 童松,熊南翔,沈建英. 大鼠腹腔麻醉方法的改进[J]. 实验动物科学, 2014, 31(1): 52-54.
- [5] 李明,鲁卫星,崔现军,等. 提高大鼠心肌缺血/再灌注损伤模型成功率的方法探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(9): 1699-1700.
- [6] 张俊修. 心之络病“孙络疏失”的中医微观病理特征研究[D]. 中国人民解放军医学院, 2014.
- [7] 陈路,李玮玮,刘春慧. 心肌缺血再灌注损伤的中医药研究进展及其模型的制备[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(9): 174-176.