

丁月,周荧,刘景艳,等. 不同病理因素诱导的大鼠心肌肥大模型心肌表型特征及表达谱 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 605-617.

Ding Y, Zhou Y, Liu JY, et al. Phenotypic characteristics and gene expression profiles of myocardial cells in rat cardiac hypertrophy models induced by various pathological factors [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 605-617.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2023. 05. 007

不同病理因素诱导的大鼠心肌肥大模型 心肌表型特征及表达谱

丁月¹,周荧¹,刘景艳²,周江峰¹,吕东颖¹,蔡兆伟¹,王德军^{1*}

(1. 浙江中医药大学动物实验研究中心,杭州 310053;2. 西湖大学实验动物中心,杭州 310023)

【摘要】 目的 建立主动脉弓缩窄(TAC)、异丙肾上腺素(ISO)诱导及自发性高血压(SHR)3种大鼠心肌肥大(cardiac hypertrophy, CH)模型,比较各模型病理特点及其心肌转录组差异。**方法** 选择雄性SD和SHR大鼠(对照组为WKY)建立3种模型。TAC诱导模型分为假手术组($n = 5$)和TAC组($n = 14$),TAC组进行TAC手术,假手术组进行假手术操作,术后饲养5周;ISO诱导模型分为正常对照组($n = 5$)和ISO组($n = 11$),ISO组颈背部皮下多点连续注射ISO 5 mg/(kg·d),正常对照组注射等量生理盐水,每日2次,连续10 d;SHR诱导模型分为WKY组($n = 5$)和SHR组($n = 5$),正常饲喂至16周龄。通过检测大鼠超声心动图和血浆ANP含量以判定成模,统计大鼠存活率并进行血压、血流动力学以及心脏质量指数测定。取大鼠心脏组织进行HE、Masson和麦胚凝集素(WGA)病理学染色,进行心肌转录组测序,筛选差异基因并分析其通路,以实时荧光定量PCR验证测序结果。**结果** 各模型组大鼠血浆ANP含量较其对照组均显著性升高($P < 0.05$),TAC和ISO模型大鼠IVSd、IVSs、LVPWd和LVPWs均显著增加($P < 0.05$),SHR大鼠LVsD显著增厚,而LVIDd、LVIDs却显著降低($P < 0.05$)。各模型组大鼠存活率为:SHR(100%)、ISO(81.82%)和TAC(35.71%)。TAC组、ISO组大鼠血压较对照组均显著下降($P < 0.05$),而SHR大鼠则显著升高($P < 0.01$)。各模型组大鼠HW/BW、LVW/BW比值均显著增大($P < 0.05$)。血流动力学结果显示,TAC和ISO模型大鼠HR、LVESP、LVEDP、dP/dtmax显著降低($P < 0.01$),而SHR大鼠各指标均显著性增加($P < 0.01$)。TAC和SHR模型大鼠心肌组织均形成不均匀网状的反应性间质纤维化,ISO大鼠心肌组织有大面积修复性间质纤维化。TAC和ISO组大鼠心肌横截面积均显著性增加($P < 0.05$),SHR大鼠无显著性差异。TAC、ISO、SHR模型测序分别获得175、568和279个差异表达基因,自噬体、癌症相关信号通路和PI3K/AKT通路在3种模型共同富集,而药物反应、松弛素信号和JAK/STAT信号等通路则是模型特异性富集,实时荧光定量PCR验证结果与测序结果基本一致。**结论** 本研究成功建立了TAC、ISO诱导和自发性高血压大鼠CH模型,不同诱导因素对模型的存活率、血压、血流动力学、心肌肥大程度、组织病理特征及基因表达谱等有着不同程度的影响。

【关键词】 心肌肥大模型;主动脉弓缩窄;异丙肾上腺素;自发性高血压;转录组分析

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0605-13

Phenotypic characteristics and gene expression profiles of myocardial cells in rat cardiac hypertrophy models induced by various pathological factors

DING Yue¹, ZHOU Ying¹, LIU Jingyan², ZHOU Jiangfeng¹, LYU Dongying¹, CAI Zhaowei¹, WANG Dejun^{1*}

(1. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China.

2. Laboratory Animal Resources Center, Westlake University, Hangzhou 310023)

Corresponding author: WANG Dejun. E-mail: wdj@zcmu.edu.cn

【基金项目】浙江省基础公益技术应用研究计划项目(LGD20C040011)。
Funded by the Zhejiang Province Basic Public Welfare Technology Application and Research Plan Project(LGD20C040011).
【作者简介】丁月(1992—),女,在读硕士研究生,研究方向:临床检验诊断学。Email:616668358@qq.com
【通信作者】王德军(1975—),男,硕士,正高级实验师,研究方向:实验动物与比较药理。Email:wdj@zcmu.edu.cn

[Abstract] Objective To compare the pathological characteristics and transcriptome differences among three rat models of myocardial hypertrophy (CH) induced by transverse aortic constriction (TAC), isoproterenol (ISO), and spontaneous hypertension (SHR). **Methods** Male SD and SHR rats (control group: WKY) were used to establish three models. For the TAC experiment, SD rats were divided into a sham group ($n = 5$) and TAC group ($n = 14$). Rats in the TAC group underwent TAC surgery and the sham group underwent a sham operation. Each group of rats were fed for 5 weeks after the operation. For the ISO experiment, SD rats were randomly divided into a control group (C) ($n = 5$) and ISO group ($n = 11$). Rats in the ISO group received multiple subcutaneous injections of $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ISO on the back of the neck, whereas the control group was injected with the same dose of saline twice daily for 10 days. For the spontaneous hypertension-mediated CH experiment, SHR rats were considered as the model group ($n = 5$) and WKY rats as the control group ($n = 5$). All rats were normally fed to 16 weeks of age. Echocardiography was performed and plasma ANP levels were measured to determine whether the CH rat model was established successfully. Then, survival rates, blood pressure, hemodynamics, and the cardiac mass index were calculated. Heart tissues were stained with HE, Masson, and wheat germ agglutinin (WGA). Transcriptome sequencing was performed in myocardial tissue to screen differentially expressed genes and analyze their pathways. The sequencing result were verified by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** Plasma ANP in each model group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). IVSd, IVSs, LVPWd, and LVPWs in TAC and ISO model rats and LVSD in SHR rats were significantly increased ($P < 0.05$), while LVIDd and LVIDs were significantly decreased ($P < 0.05$) compared with those in the control group. The survival rates of model rats in each group were 100% for SHR, 81.82% for ISO, and 35.71% for TAC. Compared with control groups, the blood pressure of model rats in TAC and ISO groups was significantly decreased ($P < 0.05$), whereas that of the SHR group was significantly increased ($P < 0.01$). HW/BW and LVW/BW ratios in each model group were increased significantly ($P < 0.05$). Hemodynamics showed that HR, LVESD, LVEDP, and dP/dtmax were significantly decreased in model rats of TAC and ISO groups ($P < 0.01$), whereas all indexes in SHR rats were significantly increased ($P < 0.01$). The myocardial tissue of TAC and SHR model rats showed a heterogeneous network of reactive interstitial fibrosis, whereas ISO rat myocardial tissues had a large area of repaired interstitial fibrosis. The cross-sectional area of the myocardium in TAC and ISO groups was increased significantly ($P < 0.05$), but there was no significant difference in SHR rat. In total, 175, 568, and 279 differentially expressed genes were identified by transcriptome sequencing in TAC, ISO, and SHR models, respectively. Autophagosome, cancer-related signaling pathway, and PI3K/AKT pathway were co-enriched in the three model groups, while drug response, relaxin signaling, and JAK/STAT signaling pathways were only enriched in TAC, ISO, and SHR model groups. qRT-PCR result were consistent with the transcriptome sequencing data. **Conclusions** CH was successfully established in TAC- and ISO-treated rats and spontaneously hypertensive rats. The survival rate, blood pressure, hemodynamics, degree of myocardial hypertrophy, histopathological characteristics, and gene expression profiles in CH model rats were influenced by various induced factors.

[Keywords] cardiac hypertrophy model; TAC; isoproterenol; SHR; transcriptome analysis

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

心肌肥大(cardiac hypertrophy, CH)是心脏对持续病理性刺激产生的一种代偿反应,来弥补受损的心功能,长期的病理刺激会使代偿阶段转变为不可逆的失代偿阶段,导致心衰甚至死亡^[1-2]。CH是导致心血管疾病患者心力衰竭和死亡的主要原因,但迄今无有效抑制CH的治疗方法^[3]。建立有效的动物模型对深入研究CH发病机制具有重要作用。近年来,多种CH疾病动物模型被相继建立^[4],但现有模型之间的共性特性并不明确,因此有针对性地研究CH动物模型的发病机制,并阐明其异同点,对寻找特定有效的防治心衰等疾病的治疗靶点具有重

要的参考意义和实践价值。

本实验选择和建立了目前使用较广的3种CH大鼠模型:主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)、异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导和自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR),通过比较多种CH表型,分析不同病理因素建立的大鼠CH模型的发病特点,进一步采用转录组测序技术分析3种CH大鼠模型心肌组织mRNA表达差异,分析转录组表达的共性和特性,既为发掘治疗CH的靶标提供实验依据,也为不同CH动物模型的应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

35 只 8 ~ 10 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 190 ~ 250 g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK (沪) 2022-0004】。11 周龄 SPF 级 SHR 大鼠 5 只, WKY 大鼠 5 只, 雄性, 200 ~ 240 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK (京) 2021-0006】。饲养环境: 环境温度控制在 22℃, 温度变化不超过 2℃, 相对湿度恒定, 光照 12 h 明暗交替, 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK (浙) 2021-0012】。实验经浙江中医药大学动物福利与伦理审查委员会批准 (IACUC-20190826-02)。所有动物均适应性饲养 1 周后进行实验。

1.1.2 主要试剂与仪器

ISO 干粉 (SIGMA, I5627-5G); 异氟烷 (苏恒丰强生物技术有限公司, 20190902), ANP 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究有限公司, H80); 乌拉坦 (上海国药集团化学试剂有限公司, 20130609), Masson 三色染色液试剂盒 (珠海贝索生物技术有限公司, 20181026); WGA 染色液 (Thermo Fisher, W11261); RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司, AJ11051A); mRNA 逆转录试剂盒 (PrimeScript™ RT Master Mix) (TaKaRa 公司, AJ60588A、AIG1952A); 荧光定量试剂盒 (SYBR Premix Taq™ II) (TaKaRa 公司, AJ613332A; AJ20706A)。

Vevo2100 小动物超声影像系统 (Visual Sonics, 加拿大); 智能无创血压计 (鼠仪) (北京软隆生物技术有限公司, 中国); Fresco17 台式冷冻离心机 (Thermo Fisher 公司, 美国); ALC-NIBP (8 道) 无创血压心率测量仪 (上海奥尔科特生物科技有限公司, 中国); HM340E 型轮转切片机、HistoStar 组织包埋机 (Thermo Fisher 公司, 美国); Nana Zoomer 数字切片扫描设备 (2.0RS, 滨松公司, 日本); StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国); PTC-200 型 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 建立 TAC 模型

雄性 SPF 级 SD 大鼠 19 只, 适应性饲养 1 周后, 按体重随机分组为假手术组 (5 只) 和 TAC 组 (14 只)。TAC 组根据文献报道进行手术操作^[5],

简而言之, 将大鼠用异氟烷进行麻醉, 随后气管插管维持麻醉, 去除大鼠胸部毛发裸露皮肤, 大鼠左侧第二根肋骨下缘开胸后分离胸腺、主动脉弓, 用 3-0 号缝线绕过主动脉弓后壁, 将外径 0.9 mm 的“L”形细针连同主动脉弓一起结扎, 结扎后将针缓慢取出, 关闭胸腔。假手术组除不结扎主动脉弓以外, 其余操作均同 TAC 组。每只大鼠术后 3 d 内连续肌肉注射青霉素 100 000 U, 术后饲养 5 周。

1.2.2 建立 ISO 模型

雄性 SPF 级 SD 大鼠 16 只, 适应性饲养 1 周后, 按体重随机分组为: 正常对照组 (5 只) 和 ISO 组 (11 只)。ISO 组颈背部皮下多点连续注射异丙肾上腺素 5 mg/(kg·d)^[6], 正常对照组注射等量生理盐水, 每日 2 次, 连续 10 d。

1.2.3 建立 SHR 模型

11 周龄 WKY 和 SHR 大鼠, 适应性饲养 1 周后, 分组为 WKY 组 (5 只) 和 SHR 组 (5 只)。正常饲养 5 周。

1.2.4 大鼠血浆 ANP 含量测定

各组大鼠在处死前 2 d 颌下取血后离心取血浆待用, 使用 ELISA 试剂盒检测大鼠血浆心房排钠肽 (atrium natriuretic peptide, ANP) 含量。

1.2.5 大鼠心脏超声和血流动力学测定

大鼠胸部去毛, 1.5% 异氟烷混合气体诱导麻醉后, 使用 Vevo2100 超声影像系统进行心脏超声测量, 取得左室长轴 M 型图。记录左室舒张末期室间隔厚度 (left ventricular end-diastolic interventricular septal thickness, IVSd)、左室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVIDd)、左室后壁舒张末期厚度 (left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)、左室收缩末期室间隔厚度 (left ventricular end-systolic interventricular septal thickness, IVSs)、左室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVIDs)、左室后壁收缩末期厚度 (left ventricular end-systolic posterior wall thickness, LVPWs)、每搏输出量 (cardiac output, CO)、射血分数 (ejection fraction, EF) 和短轴率 (fraction shortening, FS) 等指标。

大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉 (5 mg/kg) 后固定, 颈中开口后, 近心端插入微型导管至左心室。生理信号记录仪测量大鼠心率 (heart rate, HR)、左室收缩末压 (left ventricular end-systolic pressure, LVESP)、左室舒张末压 (left ventricular end diastolic

pressure, LVEDP)、左心室最大收缩速率(left ventricular pressure maximal rate of rise, + dp/dtmax)、左心室最大舒张速率(left ventricular pressure maximal rate of fall, -dp/dtmax)的变化。

1.2.6 鼠尾无创血压测量

轻柔抓取大鼠束缚带固定,待大鼠血压稳定后,使用尾套法进行血压测量。每只大鼠测量 5 次,以不超过 5 mmHg 差异的平均值,作为应测血压值。记录大鼠收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP)。TAC 组术后 5 周、ISO 在注射 10 d 后、SHR 饲养 5 周后分别进行血压测量。

1.2.7 心脏重量指数测定和组织病理学观察

处死大鼠并取出心脏,去除心房后称取全心重量(heart weight,HW),去除右心室后,称取左心室的重量(left ventricular weight,LVW)并计算游离右心室重量(right ventricular weight,RVW,RVW = HW-LVW)、全心质量指数(HW/BW)、左心室质量指数(LVW/BW)、右心室质量指数(RVW/BW)。

取大鼠非心尖部分,10%中性甲醛固定后,经脱水、透明、浸蜡后制成石蜡切块,通过 HE 染色、Masson 染色、WGA 染色观察病理变化。

1.2.8 转录组测序及分析

使用 TRIzol 法提取大鼠心肌组织总 RNA,采用安基伦 2100 生物分析仪(Agilent,美国)和

NanoDrop 2000(Thermo Scientific,美国)检测所提 RNA 的质量。待样品质检合格后,分别将每组 3 个个体的 RNA 样品等量混合,构建 cDNA 测序文库,使用 Illumina Hiseq 4000 测序平台进行高通量测序,测序读长为双端 2 × 150 bp(PE150)。文库构建及测序工作由杭州联川生物技术股份有限公司完成。

利用 Hisat 软件将测序数据比对于参考基因组上,利用比对结果来组装转录本,采用百万映射读取的外显子模型的每千碱基片段数(fragments per kilobase of exon model of million mapped reads,FPKM)来度量统计基因在不同样本中的表达丰度。采用 edgeR 软件进行差异基因表达分析,筛选阈值为差异倍数(fold change,FC) ≥ 2.0 且 P-value < 0.05。利用基因本体(gene ontology,GO)和京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)数据库对筛选出的差异表达基因进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。

1.2.9 qRT-PCR 验证

用 TRIzol 法提取各对照组和模型组大鼠心肌组织总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度后逆转录为 cDNA,用 StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增。基因的相对表达量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。PCR 引物序列均由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成,各引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
24383	<i>GAPDH</i>	F:GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG;R:ATGGTGCTGAAGACGCCACTA
25728	<i>ApoE</i>	F:AGACAAACTAAGATCGTGAGACTGG;R:AGCAATGGGACCAACAGCAG
24482	<i>Igf1</i>	F:TACCTGGCACTCTGCTTGCT;R:ATAGCCTGTGGGCTTGTGAAG
56817	<i>Kcnip2</i>	F:CTCGGTGACAATTCGCTCCC;R:TCCTCTACGCTGTCTGGGTC
24602	<i>NPPa</i>	F:TGGGGAAGTCAACCCGTCTCAG;R:GCGAGCAGAGCCCTCAGTTTG
25105	<i>NPPb</i>	F:GATCTCCAGAAGGTGCTGCC;R:GCAGCTTCTGCATCGTGGA
29437	<i>Acta1</i>	F:GCTATTACGGCGGTGCTGTCTC;R:GGCGTGTGGCAGGGCATAAC
114851	<i>Cdkn1a</i>	F:TCCTGGTGATGTCCGACCTGTTC;R:CGCGCTCAACTGCTCACTGTC
25317	<i>Fgf1</i>	F:GACAGGAGCGACCAGCACATTC;R:TGCGAGCCGTATAAAAGCCCTTC
29237	<i>Penk1</i>	F:CAACTCCTCCGACCTGCTGAAAG;R:CCATACCTCTTGCTCGTGCTGC
25211	<i>Lyz2</i>	F:CCTCTGCTCTCTGCCTCTGTC;R:TCTGCCAGGCTGACTCCATAGTAG
266766	<i>Rcan1</i>	F:CACGCAGCGACAGACACCAC;R:TCCTCCTTCTCTCTCTCTCTCTC
100188937	<i>Cox7c</i>	F:CGTCGCAGCCACTATGAGGA;R:AGGAGCAGCAATCCAGATCCA
25661	<i>Fn1</i>	F:AGGCACAAGTCCGAGAAGAGG;R:CATGAGTCATCCGTAGGCTGGTTC
362429	<i>Mfap5</i>	F:CTTGCTGCTGGCACTCAGCATCC;R:ATGTCTGGGTACGTCATCTCCTC
84032	<i>Col3a1</i>	F:AGTCGGAGGAATGGGTGGCTATC;R:CAGGAGATCCAGGATGTCCAGAGG
292949	<i>Perp</i>	F:AGCGGCTCTACGACGATGG;R:GGCGAAGAACGAGAGGATGAAGC

1.3 统计学分析

所有数据均用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用多功能数据图像分析软件 Graphpad Prism 8 进行统计分析,结果采用 Mann-Whitney 非参检验法检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),生存率采用 Log-rank test 检验比较对照组与模型组的指标差异,转录组数据在线分析工具使用联川生物云工具 (<https://www.omicstudio.cn/index>), $P < 0.05$ 为差异有统计学差异意义。

2 结果

2.1 存活率

实验发现,不同 CH 模型大鼠存活率不同。TAC 组术中和术后出现大量死亡,存活率为 35.71%,与假手术组相比,存活率显著性降低 ($P < 0.05$),结果如图 1A 所示。ISO 组存活率为 81.82%,与正常对照组相比无显著性差异 ($P >$

0.05),结果如图 1B 所示。16 周龄的 SHR 大鼠在本次实验中无死亡。

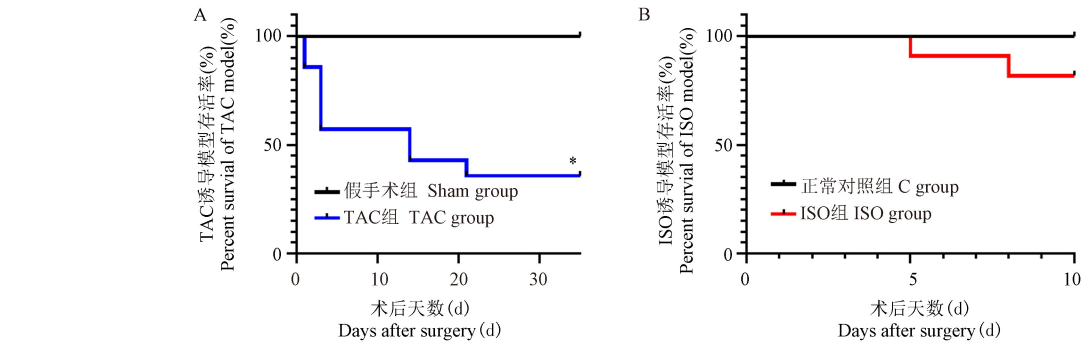
TAC 组饲养过程中部分大鼠胸前和口唇发生青紫,精神状态逐渐萎靡。ISO 模型建立过程中观察到,大鼠在注射 ISO 后表现为气喘、活动减少、饮水量增加,口、鼻处有血性分泌物,亦有少数动物在注射后 15 ~ 35 min 内发生猝死。

2.2 血浆 ANP 含量

如图 2 所示,分别与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠血浆 ANP 含量均显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 超声心动图变化

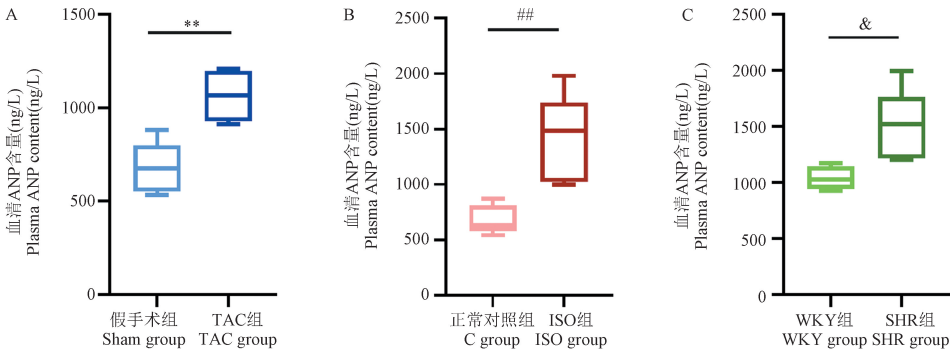
在 3 种模型中,TAC 组和 ISO 组大鼠 IVSd、IVSs、LVPWd 和 LVPWs 较假手术组和正常对照组均显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$);与 WKY 组相比,SHR 大鼠 LVsD 显著增厚 ($P < 0.01$),而 LVIDd 和 LVIDs 显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。



注:与假手术组相比, * $P < 0.05$ 。(下图/表同)
图 1 TAC 和 ISO 诱导模型大鼠的生存曲线($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)

Note. Compared with sham group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures and tables)

Figure 1 Survival rate of TAC and ISO induced model rats($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)



注:与假手术组相比, ** $P < 0.01$;与正常对照组相比, ## $P < 0.01$;与 WKY 组相比, & $P < 0.05$ 。(下图/表同)

图 2 各组大鼠血清 ANP($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)

Note. Compared with sham group, ** $P < 0.01$. Compared with C group, ## $P < 0.01$. Compared with WKY group, & $P < 0.05$ (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Plasma ANP of rats in each group($\bar{x} \pm s, n \geq 5$)

表 2 各组大鼠左心室超声参数的变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Table 2 Changes of ultrasonic indexes of left ventricle of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)								
组别 Groups	左室舒张末期 室间隔厚度 (mm) IVSd (mm)	左室收缩末期 室间隔厚度 (mm) IVSs (mm)	左室舒张末 期内径 (mm) LVIDd (mm)	左室收缩末 期内径 (mm) LVIDs (mm)	左室后壁舒 张末期厚度 (mm) LVPWd (mm)	左室后壁收 缩末期厚度 (mm) LVPWs (mm)	射血分数(%) EF (%)	短轴缩 短率(%) FS (%)
假手术组 Sham group	1.68 ± 0.11	2.96 ± 0.31	7.61 ± 0.52	4.35 ± 0.61	2.34 ± 0.33	3.60 ± 0.41	76.30 ± 8.33	47.29 ± 8.25
TAC 组 TAC group	2.66 ± 0.16**	4.09 ± 0.46**	7.07 ± 0.29	3.36 ± 0.59	3.01 ± 0.26*	4.50 ± 0.40**	84.04 ± 4.19	54.81 ± 4.96
正常对照组 C group	1.81 ± 0.11	3.27 ± 0.30	6.93 ± 0.27	3.48 ± 0.31	2.05 ± 0.25	3.45 ± 0.20	81.20 ± 4.09	51.36 ± 4.51
ISO 组 ISO group	2.83 ± 0.27###	4.13 ± 0.36##	6.60 ± 0.47	3.52 ± 0.47	2.65 ± 0.30#	3.83 ± 0.34#	80.31 ± 4.70	50.55 ± 4.90
WKY 组 WKY group	1.62 ± 0.23	2.94 ± 0.59	7.03 ± 0.49	4.08 ± 0.70	2.08 ± 0.28	3.12 ± 0.43	74.43 ± 8.07	45.14 ± 7.41
SHR 组 SHR group	2.31 ± 0.23&&	3.20 ± 0.36	5.86 ± 0.74&&	3.53 ± 0.74&	2.68 ± 0.61	3.65 ± 0.51	76.88 ± 6.60	46.90 ± 6.30

注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$;与 WKY 组相比,&& $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with C group, * $P < 0.05$. Compared with WKY group, && $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

2.4 尾动脉血压

各组大鼠血压测量结果如图 3 所示,与假手术组比,TAC 模型组大鼠 SBP 显著降低($P < 0.05$),DBP 有下降趋势,但差异并不显著($P > 0.05$)。与正常对照组比,ISO 组大鼠 SBP、DBP 均显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。与 WKY 组比,SHR 组大鼠 SBP 和 DBP 则均显著升高($P < 0.01$)。

2.5 心脏重量参数

如表 3 所示,分别与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比较,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠 HW/BW、LVW/BW 比值均显著增大($P < 0.05, P < 0.01$),而 ISO 组大鼠 RVW/BW 比值也显著增大($P < 0.01$)。

2.6 血流动力学

各组大鼠血流动力学结果见表 4。分别与假手

术组和正常对照组相比,TAC 组和 ISO 组大鼠 HR、LVEDP、+ dP/dtmax 以及 ISO 组和 TAC 组 -dP/dtmax 均显著性降低($P < 0.05$)。而与 WKY 组相比,SHR 组大鼠 HR、LVESP、+ dP/dtmax、-dP/dtmax 和 MSHR 组 LVEDP 均显著性增加。

2.7 左心室病理组织学观察

对各组大鼠进行心脏病理切片分析(图 4),HE 染色结果显示,假手术组、正常对照组和 WKY 组大鼠心脏形态正常,心肌细胞排列整齐,细胞间隙清晰,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠心肌细胞排列紊乱,心肌纤维明显增粗、增厚,与 M 型超声结果一致。Masson 染色结果显示,各模型组可见大量蓝色纤维化阳性着色不同的是,TAC 组和 SHR 组大鼠心肌组织纤维化呈不均匀的网状分布,呈现的是反应性间质纤维化,而 ISO 组大鼠心内膜有大量散在斑

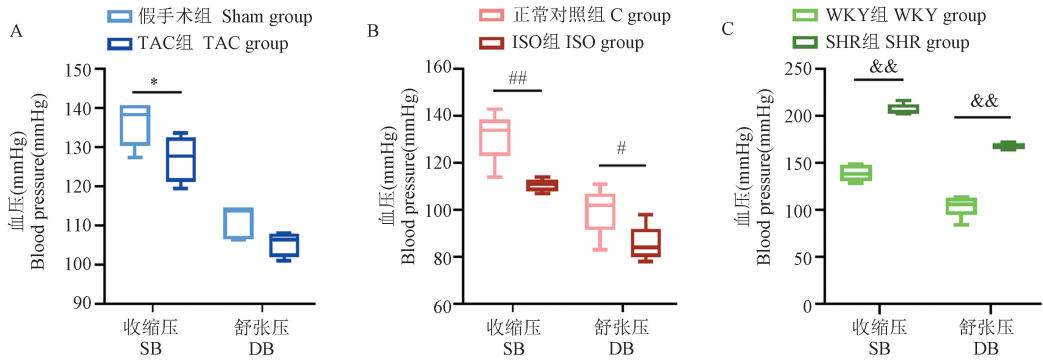


图 3 各组大鼠血压变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Figure 3 Blood pressure change of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

表 3 各组大鼠体重以及心脏重量参数变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Table 3 Change of body weight and heart weight parameters in each group($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

组别 Groups	体重(g) Body weight(g)	心重/体重(mg/g) HW/BW (mg/g)	左心室重量/体重(mg/g) LVW/BW (mg/g)	右心室重量/体重(mg/g) RVW/BW (mg/g)
假手术组 Sham group	459.40 ± 22.21	2.62 ± 0.13	2.16 ± 0.11	0.46 ± 0.02
TAC 组 TAC group	449.25 ± 9.22	3.07 ± 0.12 *	2.64 ± 0.09 *	0.43 ± 0.03
正常对照组 C group	281.40 ± 5.02	2.95 ± 0.05	2.04 ± 0.04	0.55 ± 0.01
ISO 组 ISO group	266.80 ± 1.85	4.25 ± 0.08 ##	3.49 ± 0.08 ##	0.77 ± 0.01 ##
WKY 组 WKY group	307.40 ± 7.53	2.90 ± 0.05	2.41 ± 0.06	0.49 ± 0.01
SHR 组 SHR group	286.40 ± 3.91 &&	3.37 ± 0.04 &&	2.84 ± 0.04 &&	0.53 ± 0.01

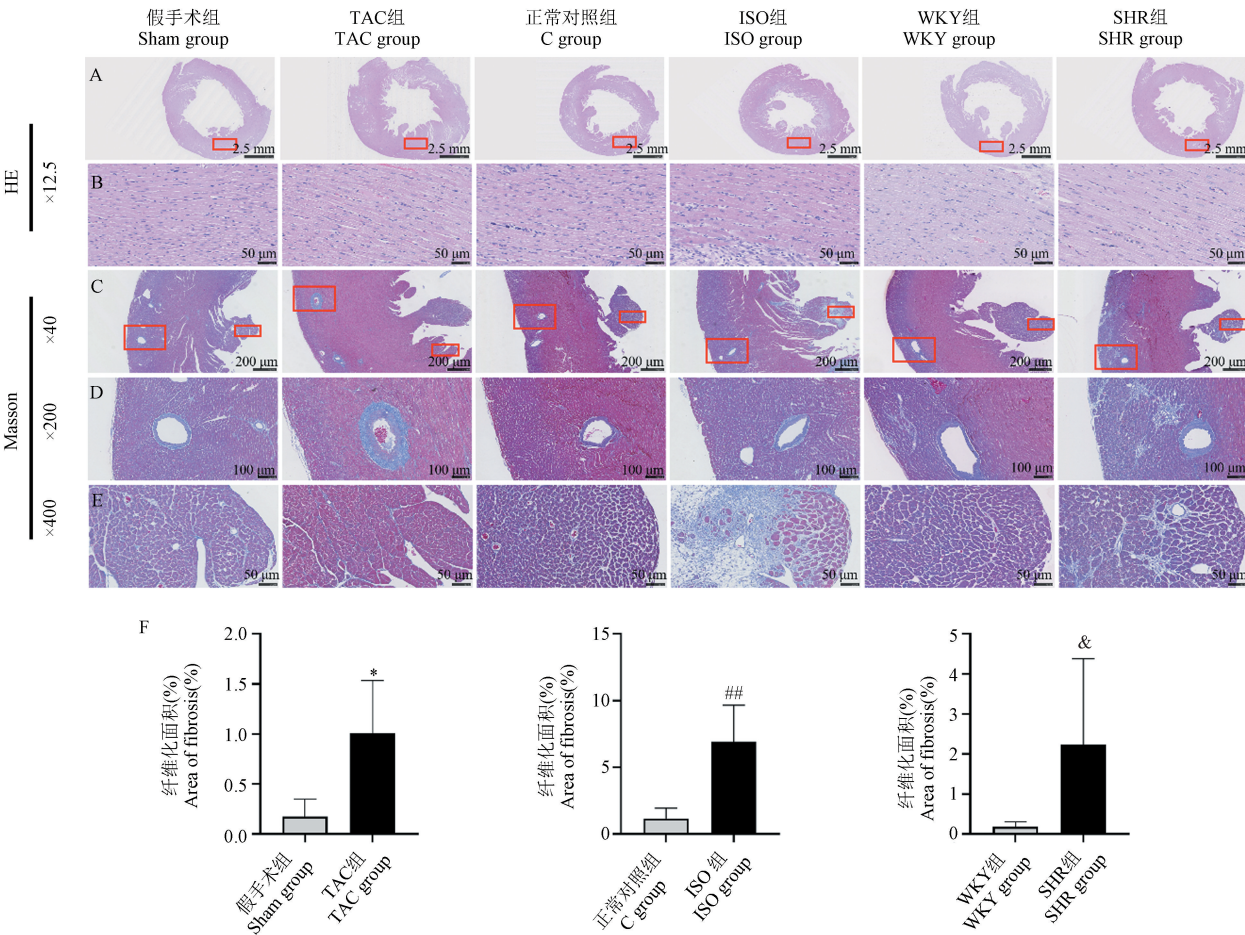


图 4 各组大鼠心肌 HE 染色和 Masson 染色

Figure 4 HE staining and Masson staining of myocardial tissue of rats in each group

片状及条索状坏死,呈现修复性间质纤维化特点。分别与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠心肌组织胶原纤维化面积均显著性增加($P < 0.05, P < 0.01$)。

WGA 染色统计心肌细胞横截面积结果如图 5 所示,与假手术组和正常对照组相比,TAC 组和 ISO 组大鼠心肌细胞横截面积均显著性增大($P < 0.01$),而 SHR 组大鼠心肌细胞相较于 WKY 组未

表 4 各组大鼠左心室功能变化($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

Table 4 Changes of left ventricular function of rats in each model($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 9$)

组别 Groups	心率 (bpm) HR (bpm)	左心室收缩 末压 (mmHg) LVESP (mmHg)	左心室舒张 末压 (mmHg) LVEDP (mmHg)	左心室最大 收缩速率 (mmHg/s) + dP/dtmax (mmHg/s)	左心室最大舒 张速率 (mmHg/s) -dP/dtmax (mmHg/s)
假手术组 Sham group	434.20 ± 2.13	194.50 ± 6.00	22.00 ± 0.69	10 293.74 ± 445.02	5993.91 ± 16.89
TAC 组 TAC group	334.20 ± 3.98**	175.30 ± 2.15	14.83 ± 1.07**	9144.87 ± 222.35*	6741.25 ± 624.59
正常对照组 C group	429.83 ± 7.52	164.42 ± 5.38	7.49 ± 0.75	6842.79 ± 309.83	4972.00 ± 215.74
ISO 组 ISO group	324.00 ± 9.88##	132.23 ± 4.44##	3.94 ± 0.18##	4195.11 ± 217.89##	3653.95 ± 205.87##
WKY 组 WKY group	270.40 ± 21.06	119.23 ± 4.38	12.68 ± 0.81	5555.89 ± 118.31	4504.28 ± 163.54
SHR 组 SHR group	412.60 ± 6.37&&	191.75 ± 0.80&&	19.26 ± 0.52&&	13 102.66 ± 110.10&&	7768.69 ± 168.08&&

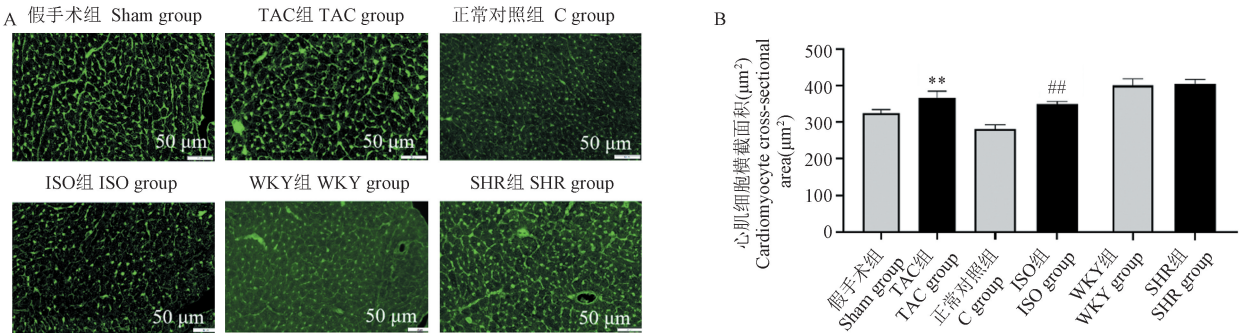


图 5 各组大鼠心肌组织 WGA 染色

Figure 5 WGA staining of myocardial tissue of rats in each group

见显著性变化。

2.8 各模型差异 mRNA 的筛选

与假手术组、正常对照组和 WKY 组相比,TAC 组、ISO 组和 SHR 组大鼠心脏中分别鉴定出 175 个 (106 个上调,69 个下调)、568 个 (408 个上调,160

个下调)和 279 个 (172 个上调,107 个下调)差异表达基因 (DEGs)。将各组 DEGs 进行 Venn 分析,发现 *Postn*、*Plcl2*、*Ltbp2*、*Tnc*、*Ncam1*、*Fibin* 等基因在 3 个 CH 模型中均同时上调,而 *Sertad2*、*Vps37b* 和 *Dcdc5* 等基因均同时下调 (图 6)。

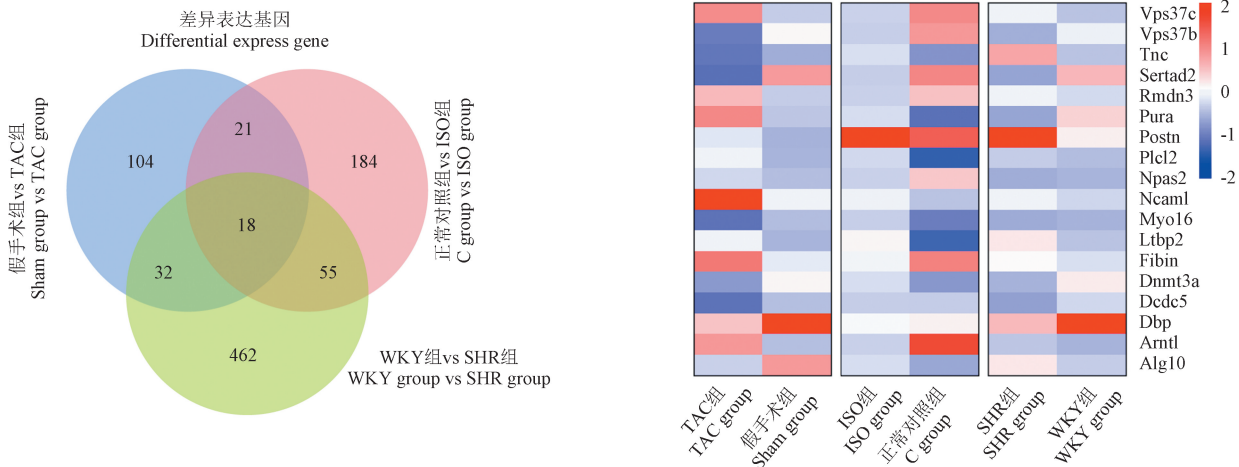


图 6 各组模型差异表达基因的 Venn 图和热图

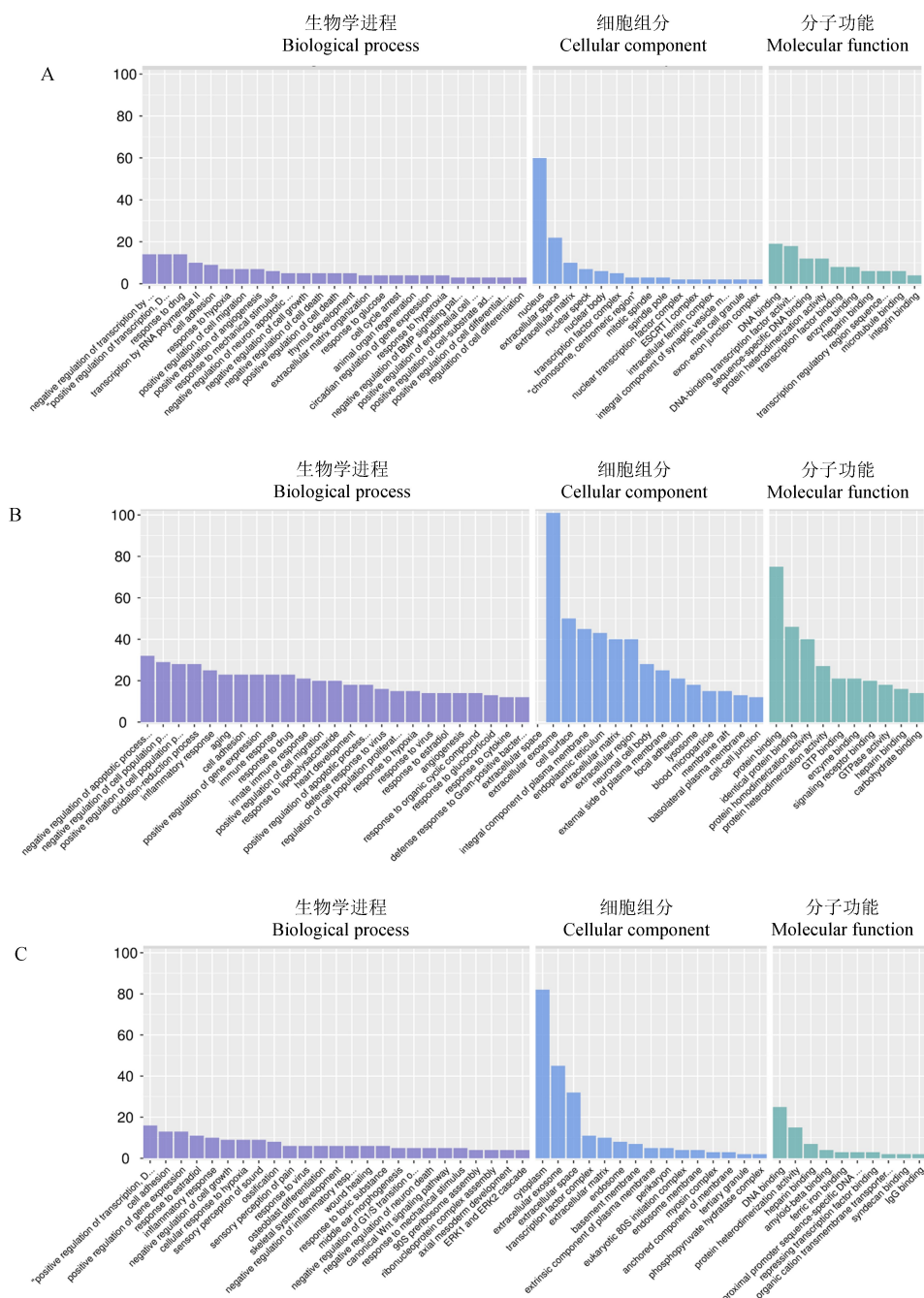
Figure 6 Venn plots and heat maps of common DEGs in each model

2.9 GO 和 KEGG 分析

将各组筛选到的 DEGs 提交 GO 和 KEGG 数据库进行富集分析。GO 分析显示,TAC 模型 DEGs 主要富集在药物反应、血管生成和细胞死亡的正向调节、机械刺激反应、丙酮酸氧化、细胞外基质、DNA 结合转录因子活性等生物学过程(图 7A)。ISO 模型 DEGs 主要富集在炎症反应、胶原原纤维组织

Toll 样受体信号通路、自噬、肥大细胞激活、胶原蛋白三聚物,胞外基质结合等途径(图 7B)。SHR 模型 DEGs 主要在细胞生长负调控、有丝分裂细胞周期 G1/S 转换负调控、细胞对缺氧反应负调控、缺氧诱导的凋亡信号通路以及蛋白质和 DNA 等小分子活动等过程显著富集(图 7C)。

经 KEGG 途径富集分析,TAC 模型 DEGs 主要



注:A:假手术组 vs TAC 组; B:正常对照组 vs ISO 组; C:WKY 组 vs SHR 组。

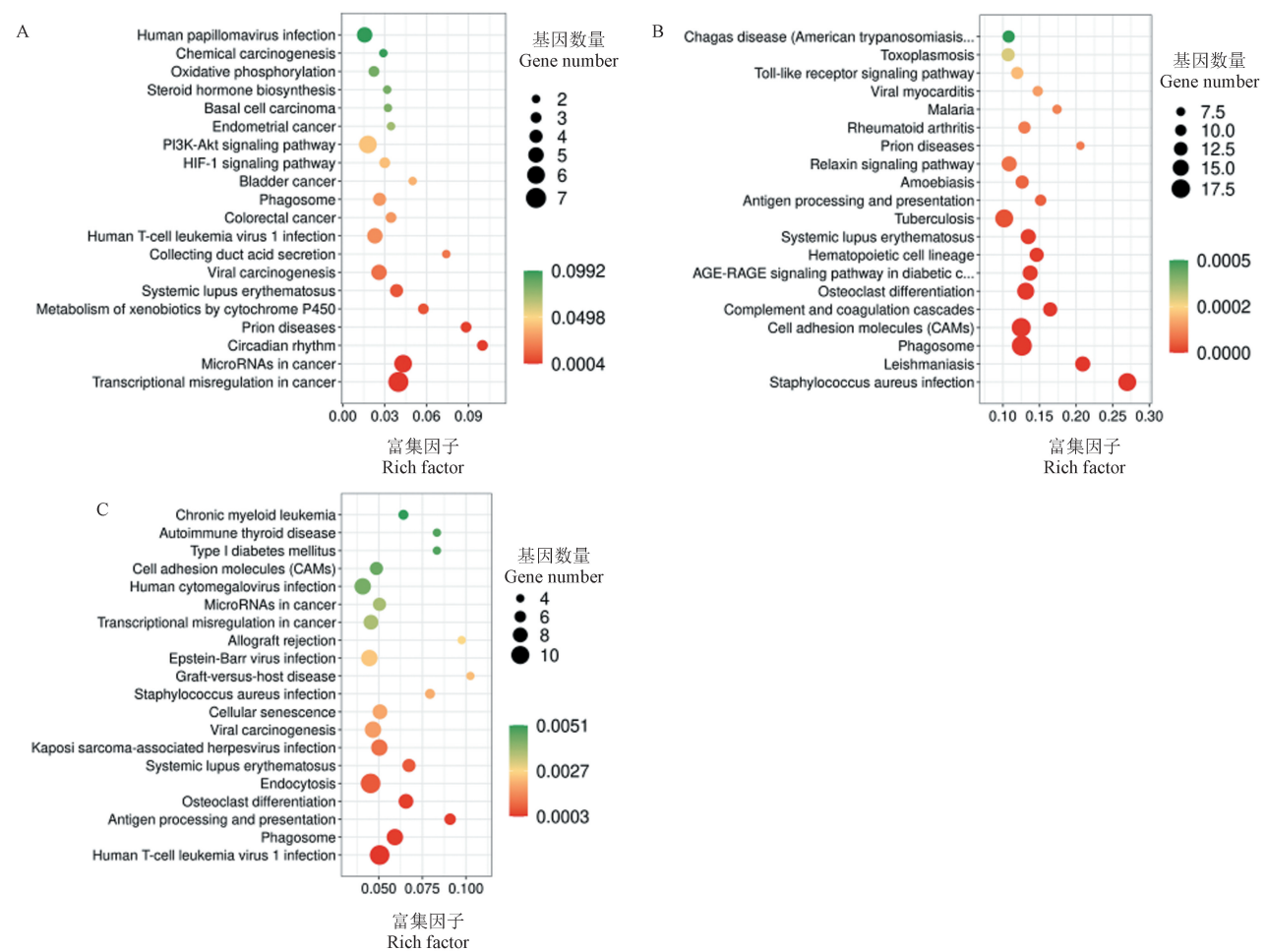
图7 各组模型差异表达基因的GO富集结果

Note. A. Sham group vs TAC group. B. C group vs ISO group. C. WKY group vs HR group.

Figure 7 GO enrichment results of DEGs in each model

富集在细胞色素 P450 对外源物质的代谢、自噬体、癌症信号转录失调、HIF-1 信号和 PI3K-Akt 信号等通路(图 8A)。ISO 模型 DEGs 主要涉及吞噬体、黏着斑、细胞粘附分子、松弛素受体信号、癌症信号通

路、PI3K-Akt 信号和 Toll 样受体信号等通路有关(图 8B)。SHR 模型 DEGs 主要富集在自噬体、JAK-STAT 信号、癌症信号转录失调、Toll 样受体信号和 PI3K-Akt 信号等通路(图 8C)。



注:A:假手术组 vs TAC 组;B:正常对照组 vs ISO 组;C:WKY 组 vs SHR 组。

图 8 各组模型差异表达基因的 Top 20 KEGG 富集通路

Note. A. Sham group vs TAC group. B. C group vs ISO group. C. WKY group vs HR group.

Figure 8 Top 20 KEGG enrichment pathway of DEGs model

2.10 qRT-PCR 验证

为了验证测序结果的可靠性,随机在各模型 DEGs 中选取共 15 个 mRNAs 进行 qRT-PCR 验证。结果如图 9 所示,除 TAC 组中 *Fgf1* 基因表达变化达到显著变化($P > 0.05$),与测序结果不一致外,其余基因上下调趋势均与测序结果一致。

3 讨论

在本研究中,建立了 3 种目前应用较为广泛的 CH 大鼠模型:TAC、ISO 和 SHR。通过比较不同模型间病理特征差异,发现 3 种模型动物均表现出血

浆 ANP 含量升高,心脏质量指数和心室壁厚度显著增加及左室舒缩功能障碍,其中 ISO 成模效果尤为明显。心肌组织病理学分析结果也显示 3 种 CH 模型都存在不同程度的心肌细胞纤维化和心肌重构。然而,3 种 CH 模型大鼠存活率不同,组织病理学特征也存在一定差异,特别是 TAC 组和 SHR 组大鼠心肌呈现反应性间质纤维化,而 ISO 组大鼠呈现修复性间质纤维化。在 TAC、ISO 和 SHR 三种模型中,分别筛选获得 175、568 和 279 个差异表达基因。3 种模型差异表达基因所富集的 KEGG 通路存在共性,但也显示各自偏好性。例如,吞噬体、癌症相关

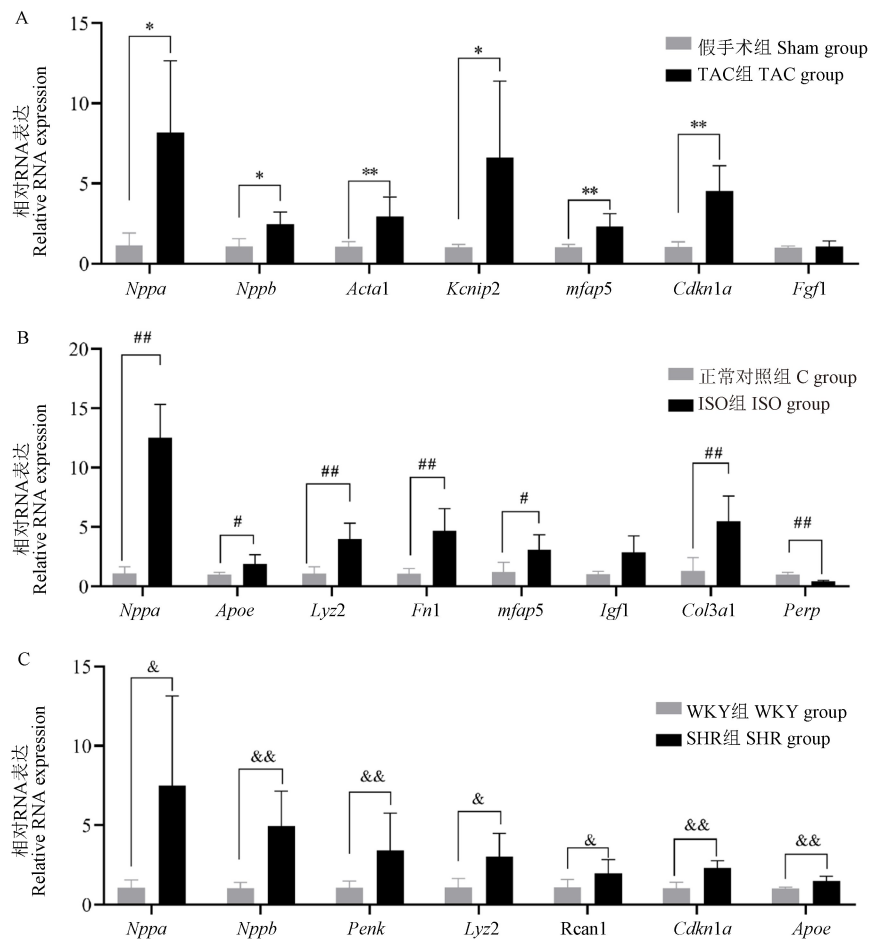


图 9 差异 mRNA 的 qRT-PCR 验证结果

Figure 9 qRT-PCR validation results of DEGs

信号通路和 PI3K/AKT 信号通路是 3 种模型共同富集途径,而 TAC 模型能富集 P450 对外源物质的代谢和 HIF-1 信号通路,ISO 模型则富集到松弛素受体信号通路、Toll 样受体信号通路和细胞黏附分子。SHR 模型不仅富集到 Toll 样受体信号通路,也富集到了 JAK/STAT 信号通路。

自噬是细胞清除多余、受损或衰老的细胞器及蛋白质来维持自身稳态的自我保护机制^[7]。心脏在病理情况下,随着内部环境和外界代谢压力等变化,心肌细胞自噬将增强^[8]。心肌细胞自噬水平升高会引起细胞器功能障碍,如线粒体钙离子积累,从而导致心肌功能紊乱和肥大^[9]。先前研究证实,许多信号途径参与细胞自噬调控,其中 PI3K/AKT 作为经典的自噬相关信号通路,与心肌肥大的发生发展关系密切^[10]。该通路的激活会抑制自噬的上游蛋白活化,进而阻止自噬过程的启动。本研究发现,自噬(吞噬体)和 PI3K/AKT 信号通路在上述 3 种模型大鼠心肌中均被显著富集,说明 TAC 组、

ISO 组和 SHR 大鼠心肌肥大发生与 PI3K/AKT 通路调控心肌细胞自噬有关,这和既往研究结果相似^[11-13]。上述研究结果也说明,PI3K/AKT 信号及其诱导的自噬在不同因素诱导的心肌肥大发病过程中作用较为保守,靶向 PI3K/AKT 信号及其诱导的自噬很有可能成为有价值的治疗心肌肥大疾病的策略。

近年来,许多临床资料显示,心衰可能增加了患癌风险,而癌症反过来同样增加心衰相关死亡率^[14-16]。动物实验发现,TAC 手术引起的 Postn 升高促进小鼠肿瘤的生长和迁移^[17]。与此一致的是,在本研究中,发现 TAC、ISO 和 SHR 三种 CH 模型动物心肌 *Postn* 表达均显著上调,并且癌症相关的信号通路显著富集,这进一步证实心血管疾病或与癌症发生密切相关。

研究还表明,松弛素受体信号在 ISO 模型中被特异激活。松弛素与心血管保护作用相关,并直接发挥抗凋亡、抗纤维化等作用^[18]。上调松弛素表达

可以减弱 ISO 诱导的心肌细胞凋亡^[19],外源性松弛素治疗同样可以改善 ISO 诱导的 CH 和心肌纤维化^[20]。还有研究表明,松弛素治疗可以逆转 SHR 大鼠的心脏纤维化和心房颤动^[21-22],但对 TAC 诱导的心脏功能障碍无保护作用^[23],这与本研究结果基本一致。当前松弛素信号保护心肌肥大的作用机制尚未完全明确,不过结果提示,ISO 模型用于研究松弛素受体信号与心肌肥大关系可能优于 SHR 模型和 TAC 模型。

炎症仍然是心脏疾病发展的关键因素。Toll 样受体属于模式识别受体,通过识别病原微生物及其特殊结构等相关分子模式,诱导细胞产生炎症反应,在机体免疫调节中发挥重要作用^[24]。Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 作为一种重要的炎症调节因子,被细菌脂多糖和纤维蛋白原等内源性配体激活,并活化转录因子核转录因子 κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 等,最终引起促炎因子的释放^[25]。以往研究证实,TLR4 介导纤维蛋白原的识别对诱导心肌肥大的影响^[26]。最近研究发现,抑制 TLR4 能够不仅能够减轻 ISO 诱导的大鼠心肌氧化应激和线粒体功能,也可以改善 SHR 大鼠心肌重塑和肥大^[27-28],这与 ISO 和 SHR 模型中发现的结果也相符。JAK-STAT 信号是调节细胞炎症反应的另一个关键途径。STAT 是 JAK 的直接底物,负责将应激信号从质膜传递到细胞核内,并且 STAT 蛋白可调节许多炎症编码基因的表达。Fu 等^[29]在 18 周龄的雄性 SHR 大鼠心肌中观察到总的和磷酸化的 JAK2 和 STAT3 信号被激活。另外的研究表明,JAK/STAT 信号在腹主动脉缩窄及 ISO 诱导的大鼠心脏组织中同样被激活^[30-31]。虽然本研究中 JAK/STAT 信号是 SHR 大鼠模型特异性富集通路,但可能仅表示该模型中参与 JAK/STAT 通路有关的差异表达基因相对较多。不过尽管如此,本研究结果仍提示在开展 CH 发病机制或药物筛选研究时,模型选择最好考虑到基因表达的偏好性。

综上所述,本研究从血压、血流动力学、心肌肥大程度、组织病理特征及模型存活率等方面评价了 TAC、ISO 诱导和自发性高血压大鼠 3 种 CH 模型间病理特征存在的差异,并通过转录组测序分析明确了不同病理因素诱导的 CH 发病基因表达的共性和偏好性,为今后发掘治疗 CH 的靶标以及动物模型的应用提供实验依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, et al. Epidemiology of heart failure [J]. Eur J Heart Fail, 2020, 22(8): 1342-1356.
- [2] Yancy C W, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines [J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(16): e147-239.
- [3] Yu Q, Kou W, Xu X, et al. FND5/Irisin inhibits pathological cardiac hypertrophy [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(5): 611-627.
- [4] 游月婷, 黄刚, 张小刚, 等. 心力衰竭动物建模的进展 [J]. 心血管病学进展, 2021, 42(12): 1105-1109.
You YT, Huang G, Zhang XG, et al. Animal models establishment of heart failure [J]. Adv Cardiovasc Dis, 2021, 42(12): 1105-1109.
- [5] Fu D, Zhou J, Xu S, et al. *Smilax glabra* Roxb. flavonoids protect against pathological cardiac hypertrophy by inhibiting the Raf/MEK/ERK pathway: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 292: 115213.
- [6] 刘景艳, 朱亮, 蔡月琴, 等. 不同因素对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌肥大模型建立影响的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 651-667.
Liu JY, Zhu L, Cai YQ, et al. A comparative study on the effects of different factors on isoproterenol-induced myocardial hypertrophy model in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 651-667.
- [7] Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease [J]. Circ Res, 2017, 120(11): 1812-1824.
- [8] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97: 245-262.
- [9] Ljubojević-Holzer S, Kraler S, Djalalinac N, et al. Loss of autophagy protein ATG5 impairs cardiac capacity in mice and humans through diminishing mitochondrial abundance and disrupting Ca^{2+} cycling [J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(6): 1492-1505.
- [10] Aoyagi T, Matsui T. Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(18): 1818-1824.
- [11] Wang W, Wang H, Geng QX, et al. Augmentation of autophagy by atorvastatin via Akt/mTOR pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. Hypertens Res, 2015, 38(12): 813-820.
- [12] Ba L, Gao J, Chen Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. Phytomedicine, 2019, 58: 152765.
- [13] Zhou WW, Dai C, Liu WZ, et al. *Gentianaella acuta* improves TAC-induced cardiac remodelling by regulating the Notch and PI3K/Akt/FOXO1/3 pathways [J]. Biomed Pharmacother,

- 2022, 154: 113564.
- [14] Hasin T, Gerber Y, Weston SA, et al. Heart failure after myocardial infarction is associated with increased risk of cancer [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(3): 265–271.
- [15] Akyea RK, Iyen B, Georgiopoulos G, et al. Cardiovascular outcomes and mortality after incident ischaemic stroke in patients with a recent cancer history [J]. *Eur J Intern Med*, 2023, 109: 50–57.
- [16] Zhang H, Gao Y, Wang L, et al. Does heart failure increase the risk of incident cancer? A meta-analysis and systematic review [J]. *Heart Fail Rev*, 2020, 25(6): 949–955.
- [17] Avraham S, Abu-Sharki S, Shofti R, et al. Early cardiac remodeling promotes tumor growth and metastasis [J]. *Circulation*, 2020, 142(7): 670–683.
- [18] Aragón-Herrera A, Feijóo-Bandín S, Anido-Varela L, et al. Relaxin-2 as a potential biomarker in cardiovascular diseases [J]. *J Pers Med*, 2022, 12(7): 1021.
- [19] You X, Guo ZF, Cheng F, et al. Transcriptional up-regulation of relaxin-3 by Nur77 attenuates β -adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(36): 14001–14011.
- [20] Sun J, Hao W, Fillmore N, et al. Human relaxin-2 fusion protein treatment prevents and reverses isoproterenol-induced hypertrophy and fibrosis in mouse heart [J]. *J Am Heart Assoc*, 2019, 8(24): e013465.
- [21] Parikh A, Patel D, McTiernan CF, et al. Relaxin suppresses atrial fibrillation by reversing fibrosis and myocyte hypertrophy and increasing conduction velocity and sodium current in spontaneously hypertensive rat hearts [J]. *Circ Res*, 2013, 113(3): 313–321.
- [22] Lekgabe ED, Kiriazis H, Zhao C, et al. Relaxin reverses cardiac and renal fibrosis in spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2005, 46(2): 412–418.
- [23] Xu Q, Lekgabe ED, Gao XM, et al. Endogenous relaxin does not affect chronic pressure overload-induced cardiac hypertrophy and fibrosis [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(2): 476–482.
- [24] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor downstream signaling [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(1): 12–19.
- [25] Cole JE, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 393946.
- [26] Li T, Wang Y, Liu C, et al. MyD88-dependent nuclear factor-kappaB activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes [J]. *J Hypertens*, 2009, 27(5): 1084–1093.
- [27] Echem C, Bomfim GF, Ceravolo G, et al. Anti-toll like receptor 4 (TLR4) therapy diminishes cardiac remodeling regardless of changes in blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 187: 243–245.
- [28] Katare PB, Bagul PK, Dinda AK, et al. Toll-like receptor 4 inhibition improves oxidative stress and mitochondrial health in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in rats [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 719.
- [29] Fu YL, Tao L, Peng FH, et al. GJA1-20k attenuates Ang II-induced pathological cardiac hypertrophy by regulating gap junction formation and mitochondrial function [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(4): 536–549.
- [30] Fan Z, Gao Y, Huang Z, et al. Protective effect of hydrogen-rich saline on pressure overload-induced cardiac hypertrophy in rats: possible role of JAK-STAT signaling [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 32.
- [31] Zhang J, Wei X, Zhang W, et al. miR-326 targets MDK to regulate the progression of cardiac hypertrophy through blocking JAK/STAT and MAPK signaling pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 872: 172941.

[收稿日期] 2023-01-20