

# 不同程度缩窄主动脉弓致小鼠心肌肥厚及心力衰竭的评价与比较

王迎超 赵菁 张玲 南金良 钟智伟 朱伟

310009 杭州, 浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心 (王迎超、赵菁、钟智伟); 310009 杭州, 浙江省心血管病诊治重点实验室 (张玲、南金良、朱伟)

通信作者: 朱伟, Email: weizhu65@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.08.012

基金项目: 国家自然科学基金 (81573641, 81370346)

## Evaluation and comparison of hypertrophy and heart failure induced by transverse aortic constriction with different degrees of stenosis of aorta

Wang Yinchao, Zhao Jing, Zhang Ling, Nan Jinliang, Zhong Zhiwei, Zhu Wei

Clinical Research Center, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China (Wang YC, Zhao J, Zhong ZW); Laboratory of diagnosis and treatment of cardiovascular disease Zhejiang Province, Hangzhou 310009, China (Zhang L, Nan JL, Zhu W)

Corresponding author: Zhu Wei, Email: weizhu65@163.com

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81573641, 81370346)

慢性心力衰竭 (Chronic heart failure, CHF) 是高血压、缺血性心肌病和心瓣膜病等许多心血管疾病终末期的临床表现。不同的心衰模型, 其作用原理、制备方法和模型特点各异, 目前常用的造模方法有: 药物腹腔注射<sup>[1-2]</sup>、冠状动脉左前降支结扎<sup>[3-4]</sup>、快速起搏致心动过速心肌病<sup>[5]</sup>及通过缩窄主动脉造成压力超负荷<sup>[6-7]</sup>等。其中缩窄主动脉弓可以通过增加心脏后负荷诱导左室向心性肥厚并最终导致心衰。Rockman 等<sup>[8]</sup>首先通过主动脉弓缩窄 (transverse aortic constriction, TAC) 建立该小鼠动物模型, 之后 TAC 模型就被广泛用于临床实验动物研究。目前关于主动脉弓缩窄制作方法主要是采用 27 G 规格的垫针使主动脉部分缩窄, 然而不同文献所用实验小鼠 8~40 周龄和体质量 18~38 g 的变化范围也很大<sup>[9-13]</sup>。相应地, 造模后心肌肥厚发展历程及其向心力衰竭的转变时程也不一致, 动物或因缩窄过重没有出现早期代偿性肥厚向晚期失代偿心力衰竭的转化过程, 仅表现为慢性心力衰竭, 甚至急性心源性猝死。或因主动脉狭窄程度过于轻微只是出现轻度心肌肥厚, 而未能及时出现心力衰竭。这些由于动物体质量不一致导致选取垫针不恰当造成的模型失败, 无法为研究疾病提供可靠的病理生理分子基础。

因此本研究即通过选择相同体质量的小鼠, 应用 22 G 和 27 G 两种不同尺寸的垫针建立主动脉弓缩窄模型, 旨在探讨对于相同体质量的动物使用不同大小的垫针进行主动

脉缩窄后模型的病理过程, 研究不同主动脉缩窄程度对小鼠代偿性心肌肥厚及其向其向失代偿心力衰竭转变过程的影响, 为更好模拟临床发病机制提供可靠的模型制作方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验动物: 20~24 g C57BL/6 雄性小鼠 65 只, 购自浙江中医药大学实验动物中心, 饲养于浙江大学医学院附属第二医院小动物实验中心, 自由进食饮水, 适应性饲养 1 周后用于实验。

仪器: ALC-V8S 小动物呼吸机 (上海奥尔科特生物科技有限公司), Vevo 2100 小动物心超仪 (Visual Sonics, 加拿大), 体视拍照显微镜 (Olympus, 日本), 冰冻切片机 (Leica, 德国), DM5500 正置荧光显微镜 (Leica, 德国)。

试剂: 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司, 上海), 蔗糖 [ (生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 上海)], WGA 染液 (Invitrogen, 美国), PBS 缓冲液。

### 1.2 实验方法

1.2.1 主动脉弓缩窄模型的构建 实验分为假手术对照组 ( $n=8$ ), 27G 缩窄组 ( $n=43$ ) 和 22G 缩窄组 ( $n=14$ ) 三组。小鼠适应性饲养 1 周后, 腹腔注射水合氯醛麻醉固定, 气管插管后接通小动物呼吸机, 调节参数 (呼吸频率 95, 呼吸比 1:2, 潮气量 1.0 mL)。于左胸前区上方剪开皮肤,

分离肌肉，暴露肋骨。撑开 4~5 肋，分离左右胸腺，用 6-0 丝线自主动脉弓头臂干和左颈总动脉分支处穿线，于其上方放置 22 G 或 27 G 垫针并将垫针结扎，然后快速将垫针拔出，以达到缩窄主动脉弓的作用。此时可见主动脉与头臂干分支处充血，而结扎线下游血管扁平，说明缩窄成功。

1.2.2 心肌肥厚及心衰模型的评价 (1) 高频超声心动检测：分别于造模后 4、8 和 12 w 应用小动物超声仪进行经胸心脏超声检查，异氟烷麻醉小鼠后固定，于胸骨旁左心室乳头肌水平短轴切面采集 M 型超声心动图，比较各组小鼠室壁厚度和左心室射血分。(2) 心脏整体形态和体质量指数计算：造模后 12 w 处死小鼠，称量记录体质量及心脏重量，计算心脏体质量指数大小，心脏使用体视显微镜记录整体形态。(3) 心肌细胞肥大检测：心脏组织经 30% 蔗糖脱水、OCT 包埋切片后，PBS 清洗 3 次，室温避光孵育 5 μg/mL WGA 染液，15 min 后再次 PBS 清洗 3 次，封片后荧光显微镜下拍照，观察小鼠心肌细胞肥大情况。

### 1.3 统计学方法

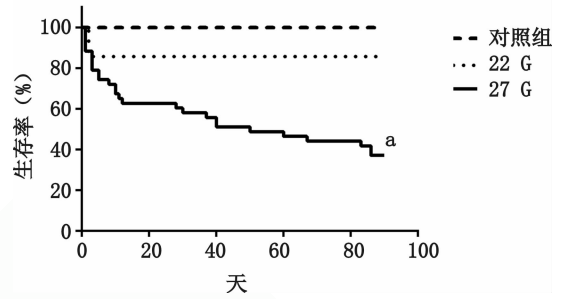
生存率采用 GraphPad Prism 6 软件分析，其余实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，多组间比较采用 two way ANOVA 方法检验，以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 动物 TAC 造模术后存活率比较

观察记录各组小鼠 TAC 术后存活率，发现术后 1 周对

照组动物没有死亡，22G 和 27G 两组动物分别死亡 2 只和 9 只。但是随着小鼠心肌肥厚和心力衰竭的发展，至术后 12 周时 27G 组小鼠病死率明显增加，存活率显著降低，而 22G 组小鼠维持原有生存率不变。(图 1)

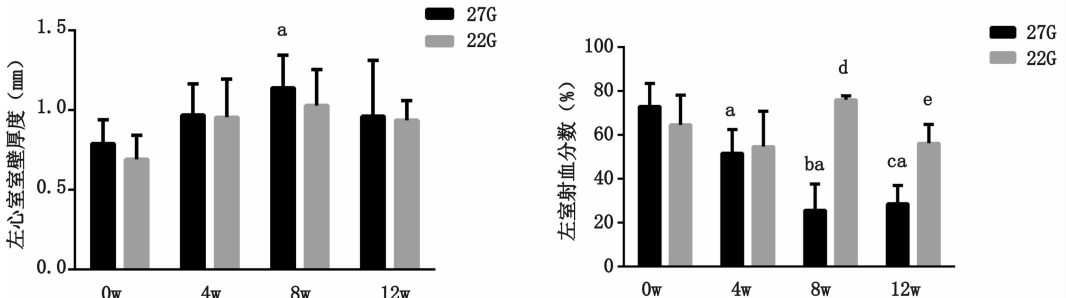
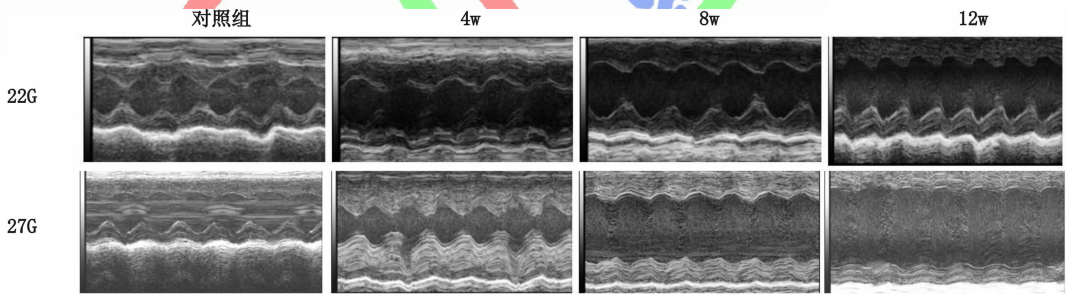


与对照组和 22G 组相比较,  $^a P < 0.01$

图 1 术后 12 w 各组小鼠存活率

### 2.2 高频超声心动检测心肌肥厚及心衰发展

TAC 术后 8 w 高频超声心动检测小鼠心功能，发现与 TAC 术前 0 周对照组相比较，22G 和 27G 垫针均造成一定程度的心肌肥厚，且 27G 垫针更为明显。同时通过测定对比 22G 和 27G 组造模 8w、12w 时小鼠心功能，发现术后 8 w 27G 组小鼠即出现心腔变大的趋势，12w 时心腔明显变大，心功能较 22G 组显著降低，说明 27G 组小鼠由心肌肥厚转换为心力衰竭的时程较早 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

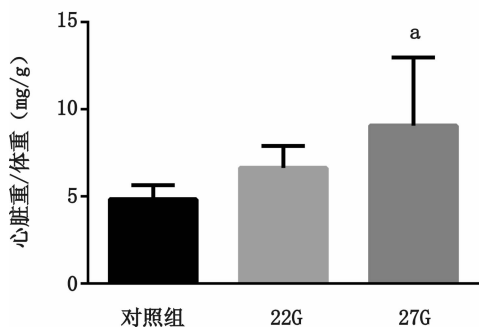


与 TAC 0 w 相比较,  $^a P < 0.01$ ; 与 27G 4 w 相比较,  $^b P < 0.01$ ;  $^c P < 0.05$ ; 与 27G 8 w 相比较,  $^d P < 0.01$ ; 与 27G 12 w 相比较,  $^e P < 0.05$

图 2 术后各组小鼠心功能测定

## 2.3 心脏体质量指数比较

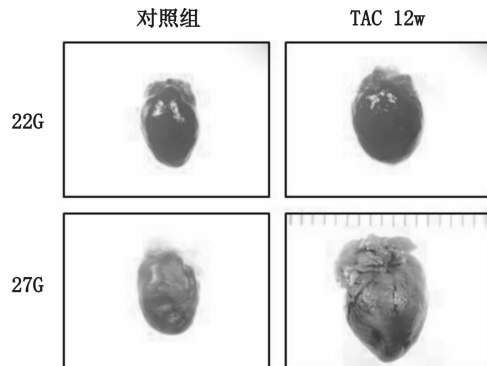
于 TAC 术后 12 w 处死动物, 记录体质量 (BW) 和心脏重量 (HW), 计算 HW/BW, 同时体视显微镜拍照观察心脏整体形态。在术后 12 w, 27G 组小鼠心脏出现向心性塌陷, 显示心室壁变薄, 说明小鼠出现明显心衰, 而 22G 组小鼠心脏外观光滑, 没有出现室壁变薄现象。计算心脏/体



与对照组相比较, a:  $P < 0.01$

图 3 TAC 小鼠心脏体质量指数与心脏整体形态观察

质量指数发现, 22G 组小鼠心脏体质量指数较对照组有所增加, 但两组之间并无差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 27G 组小鼠与对照组相比较小鼠心脏体质量指数显著性增加 ( $P < 0.01$ ), 说明 27G 组小鼠发生了明显的心肌肥厚。见图 3。



## 2.4 心肌细胞 WGA 染色

模型建立后 12 w, 各组小鼠心脏进行冰冻切片, WGA 染色观察术后心肌细胞肥大情况。染色结果表明 TAC 术后 12w, 与对照组相比 22G 和 27G 组小鼠心肌细胞明显增大, 说明 TAC 手术后压力超负荷导致心肌细胞发生了明显的肥大。见图 4。

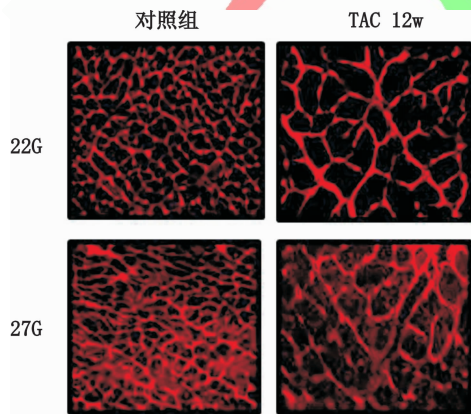


图 4 小鼠心肌 WGA 染色 (200 ×)

药物诱导<sup>[16]</sup>等不同造模方式致心力衰竭模型之间的比较。并且文献 TAC 手术采用的垫针规格 22 G, 24 G, 26 G 和 27G 都有报道, 但是模型后心肌肥厚发展及向心力衰竭的转变文献报道却并不一致, 可能与实验动物大小不一, 其主动脉内径差别较大有关, 因此本研究选择内径差别较大的两种垫针型号对相同体质量小鼠进行造模, 研究不同主动脉缩窄程度对心肌肥厚及心衰模型发生发展的影响, 为实验模型的选择提供参考依据。

研究观察发现 TAC 术后初期 22G 和 27G 两组小鼠都出现部分死亡, 随着时间的增加, 27G 缩窄组小鼠病死率逐渐增加, 而 22G 缩窄组小鼠趋于稳定无死亡。同时高频超声心动检测显示, 术后 8w 时 22G 和 27G 垫针均造成了小鼠心肌肥厚, 并且 27G 组肥厚更为明显。另外比较各组小鼠心脏体质量指数, 观察到与对照组相比 22G 和 27G 两组小鼠心脏体质量指数都有所增加, 且 27G 组与对照组相比差异具有统计学意义; 同时 WGA 染色结果也表明模型建立后 12 w, 与对照组相比 22G 和 27G 组小鼠心肌细胞明显增大, 说明小鼠发生了明显的心肌肥厚现象。

## 3 讨论

心力衰竭往往是各种心脏病的终末阶段, 对人类健康产生严重的危害。选择恰当的实验动物, 了解模型的发展过程, 对研究和治疗该疾病具有重要的作用。主动脉弓缩窄是研究压力超负荷导致心肌肥厚及心力衰竭的常用模型。目前有关主动脉弓缩窄动物模型研究主要集中在寻求不同手术方式的优劣<sup>[14]</sup>或探讨主动脉弓缩窄与冠脉结扎<sup>[15]</sup>或

整体形态学观察到模型 12 w 后, 22G 组小鼠心脏外观光滑, 没有出现明显室壁变薄现象, 超声结果显示 22G 组小鼠心功能并无明显降低。而 27G 组小鼠在术后 12 w 则出现心脏心室壁变薄, 向心性塌陷。高频超声心动检测也显示 TAC 8 w 后 27G 缩窄组小鼠心脏就出现扩大趋势, 至术后 12 w 心腔明显扩大, 心脏功能显著降低, 这也可能是 27G 小鼠后期病死率逐渐增加的原因。以上结果表明不同缩窄程度其代偿性心肌肥厚至充血性心力衰竭的自然病理

生理过程是不同的。

参 考 文 献

[1] Gonzalez JP, Ramachandran J, Xie LH, et al. Selective connexin43 inhibition prevents isoproterenol induced arrhythmias and lethality in muscular dystrophy mice [J]. *Sci Rep*, 2015, 5, 13490. DOI: 10.1038/srep13490.

[2] Zhang YL, Liang XT, Liao SY, et al. Potent paracrine effects of human induced pluripotent stem cell - derived mesenchymal stem cells attenuate doxorubicin - induced cardiomyopathy [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11235. DOI: 10.1038/srep11235.

[3] 张冬颖, 罗羽慧, 杨辉, 等. 冠状动脉结扎与腹主动脉缩窄所致慢性心力衰竭大鼠模型比较 [J]. *中国微循环*, 2005, 9 (3): 171-174.

Zhang DY, Luo YH, Yang H, et al. Comparison between experimental models of chronic heart failure established by coronary artery ligation and abdominal aorta constriction [J]. *J Chin Micr*, 2005, 9 (3): 171-174.

[4] 高琴, 关瑞锦. 充血性心力衰竭大鼠模型的制作及意义 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2004, 13 (1): 27-30.

Gao Q, Guan RJ. Significance and establish methods of experimental rat model with congestive heart failure [J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2004, 13 (1): 27-30.

[5] 何晓雷, 刘玉丽, 张岩, 等. 清醒犬慢性充血性心力衰竭模型的血流动力学特征 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2009, 34 (6): 487-491.

He XL, Liu YL, Zhang Y, et al. Hemodynamic characteristics of chronic congestive heart failure model in awake Beagle dogs [J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34 (6): 487-491.

[6] Haubner BJ, Moik D, Schuetz T, et al. In vivo cardiac role of migfilin during experimental pressure overload [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106 (3): 398-407. DOI: 10.1093/cvr/cvv125.

[7] Xie ZX, Wang SY, Liang ZJ, et al. Effect of Zhenwu Tang Granule on pressure-overloaded left ventricular myocardial hypertrophy in rats [J]. *World J Emerg Med*, 2010, 1 (2): 149-153.

[8] Rockman HA, Ross RS, Harris AN, et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88 (18): 8277-8281.

[9] Chen T, Liu J, Li N, et al. Mouse SIRT3 attenuates hypertrophy-related lipid accumulation in the heart through the deacetylation of

LCAD [J]. *Plos One*, 2015, 10 (3): e0118909. DOI: 10.1371/journal.pone.0118909.

[10] Nühnenberg TG, Hammann N, Schnick T, et al. Cardiac myocyte de novo DNA methyltransferases 3a/3b are dispensable for cardiac function and remodeling after chronic pressure overload in mice [J]. *Plos One*, 2015, 10 (6): e0131019. DOI: 10.1371/journal.pone.0131019.

[11] Wu RX, Eugene Wyatt, Kusum Chawla, et al. Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via increased ROS production [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4 (7): 633-646.

[12] Zhang YT, Liu FF, Bi XL, et al. The antioxidant compound tert-butylhydroquinone activates Akt in myocardium, suppresses apoptosis and ameliorates pressure overload - induced cardiac dysfunction [J]. *Sci Rep*, 5: 13005. DOI: 10.1038/srep13005.

[13] Sopko NA, Turturice BA, Becker ME, et al. Bone marrow support of the heart in pressure overload is lost with aging [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (12): e15187. DOI: 10.1371/journal.pone.0015187.

[14] 张焕基, 黄辉, 张坤, 等. 无呼吸机支持下小鼠主动脉弓缩窄模型优化法评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23 (5): 19-22. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2013.05.004.

Zhang HJ, Huang H, Zhang K, et al. An optimized method of transverse aortic constriction in mice without ventilator [J]. *Chin J Comp Med*, 2013, 23 (5): 19-22.

[15] 刘芬, 马依彤, 杨毅宁, 等. 冠状动脉结扎与主动脉弓缩窄所致小鼠慢性心力衰竭模型比较 [J]. *新疆医科大学学报*, 2007, 30 (4): 328-331.

Liu F, Ma YT, Yang YN, et al. Comparison between mice experimental models of chronic heart failure established by coronary artery ligation and aorta arch constriction [J]. *J Xinjiang Med Univ*, 2007, 30 (4): 328-331.

[16] 党海舟, 李明凯, 徐明, 等. 主动脉弓缩窄术和腹腔注射 IPH 致小鼠慢性心衰两种模型的比较和评价 [J]. *心脏杂志*, 2012, 24 (2): 168-172.

Dang HZ, Li MK, Xu M, et al. Evaluation of congestive heart failure mouse models induced by surgery or drugs [J]. *Chin Heart J*, 2012, 24 (2): 168-172.

(收稿日期: 2016-01-11)

(本文编辑: 何小军)