维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)02－0169－04

慢性压力负荷性心衰幼鼠实验模型建立及其病理生理探讨

周 凯，陈 沅，田 杰，易岂建，钱永如

(重庆医科大学儿科学院心脏科,重庆 400014)

【摘 要】目的:建立后负荷过高的慢性心力衰竭(chronic heart failure,CHF)幼鼠实验模型,并探讨 CHF 发生发展的病理生理。方法:腹主动脉缩窄术制备 CHF 模型。4 周后行超声心动图、血流动力学、心肌病理分析、心肌细胞凋亡及检测血清中脂质过氧化物(LPO)和超氧化物歧化酶(SOD)含量。结果:与假手术组比较,CHF 组左室内径及室壁厚度,左、右心室相对重量(LVRW,RVRW)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、凋亡指数(AI)、LPO 均显著升高($P<0.01\sim0.05$);左室短轴缩短率 FS(%)、左室射血分数 EF(%)、左室内压最大收缩率($+dp/dt_{max}$、左室内压最大舒张率($-dp/dt_{max}$、SOD 均显著降低($P<0.01$)。结论:幼鼠术后 4 周发生 CHF。心室重构、心肌细胞凋亡及氧化应激参与 CHF 发生、发展的病理生理过程。

【关键词】慢性心力衰竭;心室重构;细胞凋亡;氧化应激;幼鼠;动物模型

【中国图书分类法分类号】R541.602.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－06－02

Experimental model of chronic heart failure resulting from pressure overload in juvenile rats and its pathophysiological changes

ZHOU Kai, et al

(*Department of Cardiology, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To make animal model of chronic heart failure(CHF) resulting from pressure overload in juvenile rats, and discuss its pathophysiology. *Methods*: The animal model of CHF was established by constriction of abdominal aorta. After four weeks of operation, the high frequency ultrasonography, the hemodynamic study, the pathologic analysis of hearts were undergone, the cardiac myocyte apoptosis, and serum contents of lipid peroxidation(LPO) and superoxide dismutase(SOD) were investigated. *Results*: Compared with the sham－operated group, inner diameter, wall thickness of left ventricule, LVRW, RVRW, SBP, DBP, LVSP, LVEDP, AI, LPO increased significantly($P<0.01\sim0.05$) in CHF group. A significant decrease could be seen in EF, FS, $+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$, SOD. *Conclusion*: After 4 weeks of constriction of abdominal aorta, the juvenile rats have developed CHF, the ventricular remodeling, the myocardial apoptosis and oxidative stress may take part in the pathogenesis and progression of CHF.

【Key words】Chronic heart failure; Ventricular remodeling; Cardiomyocyte apoptosis; Oxidative stress; Juvenile rat; Animal model

小儿慢性心力衰竭(chronic heart failure,CHF)是不同病因心脏病发生、发展的共同结局。Okabem[1]发现 Wistar 大鼠在幼年期和青春期发育过程中左室心肌细胞的形态和长度/宽度比率无明显改变,而自发性高血压大鼠虽然在幼年期无改变,但在青春期心肌细胞形态发生改变,长度增长显著快于宽度增长,边边相连和端端相连减少,可见幼鼠心肌细胞在 CHF 发展过程中易受神经内分泌环境因素的影响。本实验通过腹主动脉缩窄术制备幼鼠 CHF 实验模型,为小儿心衰研究提供新的工具。并从心室重构、心肌细胞凋亡及氧化应激(oxidative stress)角度探讨其病理生理,丰富对小儿心衰的认识。

作者介绍:周 凯(1975－),男,硕士生,

主要研究方向:从事小儿心血管专业。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)采用健康雄性 5 周龄 Wistar 幼鼠(第三军医大学实验动物中心提供);(2)TUNEL 凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannheim,德国),超氧化物歧化酶 SOD 活性放免法测定试剂盒(上海放射免疫分析技术研究所),脂质过氧化物 LPO 比色法试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 动物模型制备及分组将幼鼠分为:(1)心衰组:幼鼠经10%乌拉坦腹腔注射(1.0g/kg)麻醉后,分离双肾动脉上方的腹主动脉约 1cm 长,用 7 号针头紧贴腹主动脉平行放置,并将两者一起结扎,然后抽出 7 号针头,使其内径为 0.7mm,腹主动脉部分狭窄,术后幼鼠给予青霉素 10000u/只,连续 3 天以预防感染,并在 30℃条件下苏醒。(2)假手术组:仅开腹并分离腹主动脉,但不予以结扎。所有幼鼠均饲以鼠饲料及瓶装饮用水。

1.3 一般状况观察与超声心动图检测

术后每天观察幼鼠的呼吸、皮毛颜色、活动量、体重等发育状况。4 周后于上午用 Acuson sequoia 512 超声诊断仪(频率 8.5MHz)检测,测量指标:左室舒张末期内径 LVEDD(mm)、左室收缩末期内径 LVESD(mm)、室间隔舒张末期厚度 IVSTd(mm)、室间隔收缩末期厚度 IVSTs(mm)、左室后壁舒张末期厚 LVPWTd(mm)、左室后壁收缩末期厚度 LVPWTs(mm)、左室短轴缩短率 FS(%)、左室射血分数 EF(%)。

1.4 血流动力学指标测定

0.3%水合氯醛腹腔注射麻醉幼鼠,分离颈总动脉,插入聚苯乙烯左心导管至左心室,连接八导生理记录仪(RM-600 型)记录收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、心率(HR)、左室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)、左室内压最大收缩率($+dp/dt_{max}$)、左室内压最大舒张率($-dp/dt_{max}$)。最后断头取血,分离心脏。

1.5 心脏标本分析

电子天平分别称取左、右心室实际重量,并与体重相除,得到左、右心室相对重量(LVRW,RVRW),并常规 HE 染色。

1.6 心肌细胞凋亡的检测

采用末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导 dUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling,TUNEL)。心肌组织行常规石蜡包埋,每只大鼠取 3 个不同部位的切片各 1 张。光镜下凋亡细胞胞核呈深浅不一的棕褐色。根据凋亡阳性细胞的分布情况,每张切片于光镜下随机选择 5 个无重叠视野,每视野计数 300 个心肌细胞中阳性细胞核数,以平均计数阳性细胞核数所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数(apoptoticindex,AI),见图 1。

1.7 血清脂质过氧化物(LPO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性测定

常规分离血清,比色法测定 LPO 含量,放免法测定 SOD 活性。

1.8 统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用方差分析进行统计学处理,$P<0.05$ 或 $P<0.01$ 认为具有统计学显著性意义。

2 结 果

2.1 一般状况及 HE 染色

CHF 幼鼠模型术后 24h 死亡率达 52%。CHF 幼鼠体重不增加或缓慢增加及活动量减少,可出现呼吸急促和劳力性呼吸。病理检查发现有胸腹腔积液、心包积液、心房血栓或心室肥厚。心肌组织 HE 染色光镜观察主要表现为心肌细胞排列紊乱,水肿、变性、局灶坏死,可累及心脏全层,见图 2。

2.2 心室内径、室壁厚度变化

与假手术组比较,心衰组幼鼠 LVEDD 增高了 24.92%,有明显差异($P<0.05$),LVESD、IVSTd、IVSTs、LVPWTd、LVPWTs 升高显著($P<0.01$),见表 1。

2.3 血流动力学变化

心衰组较假手术组,SBP、DBP、LVSP、LVEDP 显著升高($P<0.01$),HR 无明显统计学差异,但有升高趋势,见表 2。

2.4 心功能变化

心衰组较假手术组,$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$、

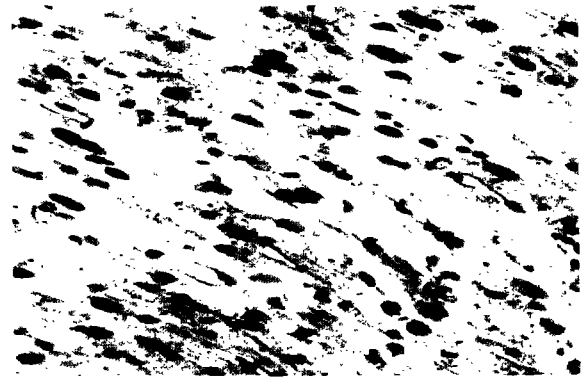


图 1 心衰组 TUNEL 染色(×400)
凋亡细胞为深浅不一的棕褐色或棕黄色

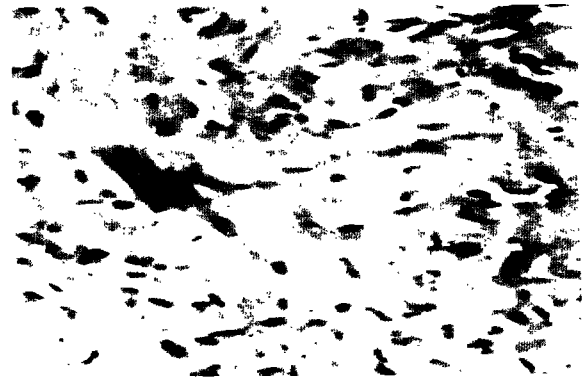


图 2 心衰组切片(HE 染色 ×400)
心肌细胞排列紊乱,水肿,变性,局灶坏死

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 心室内径、室壁厚度的变化

分组(只)	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	IVSTd(mm)	IVSTs(mm)	LVPWTd(mm)	LVPWTs(mm)
假手术组($n=8$)	6.02±0.42	3.03±0.17	1.34±0.07	1.54±0.06	1.46±0.07	1.61±0.07
心衰组($n=8$)	7.52±0.52*	5.12±0.23**	1.81±0.11**	2.04±0.15**	2.17±0.09**	2.35±0.11**

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 2 血流动力学的变化

分组(只)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	HR(次/min)	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)
假手术组($n=8$)	120.13±9.49	83.36±9.63	422.75±19.95	125.16±10.17	3.79±0.88
心衰组($n=8$)	151.14±9.44**	106.41±6.68**	436.48±31.55	158.20±10.09**	22.13±4.18**

注:与假手术组比较,** $P<0.01$

表 3 心功能的变化

分组(只)	$+dp/dt_{max}$(mmHg/s)	$-dp/dt_{max}$(mmHg/s)	FS(%)	EF(%)
假手术组($n=8$)	5776.43±312.02	4399.99±223.84	48.08±1.69	85.16±1.36
心衰组($n=8$)	4130.44±468.99**	2797.36±357.23**	32.78±1.75**	58.10±1.39**

注:与假手术组比较,** $P<0.01$

表 4 心室肌相对重量、心肌细胞凋亡和血清中 LPO、SOD 变化

分组(只)	LVRW	RVRW	AI(%)	LPO(μmol/l)	SOD(ng/ml)
假手术组($n=8$)	2.05±0.12	0.63±0.09	4.65±1.53	22.34±5.65	6.19±1.19
心衰组($n=8$)	2.87±0.17*	1.06±0.14**	65.95±7.44**	36.07±7.89**	2.27±1.08**

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$

FS、EF 均显著降低($P<0.01$),见表 3。

2.5 心室肌相对重量、心肌细胞凋亡和血清中 LPO、SOD 变化

与假手术组比较,心衰组左、右心室相对重量(LVRW、RVRW)分别升高了 40%、68.25%,AI、LPO 显著升高,SOD 降低($P<0.01$),见表 4。

3 讨 论

近年来,人们逐渐认识到 CHF 发生的基本机理是心室重构(remodeling)[2],本质是心肌细胞和细胞外基质的变化。包括心肌细胞的丧失、适应不良性肥大,心肌细胞外胶原沉积和纤维化。表现为心肌质量、心室容量增加和心室形状的改变及细胞外基质-胶原网的组成发生变化。研究发现,CHF 幼鼠心室压力和外周血压升高,血流动力学发生紊乱;LVEDD、LVESD、IVSTd、IVSTs、LVPWTd、LVPWTs 和 LVRW、RVRW 升高提示心室腔扩大、室壁肥厚,发生心室重构,与文献报道结果相符[3];HE 染色见心肌细胞排列紊乱,水肿、变性、局灶坏死,可累及心脏全层;$+dp/dt_{max}$、$-dp/dt_{max}$ 以及 FS、EF 的显著下降[3]显示心肌细胞收缩和舒张功能受损,结合 LVEDP 显著升高[4]及活动量减少、劳力性呼吸等慢性充血性心力衰竭表现,说明心衰处在慢性失代偿期。左、右心室实际重量因为受发育幼鼠体重影响,不能作为 CHF 幼鼠心室重构的指标。本实验 CHF 幼鼠的 LVRW 比相同处理的 CHF 成年鼠动物模型[5]低,但左心功能却严重受损[6],提示幼鼠在心衰过程中恶化速度较成年鼠快,其具体机理有待进一步研究。

CHF 时,心功能进行性减低,心肌细胞不断丢失,并被胶原纤维替代,由于收缩单元不断减少,使心功能不断降低[7]。研究结果显示,当缩窄 Wistar 幼鼠腹主动脉术 4 周后,心肌细胞发生凋亡增加,凋亡指数显著升高,与其心室重构进行性加重及心功能的恶化进程同步,这一结果也提示 CHF 晚期心肌细胞凋亡是心肌细胞丢失的主要原因和心衰发展的主要机理[8,9]。本实验心肌细胞凋亡数较其他报道[10]高,可能是幼鼠心肌细胞易受神经内分泌激素影响,凋亡发生率高。或由于 TUNEL 阳性的心肌细胞核与非心肌细胞核不易区分,且心肌细胞为多核细胞,在较厚的光镜上,不可能观察到全部细胞核,过高估计心肌细胞发生的凋亡比例有关。

近年来的大量实验室和临床资料证实,氧化应激时,过多的氧自由基(OFR)是使心衰发展恶化的重要机理之一[11]。本研究发现,CHF 组与假手术组比较,LPO 显著升高,SOD 显著下降,提示氧自由基清除的代谢系统处于失平衡状态,同时 CHF 组

维普资讯 http://www.cqvip.com

LVEDP 升高、心功能下降，反映 CHF 的确与氧化过载现象高度有关。实验还发现，机体出现氧化—抗氧化失衡与心肌细胞发生凋亡呈一致性变化，提示心肌细胞凋亡与氧自由基过量聚集密切相关，故氧化应激介导心肌细胞凋亡是 CHF 发生、发展的重要发病环节。这也提示，应用外源性抗氧自由基药物打断氧化应激的恶性循环，恢复 OFR 代谢的平衡状态，为临床上治疗 CHF 提供了新的思路。

综上所述，通过腹主动脉缩窄术后 4 周，幼鼠发生心室重构、血流动力学紊乱及心功能恶化，说明 CHF 模型制备是成功的。心室重构、心肌细胞凋亡及氧化应激参与了 CHF 发生、发展的病理生理过程。

参 考 文 献

[1] Okabe M, Kawamura K, Terasaki F, et al. Remodeling of cardiomyocytes and their branches in juvenice, adult, and senescent spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats [J]. Heart Vessels, 1999; 14(1): 15 - 28.

[2] Collucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure [J]. Am J Cardiol; 1997, 80: 15L - 25L.

[3] 徐 峰，王景全，郭荣利，等. 高频超声显像评价慢性压力负荷大鼠心肌结构和功能的动态改变[J]. 中国超声医学杂志，2001; 17: 293 - 296.

[4] Cohn JN, Ferrari R, Shavpe N, et al. Cardiac remodeling concepts and clinical implications: a consensus paper fi - om an international forum on cardiac remodeling [J]. J Am Coll Cardiol, 2000; 35: 569 - 582.

[5] 刘 健，何作云，王培勇. 心肌细胞核兰尼受体在大鼠压力超负荷心肌肥厚发生中的作用[J]. 中华心血管病杂志，2002; 30(3): 168 - 171.

[6] Capomolla S, Febo O, Gnemmi, et al. fi - blockade therapy in chronic heart failure: diastolic function and mitral regurgitation improvement by carvedilol[J]. Am Heart J, 2000; 13 9: 596 - 608.

[7] Bing OH, Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload[J]. J Mol Cell Cardiol, 1994; 26: 943 - 948.

[8] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, et al. Apoptosis in the failing human heart [J]. N Eng J Med, 1996; 336: 1131 - 1141.

[9] Li Z, Bing OHL, Long X, et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition of heart failure in the spontaneously hypertensive rat[J]. Am J Physiol, 1997; 272: H2313.

[10] 邢洪涛，柏树令，张丽影. 慢性压力负荷性心衰大鼠心肌细胞凋亡的研究[J]. 中国微循环，1999; 3(2): 90 - 92.

[11] Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myoeardium [J]. Circ Res, 2000; 86(2): 119 - 120.

(上接第 158 页)研究 CMXR 的较为理想的动物模型。CMXR 与同种移植急性排斥反应存在本质差异，其特点是排斥程度强烈，异种移植胎肠内以 $CD4^+$ T 细胞和 $ED2^+M\Phi$ 浸润为主，且 Th2 细胞功能增强。

参 考 文 献

[1] Auchincloss H Jr, Sachs DH. Xenogeneic transplantation [J]. Annu Rev Immunol, 1998; 16(2): 433 - 470.

[2] Thulin JD, Kuhlenschmidt MS, Gelberg HB. Development, characterization, and utilization of intestinal xenograft model for infectious disease research[J]. Lab Invest, 1991; 65 (1): 719 - 722.

[3] Wallgren AC, Karlsson - Parra A, Korsgren O. The main infiltrating cell in xenograft rejection is a CD4 macrophage and not a T lymphocyte[J]. Transplantation, 1995; 60(2): 594 - 598.

[4] Yamagami S, Isobe M, Yamagami H, et al. Mechanism of concordant corneal xenograft rejection in mice synergistic effects of anti - leukocyte function - associated antigen - 1 monoclonal antibody and FK506[J]. Transplantation, 1997; 64(1): 42 - 45.

[5] Yang L, Mottram PL, Han WR, et al. Effect of anti - CD4, anti - NC, and anti - NK monoclonal antibody on the survival of cardiac xenografts and allografts in mice[J]. Transplant Proc, 1995; 27: 2185 - 2189.

[6] Wecker H, Winn HJ, Auchincloss H Jr. $CD4^+$ T cells without $CD8^+$ or B lymphocytes, can reject xenogeneic skin grafts[J]. Xenotransplantation, 1994; 1(1): 86 - 89.

[7] Gill RG, Wolf L, Daniel D, et al. $CD4^+$ T cells are both necessary and sufficient for islet xenograft rejection[J]. Transplant Proc, 1994; 26: 1203 - 1208.

[8] 周洪伟，姚榛祥. 供体特异性 T 细胞疫苗诱导协调性异种移植延长存活的作用[J]. 中华器官移植杂志，2001; 22 (2): 230 - 232.

[9] Field EH, Gao QL, Chen NX, et al. Balancing the immune system for tolerance - A case for regulatory CD4 cell[J]. Transplantation, 1994; 64(1): 1 - 7.

[10] Morris CF, Simeonovic CJ, Fung MC, et al. Intragraft expression of cytokine transcripts during pig proislet xenograft rejection and tolerance in mice[J]. J Immunol, 1995; 154: 2470 - 2475.