

李秋林,唐婧,赵翎,等. 小鼠主动脉缩窄模型早期压力阶差与心肌肥厚程度的关系 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 9–14.

Li QL, Tang J, Zhao L, et al. Relationship between early pressure gradient and the degree of myocardial hypertrophy in a mouse model of transverse aortic constriction [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 9–14.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.002

小鼠主动脉缩窄模型早期压力阶差与心肌肥厚程度的关系

李秋林^{1,2}, 唐婧^{1,2}, 赵翎^{1,2}, 阿曼古丽·如则², 高晓明^{1,2,3*}

(1.新疆医科大学第一附属医院心脏中心, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆医学动物模型研究重点实验室, 乌鲁木齐 830054; 3.新疆医科大学临床医学研究院, 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 小鼠压力负荷模型实验终点时压力阶差 (pressure gradient, PG) 与左心室肥厚程度具有明显相关性, 但目前压力负荷早期 PG 与后期心肌肥厚完全形成阶段的心功能与心室质量相关性仍不清楚, 本实验通过研究小鼠主动脉缩窄术 (transverse aortic constriction, TAC) 后早期 PG 大小在判断 TAC 术后主动脉收缩程度和主动脉压力大小中的作用, 以及与实验终点时小鼠心肌肥厚程度与心肌收缩功能情况的相关性, 为实验早期判断主动脉缩窄程度与选取实验入组小鼠提供依据。**方法** 选取 14~16 周龄体重为 25~26 g 的 C57BL/6 雄性小鼠进行 TAC 手术, 并在术前、术后 1 周和术后 4 周进行心脏超声心动图检测, 术后 4 周时进行血流动力学检测并测量体重和左心室重量/胫骨长度 (left ventricle/tibial length, LV/TL)。**结果** 与术前相比, TAC 术后 1 周和 4 周时血流速度和 PG 都显著性升高 ($P < 0.05$); TAC 4 周时的 PG 与 LVSP ($r = 0.773, P < 0.001$) 和 SBP ($r = 0.658, P = 0.002$) 具有显著的相关性, 表明通过无创性的超声多普勒检测与侵入性的血流动力学检测主动脉缩窄术造成的压力负荷具有高度的一致性; TAC 1 周和 4 周时的 PG 都与 TAC 4 周时 LV/TL、左心室重量指数 (left ventricular mass index, LVMI)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESd)、左心室舒张期前壁厚度 (left ventricular anterior wall thickness at diastole, LVAWd)、左心室舒张期后壁厚度 (left ventricular posterior wall thickness at diastole, LVPWd) 呈显著正相关, 与射血分数 (ejection fraction, EF) 和缩短分数 (fraction shortening, FS) 呈显著负相关。**结论** TAC 1 周时 PG 大小可以预测 TAC 4 周心肌肥厚程度, PG 越大, TAC 4 周时左心室重量越重、心室壁厚度和心室扩张程度越严重, 心肌收缩功能受损越严重。

【关键词】 压力阶差; 心肌肥厚; 主动脉弓缩窄术; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 02-0009-06

Relationship between early pressure gradient and the degree of myocardial hypertrophy in a mouse model of transverse aortic constriction

LI Qiulin^{1,2}, TANG Jing^{1,2}, ZHAO Ling^{1,2}, AMANGULI Ruze², GAO Xiaoming^{1,2,3*}

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China.

2. Xinjiang Key Laboratory of Medical Animal Model Research, Urumqi 830054. 3. Clinical Medical Research Institute of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054)

【基金项目】 国家自然科学基金联合基金项目 (U190320056); 国家自然科学基金 (81870272); 新疆维吾尔自治区高校科研计划项目 (XJEDU2019I018); 新疆重点实验室开放课题项目 (2021D04020); 省部共建中亚高发成因与防治国家重点实验室心血管专项 (SKL-HIDCA-2021-XXG1)。

【作者简介】 李秋林 (1996—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病基础及临床。E-mail: 1579927357@qq.com

【通信作者】 高晓明 (1962—), 男, 博士生导师, 教授, 研究员, 研究方向: 心血管疾病基础与临床。E-mail: xiaominggao2017@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of early pressure gradient (PG) after transverse aortic constriction (TAC) on the degree of aortic constriction and aortic pressure in mice, the relationship with myocardial hypertrophy and myocardial systolic function at the experimental endpoint, and to provide a basis for the early measurement of aortic constriction and selection of experimental mice. **Methods** Male C57BL/6 mice aged 14~16 weeks were selected for TAC surgery. Cardiac echocardiography was performed before and 1 week and 4 weeks after the operation, and hemodynamic testing and measurement of body weight and left ventricular weight/tibial length (LV/TL) were performed 4 weeks after surgery. **Results** Both flow velocity and PG were significantly higher 1 and 4 weeks after TAC compared with preoperative levels ($P < 0.05$). PG at 4 weeks after TAC was significantly correlated with left ventricular systolic pressure ($r = 0.773$, $P < 0.001$) and systolic blood pressure ($r = 0.658$, $P = 0.002$), indicating that hemodynamic testing by noninvasive ultrasound Doppler can replace the invasive hemodynamic detection of pressure caused by TAC. The PG 1 and 4 weeks after TAC was significantly and positively correlated with LV/TL, left ventricular mass index, left ventricular end-diastolic diameter, left ventricular end-systolic diameter, left ventricular anterior wall thickness at diastole, and left ventricular posterior wall thickness at diastole. In addition, both 1 week and 4 weeks after TAC, the ejection fraction and fraction shortening were significantly negatively correlated with PG. **Conclusions** The PG 1 week after TAC predicted the degree of myocardial hypertrophy 4 weeks after TAC, and the larger the PG, the heavier the left ventricular weight, the more severe the ventricular wall thickness and ventricular dilation 4 weeks after TAC, and the more severe the impairment to myocardial systolic function.

【Keywords】 pressure gradient; myocardial hypertrophy; transverse aortic constriction; mice

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

高血压所致的心肌肥厚和心力衰竭的动物模型对于促进我们对这些疾病病理生理学的理解和新药物的开发至关重要。Rockman 等^[1]首创的通过缩窄无名动脉和左颈动脉之间的主动脉弓建立主动脉缩窄(transverse aortic constriction, TAC)模型,目前该模型已经被广泛用于表观遗传或药物干预对小鼠心脏重塑的影响^[2]。TAC 模型已被证明可以使小鼠心脏发生心肌肥厚和心肌衰竭。然而,尽管控制了实验小鼠的体重、周龄、品系以及性别等因素,但 TAC 产生的心肌肥厚程度差异仍很大, TAC 后很难预测小鼠心肌肥厚的程度,部分原因是 TAC 产生的主动脉弓狭窄程度不同^[3-4],这可能与小鼠主动脉直径和结扎的松紧度有关^[5]。实验早期判断主动脉缩窄程度,帮助实验者及早发现和淘汰压力负荷不足的小鼠,可以减少人力和物力的浪费。然而目前仍然缺少小鼠 TAC 模型中与表型结果相符的早期相关因子或预测因子^[4]。

压力阶差(pressure gradient, PG)是通过超声多普勒检测对主动脉收缩程度的估算^[6]。Nakamura 等^[7]发现 TAC 术后 1、3、10、和 20 d 时的 PG 与左心室重量指数(left ventricular mass index, LVMI)呈明显正相关。Mohammed 等^[2]也发现 TAC 术后 3 周和 9 周时 PG 与 LVMI 呈正相关。虽然实验终点时的 PG 与左心室肥厚的相关性已经得到了较多实验验证,但目前压力负荷早期 PG 与后期心肌肥厚完全形成阶段的心功能与心室质量相关性仍不清楚。

因此,本实验通过实验早期(TAC 术后 1 周)测量的 PG 大小与实验终点时(TAC 术后 4 周)的心肌肥厚程度与心肌收缩功能障碍的程度相关性进行分析,研究 PG 作为 TAC 术后心肌肥厚程度的实验早期预测因素的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选取 14~16 周龄(25~26) g 的 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 20 只,购自新疆医科大学动物实验中心[SCXK(新)2018-0001],实验期间动物饲养于新疆医科大学动物实验中心[SYXK(新)2018-0003],实验动物在标准环境下饲养(室温 22~25℃,12 h 照明/12 h 黑暗)。本研究进行的所有动物操作均经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(20190225-128)。实验过程严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

甲苯噻嗪(Troy Laboratory PTY Limited,澳大利亚,货号:120701);阿托品(天方药业,中国,货号:1810151);异氟烷(瑞沃德,中国,货号:22050401)。超微测压导管(Millar Instrument 公司,美国)。PowerLab 数据采集分析系统(AD Instruments 公司,澳大利亚);Vevo 3100 高分辨小动物超声成像系统(VisualSonics 公司,加拿大);显微镜(Carl Zeiss 公司,德国);小动物呼吸机(Harvard 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 主动脉缩窄术

小鼠腹腔注射甲苯噻嗪与阿托品混合药物(分别为 2 mg/100 g 和 0.12 mg/100 g)联合 2.5%异氟烷诱导麻醉小鼠,后用 1.7%异氟烷维持麻醉,并行气管插管,接通呼吸机,潮气量 250~300 μ L,呼吸频率每分钟 120~130 次。在胸前正中切口暴露主动脉弓,在右无名动脉和左颈总动脉之间垫入 26 G 针头,并使用 6-0 丝线结扎,结扎后迅速拔出针头,使主动脉弓横截面积缩减约 75%^[8],逐层关胸,缝合皮肤。

1.3.2 超声心动图检测

在术前、术后 1 周和术后 4 周时将小鼠用 2.5%异氟烷诱导麻醉,1.7%异氟烷维持麻醉使用 Vevo 3100 高分辨小动物超声成像系统和 40 MHz 频率的 MX550D 超声探头进行经胸超声心动图检测左心室长轴切面和左心室短轴切面乳头肌水平 M 模式超声心动图,测量测量左心室舒张末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDd)、左心室收缩末期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESd)、左室舒张期前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness at diastol, LVAWd)、左室舒张期后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness at diastole, LVPWd)和左心室重量(left ventricular mass, LV mass),计算 LVMI=左心室重量/体重(mg/g)、射血分数(ejection fraction, EF)和缩短分数(fraction shortening, FS);同时,利用超声多普勒侧测量主动脉弓缩窄处血流速度,通过伯努利方程计算 $PG(mmHg) = 4 \times \text{峰值流速}^2 [(m/s)^2]$ 。

1.3.3 血流动力学检测

在 TAC 术后 4 周超声心动图检测后,2.5%异氟烷麻醉小鼠,颈部正中切口,暴露分离右侧颈动脉并结扎远心端,采用 1.4 F 微导管和 PowerLab 系统测定升主动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP),采用 PowerLab 软件选择连续 10~15 个心动周期分析。

1.3.4 器官重量测量

血流动力学检测结束后,迅速开胸取出心脏,剪去心脏周围组织和血管,称量左心室(left ventricle, LV)重量,测量胫骨长度(tibial length, TL),计算左心室重量/胫骨长度比值(left ventricle/

tibial length, LV/TL)。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,应用 SPSS 22.0 及 Graphpad Prism 7 进行数据分析及作图,结果采用单因素方差分析及 Tukey 检验比较术前、术后 1 周和术后 4 周组之间的指标值的差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉弓血流流速及 PG

TAC 术前基线($n=9$)、术后 1 周($n=20$)和术后 4 周($n=20$)分别测量小鼠主动脉缩窄处的血流流速(图 1A),通过伯努利方程计算 PG。结果显示,与基线相比,TAC 术后 1 周和 4 周时血流速度和 PG 都显著性升高,但 TAC 1 周和 TAC 4 周之间无差异(图 1B)。

2.2 TAC 4 周 PG 与 LVSP、SBP 的相关性

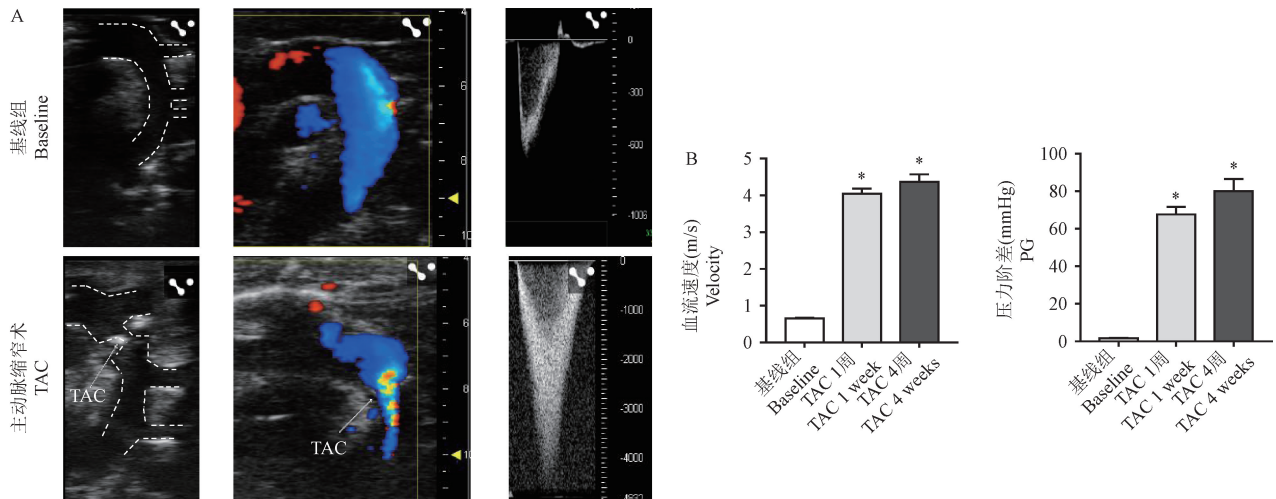
TAC 4 周时,通过超声多普勒检测计算 PG,检测血流动力学测得 LVSP 和 SBP。进行相关性分析显示(图 2),PG 与 LVSP($r=0.773, P < 0.001$)和 SBP($r=0.658, P=0.002$)具有明显的相关性,表明 PG 与 LVSP 和 SBP 相似,都能反映 TAC 术后心脏所承受的压力负荷,实验早期无法通过血流动力学检测主动脉压力时,通过无创性的超声多普勒检测可以代替侵入性的血流动力学检测主动脉缩窄术造成的压力。

2.3 TAC 4 周 PG 与左心室肥厚程度与心肌收缩功能的相关性

TAC 4 周时,进一步分析 PG 与左心室肥厚程度与心肌收缩功能的关系(图 3A),发现 PG 与 TAC 4 周时 LV/TL($r=0.645, P < 0.001$)和 LVMI($r=0.595, P=0.008$)明显正相关。同时,PG 越大,左心室前壁和后壁厚度都明显增加(图 3B),心腔大小也逐渐增加(图 3C)。另外,PG 与 TAC 4 周时的 EF($r=0.782, P < 0.001$)和 FS($r=0.545, P=0.013$)呈显著负相关,PG 越大,心肌收缩功能越差(图 3D)。

2.4 TAC 1 周 PG 与 TAC 4 周左心室肥厚程度与心肌收缩功能的相关性

通过对 TAC 1 周时的 PG 与 TAC 4 周时 LV/TL 和 LVMI 进行相关性分析(图 4A),发现 LV/TL($r=0.679, P=0.001$)和 LVMI($r=0.618, P=0.004$)都



注:与基线组比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 超声多普勒检测血流速度并计算 PG

Note. Compared with the baseline, * $P < 0.05$.

Figure 1 Ultrasound Doppler detects blood flow velocity and calculates PG

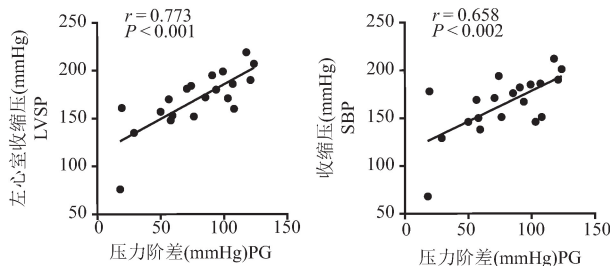


图 2 TAC 4 周时 PG 与 LVSP 和 SBP 的相关性 ($n = 20$)

Figure 2 Correlation of PG with LVSP and SBP at 4 weeks after TAC

明显呈正相关,因此,TAC 1 周 PG 可以预测 TAC 4 周时心肌肥厚程度,与 TAC 4 周时一致,TAC 1 周时 PG 也与 LVESd、LVEDd、LVAWd 和 LVPWd 呈正相关(图 4B、图 4C),分析发现 TAC 1 周的 PG 与 TAC 4 周时 EF($r = 0.656$, $P = 0.002$)和 FS($r = 0.689$, $P < 0.001$)呈显著负相关(图 4D),TAC 1 周时 PG 越大,TAC 4 周时左心室重量越重、心室壁厚度和心室扩张程度越严重,心肌收缩功能受损越严重。

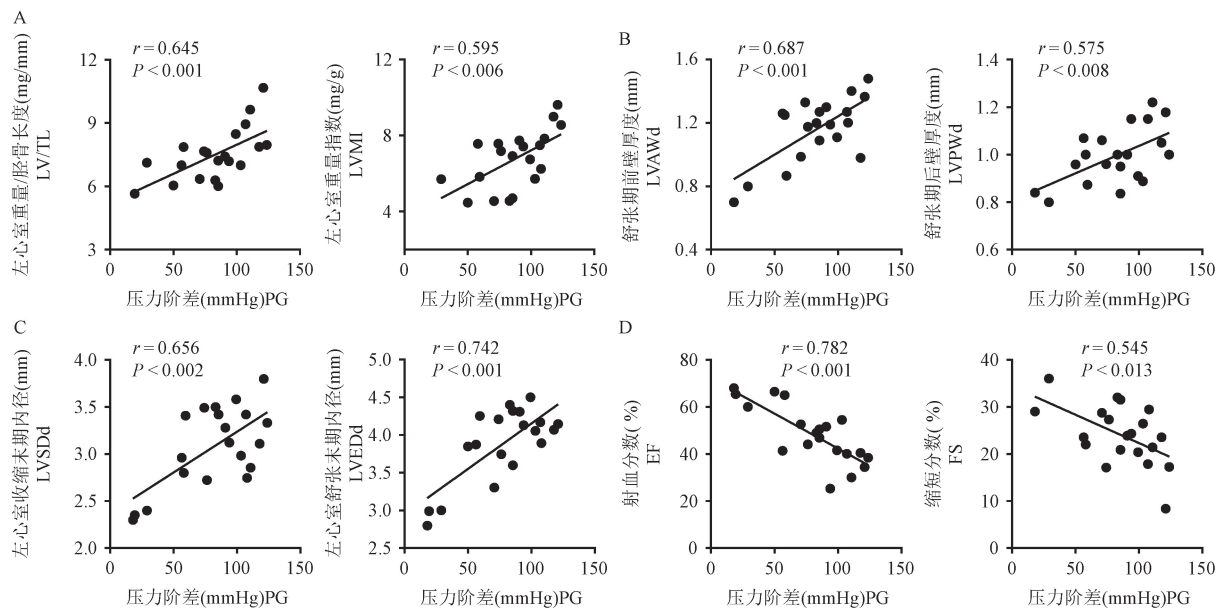


图 3 TAC 4 周时 PG 与 LV/TL 和超声检测指标的相关性 ($n = 20$)

Figure 3 Correlation of PG with LV/TL and ultrasound variables at 4 weeks TAC

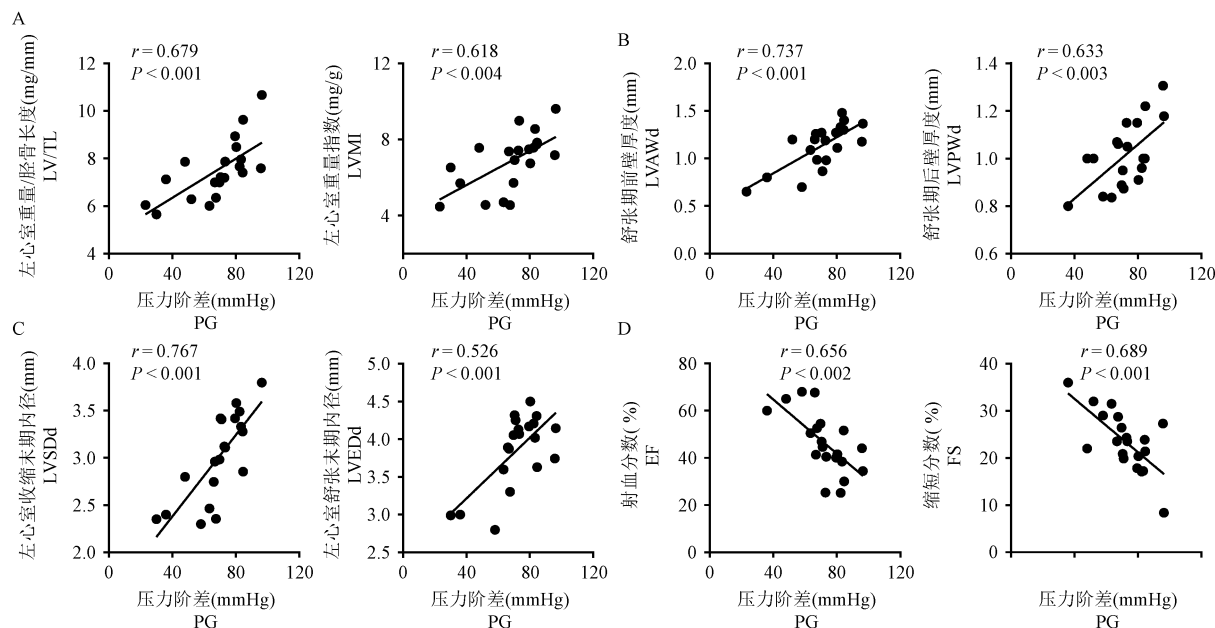
图 4 TAC 1 周时 PG 与 TAC 4 周超声检测指标的相关性 ($n=20$)

Figure 4 Correlation of PG at 1 week of TAC with ultrasound variables at 4 weeks of TAC

3 讨论

心肌肥厚是心力衰竭的独立危险因素,是全世界人口死亡率的重要原因^[9]。心肌细胞随着机械负荷的增加而肥大,例如血压升高和循环容量增加,最初是一种适应性反应。然而,机械负荷的持续存在导致心肌细胞死亡和纤维化的增加,伴随着心肌收缩力的降低,这引发了由细胞死亡增加、左心室功能障碍和机械负荷增加组成的恶性级联反应,最终发展为病理性心肌肥厚^[10]。

TAC 手术 1991 年被首次报道,现在已经是研究心脏重塑和心力衰竭最主要的压力超负荷模型之一^[1]。使用 0.5 mm 针头可以使主动脉直径减少 50%~55%,横截面积减少了约 75%,TAC 术后的前 2 周,左心室质量和壁厚迅速增加,而左心室尺寸减小或保持不变,FS 也基本保持不变。因此,TAC 早期引起的代偿性心肌肥厚是向心性肥厚;术后 4 周主要表现为从心室壁肥厚到室内径扩大的过渡、心肌收缩功能开始下降;TAC 术后 4~12 周,左心室的质量或壁厚没有进一步增加,但左心室逐渐扩张,表明已发生离心性和失代偿性心肌肥厚,解除压力超负荷以后 6 周,压力超负荷诱导的心肌肥厚和功能障碍、心室重塑、心肌细胞增大、间质纤维化和基因表达改变都能部分或完全恢复^[8]。影响 TAC 诱导的心室重塑表型的因素很多,如动物的种类、周龄、性别、遗传背景和个体差异,但狭窄程度

是最重要的因素之一。不同大小的针头直接影响主动脉狭窄的程度,针头直径越小,结扎后产生的压力负荷越大^[11-12]。不同的研究者使用的针头大小不尽相同,范围从 17~30 G 不等。在大多数情况下使用的是 27 G 针头(71%),其次是 26 G(12%)和 25 G(7%)^[13]。尽管使用同样大小的针头,但主动脉狭窄程度仍然有较大差异,主要由于小鼠主动脉直径和结扎的松紧度也是影响主动脉狭窄程度的重要因素,尤其控制结扎的松紧度是 TAC 手术过程中最困难的任务,容易受到人为因素的影响^[5]。因此,如何在实验早期判断 TAC 术后小鼠主动脉狭窄程度成为了 TAC 模型的一个难点,也很少有文献研究报道在小鼠 TAC 模型中与表型结果相符的早期相关因子或预测因子^[4]。

本实验通过 TAC 术前、术后 1 周和 4 周测量主动脉弓血流流速,用伯努利方程计算 PG,通过 TAC 4 周时 PG 与侵入性血流动力学检测 LVSP 和 SBP 的相关性研究,发现 PG 估算的压力与侵入性血流动力学检测结果高度相关,这与 Li 等^[3]的结果一致。然后通过 TAC 4 周时 PG 与小鼠器官重量和超声指标的相关性进行研究发现, LV/TL、LVMI、LVEDd、LVESd、LVAWd 和 LVPWd 越大、EF 和 FS 越小,表明随着 PG 的增大,TAC 4 周时小鼠心肌肥厚、心腔扩张和心肌收缩功能障碍越严重。因此,TAC 1 周时尚未到实验的终点,PG 能作为 LVSP 和 SBP 的良好替代指标,反映主动脉压力负荷。通过

TAC 1 周时 PG 与 TAC 4 周时的器官重量和超声指标进行相关性分析发现,TAC 1 周时 PG 越大,TAC 4 周时 LV/TL、LVMI、LVEDd、LVESd、LVAWd 和 LVPWd 越大、EF 和 FS 越小,表明 TAC 1 周时 PG 与 TAC 4 周时心肌肥厚和心腔扩张程度呈显著的正相关、与心肌收缩功能呈明显负相关。与本研究结果一致,通过术后 1 周超声多普勒检测无名动脉血流/左颈总动脉血流比值也能较好的预测术后 4 周 LVPWd 增加情况^[14]。

综上所述,多普勒超声检测估算的 PG 与侵入性血流动力学检测的压力具有良好的相关性,在 TAC 早期无法进行侵入性检测时能准确反映 TAC 术后主动脉的压力,并且 TAC 1 周时 PG 大小与 TAC 4 周时心肌肥厚呈显著正相关、与心肌收缩功能呈明显负相关,因此 TAC 早期 PG 大小能有效帮助判断 TAC 术后主动脉收缩程度和主动脉压力大小,预测实验终点时小鼠心肌肥厚程度与心肌收缩功能情况。因此,通过实验早期 PG 的测算可以为实验者提供主动脉缩窄程度和实验入组小鼠的选择提供依据。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Mohammed SF, Storie JR, Oehler EA, et al. Variable phenotype in murine transverse aortic constriction [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2012, 21(3): 188-198.
- [3] Li YH, Reddy AK, Taffet GE, et al. Doppler evaluation of peripheral vascular adaptations to transverse aortic banding in mice [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2003, 29(9): 1281-1289.
- [4] Hampton C, Rosa R, Campbell B, et al. Early echocardiographic predictors of outcomes in the mouse transverse aortic constriction heart failure model [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2017, 84: 93-101.
- [5] Furihata T, Kinugawa S, Takada S, et al. The experimental model of transition from compensated cardiac hypertrophy to failure created by transverse aortic constriction in mice [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2016, 11: 24-28.
- [6] Blanton RM, Takimoto E, Lane AM, et al. Protein kinase G α inhibits pressure overload-induced cardiac remodeling and is required for the cardioprotective effect of sildenafil *in vivo* [J]. *J Am Heart Assoc*, 2012, 1(5): e003731.
- [7] Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, et al. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(3): H1104-H1112.
- [8] Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, et al. Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(6): H2702-H2707.
- [9] Luo Y, Jiang N, May HI, et al. Cooperative binding of ETS2 and NFAT links Erk1/2 and calcineurin signaling in the pathogenesis of cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2021, 144(1): 34-51.
- [10] Ago T, Yang Y, Zhai P, et al. Nifedipine inhibits cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction in response to pressure overload [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2010, 3(4): 304-313.
- [11] Deng H, Ma LL, Kong FJ, et al. Distinct phenotypes induced by different degrees of transverse aortic constriction in C57BL/6N mice [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 641272.
- [12] Richards DA, Aronovitz MJ, Calamaras TD, et al. Distinct phenotypes induced by three degrees of transverse aortic constriction in mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5844.
- [13] Bosch L, de Haan JJ, Bastemeijer M, et al. The transverse aortic constriction heart failure animal model: a systematic review and meta-analysis [J]. *Heart Fail Rev*, 2021, 26(6): 1515-1524.
- [14] 吕丹, 鲍丹, 董伟, 等. 主动脉缩窄术模型小鼠成模早期评价技术 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(4): 21-25, 94.

[收稿日期]2022-08-28