

蕨麻小型猪心肌梗模型的建立及梗死边缘区的基因表达谱分析

谭伟江^{1#}, 王静^{1#}, 李想^{1,2#}, 李小辉³, 雷迁⁴, 黄家园⁵, 龚宝勇¹,
李菁¹, 陈智英¹, 王剑¹, 陈小红¹, 王希龙¹, 杨丰华^{1*}, 黄韧^{1*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510633; 2. 广东药科大学, 广州 510006;
3. 暨南大学附属第一医院心外科, 广州 510632; 4. 四川省医学科学院, 四川省人民医院麻醉科, 成都 610072;
5. 复旦大学附属中山医院, 上海 200032)

【摘要】 目的 建立应用蕨麻小型猪建立心肌梗死(心梗)的造模方法和具有临床意义的模型指标, 探讨心肌梗死边缘区的基因表达与代谢失偿的相关性。**方法** 选取13只雄性蕨麻小型猪, 随机分组, 其中假手术对照组和心梗手术组各5只, 不经任何手术处理的正常对照组3只。麻醉后在左前冠状动脉行靠近心尖的三分一降支主干支进行永久性结扎形成心肌缺血、梗死。术后4周进行心功能超声检测、采血并进行血清生化分析; 安乐死后取梗死边缘区进行病理和基因芯片分析。**结果** 超声图可见明显的心梗区域, 数据显示心梗手术组的收缩末期左心室腔射血分数及短轴缩短率较假手术组分别降低32%和40%; 血清中有谷草转氨酶、血清胆红素、乳酸脱氢酶等升高; 病理切片显示梗死边缘区域的心肌纤维断裂、溶解, 结缔组织增生, 中性粒细胞和淋巴细胞增多; 基因表达谱分析显示在梗死边缘区有2个调控心梗后重构和组织病理通路, 3个炎症和免疫调节通路, 8个脂肪、蛋白、糖能量代谢途径的基因表达有显著性改变。**结论** 成功建立了蕨麻小型猪的心梗模型, 其冠状动脉分支少, 便于手术且成模稳定性, 模型表征可与临床指标相吻合; 模型梗死边缘区的基因表达谱特征与临床上代谢失偿表现有相同变化趋势, 为心梗机理的研究提供了实验动物模型及心肌梗死边缘区的具有参考价值的特征性改变。

【关键词】 蕨麻小型猪; 心肌梗死模型; 模型评价; 梗死边缘区; 基因表达谱

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0558-09

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.002

Establishment of a myocardial infarction model and the gene expression profile in peri-infarct area in Juema minipigs

TAN Wei-jiang^{1#}, WANG Jing^{1#}, LI Xiang^{1,2#}, LI Xiao-hui³, LEI Qian⁴, HUANG Jia-yuan⁵, GONG Bao-yong¹,
LI Jing¹, CHEN Zhi-ying¹, WANG Jian¹, CHEN Xiao-hong¹, WANG Xi-long¹, YANG Feng-hua^{1*}, HUANG Ren^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510063; 3. Jinan University, Guangzhou, 510632; 4. Department of Anesthesiology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chendu 610072; 5. Zhongshan Hospital Fudan University, Shanghai 200032)

【Abstract】 Objective To establish a Juema minipig model of myocardial infarction, to evaluate the clinical indices in the model pigs, and to explore the relationship between gene expression and metabolic decompensation. **Methods**

[基金项目] 广东省科技专项(No. 2016A020216019); 广东省实验动物重点实验室(No. 2013A061402001); 国家自然科学基金-面上项目(No. 31572351); 广东省科技专项(No. 2015A030302035); 国家自然科学基金-青年科学基金项目(No. 81500281)。

[作者简介] 谭伟江(1992-), 男, 学士, 研究方向: 心血管生物学, Email: 836550767@qq.com; 王静, (1988-), 女, 硕士, 研究方向: 兽医药理学, Email: 454431684@qq.com; 李想(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管生物学, Email: 814736766@qq.com。

#对本文的贡献相同。

[通讯作者] 黄韧(1959-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学。Email: labking@sohu.com;

杨丰华(1970-), 女, 副研究员, 研究方向: 心血管生物学。Email: fenghua.yang@gdliami.com

13 male Juema minipigs were randomly divided into control (Sham, $n = 5$), myocardial infarction (MI, $n = 5$) and normal control (for evaluating the recovery condition after surgery, $n = 3$) groups. In the MI group, the ligation was done at the left descending coronary artery around the 1/3 distance to heart apex. Four weeks after the surgery, the cardiac function and serum biochemistry was analyzed. The histological changes and gene expression profiles in the myocardium in the peri-infarct area were examined. **Results** Ultrasonic images showed that the infarction was formed, the ejection fraction and fraction shortening were significantly reduced in the MI group ($\sim 32\%$ and $\sim 40\%$ less than those of the sham group). Histological examination showed that myocardial fibers at the peri-infarct area were broken, dissolved, and there was connective tissue hyperplasia with increased neutrophil and lymphocyte infiltration. Microarray analysis revealed that two myocardial remodeling and pathology mediating pathways, three inflammation-related pathways, and 8 metabolic pathways (including fatty acid, amino acid, and glucose metabolic pathways) were significantly changed. **Conclusions** We have successfully established a Juema minipig model of myocardial infarction. The less branches of the left descending coronary artery allow us to establish a stable model by surgery with comparable characteristics in the clinic indices. The results of this study provides useful reference characteristics of an animal model with characteristic changes in the peri-infarct area.

【Key words】 Juema minipig; Myocardial infarction model; Model evaluation; Peri-infarct area; Gene expression profile

Corresponding author: HUANG Ren, Email: labking@sohu.com; YANG Feng-hua, Email: fenghua.yang@gd-lami.com

心脏在各种病因导致心肌缺血、心梗后,其进程最早激活的是代偿机制例如形成瘢痕组织、功能改变和心肌重构等。随着梗死边缘区往正常组织推进,越来越多组织失去正常功能,最终发生失代偿性心衰。在一项针对梗死边缘区的临床研究表明,改善梗死边缘区的代谢状况、减少组织病理改变是改善心脏功能的有效方式^[1]。临床诊治评价只能追踪电生理^[2]、影像学^[3]的改变,而无法实时评价病人的组织病理学和分子生物学指征,更无法提出梗死边缘区功能失代偿的诊治参数,因此,应用小型猪建立心梗和心衰模型是实验研究的必要途径,而且,利用实验模型分析梗死边缘区病理和分子变化对临床诊断评价具有直接应用价值。

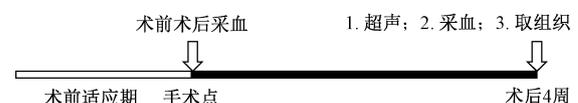
蕨麻小型猪原产甘肃南部,基因型稳定^[4],经本单位多年前引种成功后,封闭繁育和实验动物化,其生物学特性数据清楚^[4-6]。我们前期观察发现蕨麻小型猪的左前冠状动脉降支分支较少,个体之间的分布模式比较一致,与其他小型猪比较,更适合实行心梗手术。本研究报道蕨麻小型猪建立和心梗模型各项评价指标、梗死边缘区在功能失代偿之下的基因表达谱。

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验流程

实验选用 13 只 20 ~ 25 kg 的普通级雄性蕨麻小型猪【SCXK(粤)2015 - 0036】,随机分为假手术对照组($n = 5$)、心梗手术组($n = 5$)及作为评价手术

后动物恢复状况的正常对照组 3 只。实验期间动物饲养于广东省实验动物监测所的 AAALAC 认证设施,手术在同设施内的无菌手术室实施。实验动物建模前在实验设施内进行两周环境驯化,建模成功后在设施内继续护理饲养 4 周直至组织采样。实验的总体流程如下。

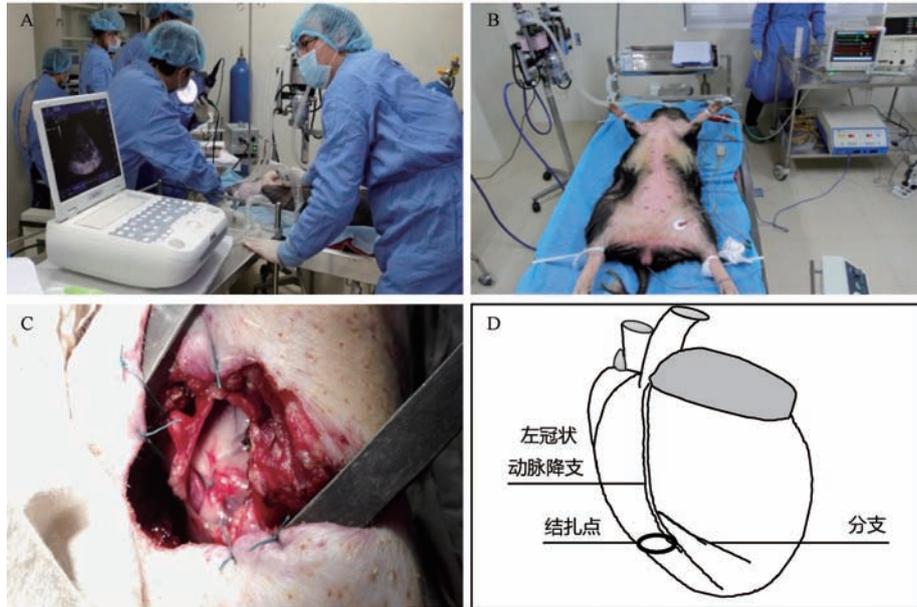


1.2 心梗手术建模及术后监护

实验动物诱导麻醉后使用 2% 七氟醚维持麻醉(建模示意图见图 1)。动物仰卧保定后在左侧第三肋间隙位置进行 7 ~ 10 cm 横切,逐层分离后暴露心脏并找到冠状动脉降支,在第一分支后靠近心尖三分之一处的主干进行永久性结扎;假手术组则打开胸腔并在近似位置放置缝线但不做结扎。术中使用 BeneViewT5 心电监护系统及 EDAN H100 监护仪监测动物基本生命体征。通过心电图 ST 段是否抬高来判断是否结扎成功。手术结束后采血并用血液流变仪测定血液粘稠度,获取 200/s(高切)、30/s(中切)、3/s(低切)三个切变率时的全血粘度。术后肌注青霉素预防术后感染。并使用身体质量指数(body mass index, 简称 BMI)对蕨麻小型猪的术后健康情况。BMI 的计算公式为:实验猪 BMI = 体重 kg/(身长 cm × 身长 cm)。

1.3 心脏超声功能检测

使用迈瑞 M7Vet 便携式彩色多普勒超声诊断



注:A. 超声操作;B. 术中动物的保定位置;C. 暴露左前冠状动脉降支及结扎位置;D. 结扎点示意图。

图1 左冠状动脉降支结扎建立心梗模型

Note. A. Ultrasound operation; B. The operative position; C. Exposure of the left descending coronary artery and suture site; D. Diagram of the ligation point.

Fig.1 Ligation of the left descending coronary artery to establish MI model.

系统(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)配置的 P7-3s 相控阵心脏探头(3~7 MHz)评价蕨麻小型猪心梗后的心脏功能。动物超声时使用氯胺酮 6 mg/kg 麻醉保定。在右侧肋间触摸到心脏跳动位置后放置探头获得四腔室图像,随后探头往心尖方向寻找心梗区域,采集 B 型和 M 型图。假手术对照组在心室乳头肌后采集图像。

1.4 血液生理生化指标检测

术后 4 周对假手术对照组和心梗手术组采血。血样静置于 4℃ 冰箱 2 h 后使用冷冻离心机在 3000 r/min 转速下离心 5 min,取上清液为测量使用的血清样本。血清生化值使用美国 Beckman 公司 LX20 全自动生化分析仪和 Beckman 公司的配套试剂。

1.5 组织取样和染色

术后第 4 周麻醉开胸取出假手术对照组和心梗手术组动物的心脏组织。在结扎线头附近颜色暗黑的室壁组织为梗死区;梗死往鲜红组织过渡的区域为梗死边缘区;远离梗死区域且颜色正常的组织确定为非梗死区。在梗死边缘区取 1 cm × 1 cm 组织块,放入冻存管中置于 -80℃ 超低温冰箱保存,供后续基因表达分析使用。供病理切片的每个组织块包括梗死区、梗死边缘区、非梗死区三部分,福尔马林固定后切片,使用 HE 和 Masson 染色法染色,显微

镜下观察梗死边缘区的病理改变。

1.6 基因芯片和基因表达谱分析

取三个假手术对照组和三个心梗手术组的梗死边缘区组织,两组的三个样品各自混合成一个样品,使用 TRIzol® Reagent(Fisher Scientific)试剂盒提取 RNA 后应用 NanoDrop ND-1000 测定 CyDye 和 RNA 的浓度。应用芯片 Bovine (v2) Gene Expression 4 × 44K Microarray (Agilent Technologies, USA) 和 Agilent 杂交程序确定基因的表达谱。对心梗组的梗死边缘区和对照组的正常组织进行差异基因数比照,随后对差异基因进行生物途径富集分析,用以评估心梗后基因表达改变的生物信号转导和代谢途径。基因芯片的技术服务由北京六合华大基因科技有限公司(BGI)提供。

1.7 统计学处理

数据表达为平均值 ± 标准误 (Mean ± SEM),使用 SPSS for Windows 13.0 统计软件处理,对两组间的数据进行比较和独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 判定为有统计学意义。

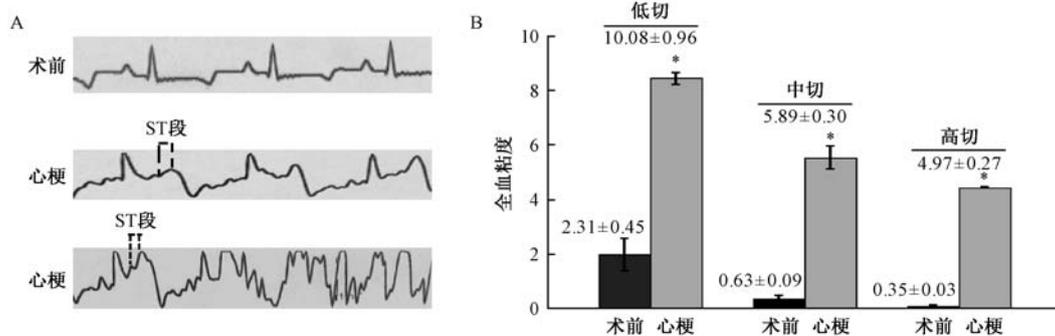
2 结果

2.1 术后蕨麻小型猪的生命特征

假手术对照组 (*n* = 5) 和心梗手术组 (*n* = 5) 的

蕨麻小型猪均存活。在左前冠状动脉降支结扎后心电图即刻显示 ST 段调高(图 2A),同时可见结扎点往心尖位置肌肉颜色变浅,全血粘度测量显示在高中低切不同切变率下血液粘稠度均显著上升(图 2B),这些指征表明结扎已致心肌缺血。评价实验

动物健康情况的 BMI 指数测量表明,10 只经历开胸手术的实验猪(包括假手术对照组和心梗手术组)与正常对照组相比,未见统计意义上的差别(21.01 ± 0.69 vs. 20.35 ± 1.0 , $P = 0.36$),表明手术对实验动物 4 周内的身体健康状况无明显影响。



注:A. 冠状动脉结扎后心电图监护显示抬高的 ST 段,并可能伴发短期室颤; B. 术后采血在不同切变率上的全血粘度。

* $P < 0.05$ 表示心梗手术后有显著差别, $n = 5$ 。

图 2 手术期间心电图监护和术后血液粘度

Note. A. ECG ST segment elevation after coronary artery ligation, and occasionally short-term fibrillation; B. Postoperative blood viscosity at different shear rates. * $P < 0.05$, significant differences between pre- and post-MI groups, $n = 5$.

Fig. 2 The intraoperative ECG monitoring and postoperative blood viscosity.

2.2 结扎后梗死区域形成并伴随着心脏收缩功能显著减弱

超声显示心梗手术组的心脏有不活动的梗死区域(图 3B,黄色箭头),各指标的测量值见表 1。结果表明心梗 4 周后,评价心功能的多项超声指标发生了明显的改变。心梗使左心室壁舒张末期的厚度从(0.73 ± 0.02) cm 增加到(0.85 ± 0.09) cm,并且收缩末期内径从(2.01 ± 0.12) cm 增加到(2.60 ± 0.18) cm。相对应的,心梗后左心室收缩末期容积

量也显著增加(26.65 ± 4.58 mL vs. 18.13 ± 2.78 mL,见图 3E),提示泵血不全。同时,心输出量从(7.60 ± 0.57) L/min 减少到(4.44 ± 0.31) L/min(图 3F),指示心脏收缩功能的射血分数从(71.77 ± 1.81)% 减少到(48.70 ± 3.76)%,短轴缩短率从(40.64 ± 1.50)% 减少到(24.21 ± 2.33)%。综合以上结果表明心梗后心脏收缩功能受损,心室发生了重构。

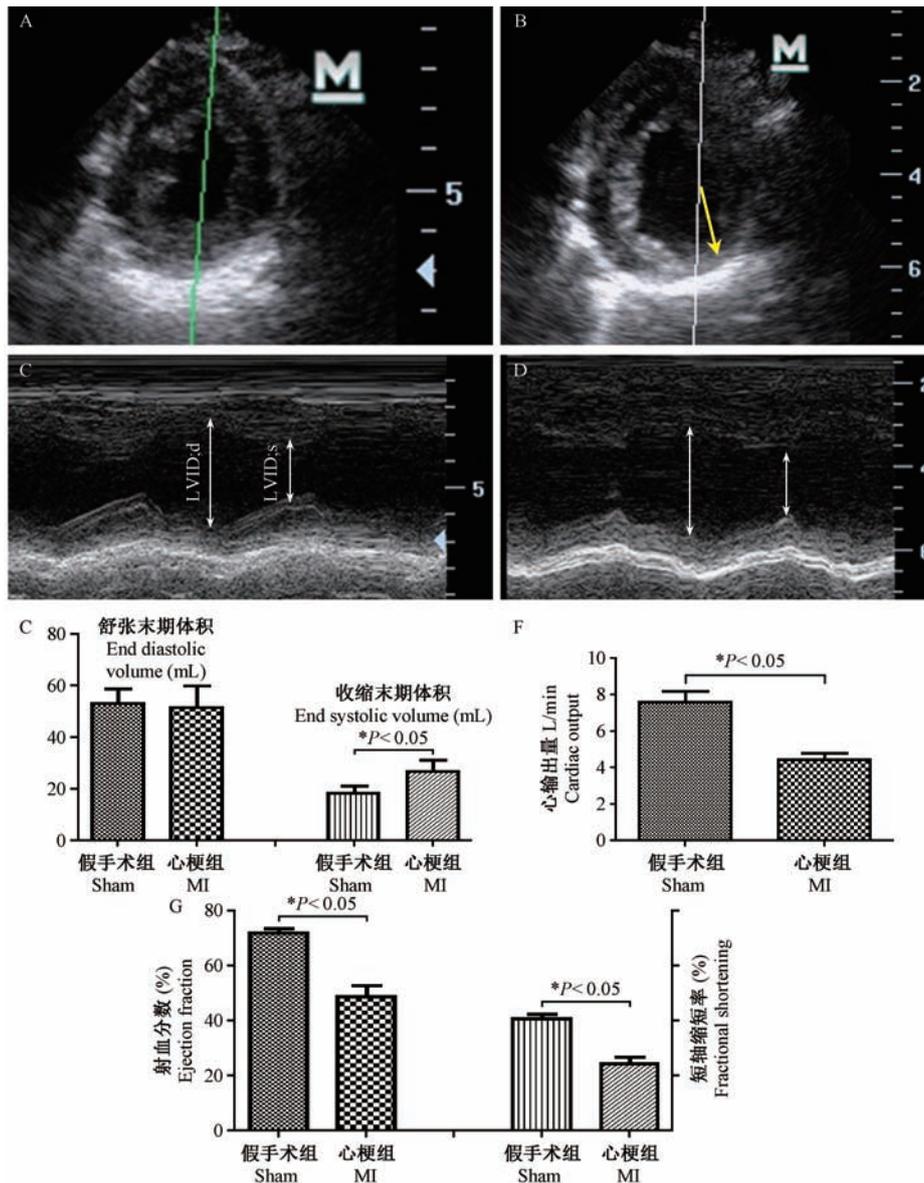
表 1 心脏超声功能评价结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 1 The evaluation results of echocardiography

心功能检测指标 Heart function indexes	假手术对照组 Sham	心梗手术组 MI
舒张末期左心室前壁厚度 IVSD (cm)	0.73 ± 0.02	0.85 ± 0.09
收缩末期左心室前壁厚度 IVS;s (cm)	1.04 ± 0.06	1.03 ± 0.10
舒张末期左心室后壁厚度 LVPW;s (cm)	0.68 ± 0.033	1.00 ± 0.09
收缩末期左心室后壁厚度 LVPW;s (cm)	1.02 ± 0.03	1.20 ± 0.11
舒张末期左心室内径 LVID;d (cm)	3.53 ± 0.12	3.44 ± 0.23
收缩末期左心室腔内径 LVID;s (cm)	2.01 ± 0.12	$2.60 \pm 0.18^*$
舒张末期左心室容量 EDV;d (mL)	53.05 ± 5.79	51.48 ± 8.27
收缩末期左心室容量 ESV;s (mL)	18.13 ± 2.78	$26.65 \pm 4.58^*$
心输出量 CO (L/min)	7.60 ± 0.57	$4.44 \pm 0.31^*$
射血分数 EF(%)	71.77 ± 1.81	$48.70 \pm 3.76^*$
短轴缩短率 FS (%)	40.64 ± 1.50	$24.21 \pm 2.33^*$
心跳 HR (Beats/min)	210 ± 10	214 ± 23

注: * $P < 0.05$,表明假手术对照组和心梗手术组的数值差异有显著性。

Note. * $P < 0.05$, indicating significant differences were seen between the MI and Sham groups. MI, myocardial infarction.



注: A、C. 超声显示豚鼠的正常心脏 B 型和 M 型图; B、D. 超声显示心肌梗死术组的 B 型和 M 型图, 黄色箭头指示心肌梗死术组心脏的梗死区域位置; D 图明显可见左心室内径收缩末期显著增加; E. 收缩末期和舒张末期的血容量; F. 心输出量; G. 射血分数和短轴缩短率。LVID; d-舒张末期左室内径; LVID; s-收缩末期左室内径。* $P < 0.05$ 表示心肌梗死术组(标记为“心梗组”)较假手术对照组(标记为“假手术组”)差异有显著性, $n = 5$ 。

图 3 超声心功能评价

Note. A, C. Typical B- and M-mode images of the normal heart in the sham group (short axis); B, D. Typical B- and M-mode images in the MI group (short axis); the yellow arrow indicates the infarct area of the heart; D. Dilated internal diameter at the end of systolic state was seen; E. End diastolic and systolic blood volume; F. Cardiac output; G. Ejection fraction and fractional shortening. LVID; d: Left ventricular diastolic diameter at the end diastolic state; LVID; s: Left ventricular diameter at the end systolic state. * $P < 0.05$, significant differences between the Sham and MI groups, $n = 5$.

Fig. 3 Ultrasonic evaluation of the cardiac function

2.3 血清生化指标变化

术后 4 周, 血清生化值的部分指标发生改变, 见表 2。心梗手术组中谷草转氨酶为 (31.5 ± 2.58) 、血清总胆红素 $(4.5 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$ 、直接胆红素为

$(0.92 \pm 0.33) \mu\text{mol/L}$ 、肌酐 $(141.75 \pm 12.65) \mu\text{mol/L}$, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 其他血清生化值无明显改变。这些指标的改变提示了生理功能的改变有密切关系。

表 2 假手术对照组和心梗手术组的血清生化值($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.2 Serum biochemical results of the sham and MI groups.

血清生化指标 Serum biochemical indexes	假手术对照组 Sham	心梗手术组 MI
谷丙转氨酶 ALT/U/L	46 ± 5.11	47.75 ± 7.88
谷草转氨酶 AST/U/L	25.25 ± 1.88	31.5 ± 2.58 *
总蛋白 TP/g/L	63.12 ± 0.138	60.17 ± 1.91
白蛋白 ALP/g/L	32.25 ± 0.77	23.77 ± 5.61
球蛋白 GLOB/g/L	30.87 ± 0.136	36.4 ± 6.03
总胆红素 TBIL/μmol/L	2.5 ± 0.47	4.5 ± 0.14 *
直接胆红素 D-BIL/μmol/L	0.025 ± 0.14	0.92 ± 0.33 *
碱性磷酸酶 ALP/IU/L	103 ± 19.3	104 ± 16.04
血糖 GLU/mmol/L	4.44 ± 0.36	5.96 ± 0.42
尿素氮 BUN/mmol/L	2.46 ± 0.17	2.89 ± 0.65
肌酐 CREA/μmol/L	92.75 ± 4.15	141.75 ± 12.65 *
总胆固醇 CHOL/mmol/L	2.37 ± 0.12	2.16 ± 0.06
甘油三酯 TG/mmol/L	0.48 ± 0.10	0.25 ± 0.05
高密度脂蛋白 HDL-C/mmol/L	1.05 ± 0.07	1.03 ± 0.07
极低密度脂蛋白 LDL-C/mmol/L	1.43 ± 0.06	1.29 ± 0.04
乳酸脱氢酶 LDH/U/L	384.75 ± 26.8	478.25 ± 49.58 *

注: * $P < 0.05$ 表示心梗手术组的数值较假手术对照组有明显差异。

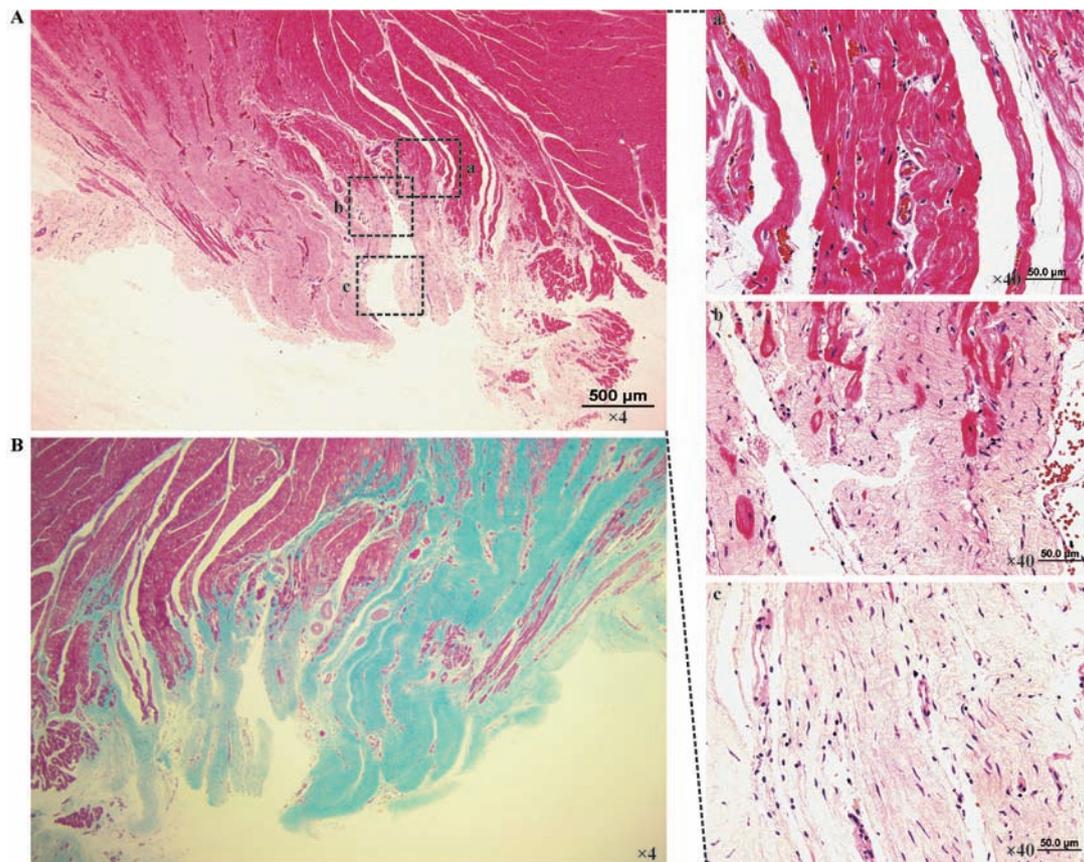
Note: * $P < 0.05$, significant differences were indicated between the MI and Sham groups.

2.4 心梗导致心肌纤维坏死、胶原纤维组织增生以及中性粒细胞和淋巴细胞增加

在 HE 染色切片上使用 4 倍物镜可观察到从非梗死区、梗死边缘区到梗死区组织变化的过渡(图 4A)。Masson 染色的梗死区可明显观察到纤维化的结缔组织(图 4B)。使用 40 倍物镜可清晰观察到梗死边缘区的心肌组织水肿、组织间隙增大,以及心肌纤维的断裂、溶解和结缔组织增生(图 4A, a-c)。同时,镜下可见中性粒细胞(图 5B、5C)、淋巴细胞增多的现象(图 5D),并有出血的病理特征(图 5B、5C)。

2.5 心梗后心肌重构调控、炎症和代谢通路基因的表达

基因表达差异分析表明心梗手术组心梗边缘区的有 2029 基因表达发生了显著改变,对这些差异基因进行生物途径富集分析,概要如下:(1) 调控心梗后心肌重构的信号通路激活和胞外基质-膜受体相互作用的改变,受影响的主要为构成心肌丝主要成分如肌动蛋白、肌球蛋白轻链、原肌球蛋白蛋白、整合素、



注:A. HE 染色。方框显示放大区域:(a) 非梗死区,心肌纤维形态正常,没有明显病变;(b) 边缘区,心肌纤维束断裂、坏死,胶原纤维增多;(c) 梗死区,不见心肌细胞,以瘢痕组织为主要特征。B. Masson 染显示增生的纤维(蓝色区域)。

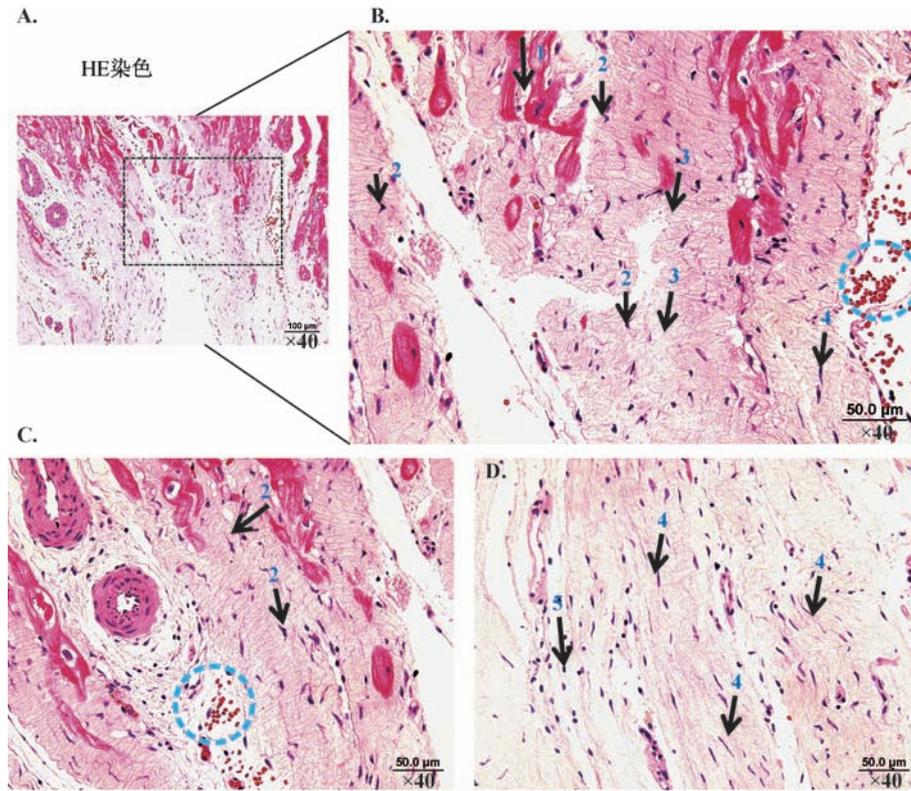
图 4 组织切片显示从非梗死区、梗死边缘区到梗死区的过渡

Note: A. HE staining. The rectangle shape shows the following magnified areas: (a) Non-infarct area, morphology of myocardial fibers appears normal, without obvious lesions; (b) Peri-infarct area, myocardial fiber breakage, necrosis, and collagen fibers are increased; (c) Infarct area, the cardiomyocytes are dissolved, fibrous scar is the main feature in this area. B. Masson staining shows hyperplasia of collagen fibers (blue).

Fig.4 The transition from non-infarct area to infarct area

受磷蛋白等,以及细胞基质的改变(见表3);(2) 白细胞跨内皮迁移通路以及补体/凝血级联信号通路激活,包括磷脂酰肌醇3激酶、胶原蛋白VI/V,基质金属酶亚型2和亚型12,丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(见表3),提示了组织炎症信号通路的激活,以及胞内外信号的串话;(3) 受影响的主要胞内信号通路是调控炎

症信号通路和脂代谢的PPAR(peroxisome proliferator-activated receptors,过氧化物酶体增殖物激活受体)信号通路(见表3);(4) 脂肪、糖、蛋白代谢能量的主要通路,如脂肪代谢、甘油酯代谢、糖酵解、三羧酸循环、丙酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等均受影响(见表4),提示了能量代谢机能的受损。



注:A. 显示所放大观察的区域;B. 局部放大图A,指示心肌纤维断裂溶解(箭头1)、中性粒细胞增多(箭头2)、结缔组织增生(箭头3)和出血现象(圆形示意);C. 中性粒细胞和出血现象(箭头2和圆形区域);D. 成纤维细胞核(箭头4)和淋巴细胞(箭头5)。

图5 显示典型的梗死边缘区的组织变化

Note. A. The magnified observation area of the "B"; B. The magnified area from "A", indicating the dissolved myocardial fibers (arrow 1), neutrophils (arrow 2), connective tissues (arrow 3) and bleeding (circular); C. Neutrophils and bleeding (arrow 2 and circle); D. The nuclei of fibroblasts (arrow 4) and lymphocytes (arrow 5).

Fig. 5 Typical histological changes in the peri-infarct area

表3 基因表达谱分析获得的主要富集生物信号调控途径

Tab. 3 Main enrichment of biological signal regulation pathways from the gene expression profile analysis

生物通路 Biological pathways	包含的基因名(编号) Included genes (ID)
心脏重构性 Cardiac remodeling myopathy	SGCB(100135674)*; ACTC(1100152267); SGCA(100240723); MYL(2396690); TPM(2396693); LOC(396781396781); ITGB(3397063); TGFB(3397400); PLN(397421); TPM(4397608);
胞外基质-膜受体相互作用 ECM-receptor interaction	COL6A(3100101551); SDC(2100152754); THBS(3100155108); GP(9100216312); ITGB(3397063); VTN(397192); COL5A(2397532); COL5A(1397533); TN-X(445520); CD36(733702)
白细胞跨内皮迁移 Leukocyte transendothelial migration	GNAI1(100144419); ACTN2(100157406); THY1(100271931); MYL2(396690); VCAM(1396925); ITGB(2396943); PIK3CG(396979); MMP(2397391); CYBA(397507); MYLIP(474162); CXCL(12494460); MAPK(12574062)
补体与凝血级联 Complement and coagulation cascades	SERPING(1100144304); LOC(100153504); THBD(100157642); CD(55396743); PLAU(396985); PLAT(397121); C1S(397274); CFH(397525); C7(397526); C1QA(445461); C4A(445467); C2(448981)
PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway	AQP7(100126283); SCD5(100135661); GK(100233182); SCD(396670); OLR1(396724); ACADL(396931); ACADM(397104); LPL(397537); ADIPOQ(397660); CPT1B(399528); FABP3(399532); FABP4(399533); RXR(G(445465); ACSLA(448980); FABP7(574075); CD36(733702)

注:括号内为基因库的基因编号。

Note. In the bracket was the gene ID in the gene library.

表 4 基因表达谱分析获得的主要富集代谢途径

Tab. 4 Main enrichment metabolic pathways from gene expression profile analysis.

代谢通路 Metabolic pathways	包含的基因名(编号) Included genes (ID)
脂肪代谢 Fatty acid metabolism	ECI2(100134957); ACADL (396931); ACADS (396932); HADHA (397012); HADHB (397017); ACADM(397104); HADH(397604); CPT1B(399528); ACSL4 (448980); ALDH2 (733685)
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	GPAT4 (100152836); AGPAT4 (100156632); LCLAT1 (100217396); GK (100233182); PPAP2C (100233200); AKR1B1(396816); LPL(397537); ALDH2 (733685)
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	MCEE (100037986); BCKDHA (100142666); BCKDHB (100142669); DBT (100156530); ACADS (396932); OXCT(1396978);HADHA(397012); HADHB(397017); ACADM(397104); DLD(397129); HADH(397604); ALDH2(733685);
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	ARG2 (100155893); ACY1 (396930); GLUL (396944); GOT1 (396967); GOT2 (396968); CKM (397264); SAT1 (397645);MAOA (414424); CKMT2 (733602); ALDH2(733685)
糖酵解 Glycolysis/Gluconeogenesis	ACSS2 (100153866); PGAM2 (100188980); FBP1 (397038); DLAT (397054); DLD(397129); ENO3 (692156); PFKM(733601); ALDH2(733685)
柠檬酸循环 Citrate cycle (TCA cycle)	ACLY(100125957); IDH3A (100157242); ACO2 (396999); DLAT(397054); DLD(397129)
丙酸代谢 Propanoate metabolism	MCEE (100037986); ACSS2 (100153866); ACACB (100154993); HADHA (397012); ACADM (397104); ALDH2(733685);
丁酸代谢 Butanoate metabolism	ALDH5A1(100157072); ACADS(396932); OXCT1 (396978); HADHA (397012); HADH (397604); ALDH2(733685); CS (397519); IDH2(397603); SDHB(414412); IDH3B(733641)

注:括号内为基因库的基因编号。

Note: in the bracket for gene ID from the gene library.

3 讨论

本研究首次应用我国特有的蕨麻小型猪施行心肌梗死手术,造模 4 周时的心功能指标、血清生化值、心脏组织学病理变化以及各项参数与已有其他论文报道相近似^[7-9],表明造模成功。

我们结扎位置与所报道其他实验猪如苏中家猪或五指山等小型猪的心梗模型的相近,但不容易因手术因素诱发房、室颤及其导致的抢救无效死亡^[10,11]。并且实验动物健康指数跟正常对照组比较无明显差异,恢复状况和我们研究所的其他报道一致^[4],表明蕨麻猪比其他猪更适合用于建立心梗模型,并且此模型在药效学或疾病机制的研究上能够减少因为实验动物机能异常导致的结果偏差。

超声心动图作为临床评价心脏结构和功能的主要工具,也广泛应用于猪心梗模型的评价^[12-13]。在超声评价指标中常用射血分数和短轴缩短率来表征(指示)心脏收缩功能的降低程度,我们所获得的这两个指标与其他报道的范围一致,分别大约减少 32% 和 40%^[14-18],这些数值也与小鼠模型相近^[19,20]。因此,此模型建立有助于促进小鼠研究成果的比较和转化。此外,鉴于现有的猪心梗模型报道中评价心脏功能参数项目比医学临床少,除常用的射血分数和短轴缩短率外,本文也报道了左心室收缩和舒张末期的前后壁厚度、心室内径、血容量,

以及心输出量等测量参数,模型参数全面系统,更具临床转化应用价值。

梗死后心肌重构及至心衰是一个渐进性的复杂过程。本模型的心脏组织切片展示了从梗死区域、梗死边缘区到非梗死区域的改变,并且清楚观察到心梗边缘区相互交错的断裂纤维和增生胶原、水肿组织、浸润的单核细胞和淋巴细胞,体现了猪心梗模型适合病生病理过程和机理解释。

本研究对心脏梗死边缘区和正常组织的基因表达谱进行差异分析,发现心梗致心肌重构、炎症调节、代谢途径的重要改变。在心梗后心肌重构途径的数据分析中,首先,我们看到许多结构蛋白基因表达的改变包括以肌小节蛋白如肌动蛋白、肌球蛋白轻链、原肌球蛋白,以及控制与胞内钙离子浓度的受磷蛋白,这些蛋白与心脏的收缩功能直接相关。其次,我们发现胶原蛋白 VI、胶原蛋白 V 的基因表达也发生明显的改变,这些亦与重构有直接关系。第三,在心梗机理的研究中,比较一致的认为炎症在心梗后心肌的命运起到重要的作用^[21]。我们从基因谱中也观察到了 3 个与心梗炎症有密切关系的主要通路变化,其中有 PPAR,已知其既有炎症调节功能又有调控脂肪酸和葡萄糖的氧化底物转换的作用^[22],其激活可导致脂肪酸氧化和增加心肌脂毒性^[23]。最后,我们在本文中报道了 8 个代谢通路异常的数据,含糖、脂、蛋白质代谢异常。这可与其他

研究关于梗死区代谢异常的报道^[24]互为参考。

本研究所获得的基因表达改变的特征能够与模型心功能、血清生化、病理组织参数指标能够相互解释,例如重构通路的激活,此结果与超声评价中收缩末期测得的左心室有明显扩张相对应;白细胞跨内皮迁移通路以及补体/凝血级联信号通路激活,此发现和组织观察的出血和炎症有相对应的结果;胞外基质-膜受体作用通路的激活和组织学观察到的细胞大量坏死纤维化相对应;同时,心梗中基因表达谱的改变既是多方面的,也是相互关系的,例如,PPAR 的表达提示了其可能是心肌炎症病理变化与心肌代谢功能调节的串话的关键节点,对这些调控关系的深入了解,对心梗疾病的精准诊治及机理解释令人期待。

参 考 文 献

- [1] Fink GR, Herholz K, Pietrzyk U, et al. Peri-infarct perfusion in human ischemia; Its relation to tissue metabolism, morphology, and clinical outcome [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 1993, 3 (2): 123 - 131.
- [2] Figueras J, Cinca J, Santana L, et al. Peri-infarction zone at risk during the first 5 days after an acute transmural myocardial infarction: electrocardiographic evidence [J]. *Am J Cardiol.* 1984, 53(4): 433 - 438.
- [3] Matsumoto H, Matsuda T, Miyamoto K, et al. Peri-infarct zone on early contrast-enhanced CMR imaging in patients with acute myocardial infarction [J]. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011, 4 (6): 610 - 618.
- [4] 闵凡贵, 潘金春, 王希龙, 等. 藏麻小型猪在广东地区的适应性观察 [J]. *家畜生态学报*, 2014, 35(7): 72 - 77.
- [5] 潘金春, 闵凡贵, 王希龙, 等. 藏麻小型猪繁殖性能测定和分析 [J]. *畜牧与兽医*, 2014, 46(12): 47 - 49.
- [6] 潘金春, 闵凡贵, 王希龙, 等. 藏麻小型猪主要脏器重量与体重的相关性分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4): 19 - 22.
- [7] 顾晓龙, 黄军, 董正华, 等. 介入法建立比格犬和小型猪急性心肌梗死模型的对比研究 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(9): 1090 - 1092.
- [8] 张晶, 傅向华, 贾辛未, 等. 小型猪急性心肌梗死后心力衰竭模型的构建 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(1): 33 - 36.
- [9] 顾晓龙, 黄军, 董正华, 等. 五指山小型猪急性心肌梗死合并急性心力衰竭模型的建立及评价 [J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33: 5932 - 5934.
- [10] 田玉龙, 钟红珊. 五指山小型猪在心血管系统疾病建模中的应用 [J]. *介入放射学杂志*, 2016, 25(4): 363 - 366.
- [11] 宋桂仙, 李小荣, 张凤祥, 等. 猪心肌梗死后室性心律失常模型建立方法的比较 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2012, 26(3): 246 - 249.
- [12] 张蕊, 王健, 薛继平, 等. 猪心肌梗死模型的建立以及心功能的超声评价 [J]. *山西医药杂志*, 2008, 37(21): 994 - 995.
- [13] 胡琼, 倪锐志. 超声心动图在猪心脏病模型中的应用进展 [J]. *医学综述*, 2011, 17(8): 1223 - 1226.
- [14] 吴剑, 蒲磊, 戴勇, 等. 前降支结扎构建滇南小耳猪心梗诱导的缺血性心脏病模型 [J]. *昆明医科大学学报*, 2016, 37(6): 21 - 24.
- [15] 陈剑, 王庆慧, 尹帆, 等. 急性前壁心肌梗塞猪模型左室壁三维运动的相关研究 [J]. *昆明医科大学学报*, 2015, 36(10): 9 - 12.
- [16] 赵国安, 孙海燕, 王显良, 等. 自体骨髓间充质干细胞移植对猪急性心肌梗死再灌注后心功能的影响 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2012, 41(5): 562 - 565.
- [17] 刘涛, 秦瑾, 刘正湘, 等. CD151 基因对心肌梗死心肌细胞凋亡和心功能的影响 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2009, 18(2): 117 - 122.
- [18] 易甫, 郭文怡, 吕安林, 等. 骨髓基质细胞结合血管内皮生长因子基因治疗猪慢性心肌缺血的疗效 [J]. *心血管康复医学杂志*, 2009, 18(4): 325 - 328, + 300.
- [19] Akhnokh MK, Yang FH, Samokhvalov V, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase limits mitochondrial damage and preserves function following ischemic injury [J]. *Front Pharmacol.* 2016, 7: (242). 7: 133.
- [20] Kandalam V, Basu R, Abraham T, et al. TIMP2 deficiency accelerates adverse post-myocardial infarction remodeling because of enhanced MT1-MMP activity despite lack of MMP2 activation [J]. *Circ Res.* 2010, 106(4): 796 - 808.
- [21] Sanders LN, Schoenhard JA, Saleh MA, et al. BMP antagonist gremlin 2 limits inflammation after myocardial infarction [J]. *Circ Res.* 2016, 119(3): 434 - 449.
- [22] Razeghi P, Young ME, Abbasi S, et al. Hypoxia in vivo decreases peroxisome proliferator-activated receptor alpha-regulated gene expression in rat heart [J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 287(1): 5 - 10.
- [23] Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism [J]. *Trends Cardiovasc Med.* 2000, 10(6): 238 - 245.
- [24] Hu Q, Wang X, Lee J, et al. Profound bioenergetic abnormalities in peri-infarct myocardial regions [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006, 291(2): H648 - 657.

[收稿日期] 2016 - 10 - 11