

实验动物心肌梗塞模型的建立 和染色方法的改进*

刘延玲 蔡凯华 唐昊

(第二军医大学长海医院胸心外科研究所 上海 200433)

摘要:介绍了如何建立可靠稳定的心肌梗塞动物模型。通过应用常规病理苏木素-伊红(H.E)染色及改进的碱性复红-苦味酸(HBFP)组织化学染色,结果表明,在建立实验动物心肌梗塞模型时,操作规范、及时取材制片、选用改进的染色液和染色时间流程,即可证明心肌梗塞的发生。

关键词:动物模型;心肌梗塞;组织化学染色

中图分类号:Q95-3 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2002)04-39-02

Establishment of an Animal Model and Improvement of Staining Method for Myocardial Infarction

LIU Yan-Ling CAI Kai-Hua TANG Hao

(Changhai Hospital, The Second Military Medical University Shanghai 200433, China)

Abstract: Our purpose is to establish a steady and credible animal model of infarct heart. Following hematoxylin-eosin (H.E) and haematoxylin fuchsin basic picric acid (HBFP) staining, we showed that factors critical to get a satisfactory result are normative operation, timely sample harvesting, modified staining formula and proper staining schedule. The results demonstrated that our myocardial infarction animal model is reliable.

Key words: Animal model; Myocardial infarction; Histology

缺血性心脏病是严重危害人类健康的疾病,为了探讨新的治疗方法,作者经过充分的实验准备,建立了兔动物心梗模型^[1],并选用改良HBFP法证实了心肌梗塞的发生,得到了较好的效果。

1 材料与方 法

1.1 动物模型的建立 健康纯种新西兰大白兔24只,雄性,2.7~3.3 kg,购自第二军医大学动物中心。小动物手术器械购自第二军医大学教保处。麻醉动物:将动物仰卧,四肢固定于手术台板上,采用芬太尼耳静脉注射作为基础麻

醉,剂量:10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重。麻醉成功后,将肢体及头部再次固定稳妥,手术野皮肤剪毛,用0.8%的硫化钠脱毛,碘酒、酒精消毒,铺消毒巾,标准的肢体导联进行ECG监测。结扎左冠状动脉前降支^[1],在利多卡因局部浸润麻醉下,行长约4 cm胸部正中切口,切开皮肤、皮下组织及胸骨前肌肉,紧贴胸骨左缘第3、4肋软骨进胸,牵开胸壁,暴露心脏。以无损伤镊提夹左

* 国家自然科学基金(No. 39970735)资助项目;

第一作者介绍 刘延玲,女,38岁,副主任技师;研究方向:临床与实验病理技术。

收稿日期:2001-06-28,修回日期:2002-01-22

心耳,确定左冠状动脉前降支根部,在此处用5/0缘纶线高位双重缝扎前降支,结扎前首先记录动物正常 ECG;结扎后局部心肌由鲜红变为暗紫色,心外膜苍白,收缩力降低,心室膨胀,ECG 检查出现 ST 段明显弓背状抬高或压低,即初步认为心梗模型已建立。逐层缝合胸部切口,关胸。术毕,动物自动爬行、饮食、饮水,正常饲养。

1.2 组织处理方法 动物分别于术后 3 h、7 d、14 d,经耳缘静脉空气注射法处死兔子,取出心脏,在生理盐水中漂洗干净,沿心脏短轴方向切取长 0.2~0.3 cm 厚度的左心室,及时固定于混合性中性甲醛液^[2] 15~24 h,在室温下采用人工梯度乙醇脱水,二甲苯透明,54~56℃石蜡浸透与包埋,常规 H.E 和组织化学 HBFP 法染色。

1.3 HBFP 染色法

1.3.1 染色试剂的配制 (1)改良苏木素染液:苏木素 2 g,乙二醇乙稀 250 ml,硫酸铝 17.6 g,蒸馏水 730 ml,碘酸钠 0.2 g,冰醋酸 20 ml。先将苏木素溶于乙二醇乙稀中,再将硫酸铝溶于蒸馏水中。两溶液溶解后将其混合,加入碘酸钠,最后加入冰醋酸。(2)碱性复红染液:碱性复红 0.1 g,蒸馏水 100 ml;(3)苦味酸丙酮液:苦味酸 0.2 g,纯丙酮 100 ml。

1.3.2 染色步骤 组织切片厚度为 4 μm,脱蜡至水。入苏木素染液 30~60 s;自来水洗 5 min;入碱性复红染液 5 min;蒸馏水迅速水洗 5 s,以纯丙酮液浸洗 3~5 s,用苦味酸丙酮液迅速分化 10~15 s;以纯丙酮液急速脱水 5 s,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.3.3 染色注意事项 (1)染色时选用正常动物心肌组织作为对比染色;(2)染色液与分化液宜盛放染色缸内进行浸染与分色;(3)苦味酸丙酮液分色要快速,至切片基本无红色的染液流下为止;(4)纯丙酮脱水和二甲苯透明后可在镜下观察切片,如染色较深,可重复分色。

2 结果

2.1 动物存活情况 24 例兔子中因室颤死亡

2 例,气胸死亡 2 例,其余均存活至处死为止。

2.2 HBFP 染色结果 HBFP 染色显示缺血梗塞区心肌、红细胞、血浆蛋白、弹力纤维、胶原纤维呈鲜红或深红色;正常心肌呈黄色或黄棕色,细胞核呈蓝黑色;亦可见到心梗区有大量炎细胞浸润,早期梗塞发生时,肌细胞内外水肿,肌纤维增粗变性、坏死、横纹模糊至消失(图版 1:1~3)。

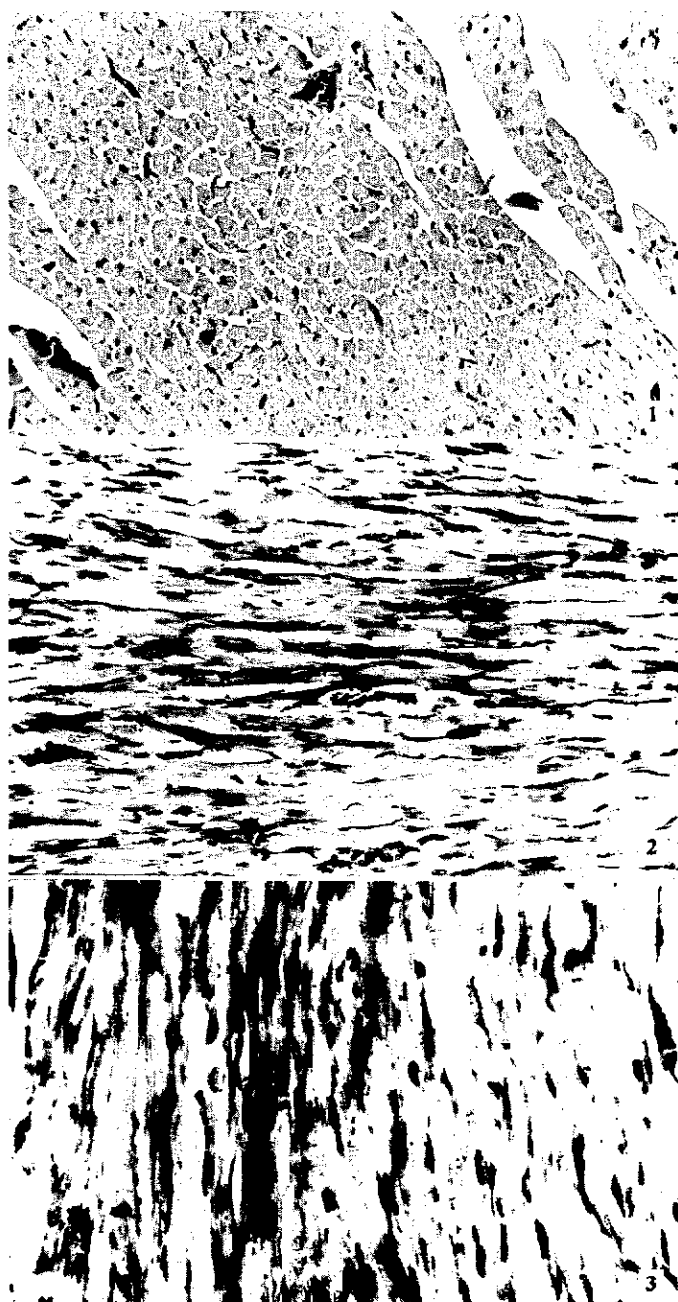
3 讨论

在建立动物心梗模型时,因其心脏不能停跳,手术中操作要谨慎细致,勿损伤其它血管神经,尽可能减少动物突发性死亡。在切取心脏标本时,应使用新的手术刀片,动作要轻柔,以免人为造成心肌坏死。组织必须及时固定于混合性中性甲醛缓冲液内^[2],能够提高渗透效果,严格乙醇的梯度脱水,二甲苯透明和低熔点石蜡的浸透与包埋亦是制作好组织切片的关键。

对于如何显示早期心肌病变组织,有多种技术方法,其中较为可靠的是苏木素、碱性复红——苦味酸染色法(Haematoxylin Fuchsin basic Picric acid, HBFP)。它对缺血缺氧心肌有一定的亲和力,或者称为亲(嗜)复红性^[3],但对于染色技术的要求比较高,染色时必须选用正常心肌组织和病变组织进行双重对照染色,结果才更加可靠。这种退行性染色的关键是掌握好分化程度,其分化应在染色缸内进行,这样浸洗分色才能均匀。改进后的细胞核复染和染色时间流程,能够提高苦味酸的分色程度,加强染色的对比度,使切片色彩鲜艳,结合 ECG 监测与 H.E 常规染色,可以确定动物心梗模型的成功建立。

参 考 文 献

- [1] 朱愉,多秀瀛编著. 实验动物的疾病模型. 天津:天津科技翻译出版公司出版,1997. 154~155.
- [2] 龚志锦,詹榕州编著. 病理组织制片和染色技术. 上海:上海科学技术出版社,1994. 7~10.
- [3] 刘介眉,严庆汉编著. 病理组织染色的理论方法和应用. 北京:人民卫生出版社出版,1983. 57~58.



1. 正常心肌横切面,肌纤维呈黄色,细胞核蓝黑色(7×14); 2. 梗塞区心肌纤维呈深红色,细胞核蓝黑色(7×14); 3. 梗塞区心肌纤维呈深红色,细胞核蓝黑色(7×28)