

谭伟江,李想,郑双,等. 压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 583-591.

Tan WJ, Li X, Zheng S, et al. Structural and functional pathological characteristics of pressure-overload induced heart failure mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 583-591.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2020. 05. 001

压力超负荷心衰小鼠模型的心脏结构和功能病理进程特征

谭伟江^{1,2#}, 李想^{2#}, 郑双², 马俊峰², 任学聪², 贺天真², 陈虹华², 陈建新^{1*},
杨丰华^{2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 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)

【摘要】 目的 建立小鼠心衰模型,应用超声影像学 and 病理学技术综合评价疾病发展过程中的特征性的心脏功能和结构的改变。**方法** 应用主动脉弓缩窄(transverse aortic constriction, TAC)手术技术建立压力超负荷致小鼠心衰模型,造模前 0 周和造模后 2、4、8 周采集主动脉弓缩窄处血流多普勒估测血管承受压力,采集 B 型和 M 型超声图像评价心脏结构左室收缩功能,采集二尖瓣口血流多普勒结合二尖瓣环组织多普勒评价心脏舒张功能,采集心脏组织进行组织病理学观察。**结果** 超声影像学结果显示术后 2、4、8 周主动脉血流压力均显著性增加。术后 2 周主要表现为特征性左室壁代偿性厚度增加、内径减少,收缩功能代偿性增加,但伴随舒张功能受损和心肌纤维化;术后 4 周为过渡期,主要表现为从室壁肥厚到心室扩张的过渡、收缩功能开始下降、舒张功能持续性受损、心肌进一步纤维化;术后 8 周为表现为特征性的心室腔扩大,收缩、舒张功能均显著性降低,心肌细胞部分溶解并且显著性纤维化。**结论** 通过评价小鼠主动脉弓缩窄后代偿性心肌肥厚期、过渡期到失代偿扩张型心衰等三个阶段的左室结构和功能,为主动脉弓缩窄模型的在基础和转化研究上的应用提供理论依据。

【关键词】 主动脉弓缩窄模型;疾病进程;超声影像学;病理学;收缩功能;舒张功能;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 05-0583-10

Structural and functional pathological characteristics of pressure-overload induced heart failure mouse model

TAN Weijiang^{1,2#}, LI Xiang^{2#}, ZHENG Shuang², MA Junfeng², REN Xuecong²,
HE Tianzhen², CHEN Honghua², CHEN Jianxin^{1*}, YANG Fenghua^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China.
2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals, Guangzhou 510633)
Corresponding author: YANG Fenghua. E-mail: fenghua.yang@gdlati.com; CHEN Jianxin. E-mail: jxchen@scau.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金-面上项目(31672376), 广东省科技专项(2017B020231001, 2018B030317001, 2019A030317014, 2018A0303130208), 广州市科技计划项目(201804010206), 广东省实验动物重点实验室(2017B030314171)。

Funded by National Natural Science Foundation of China-Surface Projects (31672376), Guangdong Provincial Science and Technology Project (2017B020231001, 2018B030317001, 2019A030317014, 2018A0303130208), Guangzhou Science and Technology Project (201804010206), Guangdong Key Laboratory for Laboratory Animals (2017B030314171).

[作者简介] 谭伟江(1992—),男,实习研究员,研究方向:基础兽医。Email: twj@gdlati.com;
李想(1992—),男,研究方向:心血管疾病动物模型。Email: lixiang@gdlati.com。
#共同第一作者

[通信作者] 杨丰华(1970—),女,博士,副研究员,研究方向:心血管生物学。Email: fenghua.yang@gdlati.com;
陈建新(1967—),男,博士,教授,研究方向:抗病毒药物研究。Email: jxchen@scau.edu.cn。
* 共同通信作者

[Abstract] Objective To establish a heart failure model in mice, and to use ultrasound imaging and pathology techniques to comprehensively evaluate the characteristics of cardiac function and structural changes during disease development. **Methods** The transverse aortic constriction (TAC) surgical technique was used to establish a model of pressure-overload-induced heart failure in mice. Blood flow Doppler spectra were collected to evaluate the pressure at the aortic arch stenosis before surgery and at weeks 2, 4, and 8 after it. B-mode and M-mode ultrasound images were collected to evaluate cardiac structure and systolic function. The blood flow Doppler spectrum from the mitral valve orifice and tissue Doppler spectrum from the mitral annulus were combined to evaluate cardiac diastolic function, and cardiac tissues were collected for histopathological observation. **Results** The ultrasound result showed that the blood pressure of the aortic arch stenosis increased significantly at weeks 2, 4, and 8 after the operation. At 2 weeks after the operation, the thickness of the left ventricular wall typically showed compensatory increases, while the inner diameter was decreased, accompanied by impaired diastolic function and myocardial fibrosis. Four weeks after the operation was the transition period, which was mainly manifested as a transition of the left ventricle from hypertrophy to dilation, decreased systolic function, continuously impaired diastolic function, and further fibrosis in the myocardium. Eight weeks after surgery, the ventricle was characterized by cavity enlargement, significant reductions of systolic and diastolic function, and cardiomyocytes being partially lysed and significantly fibrotic. **Conclusions** By evaluating the structure and function of the left ventricle in the three stages of compensated hypertrophy, transitional stage, and decompensated dilatation of a TAC-induced heart failure model in mice, the use of the model should advance basic research and translational medicine.

[Keywords] transverse aortic constriction model; disease progression; echocardiography; pathological evaluation; systolic function; diastolic function; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

我国心血管病患者达到 2.9 亿,死亡率居各疾病之首,已成为严重的公共卫生问题^[1]。多种心血管疾病包括高血压、瓣膜病、先天性主动脉狭窄均可导致左室压力超负荷,诱发心室代偿性肥厚、收缩舒张功能障碍,并进而发展为失代偿性心衰^[2]。压力超负荷致心衰是基础和转化医学的研究重点。最早由 Rockman 等^[3-4]报道应用小鼠主动脉弓缩窄(TAC)手术来诱导压力超负荷技术,是最常用的心衰疾病机制研究和药物研发的手术诱导模型之一。

目前在应用 TAC 小鼠心衰模型中普遍只关注某个病理进程点,例如基于心肌肥厚^[5-6]或心衰^[7]的研究,缺乏对模型多个疾病进程结构、功能和病理变化的完整探索。近年来随着影像学技术的不断发展,特别是超高频高分辨小动物超声影像系统的应用,为无创、连续性动态检测小鼠手术模型的心脏结构和功能变化提供了可能^[8-9]。在超声影像数据采集中,较为常用的为 B 型超声和 M 型超声,其通过测量心脏室壁厚度,心室内径并计算射血分数和短轴缩短率来评价心脏结构和收缩功能,但结合二尖瓣口血流多普勒和二尖瓣环组织多普勒评价心脏舒张功能的方法较为少用。除了影像学外,病理学技术也为深入了解模型病理变化提供了重要依据。本研究通过结合 B 型、M 型、多普勒超声影像学与病理组织学技术,对小鼠压力超负荷致心

衰模型疾病进程做出综合性评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 月龄无特定病原体(SPF)级雄性 C57BL/6J 小鼠 32 只,体重(26 ± 2)g,购买自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2018-0002】,饲养于广东省实验动物监测所 SPF 级和 AAALAC 认证的动物设施【SYXK(粤)2016-0122】,饲养设施环境保持温度 $22 \sim 26^{\circ}\text{C}$ 和湿度 $40\% \sim 60\%$,12 h 日夜周期交替。实验计划由广东省实验动物监测所实验动物伦理委员会审核通过(IACUC2017015)。

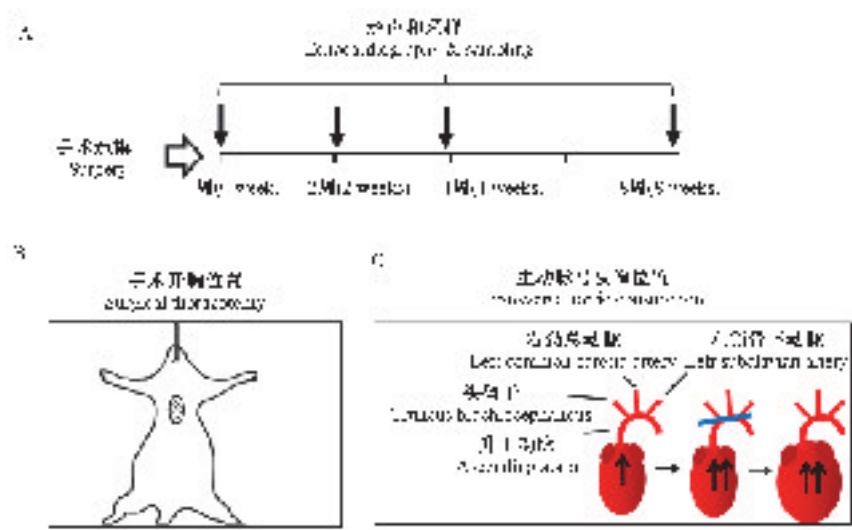
1.1.2 试剂与仪器

异氟烷(瑞沃德,中国),直接红 80(Sigma, 366648),苦味酸(Sigma, 197378),伊红(Sigma, 14009)苏木素(Sigma, 104302),显微镜(Leica DM 2000,德国),Vevo2100 超高频高分辨小动物超声影像系统(VisualSonics,加拿大)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

32 只小鼠随机分为手术造模前 0 周($n=8$)和手术造模后 2 周($n=8$)、4 周($n=8$)、8 周($n=8$)组。实验总体设计见图 1。



注:A:实验总体设计图;B:手术开胸位置;C:小鼠 TAC 造模示意图,蓝色:确定缩小尺寸所使用的针头。

图 1 小鼠心衰模型建模和实验设计

Note. A, The overall design of the experiment. B, Surgery thoracotomy. C, Schematic diagram of establishment of TAC model in mice. Blue, the needle for determining the constriction size.

Figure 1 Model establishment and experimental design for the murine heart failure model

1. 2. 2 小鼠压力超负荷心衰模型制备

按已有报道所述建模^[10-12],首先,使用 2%异氟烷(瑞沃德)混合气体对小鼠进行诱导麻醉,然后转移至手术台保定,行气管插管后连接呼吸机,给予 1.5%异氟烷混合气体维持麻醉;其次,小鼠胸部进行消毒及备皮后,第二肋位做纵向切口打开胸腔,暴露主动脉胸段;最后,在主动脉的头臂干与左颈总动脉间下方穿入 7-0 细线,把 26 G 细针与主动脉弓共同结扎,结扎后取出细针(图 1B,1C)。

1. 2. 3 主动脉弓血流多普勒超声

主动脉弓血流参数通过多普勒超声技术获取。将超声探头放置于小鼠右侧颈部位置,显示主动脉弓图像后,将多普勒取样容积光标放到头臂干与左侧颈总动脉间的主动脉弓段,获得主动脉血液峰值速度,结合多普勒效应运算获得血液峰值压力。

1. 2. 4 M 型和 B 型超声

对实验小鼠应用 Vevo 2100 小动物超声成像仪配合 MS-400 探头进行 B 型和 M 型超声测量。采用已报道的方法进行超声检测^[13-15],使用 1.5%异氟烷混合气体对小鼠麻醉,取仰卧位保定,探头切迹朝向小鼠右肩与中线成约 30°取得水平位胸骨旁左室长轴 B 型图;顺时针旋转探头约 90°,获得乳头肌平面的胸骨旁左室短轴 B 型图,同时放置 M 型超声光标,获得左室 M 型超声图像。记录室间隔收缩末期厚度(interventricular septum thickness, end-systolic, IVS;s),室间隔舒张末期厚度

(interventricular septum thickness, end-diastolic, IVS;d),左室收缩末期内径(left ventricular internal dimension, end-systolic, LVID;s),左室舒张末期内径(left ventricular internal dimension, end-diastolic, LVID;d),左室收缩末期后壁厚度(left ventricular posterior wall, end systolic, LVPW;s)和左室舒张末期后壁厚度(left ventricular posterior wall, end diastolic, LVPW;d)。计算反映左室收缩功能指标包括射血分数(ejection fraction, EF)和短轴缩短率(short axis fractional shortening, FS)。

1. 2. 5 二尖瓣血流和组织多普勒频谱采集

采集二尖瓣口血流和二尖瓣环组织多普勒频谱用于评价心脏舒张功能。将探头移动到胸腔的外侧壁水平放置,得到心尖四腔切面。将多普勒取样容积光标放置在二尖瓣瓣尖上方获得二尖瓣口舒张早期血流 E 峰值速度和舒张晚期血流 A 峰值速度,等容收缩时间(isovolumetric contraction time, IVCT),等容舒张时间(isovolumetric relaxation time, IVRT),和射血时间(ejection time, ET)。使用如下公式计算心肌功能指数(myocardial performance index, MPI): $MPI = (IVCT + IVRT) / ET$ 。同时,在标准心尖四腔心切面,选取组织多普勒模式显示完整二尖瓣环结构,容积光标至于左室前壁处获得二尖瓣环运动频谱。测量可获得舒张早期瓣环 e' 峰值速度和舒张晚期瓣环 a' 峰值速度。

1.2.6 病理学评价

采集 0、2、4、8 周组小鼠心脏样本,置于 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h,取心脏进行石蜡包埋,4 μm 厚度切片,HE 染色观察心肌细胞形态改变,天狼猩红染色分析心肌纤维化程度。

1.3 统计学分析

数据采用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用多功能数据图像分析软件 GraphPad Prism 7 进行统计分析。结果采用 One-way ANOVA 单因素方差分析及 Tukey's 检验比较 0、2、4、8 周组之间的指标值

的差异。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉弓缩窄诱导左室压力超负荷

血流多普勒用于检测血流速度流向及速度(图 2)。在造模前 0 周和造模后 2、4、8 周对小鼠主动脉弓缩窄部位进行测量。超声结果显示,与 0 周组相比,2、4、8 周组小鼠主动脉弓缩窄部位血流速度和压力均显著性增加。所有测量和计算值见表 1。

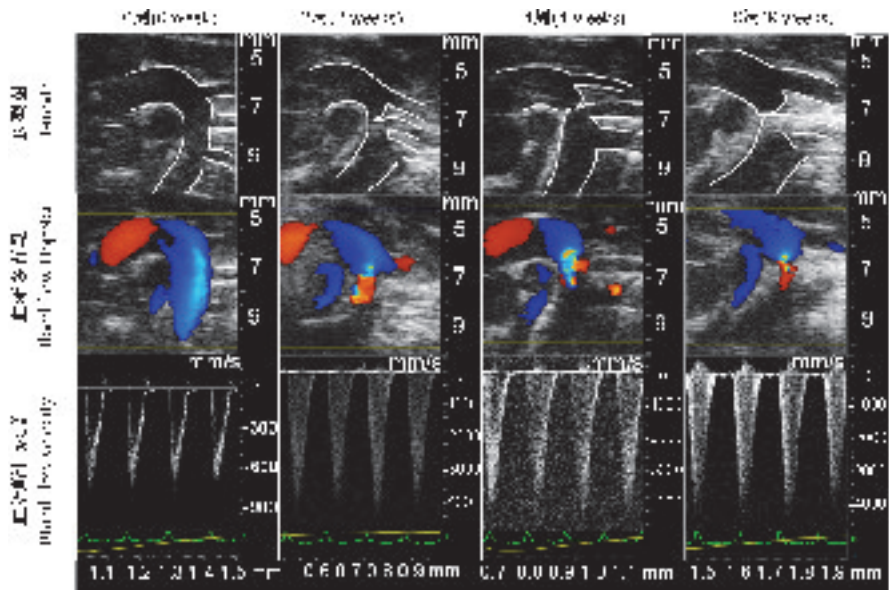


图 2 B 型图和血流多普勒频谱

Figure 2 B-mode and blood flow Doppler indices at the aortic arch stenosis

表 1 主动脉弓血流峰值速度及血流峰值压力($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Peak velocity and pressure at the aortic arch stenosis($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	血流峰值速度(mm/s) Peak velocity(mm/s)	血流峰值压力(mmHg) Peak pressure(mmHg)
0 周 0 week	689.42 ± 45.92	1.91 ± 0.26
2 周 2 weeks	4773.00 ± 622.71 *	92.48 ± 23.25 *
4 周 4 weeks	4395.57 ± 572.69 *	78.43 ± 21.21 *
8 周 8 weeks	4553.73 ± 644.53 *	84.40 ± 25.03 *

注:与 0 周组比较, * $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the 0 week group, * $P < 0.05$.

2.2 小鼠心衰病理进程中心脏结构的改变

胸骨旁 B 型长轴和短轴以及 M 型超声显示造模后 2、4、8 周心脏结构发生显著性的阶段性改变(图 3A)。与造模前 0 周组相比,造模后 2 周心脏室间隔(图 3A,3B)和左室后壁(图 3A,3D)在收缩和舒张末

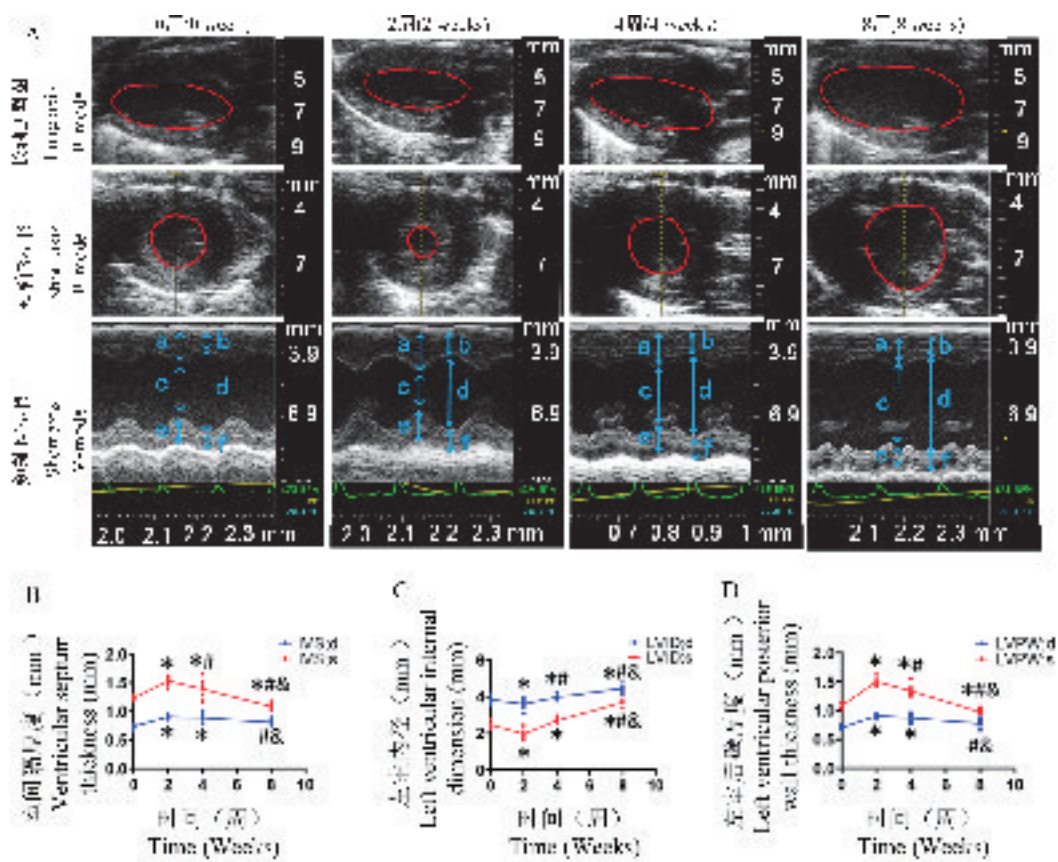
期均显著性增厚,而左室内径显著性缩小(图 3A,3C),表现为代偿性心肌肥厚的结构特征。随着疾病进程进入过渡期,造模后 4 周的心脏室间隔和左室后壁收缩末期的代偿性肥厚消失(图 3B,3D,红线);同时,左室内径开始扩大,指标值由显著性缩小恢复到

与造模前 0 周组一致(图 3C)。当疾病发展至第 8 周时,室间隔和左室后壁进一步变薄,与 2 周组和 4 周组比较均有显著性差异(图 3B,3D),在收缩期甚至显著性低于造模前 0 周组(图 3B,3D,红线)、在舒张期与造模前 0 周组接近(图 3B,3D,蓝线);第 8 周内径进一步扩大,与 2、4 周均有显著性差异(图 3C)。第 8 周的心脏结构结果指示了扩张型心衰的结构特征。所有测量和计算值见表 2。

2.3 小鼠心衰病理进程中左室收缩功能变化特征

射血分数(图 4A)和短轴缩短率(图 4B)分别反映了左室心肌缩短和左室排空功能,是整体评价心脏收缩功能的两个主要指标。结果显示,与造模

前相比,手术造模 2 周后,心脏射血分数和短轴缩短率显著性升高,提示左室收缩功能因压力超负荷导致代偿性功能增强。4 周时,心脏射血分数和短轴缩短率与 2 周时相比显著性降低,但与造模前无显著性差异,提示了左室代偿性增加的收缩功能逐渐丧失。当疾病持续至 8 周,心脏射血分数和短轴缩短率进一步降低,与 2、4 周相比均有显著性差异。另外,造模后小鼠心脏每搏输出量持续性下降。综上所述,在压力超负荷诱导小鼠心衰的病理过程中,心脏收缩功能首先代偿性增强,随着疾病发展,心脏收缩功能不断丧失,直至失代偿。术后各周心脏射血分数和短轴缩短率值,见表 3。



注:A:左室0、2、4、8周组的胸骨旁长轴观B型超声图、短轴观B型超声图和短轴观M型超声图,a-室间隔收缩末期厚度IVS;s和b-室间隔舒张末期厚度IVS;d、c-左室收缩末期内径LVID;s和d-左室舒张末期内径LVID;d/e-左室收缩末期厚度LVPW;s和f-左室舒张末期厚度LVPW;B-D:收缩末期(红)和舒张末期(蓝)的室间隔厚度、左室内径、左室后壁厚度。分别与0、2、4周组比较,*、#、&P<0.05。

图3 病理进程中M型和B型超声结果

Note. A, Parasternal long-axis B-mode ultrasound, short-axis B-mode ultrasound, and short-axis M-mode ultrasound images of the left ventricle at 0, 2, 4, and 8 weeks, a-Left ventricular septal end-systolic thickness IVS;s and b-Left ventricular septal thickness IVS;d, c-Left ventricular end-systolic diameter LVID;s and d-Left ventricular end-diastolic diameter LVID;d/e-Left ventricular end-systolic thickness LVPW;s And f-Left ventricular end-diastolic thickness LVPW;d. B-D, end-systolic (red) and end-diastolic (blue) interventricular septal thickness, left ventricular diameter, and left ventricular posterior wall thickness. Compared with 0 week, 2 weeks, and 4 weeks respectively, *, #, & P < 0.05.

Figure 3 B-mode and M-mode ultrasonic images in the pathological process

表 2 心脏结构测量值($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Structural indices in the pathological process($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	收缩末期室 间隔厚度 (mm) Interventricular ventricular septum thickness, end-systolic, IVS; s (mm)	舒张末期室 间隔厚度 (mm) Interventricular ventricular septum thickness, end-diastolic, IVS; d (mm)	收缩末期 后壁厚度 (mm) Left ventricular posterior wall thickness, end-systolic, LVPW; s (mm)	舒张末期 后壁厚度 (mm) Left ventricular posterior wall thickness, end-diastolic, LVPW; d (mm)	收缩末期 左室内径 (mm) Left ventricular internal dimension, end-systolic, LVID; s (mm)	舒张末期 左室内径 (mm) Left ventricular internal dimension, end-diastolic, LVID; d (mm)
0 周 0 week	1.23 ± 0.04	0.74 ± 0.03	1.08 ± 0.05	0.71 ± 0.03	2.47 ± 0.19	3.84 ± 0.20
2 周 2 weeks	1.53 ± 0.08 *	0.90 ± 0.03 *	1.50 ± 0.07 *	0.90 ± 0.04 *	1.96 ± 0.30 *	3.60 ± 0.27 *
4 周 4 weeks	1.39 ± 0.16 **	0.89 ± 0.09 *	1.34 ± 0.10 **	0.87 ± 0.07 *	2.69 ± 0.13 #	3.97 ± 0.16 #
8 周 8 weeks	1.08 ± 0.05 **&	0.81 ± 0.05 #&	0.97 ± 0.09 **&	0.77 ± 0.07 #&	3.69 ± 0.19 **&	4.45 ± 0.20 **&

注:分别与 0、2、4 周组比较,*,#, & $P < 0.05$ 。(下图/表同)
Note. Compared with 0 week, 2 weeks, and 4 weeks respectively, *, #, & $P < 0.05$. (The same in the following Figures and Tables)

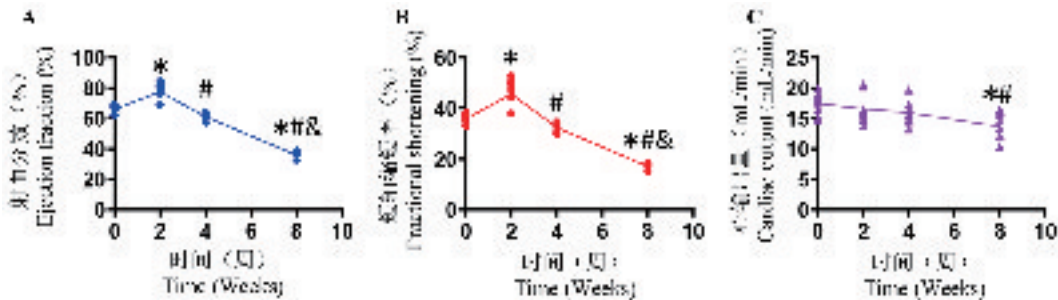


图 4 病理进程中左室收缩功能评价

Figure 4 Systolic function of left ventricle in the pathological process

表 3 心脏收缩功能测量值($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Assessment results of the left ventricular systolic function($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	心输出量 (mL/min) Cardiac output per beat (mL/min)	射血分数 (%) Ejection fraction, EF (%)	短轴缩短率 (%) Short axis fractional shortening, FS (%)
0 周 0 week	17.46 ± 1.86	66.08 ± 2.68	35.84 ± 1.91
2 周 2 weeks	16.56 ± 2.52	77.44 ± 5.97 *	45.57 ± 5.48 *
4 周 4 weeks	15.95 ± 1.95	61.13 ± 2.69 #	32.31 ± 1.89 #
8 周 8 weeks	13.66 ± 2.46 **	35.89 ± 2.48 **&	17.10 ± 1.31 **&

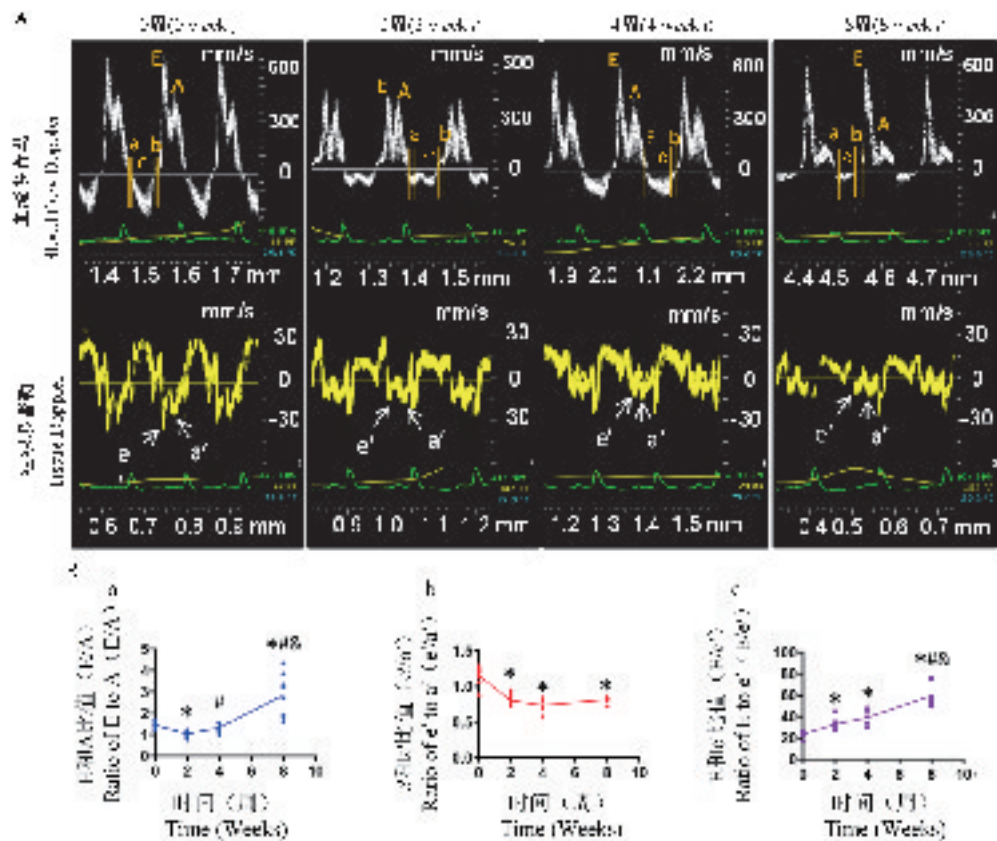
2.4 小鼠心衰病理进程中左室舒张功能的评价

采用二尖瓣口血流多普勒结合二尖瓣环组织多普勒整体评价左室的舒张功能(图 5A,表 4,5)。血流多普勒结果显示,与造模前比较,二尖瓣口血流等容收缩时间在 2、4 周有延长趋势但无显著性差异,8 周显著性延长,等容舒张时间在 2、4、8 周均显著性延长;射血时间在各时间点均无显著性改变。以上结果提示心功能受损。

二尖瓣口舒张早期血流 E 峰值速度在 2、4 周组显著性下降,其中 4 周组有回升趋势;E 峰值流速 8 周组无显著性改变。舒张晚期血流 A 峰值速度只在 8 周组显著性下降。计算血流峰值速度比 E/A,

可见先下降,随后回升到增加的趋势,其中,2 周组表现为显著性下降、4 周组表现为回升到接近正常值、8 周组表现为显著性上升(图 5B)。二尖瓣环组织多普勒 e'和 a'分别代表舒张早期和晚期的二尖瓣环运动速度(图 5A)。结果显示,与 0 周相比,2、4、8 周 e',a'及 e'/a'均显著性降低(图 5A,5B),表明心脏舒张功能受损。所有测量和计算值见表 4,5。

结合二尖瓣血流多普勒结合二尖瓣环组织多普勒测量结果,分析 E/e'值显示,此指标 0 周与 2、4、8 周值均显著性改变,表明三个心衰进程心脏舒张功能受损,并提示了 4 周过渡期的 E/A 值为假性正常(图 5B,表 4,5)。



注:A:0、2、4、8周组二尖瓣口血流多普勒和二尖瓣环组织多普勒频谱,其中E-舒张早期血流E峰值速度,A-舒张晚期血流A峰值速度,a-等容收缩时间,b-等容舒张时间,c-射血时间。e'-舒张早期瓣环e'峰值速度,a'-舒张晚期瓣环a'峰值速度。B:病理进程中的心脏舒张功能改变,其中a:E/A,舒张早期血流E峰值和舒张晚期A峰值的速度比例,b:舒张早期瓣环e'峰值和舒张晚期瓣环a'峰值的速度比例,c:舒张早期血流E峰值和瓣环e'峰值的比例。

图5 二尖瓣的血流多普勒和组织多普勒频谱

Note. A, 0, 2, 4 and 8 weeks group mitral valve orifice blood flow Doppler and mitral valve annulus tissue Doppler spectrum. E-mitral peak E wave velocity in diastole, A-mitral peak A wave velocity in diastole, a-isovolumic contraction time, b-isovolumic relaxation time, c-ejection time. e'-mitral annular e' velocity in diastole, a- mitral annular e' velocity in diastole. B, The cardiac diastolic function changes during the pathological process. a, E/A, ratio of early diastolic blood flow peak E and late diastolic peak A. b, Ratio of early diastolic annular e' velocity and late diastolic annular a' velocity. c, Ration of early diastolic blood flow peak E velocity to early diastolic annular e' velocity.

Figure 5 Blood flow and tissue Doppler spectrum of mitral valve

表4 二尖瓣的血流多普勒测量值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Measurement of blood Doppler of mitral valve($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	等容收缩 时间(ms) Isovolumetric contraction time, IVCT(ms)	等容舒张 时间(ms) Isovolumetric relaxation time, IVRT(ms)	射血时间(ms) Ejection time, ET(ms)	心肌功能指数 Myocardial performance index, MPI	E 峰值速度 (mm/s) Peak E-wave velocity, E(mm/s)	A 峰值速度 (mm/s) Peak A-wave velocity, A(mm/s)	E 和 A 比值 Ratio of E to A, E/A
0周 0 week	11.74 ± 1.44	12.57 ± 1.18	50.49 ± 4.70	0.48 ± 0.05	466.53 ± 57.33	672.00 ± 49.67	1.45 ± 0.14
2周 2 weeks	14.77 ± 4.64	15.67 ± 1.66*	49.79 ± 5.11	0.62 ± 0.16*	483.58 ± 61.86	501.99 ± 110.65*	1.03 ± 0.15*
4周 4 weeks	14.48 ± 1.60	16.20 ± 1.79*	49.34 ± 3.64	0.62 ± 0.07*	429.282 ± 84.79	561.57 ± 86.78*	1.33 ± 0.19#
8周 8 weeks	18.26 ± 4.13*	20.73 ± 3.21*##	52.50 ± 9.25	0.76 ± 0.12*	268.94 ± 101.02*##	681.08 ± 80.77*##	2.84 ± 0.99*##

2.4 小鼠心衰病理进程中左室病理组织学改变

对 0、2、4、8 周组小鼠进行心脏病理切片分析(图 6)。低倍镜下显示造模前心脏形态正常,造模 2 周心肌增厚、心腔减小,造模 4 周心脏内径增大,8 周心腔持续性扩张(图 6A,a-d),与 B 型及 M 型超声显示的结果一致。高倍镜下显示造模前心肌细胞结构完整、

细胞排列整齐(图 6A,e);造模 2 周细胞增大,但仍能看到完整细胞结构(图 6A,f);造模 4 周时,心肌细胞肥大、细胞结构排列紊乱(图 6A,g);造模 8 周后,心脏细胞核固缩、细胞溶解、细胞间隙明显增大(图 6A,h)。同时,天狼猩红染色显示,心肌组织纤维化随着小鼠心衰进程逐步增加(图 6B,6C)。

表 5 二尖瓣的组织多普勒测量值($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 5 Measurement of tissue Doppler of mitral valve($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Groups	a'峰值速度 (mm/s) Peak a' velocity, a' (mm/s)	e'峰值速度 (mm/s) Peak e' velocity, e' (mm/s)	e'和 a'比值 Ratio of e' to a', e'/a'	E 和 e'比值 Ratio of E to e', E/e'
0 周 0 week	25.09 ± 2.26	28.74 ± 3.24	1.15 ± 0.13	23.64 ± 3.02
2 周 2 weeks	19.26 ± 2.71 *	15.31 ± 1.80 *	0.80 ± 0.09 *	32.74 ± 5.72 *
4 周 4 weeks	20.91 ± 1.97 *	15.28 ± 2.11 *	0.73 ± 0.09 *	39.03 ± 7.53 *
8 周 8 weeks	14.31 ± 1.63 *#&	11.61 ± 1.38 *#&	0.81 ± 0.04 *	59.35 ± 10.37 *#&

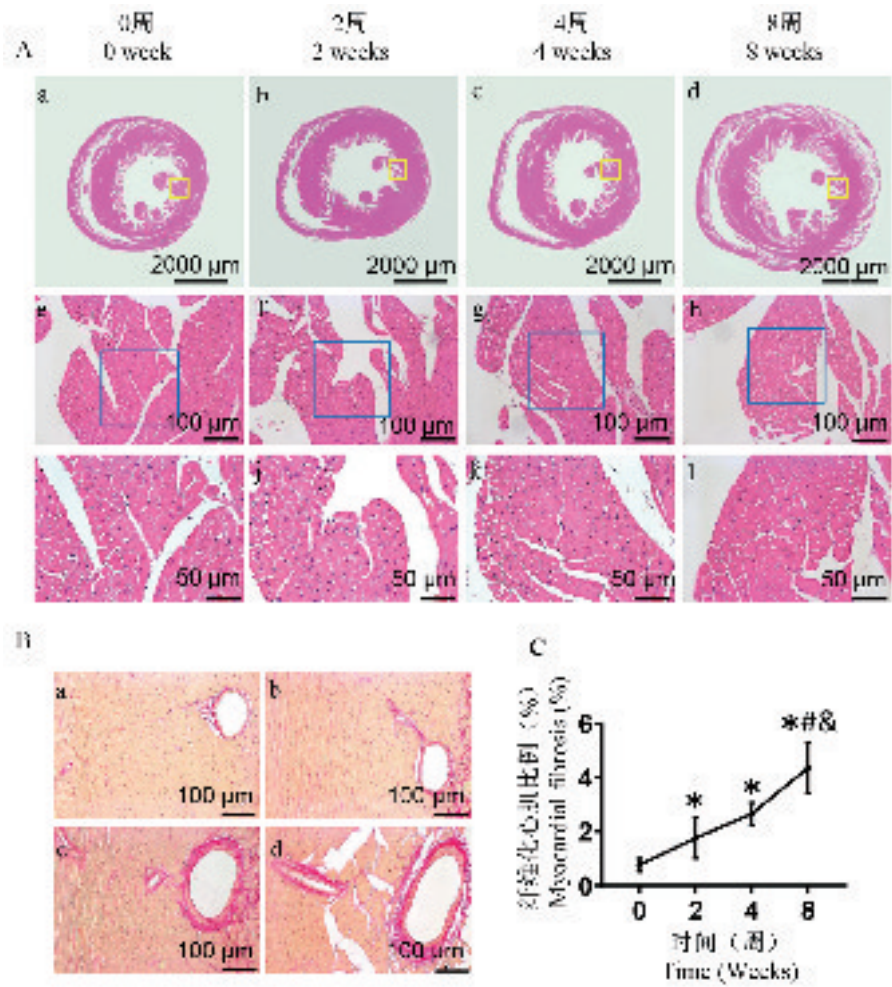


图 6 心脏组织病理评价($n=8$)
Figure 6 Pathological evaluation of cardiac tissue($n=8$)

3 讨论

在本研究中,我们应用影像学多种超声模式和病理学技术,展示了小鼠 TAC 模型的病理进程代偿性心肌肥厚、过渡期到失代偿扩张型心衰等三个主要阶段的特征。研究结果多方位可视化的展示了压力超负荷至心衰疾病中心脏功能逐步加剧恶化的过程,并通过 HE 染色观察组织病理改变和天狼猩红染色观察心肌纤维化,显示心肌组织经历从肥大到坏死阶段,心肌胶原纤维含量从少到多的积累过程,与现有研究报道结果相类似^[16]。这些实验数据综合性地评价了心衰疾病过程中心脏的改变,为此模型在心血管疾病领域研究的应用提供了可靠的理论依据。

目前,已有研究人员开始关注压力超负荷心衰小鼠模型引起的疾病变化^[16-17],但评价指标较少,往往只能集中在疾病发展过程中的某个时间点^[18-19]。我们对左室压力超负荷诱发心衰的从代偿性心肌肥厚、过渡期和失代偿扩张型心衰三个进程的结构和功能特点进行的分析。在影像学功能特征分析方面,我们在造模 2 周发现心脏射血分数和短轴缩短率显著性上升,到 4 周后下降至正常水平,并且至第 8 周失代偿性扩张期,射血分数和短轴短缩率持续下降。此外,我们发现造模八周后心脏等容收缩期显著性延长。等容收缩时间是反映收缩能力的重要指标,结合在 M-型超声结果发现的小鼠收缩功能显著受损(EF 值显著降低),我们判定心衰期左室收缩功能不足导致了血液不能快速冲开主动脉瓣流出左室,表现为等容收缩时间延长。综上所述表明,心脏收缩功能在压力超负荷诱发心衰的疾病进程中呈现先增强后持续性下降的倒“V”形变化趋势。我们的研究结果支持了临床上认为预防心衰需要尽早干预心脏收缩功能障碍的策略^[20],为科学探索心衰发生发展机制和防治药物研发提供参考依据。

有研究表明舒张功能的异常也是导致心脏疾病发展的重要因素^[21-22],但是当前压力超负荷致心衰模型的评价常集中在心脏结构和心脏收缩功能方面,缺乏心脏舒张功能的多方面评价。目前关于心脏舒张功能评价时常使用二尖瓣血流多普勒作为单一评价方式,通过核心指标二尖瓣血流 E/A 比值作为主要参考依据,这样容易造成诊断误差。研究证实,舒张期二尖瓣环的心肌运动和二尖瓣血流

多普勒频谱相互呼应,代表舒张早期瓣环运动速度 e' 和舒张晚期瓣环运动速度 a' 可作为舒张期心肌运用的直接指标,具有更高的敏感性和特异性^[23]。因此,我们除了关注二尖瓣血流核心指标 E/A 值外,还选择二尖瓣环组织多普勒 e'/a' 比值以及二者结合参数 E/ e' 作为重要参考指标进行评价依据,从而能够多方面完整评价心脏舒张功能。

第 2 周舒张功能评价显示 E/A 显著下降, e'/a' 和 E/ e' 的改变显示舒张功能受损,第 4 周时发现 E/A 上升至接近正常值,但 e'/a' 和 E/ e' 显示舒张功能受损,当疾病持续至第 8 周,E/A 显著性上升 e'/a' 和 E/ e' 的显著性改变均一致提示心脏舒张功能受损的进一步加剧,测量值表明 e'/a' 和 E/ e' 与 M 型超声和病理组织检测结果完全一致。另外,我们结合 e'/a' 和 E/ e' 的变化也揭示心脏舒张功能的假性正常化,与临床上的舒张不全导致的假性正常化特征一致^[24]。因此,二尖瓣环的各项指标在舒张功能评价中必不可少。

综上所述,通过影像学和病理学展示压力超负荷的心衰模型经历了代偿性心肌肥厚,过渡期到失代偿扩张型心衰的疾病进程中各项功能结构的改变,为日后小鼠主动脉弓缩窄模型的使用提供理论基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] 马丽媛, 吴亚哲, 陈伟伟. 《中国心血管病报告 2018》要点介绍[J]. 中华高血压杂志, 2019, 27(8): 712-716.
Ma LY, Wu YZ, Chen WW. Introduction of key points in Chinese Cardiovascular Disease Report 2018 [J]. Chin J Hypertension, 2019, 27(8): 712-716.
- [2] Frohlich ED, Susic D. Pressure overload[J]. Heart Fail Clin, 2012, 8(1): 21-32.
- [3] 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 U S A, 1991, 88(18): 8277-8281.
- [4] Noll NA, Lal H, Merryman WD. Mouse models of heart failure with preserved or reduced ejection fraction[J]. Am J Pathol, 2020, 190(8): 1596-1608.
- [5] Merino D, Gil A, Gómez J, et al. Experimental modelling of cardiac pressure overload hypertrophy: Modified technique for precise, reproducible, safe and easy aortic arch banding-debanding in mice[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3167.
- [6] Zhao X, Wang X, Wang J, et al. A peptide-functionalized magnetic nanoplateform-loaded melatonin for targeted amelioration of fibrosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. Int J Nanomedicine, 2020, 15: 1321-1333.
- [7] Wang G, Kong B, Shuai W, et al. 3, 3-Dimethyl-1-butanol

- attenuates cardiac remodeling in pressure-overload-induced heart failure mice[J]. J Nutr Biochem, 2020, 78: 108341.
- [8] 刘建, 范慧敏, 汪进益, 等. 小鼠心梗模型的建立与无创评价[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3): 196-198, 282.
- Liu J, Fan HM, Wang JY, et al. Establishment and noninvasive evaluation of myocardial infarction in mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(3): 196-198, 282.
- [9] Kandam 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.
- [10] Kandam V, Basu R, Moore L, et al. Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 leads to exacerbated left ventricular dysfunction and adverse extracellular matrix remodeling in response to biomechanical stress [J]. Circulation, 2011, 124(19): 2094-2105.
- [11] Pavel Z, Manoj G, Jun M, et al. Pressure-overload-induced heart failure induces a selective reduction in glucose oxidation at physiological afterload[J]. Cardiovasc Res, 2013, 97(4): 676-685.
- [12] Wang S, Wu J, You J, et al. HSF1 deficiency accelerates the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure through endothelial miR - 195a - 3p-mediated impairment of cardiac angiogenesis [J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 118: 193-207.
- [13] Kandam 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.
- [14] Wu J, You J, Jiang G, et al. Noninvasive estimation of infarct size in a mouse model of myocardial infarction by echocardiographic coronary perfusion [J]. J Ultrasound Med, 2012, 31(7): 1111-1121.
- [15] Akhnoh 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: 133.
- [16] 奚晓青, 陈小真, 马全鑫, 等. 主动脉弓狭窄致大鼠慢性心力衰竭模型的建立及病理过程观察[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(4): 35-40, 85.
- Xi XQ, Chen XZ, Ma QX, et al. Establishment of rat model of chronic heart failure caused by aortic arch stenosis and observation of pathological process[J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(4): 35-40, 85.
- [17] 方明笋, 金桦帅, 张利棕, 等. 小鼠非开胸式主动脉弓狭窄心衰模型的构建及评价[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 14-19.
- Fang MS, Jin TS, Zhang LZ, et al. Construction and evaluation of a mouse model of heart failure with non-thoracic aortic stenosis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 14-19.
- [18] Omiya S, Omori Y, Taneike M, et al. Cytokine mRNA degradation in cardiomyocytes restrains sterile inflammation in pressure-overloaded hearts[J]. Circulation, 2020, 141(8): 667-677.
- [19] Tang X, Pan Li, Zhao S, et al. SNO-MLP (S-Nitrosylation of muscle LIM protein) facilitates myocardial hypertrophy through TLR3 (toll-like receptor 3)-mediated RIP3 (Receptor-Interacting Protein Kinase 3) and NLRP3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3) inflammasome activation [J]. Circulation, 2020, 141(12): 984-1000.
- [20] 潘锋. 预防心衰需早期干预左心室收缩功能障碍—访南方医科大学南方医院心血管内科许顶立教授[J]. 中国当代医药, 2019, 26(35): 1-3.
- Pan F. Early intervention of left ventricular systolic dysfunction in the prevention of heart failure: a visit to xu dingli, professor of cardiovascular medicine, nanfang hospital, southern medical university[J]. Chin Mod Med, 2019, 26(35): 1-3.
- [21] 胡晓贞, 董耀荣. 舒张性心力衰竭的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(5): 606-607.
- Hu XZ, Dong YR. Research progress of diastolic heart failure [J]. Chin J Integr Med, 2014, 12(5): 606-607.
- [22] 刘思谦. 彩色多普勒超声心动图评价冠心病左室舒张功能的临床价值[J]. 中国医药指南, 2011, 9(30): 105-106.
- Liu SQ. The clinical value of color doppler echocardiography in evaluating left ventricular diastolic function of coronary heart disease[J]. Guid Chin Med, 2011, 9(30): 105-106.
- [23] 陈惠珍, 林美燕, 阮琴韵, 等. 二尖瓣环运动速度达峰时间评价左心室舒张功能的价值[J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31(2): 132-134.
- Chen HZ, Lin MY, Ruan QY, et al. Evaluation of left ventricular diastolic function in mitral annulus at peak velocity [J]. Chin J Ultrasound Med, 2015, 31(2): 132-134.
- [24] 刘克俭. NT-proBNP 在舒张性心力衰竭中的临床诊断及心功能分级评估中的意义[J]. 中国医药指南, 2019, 17(11): 106-107.
- Liu KJ. Significance of NT-proBNP in clinical diagnosis and grading assessment of cardiac function in diastolic heart failure [J]. Guid Chin Med, 2019, 17(11): 106-107.

[收稿日期] 2020-04-22