

姜笑雨,刘梦迪,马嘉昕,等. 基于植入式渗透泵经异丙肾上腺素诱导心肌肥厚模型大鼠条件的改进及评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 60-67.

Jiang XY, Liu MD, Ma JX, et al. Establishment and evaluation of a cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through a subcutaneously implanted osmotic pump [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 60-67.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 009

基于植入式渗透泵经异丙肾上腺素诱导心肌肥厚模型大鼠条件的改进及评价

姜笑雨^{1,2}, 刘梦迪^{1,2}, 马嘉昕^{1,2}, 董伟^{1,2,3}, 张旭^{1,2,3}, 张连峰^{1,2,3}, 吕丹^{1,2,3*}

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021; 2. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021; 3. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 国家人类疾病动物模型资源库, 北京 100021)

【摘要】 目的 心肌肥厚是一种缓慢发展的有效代偿功能, 是对血流动力学或心肌损伤的适应性反应, 是导致心衰的独立风险因素。已有报道显示, 经异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO) 诱导的心肌肥厚大鼠模型, 其给药途径和诱导剂量差异很大, 模型动物病理表型发展进程不均一。**方法** 综合以往方法的先进性、模型表型的均一性、方法稳定性及复制的难易性等因素, 本文利用皮下植入渗透泵的方式, 采用低剂量长时程给予 ISO (4 mg/kg, 持续 28 d) 诱导构建心肌肥厚大鼠模型, 并利用超声影像、病理组织学染色、免疫荧光染色及 Real-time PCR 等技术对模型表型进行评估。**结果** 模型大鼠病理表型典型。整体表型, 包括增大的心脏体积、心室壁厚度及心重指数; 细胞表型, 包括增大的心肌细胞, 严重的心肌纤维化, 心肌纤维断裂、溶解, 线粒体脊消失、空泡化, 心肌 Z 线、M 线以及闰盘扭曲模糊等; 分子表型, 包括心肌肥厚标志物心房钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 及脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP) 显著升高。**结论** 本文建立的心肌肥厚大鼠模型, 方法稳定易复制, 表型特征典型, 更适于基因功能分析及相关药物筛选等科学研究。

【关键词】 心肌肥厚; 大鼠; 异丙肾上腺素; 植入式渗透泵

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0060-08

Establishment and evaluation of a cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through a subcutaneously implanted osmotic pump

JIANG Xiaoyu^{1,2}, LIU Mengdi^{1,2}, MA Jiaxin^{1,2}, DONG Wei^{1,2,3}, ZHANG Xu^{1,2,3}, ZHANG Lianfeng^{1,2,3}, LYU Dan^{1,2,3*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, National Health Commission of China (NHC), Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China. 2. Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021. 3. National Human Diseases Animal Model Resource Center, Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【基金项目】 北京市自然科学基金 (5212017)。

【作者简介】 姜笑雨 (1995—), 女, 硕士, 研究方向: 心血管疾病相关动物模型创制。E-mail: jiangxiaoyu@cnilas.org

【通信作者】 吕丹 (1980—), 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 从事心血管相关动物模型创制, 发病机制及基因功能分析。

E-mail: lvd@cnilas.org

【Abstract】 Objective Cardiac hypertrophy (CH) is classified into physiologic and pathological types; it can be induced under chronic stress and is an independent risk factor for heart failure. Previous reports have suggested that drug delivery routes and dosage of isoprenaline (ISO) vary widely. The pathological characteristic of CH animal models varies induced by ISO treatment. **Methods** We established a rat CH model by subcutaneous implantation of an osmotic pump with low dose of ISO and long duration (4 mg/kg, for 28 days). The phenotypes were determined by echocardiography, histopathological observation, immunofluorescence and Real-time PCR. **Results** The pathological phenotypes of rats were typical. The overall phenotypes included markedly increased heart size, heart weight to body weight ratio and heart wall thickness. The cell phenotypes included enlarged cardiomyocytes and severe myocardial fibrosis, myocardial fiber rupture and myolysis, mitochondria ridge disappearance and vacuolation, distortion of the Z-line, M-line and leap disk. The molecular phenotypes including increased expression of ANP and BNP. **Conclusions** The rat model established in this study exhibited typical CH phenotypes. This method is stable and easy to replicate and this model can be used for scientific research such as for gene function analysis and relevant drug screening.

【Keywords】 cardiac hypertrophy; rat; isoproterenol; implantable osmotic pump

心肌肥厚,作为一种适应性效应,通常包括病理性和生理性两种类型,而病理性肥厚是导致心衰的独立风险因素^[1-2]。心肌肥厚的主要特征包括心重指数增大、收缩力增强,这些皆是心脏功能及心肌耗氧量增加后的代偿效应,同时,它可以在某种程度上维持相对正常的心输出量和血液循环功能。所以,心肌肥厚是一个缓慢发展且有效的代偿进程。

尽管心肌肥厚在最初的阶段可以获得心肌功能的代偿性适应效应,但长期的病理性心肌肥厚,可以导致基因调控网络异常,诱发严重的心肌纤维化和心肌功能受损,并最终失代偿发展为心衰,甚至死亡。

动物模型是研究发病机制的重要工具,而目前报道显示,通过手术或者药物皆可诱导建立心肌肥厚动物模型。通过手术诱导,如主动脉缩窄术(transverse aortic constriction, TAC),对操作技术要求较高,需要长期反复的练习,且因手法差异的原因,不同技术员建立的模型,动物表型一致性较差,实验室内数据变异亦较大。利用药物诱导建立心肌肥厚模型,包括异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO),去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)和血管紧张素(angiotensin II, AngII)等药物^[3-5],方法简易,但造模剂量及给药方式差异较大,建立的模型动物表型变异范围广。

异丙肾上腺素已广泛应用于临床基础医学研究,包括疾病发病信号机制,疾病的代谢调节调控,生理进程的应激反应等等多种生物进程。其作为非选择性 Beta 激动剂^[6-9],其可诱发心脏骤停已经心肌细胞传导障碍等,在这种情况下,增加处理剂量后,可继而诱发心肌细胞的不可逆转的刺激和损伤,进而引发心肌缺血性损伤^[10-11]。近年来,随着

研究的深入,其在血管内皮生成以及细胞氧化应激损伤方面有了进一步的发现^[7,12]。

ISO 可引起大鼠和小鼠心肌损伤、坏死、纤维化和心室重构。同时,随着心脏功能的下降,可出现许多类似于人类心肌肥大的形态及代谢异常改变。目前,已报道的经 ISO 建立的心肌肥厚动物模型,有多种给药途径,且剂量范围差异亦较大,如大鼠皮下注射 ISO (5 mg/(kg·d), 7 d), 大鼠皮下注射 ISO (1 mg/(kg·d), 10 d), 微量渗透泵皮下植入小鼠 (50 mg/(kg·d), 28 d) 等。此外,上述方法建立的动物模型病理发展进程也存在不均一的问题^[13-16]。目前,心肌肥厚动物模型制备方法还没有统一的标准,尤其是大鼠心肌肥厚模型的制备。

因此,我们通过总结已报道的构建方法,并综合上述方法的先进性、模型表型的均一性,方法的稳定性及复制的难易性等因素。通过皮下植入渗透泵给予 ISO,经低剂量长时程(4 mg/kg, 持续 28 d)诱导建立心肌肥厚大鼠模型,从心脏整体形态及功能改变、心肌细胞显微和超微结构的改变以及分子标志物 3 个水平进行评估,结果显示模型动物间病理表型均一性好,心肌肥厚表型典型。

综上所述,本研究建立的大鼠模型具有典型的心肌肥厚表型,动物表型均一性好、方法稳定且易于复制,更适合于基因功能分析及相关药物筛选等科学研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 7 只(10~12 周龄,体重 250~300 g),由中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物资源研究中心繁育并提供[SCXK

(京)2019-0011],大鼠饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏障环境动物房内[SYXK(京)2019-0014],同时饲养房间,采用每 12 h 进行交替明暗式照明。同时,动物实验中涉及的操作已得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用及管理委员会(IACUC,ZLF18003)的许可认证。

1.2 主要试剂与仪器

异丙肾上腺素(I5627, sigma, 美国);WGA 抗体(W7024, Invitrogen, 美国);磷钨酸(Innochem, 中国);重铬酸钾(Innochem, 中国);TRIzol 试剂(Solarbio, 中国);10%福尔马林(益利, 中国)。小动物超声影像系统(加拿大, Vevo3100);逆转录试剂盒(TaKaRa, PrimeScript RT reagent Kit, 美国);切片扫描机(徕卡 TCS SP2, 德国);干燥仪(泰斯特, 中国);渗透泵(MODEL 2004, ALZET, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 异丙肾上腺素药物处理

选择的渗透泵(MODEL 2004, ALZET)腔体容积为 200 μ L, 泵药容积为 6 μ L/d。配制好的 ISO(I5627, sigma, 药物剂量为 4 mg/(kg · d))注入渗透泵, 随后置入无菌生理盐水中浸泡至少 40 h (37℃)方可使用。对照组渗透泵注入生理盐水, 后续操作相同。

大鼠经异氟烷(1.5%~2.0%)麻醉后, 俯卧位放置于手术台热垫上, 四肢固定, 颈部皮肤经备皮及消毒后, 剪取 1 cm 左右纵向切口, 渗透泵从切口处植入颈部皮下位置。经缝合消毒后, 动物解除麻醉。将动物放置观察笼内, 直至苏醒并恢复正常活动状态, 随后常规饲养, 每日记录动物状态, 于手术后 28 d 时, 对大鼠模型的表型, 包括整体形态和功能, 心肌细胞显微和超微结构的改变以及分子标志物 3 个水平进行评估。

1.3.2 超声影像学检查

大鼠于超声检查前, 需经麻醉(异氟烷, 浓度为 1.5%~2.0%)及备皮(胸前区脱毛, 以降低对超声波的干扰), 动物固定于超声仪自带操作台面上(含加热板, 动物采取仰卧位), 对大鼠的四肢进行固定, 以保持检查全程图像的稳定性。动物麻醉至其呼吸平稳后, 利用 201 探头, 经胸前区长轴和短轴两个切面, 采集灰阶模式和运动模式信号, 经 3100 工作站数据分析系统, 导出超声参数。包括左室内径(收缩末期和舒张模型两个节点);左室容积(收缩

末期和舒张模型两个节点);左心室室壁厚度(收缩末期和舒张模型两个节点)以及左心室收缩功能等多项超声参数。

1.3.3 苏木素伊红染色

在观察终点时, 对动物实施安乐死, 开胸腔后摘除心脏, 并于 0℃~4℃的生理盐水中将心脏中残余血液清洗干净, 随即转入预冷的福尔马林固定液中固定过夜。修整固定后心脏组织并脱水后制成蜡块。

切取厚度为 4 μ m 石蜡切片, 经干燥仪制片。HE 染色完成后, 将切片扫描成电子文档, 并于专业工作站进行图像分析并截图。

1.3.4 Masson 三原色染色

在观察终点时, 对动物实施安乐死, 开胸腔后摘除心脏, 并于 0℃~4℃的生理盐水中将心脏中残余血液清洗干净, 随即转入预冷的福尔马林固定液中固定过夜。修整固定后心脏组织并脱水后制成蜡块。

切取厚度为 4 μ m 石蜡切片, 经干燥仪制片。经丽春红染色、磷钨酸分化、亮绿染色后, 随后经脱水透明。染色完成后, 将切片扫描成电子文档, 并于专业工作站进行图像分析并截图。

1.3.5 透射电镜观察

大鼠经安乐死后, 摘取心脏, 经生理盐水清洗, 摘取左室处约 2 mm³ 心肌组织, 置于 2.5%的戊二醛固定液中固定 24 h (4℃)。经饿酸固定、梯度乙醇脱水、环氧丙烷置换, 最后经环氧树脂 Epon812 包埋。经透射电镜观察心肌组织超薄切片结构变化。

1.3.6 免疫荧光观察

在观察终点时, 对动物实施安乐死, 开胸腔后摘除心脏, 并于 0℃~4℃的生理盐水中将心脏中残余血液清洗干净, 随即转入预冷的福尔马林固定液中固定过夜。修整固定后心脏组织并脱水后制成蜡块。

切取厚度为 4 μ m 石蜡切片, 经干燥仪制片。经抗原修复、Tritox-100 穿透、羊血清封闭后, 孵育抗体, 于荧光显微镜下观察并导出图片。

1.3.7 RNA 提取及实时荧光定量分析

大鼠经安乐死后, 摘取心脏, 经生理盐水清洗后, 摘取约 20 mg 心肌组织, 于自动破碎仪及 TRIzol Reagent 裂解后, 经氯仿分层、异丙醇沉淀及乙醇清洗, 即获得总 RNA 提取物。经逆转录获得 cDNA。经 PCR 扩增(ANP 引物序列, F: 5'-

GAGCCTGCGAAGGTCAAG-3', R: 5'-GTCTGTCCGTGGTGCTGA-3'; BNP 引物序列, F: 5'-TAGCCAGTCTCCAGAACA-3', R: 5'-AACAACCTCAGCCCGTCA-3'; GAPDH 引物序列, F: 5'-TATCGGACGCCTGGTTAC-3', R: 5'-TGCTGACAATCTTGAGGGA-3'), 鉴定 ANP 及 BNP 的表达情况。

1.4 统计学方法

本文数据采用 GraphPad 软件(版本 Prism 7)统计处理,获得数据表示为平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),间采用 Student's *t* 分析,且 $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 模型大鼠心脏整体形态及功能表型评价

通过总结已报道的构建方法,并综合上述方法的先进性、模型表型的均一性、方法稳定性及复制的难易性等因素。我们利用植入式渗透泵给予 ISO,经低剂量长时程(4 mg/kg,持续 28 d)诱导建立了心肌肥厚大鼠模型,并利用超声影像、病理组织学观察、免疫荧光染色及 Real-time PCR 等技术,从心脏整体形态及功能、心肌细胞显微和超微结构以及分子标志物 3 个水平,对模型表型进行评估(图 1)。

首先,超声影像分析显示模型大鼠收缩末期前壁和后壁厚度显著增高(图 2A~2C, LVAWS, $P=0.0327, n=3$; LVPWS, $P=0.0275, n=3$),反映心脏收缩功能的射血分数和短轴缩短率(图 2D~2E,

EF%, $P=0.0206, n=3$; FS%, $P=0.0188, n=3$)亦显著增高,而模型大鼠左室腔内径没有显著改变,这与临床上观察到的心肌肥厚表型一致,即心室壁增厚,心脏收缩功能增强,心室腔减少或不改变。

随后,我们利用病理组织学染色观察模型大鼠心肌组织学改变,首先,通过模型大鼠心脏长轴整体切片的 HE 染色,发现模型大鼠心脏整体增大,心室壁增厚。同时,大体解剖时经心脏湿重获得的心重/体重比显著增高(图 3A~3B, HW/BW, $P=0.0202, n=3$)。这些观察结果与超声影像学观察结果一致。

2.2 模型大鼠心肌显微和超微水平表型评价

我们首先通过 HE 染色,对模型大鼠心肌显微结构形态的改变进行分析,发现模型大鼠心肌纤维发生不均一性肥大,排列紊乱(图 3C)。

随后通过 Masson 染色观察模型大鼠心肌胶原沉积情况,发现模型大鼠纤维化程度显著增高(图 3D~3E, $P<0.0001, n=3$)。

为进一步观察模型大鼠心肌细胞形态并对肥大细胞进行定量分析,我们利用模型大鼠心肌切片进行细胞膜标志物 WGA (Wheat Germ Agglutinin Conjugate) 免疫荧光染色。结果显示模型大鼠心肌细胞不均一性肥大、排列不齐、细胞膜不连续、膜结构破损严重,经心肌细胞横截面积定量分析,显示模型大鼠心肌细胞显著增大(图 4A~4B, $P<0.0001, n=3$)。

随后,我们通过透射电镜观察了模型大鼠心肌组织超微结构形态的改变,我们发现模型大鼠

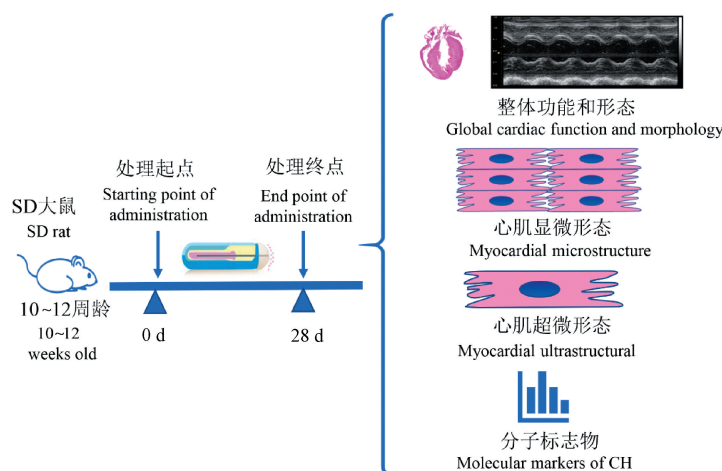
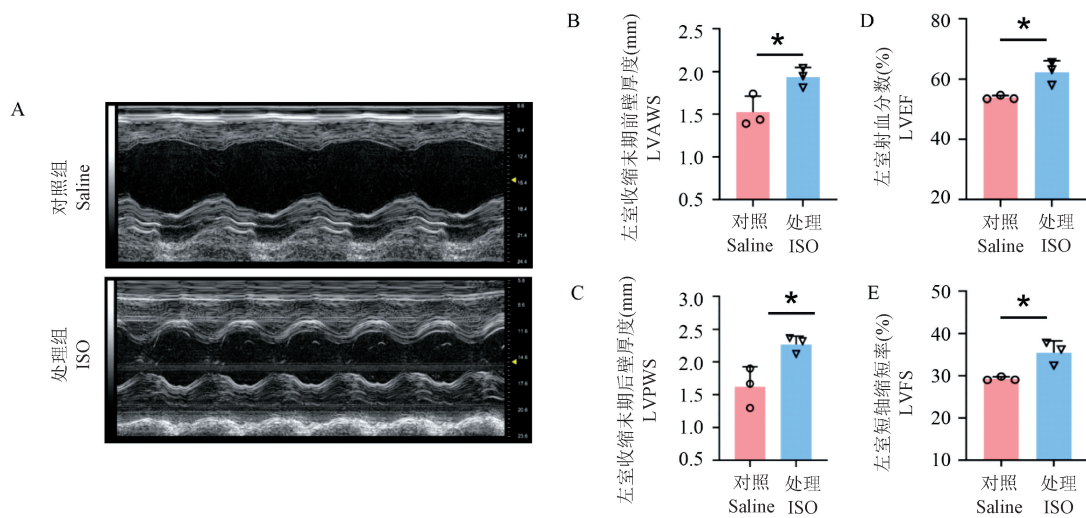


图 1 基于植入式渗透泵经 ISO 诱导心肌肥厚大鼠模型及表型评估流程图

Figure 1 Flow diagram of establishment and evaluation of cardiac hypertrophy rat model induced by ISO administered through subcutaneously implanted osmotic pump

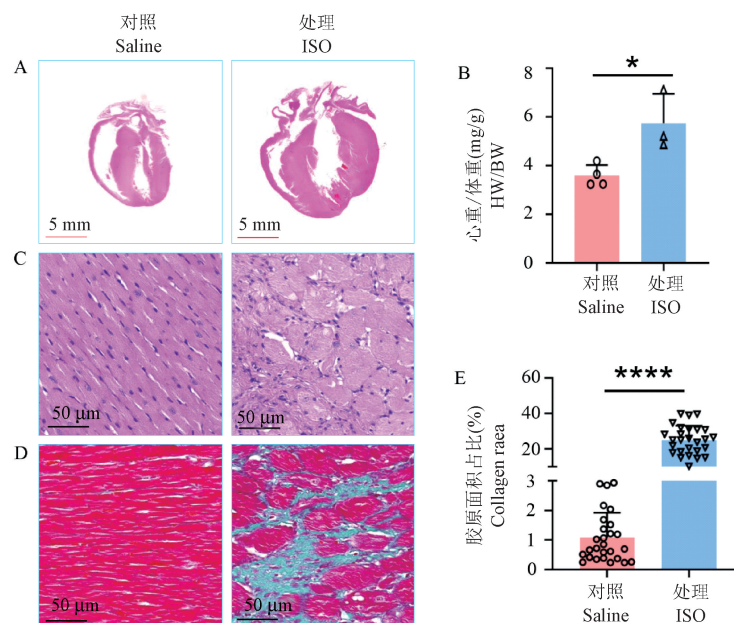


注:A:超声影像分析运动模式截图;B:LVAWS,左室收缩末期前壁厚度;C:LVPWS,左室后壁厚度(为收缩末期节点);D:LVEF,射血分数(左心室);E:LVFS,短轴缩短率(左心室)。与对照组比较,* $P<0.05$ 。

图2 对照组与处理组大鼠超声影像分析

Note. A, Typical M-mode screenshot of echocardiography. B, LVAWs, Left ventricular(LV) anterior walls thickness at end-systole. C, LVPWS, LV posterior walls thickness at end-systole. D, LVEF, LV ejection fraction. E, LVFS, LV fraction shortening. Compared with control group, * $P<0.05$.

Figure 2 Echocardiographic analysis of rats in control group and treatment group

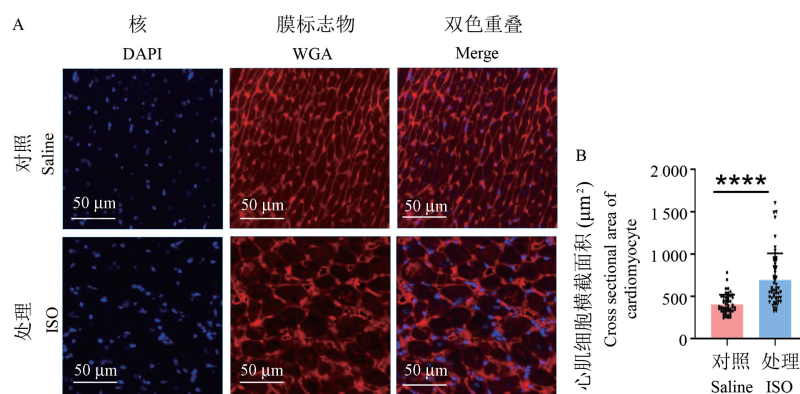


注:A:模型大鼠心脏 HE 染色(为长轴纵向切面);B:模型大鼠心重指数;C:模型大鼠心肌染色后高倍截图(HE 染色);D:模型大鼠心肌组织 Masson 染色;E:模型大鼠心肌胶原面积占比定量分析。 $n=3$ 只/组, $n=9$ 视野/只。与对照组比较,* $P<0.05$,**** $P<0.0001$ 。

图3 对照组与处理组大鼠心肌病理组织学检查

Note. A, Whole-heart longitudinal sections with HE staining. B, Ratio of heart weight/body weight. C, Magnification of the whole-heart longitudinal sections with HE staining. D, Magnification of Masson trichrome-stained left ventricle section, myocytes are stained red, and collagen is stained green. E, Quantitative analysis of collagen area. $n=3$ rats per group and $n=9$ fields per rat. Compared with control group, * $P<0.05$, **** $P<0.0001$.

Figure 3 Histological analysis in myocardial of rats in control group and treatment group

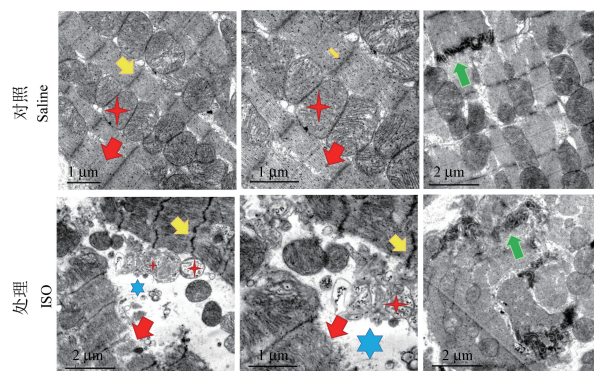


注:A:模型大鼠心肌组织中细胞膜标志物 WGA 免疫荧光染色;B:心肌细胞横截面积定量分析。 $n=3$ 只/组, $n=18$ 视野/只。与对照组比较, **** $P<0.0001$ 。

图 4 对照组与处理组大鼠心肌细胞形态观察及定量分析

Note. A, Immunofluorescence detection of WGA in the heart tissues. B, Quantitative analysis of cross-sectional area of cardiomyocyte. $n=3$ rats per group and $n=18$ fields per rat. Compared with control group, **** $P<0.0001$.

Figure 4 Morphological observation and quantitative analysis of cardiomyocytes in control group and treatment group rats



注:利用透射电镜观察模型大鼠心肌超微结构变化。红色箭头:心肌纤维断裂溶解,排列不齐;蓝色六角星:部分被肌浆网代替;红色四角星:线粒体肿胀;黄色箭头:Z线和M线模糊;绿色箭头:闰盘结构扭曲。

图 5 对照组与处理组大鼠心肌超微结构观察

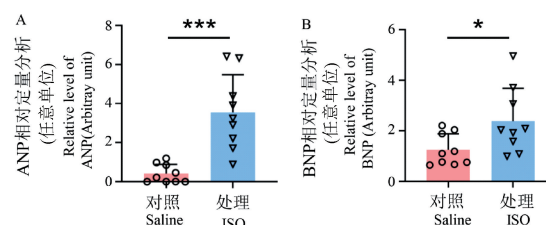
Note. Ultrastructural analysis in left ventricular of heart tissues. Red arrow, Myocardial fiber rupture and myolysis. Blue star, Myocardium was occupied by the sarcoplasmic reticulum. Red star, Mitochondria swelling. Yellow arrow, Ridge smear in the Z-Line and M-line. Green arrow, Leap disk distorted.

Figure 5 Ultrastructural observation of heart tissue in control group and treatment group rats

心肌纤维断裂,部分区域出现心肌溶解,并被肌浆网代替,心肌线粒体出现脊消失,甚至空泡化,心肌Z线、M线以及闰盘出现严重扭曲模糊等(图5)。

2.3 模型大鼠心肌分子水平表型评价

我们随后利用实时荧光定量PCR技术,分析模型大鼠心肌组织内心肌肥厚标志物心钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)和脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)的表达变化,从而在分子水平,观察模型大鼠心肌肥厚表型。结果显示模型大鼠心肌组织内,这两个分子标志物的表达水平显著增高(图6A~6B, $P<0.001$, $P<0.001$, $n=3$)。



注:利用实时荧光定量PCR分析模型大鼠心肌组织内肥厚标志物,心钠肽(A)和脑钠肽(B)的表达水平。 $n=3$ 只/组, $n=3$ 个重复/只。与对照组比较, * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 6 对照组与处理组大鼠心肌肥厚标志物分析

Note. Quantitative analysis of markers of cardiac hypertrophy, ANP (A) and BNP (B), which determined by Real-time PCR. $n=3$ rats per group and 3 repeats per rat. Compared with control group, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

Figure 6 Level of markers of cardiac hypertrophy from heart tissues in control group and treatment group rats

3 讨论

已有研究报道显示,ISO 作为肾上腺素能激动剂,其可诱发细胞内钙分布紊乱,并导致细胞内钙离子水平异常增高,进而引发心室收缩期缩短耗氧量增大,长期诱导下的心肌细胞可发生缺血性梗死^[17]。同时,其在代谢过程中产生的氧化应激损伤,可继发磷脂的过氧化损伤,对心肌细胞造成损害。研究表明,异丙肾上腺素可引起心肌肥大,心肌纤维化增高,心肌炎症,长期诱导可引起心室重构等不可逆性损伤^[18-22]。

目前,国内外心肌肥厚动物模型应用最广泛的诱导方式,包括手术诱导和药物诱导两种。手术诱导方式对技术人员的要求较高,因技术水平及操作手法差异等因素,不同课题组建立的手术诱导模型,动物表型的一致性较差,实验室间数据变异亦较大。利用药物诱导建立心肌肥厚模型,包括异丙肾上腺素,去甲肾上腺素和血管紧张素等药物^[3-5],虽然诱导方法简易,但造模剂量及给药方式差异极大,同时建立的动物模型表型变异也较大,从急性心肌缺血,心肌肥厚到心肌重度纤维化,建立的动物模型病理表型特点也存在明显差异。如,腹腔注射 ISO(2 mg/(kg·d))连续 10 d 可引起大鼠心肌纤维化^[23],皮下注射 ISO(85 mg/(kg·d))连续 2 d 可诱导大鼠急性心肌缺血^[24],皮下注射 ISO(0.25 mg/(kg·d))7 d 可诱导大鼠心肌肥厚^[25],Chowdhury 等^[26]发现皮下注射 ISO(5 mg/(kg·d))连续 14 d 可诱导心肌肥厚,Ardjmand 等^[27]发现每 24 h 皮下注射 ISO(0.25 mg/(kg·d))连续 2 d 诱导心肌损伤。

总结已报道方法,ISO 药物用量差异大,诱发的病理表型发展变异性大。目前,利用 ISO 诱导建立的包括心肌肥厚在内的多种心血管疾病动物模型,特别是大鼠心肌肥厚模型,尚无统一的标准。

渗透泵给药系统,在疾病机理研究、药物筛选、药理及药物代谢调控等领域应用广泛,被认为是目前较为先进的给药系统之一。该系统依据渗透原理输送靶药物,并且给药速度可控^[28]。渗透泵植入动物皮下,由于泵内渗透压的作用,当达到平衡后,药物以恒定的速率输送到靶部位^[29]。

与传统给药方式相比,可连续给药及给药剂量准确,为该系统的优势。所以模型表型的稳定性和均一性可大大提高。在药物筛选和发病机制研究

中,可以大大减少使用的动物数量,提高动物福利,降低成本,同时,获得的数据离散程度更小,结果更可信。

因此,综合以往方法的先进性、模型表型的均一性,方法稳定性及复制的难易性等因素,我们通过皮下植入渗透泵经 ISO 建立心肌肥厚大鼠模型,并采用低剂量长时程的给药方案。获得的模型表现出典型的心肌肥厚表型,包括整体功能和结构形态,心肌细胞和分子标志物,3 个层面的表型分析。

此外,以往关于 ISO 诱导心肌肥厚模型的报道,主要集中在整体和显微结构层面的变化分析,对其超微结构的观察研究较少。本研究中,我们利用透射电镜技术,发现了明显的超微结构变化,包括心肌纤维紊乱、断裂和肌溶解,肌浆网扩张,线粒体嵴消失和空泡化,Z 线、M 线和闰盘结构的严重扭曲和模糊,这些都为进一步理解心肌肥大的组织学特征提供了证据和线索。

总结以往的报道和我们的研究发现,本文建立的大鼠模型具有典型的心肌肥厚表型,方法稳定且易于复制,更适用于基因功能分析和相关药物筛选等科学研究。

参考文献:

- [1] Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, et al. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis [J]. Med Sci Monit Basic Res, 2016, 22: 75-79.
- [2] Deng KQ, Wang A, Ji YX, et al. Suppressor of IKK ϵ is an essential negative regulator of pathological cardiac hypertrophy [J]. Nat Commun, 2016, 7: 11432.
- [3] Zhao L, Cheng G, Jin R, et al. Deletion of interleukin-6 attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction [J]. Circ Res, 2016, 118(12): 1918-1929.
- [4] Gesmundo I, Miragoli M, Carullo P, et al. Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(45): 12033-12038.
- [5] Wang J, Liu Z, Feng X, et al. Tumor suppressor gene ING3 induces cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of AMPK and activation of p38 MAPK signaling [J]. Arch Biochem Biophys, 2014, 562: 22-30.
- [6] Ansari MA, Iqbal A, Ekbal R, et al. Effects of nimodipine, vinpocetine and their combination on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1372-1380.
- [7] Yan YY, Wang ZH, Zhao L, et al. MicroRNA-210 plays a critical role in the angiogenic effect of isoprenaline on human umbilical vein endothelial cells via regulation of noncoding RNAs

- [J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(22): 2676–2682.
- [8] Li JD, Cheng AY, Huo YL, et al. Bilateral renal denervation ameliorates isoproterenol-induced heart failure through downregulation of the brain renin-angiotensin system and inflammation in rat [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016, 35: 62634.
- [9] Ren S, Chang S, Tran A, et al. Implantation of an isoproterenol mini-pump to induce heart failure in mice [J]. J Vis Exp, 2019, 152: 10.
- [10] Al-rasheed NM, Al-rasheed NM, Al-rabeeah DA, et al. Possible protective mechanisms exerted by metformin or metformin and vitamin E in isoproterenol-induced cardiac injury [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(5): 3903–3912.
- [11] Gyongyosi A, Zilinyi R, Czeglédi A, et al. The role of autophagy and death pathways in dose-dependent isoproterenol-induced cardiotoxicity [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(19): 2192–2198.
- [12] Wang J, Li J, Liu J, et al. Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced DNA damage in vascular smooth muscle cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4063–4068.
- [13] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31(2): 141–151.
- [14] Sun JM, Wang CM, Guo Z, et al. Reduction of isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and modulation of myocardial connexin43 by a KATP channel agonist [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3): 1845–1850.
- [15] 伍学翠, 赵云, 李聪, 等. miRNA 在异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥厚中的表达及生物信息学分析 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(5): 476–480.
- [16] Gao W, Guo N, Zhao S, et al. Carboxypeptidase A4 promotes cardiomyocyte hypertrophy through activating PI3K-AKT-mTOR signaling [J]. Biosci Rep, 2020, 40(5): BSR20200669.
- [17] Grant MKO, Abdelgawad IY, Lewis CA, et al. Lack of sexual dimorphism in a mouse model of isoproterenol-induced cardiac dysfunction [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0232507.
- [18] Patel V, Upaganlawar A, Zalawadia R, et al. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: A biochemical, electrocardiographic and histoarchitectural evaluation [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 644(1–3): 160–168.
- [19] Sözlmen M, Devrim AK, Kabak YB, et al. The effects of periostin in a rat model of isoproterenol: mediated cardiotoxicity [J]. Cardiovasc Toxicol, 2018, 18(2): 142–160.
- [20] Akila P, Vennila L. Chlorogenic acid a dietary polyphenol attenuates isoproterenol induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An *in vivo* study [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 208–214.
- [21] Si LY, Kamisah Y, Ramalingam A, et al. Roselle supplementation prevents nicotine-induced vascular endothelial dysfunction and remodelling in rats [J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2017, 42(7): 765–772.
- [22] Rona G, Chappel CI, Balazs T, et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat [J]. AMA Arch Pathol, 1959, 67(4): 443–455.
- [23] Zhang W, Chang H, Zhang H, et al. MiR-30e attenuates isoproterenol-induced cardiac fibrosis through suppressing snail/TGF- β signaling [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2017, 70(6): 362–368.
- [24] Zheng P, Liu J, Mai S, et al. Regulation of signal transducer and activator of transcription 3 and apoptotic pathways by betaine attenuates isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats [J]. Hum Exp Toxicol, 2015, 34(5): 538–547.
- [25] Sun R, Zhu B, Xiong K, et al. Senescence as a novel mechanism involved in β -adrenergic receptor mediated cardiac hypertrophy [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0182668.
- [26] Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN, et al. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats [J]. J Transl Med, 2013, 11: 130.
- [27] Ardjmand A, Shahaboddin ME, Mazoochi T, et al. Ameliorative effects of cerebrolysin against isoproterenol-induced myocardial injury in male rats [J]. Life Sci, 2019, 227: 187–192.
- [28] Chen J, Pan H, Ye T, et al. Recent aspects of osmotic pump systems: functionalization, clinical use and advanced imaging technology [J]. Curr Drug Metab, 2016, 17(3): 279–291.
- [29] Cooper JD, Heppert KE, Davies MI, et al. Evaluation of an osmotic pump for microdialysis sampling in an awake and untethered rat [J]. J Neurosci Methods, 2007, 160(2): 269–275.

[收稿日期] 2021-02-24