

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.07.008  
文章编号: 1005-8982 (2023) 07-0046-09

综述

## 心肌缺血再灌注损伤模型复制方法的研究进展\*

赵元彬, 胡龙龙, 余作忠, 陈洋, 杨人强

(南昌大学第二附属医院 心血管内科, 江西 南昌 330006)

**摘要:** 复制心肌缺血再灌注损伤模型是进行心肌缺血再灌注损伤研究的基础, 复制稳定且高效的动物和细胞模型尤为重要。目前, 心肌缺血再灌注损伤模型分为结扎动物冠状动脉左前降支的在体模型、动物心脏灌注装置及细胞缺氧再灌注的离体模型, 但在模型复制过程中仍存在成功率低、重复性差等问题。因此, 该文结合近年研究对该模型的复制和改良方法进行归纳和综述, 为复制更为稳定的模型提供新的思路 and 方向。

**关键词:** 缺血性心脏病; 心肌细胞; 缺血再灌注损伤; 缺氧/复氧; 模型

**中图分类号:** R542.2

**文献标识码:** A

## Research progress in establishing myocardial ischemia-reperfusion injury model\*

Zhao Yuan-bin, Hu Long-long, Yu Zuo-zhong, Chen Yang, Yang Ren-qiang  
(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University,  
Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract:** The establishment of myocardial ischemia-reperfusion injury model is the basis of myocardial ischemia-reperfusion injury research. It is particularly important to establish stable and efficient animal and cell models. At present, myocardial ischemia-reperfusion injury model can be divided into in vivo model of ligation of animal anterior descending coronary artery, animal heart perfusion device and in vitro model of cell hypoxia reperfusion. However, there are still some problems in model construction, such as low success rate and poor repeatability. Consequently, this paper summarizes and reviews the construction and improvement methods of this model based on recent studies, providing new ideas and directions for the construction of a more stable model.

**Keywords:** ischemic heart disease; myocardial; ischemia/reperfusion injury; hypoxia/reoxygenation; model

近年来, 中国缺血性心脏病的患病率持续上升, 并且超过癌症成为主要死因<sup>[1]</sup>。急性冠脉综合征作为最凶险的心血管疾病之一, 中国专家共识建议实现早期血管再通, 恢复心肌供血以减少心肌缺血坏死<sup>[2]</sup>。然而, 缺血再灌注可能导致心肌进一步损伤, 这种现象被称为心肌缺血再灌注损伤<sup>[3]</sup>。心肌缺血再灌注损伤主要表现为再灌注性心律失常、心肌顿抑引起的心功能障碍及微血管闭

塞引起的无复流<sup>[4]</sup>。目前, 对心肌缺血再灌注损伤的防治尚缺乏有效治疗手段。因此, 深入研究并阐明心肌缺血再灌注损伤的发病机制可以为其防治提供理论依据和研发方向。

心肌缺血再灌注损伤的病理机制较为复杂, 主要涉及氧自由基损伤、钙超载、炎症反应、细胞凋亡、补体激活、免疫失衡、内质网应激、细胞自噬、铁自噬、心肌能量代谢紊乱、心肌微血

收稿日期: 2022-07-05

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81960081)

[通信作者] 杨人强, E-mail: yangrenqiangcn@163.com; Tel: 13979117790

管内皮细胞损伤等<sup>[5]</sup>。首先,缺氧阶段线粒体中腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)和抗氧化剂产生减少,无氧代谢导致乳酸堆积引起代谢性酸中毒。其次,ATP生成减少,细胞表面钠钾泵和钙泵功能障碍,离子交换通道失效,细胞中较高水平的钠会降低钠-氢交换泵的活性,内质网上的钙泵功能障碍,从而限制钙的再摄取。氢、钠、钙离子的积累导致细胞内高渗透压,使细胞肿胀,最终细胞质中的酶活性受损。再灌注阶段,缺血细胞中抗氧化剂浓度降低,活性氧(reactive oxygen species, ROS)浓度增加,线粒体损伤和免疫失衡并通过烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶系统、一氧化氮合酶系统和黄嘌呤氧化酶系统促进氧化应激,导致心肌微血管内皮细胞损伤、脱氧核糖核酸损伤和局部炎症反应。最后,细胞损伤并通过自噬、凋亡、焦亡、坏死等途径致使细胞死亡<sup>[6-7]</sup>。目前,心肌缺血再灌注损伤的具体病理机制仍不明确,也有学者表明,再灌注阶段由于受到缺血时期炎症反应的遗留作用导致心肌坏死边缘进一步扩大<sup>[8]</sup>。再灌注阶段NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)的过表达和炎症小体活化,能促进细胞因子和其他炎症因子释放、破坏细胞膜、降低细胞渗透压,使细胞肿胀,引起细胞凋亡。在探究靶向药物的病理机制过程中,通过I、II期临床研究发现,白细胞介素-1受体拮抗剂——阿那白滞素有望在心肌缺血再灌注损伤中起积极作用<sup>[9]</sup>。因此,复制高效且稳定的动物或细胞缺血再灌注模型,深入探索其病理机制,对进一步改善临床预后有重要意义。该文结合近5年的研究对心肌缺血再灌注损伤模型复制和改良的方法进行归纳和综述。

## 1 动物缺血再灌注损伤模型的复制

### 1.1 动物种属选择

当前动物模型种属复杂多样。用于心血管疾病研究的动物主要包括猪、比格犬、小鼠、大鼠及日本大耳白兔。其中,比格犬和猪因冠状动脉分布与人类有所不同而不被选择<sup>[10]</sup>。大鼠因其冠状动脉分布、血液循环系统与人类较为相似,且其冠状动脉侧支循环少、心肌坏死表现早,模型复

制的稳定性高、费用较低,常作为此类模型的首选<sup>[11-12]</sup>。其中,8~10周的成年SD大鼠肌肉和胸壁弹性较好,能提高实验操作成功率,被选择最多<sup>[13]</sup>。兔因心脏较大,便于手术操作,并且左右胸腔相互独立,暴露心脏时不需要使用呼吸机,便于手术操作等优点被广泛应用于体内及体外模型<sup>[14]</sup>。近年来,树鼯因与灵长类动物的遗传关系比啮齿动物更密切,且体型小,繁殖容易,逐渐成为复制心血管疾病模型的理想动物<sup>[15]</sup>。

### 1.2 方法选择

阻断动物冠状动脉左前降支(left anterior descending branch, LAD)后又再通是目前模拟人类心肌缺血再灌注损伤的经典动物模型复制方法。研究目的和实验条件不同而选择各异。根据是否离体分为心脏在体结扎模型和心脏离体灌流装置模型;心脏在体结扎模型从解剖位置上又可分为胸外结扎法及心脏原位结扎法<sup>[13, 16]</sup>。

胸外结扎法因需要多次牵拉心脏,操作过程中容易影响心脏的电活动和循环功能,模型成功率低,因此该方法正被逐步淘汰。常规的原位结扎可保持心脏处于正常解剖位置,对术后动物的心脏生理功能影响较小,可延长术后动物的存活时间,适合用于慢性再灌注的实验研究<sup>[11, 17]</sup>。在此基础上,具体操作可分为垫管法和推管法。垫管法是将丝线或乳胶管等物质放置在心脏表面与LAD一起结扎,此方法在缺血后不用剪断结扎线,可直接取出垫物恢复冠状动脉的血供,具有创伤小、手术时间短、操作相对简单等优点而被广泛应用<sup>[18]</sup>。传统的推管法因缺血效果不好,对心肌有严重的机械损伤,因此逐渐被淘汰。LI等<sup>[13]</sup>将塑料管垫于LAD表面,再用丝线穿过一起结扎,此操作减轻了手术过程中的机械损伤,提高了模型成功率。但此方法的缺点是手术视野小、心脏不易固定,结扎LAD时进针的位置及深度不易控制,对术者的熟练度要求较高。

由于离体心脏不受神经、体液的调节,影响因素较少,可控性与重复性较强,同时可控灌流装置可满足复杂缺血模型及药效学实验研究需要,是心肌缺血再灌注形态、功能及电生理学的重要模型<sup>[19]</sup>。1895年,德国生理学家Oskar Langendorff首次介绍离体心脏灌流实验,其基本原

理在于主动脉逆行灌流含氧的 Krebs-Henseleit 重碳酸盐缓冲液,使心脏维持营养保持跳动。Langendorff 离体心脏灌流前负荷、后负荷、营养液成分、温度等均可调节,且对技术的要求相对较低,现今仍被广泛应用。因不受在体神经、体液调节等影响,体外模型在监测心脏收缩力、心率及药物效果评价方面有着显著优势,通过体外左心室插水囊或气囊,可以更稳定地监测心脏收缩力和心率,将不同浓度药物溶解于灌流液中可以更为直接地观察药物对其心脏功能的量-效关系<sup>[16]</sup>。Langendorff 离体心脏模型主要通过减少或停止缓冲液灌注和冠状动脉原位结扎来复制缺血模型<sup>[20]</sup>。Langendorff 系统也是分解心脏组织并获得原代心肌细胞的常用方法。将离体心脏连接到 Langendorff 灌流装置,通过左心室灌流胶原酶消化后切碎过滤分离获得心肌细胞<sup>[21]</sup>。LI 等<sup>[22]</sup>优化了此系统,使之与多重自然重力沉降相结合,进一步用更简便的方法提供更高质量的心肌细胞,但由于持续冠状动脉灌注导致的组织水肿及动物细胞与人体细胞形态学的差异等,使此系统存在一定局限性<sup>[23]</sup>。

### 1.3 术前准备与手术操作选择

传统的术前准备包括仪器设备连接、手术器材准备、备皮、消毒、麻醉后气管插管。气管插管对于维持呼吸循环稳定及模型稳定性有重要意义,但气管切开后插管本身属于有创操作,手术时间长会导致脏器体表降温及脱水,且对实验器材及手术技能要求较高。有研究者结合先进的临床经验,使用小型气管内镜辅助气管插管以避免气管切开,更大程度减少动物损伤<sup>[24]</sup>。通过面罩供给异氟烷诱导和维持麻醉方法,避免了气管插管,并且大鼠术后能快速恢复意识和自主行为,手术时间短、并发症少、围手术期死亡率低<sup>[25]</sup>。手术切口位置也是影响手术成功的重要因素。成年 SD 大鼠左侧 3、4 肋间正对结扎部位,心脏暴露良好,是理想的手术切口位置。结扎部位越高,发生恶性心律失常及心脏骤停可能性越大,因此结扎部位的选择也至关重要。李言明等<sup>[26]</sup>以冠状静脉定位 LAD 并在冠状静脉主干动脉圆锥下 2~3 mm 处结扎,并对比更高结扎位置,发现前者减少了恶性心律失常等不良反应的发生,提升了模型成功率。另外,结扎线太细极易损伤心肌甚至导致血管离

断,并且再灌注时缝线不易剪断,容易导致左心耳撕脱,然而结扎线太粗可导致定位不准确,因此 6-0 缝线更为合适<sup>[25]</sup>。

### 1.4 模型时间窗选择

缺血和再灌注的时间长短均可明显影响模型的效果。受动物种属、术型选择、实验条件等多因素影响,模型时间窗也存在差异。首先,缺血时间不应少于 15 min,研究表明,过短的缺血时间不会导致细胞死亡和心肌细胞结构的变化<sup>[27]</sup>。与细胞模型中时间跨度大不同,大多数文献对动物心肌缺血时间的选择都控制在 30~60 min<sup>[12, 28-29]</sup>,尤其是缺血 30 min 后模型动物仍有较高的存活率而被选择最多<sup>[24]</sup>。有研究通过结扎大鼠 LAD 复制缺血再灌注模型时发现,再灌注时间越长再灌注损伤的最大面积也越大,再灌注时间超过 180 min,大鼠死亡率明显增高<sup>[30]</sup>。缺血 30 min 和再灌注 120 min 模型大鼠的死亡率低、心肌缺血面积大、心肌梗死明显,是研究心肌缺血再灌注损伤的理想模型<sup>[12-13, 29]</sup>。这一时间窗同样适用于家兔<sup>[4]</sup>、树鼩等其他小型动物。杨天睿等<sup>[31]</sup>通过前期大量实验确定选用缺血 30 min、再灌注 30 min 复制树鼩体外心肌缺血再灌注损伤模型,发现再灌注 30 min 后树鼩的心功能参数接近了的正常生理状态,且模型组的所有指标较空白组均有极显著的变化。

### 1.5 模型成功的判定方法

LAD 结扎成功的标志为左心室顶壁和前壁心肌变白,结扎线远端心肌颜色发绀,心室壁运动减弱,心电图表现为 II 导联 R 波增宽,ST 段进行性抬高和/或 T 波高耸和/或 QRS 波群增宽,或可出现心律失常。再灌注后,心肌缺血部位紫绀消失或减轻,左心室心尖和前壁恢复红色,局部炎症引起水肿、渗出,心电图表现为心电图 ST 段回落,一般以回落 50% 以上为判断标准<sup>[12]</sup>,QRS 波形态趋于术前。模型复制后,小鼠心排量降低 30%,射血分数少于 50%,则认为模型复制成功<sup>[32]</sup>。TTC 染色法观察梗死心肌面积、HE 染色观察心肌损伤程度是动物模型中对单个暴露因素研究最常用的两种方法,特别是对时间窗的选择有重要意义,因其稳定性高、操作简单被广大研究者使用<sup>[11, 29]</sup>。

近 5 年心肌缺血再灌注损伤动物模型复制情况见表 1。

表1 近5年心肌缺血再灌注损伤动物模型复制一览表

作者	年份	动物种属	方法及位置选择	时间窗(H/R)	模型成功标准	
					模型复制中(H/R)	模型复制后
WANG等 <sup>[11]</sup>	2022	SD大鼠(8~10周龄,180~200g)	原位结扎法,肺动脉锥和左心耳之间LAD	30 min/180 min	心电图ST段抬高/ST段回落	HE染色、TTC染色
LI等 <sup>[13]</sup>	2020	SD大鼠(8周,250~300g)/新生SD大鼠(2d)	原位垫扎法,用塑料管垫扎大鼠LAD	30 min/120 min	文章未提及	HE染色、CK、LDH
WU等 <sup>[12]</sup>	2021	SD大鼠	原位结扎法,结扎大鼠LAD	30 min/120 min	左心室顶壁和前壁变白/左心室心尖和前壁恢复并变红	文章未提及
ZHANG等 <sup>[29]</sup>	2019	成年SD大鼠(约200~250g)	原位结扎法,结扎大鼠LAD	30 min/120 min	文章未提及	HE染色、TTC染色、LDH
LEE等 <sup>[14]</sup>	2021	家兔	原位结扎法,结扎左回旋动脉钝缘支(房室沟和心尖之间)	60 min/15 min	心肌颜色发绀/心肌颜色恢复	离体电生理检测
CHOU等 <sup>[17]</sup>	2020	新西兰大白兔(2.8~3.8kg)	原位结扎法,结扎左回旋动脉钝缘支(房室沟和心尖之间)	30 min/15 min	心肌颜色发绀/心肌颜色恢复	NO水平
PENG等 <sup>[33]</sup>	2019	新西兰大白兔(2.9~3.3kg)	建立动静脉体外循环、夹闭主动脉根部	60 min/120 min	文章未提及	HE染色
ZHANG等 <sup>[16]</sup>	2020	SD大鼠(8~10周龄,180~230g)	Langendorff离体心脏灌流	30 min/120 min	文章未提及	TTC染色
MUESSIG等 <sup>[34]</sup>	2020	C57/BL6小鼠(9~15周龄)	Langendorff离体心脏灌流	40 min/120 min	文章未提及	TTC染色

## 2 细胞缺血再灌注损伤模型的复制

心肌细胞缺血再灌注模型有助于在细胞层面对缺血再灌注损伤的机制进行探讨。氧糖剥夺/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)模型是目前较为成熟的一种缺氧/复氧细胞模型,让细胞维持在无葡萄糖无血清达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)及缺氧环境中,离开缺氧环境后并更换完全培养基模拟再灌注,以复制缺血再灌注细胞模型<sup>[11]</sup>,这种模型同样适用于心肌细胞缺血再灌注损伤研究<sup>[29]</sup>。不同细胞对缺氧的耐受性不同,其时间窗也不同,需要通过大量预实验确定其合适时间窗。

### 2.1 细胞种属及方法选择

目前细胞选取大致分为两种类型:①原代心肌细胞:其中包括新生心肌细胞、成年心肌细胞、心脏祖细胞(cardiac progenitor cell, CPC)、诱导多能干细胞衍生的心肌细胞(induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, iPSC-CMs);②细胞系:人心肌细胞(HCM)、小鼠心房肌细胞(HL-1)和大鼠心室肌细胞(H9C2)。

原代心肌细胞具有保持心肌细胞原有结构和

功能特点的优势。原代心肌细胞中,尽管成年心肌细胞最贴合临床,但较难分离纯化,存在混杂因素较多的缺点,新生心肌细胞更容易纯化、对缺氧的抵抗力更强而更为常用。iPSC-CMs因为有缺氧抵抗和较低细胞死亡率特性,是药理学领域致力于药物研究的又一绝佳选择<sup>[35]</sup>。有研究通过胶原纤维蛋白原水凝胶包裹 iPSC-CMs 复制了一种体外心肌缺血再灌注损伤模型,这一人体组织工程模型可以更为准确地模拟体内心肌缺血再灌注损伤环境<sup>[36]</sup>。培养细胞系可以无限期地传代,同时保持其表型特征,因此在使用性方面具有优势<sup>[11]</sup>。

大鼠心室肌细胞 H9C2 在能量代谢特征方面更接近正常的原代心肌细胞,且相较于 HL-1 对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)刺激更为敏感,是复制心肌缺血再灌注损伤模型更为合适的细胞系<sup>[37]</sup>。通过 OGD/R 方式复制模型仍然是最常见方法选择,缺氧前置换不同缺氧液并置入不同缺氧装置,缺氧后将缺氧液换成完全培养基在常氧条件下(21%氧气)进行复氧<sup>[25]</sup>。也有研究者在复氧阶段使用高氧条件(95%氧气)来构建复氧环境,但有相

关实验研究表明,高氧会加重再灌注心肌氧化应激及炎症损伤<sup>[33]</sup>。

考虑到现实中无法捕获再灌注期间缺血区域的实际氧气分布,有学者构建了一种心脏计算模型,这种氧扩散三维模型也证明了再灌注早期高浓度氧会增加ROS的产生,导致心肌组织进一步损伤<sup>[38]</sup>。结合目前临床环境的局限性,为深入了解人体模型相关的疾病形成过程,心脏计算模型作为一种新型工具正被广泛应用<sup>[39]</sup>。有研究<sup>[40]</sup>将组织工程技术与心血管疾病模型相结合,把新型心脏芯片置入含有iPSC-CMs细胞的胶原基水凝胶中,实现了三维结构的模拟,为复制人细胞体外模型开拓了新的方向。由于经典动物及细胞模型的局限,三维培养系统可以使人类心肌细胞功能在体外更好地成熟,同时提高细胞-细胞和细胞-基质相互作用的水平,为探究旁分泌等更为复杂的生理机制提供新的方法。但目前该技术未标准化,仍然需要大量证据来证明模型的准确性、相关性和可重复性。不可否认的是,三维心脏细胞培养技术在组织工程、药物开发、心脏毒理学和疾病模型复制方面具有巨大的应用潜力<sup>[41]</sup>。

缺氧可以通过化学或物理方法实现。化学诱导因副作用太多,无法排除多因素影响复氧阶段的损伤,因此现在很少应用。物理方法通过将培养的细胞更换缺氧液后放入缺氧装置模拟缺氧,根据预实验缺氧一段时间后,将细胞更换完全培养基,离开缺氧环境模拟复氧<sup>[42]</sup>。三气培养箱是精密可控的缺氧设备,但仪器价格昂贵,不利于前期实验<sup>[43]</sup>。通常,缺氧过程中使用含5%二氧化碳和95%氮气的气体成分、37℃的箱内环境来实现缺氧<sup>[13, 44-45]</sup>。心肌缺血再灌注损伤模型大都采用更换无血清、无葡萄糖有机溶剂模拟缺血环境<sup>[11, 44, 46]</sup>。然而,实际临床中无血清并不符合缺血的自然结果,因为在短暂的缺血损伤期间,血清往往不会耗尽,此外,无血清会加剧细胞活性氧的生成引起细胞进一步死亡<sup>[47]</sup>。通过对缺氧溶剂的预缺氧处理可以更大程度地减少溶于液体中的氧气,使缺氧环境更为稳定<sup>[11]</sup>。

## 2.2 细胞模型的检测方法

常见的细胞模型检测方法是通过检测心肌缺血再灌注损伤模型中目的细胞的活力、氧化应激、

炎症因子(IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等)<sup>[11]</sup>、ROS和凋亡等来评估暴露因素对心肌缺血再灌注损伤的影响。细胞活力是确立细胞模型合适时间窗及模型是否成功的重要标准之一。CCK-8法和MTT法是检测细胞活力常用方法,操作便捷、简单,被广泛应用于模型复制前研究<sup>[48-49]</sup>。肌酸激酶(creatine kinase, CK)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)是心肌细胞中具有稳定细胞作用的溶质酶,缺血再灌注会诱导心肌细胞产生氧化应激反应使细胞膜受损,CK和LDH迅速从细胞释放到细胞培养基中,是心肌损伤的标志物。CK和LDH的细胞毒性检测试剂盒使用方便、操作简单,也可作为细胞模型复制过程中重要检测工具之一<sup>[47, 50]</sup>。细胞凋亡检测常用于模型成熟后暴露因素对蛋白水平的影响,因价格昂贵及时间成本高,不利于前期实验<sup>[51-52]</sup>。近5年心肌缺血再灌注损伤细胞模型复制情况见表2。

## 3 小结

理想的动物和细胞缺血再灌注损伤模型是研究心肌缺血再灌注损伤的前提条件,在此基础上深入研究其病理机制,探寻目标靶点精准治疗以减轻缺血再灌注造成的组织和功能损伤,具有重要的临床意义。该模型需要研究者以实验目的为基础,综合考虑经济、稳定、可复制、实验室条件等因素进行选择,提高模型复制的稳定性,缩短手术时间,提高动物存活率及成功率,重在优化步骤及细节。细胞模型时间窗及缺氧复氧条件不固定,需要前期大量预实验,本文就这一问题也给出参考。目前,临床对于心肌缺血再灌注损伤治疗方法有限且其有效性还未在大型临床试验中得到证实,因此临床前模型还亟待优化。考虑到动物及细胞模型的局限性,三维数字计算模型也正被广泛应用。组织工程与心血管疾病模型相结合是未来发展趋势,三维培养系统模型是常规体外模型的又一替代。综上所述,随着对缺血再灌注损伤病理生理机制研究的逐步深入,缺氧再灌注模型将得到持续优化,稳定的模型为缺血再灌注损伤病理生理机制研究提供保障。可以预见,随着越来越多的靶点被发现,临床防治缺血性心脏病将有更加广阔光明的前景。

表2 近五年心肌缺血再灌注损伤细胞模型构建一览表

作者	年份	细胞种属	细胞选择	溶剂条件(H/R)	环境条件(H/R)	时间窗(H/R)	检测指标
ZHENG等 <sup>[50]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	600 μmol/L CoCl <sub>2</sub> /完全培养基	化学法	24 h/3 h	CCK-8、氧化应激指标(CK、LDH、SOD、CAT、GSH、MDA)
WANG等 <sup>[11]</sup>	2022	大鼠细胞系	H9C2	无糖D-Hank液(预缺氧30 min)/完全培养基	缺氧箱A	4 h/-	CCK-8、氧化应激指标(CK、LDH)、炎症因子(LI-1β、IL-6、IL-8和TNF-α)
WANG等 <sup>[44]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	无糖台式液/DMEM F12	缺氧箱A	5 h/12 h	CCK-8、氧化应激指标(CK、LDH)、凋亡蛋白(Caspase-3)
LIU等 <sup>[47]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	无葡萄糖DMEM/完全培养基	缺氧箱A	4 h/24 h	CCK-8、氧化应激指标(LDH、SOD、CAT、MDA)、ROS
GUO等 <sup>[48]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	0.5%FBS DMEM/完全培养基	缺氧箱A	2 h/1 h	CCK-8、氧化应激指标(LDH)
CHENG等 <sup>[45]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	无葡萄糖无血清DMEM/完全培养基	缺氧箱A	6 h/6 h	凋亡蛋白(caspase-3)
LU等 <sup>[49]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	无葡萄糖DMEM/完全培养基	缺氧箱A	4 h/24 h	MTT、凋亡蛋白(caspase-3、caspase-9)
CHEN等 <sup>[51]</sup>	2021	大鼠细胞系	H9C2	完全培养基/完全培养基	缺氧箱A	3 h/12 h	凋亡检测(AnnexinV-FITCPI)
LANG等 <sup>[43]</sup>	2021	小鼠细胞系	HL-1	完全培养基/完全培养基	三气培养箱B	6 h/24 h	CCK-8、氧化应激指标(LDH)、凋亡蛋白(Bcl-2、Bax、Caspase-3)
QIU等 <sup>[42]</sup>	2021	小鼠细胞系	HL-1	(无血清RPMI-1640预适应24 h)无糖无血清缺氧模拟液/含糖无血清DMEM	三气培养箱B	5 h/12 h	MTS、氧化应激指标(LDH)、凋亡检测(AnnexinV-FITCPI)、ROS
GONG等 <sup>[52]</sup>	2021	新生SD大鼠(1~3 d)	NRVMs	完全培养基/完全培养基	缺氧箱C	6 h/6 h	凋亡蛋白(Bcl-2、Bax、Caspase-3)
ZHU等 <sup>[53]</sup>	2021	新生SD大鼠(1~3 d)	NRVMs	低糖DMEM/完全培养基	三气培养箱B	12 h/12 h	MTT、氧化应激指标(LDH、SOD、MDA)、凋亡蛋白(Bcl-2、Bax、Caspase-3、C-caspase-3)
XIANG等 <sup>[54]</sup>	2020	新生SD大鼠(1~3 d)	NRVMs	PBS/完全培养基	缺氧箱A	3 h/3 h	CCK-8、氧化应激指标(LDH、MDA)、凋亡检测(AnnexinV-FITCPI)
LI等 <sup>[13]</sup>	2020	新生SD大鼠(2 d)/大鼠细胞系	NRVMs、H9C2	无血清DMEM/完全培养基	缺氧箱A	6 h/6 h	凋亡蛋白(Bcl-2、Bax、Caspase-3)
WANG等 <sup>[55]</sup>	2018	新生C57/BL6小鼠(1 d)	NRVMs	完全培养基/完全培养基	三气培养箱B	6 h/24 h	CCK-8、氧化应激指标(LDH)、ROS、凋亡蛋白(Caspase-3)
DALAL等 <sup>[56]</sup>	2020	雄性SD大鼠(8周)/雄性C57/BL6小鼠(8~10周龄)	ARVM	完全培养基/完全培养基	缺氧箱A	2.5 h/18 h	凋亡检测(TUNEL)、ROS
ZHOU等 <sup>[57]</sup>	2021	人类细胞系	HCM	无血清心肌细胞培养基/含10%FBS心肌细胞培养基	三气培养箱B	4 h/4 h	MTT、凋亡检测(AnnexinV-FITCPI)、凋亡蛋白(Bcl-2、Bax)
WU等 <sup>[12]</sup>	2021	人类细胞系	HCM	无血清心肌细胞培养基(预适应12 h)/含10%FBS心肌细胞培养基	三气培养箱B	4 h/8 h	MTT、凋亡检测(AnnexinV-FITCPI)、凋亡蛋白(Bax、Caspase-3、Caspase-9)
TONG等 <sup>[58]</sup>	2021	人类细胞系	HCM(AC16)	无血清DMEM/完全培养基	缺氧箱C	6 h/24 h	CCK-8、凋亡检测(AnnexinV-FITCPI)、凋亡蛋白(Bax、Caspase-3、Caspase-9)
LU等 <sup>[59]</sup>	2019	人类细胞系	iPSC-CMs	完全培养基/完全培养基	缺氧箱C	24 h/24 h	凋亡检测(TUNEL)、ROS

注: NRVMs: 新生大鼠心室肌细胞; ARVM: 成年大鼠心室肌细胞; SOD: 超氧化物歧化酶、CAT: 过氧化氢酶、GSH: 谷胱甘肽、MDA: 丙二醛; 完全培养基: 高糖(4 500 mg/L)、10% FBS的DMEM培养基; 所有环境温度均为37 °C。A: 缺氧条件 95% N<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>, 复氧条件 95%空气和5% CO<sub>2</sub>; B: 缺氧条件 94% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>, 复氧条件 95%空气和5% CO<sub>2</sub>; C: 缺氧条件 95% N<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>, 复氧条件 95% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>。

## 参 考 文 献 :

- [1] MA L Y, CHEN W W, GAO R L, et al. China cardiovascular diseases report 2018: an updated summary[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2020, 17(1): 1-8.
- [2] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. ST段抬高型心肌梗死患者急诊PCI微循环保护策略中国专家共识[J]. *中华心血管病杂志*, 2022, 50(3): 221-230.
- [3] BROWN D I, GRIENDLING K K. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system[J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 531-549.
- [4] MOKHTARI-ZAER A, MAREFATI N, ATKIN S L, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(1): 214-222.
- [5] SHAN X, LV Z Y, YIN M J, et al. The protective effect of cyanidin-3-glucoside on myocardial ischemia-reperfusion injury through ferroptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8880141.
- [6] WU M Y, YANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [7] SHI H R, GAO Y, DONG Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury[J]. *Circ Res*, 2021, 129(3): 383-396.
- [8] TOLDO S, MAURO A G, CUTTER Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-H1568.
- [9] TOLDO S, MARCHETTI C, MAURO A G, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 209: 215-220.
- [10] SOROP O, van de WOUW J, CHANDLER S, et al. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction[J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4): 756-770.
- [11] WANG N, YU Y B. MiR-486 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced H9c2 cell injury by regulating forkhead box D3[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2022, 26(2): 422-431.
- [12] WU K P, CHEN Y, WANG D M, et al. MicroRNA-520d-3p alleviates hypoxia/reoxygenation-induced damage in human cardiomyocytes by targeting ATG-12[J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2021, 52(2): 429-439.
- [13] LI X, NI L C, WANG W X, et al. LncRNA Fendrr inhibits hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by downregulating p53 expression[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(9): 1211-1220.
- [14] LEE H L, CHANG P C, WO H T, et al. Beneficial electrophysiological effects of rotigaptide are unable to suppress therapeutic hypothermia-provoked ventricular fibrillation in failing rabbit hearts with acute ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 726389.
- [15] XIAO J, LIU R, CHEN C S. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model[J]. *Zool Res*, 2017, 38(3): 127-137.
- [16] ZHANG J, HUANG L L, SHI X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 24270-24287.
- [17] CHOU C C, LEE H L, HUANG Y C, et al. Single bolus rosuvastatin accelerates calcium uptake and attenuates conduction inhomogeneity in failing rabbit hearts with regional ischemia-reperfusion injury[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2020, 75(1): 64-74.
- [18] 贺帅, 刘欣媛, 齐琦, 等. 心脏原位垫线结扎法建立大鼠心肌缺血再灌注模型[J]. *包头医学院学报*, 2018, 34(12): 75-77.
- [19] BELL R M, MOCANU M M, YELLON D M. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(6): 940-950.
- [20] SCHECHTER M A, SOUTHERLAND K W, FEGEB B J, et al. An isolated working heart system for large animal models[J]. *J Vis Exp*, 2014(88): 51671.
- [21] LIU Y, DOSTAL D E, TONG C W. Isolation of Adult Mouse Cardiomyocytes Using Langendorff Perfusion Apparatus, Cardiovascular Development[M]. Clifton, N.J.: Springer, 2021: 143-152.
- [22] LI H T, LIU C G, BAO M H, et al. Optimized Langendorff perfusion system for cardiomyocyte isolation in adult mouse heart[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(24): 14619-14625.
- [23] MAWAD D, FIGTREE G, GENTILE C. Current technologies based on the knowledge of the stem cells microenvironments[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1041: 245-262.
- [24] DASAGRANDE D, R A S K, MUTHUSWAMY A, et al. Ischemia/reperfusion injury in male guinea pigs: an efficient model to investigate myocardial damage in cardiovascular complications[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 469-479.
- [25] HUANG Z Q, XU W, WU J L, et al. MicroRNA-374a protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in mice by targeting the MAPK6 pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 232: 116619.
- [26] 李言明, 刘晶, 张成成, 等. 一种改良的SD大鼠心肌缺血再灌注模型的建立[J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(4): 413-417.
- [27] VANDER HEIDE R S, STEENBERGEN C. Cardioprotection and myocardial reperfusion: pitfalls to clinical application[J]. *Circ Res*, 2013, 113(4): 464-477.
- [28] NAZIR S, GADI I, AL-DABET M M, et al. Cytoprotective activated protein C averts Nlrp3 inflammasome-induced ischemia-reperfusion injury via mTORC1 inhibition[J]. *Blood*, 2017, 130(24): 2664-2677.
- [29] ZHANG Y N, LIU D W, HU H J, et al. HIF-1 $\alpha$ /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109464.

- [30] CHANG S T, CHU C M, YANG T Y, et al. Optimal duration of coronary ligation and reperfusion for reperfusion injury study in a rat model[J]. *Acta Cardiol Sin*, 2016, 32(4): 491-497.
- [31] 杨天睿, 张荣平, 穆宁晖. 龙血竭对实验树鼯体外心肌缺血再灌注模型的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4): 137-142.
- [32] UCHINAKA A, KAWAGUCHI N, HAMADA Y, et al. Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 99(1): 102-110.
- [33] PENG Y W, MOHAMMED A, DEATRICK K B, et al. Differential effects of normoxic and hyperoxic reperfusion on global myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 31(2): 188-198.
- [34] MUESSIG J M, KAYA S, MOELLHOFF L, et al. A model of blood component-heart interaction in cardiac ischemia-reperfusion injury using a Langendorff-based *ex vivo* assay[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2020, 25(2): 164-173.
- [35] HIDALGO A, GLASS N, OVCHINNIKOV D, et al. Modelling ischemia-reperfusion injury (IRI) *in vitro* using metabolically matured induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes[J]. *APL Bioeng*, 2018, 2(2): 026102.
- [36] CHEN T, VUNJAK-NOVAKOVIC G. Human tissue-engineered model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25(9-10): 711-724.
- [37] KUZNETSOV A V, JAVADOV S, SICKINGER S, et al. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(2): 276-284.
- [38] WAN AB N W N, MOHAMED M M J, CHAN B T, et al. The study of myocardial ischemia-reperfusion treatment through computational modelling[J]. *J Theor Biol*, 2021, 509: 110527.
- [39] CHAN B T, AHMAD B A, AL ABED A, et al. Impact of myocardial infarction on intraventricular vortex and flow energetics assessed using computational simulations[J]. *Int j numer method biomed eng*, 2019, 35(6): e3204.
- [40] VELDHUIZEN J, CHAVAN R, MOGHADAS B, et al. Cardiac ischemia on-a-chip to investigate cellular and molecular response of myocardial tissue under hypoxia[J]. *Biomaterials*, 2022, 281: 121336.
- [41] SHARMA P, WANG X W, MING C L C, et al. Considerations for the bioengineering of advanced cardiac *in vitro* models of myocardial infarction[J]. *Small*, 2021, 17(15): e2003765.
- [42] QIU Q, SHEN T, YU X X, et al. Cardiac shock wave therapy alleviates hypoxia/reoxygenation-induced myocardial necroptosis by modulating autophagy[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 8880179.
- [43] LANG Z B, FAN X Z, LIN H Q, et al. Silencing of SNHG6 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by modulating miR-135a-5p/HIF1AN to activate Shh/Gli1 signalling pathway[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2021, 73(1): 22-31.
- [44] WANG F, MIN X, HU S Y, et al. Hypoxia/reoxygenation-induced upregulation of miRNA-542-5p aggravated cardiomyocyte injury by repressing autophagy[J]. *Hum Cell*, 2021, 34(2): 349-359.
- [45] CHENG C, XU D L, LIU X B, et al. MicroRNA-145-5p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by targeting ROCK1[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 796.
- [46] LI W J, NIE S P, YAN Y, et al. The protective effect of *Ganoderma atrum* polysaccharide against anoxia/reoxygenation injury in neonatal rat cardiomyocytes[J]. *Life Sci*, 2009, 85(17-18): 634-641.
- [47] LIU X J, LV Y F, CUI W Z, et al. Icariin inhibits hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis of cardiomyocytes via regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(11): 2966-2976.
- [48] GUO C Y, ZHANG L, GAO Y X, et al. Cox-2 antagonizes the protective effect of sevoflurane on hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibiting the Akt pathway[J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 4114593.
- [49] LU P, XIAO S H, CHEN S Z, et al. LncRNA SNHG12 downregulates RAGE to attenuate hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cells[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2021, 85(4): 866-873.
- [50] ZHENG B, QI J Y, LIU P P, et al. 10-gingerol alleviates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury through inhibition of the Wnt5a/Frizzled-2 pathway[J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(7): 3917-3931.
- [51] CHEN S X, SUN T, LI X L. Nobiletin alleviates the hypoxia/reoxygenation-induced damage in myocardial cells by modulating the miR-433/SIRT1 axis[J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(8): e13844.
- [52] GONG N J, YANG X H, LI X Y, et al. MicroRNA-590-3p relieves hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis and autophagy by targeting HIF-1 $\alpha$ [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1077.
- [53] ZHU K Y, GUO J, YU X X, et al. Polypeptide globular adiponectin ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by inhibiting both apoptosis and necroptosis[J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 1815098.
- [54] XIANG H Y, YANG J S, LI J, et al. Citrate pretreatment attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury via regulating microRNA-142-3p/Rac1 axis[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 40(6): 560-569.
- [55] WANG D, CHEN T Y, LIU F J. Che-1 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by upregulation of Nrf2 signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4): 1084-1093.



- [56] DALAL S, DANIELS C R, LI Y, et al. Exogenous ubiquitin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiac myocyte apoptosis via the involvement of CXCR4 and modulation of mitochondrial homeostasis[J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(4): 492-501.
- [57] ZHOU K, XU Y, WANG Q, et al. Overexpression of miR-431 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced myocardial damage via autophagy-related 3[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2021, 53(2): 140-148.
- [58] TONG Q H, HU H Y, CHAI H, et al. Dysregulation of the miR-1275/HK2 axis contributes to the progression of hypoxia/reoxygenation-induced myocardial injury[J]. *Arch Med Res*, 2021, 52(5): 461-470.
- [59] LU Y F, BU M, YUN H F. Sevoflurane prevents hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting PI3KC3-mediated autophagy[J]. *Hum Cell*, 2019, 32(2): 150-159. (张蕾 编辑)

**本文引用格式:** 赵元彬, 胡龙龙, 余作忠, 等. 心肌缺血再灌注损伤模型复制方法的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(07): 46-54.

**Cite this article as:** ZHAO Y B, HU L L, YU Z Z, et al. Research progress in establishing myocardial ischemia-reperfusion injury model[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(7): 46-54.