

# 猪离体不停跳心脏模型建立和应用

宋剑非, 杨锋, 马魁, 郑民

(广西桂林医学院附属医院 心胸外科, 广西 桂林 541001)

**【摘要】** 目的 研究不停跳技术在猪离体心脏实验模型的应用。方法 7 只实验用猪, 戊巴比妥钠麻醉后常规开胸, 在不停跳的情况下游离血管, 建立体外循环管道连接, 利用体外循环机保证冠脉灌注。在心脏不停跳情况下进行心脏离体手术, 离体后心脏置无菌塑料袋于恒温水箱 (37 ℃) 保存, 左心耳置引流管。灌注血液温度 37 ℃, 流量控制在 300 ml/min 左右。观察离体后心脏跳动情况, 离体后每隔 1 小时取左心耳组织测定丙二醛 (MDA)、超氧化歧酶 (SOD), 6 小时后取心尖部心肌行电镜检测。结果 7 只动物除一只因左心反流胀停失败, 其余均成功建立离体不停跳模型。MDA 及 SOD 在离体 6 h 内变化不明显, 心肌超微结构保持良好。结论 在体外循环系统支持下可以保证心脏在离体及体外过程中不停跳, 避免了缺血再灌注损伤, 为大型动物的体外心脏实验提供了良好的模型。

**【关键词】** 离体; 心脏; 不停跳; 猪

中图分类号: R-332; R654.2

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1674-4659.2012.01.0022

**Establishment and Application of Isolated Beating Pig Heart Model** // SONG Jianfei, YANG Feng, MA Kui, ZHENG Min

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China)

**【Abstract】 Objective** To study the establishment of isolated beating heart experimental model. **Methods** 7 pigs were anesthetized with sodium pentobarbital then received thoracotomy, using cardiopulmonary bypass machine to ensure coronary perfusion. Separated hearts were preserved in sterile plastic bags at constant-temperature water-bath (37 ℃), the left atrial appendage setting tube. Perfusion blood temperature was 37 ℃, flow control was 300 ml/min. Observe states of the beating heart, at intervals each of 1 h, the left atrial appendage was resected, measuring MDA, SOD. After 6 h, apex myocardium was taken for electron microscopy. **Results** 1 case failed because of left ventricular reverse flow, and the others were successfully established beating heart model in vitro. MDA and SOD didn't change significantly within 6 h, myocardium ultrastructure maintained in good state. **Conclusion** The CPB system can support heart beating in procuring surgery and in vitro, avoiding the ischemic-reperfusion injury, which provides an optimal model for cardiac experiment of large animals in vitro.

**【Key words】** Isolation; Heart; Beating heart; Pig

心脏离体实验多选用小型动物, 利用 Langendorff 方法<sup>[1]</sup>, 对于大型动物离体心脏研究模型尚无较好的模型, 我们利用体外循环设备和心脏不停跳技术成功建立了体外心脏不停跳实验模型。这一模型模拟心脏的生理状态, 没有再灌注损伤, 为体外心脏的各项研究提供良好的实验条件。

## 1 材料与方法

**1.1 设备与动物** 7 只巴马香猪, 雌雄不限, 体重 40 ~ 45 kg。Sarns 9000 体外循环机 (3M 公司), 东莞科威产西京-87 鼓泡式氧合器、西京-2000 型贮血滤血器、一次性使用心肌保护液灌注装置、一次性使用体外循环管道。试剂采用南京建成产 MDA 及 SOD 试剂盒。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 准备与动物麻醉** 手术器械、铺巾及标本收集管 (EP 管)

收稿日期: 2011-09-09 修回日期: 2011-12-16

基金项目: 广西壮族自治区科学技术厅科学基金项目“供体心脏不停跳和停跳保存方法对心肌保护的对比研究”(桂科基 0236068)。

作者简介: 宋剑非, 男, 桂林医学院附属医院副院长, 心胸外科教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 心胸外科临床及基础研究。

高温消毒, 实验室术前紫外线消毒 1 h。动物术前禁食 12 h, 禁水 6 h, 术前冲洗。术前 30 min 予阿托品 0.5 mg, 麻醉采用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射 (40 mg/kg)。抬上手术台固定, 耳缘静脉建立静脉通道, 维库溴铵 0.2 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> 维持肌松。同时气管插管 (ID7.0) 呼吸机维持呼吸频率 15 ~ 20 次/分, 潮气量 5 ~ 10 ml/kg, I : E = 1 : 2。胸部正中切口, 常规铺巾消毒。体外循环管道预充林格液 1 000 ml, 提前进行循环管道排气。

**1.2.2 离体心脏模型建立** 正中切口暴露心脏后心包悬吊, 游离上下腔静脉, 过双七号线, 不结扎。心包悬吊, 游离主动脉, 肺动脉, 分别过双十号线, 不结扎。主动脉尽量游离至远端, 过带一条。右心耳荷包缝合, 于右心耳处注射肝素 3 mg/kg。全身肝素化 (ACT 500-600 s) 后主动脉近端缝合荷包, 过线套, 不收紧。右心耳插腔静脉引流管, 过三尖瓣, 引流管远端阻断钳夹闭, 主动脉近端插灌注管, 接灌注管, 二者均不开放, 管道连接结束。

开放腔静脉引流管, 主动脉开始灌注, 保持主动脉血压水平。待血液与晶液体充分混匀, 血槽平面保持一千毫升左右后开始结扎套带, 双 10 号线随即结扎, 同时主动脉近端开始灌注 37 ℃ 的温血, 灌注流量在 300 ml/min 左右, 左心耳置引流管一根, 过二尖瓣口, 保证主动脉血压同时防止主动脉反流引

起的左心膨胀,游离结扎各个肺静脉。血槽血液维持平衡后结扎肺动脉,相继结扎上下腔静脉,离体前操作完成。

无菌袋置于玻璃器皿中外层有生理盐水,玻璃器皿置于 37℃ 恒温水箱。开始离体:先远端离断上下腔静脉,将心脏上左侧抬起,结扎肺静脉,远端离断。接着在远端离断主动脉,肺动脉。心脏小心移动到袋子中,保持心脏姿势,防止扭转,并注意主动脉充盈情况,随时调整流量。

1.2.3 取样及相关指标检测 离体后计时开始,每隔 1 小时取左心耳全层心肌 1 克左右于 EP 管封口, -20℃ 保存。取样的心肌组织制作成 10% 的组织匀浆,取 100  $\mu$ l 配置成 1% 的组织匀浆。MDA 采用硫代巴比妥酸法 (thiobarbituric acid, TBA) 测定 (10% 的组织匀浆), SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定 (1% 的组织匀浆),试剂南京建成公司生产。

## 2 结果

2.1 SOD 及 MDA 随时间变化 见图 1、2。从图中可看到离体不停跳保存的心肌组织在保存时间内 SOD、MDA 随时间变化趋势不明显,未有明显的升高和降低。

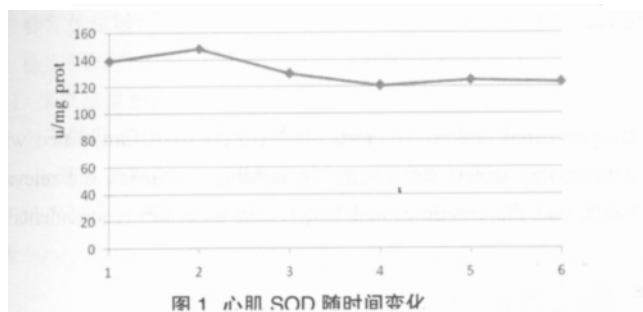


图 1 心肌 SOD 随时间变化

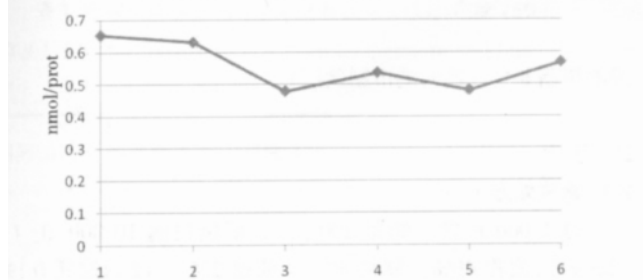


图 2 心肌 MDA 随时间变化

2.2 心肌超微结构变化 见图 3。供体心肌体外不停跳时间在 6 h 末的心肌超微结构电镜观察,见心肌无明显细胞肿胀,线粒体嵴完整,细胞肌丝无断裂改变,细胞超微结构保持良好。

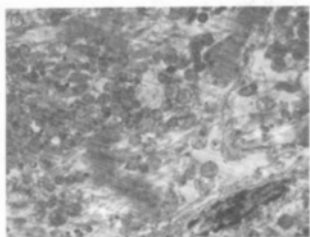


图 3 不停跳组超微结构  $\times 8000$

## 3 讨论

传统的心脏离体实验多采用 Langendorff 离体心脏灌流实验装置,有许多有关心血管的研究<sup>[2]</sup>。动物一般选用大鼠、兔等

小型动物进行,原因在于大型动物心脏由于体积大,灌注液难以保证氧合,在体外难以建立工作模型<sup>[3]</sup>。而且采用传统方法对心脏进行离体操作难以避免心脏缺血,即使在离体后立即提供血供也必然造成再灌注损伤发生,这样显然对后续实验会造成影响。孙益峰等<sup>[4]</sup>曾经采用膜肺和体外循环装置建立了猪的心脏离体再灌注模型。他们在心脏离体阶段采用停跳处理,由于停跳的影响,存在再灌注损伤,所以有的心脏复跳困难,需行除颤,这也进一步加重了心肌的损伤。

不停跳是一项成熟的心肌保护技术<sup>[5-6]</sup>,我们将心脏不停跳这一心肌保护技术应用到离体心脏模型建立,避免了再灌注损伤,细胞超微结构保持较好。手术过程中没有停跳步骤,心脏没有大的切口,也避免了心肌的损伤。在试验过程中我们发现的需要注意问题主要有:①主动脉逆灌过程中左心系统可由于主动脉反流而胀停,所以需在左心耳置引流管,并且需要插过二尖瓣,在试验过程中有一例就是由于左心反流导致心脏胀停而失败的。②血液与晶体液必须充分混匀,所以转流开始时流量必须由小变大,待血槽中为混匀血液时方可达到最大流量。③游离各个血管时必须仔细,防止出血,游离难度最大的为肺静脉,需特别小心。

从试验结果看,采用不停跳方法保存的供体心脏,心肌的 MOD、SOD 随时间变化趋势不明显,说明供体心脏处于接近生理的状态下细胞膜脂质过氧化的程度较低,细胞抗氧化的能力得以保存,所以在保存末期的心肌超微结构保持较好。

这一大型动物心脏离体不停跳模型建立为体外心脏试验提供了没有再灌注损伤和接近生理条件的实验模型<sup>[7]</sup>,可以利用为药理或生理等方面的大型动物心脏离体研究。本实验由于利用的是国产鼓泡式氧合器,氧合时间为 4~6 h,所有试验终点时间选择在 6 h。在我们心脏离体保存期间心脏跳动有力,未出现心律失常等现象。

致谢 本实验承蒙杜振宗博士、王海永博士提供帮助。

## 参考文献

- [1] Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa J C, et al. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23 (4): 327-331.
- [2] Guo L, Dong Z, Guthrie H. Validation of a guinea pig Langendorff heart model for assessing potential cardiovascular liability of drug candidates [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2009, 60 (2): 130-151.
- [3] 陈长春. 心脏移植新进展 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36 (3): 85-96.
- [4] 孙益峰. 离体猪心再灌注模型的建立和应用 [J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18 (6): 591-592.
- [5] 宋剑非, 梁岳培, 李安桂, 等. 冷晶体灌注和不停跳行心脏直视手术对心肌保护作用的实验研究 [J]. 广西医科大学学报, 2002, 19 (4): 102-134.
- [6] 林辉, 何巍, 彭青云, 等. 心脏不停跳心内直视手术的临床研究 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2001, 17 (3): 134-142.
- [7] Jahania M S, Sanchez J A, Narayan P, et al. Heart preservation for transplantation: principles and strategies [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68 (5): 1983-1987.

(责任编辑: 常海庆)