文章编号:1000-5404(2010)05-0427-04

论著

非人工通气兔主动脉瓣上狭窄模型的建立及评价

赵 哲[1],陈 林[1],高顺记[2],郑德志[1],肖颖彬[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:全军心血管外科中心[1],全军超声诊断中心[2])

[摘要] **目的** 探讨在非人工通气的条件下通过升主动脉缩窄的方法建立主动脉瓣上狭窄模型的可行性并进行评价。**方法** 将20只新西兰大白兔完全随机分为升主动脉缩窄组($n=12$)和假手术组($n=8$)。在非人工通气的条件下,在主动脉近端根部结扎升主动脉,使其缩窄。假手术组只行开胸手术,不行升主动脉结扎。术后2、4、8、12、16、20、24周行超声心动图检查,测量心室内径及心功能。术后8、24周行光学显微镜及透射电子显微镜检查,观察心肌组织形态学改变。**结果** 超声心动图检查示:升主动脉缩窄组术后8周时左室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)明显增大[(2.30±0.11)mg/g],较术前[(1.02±0.05)mg/g]及假手术组[(0.98±0.01)mg/g]均有显著差异($P<0.01$),左室短轴缩短率(fractional shortening, FS%)自术后4周始逐渐下降,术后24周时较术前降低了9.3%,有显著差异($P<0.01$)。组织学检查示:心肌纤维排列紊乱,心肌细胞肥大,间质胶原纤维显著增生。**结论** 通过非人工通气升主动脉缩窄的方法成功建立了兔主动脉瓣上狭窄的模型,该方法简单、有效、重复性好。

[关键词] 左心室肥大;主动脉缩窄;非人工通气;动物模型;兔
[中图法分类号] R-332;R542.52;R615 **[文献标志码]** A

A rabbit model of supravalvular aortic stenosis without endotracheal intubation

Zhao Zhe[1], Chen Lin[1], Gao Shunji[2], Zheng Dezhi[1], Xiao Yingbin[1] ([1]Center of Cardiovascular Surgery, [2]Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To establish an animal model of supravalvular aortic stenosis in rabbits without endotracheal intubation. **Methods** New Zealand white rabbits were randomly assigned to the aortic banding group ($n=12$) and the sham-operation group ($n=8$). The former group underwent aortic banding with 3-0 Prolene contiguous to the aortic valve without endotracheal intubation. The sham-operation group received the same procedures but without actual ligation of the aorta. To investigate the effects of the surgical procedure on physiological parameters, echocardiography, histology and electron microscopy were carried out to assess the function and structure of hypertrophy at various time intervals. **Results** Banding of the ascending aorta caused the expected increase in aortic velocity. The pressure overload resulted in a robust left ventricular hypertrophic (LVH) assessed by transthoracic echocardiography, microscopic histology, and electron microscopy. At week 8 after ascending aorta banding, the LV mass index was increased significantly 2.30±0.11 mg/g at week 8 *vs* 1.02±0.05 mg/g at baseline and 0.98±0.01 mg/g in sham-operation group, $P<0.01$). While fractional shortening (FS) was progressively declined after 4 weeks, and the decrease was 9.3% at week 24 compared to the baseline ($P<0.01$). **Conclusion** These results demonstrate a simple, effective, and reproducible method of producing supravalvular aortic stenosis in rabbits without the need for endotracheal intubation and mechanical ventilation.

[Key words] left ventricular hypertrophy; aortic coarctation; without endotracheal intubation; animal model; rabbits

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5025). Corresponding author: Chen Lin, Tel:86-23-68774897, E-mail:chenlin_xq@yahoo.com.cn

心脏瓣膜置换术是治疗瓣膜疾病的主要手段,尽管瓣膜置换术后早期死亡率不断降低,血流动力学得到改善,但并没有达到预期的临床目的,特别是部分主动脉瓣狭窄为主的瓣膜疾病手术后的心脏舒张功能恢复不佳,影响手术中、远期疗效[1],具体原因不明,推测可能与心肌纤维化恢复不良有关。因此,建立主动

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5025)
[通信作者] 陈 林,电话:(023)68774897,E-mail:chenlin_xq@yahoo.com.cn

脉瓣狭窄的动物模型,研究如何改善已形成心肌纤维化及异常的左心室僵硬度,是提高瓣膜置换手术后中、远期心脏功能急需解决的主要问题。

根据主动脉瓣狭窄的病理生理特点,该疾病模型的特征主要应满足:引起心室肥厚的因素尽量为单纯的压力超负荷、无脑血管的高血压、缩窄部位最好位于主动脉窦的近端。目前,国内报道的压力超负荷性左室肥厚动物模型虽然较多[2,3],但是鲜有能很好地模拟主动脉瓣狭窄的模型。本研究拟在非人工通气的条件下通过兔升主动脉根部缩窄建立主动脉瓣上狭窄模型,探寻一种模拟主动脉瓣狭窄的更为简单、有效、重复性好的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 健康新西兰大白兔20只,雌雄不拘,体质量(1.94 ± 0.11) kg,由新桥医院实验动物中心提供。通过完全随机的方法分为升主动脉缩窄组(n = 12)和假手术组(n = 8)。动物饲养与实验均遵照《第三军医大学实验动物饲养与使用规定》。

1.1.2 主要试剂及仪器 3%戊巴比妥钠等常规试剂(新桥医院中心实验室),超声诊断仪(挪威GE威曼超声Vivid7型),显微图像采集系统(德国Leica DMIRB荧光倒置显微镜),透射电子显微镜(芬兰飞利浦TECNAI10型),电子称量仪。

1.2 实验方法

1.2.1 手术方法 经耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,将其仰卧位固定于手术台。不用气管插管和呼吸机通气,保持兔自然呼吸状态,无需给氧。行胸部正中切口,严格沿胸骨正中从剑突处开始纵行剪开胸骨直至颈静脉切迹,撑开胸骨。纵行剪开心包,分离升主动脉,将直径2.5 mm的不锈钢丝涂抹无菌石蜡油,放在升主动脉旁,用3-0 Prolene线于主动脉近端根部将升主动脉与钢丝一起结扎,扎好后迅速撤出钢丝,使升主动脉内径减少50%左右(术前经超声测量的兔升主动脉内径约5 mm)。心包不缝,胸腔内喷洒青霉素溶液40万单位后,逐层关胸。假手术组不结扎升主动脉,其余操作同升主动脉缩窄组。术后连续3 d肌肉注射青霉素预防感染(20万单位,2次/d)。所有兔均喂标准颗粒饲料,自由饮水,饲养24周。

1.2.2 超声心动图检查 分别于术前和术后2、4、8、12、16、20、24周行超声心动图检查。实验兔给予3%戊巴比妥钠麻醉(15 mg/kg),按照美国超声心动图协会建议的方案[4],经二维超声引导,通过M型超声测量以下参数:心率,左室舒张末内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd),左室收缩末内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESd),舒张期室间隔(inter ventricular septum at diastole, IVS)及左室后壁(left ventricular wall posterior thickness at diastole, LVPW)的厚度,左室短轴缩短率(fractional shortening, FS%)。左室舒张末外径(external left ventricular diastolic diameter, ExLVDd) = LVEDd + LVPW + IVS;左室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)[(ExLVDd^3 − LVEDd^3) × 1.055]/体质量;计算舒张期左室后壁厚度/左室腔的半径(h/r)[5]。

1.2.3 组织学检查 将兔麻醉,静脉注射肝素300 U后,开胸取出心脏,用4 ℃ PBS缓冲液(pH = 7.40)冲洗干净,滤纸吸干。去除右室、右房及左房,将左室置于电子称量仪上称量。拟行电镜检查的标本从室间隔下部取1 mm × 1 mm × 2 mm的长条状心肌组织数块,置于2.5%戊二醛中固定,用0.1 mol/L PBS漂洗2次,1%锇酸后固定2 h,丙酮梯度脱水后,环氧树脂618包埋,予以超薄切片、铀染、铅染后,透射电子显微镜观察。将左室迅速置于10%甲醛溶液中,充分固定,石蜡包埋,切片后行HE染色及Masson三色法染色,光学显微镜观察心肌改变。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0统计软件进行重复测量资料的方差分析、t 检验和单因素直线相关分析。

2 结果

2.1 一般情况

在术后24 h内,2组兔都有精神萎靡、摄食减少及活动明显减少的表现,24 h后渐恢复。升主动脉缩窄组有1只兔术中死于气胸,2只兔术后8周时处死行组织学检查,1只兔术后90 d死于心力衰竭。其余实验兔一直观察至术后24周。升主动脉缩窄组实验兔死亡率为16.7%。假手术组实验兔一般情况良好,无死亡发生。

2.2 超声心动图检查

升主动脉缩窄导致LVMI快速增加,4周时增加约100.5%,主要与LVPW及IVS增厚有关,8周后没有进一步增加。LVEDd与LVESd在术后前2周变化不明显,甚至略有减小,2周后迅速增大,8周后增大速度减慢。FS在前2周[(41.2 ± 2.7)%]明显增加(P < 0.01)。2周后,FS逐渐下降。h/r的变化趋势与FS相似。假手术组的上述超声指标没有明显变化(P > 0.05)。见表1。

2.3 左室质量与体质量的比值

术后24周时,升主动脉缩窄组实验兔的左室质量(left ventricular weight, LVW)明显增大,体质量(body weight, BW)略减小,LVW/BW较假手术组明显增大(P < 0.01)。见表2。

2.4 LVW/BW与LVMI的相关性分析

术后24周时,LVW/BW与LVMI呈正相关(r = 0.629, P < 0.01),与超声心动图检查结果一致。

2.5 光镜下观察心肌组织形态学改变

假手术组心肌纤维排列正常,无血管扩张及血管壁增厚等表现。升主动脉缩窄组心肌纤维排列紊乱,心肌细胞肥大,分支增多,间质胶原纤维显著增生(图1)。

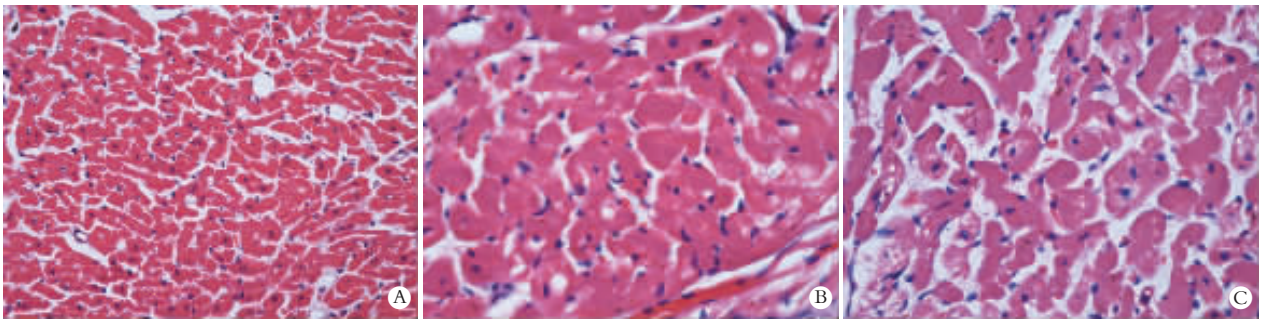
2.6 透射电镜下观察心肌组织形态学改变

与假手术组(图2A)比较,升主动脉缩窄组兔的透射电镜表现有如下特征:①肌原纤维排列紊乱,肌节结构模糊;②核膜凹凸明显(图2B);③闰盘结构不连续、模糊(图2C);④线粒体数量明显增多,部分线粒体肿胀、破裂;⑤灶性的心肌纤维的溶解;⑥肌浆网肿胀、破裂。

表 1　2 组兔的超声心动图变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

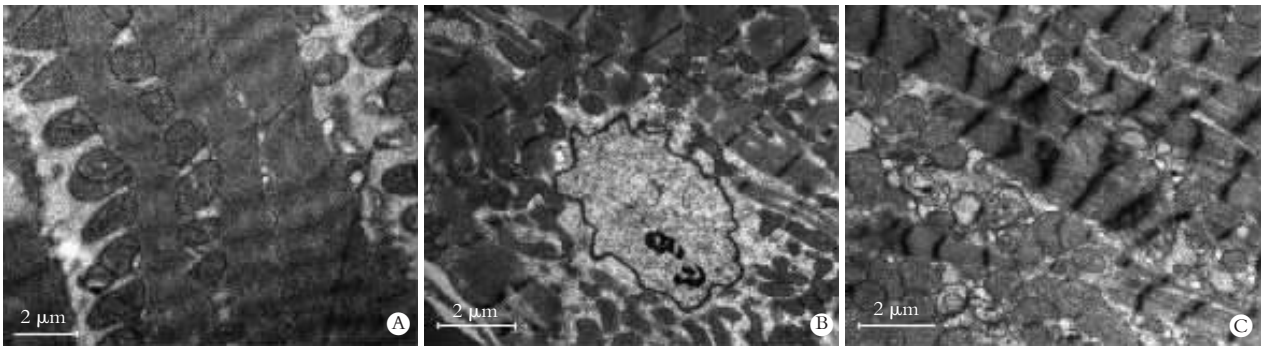
组别	LVESd(mm)	LVEDd(mm)	LVPW(mm)	IVS(mm)	LVMI(mg/g)	FS(%)	h/r
升主动脉缩窄组							
术前	6.75 ±0.37	10.01 ±0.31	2.26 ±0.04	2.02 ±0.05	1.02 ±0.05	32.64 ±1.94	0.451 ±0.007
术后 2 周	6.02 ±0.41^{b}	10.21 ±0.27	2.65 ±0.03^{ab}	2.63 ±0.07^{ab}	1.42 ±0.03^{ab}	41.16 ±2.74^{ab}	0.520 ±0.010^{ab}
术后 4 周	7.94 ±0.35^{ab}	12.23 ±0.28^{ab}	2.86 ±0.04^{ab}	2.95 ±0.06^{ab}	2.04 ±0.03^{ab}	35.15 ±1.59	0.468 ±0.006^{ab}
术后 8 周	9.61 ±0.24^{ab}	13.50 ±0.30^{ab}	2.81 ±0.03^{ab}	2.90 ±0.04^{ab}	2.30 ±0.11^{ab}	28.77 ±2.29^{ab}	0.416 ±0.009^{ab}
术后 12 周	9.53 ±0.38^{ab}	14.04 ±0.21^{ab}	2.78 ±0.02^{ab}	2.78 ±0.07^{ab}	2.27 ±0.03^{ab}	32.11 ±1.81^{a}	0.396 ±0.004^{ab}
术后 16 周	9.93 ±0.33^{ab}	14.23 ±0.30^{ab}	2.76 ±0.05^{ab}	2.76 ±0.07^{ab}	2.10 ±0.02^{ab}	30.25 ±1.06^{a}	0.388 ±0.003^{ab}
术后 20 周	10.42 ±0.17^{ab}	14.52 ±0.16^{ab}	2.71 ±0.03^{ab}	2.60 ±0.04^{ab}	2.09 ±0.02^{ab}	28.27 ±0.45^{ab}	0.373 ±0.002^{ab}
术后 24 周	11.59 ±0.19^{ab}	15.12 ±0.22^{ab}	2.59 ±0.05^{ab}	2.47 ±0.03^{ab}	2.06 ±0.05^{ab}	23.34 ±0.81^{ab}	0.343 ±0.004^{ab}
假手术组							
术前	6.59 ±0.17	10.04 ±0.18	2.25 ±0.04	2.00 ±0.03	1.04 ±0.03	34.31 ±0.58	0.448 ±0.003
术后 2 周	6.45 ±0.19	9.86 ±0.22	2.26 ±0.02	2.00 ±0.05	1.00 ±0.02	34.63 ±0.70	0.458 ±0.007
术后 4 周	6.73 ±0.21	10.10 ±0.18	2.26 ±0.04	2.04 ±0.04	1.01 ±0.02	33.40 ±1.05	0.447 ±0.002
术后 8 周	6.80 ±0.15	10.37 ±0.27	2.24 ±0.03	2.08 ±0.03	0.98 ±0.01	34.42 ±1.16	0.433 ±0.008
术后 12 周	6.61 ±0.32	10.39 ±0.21	2.27 ±0.02	2.10 ±0.03	0.99 ±0.04	36.43 ±1.81	0.437 ±0.005
术后 16 周	6.49 ±0.16	10.36 ±0.25	2.26 ±0.03	2.09 ±0.07	0.89 ±0.03	37.38 ±0.65	0.437 ±0.005
术后 20 周	6.63 ±0.35	10.23 ±0.06	2.26 ±0.04	2.08 ±0.04	0.81 ±0.03	35.15 ±3.13	0.443 ±0.006
术后 24 周	6.62 ±0.24	10.24 ±0.24	2.26 ±0.03	2.10 ±0.03	0.81 ±0.02	35.41 ±0.92	0.442 ±0.005

a:$P<0.01$,与假手术组同一时间点比较;b:$P<0.01$,与同组术前比较



A:假手术组;B:升主动脉缩窄组术后 8 周;C:升主动脉缩窄组术后 24 周

图 1　2 组兔术后不同时间点心肌形态学观察　(HE ×400)



A:假手术组;B:升主动脉缩窄组术后 24 周;C:升主动脉缩窄组术后 24 周

图 2　透射电镜观察 2 组兔心肌组织形态学改变

表 2　2 组兔术后 24 周时左室质量与体质量的比值(LVW/BW)

组别	n	LVW(g)	BW(kg)	LVW/BW(g/kg)
假手术组	8	3.44 ±0.17	2.65 ±0.09	1.30 ±0.08
升主动脉缩窄组	8	6.67 ±0.34^{a}	2.45 ±0.10	2.73 ±0.19^{a}

a:$P<0.01$,与假手术组比较

3　讨论

传统的腹主动脉缩窄模型,因操作简单,损伤程度易控制,在左室肥厚的研究领域应用广泛[2,3,6]。但其缺点在于制模时间长,苏丹等[3]报道的压力过载型心肌肥厚大鼠模型,制模时间长达 24 周。而且该类模型在模拟主动脉瓣狭窄方面,有明显的不足。单纯主动脉瓣狭窄的患者,其主动脉平均压低于正常,故脑血管血压不会升高。而腹主动脉缩窄后,在实验动物出现心衰前,缩窄近端血压会明显升高,故脑血管血压随之升高,从而使血管紧张素原、酪氨酸羟化酶表达改变[7]。新近出现的主动脉弓部缩窄的模型[8],也同样存在脑血管血压明显升高的问题。家族性高血压模型[9]、药物性高血压模型[10],都能良好地模拟高血压疾病,但因致病因素的差异,不适合用作主动脉瓣狭窄

方面的研究。Tse 等[11]通过对狗行主动脉瓣折叠术，造成主动脉瓣开放受限，继而引起压力超负荷性左室肥大。该模型固然与主动脉瓣狭窄疾病更为相近，但制模方法难度大，需要有高超的心外科手术技术，且对实验设备要求高，需要体外循环设备的支持，需要选用大型实验动物，成本高，不利于普及推广。本实验建模时缩窄部位选择在升主动脉近端，靠近主动脉瓣的根部，其引起压力超负荷的因素相对单纯，无药物因素的影响，且不会发生脑血管的高血压，比较接近主动脉瓣狭窄的病理生理改变，可以较好地模拟主动脉瓣狭窄的疾病模型。该方法简单易行，无需特殊设备，实验成本低，利于推广。

给实验动物做开胸手术时，为了避免胸膜破裂引起气胸，往往需要气管插管及人工通气。否则，气胸导致的肺塌陷会引起致命的呼吸循环功能障碍。然而，气管插管可能使实验动物出现严重的气管损伤及后遗症[12]。兔的胸腔解剖较其他动物具有独特的优势，其胸腔被纵隔分为左右两部，互不相通。因此，开胸时，只要不弄破纵隔膜，动物不需要人工通气，从而省掉了气管插管的麻烦[13]。根据我们的经验，开胸手术时避免胸膜损伤的关键是一定要沿胸骨的正中开胸，操作轻柔，尤其在刚开始分离胸骨下端时，要小心谨慎，避免损伤横隔膜。

超声心动图能够无创地监测心脏的变化，并可以估算左室质量，方法简便、结果可靠，可以作为动态监测心脏结构和功能的手段[14]。本实验中，在升主动脉缩窄术后的前2周，可以观察到LVMI和室壁厚度的快速增加，而左室内径却减小了或基本保持不变。所以，本实验中压力超负荷导致的左室肥厚在早期阶段是向心性肥厚，室壁增厚是左室质量增加的主要因素。在该阶段，FS仍在正常范围，甚至有所增加，表明心脏完全代偿了增加的后负荷。升主动脉缩窄后4～8周，室壁厚度没有进一步增加，但是左室腔内径明显增大，FS亦明显降低，显著低于对照组水平，意味着发生了心脏扩大和心脏功能失代偿状态。h/r可以更好地反映心腔大小的变化。它在4周前高于对照组水平，8周后低于对照组水平，并持续减小，反映了心脏先发生向心性肥厚，然后心腔逐渐扩大的动态变化过程。该过程与主动脉瓣狭窄的病理生理发展过程基本一致。本研究中，LVW/BW与LVMI呈正相关，证明了用超声估算左室质量的方法是可靠的。

本实验用兔子成功地在非人工通气的条件下完成了升主动脉缩窄的手术，建立了主动脉瓣上狭窄的动物模型，较好地模拟了主动脉瓣狭窄的病理生理改变。该模型有3个主要优点：①在升主动脉缩窄后4周即有左室肥厚的表现，制模时间短、效果好。②实验动物不需要行气管插管和人工通气，从而避免了气管插管可能引起的严重的气管损伤和后遗症，以及人工通气相关的并发症。③引起左室肥厚的诱因为相对单纯的升主动脉缩窄，受其他因素干扰小。

参考文献：

[1] Gjertsson P, Caidahl K, Bech-Hanssen O. Left ventricular diastolic dysfunction late after aortic valve replacement in patients with aortic stenosis[J]. Am J Cardiol, 2005, 96(5): 722－727.

[2] 宋晓东，辛颖，刘哲，等. 压力后负荷增高大鼠心肌肥厚向心力衰竭的转变[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(2): 86－89.

[3] 苏丹，严浩然，吴大正. 压力过载型心肌肥厚大鼠模型的制备及评价[J]. 同济大学学报：医学版, 2008, 29(6): 32－35.

[4] Sahn D J, DeMaria A, Kisslo J, *et al*. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements[J]. Circulation, 1978, 58(6): 1072－1083.

[5] Gao X M, Kiriazis H, Moore X L, *et al*. Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(6): H2702－H2707.

[6] Kumbar D H, VanBergen A, Ocampo C, *et al*. Adapter molecule DOC-2 is differentially expressed in pressure and volume overload hypertrophy and inhibits collagen synthesis in cardiac fibroblasts[J]. J Appl Physiol, 2007, 102(5): 2024－2032.

[7] Maximino J R, Ferrari M F, Coelho E F, *et al*. Time course analysis of tyrosine hydroxylase and angiotensinogen mRNA expression in central nervous system of rats submitted to experimental hypertension[J]. Neurosci Res, 2006, 55(3): 292－299.

[8] Chess D J, Lei B, Hoit B D, *et al*. Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload[J]. J Card Fail, 2008, 14(1): 82－88.

[9] Nguyen L, Chung J, Lam L, *et al*. Abnormal cardiac response to exercise in a murine model of familial hypertrophic cardiomyopathy[J]. Int J Cardiol, 2007, 119(2): 245－248.

[10] Lako-Futo Z, Szokodi I, Sarman B, *et al*. Evidence for a functional role of angiotensin II type 2 receptor in the cardiac hypertrophic process in vivo in the rat heart[J]. Circulation, 2003, 108(19): 2414－2422.

[11] Tse J, Huang M W, Leone R J, *et al*. Down regulation of myocardial beta1-adrenoceptor signal transduction system in pacing-induced failure in dogs with aortic stenosis-induced left ventricular hypertrophy[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 205(1/2): 67－73.

[12] Phaneuf L R, Barker S, Groleau M A, *et al*. Tracheal injury after endotracheal intubation and anesthesia in rabbits[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2006, 45(6): 67－72.

[13] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社, 2001: 248－249.

[14] Mornos C, Cozma D, Rusinaru D, *et al*. A novel index combining diastolic and systolic Tissue Doppler parameters for the non-invasive assessment of left ventricular end-diastolic pressure[J]. Int J Cardiol, 2009, 136(2): 120－129.

（**收稿**：2009-10-09；**修回**：2009-11-30）

（编辑　吴培红）