

异丙肾上腺素联合腹主动脉缩窄术诱导心力衰竭大鼠模型的建立

刘雪琴 蒋洪强 张金国

【摘要】 目的 探讨异丙肾上腺素 (ISO) 联合腹主动脉缩窄术 (AAC) 诱导大鼠慢性心力衰竭模型的效果。**方法** 将雄性 SD 大鼠分为 5 组, 每组 20 只, 分别为假手术、手术、联合 A [手术 + ISO 1.0 mg/(kg · d)]、联合 B [手术 + ISO 2.5 mg/(kg · d)]、ISO 组 [2.5 mg/(kg · d)]。联合 A、B 术后 1 周后给予相关剂量的 ISO, 持续 4 周, 假手术组除不结扎外, 余与手术组相同。8 周后, UCG 监测舒张末期室间隔厚度 (IVSd), 左心室舒张末期腔内径 (LVEDd)、左心室后壁厚度 (LVPWd)、LVEF, 随后处死大鼠, 计算左心质量指数 (左心室重量/体质量比, LVW/BW)、全心质量指数 (心脏重量/体质量比, HW/BW), 制作病理切片, 经苏木素-伊红染色观察心肌组织及纤维化程度。**结果** 与假手术组比较, 联合 A、B 组于术后 6 周出现尿量下降、呼吸急促、毛色暗淡、活动能力下降等表现, 且联合 B 组死亡率高达 85%, 其余各组未见明显异常。术后 8 周联合组 IVSd、LVEDd、LVPWd、LVEF 指标与假手术组、手术组、ISO 组比较差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。心脏解剖发现联合 A、B 组 HW/BW、LVW/BW 明显高于其他各组 (P 均 <0.05)。病理结果显示, 联合 A、B 组心肌细胞体积增大、排列紊乱, 间质出血、纤维化明显。**结论** ISO [1.0 mg/(kg · d)] 联合 AAC 可以在 8 周内成功建立慢性充血性心力衰竭模型, 较单纯 AAC 或 ISO 药物造模效果更佳, 同时此法简单易行, 为心力衰竭模型的制作提供一种新的思路, 对心力衰竭机制的研究具有重大的意义。

【关键词】 腹主动脉缩窄术; 异丙肾上腺素; 慢性心力衰竭; 大鼠

Establishment of heart failure rat model induced by the combination of isoproterenol and abdominal aortic constriction Liu Xueqin, Jiang Hongqiang, Zhang Jinguo. Medical College of Shandong University, Jinan 250100, China

Corresponding author, Zhang Jinguo, E-mail: cck112000@aliyun.com

【Abstract】 Objective To establish chronic heart failure rat models by the combination of isoproterenol (ISO) and abdominal aortic constriction (AAC) and assess the rat models with relevant data. **Methods** One hundred male SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation, operation, combination A [AAC + ISO 1.0 mg/(kg · d)], combination B [AAC + ISO 2.5 mg/(kg · d)] and ISO groups [2.5 mg/(kg · d)], 20 rats for each group. At postoperative one week, corresponding doses of ISO were administered in two combination groups for consecutive 4 weeks. Except for ligation, the procedures in the sham operation group were similar to those in the other operation groups. At 8 weeks post-operation, echocardiography was performed to measure interventricular septum thickness at end-diastole (IVSd), left ventricular end-systolic dimension (LVEDd), left ventricular posterior wall diastolic (LVPWd) and left ventricular ejection fraction (LVEF). Then, the rats were executed to obtain and calculate the left ventricular weight/body weight ratio (LVW/BW) and heart weight/body weight ratio (HW/BW). H. E staining was performed to observe the morphologic changes and fibrosis degree of myocardial tissue. **Results** Compared with the sham operation group, the rats in the combination A and B groups presented with decreased urine volume, tachypnea, darkening fur color and decreased mobility at 6 weeks post-operation. The death rate in the combination B group was up to 85%. No evident abnormality was noted among the rest groups. At postoperative 8 weeks, IVSd, LVEDd, LVPWd and LVEF in two combination groups significantly differed from those in sham operation, operation and

ISO groups (all $P < 0.05$). Cardiac anatomy showed that both LVW/BW and HW/BW in two combination groups were significantly higher than those in the other groups (all $P < 0.05$). Pathological findings demonstrated that cardiac muscle cells were enlarged and irregularly arranged, and interstitial hemorrhage and evident fibrosis were observed. **Conclusions** Chronic congestive heart failure rat models can be established by the combination of AAC and ISO at a dose of 1.0 mg/(kg · d) within 8 weeks. This modeling method is simple, feasible, and more effective than AAC or ISO alone, providing a novel approach for heart failure modeling and of significance for elucidating the mechanism of heart failure.

[Key words] Abdominal aortic constriction; Isoproterenol; Chronic heart failure; Rat

慢性心力衰竭是各种心脏疾患的最终归宿,也是心内科最常见的死亡原因。根据欧洲心脏病学会最新统计,在欧洲 47 个国家近 10 亿的人口,至少有 1 500 万慢性心力衰竭患者,还有 1 500 万无症状的心功能不全患者^[1]。美国心脏学会统计,当前美国慢性心力衰竭患者高达 580 万,每年因心力衰竭而消耗的医疗费用高达 390 亿美元^[2]。在中国 34 ~ 74 岁年龄段,有超过 400 万的心力衰竭患者,年病死率高达 40%,同时心力衰竭的患者不断增加,年增长率已达 2.8%^[3]。慢性心力衰竭在世界范围内呈现扩大的态势,死亡率不断升高,给家庭乃至社会带来巨大的经济负担。在研究慢性心力衰竭机制过程中,大鼠心力衰竭模型起到十分关键的作用。本研究探讨异丙肾上腺素 (ISO) 联合腹主动脉缩窄术 (AAC) 制作大鼠心力衰竭模型的效果,并与既往传统的两种常见模型制作方法比较,现将结果报告如下。

材料与方法

一、材 料

1. 实验动物

雄性大鼠 100 只 (SD 级, 山东鲁抗公司提供), 体质量 270 ~ 310 g。100 只大鼠分为 5 组, 每组 20 只, 分别为假手术、手术、联合 A[手术 + ISO 1.0 mg/(kg · d)]、联合 B[手术 + ISO 2.5 mg/(kg · d)]、ISO 组[2.5 mg/(kg · d)]。

2. 仪器和药物

超声诊断仪; 6 ~ 12 MHz 高频线阵探头; 电子天平 (0 ~ 1 000 g); 10% 水合氯醛; 青霉素 (80 万单位/支, 山东鲁抗); 异丙肾上腺素 (1 mg/支, 上海禾丰)。

二、方 法

1. 动物模型制备

大鼠术前禁食 12 h, 称重, 采用 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 将大鼠仰卧固定于手术台, 腹中线周围备皮、消毒、铺巾, 切口起自

剑突下 1 cm, 沿腹中线分层切开皮肤、肌肉约 2 cm, 将盲肠挤出放在浸有生理盐水的无菌纱布, 保持湿润。止血钳钝性分离腹主动脉、左肾动脉, 于左肾动脉上方约 1.5 cm 处, 穿一条 4 号手术线, 用去尖磨钝的 7 号针头与腹主动脉平行放置, 手术线将两者一同结扎, 随后抽出针头, 剪掉线头, 内脏放回, 分层关腹, 术后给予腹腔注射青霉素 (20 万单位/只), 连续 3 d, 常规喂养^[4]。假手术组不结扎腹主动脉, 余操作与手术组一样。联合组以及 ISO 组术后腹腔注射给予相应剂量 ISO, 连续 4 周, 手术组以及假手术组给予相应剂量的生理盐水。

2. 心脏超声动态监测

术后 4 周开始, 每周利用 UCG 监测大鼠舒张末期室间隔厚度 (IVSd), 左心室舒张末期内径 (LVEDd)、左心室后壁厚度 (LVPWd)、LVEF 等指标。

3. 取材和病理分析

术后 8 周, 大鼠称重后处死, 立即取出心脏, 用冷盐水充分清洗心脏, 并用滤纸吸干心脏内外水分后称量, 称全心重量 (HW), 随后沿室间隔分离左心室, 称左心室重量 (LVW), 计算心脏重量/体质量比 (HW/BW)、左心室重量/体质量比 (LVW/BW)。称重后将心肌组织浸泡在多聚甲醛溶液 (4%) 中, 常规固定、脱水、石蜡包埋、切片 (厚度 5 μm)、苏木素-伊红染色, 最后放在显微镜下观察。

三、统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组小鼠死亡数目以及死亡原因

假手术组 2 只均死于术后 48 h, 解剖可见肠梗阻。手术组 6 只死于 3 d 内, 其中 3 只死于肠梗

阻, 3 只死于急性心力衰竭。联合 A 组 2 只死于麻醉剂量过大, 2 只死于肠梗阻, 2 只死于急性心力衰竭, 1 只死于腹腔感染。联合 B 组 3 d 内死亡 3 只 (肠梗阻), 后期注射 ISO 死亡 15 只 (急性心力衰竭), 死亡率为 85%。ISO 组 4 只死于急性心力衰竭。

表 1 术后 8 周各组小鼠血流动力学指标比较					
组 别	<i>n</i>	LVEDd (mm)	IVSd (mm)	LVPWd (mm)	LVEF (%)
假手术组	18	4.50 ± 0.52	1.81 ± 0.25	1.66 ± 0.33	82.22 ± 1.20
手术组	14	3.76 ± 0.46 ^a	3.08 ± 0.34 ^a	3.52 ± 0.24 ^a	84.26 ± 1.65 ^a
联合 A 组	13	5.52 ± 0.64 ^{acd}	1.30 ± 0.13 ^{acd}	1.26 ± 0.27 ^{acd}	43.39 ± 2.15 ^{acd}
联合 B 组	2	5.63 ± 0.16 ^a	1.24 ± 0.19 ^b	1.38 ± 0.12 ^b	43.50 ± 0.75 ^a
ISO 组	16	3.80 ± 0.35 ^a	3.14 ± 0.31 ^a	3.52 ± 0.22 ^a	83.73 ± 1.31 ^a
<i>F</i> 值		3.05	5.59	4.31	3.55
<i>P</i> 值		<0.05	<0.01	<0.01	<0.05

注: 与假手术组比较, ^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.05; 与 ISO 组比较, ^c*P* < 0.01; 与手术组比较, ^d*P* < 0.01

三、各组小鼠心脏解剖结果比较
联合组心脏质量增大, 左心室肥厚明显, 同时出现心腔扩大, HW/BW 及 LVW/BW 均明显高于

二、各组小鼠血流动力学指标比较
术后 8 周联合组 IVSd、LVEDd、LVPWd、LVEF 指标与假手术组、手术组、ISO 组比较差异均有统计学意义 (*P* 均 < 0.05); 联合 B 组与联合 A 组比较, IVSd、LVEDd、LVPWd、LVEF 差异均无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 1。

手术组以及 ISO 组; 联合 B 组与联合 A 组比较, LVW/BW 明显升高, 而 HW、BW、HW/BW 比较差异均无统计学意义 (*P* 均 > 0.05), 见表 2。

表 2 术后 8 周各组小鼠心脏解剖结果比较 ($\bar{x} \pm s$)						
组 别	<i>n</i>	BW (g)	HW (mg)	LVW (mg)	HW/BW (mg/g)	LVW/BW (mg/g)
假手术组	18	349 ± 33	984 ± 18	660 ± 10	2.92 ± 0.17	1.99 ± 0.15
手术组	14	361 ± 47	1210 ± 16 ^{ac}	821 ± 15 ^{ac}	3.35 ± 0.32 ^{ac}	2.27 ± 0.24 ^{ac}
联合 A 组	13	353 ± 21	1537 ± 21 ^a	1148 ± 23 ^a	4.55 ± 0.29 ^a	3.11 ± 0.27 ^a
联合 B 组	2	360 ± 43	1542 ± 26 ^a	1156 ± 21 ^a	4.53 ± 0.45 ^a	3.21 ± 0.39 ^{ad}
ISO 组	16	354 ± 20	1102 ± 23 ^a	732 ± 11 ^a	3.11 ± 0.21 ^b	2.07 ± 0.23 ^b
<i>F</i> 值		1.63	10.88	13.19	5.03	2.77
<i>P</i> 值		>0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

注: 与假手术组比较, ^a*P* < 0.01, ^b*P* < 0.05; 与联合 A 组比较, ^c*P* < 0.01, ^d*P* < 0.05

四、各组小鼠心肌病理切片结果
联合 A、B 组心肌细胞体积增大直径增宽, 着色不均; 可见明显纤维组织, 肌纤维间疏松水肿,

间隙增宽; 手术组以及 ISO 组心肌细胞轻度增大, 血管周围可见轻微纤维组织, 见图 1。

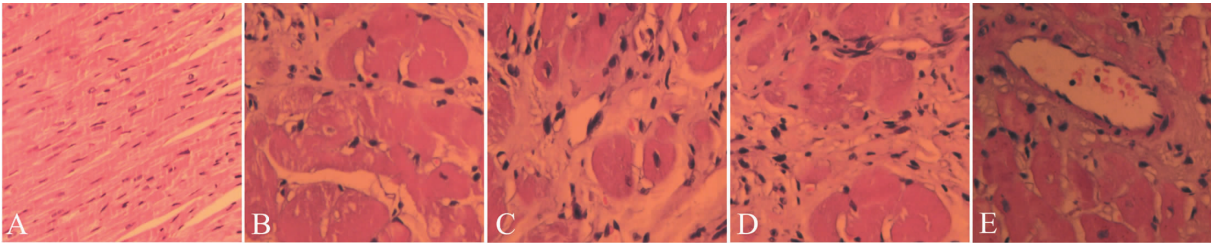


图 1 各组小鼠心肌病理切片形态学检查 (苏木素-伊红染色, ×100)
A: 假手术组; B: 手术组; C: 联合 A 组; D: 联合 B 组; E: ISO 组

讨 论

目前复制大鼠心力衰竭的模型种类繁多,主要分为压力超负荷型心力衰竭模型(如 AAC)、缺血性心力衰竭模型(如冠状动脉结扎术)、容量超负荷型心力衰竭模型(如动静脉瘘)以及药物心力衰竭模型(如 ISO)等^[5]。

ISO 制作慢性心力衰竭大鼠模型存在着注射部位、剂量、时间等问题,ISO 复制心力衰竭模型的作用机制是通过 ISO 激动心肌 β 受体,使心肌剧烈收缩、心率加快,增加心肌氧耗,但作用时间相对较短,同时大剂量 ISO 会引起急性心力衰竭导致死亡,小剂量 ISO 达不到诱导心力衰竭模型的目的,目前尚无统一的使用剂量指标^[6]。本研究 ISO 组中大鼠 LVEDd 较正常组低,IVSd、LVPWd 以及 HW/BW 也提示心肌明显肥厚,但心脏功能 LVEF 反而轻度升高,考虑是心脏代偿性作用。

AAC 复制慢性心力衰竭模型的机制是通过缩窄腹主动脉,使心脏后负荷增加,心肌通过神经-体液等机制代偿性增厚,随着后负荷的持续存在,心室容积增大、心脏扩大,最终心肌失代偿形成心力衰竭^[7-8]。既往多项研究发现,AAC 术后 8 周出现心肌肥厚,此时心脏处于代偿阶段,未能达到心力衰竭的指标,需要长达 12 周甚至更长时间达到心力衰竭^[9-10]。本研究中手术组大鼠 8 周 LVEDd 较假手术组低,IVSd 和 LVPWd 高,可见心肌肥厚明显,但是 LVEF 未见明显下降,心脏功能尚处于代偿期,模型未成功。

本研究采用 ISO 联合 AAC 诱导大鼠慢性心力衰竭模型,模拟临床慢性心力衰竭的病理变化。通过对比血各组流动力学指标、HW/BW、LVW/BW 以及病理切片等,ISO 联合 AAC 方法制作慢性心力衰竭模型较单纯 AAC 组和 ISO 组更具有稳定性及有效性,主要机制是在 AAC 模型的基础上,连续给予 ISO 刺激心肌 β 受体,增加心肌收缩力以及收缩频率,促进心力衰竭的进一步发生。联合 B 组中的大鼠死亡率高达 85%,主要是因为 ISO 的剂量过大导致大鼠发生急性心力衰竭导致死亡,联合组中高剂量 ISO 并不适合诱导大鼠心力衰竭模型。联合组中低剂量组,大鼠死亡率与 ACC、ISO 组无明显的差异,血流动力学、心脏超声等均提示

慢性心力衰竭的发生,显微镜下可见大量的心肌纤维化,提示心脏功能严重受损,LVEF 已达小于 45% 的国际标准^[11]。本方法具有操作简单、死亡率较低、造模效果明确、节省时间等优势,为研究慢性心力衰竭的发病机制和采取措施提供理想的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Guha K, McDonagh T. Heart failure epidemiology: European perspective. *Curr Cardiol Rev*, 2013, 9 (2): 123-127.
- [2] Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8 (1): 30-41.
- [3] 邢作英,王永霞,朱明军. 慢性心力衰竭流行病学研究现状及其病因. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2012, 26 (10): 937-938.
- [4] 石岩,梅世昌. 医学动物实验实用手册. 北京: 中国农业出版社, 2002: 170.
- [5] Huang CC, Monte AA, James M, Cook JM, Kabir MS, Peterson KP. Zebrafish heart failure models for the evaluation of chemical probes and drugs. *Assay Drug Dev Technol*, 2013, 11 (9-10): 561-572.
- [6] Ge T, Qin H, Wang X, Yang SS, Guo L, Han W, Chang HY. Effects of thoracic epidural anesthesia on cardiac function and myocardial cell apoptosis in isoproterenol-induced chronic heart failure rats. *J Interv Cardiol*, 2014, 27 (5): 446-455.
- [7] Zhang Y, Li B, Wang B, Zhang J, Wu J, Morgan T. alteration of cardiac ace2/mas expression and cardiac remodelling in rats with aortic constriction. *Chin J Physiol*, 2014, 57 (6): 335-342.
- [8] Liu S, Zhao C, Yang C, Li X, Huang H, Liu N, Li S, Wang X, Liu J. Gambogic acid suppresses pressure overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Cardiovasc Dis*, 2013, 3 (4): 227-238.
- [9] 王瑞芳,何昆仑,杨泉,苗冬梅. 压力负荷诱导的大鼠舒张性心力衰竭模型的建立. *中华保健医学杂志*, 2009, 11 (2): 92-95.
- [10] Ibrahim M, Kukadia P, Siedlecka U, Cartledge JE, Navaratnarajah M, Tokar S, Van Doorn C, Tsang VT, Gorelik J, Yacoub MH, Terracciano CM. Cardiomyocyte Ca^{2+} handling and structure is regulated by degree and duration of mechanical load variation. *J Cell Mol Med*, 2012, 16 (12): 2910-2918.
- [11] Mpe MT, Klug EQ, Silwa KS, Hitzeroth J, Smith DA. Heart Failure Society of South Africa (HeFSSA) perspective on the European Society of Cardiology (ESC) 2012 chronic heart failure guideline. *S Afr Med J*, 2013, 103 (9 Suppl 2): 660-667.

(收稿日期: 2015-09-06)

(本文编辑: 杨江瑜)