

关开明,钟德琳,罗朝天,等. 铁过载致心肌纤维化小型猪模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 598-604.

Guan KM, Zhong DL, Luo CT, et al. Establishment of a miniature pig model of myocardial fibrosis induced by iron overload [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 598-604.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.05.006

铁过载致心肌纤维化小型猪模型的建立

关开明¹,钟德琳⁴,罗朝天¹,彭飞¹,方培荣²,韦力琪²,彭鹏^{1,3*}

(1. 广西医科大学第一附属医院放射科,南宁 530021;2. 广西医科大学,南宁 530021;
3. 国家卫健委地中海贫血防治重点实验室,南宁 530021;4. 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司
昆明分公司,昆明 650051)

【摘要】 目的 建立铁过载致心肌纤维化的小型猪模型,探讨铁过载致心肌纤维化的作用机制/病理生理特征。**方法** 选取巴马小型猪 18 只,随机分为实验组 15 只、对照组 3 只。每隔 7 d 经肌肉注射右旋糖酐铁溶液 1 次,首次剂量为 400 mg/kg,其余剂量为 200 mg/kg,对照组注射与实验组相同剂量生理盐水,于注射铁剂 6 d 后随机处死 1 ~ 2 只巴马小型猪;取部分心脏组织切片进行心肌胶原容积分数(CVF)测定和心肌铁半定量测定,剩余心脏组织用于测量心脏铁浓度(CIC)。**结果** 随注射次数增多,实验组巴马猪 CIC 呈上升趋势,心肌胶原纤维及铁颗粒占视野面积比例增多。注射铁总量与 CIC、心肌铁病理半定量、CVF 之间高度正相关($r = 0.957, r = 0.971, r = 0.957, P < 0.001$),CIC 与 CVF 之间高度正相关($r = 0.924, P < 0.001$),心肌铁半定量与 CIC、CVF 之间高度相关($r = 0.973, P < 0.001; r = 0.944, P < 0.001$)。**结论** 通过肌肉注射首次剂量为 400 mg/kg,后续剂量为 200 mg/kg 的右旋糖酐铁,共 15 次,可以建立心肌纤维化小型猪模型,心肌铁颗粒沉积越多提示心肌纤维化程度越严重。

【关键词】 小型猪;心肌纤维化;铁过载;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 05-0598-07

Establishment of a miniature pig model of myocardial fibrosis induced by iron overload

GUAN Kaiming¹, ZHONG Delin⁴, LUO Chaotian¹, PENG Fei¹, FANG Peirong², WEI Liqi², PENG Peng^{1,3*}

(1. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.
2. Guangxi Medical University, Nanning 530021. 3. NHC Key Laboratory of Thalassemia Medicine, Nanning 530021.
4. Kunming Branch of Shenzhen Mindray Biomedical Electronics Company Limited, Kunming 650051)

Corresponding author: PENG Peng. E-mail: doublep@126.com

【Abstract】 **Objective** To establish an animal model of myocardial fibrosis induced by iron overload. **Methods** Eighteen Bama minipigs were randomly divided into an experimental group ($n = 15$) or control group ($n = 3$). An iron dextran solution was intramuscularly injected every seven days. The first dose was 400 mg/kg, and the other doses were 200 mg/kg. The control group was injected with the same volume of normal saline. One to two Bama minipigs were randomly euthanized 6 days after injection of iron. Cardiac tissue sections were used for myocardial collagen volume fraction (CVF), semiquantitative myocardial iron, cardiac iron concentration (CIC) measurements. **Results** With the increase in the number of injections, CIC in the experimental group showed an upward trend, and the proportions of

【基金项目】国家自然科学基金(81641066,81760305),国家级大学生创新创业计划项目(202210598039,202210598041),国家卫健委地中海贫血防治重点实验室开放课题(GJWJWDP202208,GJWJWDP202209),广西研究生教育创新计划项目(YCSW2022203)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81641066, 81760305), National College Students' Innovation and Entrepreneurship Program (202210598039, 202210598041), Open Project of NHC Key Laboratory of Thalassemia Medicine (GJWJWDP202208, GJWJWDP202209), Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2022203).

【作者简介】关开明(1997—),男,在读硕士研究生,研究方向:血液病及铁代谢疾病影像。Email:353909595@qq.com

【通信作者】彭鹏(1977—),男,主任医师,博士,研究方向:血液病及铁代谢疾病影像。Email:doublep@126.com

myocardial collagen fibers and iron particles were increased. The total amount of injected iron was highly correlated to CIC, myocardial iron, and CVF ($r = 0.957$, $r = 0.971$, $r = 0.957$, $P < 0.001$). CIC was highly correlated to CVF ($r = 0.924$, $P < 0.001$), and myocardial iron was highly correlated to CIC and CVF ($r = 0.973$, $P < 0.001$; $r = 0.944$, $P < 0.001$). **Conclusions** A miniature pig model of myocardial fibrosis was established by intramuscular injection of 400 mg/kg iron dextran as the first dose and 200 mg/kg iron dextran as the other doses. More iron particles deposited in the myocardium led to more severe myocardial fibrosis.

【Keywords】 minipigs; myocardial fibrosis; iron overload; animal models

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

铁是人类必需的微量元素之一^[1],在红细胞功能及许多生理过程所需的蛋白质和酶中起着关键作用^[2],铁稳态对维持生命健康至关重要^[3]。一些血液性疾病患者由于长期输血、无效造血及胃肠铁吸收增多等原因,造成过量铁在器官沉积,使机体处于铁过载状态^[4-5],最终诱发各个系统的疾病^[6-7]。铁过载导致心功能障碍,最终进展为心力衰竭,是该人群主要死亡原因之一^[8]。研究表明,弥漫性心肌纤维化可能与铁过载和心力衰竭相关^[9],进一步探索心肌铁过载与弥漫性心肌纤维化之间的关系,具有重要意义。既往通过皮下注射右旋糖酐铁成功诱导心肌铁过载家兔模型^[10],但尚未探讨铁过载导致心肌纤维化的机制。相比家兔,小型猪因其与人类相似的血流动力学及解剖生理学特点被广泛用于心血管疾病动物模型的建立^[11],对比其他小型动物,具有耐受性高、较大体型便于病理取材观察等优势^[12]。Jensen 等^[13]利用小型猪成功制作了铁过载动物模型,但其主要研究目的为探讨肝、心脏铁过载规律,并未对铁过载致心肌纤维化进一步探讨。目前,针对心肌纤维化的动物模型,多通过压力超负荷、外源性活性因子、缺血、高糖环境进行诱导^[14],尚未见报道通过铁过载进一步诱导心肌纤维化动物模型的建立。因此,本研究目的为建立铁过载致心肌纤维化的小型猪模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级 26 ~ 30 周龄巴马小型猪 18 只,雄性,体重为 20 ~ 22 kg,由广西大学动物科学技术学院巴马小型猪繁育基地提供【SCXK(桂)2018-0003】。温度 21 ~ 24℃,相对湿度为 50% ~ 70%。饲喂全价营养饲料和自由饮水,12 h/12 h 明暗交替,饲养于广西医科大学动物实验研究中心【SYXK(桂)2020-0004】。所有巴马小型猪操作程序均符合广西医科大学第一附属医院医学伦理委员会要求

(2022-E380-01)。

1.1.2 主要试剂与仪器

右旋糖酐铁(铁浓度 150 mg/mL)购自广西化工研究院兽药厂;电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9140A 型,上海柏欣仪器设备厂,中国);火焰原子吸收分光光度计(ZA3000,日立公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

选取巴马小型猪 18 只,随机分为实验组 15 只、对照组 3 只。

1.2.2 各组实验动物处理方法

实验组 15 只巴马小型猪间隔 7 d 称重后经两侧后腿深部肌肉轮流注射右旋糖酐铁溶液,首次注射剂量为 400 mg/kg,后续剂量为 200 mg/kg。于注射铁剂 6 d 后随机选取实验组小型猪 1 只处死。对照组注射与实验组相同剂量生理盐水,处死时间从首次注射后 1 ~ 15 周随机抽取 3 周,并与实验组同一时间点处死。处死方法为经耳缘静脉注射过量的 2.5% 戊巴比妥钠溶液致巴马小型猪安乐死。待小型猪呼吸运动停止、瞳孔扩大、对光反射消失,且无法触及心跳后固定于手术台。手术刀沿胸骨纵向切割离断皮肤,组织剪、手术镊、止血钳逐层分离皮下脂肪、肌肉、筋膜并暴露肋骨,肋骨钳剪断心脏周围肋骨,完整取下胸骨及肋骨,充分暴露心包,用组织剪沿纵隔胸膜分离心包并经心底主动脉离断血管,取出心脏,去掉心包、心内膜、脂肪等组织,用生理盐水冲洗干净,手术刀垂直心脏左心室长轴,切厚约 0.5 cm 横断面,放入 10% 的福尔马林溶液(100 mL)中固定 24 h 后送广西医科大学第一附属医院病理科,经病理科医师行蜡埋、切呈 5 μm 厚的组织切片用于苦味酸天狼星红染色(Picrosirius red staining)和普鲁士蓝染色(Prussian blue)。剩余心肌室间隔组织切成数块,用双蒸水反复冲洗 8 ~ 10 次,至无法挤压出残留血液,放置于 60℃ 恒温烤箱烘干,烘干时间为 5 ~ 7 d,至心脏组织重量不再改变。

1.2.3 观察项目、时间点及观察方法

分别于 1 ~ 15 周观察组织切片的心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)、心肌铁半定量及心脏铁浓度(cardiac iron concentration, CIC)。使用 Olympus CKX41SF 光学显微镜观察切片,放大 200 倍后拍摄并测量不相连的视野(共计 15 个),运用 Image J 软件,系统计算胶原纤维及铁颗粒占视野面积的百分比,即 CVF 和心肌铁半定量。将烘干心脏组织粉碎,称重后送广西分析测试研究中心经硝酸硝化处理后,利用原子发射光谱(inductively coupled plasma, ICP)法测量 CIC, 计量认证标准:国标食品理化项目 GB/T 5009.90-2003。

1.3 统计学分析

使用 IBM SPSS 24.0 软件进行统计学分析,由于实验采用梯度设计,数据不成正态分布,通过秩和检验比较对照组与实验组个体之间 CIC、CVF、心肌铁半定量的差异,采用 Spearman 相关分析评价 CIC、CVF、心肌铁半定量和注射铁总量之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $r > 0.70$ 为两变量之间高度相关。

2 结果

2.1 一般情况

经过 15 周,18 只实验动物均完成实验,实验组巴马小型猪分别于注射铁剂后每周处死 1 只,共进行 15 周,注射铁剂总量分别为:400、600 ~ 3000、3200 mg/kg, CIC 范围为 0.51 ~ 2.90 mg/g, CVF 范围为 10.17% ~ 27.70%, 心肌铁半定量范围为 0.19% ~ 3.42%, 未出现因铁剂注射致死的情况。对照组巴马小型猪共 3 只分别于 1 周、11 周、15 周后处死, CIC 范围为 0.24 ~ 0.28 mg/g, CVF 范围为 10.89% ~ 11.21%, 心肌铁半定量测定均为 0%。

2.2 病理

2.2.1 大体病理

对照组与实验组小型猪心脏大小、形态无明显差异,对照组小型猪心脏呈鲜红色,实验组第 10 周后小型猪心脏呈棕褐色(图 1)。

2.2.2 镜下病理

经普鲁士蓝染色的心肌组织病理切片显示,对照组巴马小型猪心肌内未见蓝染色颗粒(图 2A);实验组注射铁剂 1 周后,心肌可见散在细小的铁染色颗粒(占视野面积比为 0.19%,图 2B);注射铁剂 5 周后,心肌可见较多颗粒状散在分布的蓝染色颗



图 1 巴马小型猪心脏的大体病理

Figure 1 Gross pathology of the hearts of Bama miniature pigs

粒(占视野面积比为 1.00%,图 2C);注射铁剂 15 周后,心肌可见大量颗粒状、团块状蓝染色颗粒(占视野面积比 3.42%,图 2D);实验组蓝染色颗粒占心肌视野面积最高为 3.42%,平均为 $1.86\% \pm 1.58\%$ 。经天狼星红染色的心肌组织病理切片显示,对照组巴马小型猪心肌内胶原纤维呈正常分布(CVF = 10.89%,图 2E);实验组注射铁剂 1 周后,心肌内胶原纤维较为正常(CVF = 10.17%,图 2F);注射铁剂 5 周后,心肌内胶原纤维可见明显增多(CVF = 13.82%,图 2G);注射铁剂 15 周后,心肌内胶原纤维大量增多(CVF = 27.70%,图 2H)。其中,心肌细胞形态各异,存在横向、纵向走行(图 2I,红、蓝箭头),胶原纤维分布不均匀,以血管周围分布较多(图 2J)。对照组 CVF 平均为 10.89%;实验组 CVF 最高达 27.70%,平均为 $14.70\% \pm 8.21\%$ 。

2.3 巴马小型猪的 CIC、心肌铁半定量、CVF 和注射铁总量之间的关系

通过 Spearman 相关分析,注射铁总量与 CIC、心肌铁半定量、CVF 之间高度相关($r = 0.957, r = 0.971, r = 0.957, P < 0.001$,图 3A ~ 3C);CIC 与 CVF 之间高度相关($r = 0.924, P < 0.001$,图 3D);心肌铁半定量与 CIC 之间高度相关($r = 0.973, P < 0.001$,图 3E);心肌铁半定量与 CVF 之间高度相关($r = 0.944, P < 0.001$,图 3F)。

2.4 实验组巴马小型猪与对照组巴马小型猪 CIC、CVF、心肌铁半定量的关系

15 只实验组巴马小型猪随着注射铁剂时间的增加,CIC、CVF、心肌铁半定量总体呈上升趋势。3 只正常对照组巴马小型猪 CIC、CVF、心肌铁半定量不随实验周数的增加而上升。与对照组巴马小型猪相比,实验组巴马小型猪 CIC、CVF、心肌铁半定量明显增加(表 1)。

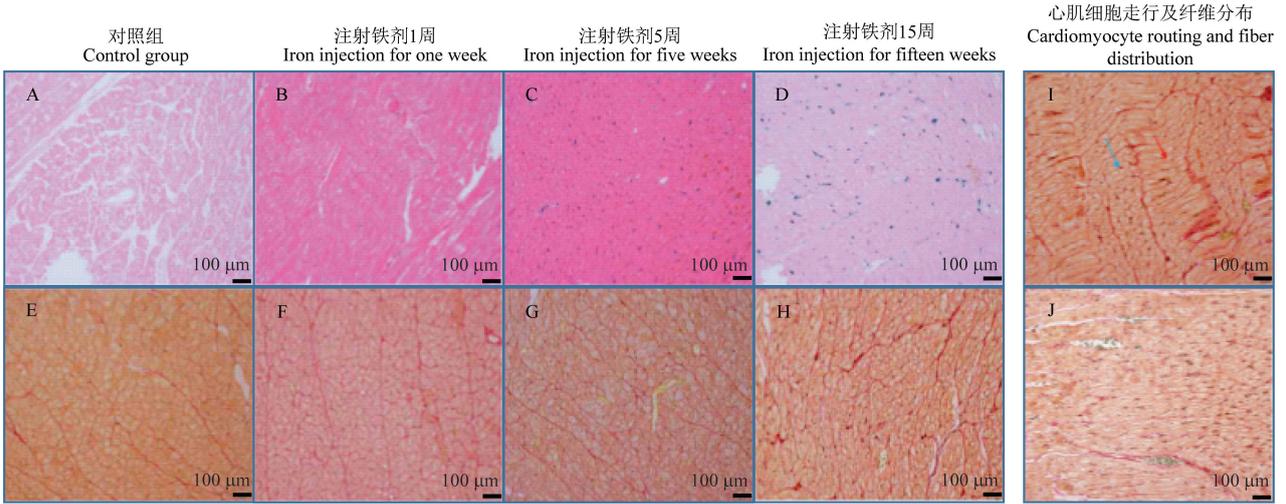


图 2 巴马小型猪心肌组织普鲁士蓝染色、天狼星红染色(×400)

Figure 2 Prussian blue staining and Sirius red staining of myocardial tissue of Bama miniature pigs(×400)

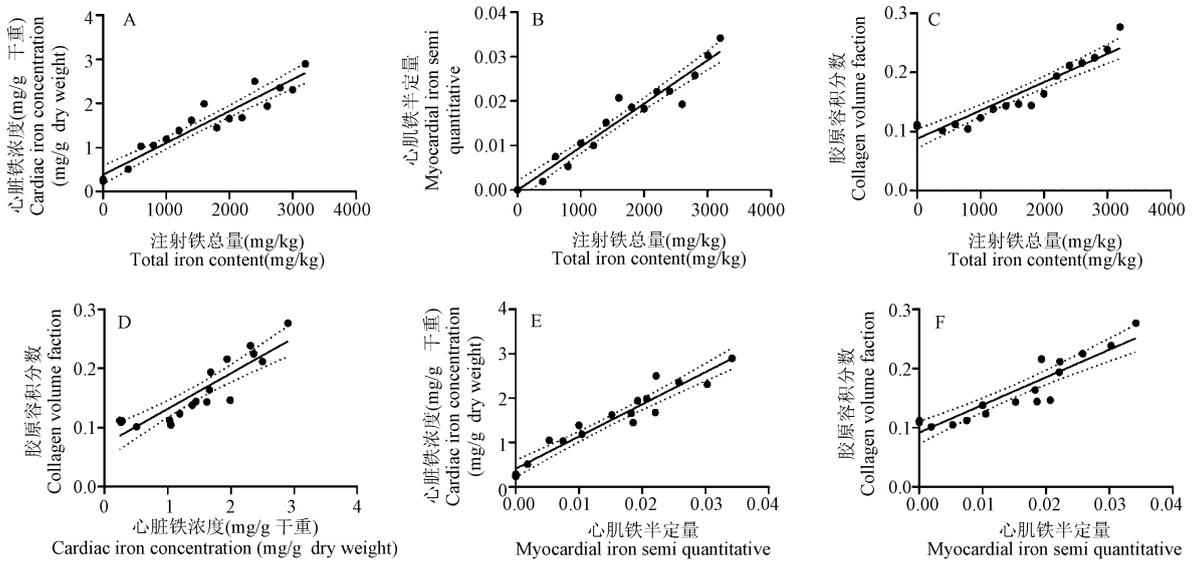


图 3 巴马小型猪的 CIC、CVF、普鲁士蓝染色心肌铁半定量和注射铁总量之间的散点图

Figure 3 Scatter plot of CIC, CVF, Prussian blue and total injected iron of Bama miniature pigs

表 1 实验组与对照组 CIC、心肌铁半定量、CVF 测定的比较

Table 1 Comparison of CIC, myocardial iron semi quantitative and CVF determination between the experimental group and the control group

观察项目/ 数值	心脏铁浓度 (mg/g 干重) Cardiac iron concentration (mg/g dry weight)		心肌铁半定量 Myocardial iron semi quantitative		胶原容积分数 Collagen volume fraction	
	实验组 (n = 15) Experimental group (n = 15)	对照组 (n = 3) Control group (n = 3)	实验组 (n = 15) Experimental group (n = 15)	对照组 (n = 3) Control group (n = 3)	实验组 (n = 15) Experimental group (n = 15)	对照组 (n = 3) Control group (n = 3)
中位数 Median	1.660	0.260	0.0186	0	0.1466	0.1115
最大值 Maximum	2.900	0.280	0.0342	0	0.2770	0.1121
最小值 Minimum	0.510	0.240	0.0019	0	0.1017	0.1089
Z	-2.666		-2.671		-1.955	
P	< 0.05		< 0.05		0.051 (≈ 0.05)	

3 讨论

3.1 铁过载致心肌纤维化模型动物的选择

合适的动物模型能够提供更好的研究材料,从而更好地配合临床工作进行研究。小型啮齿动物常用于人类主要疾病模型的建立,小体型使其易于操作,病理取材后能够在一个切片上对完整的组织或器官进行观察。但用于建立心血管疾病模型则存在许多问题。啮齿类动物和人类之间在心脏特征方面存在显著性差异^[15],这会导致所研究的结果在人体上往往得不到验证。

本课题组既往研究中,通过每周皮下注射剂量为 200 mg/kg 右旋糖酐铁溶液的方法成功建立了心肌铁过载兔模型^[10],但在实验过程中发现家兔耐受性较差,往往未出现心肌纤维化,就已经出现死亡的情况。相似的方法,黄璐等^[16]通过每周肌内注射剂量为 50 mg/kg 右旋糖酐铁的方法建立心肌铁过载兔模型,但该研究并未对注射铁剂后的 CVF 进行测定,和对铁过载所致心肌纤维化进一步探讨,且心肌铁过载兔模型的心血管系统与成人相比,体积、比例均存在差异,临床意义仍有待考究^[17]。

目前,心血管疾病动物模型多使用大型动物^[18]。猪在心血管系统的发生、发展、结构、生理机制与人类相似^[19],此外,与非人类灵长类动物等大型动物相比,猪在伦理和经济上更容易被接受,使它们成为心血管疾病研究的首选模型^[20],许多心血管疾病模型运用猪得以建立^[21-22]。小型猪能够弥补传统大型猪体积大、不便搬运、操作困难等不足^[23]。本研究采用的是广西地区特有的巴马小型猪,具有稳定的遗传特性,能够避免一些由实验动物导致的非特异因素的影响,其比小型啮齿类动物具有与人体更为相似的解剖与生理,比家兔具有更强的心脏耐受性^[12]。因此,巴马小型猪是铁过载诱导心肌纤维化动物模型建立的最佳动物选择。

3.2 注射铁剂剂量的选择

既往研究证明,通过注射铁剂可实现铁过载猪模型的建立^[13],且对比其他铁过载动物模型的方法成功率高、操作简单^[24-25]。本研究通过深部肌内注射过量右旋糖酐铁溶液,使实验动物血液循环的游离铁增加,随剂量和时间的推移不断沉积于心脏,减少了因铁过载脏器分布与肝等网状内皮系统及肾排泄等因素导致实验动物心肌铁过载程度较低的干扰。

采用注射铁剂的方法建立铁过载动物模型,注射铁剂剂量的选择是关键。少量的每周注射铁剂剂量,通常需要较长时间才能成模,实验周期过长往往又会造成动物非正常生理状态持续时间的增加,从而导致过高的动物死亡率。早期预实验采用的首次剂量为 200 mg/kg,后续剂量为 100 mg/kg,注射 8 周后取心肌切片染色,发现当前剂量诱导心肌纤维化的程度不高,甚至与正常对照组比较未见明显差异。铁过载主要沉积于肝、脾等网状内皮系统,心肌铁过载相对较轻,为了较快达到铁过载负荷的状态并诱导心肌纤维化,本研究增加首次注射右旋糖酐铁剂量,可以迅速达到铁过载状态,使循环血液中的转铁蛋白逐渐饱和,非转铁蛋白结合铁(non-transferrin-bound iron, NTBI) 出现。NTBI 是一种不稳定、有高度细胞毒性的物质,其进入心肌细胞,导致心肌的可变铁水平增高,最后以铁蛋白及含铁血黄素形式沉积存在,造成心肌纤维化。

3.3 巴马小型猪铁过载致心肌纤维化的病理改变

此前针对铁过载导致的心肌纤维化动物模型研究少见,目前,临床应用中通过测定 CIC 可评估患者铁负荷情况^[26],心肌纤维化的组织病理学分析常采用测定 CVF 的方法^[27],故铁过载及心肌纤维化严重程度将通过测定 CIC、CVF 进行评价。CIC 测定结果显示,随着注射铁剂次数增多,实验组的注射铁总量增多,CIC 总体呈逐渐上升趋势,证实了整个实验过程中游离铁不断沉积于心肌。因此,通过本实验肌内注射铁剂的方法,可造成小型猪心肌铁过载,实验过程中观察到心脏解剖后颜色的加深很有可能是心肌铁过载颗粒所致。

普鲁士蓝染色的心肌组织病理切片显示随着注射铁剂剂量的增加,心肌蓝染色颗粒占心肌视野的面积逐渐增加,且铁颗粒多沉积于细胞间质,少量进入细胞内。与既往课题组铁过载家兔模型^[10]及 Jensen 等^[13]以每周最大注射右旋糖酐铁剂量为 140 mg/kg、平均随访时间为 13 个月的 13 只铁过载小型猪模型的心肌普鲁士蓝染色切片结果显示一致。

天狼星红染色的心肌组织病理切片显示,随着注射铁剂剂量的增加,胶原纤维占心肌视野面积逐渐增加。

3.4 铁过载心肌纤维化模型评估

注射铁总量与 CIC、心肌铁半定量、CVF 之间高度相关($r = 0.957$, $r = 0.971$, $r = 0.957$, $P <$

0.001),提示通过肌内注射铁剂的方法可以造成巴马小型猪心脏铁过载及心肌纤维化。CIC 与 CVF 之间高度相关($r = 0.924, P < 0.001$),说明心脏铁过载越重,心肌纤维化程度越重。心肌铁半定量与 CIC 之间高度相关($r = 0.973, P < 0.001$),说明实际心铁过载越严重,普鲁士蓝染色中铁颗粒占面积视野的比例越大。心肌铁半定量与 CVF 之间高度相关($r = 0.944, P < 0.001$),说明心肌细胞间质内铁颗粒沉积越多,心肌纤维化程度越重。

在统计分析结果中,实验组与对照组 CVF 值的差异无统计学意义,分析导致 P 值稍大的可能原因为:(1)动物个体之间 CVF 值存在差异,部分对照组小型猪的 CVF 值偏大;(2)在造模的前期过程中部分实验组心肌纤维化程度较轻,导致实验组与对照组的 CVF 值差异不明显。

综上,通过肌内注射铁剂可以造成心肌铁过载,进而引起心肌纤维化的形成。因注射铁总量不足或铁过载持续时间较短,未能造成更为严重的铁过载及心肌纤维化是本研究的不足之处,后续将进一步探讨增大注射铁剂剂量、加长注射铁剂持续时间对铁过载及心肌纤维化严重程度的影响。

3.5 建立铁过载致心肌纤维化动物模型的意义

铁参与了红细胞生成、循环氧气输送和各种器官的转移、生长、发育等许多生理过程^[28]。正常人体处于铁稳态的状态,铁稳态失调可能会发展为铁过载,损害正常的心脏功能^[29]。

铁过载会导致弥漫性心肌纤维化,弥漫性心肌纤维化改变了细胞外基质的生物学作用并扭曲了心肌结构和生理学,这种病变损害心脏功能,因此在心衰的发展中至关重要,并导致患者的不良临床结局。在研究过程中,从开始注射铁剂时,便发现有铁颗粒沉积于心肌组织,但早期的心肌纤维化程度不明显,提示铁过载与心肌纤维化在时间上出现不一致。心肌纤维化要稍落后于铁过载,这与 CIC、CVF 的分析结果相一致,即心肌纤维化不仅受铁过载程度影响,还受铁过载的持续时间影响。因此,在发生心功能减退之前,及早检出心肌纤维化并及时的祛铁治疗,减少铁过载的程度和持续时间,将有助于预防、延缓心肌纤维化,从而实现心功能的逆转^[30]。该动物模型可为今后探讨及时祛铁治疗逆转心肌纤维化提供必要的研究工具。

目前,心内膜心肌活检(endomyocardial biopsy, EMB)是确诊心肌纤维化的“金标准”,但其为有创

伤性检查,不仅操作复杂还存在多种并发症,且因仅能对小面积心肌进行采样,活组织检查容易产生采样误差^[31]。利用该动物模型可以解决影像学检查手段中对于小型动物无法使用常规的心电门控扫描、常规 MRI 扫描序列分辨率不足、无法进行准确定位定量等问题,从而为影像学检查方法探讨无创性心肌纤维化的定量评估提供一种重要工具。

综上所述,通过首次肌内注射剂量为 400 mg/kg,后续剂量为 200 mg/kg 的右旋糖酐铁,共 15 次可以成功建立铁过载致心肌纤维化巴马小型猪模型,为铁过载所致的心肌纤维化疾病的发病机制、诊断治疗等提供一种重要的研究工具。

参 考 文 献 (References)

- [1] Sousa L, Oliveira MM, Pessôa MTC, et al. Iron overload: Effects on cellular biochemistry [J]. Clin Chim Acta, 2020, 504: 180-189.
- [2] Zeidan RS, Han SM, Leeuwenburgh C, et al. Iron homeostasis and organismal aging [J]. Ageing Res Rev, 2021, 72: 101510.
- [3] Mu Q, Chen L, Gao X, et al. The role of iron homeostasis in remodeling immune function and regulating inflammatory disease [J]. Sci Bull, 2021, 66(17): 1806-1816.
- [4] Weber S, Parmon A, Kurrel N, et al. The clinical significance of iron overload and iron metabolism in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia [J]. Front Immunol, 2021, 11: 627662.
- [5] Ali S, Mumtaz S, Shakir HA, et al. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies [J]. Mol Genet Genomic Med, 2021, 9(12): e1788.
- [6] Zhang L, Meng Z, Jiang Z, et al. Indicators of glucose dysregulation and the relationship with iron overload in Chinese children with beta thalassemia major [J]. Pediatr Diabetes, 2022, 23(5): 562-568.
- [7] Koohi F, Kazemi T, Miri-Moghaddam E. Cardiac complications and iron overload in beta thalassemia major patients-a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Hematol, 2019, 98(6): 1323-1331.
- [8] Dimitroglou Y, Anagnostopoulos F, Aggeli C, et al. Severity of heart failure and health-related quality of life in beta-thalassemia patients: a cross-sectional study [J]. Ann Hematol, 2020, 99(9): 2037-2046.
- [9] Meloni A, Pistoia L, Positano V, et al. Increased myocardial extracellular volume is associated with myocardial iron overload and heart failure in thalassemia major [J]. Eur Radiol, 2023, 33(2): 1266-1276.
- [10] 齐国将, 钟德琳, 蓝海梅, 等. 心肌铁过载兔模型的制作及铁沉积规律的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 242-247.

Qi GJ, Zhong DL, Lan HM, et al. Establishment of a rabbit model of cardiac iron overload and its relationship with iron

- deposition [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(2): 242–247.
- [11] Liu J, Xie CM, Liu Q, et al. Dynamic alteration in myocardium creatine during acute infarction using MR CEST imaging [J]. NMR Biomed, 2022, 35(7): e4704.
- [12] 邹迪莎, 于健. 巴马小型猪动物模型在医学领域的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(4): 1128–1134.
- Zou DS, Yu J. Research progress on animal models of *Bama* miniature pigs in the field of medicine [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2017, 44(4): 1128–1134.
- [13] Jensen PD, Nielsen AH, Simonsen CW, et al. Consequences of parenteral iron-dextran loading investigated in minipigs. A new model of transfusional iron overload [J]. Blood Cells Mol Dis, 2020, 83: 102440.
- [14] 潘建衡, 曹占鸿, 李娜, 等. 常见心肌纤维化模型的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(1): 84–88.
- Pan JH, Cao ZH, Li N, et al. Current situation of common myocardial fibrosis model [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2021, 37(1): 84–88.
- [15] Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human [J]. J Clin Invest, 2003, 111(6): 869–876.
- [16] 黄璐, 韩瑞, 周舒畅, 等. 心肌铁过载兔模型心功能的 MR 评价 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2018, 47(5): 520–525.
- Huang L, Han R, Zhou SC, et al. Assessment of cardiac function of rabbit models of myocardial iron overload: an MR study [J]. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong, 2018, 47(5): 520–525.
- [17] 叶鹏飞, 郭应坤, 张怡, 等. 构建兔颈总动脉粥样硬化斑块模型的新方法及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 301–306.
- Ye PF, Guo YK, Zhang Y, et al. Establishment and evaluation of a rabbit model of carotid atherosclerotic plaque [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 301–306.
- [18] Tsang HG, Rashdan NA, Whitelaw CBA, et al. Large animal models of cardiovascular disease [J]. Cell Biochem Funct, 2016, 34(3): 113–132.
- [19] Zhao Y, Hou Y, Xu Y, et al. A compendium and comparative epigenomics analysis of cis-regulatory elements in the pig genome [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2217.
- [20] Fang B, Ren X, Wang Y, et al. Apolipoprotein E deficiency accelerates atherosclerosis development in miniature pigs [J]. Dis Model Mech, 2018, 11(10): dmm036632.
- [21] Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, et al. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine [J]. Diabetes, 2001, 50(7): 1654–1665.
- [22] Zhai X, Han W, Wang M, et al. Exogenous supplemental NAD⁺ protect myocardium against myocardial ischemic/reperfusion injury in swine model [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(9): 6066–6074.
- [23] 李艳君, 宋少锐, 郭亚芬, 等. 广西巴马小型猪动脉粥样硬化模型的制作 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(7): 1770–1776.
- Li YJ, Song SR, Guo YF, et al. Preparation of atherosclerosis model using Guangxi *Bama* mini-pig [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2015, 42(7): 1770–1776.
- [24] Santos M, Schilham MW, Rademakers LH, et al. Defective iron homeostasis in beta 2-microglobulin knockout mice recapitulates hereditary hemochromatosis in man [J]. J Exp Med, 1996, 184(5): 1975–1985.
- [25] Asare GA, Paterson AC, Kew MC, et al. Iron-free neoplastic nodules and hepatocellular carcinoma without cirrhosis in Wistar rats fed a diet high in iron [J]. J Pathol, 2006, 208(1): 82–90.
- [26] DivakarJose RR, Delhikumar CG, Ram Kumar G. Efficacy and safety of combined oral chelation with deferiprone and deferasirox on iron overload in transfusion dependent children with thalassemia-A prospective observational study [J]. Indian J Pediatr, 2021, 88(4): 330–335.
- [27] Foussier C, Barral PA, Jerosh-Herold M, et al. Quantification of diffuse myocardial fibrosis using CMR extracellular volume fraction and serum biomarkers of collagen turnover with histologic quantification as standard of reference [J]. Diagn Interv Imaging, 2021, 102(3): 163–169.
- [28] Bi Y, Ajoalabady A, Demillard LJ, et al. Dysregulation of iron metabolism in cardiovascular diseases: from iron deficiency to iron overload [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 190: 114661.
- [29] Vela D. Keeping heart homeostasis in check through the balance of iron metabolism [J]. Acta Physiol, 2020, 228(1): e13324.
- [30] López B, Ravassa S, Moreno MU, et al. Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches [J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(7): 479–498.
- [31] Raafs AG, Verdonschot JAJ, Henkens MTHM, et al. The combination of carboxy-terminal propeptide of procollagen type I blood levels and late gadolinium enhancement at cardiac magnetic resonance provides additional prognostic information in idiopathic dilated cardiomyopathy—a multilevel assessment of myocardial fibrosis in dilated cardiomyopathy [J]. Eur J Heart Fail, 2021, 23(6): 933–944.