

李楠,张晨,孙艳君,等. Langendorff 心脏灌流技术(针对心肌缺血再灌注)的应用和发展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 1070-1077.

Li N, Zhang C, Sun YJ, et al. Langendorff cardiac perfusion technique for myocardial ischemia reperfusion applications and developments [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1070-1077.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 08. 013

Langendorff 心脏灌流技术(针对心肌缺血再灌注)的应用和发展

李楠¹, 张晨^{2*}, 孙艳君¹, 高晟玮¹, 李多静¹, 王心蕊¹, 王保和^{3*}

(1. 天津中医药大学, 天津 301600; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300143;
3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300380)

【摘要】 Langendorff 离体心脏灌流模型技术具有可重复性强、给药方便和技术要求低等特点, 常被用于研究心肌缺血再灌注损伤。该模型排除了其他器官系统、神经系统或体液等影响。本文对该技术的步骤、动物的选择、灌流模式、灌注液的选择、检测的指标、缺血方式以及缺血和灌流时间的选择等方面进行了综述和优缺点的评价。

【关键词】 离体心脏; Langendorff; 缺血; 再灌注; 灌流

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-1070-08

Langendorff cardiac perfusion technique for myocardial ischemia reperfusion applications and developments

LI Nan¹, ZHANG Chen^{2*}, SUN Yanjun¹, GAO Shengwei¹, LI Duoqing¹, WANG Xinrui¹, WANG Baohe^{3*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China. 2. the Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300143. 3. the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300380)

Corresponding author: ZHANG Chen. E-mail: 15822746632@126.com; WANG Baohe. E-mail: wbh3423@sina.com

【Abstract】 The Langendorff ex vivo heart perfusion model is a widely used technique used for investigating myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) because of its notable advantages of high reproducibility, ease of drug administration, and low technical requirements. This model excludes confounding influences from other organ systems, neural pathways, and circulating factors, making it an ideal choice to study MIRI-related diseases. In this review, we provide a comprehensive assessment of the Langendorff perfusion technique, encompassing its procedural steps, animal selection criteria, perfusion modes, choice of perfusion buffer, relevant assessment indices, Methods of inducing ischemia, and considerations for ischemia and reperfusion time intervals. We discuss the strengths and limitations of this model to aid researchers in its proper application in studying MIRI. By analyzing the relevant literature, this review serves as a valuable resource to enhance understanding and implementation of the Langendorff perfusion model in cardiac research.

【Keywords】 isolated heart; Langendorff; ischemia; reperfusion; perfusion

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目] 天津市教委科研计划项目(自然科学)(2021KJ163)。

Funded by Research Program of Tianjin Municipal Education Commission (Natural Science) (2021KJ163).

[作者简介] 李楠(1994—), 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中医药对心脑血管的防治研究。Email: 595216040@qq.com

[通信作者] 王保和(1964—), 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 心脑血管疾病中医药防治、中药临床药理研究及中药临床评价。Email: wbh3423@sina.com;

张晨(1988—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 心脑血管疾病中医药防治。Email: 15822746632@126.com。

* 共同通信作者

Langendorff 离体心脏灌流模型技术是一种体外技术,用于研究动物心脏的药理学和生理学。该模型具有多项优点,包括模拟心脏缺血状态、实时将药物直接输送至心肌并对药物进行功能评估等特点。Oscar Langendorff 利用逆行灌注的原理于 1895 年开创了离体哺乳动物心脏灌注系统^[1]。从那时起,Langendorff 不断发展并提供了丰富的数据来支持对心脏基本生理学的理解。近年来,该技术在研究心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 和心律失常方面得到广泛应用,同时也被用于分离成年大鼠心肌细胞^[2-3]。

MIRI 是指由于心肌供血的中断和在一定时间的恢复时对原有缺血的心肌造成更严重的损伤^[4]。它是一个复杂的过程,涉及各种病理机制,可对心肌产生有害的影响。MIRI 经常发生在恢复心脏血流的医疗干预过程中,如经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 或冠状动脉旁路移植 (CABG)。因此,MIRI 疾病成为近几年研究的热点。

利用 Langendorff 通过停止灌流液中的氧气供应,模拟心肌缺血,心肌无法获得氧气,导致损伤;随着再次将灌流液通入冠脉中,模拟心肌再灌注,从而导致进一步的损伤。因此,本文将对 Langendorff 灌流技术模拟 MIRI 的发展和应用进行综述。

1 灌流原理

利用逆行灌注的方法,通过心脏主动脉插管灌注,随着灌注缓冲液的充盈,主动脉瓣在压力下关闭。主动脉内的灌注液,通过主动脉根部的两个冠

状动脉口 (左和右) 填充。然后灌注缓冲液进入冠状动脉血管,通过冠状静脉流出到右心房的冠状窦 (位于后心房三尖瓣的隔叶上方),通过右心房流出^[5]。

2 常规步骤

(1) 配制 Krebs Henseleit 缓冲液 (KHB), 向 KHB 中通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,缓冲液 pH = 7.4,并取部分 KHB 放入冰箱中,使其温度降到 4℃。(2) 使用前用蒸馏水清洁 Langendorff 管路,打开水浴循环,再用 KHB 将整个灌流管路系统进行冲洗。确保清除管内的气泡。(3) 大鼠充分肝素化后,麻醉,固定至手术台,开胸,取下完整心脏,放入预冷 KHB 中去除血液。(4) 将灌流管插入主动脉中,固定心脏,逆行灌入预先以 95% O₂ 和 5% CO₂ 氧合的 KHB,剪开右心耳以便灌流液流出,以此状态平衡 20 min。(5) 待心脏复跳后,将左心耳剪开,经左心耳穿过二尖瓣,将一个心室内压球囊插入左心室,通过压力感受器连接,并全程记录心脏电生理活动。(6) 全心缺血再灌注方案:转动旋钮使 KHB 停止流入冠状动脉,引起缺血。缺血完成后,再次打开旋钮,使 KHB 再次流入冠状动脉,实现再灌注 (见图 1)^[5]。

3 动物选择

3.1 动物类别

几乎大多数哺乳动物心脏均可用于 Langendorff 离体心脏灌注模型,较大体积动物 (猪、猴或狗) 的

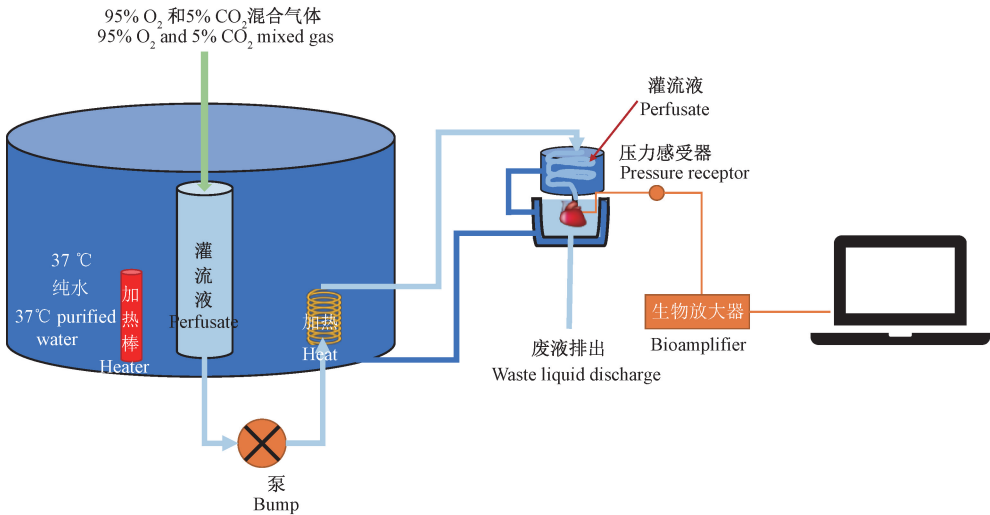


图 1 Langendorff 离体心脏灌流模型
Figure 1 Langendorff isolated heart perfusion model

心脏便于操作,且结果更接近人类血液动力学特征^[6],但是大型哺乳动物成本相对较高,对灌流液消耗较大。啮齿类动物(大、小鼠、兔子、豚鼠等)相对成本较低,受到研究者的青睐。但是不同啮齿动物的心脏电生理不同。研究发现大鼠、豚鼠和兔心脏在动作电位的复极化不同。豚鼠心室肌细胞不产生瞬时外向钾电流,并且存在幅度非常高的延迟整流电流。而兔心室细胞有大约一半表现出 1 期复极化和瞬时外向电流。大鼠心室肌细胞也有明显的 1 期复极化,但是缺乏明显的平台期,动作电位明显短于兔和豚鼠心室肌细胞^[7]。不同动物心脏适合的模型不同,经过实验研究评估豚鼠、大鼠和兔的缺血再灌注损伤的反应,大鼠离体心脏的缺血恢复最为显著;而豚鼠对缺氧的抵抗力比较强^[8],缺血再灌注对豚鼠影响较低;而兔更多被用于 Langendorff 心律失常模型。因此大鼠更适合用于 Langendorff 离体心脏缺血再灌注模型;此外由于大鼠羟自由基的产生更为显著(心律失常的发生率和严重程度与羟基自由基的产生之间存在密切关系),因此大鼠心脏也适合于缺血再灌注损伤诱发心律失常模型^[9]。随着转基因小鼠作为人类疾病转基因模型的研究逐渐广泛,转基因小鼠也成了 Langendorff 技术常使用的动物类型,虽然小鼠心脏结构小巧,考验研究者操作水平,但是依然是研究者常采用的物种。

3.2 动物性别

不同性别也对 Langendorff 离体心脏灌流模型有影响。与雄性动物相比,雌性动物对心肌缺血再灌注损伤的耐受性更高,提高了心脏存活率。一个犬类心脏实验的结果表明,雌激素可能会限制梗死的范围^[10]。研究发现雌激素补充的大鼠在心肌缺血再灌注后具有更高的冠状动脉血流速度和左心室压力以及生成更高的硝酸盐(硝酸盐通过调节 eNOS 和 iNOS 表达并抑制心脏中的脂质过氧化作用来提供心脏保护以防止心肌缺血再灌注损伤)^[11]。另外有团队研究发现雌激素会增加线粒体连接蛋白 43(Cx43)的含量和磷酸化,Cx43 是一种间隙连接蛋白,越来越多的证据表明,Cx 蛋白与线粒体的多个功能有关,包括线粒体复合物 I 介导的耗氧和 ATP 产生、钾处理、mPTP 开放和 ROS 形成,因此雌激素通过调节 Cx43 间接性的起到心脏保护作用^[12]。在动物性别的选择上,需要对心脏存活率和成模率之间斟酌。一个研究对 Langendorff 相关

基础研究的动物性别进行统计,发现雄性动物的研究占 63.3%,两种性别都选的研究占了 11.6%,仅 5.1%的研究选择使用雌性动物^[13]。

3.3 动物年龄

动物的年龄也对该模型具有影响。与青年鼠(4 ~ 6 个月)相比,老年鼠(18 ~ 20 个月)再灌注后,LVDP、dp/dtmax 和 dp/dtmin 的恢复率有降低的趋势,老年鼠心肌缺血再灌注损伤程度加重,可能与老龄鼠心肌细胞凋亡和坏死的加速,心肌细胞总数减少,心肌细胞为了维持心功能恢复而发生适应性肥大,并且胶原沉积增加,导致严重的心功能受损^[14]。较早前研究结果显示,对缺血抵抗力的年龄依赖性变化呈现双相模式,耐受性增加至 23 日龄,随后下降。因此,未成熟的大鼠心脏在缺血和再灌注期间比新生儿大鼠心脏更不易受损,成熟心脏比年轻的心脏更容易受损^[15]。

3.4 动物体重

不同体重的大鼠心脏心室腔和冠脉体积也会有差异,因此需选择体重保持在一定范围内的大鼠。笔者在练习时,利用体重超过 500 g 的大鼠心脏灌流,发现即使泵速已经达到最高(13.17 mL/min),灌注压依然无法达到 65 mmHg。这可能是由于重量更大的心脏,冠脉总体积比体重小的心脏的相对体积大,在同一泵速下,灌脉压更小(保持在同一心率下)。并且为了保证心脏左心室发展压能够保持在同一基线,球囊的大小也需要根据心脏大小进行调整,因此,同一批实验,最好保证大鼠体重保持在同一水平。

4 灌流模式

4.1 恒定灌注压力模式(稳定压力)

在恒定压力设置下,灌注压力保持恒定,研究者可以检测实验过程中灌注液流量的变化。一种方法是通过设置流体柱保持在一定的高度来施加恒定的灌注压力,或者通过蠕动泵调整流速保持灌注压力恒定。该模式下,可以自动调节冠状动脉血管张力和改变灌注流量匹配心脏需求的能力。大鼠灌注压力一般维持在 60 ~ 70 mmHg。

4.2 恒定灌注流量模式(稳定流量)

恒定灌注流量模式是指使用蠕动泵使灌注液通过冠状动脉血管的流速保持恒定,研究者可以观察冠状动脉压力的变化,因此,恒流模式更适合评估冠脉血管对药物的反应。但是恒定流量灌注模

式不可以根据心脏的情况进行调节,比如在局部缺血时,由于灌流液在相同时间内流入灌流液体积不变,相同量的灌流液进入结扎后的冠脉,冠脉总体积变小,灌注液比冠脉结扎前相对变多,容易在结扎部位导致冠状动脉损伤。大鼠灌流量一般在 10 ~ 15 mL/min,家兔为 20 mL/min^[16-17]。

5 灌注液类型

灌注液具有血液的基本特质,一般灌注液具有缓冲能力(pH = 7.4),提供能量来源,具有渗透压、携氧能力,并且灌注液在灌注时保持的生理温度 37℃。

5.1 晶体灌注液

一般指的是 Krebs-Henseleit 缓冲液,由 Hans Krebs 和 Kurt Henseleit 开发,是目前离体心脏再灌注损伤模型使用最广泛的灌注缓冲液。KHB 包含钠(Na)、钾(K)、氯化物(Cl)、钙(Ca)、硫酸镁(MgSO₄)、碳酸氢盐(HCO₃⁻)、磷酸盐(PO₄³⁻)和葡萄糖。但是 KHB 中无蛋白质,渗透压低于生理水平,容易导致水肿,并且在没有血红蛋白存在的情况下,携氧力相对低。同时不能解决血细胞和血源性分子与心肌细胞和内皮细胞的基本相互作用(这种相互作用在病理生理条件下是非常重要的)。并且,在无红细胞灌注的动物心脏中,心室壁厚度相对较早增加,在某些情况下增加了 15%,而且这些心脏的功能稳定性明显低于血液灌注的心脏^[18]。此外,由于晶体灌注液粘稠度较血液粘稠度低,流量明显升高,长时间灌流会引起心肌水肿。尽管如此,由于 KHB 成本低、好获取,目前依然是多数研究者在 Langendorff 实验中,使用的灌注液类型。KHB 可以现用现配也可以配制成母液。配制母液时,不添加葡萄糖和 CaCl₂,需在使用时临时加,以防细菌滋生和溶液浑浊^[19]。此外由于灌流液中葡萄糖和钙离子的存在,灌流系统管壁容易残留细菌和形成结晶沉淀,在灌流过程中,有脱落的风险,从而堵塞冠脉,造成梗塞。因此文飞等^[20]在灌流系统远端加入输液器滤头,避免晶体沉淀和细菌栓子等异物进入冠脉血管。

5.2 全血灌注液

该方法需要供体动物,并对供体动物大动脉和静脉进行插管,动脉管连接到离体心脏的主动脉插管,供体动物的血液流入到离体心脏,然后收集离体心脏流出的血液,将其泵回供体动物的静脉,通过供体动物的呼吸系统给静脉血液充氧,如此循

环。该方法更接近生理情况,但是血液在体外循环时容易出现溶血的情况。此外,提供血液的供体动物因为体液在体外循环的原因,会导致内啡肽释放明显增加,研究证实内啡肽在大鼠心肌缺血再灌注损伤模型中有一定的心肌保护作用,因此可能影响实验结果^[21-22]。也有研究在缺血前利用小鼠全血和人类全血加载到离体鼠类的心脏中,并发现全血在 MI/RI 模型中起到保护作用,并且将转基因小鼠的血液成分加载到不同品系的小鼠心脏中,该方式有助于开发新的靶向治疗^[23]。

5.3 红细胞灌注

红细胞灌注是在 KHB 基础上,加入牛来源的红细胞和白蛋白,使灌注液维持生理渗透压,并且使心脏也能获得足够的氧气供应。在开始全心缺血时,将小鼠红细胞加载至离体小鼠冠脉中,当缺血结束后,用 KHB 重新灌注冠状动脉,减少血液在冠脉中存留的时间^[24]。有研究采用健康的人类红细胞注射到 Langendorff 灌注的小鼠心脏的冠状系统中,与小鼠红细胞发挥相当的心脏保护作用,并且另外有研究表明,2 型糖尿病人类患者的红细胞注入非糖尿病大鼠心脏中,与健康人类患者的红细胞相比,明显减弱了缺血后心脏功能。虽然人类红细胞携带抗原,可以诱导动物心脏的免疫调节反应,但是多个研究认为这种影响是微不足道的。因此,利用人类血细胞替代动物血细胞的方法为研究人类疾病提供了创新的实验方法^[23]。

由于全血灌注液或血细胞灌注液需要大量的血液,因此只能限制在使用大鼠或兔等相对大型的实验动物,而不能使用具有广泛基因修饰品系和较低成本的小鼠,增加了实验成本^[23]。此外,为了提高梗死面积,Yang 等^[25]在全心缺血期间将线粒体 DNA 片段加载到冠状动脉系统中。另外,有研究者在灌流液中加入丙酮酸,使离体心脏通过增强能量产生和抗氧化等机制,起到抗心肌缺血再灌注损伤的心脏保护作用 and 线粒体通透性转换孔的关闭的作用^[26]。

6 Langendorff 测量指标

6.1 心肌功能

利用 Langendorff 与检测模块连接后,在灌注过程中,直接检测心肌功能。离体心脏连接 Langendorff 后,剪开左心房,通过二尖瓣向内置入自制球囊^[27],注射器向内注水以调整球囊大小,使左

心室舒张末压保持在 5 ~ 7 mmHg (也有实验保持在 8 ~ 12 mmHg^[28]), 实时监测左心室压力, 利用压力轨迹计算心室功能的多个参数。比如左心室发展压 (LVDP), 计算收缩压和舒张压之差, 正常的大鼠的 LVDP 是 70 ~ 130 mmHg。此外还可以计算心率 (heart rate, HR)、左心室内压最大上升速率 (+ dp/dtmax)、左心室内压最大下降速率 (-dp/dtmax) 等。并且可以定时收集冠状动脉流出物的体积, 计算冠状动脉血流 (CF), 以此反应心肌功能。

6.2 心脏电活动

电活动是心脏不可缺少的检测指标, 如检测心电的正负电极分别置于心脏表面 (或蛙心夹)、连接生物放大器模块、直接描绘心脏表面心电图 (ECG)。此外, 利用铂金刺激电极连接多道电生理仪, 使用吸力或浮动电极的电气测量 (单点测量) 或使用单个光电探测器 (单点测量) 或图像传感器 (面积测量) 的光学测量^[29]。此外还可以利用多极阵列记录场电位^[30]。近几年, 多个研究联合光学映射技术使用荧光染料和相机对心脏组织的关键动态特性进行非接触式测量, 例如跨膜电位和细胞内钙浓度^[31]。一种常用的荧光分子是 di-4-ANEPPS, 作为可兴奋细胞 (如心肌细胞和神经元) 毫秒级动作电位变化的快速响应探针。染料被添加到灌注溶液中, 从而分布在整个心脏组织中, 以检测跨膜电位^[32]。但是一个兔孤立心脏模型结果显示, di-4-ANEPPS 对兔心脏自发心率和心室冲动传导具有显著的直接不可逆影响 (其他物种不确定), 因此兔心脏缺血性研究需要考虑到这一点^[33]。此外根据前面提到的原理, 针对钙离子浓度, 也可以使用荧光指示剂 Fluo-4 进行检测^[34]。

6.3 心脏代谢和心脏标志物

收集冠脉流出液, 通过测量心肌代谢物的产生和消耗来评估心脏代谢状态, 如 ATP、ADP、乳酸等。心脏停灌后容易引起心肌损伤, 因此心肌梗死的心脏标志物检测也是必不可少的, 如肌酸激酶、乳酸脱氢酶和肌钙蛋白等评估心脏损伤程度。此外, 实验结束后保留心脏, 可以用来做分子生物学分析 (如 Western Blot、PCR) 和形态学变化分析 (如利用 TTC 染色, 测量梗死面积)。

7 排除标准

心脏摘下后连接 Langendorff 后, 离体心脏需要 20 ~ 30 min 稳定期, 以便清除心脏在切除过程中产

生的有毒代谢物, 并且在此期间研究可根据排除标准观察心脏运作状态, 决定是否将该心脏纳入研究当中, 从而获得一致且可重现的数据, 降低实验失败的风险。不同动物, 排除标准不同。小鼠恢复灌注大于 4 min; 灌注小于 2 mL/min 或大于 5.5 mL/min; 每分钟心律失常发生频次大于 3 次, 心率小于 320 次或大于 620 次; 左心室发展压力小于 60 mmHg 或大于 140 mmHg。兔子恢复灌注大于 3 min; 灌注小于 55 mL/min 或大于 80 mL/min; 每分钟心律失常发生频次大于 3 次, 心率小于 150 次或大于 190 次; 左心室发展压力小于 70 mmHg 或大于 130 mmHg。大鼠恢复灌注大于 3 min; 灌注小于 10 mL/min 或大于 28 mL/min; 每分钟心律失常发生频次大于 3 次, 心率小于 70 次或大于 400 次; 左心室发展压力小于 70 mmHg 或大于 130 mmHg^[35]。心脏从动物体内取下到恢复灌注的时间是关键, 研究者需要尽量压缩这部分时间, 从而提高心脏的活性。左心室发展压提示左心室在收缩期内产生的最大压力, 是衡量左心室收缩功能和心肌收缩力的指标。灌注速度也影响心脏状态, 在平衡期灌注速度慢, 灌注压过低, 冠状动脉得不到很好的灌注; 灌注速度快, 使灌注压过高, 容易打开二尖瓣, 使灌注液进入心室, 且容易使心脏水肿。因此, 研究者依据排除标准, 可以保证心脏维持良好的活性。

8 缺血方式

Langendorff 缺血常见方式有两种: 一种是全心缺血, 往往是在稳定期结束后, 停止 Langendorff 的灌注, 之后直接打开旋钮恢复灌注; 另一种是局部缺血则是在稳定期后, 利用结扎线在左降支冠状动脉, 其他冠状动脉一直保持灌注, 实现局部灌注, 缺血结束后, 松开结扎线恢复灌注。这两者各有利弊, 对于全心缺血, 当心肌细胞死亡数量达到一定程度时, 心脏可能会停跳, 但是操作简单。而局部缺血需要研究者结扎冠状动脉, 由于每只动物个体的冠状动脉分布并不完全一致, 且实验者结扎手法无法保证完全一致, 这可能导致实验结果可比性降低, 但是心脏一直保持灌注的状态, 降低心脏停跳的风险。并且结扎线可能会破坏心肌组织, 因此也有研究者利用方式, 并且在圈内放置一个小的塑料管^[36]。对于两种缺血的方式比较, 目前尚未查询到相关研究, 因此无法确定哪种缺血方式更适合用于离体心脏缺血再灌注损伤的研究。

9 停灌和再灌时间

停灌和再灌注时间直接影响到造模成功与否,在国内樊官伟团队研究发现,在恒压模式下(65 mmHg),缺血 20 min 时对大鼠离体心脏再灌注即可造成损伤,然而 40 min 缺血后,再灌注造成的损伤较为严重,综合考虑到模型建立的成功、损伤后可恢复的程度和药物的干预性,建议停灌 30 min。对于再灌注时间,樊官伟团队研究发现 60 min 足够造成心脏血流动力学和心肌梗死面积等指标的改变^[37]。另外一个研究在 80 mmHg 的恒定压力下, KHB 中加入了丙酮酸盐,对小鼠心脏分别缺血 5、15 和 20 min,再灌注 45 min 后,心功能可以恢复至长期保持灌注的心功能状态;而在缺血 25、30、45 和 60 min 后,CK 的释放显著增加,并且随着 45 min 再灌注结束后,心肌发生广泛的损伤。与樊官伟团队的研究结果一致,缺血 60 min 后,心脏 LV dP/dt max 的恢复降低至接近 0,表明可能已达到最大程度的损伤^[26]。结合以上文献大鼠离体心脏建议停灌 30 min,再灌注 60 min。但是不同实验室条件可能还需要结合实际,确定最佳合适时间。

10 肝素的应用

笔者实验时发现,未使用肝素的大鼠心脏在不改变灌流速度时,灌流后期灌注压会持续增高,甚至可以升高至 130 ~ 140 mmHg。这可能是冠状动脉系统中残留的血液逐渐凝固,形成微血栓堵塞血管,使得灌流液通过冠脉阻力增大。使用肝素后,这种情况得到很大程度的改善。对于肝素的应用,多数研究者是对大鼠麻醉前 15 ~ 20 min 通过腹腔注射肝素(1000 U/kg)^[38];另有研究者对大鼠开胸后,利用含肝素的 KHB 冲洗心脏,再摘取心脏^[39]。

11 结语

随着缺血性心脏病的高发病率和针对其治疗如介入和溶栓等手术方式的广泛应用,使得心脏缺血再灌注损伤疾病成为研究的重点。因此这样的研究离不开利用动物构建心肌缺血再灌注损伤模型。Langendorff 离体心脏灌流技术得以延续百年之久,离不开该技术的可重复性、成模率高和技术要求低等特点。目前利用该技术的研究越来越多,但是该技术变量较多,包括动物的选择、灌流液的配制和缺血的方式等,每个步骤基本都可能影响实验

的成败。因此,虽然各个条件各有优缺点,研究者需结合自身实验设计摸索出最佳的实验条件。

Langendorff 原理采用逆灌的方式实现,与心脏的自然工作状态不同。此外,测定心室发展压需要手动放置球囊,但这个过程以及球囊在心室内的位置都可能对心脏造成损伤。相比之下,Working heart 系统通过模拟心脏血液流动进行灌注,左心房和主动脉由恒定速度的泵提供动力。Working heart 系统能够保持心脏的天然心律和心室壁张力,在测定心室压时无需插入球囊。尽管如此,由于操作简单,Langendorff 技术一直受到研究者的青睐。相对于 Working heart 系统,Langendorff 技术更容易操作,无需复杂的动物手术和灌注系统。这使得许多实验室,尤其是初学者或资源有限的实验室,普遍采用 Langendorff 技术。尽管 Langendorff 已应用上百余年,但是随着科学技术的发展,越来越多(如光学映射和多极阵列等^[30]) 高端先进技术能够与 Langendorff 技术相结合,使得 Langendorff 灌流技术历久弥新。

参 考 文 献(References)

- [1] Taegtmeier H. One hundred years ago: Oscar Langendorff and the birth of cardiac metabolism [J]. Can J Cardiol, 1995, 11 (11): 1030-1035.
- [2] Li SH, Ma GL, Zhang SL, et al. Naringin exerts antiarrhythmic effects by inhibiting channel currents in mouse cardiomyocytes [J]. J Electrocardiol, 2023, 80: 69-80.
- [3] Li H, Liu C, Bao M, et al. Optimized Langendorff perfusion system for cardiomyocyte isolation in adult mouse heart [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(24): 14619-14625.
- [4] He J, Liu D, Zhao L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury: mechanisms of injury and implications for management (Review) [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(6): 430.
- [5] Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen [J]. Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1897, 66(7-8): 355-400.
- [6] Christoph J, Schröder-Schetelig J, Luther S. Electromechanical optical mapping [J]. Prog Biophys Mol Biol, 2017, 130: 150-169.
- [7] Varró A, Lathrop DA, Hester SB, et al. Ionic Currents and action potentials in rabbit, rat, and Guinea pig ventricular myocytes [J]. Basic Res Cardiol, 1993, 88(2): 93-102.
- [8] Rivera-Ch M, León-Velarde F, Huicho L, et al. Ventilatory response to severe acute hypoxia in Guinea pigs and rats with low hemoglobin-oxygen affinity induced by phytic acid [J]. Comp Biochem Physiol A, 1995, 112(3-4): 411-416.
- [9] Rokeach R, Nesterova T, Ushenin K, et al. Anatomical model of rat ventricles to study cardiac arrhythmias under infarction injury [J]. Mathematics, 2021, 9(20): 2604.

- [10] Zhou KQ, Davidson JO, Gunn AJ. Does sex materially modulate responses to therapeutic hypothermia? [J]. *Pediatr Res*, 2023, 2023; 1-2.
- [11] Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, et al. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279 (6): H2766-H2775.
- [12] Boengler K, Ruiz-Meana M, Gent S, et al. Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8): 1649-1655.
- [13] King DR, Hardin KM, Hoeker GS, et al. Reevaluating methods reporting practices to improve reproducibility: an analysis of methodological rigor for the Langendorff whole heart technique [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2022, 323 (3): H363-H377.
- [14] 胡荣. 浅治疗性低体温(34℃)对青年和老年大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其作用机制的研究 [D]. 南昌: 南昌大学; 2015.
- Hu R. Effect of mild therapeutic hypothermia (34℃) on myocardial ischemia-reperfusion injury in young and old rats and its mechanism [D]. Nanchang: Nanchang University; 2015.
- [15] Riva E, Hearse DJ. Age-dependent changes in myocardial susceptibility to ischemic injury [J]. *Cardioscience*, 1993, 4 (2): 85-92.
- [16] Liao R, Podesser BK, Lim CC. The continuing evolution of the Langendorff and ejecting murine heart: new advances in cardiac phenotyping [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303 (2): H156-H167.
- [17] Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart [J]. *Pharmacol Res*, 2000, 41(6): 613-627.
- [18] Schmitz-Spanke S, Seyfried E, Schwanke U, et al. The isolated rabbit heart: comparison between five different modifications [J]. *Herz*, 2002, 27(8): 803-813.
- [19] 李玉红, 段真珍, 高秀梅, 等. Langendorff 离体心脏灌流模型及在研究线粒体通透性转换中的应用 [J]. *天津中医药*, 2013, 30(7): 442-445.
- Li YH, Duan ZZ, Gao XM, et al. Langendorff isolated heart perfusion model and its application in studying mitochondrial permeability transition [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2013, 30 (7): 442-445.
- [20] 文飞, 赖婷婷, 李瑶. Langendorff 离体大鼠心脏灌流实验的改进及其效果 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16 (54): 34.
- Wen F, Lai TT, Li Y. Improvement and effect of Langendorff isolated rat heart perfusion experiment [J]. *World Latest Med Inf*, 2016, 16(54): 34.
- [21] Spanos E, Karlsson LO, Redfors B, et al. Cardioprotection of the enkephalin analog Eribis peptide 94 in a rat model of ischemia and reperfusion is highly dependent on dosing regimen and timing of administration [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 747: 1-6.
- [22] Pasini E, Solfrini R, Bachetti T, et al. The blood perfused isolated heart: characterization of the model [J]. *Basic Res Cardiol*, 1999, 94(3): 215-222.
- [23] Muessig JM, Kaya, 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.
- [24] Yang J, Zheng X, Mahdi A, et al. Red blood cells in type 2 diabetes impair cardiac post-ischemic recovery through an arginase-dependent modulation of nitric oxide synthase and reactive oxygen species [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3 (4): 450-463.
- [25] Yang XM, Cui L, White J, et al. Mitochondrially targeted Endonuclease III has a powerful anti-infarct effect in an *in vivo* rat model of myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(2): 3.
- [26] Wang QD, Swärdh A, Sjöquist PO. Relationship between ischaemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts [J]. *Acta Physiol Scand*, 2001, 171(2): 123-128.
- [27] Miller A, Wright GL. Fabrication of murine ventricular balloons for the langendorff heart preparation [J]. *J Biotechnol Biomater*, 2011, 1(101): 1000101.
- [28] 白枫, 何倚帆, 牛亚楠, 等. 超细颗粒物对大鼠离体灌注心脏功能的影响 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2021, 53(2): 240-245.
- Bai F, He YF, Niu YN, et al. Effects of ultrafine particulates on cardiac function in rat isolated heart [J]. *J Peking Univ (Health Sci)*, 2021, 53(2): 240-245.
- [29] 魏丽芳. 急性 ST 段抬高型心肌梗死不同 ST 段抬高的形态和幅度的电生理机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学; 2022.
- Wei LF. Study on electrophysiological mechanism of different ST segment elevation in acute ST segment elevation myocardial infarction [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2022.
- [30] Zhong P, Quan D, Huang Y, et al. CaMKII activation promotes cardiac electrical remodeling and increases the susceptibility to arrhythmia induction in high-fat diet-fed mice with hyperlipidemia conditions [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 70(4): 245-254.
- [31] Schröder-Schetelig J. Multimodal high-resolution mapping of contracting intact Langendorff-perfused hearts [D]. Goettinge: Georg-August-Universität Göttingen; 2021.
- [32] Suchodolski J, Krasowska A. Plasma membrane potential of *Candida albicans* measured by di-4-ANEPPS fluorescence depends on growth phase and regulatory factors [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(4): 110.
- [33] Ronzhina M, Stracina T, Lacinova L, et al. Di-4-ANEPPS modulates electrical activity and progress of myocardial ischemia in rabbit isolated heart [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 667065.
- [34] Fast VG. Simultaneous optical imaging of membrane potential and intracellular calcium [J]. *J Electrocardiol*, 2005, 38(4): 107-112.
- [35] Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion;

the Langendorff technique of isolated heart perfusion [J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(6): 940-950.

[36] Ismaeil A, Babiker F, Al-Sabah S. Discrepancy between the actions of glucagon-like peptide-1 receptor ligands in the protection of the heart against ischemia reperfusion injury [J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(6): 720.

[37] 于佳慧, 李玉红, 段真珍, 等. 不同缺血再灌注时间对大鼠离体心脏缺血_再灌注损伤的影响 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(18): 1605-1609.

Yu JH, Li YH, Duan ZZ, et al. Effects of different time on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. Chin J Pharmacol, 2014, 49(18): 1605-1609.

[38] 王小晓, 王幼平, 余海滨, 等. 大鼠 Langendorff 离体心脏灌

流模型的制备经验及其影响因素分析 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(6): 184-186.

Wang XX, Wang YP, Yu HB, et al. Preparation experience on model of Langendorff isolated heart perfusion in rat and analysis of influence factors [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2014, 30(6): 184-186.

[39] Butova XA, Myachina TA, Khokhlova AD. A combined Langendorff-injection technique for simultaneous isolation of single cardiomyocytes from atria and ventricles of the rat heart [J]. MethodsX, 2021, 8: 101189.

[收稿日期] 2023-07-07

辐射防护剂研究进展

随着核电站的建立、人类太空活动的增加、临床上放射诊疗设备的广泛应用以及核武器恐怖威胁等因素的持续存在,人类暴露于电离辐射和核辐射的可能性日益增加。日本核电站泄漏事故和持续 1 年的俄乌冲突更是加剧了核威胁的紧张局势,公众及国际社会都在持续关注核辐射等辐射损伤的危害和救治方案,以及应急准备。

2016 年 1 月,中国发布了《中国核应急》白皮书,全面更新中国核应急体系与响应战略。世界卫生组织 (WHO,2013)更新了应对辐射和核应急的储备药物清单以及应用管理的政策建议。本综述简要介绍 WHO 辐射应急防护政策建议以及在急性放射病(ARS)动物模型中能够提高受照动物生存率的辐射防护剂,以及中草药表现出的抗辐射作者用。

在这篇综述中,作者重点介绍了 WHO 应对辐射和核紧急情况建议储备的药物清单、辐射防护药物的研发进展,以及部分中医药在降低急性放射病死亡率方面的研究。自 20 世纪 60 年代以来,我国科研人员致力于挖掘中药资源宝库,开发具有抗辐射作用的中药方剂、中药单药、中药活性提取物及单体中药或方剂中含有的活性成分,发现这些有效药物具有预防自由基损伤、减轻 DNA 损伤、减少细胞凋亡、刺激损伤后修复的作用,且副作用很小。结果显示部分中药能显著降低致死剂量全身照射小鼠的死亡率,具有防治急性放射病的潜能。

在核事故和核恐怖主义威胁下,急救人员、专业工作人员和普通公众需要不同的辐射防护剂。急性放射病包括骨髓型、胃肠型和脑型,目前的可使用辐射防护药物较少,且主要针对急性造血系统辐射损伤,其他类型急性放射病缺乏有效的防护药物,无法满足国家辐射应急战略储存和医疗管理的需求。许多国家已投入大量资金加快辐射防护剂的研发,但仍面临诸多挑战。开发具有原创性的辐射防护和治疗药物已经迫在眉睫。

该研究成果发表于《动物模型与实验医学(英文)》期刊 (Animal Models and Experimental Medicine, 2023, 6(4):329-336. <https://doi.org/10.1002/ame2.12339>)