

舒张性心力衰竭实验动物模型的研究进展

陈会花, 章忱, 吕嵘*

(上海中医药大学病理教研室, 上海 201203)

【摘要】 舒张性心力衰竭患者在并发高血压、糖尿病、心肌缺血和老龄化时可显著增加心衰的发病率, 目前其潜在发病机制尚不完全清楚。随着我国人口老龄化的加剧, 舒张性心力衰竭的患病率和死亡率明显上升, 严重影响人们的生活质量和寿命。建立实验动物模型时尽量模拟临床发病诱因和特征, 可以更真实地揭示疾病的发病机制或药物的作用机制。本文从舒张性心力衰竭的主要诱因重点综述构建舒张性心力衰竭实验动物模型的方法和各自的特点, 为将来更多的研究舒张性心力衰竭发病机制的研究者提供依据。

【关键词】 舒张性心力衰竭; 动物模型; 综述

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017)03-0336-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.019

Advances in research of diastolic heart failure in experimental animal models

CHEN Hui-hua, ZHANG Chen, LYU Rong*

(Department of Pathology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 The risk factors of diastolic heart failure include among others: hypertension, diabetes, myocardial ischemia and aging. The underlying mechanisms for this cardiac complication are incompletely understood. With the increase of aging of the population, the prevalence and mortality of diastolic heart failure is rising gradually. It seriously affects the life quality and life span of people. In order to more truly reveal the underlying mechanisms of diastolic heart failure and to develop novel therapeutic strategies, the experimental animal models are extremely important. The present review focuses on providing an overview of the characteristics of these models for the growing number of investigators who seek to understand the pathology of diastolic heart failure.

【Key words】 Diastolic heart failure; Animal models; Review

Corresponding author: LYU Rong. E-mail: lurong@shutcm.edu.cn

舒张性心力衰竭(diastolic heart failure, DHF)又称为射血分数正常的心力衰竭(heart failure with normal ejection fraction, HF-NEF)或射血分数尚保留的心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction, HF-PEF)是指患者有心力衰竭的临床症状和(或)体征, 但LVEF正常或接近正常(LVEF > 50%或> 45%), 有左室舒张功能不全的证据, 左心室舒张末期内径/体表面积 < 3.7 cm/m², 并排除其他瓣膜性心脏疾病^[1]。2013年美国心脏病学会基

金会/美国心脏协会(American College of Cardiology Foundation/American Heart Association, ACCF/AHA)公布的心衰治疗指南中指出DHF大约占心力衰竭的50%, 发病率呈逐年上升趋势^[2]。

DHF的特点是发病人群年龄较大, 多见于女性, 常见的并发症有糖尿病、高血压和心肌缺血等^[3]。在DHF的发病相关机制中, 年龄、高血压、糖尿病的地位格外受到重视。目前, 临床针对DHF没有确实有效的治疗药物, 防治策略主要针对其病理

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81373858)。

【作者简介】 陈会花(1989-), 女, 博士研究生, 主要从事中医药对心力衰竭的作用机制研究。E-mail: chenhuihua123456@163.com

【通讯作者】 吕嵘(1971-), 男, 教授, 博士, 主要从事中医药对心力衰竭的作用机制研究。E-mail: lurong@shutcm.edu.cn

生理机制。因此,建立不同因素诱导的舒张性心力衰竭动物模型能够有助于我们更加深入地研究并寻找有效干预手段,本文将回顾近年国内外 DHF 动物模型的制备方法。

1 高血压致舒张性心力衰竭

高血压是 DHF 患者最常见的并发症之一(尤其是老年患者),高血压诱导的压力超负荷可导致心肌肥大以及心脏僵硬度增加。因此,利用高血压诱导舒张性心力衰竭模型符合临床病理生理过程。

1.1 Dahl - 盐负荷法

给 Dahl 盐敏感大鼠喂 8% NaCl 高盐饮食,13 ~ 14 周后, LVEF > 50%, 但左室僵硬度 (LV stiffness)^[4,5]、心外膜运动指数 (EMI) 和舒张末期室壁张力 (DWS) 等都发生明显改变 ($P < 0.05$), 形成舒张性心力衰竭^[6]。

1.2 醋酸脱氧皮质酮/西方饮食法 (DOCA/WD):

将醋酸去氧皮质醇 (100 mg/kg) 以长效制剂的形式在兰德瑞斯猪皮下缓慢释放 90 d, 同时给予高盐、高脂、高糖和高胆固醇饮食 12 周。模型组 LVEF 未发生改变, 但左室压力 - 容积环 (LV PV-loop)、左室舒张末压力 (LVEDP)、心输出量储备以及最大收缩速率 ($+dv/dt_{max}$) 均发生明显改变, 舒张性心力衰竭形成^[7]。

1.3 自发性高血压大鼠 (spontaneous hypertensive rat, SHR)

一种遗传性高血压大鼠模型, 大鼠 12 周龄出现高血压症状, 15 ~ 18 周龄出现舒张性心力衰竭症状和体征^[11]。这是模拟人高血压导致心力衰竭的理想模型, 不需要技术干预即可形成, 但由于成模时间久且时间不固定, 从而其应用受到一定限制。

1.4 主动脉缩窄法 (transverse abdominal aortic constriction, TAC)

通过缩窄主动脉, 使主动脉压力升高而增加后负荷, 根据缩窄的动脉的位置不同可以分为主动脉弓缩窄和腹主动脉缩窄。

1.4.1 主动脉弓缩窄法

是通过手术的方法在主动脉弓的无名动脉和左颈总动脉之间的进行缩窄^[9]。目前, 国内外较统一的模型制作方法是: 4 ~ 5 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠, 使用 27 G 针头和 7 - 0 丝线在主动脉弓的无名动脉与左颈总动脉之间进行缩窄, 结扎后拔出针头, 使主动脉弓缩窄至 0.4 mm, 造成主动脉弓缩窄模型。结果显示升主动脉缩窄后左右颈内动脉收缩压

之间压力梯度约为 50 mm Hg, 1 ~ 2 周后模型产生明显的左室肥厚, 舒张功能的下降, 左心室僵硬度增加, 以及血液中血管加压素和心房利钠肽的增加。但不激活肾素血管紧张素系统, 也不导致左心室收缩功能障碍^[10-12]。本模型适合研究高血压性心脏病, 由左室肥厚演变为 DHF 时的心肌力学特性, 病理变化以及分子机制。该方法造模成功率高, 时间短, 但手术相对较复杂, 且死亡率高。

1.4.2 腹主动脉缩窄法 (abdominal aortic constriction, AAC)

6 周龄雄性 Wistar 大鼠, 使用 18 G 针头和 6 - 0 丝线在双侧肾动脉分支上方约 0.5 cm 处进行缩窄, 结扎后拔出针头, 使腹主动脉狭窄约为 60%。术后 4 周, 大鼠出现心肌肥厚。缩窄 12 周后, 模型大鼠出现舒张性心力衰竭。该方法构建的模型具有很强的时间依赖性, 缩窄 4 周大鼠处于代偿性阶段, 属于高血压心室肥厚, 缩窄 8 周后逐渐处于失代偿阶段, 此时模型成功率高^[13,14]。此动物模型可模拟临床慢性充血性心力衰竭病理过程。

1.5 肺动脉缩窄法 (pulmonary artery banding, PAB)

主要原理是通过造成肺动脉狭窄, 导致右心室排血障碍, 右心室后负荷增加。出生 10 d 体重 (160 ± 33) g 的新西兰兔进行肺动脉缩窄, 将 20 G 的导管放在肺动脉上, 用 2 - 0 线结扎, 缩窄 10% ~ 25%。6 周后可出现明显的舒张性心力衰竭症状^[15]。

2 糖尿病致舒张性心力衰竭

糖尿病导致的舒张性心力衰竭多见于糖尿病心肌病的早期, 病变早期表现为单纯性的心肌细胞结构改变、室壁厚度、左室容积及左室重量增加, 左室僵硬度增加, 舒张功能下降; 随病程进展, 心肌细胞出现凋亡坏死肥大和纤维化加重, 心脏收缩舒张及射血功能出现明显障碍, 最终可发展为心肌缺血和心衰^[16]。

2.1 OLETF 肥胖大鼠 (Otsuka Long-Evans-Tokushima fatty rats, OLETF)

OLETF 是已经建成的一种自发性 2 型糖尿病大鼠, 同时还有非糖尿病的对照组 LETO 大鼠 (Long-Evans-Tokushima Otsuka rats, LETO)。在 29 ~ 35 周龄时, 可出现高胰岛素血症和胰岛素抵抗, LVESP、LV stiffness、DWS 和衰减常数 (τ) 等均发生改变, 但 LVEF > 50%, 形成舒张性心力衰竭^[17]。

2.2 db/db 小鼠

db/db 小鼠的瘦素受体 leptin receptor, Lepr 自

发性突变,表现为极度肥胖、多饮、多食、多尿,为广泛应用的 II 型糖尿病动物模型,基因背景影响表型的严重程度,在 C57BLKS/J 背景下最严重。11 周龄时, LVEF > 50%, 但 E/A 值[左室舒张早期快速充盈的充盈峰/舒张晚期(心房收缩)充盈的充盈峰]、tau 以及舒张末容积等指标均发生改变^[18]。

2.3 链脲佐菌素 STZ 诱导法

本方法又分为高糖高脂膳食并小剂量链脲佐菌素法和一次性大剂量链脲佐菌素诱导法。

2.3.1 高糖高脂膳食并小剂量链脲佐菌素(STZ)法

大鼠喂高糖高脂饲料 6 周后,按 30 mg/kg 剂量一次性腹腔注射 STZ,72 h 后尾静脉取血测空腹血糖,大于 7.77 mmol/L 者入选实验研究,继续喂养高糖高脂饲料 6 周至实验结束。在左室射血分数保留的情况下,出现明显的舒张功能异常(LVEDP、 $-dp/dt_{max}$ 升高),此外还出现收缩功能异常(LVESp、 $+dp/dt_{max}$ 值降低),并出现了心排出量(SV、CO)的明显降低^[19]。另有用 1 年龄恒河猴喂食高脂饮食 12 个月后,腹腔注射低剂量 STZ(25 mg/kg)两次,继续高脂饮食 24 个月后出现舒张性心力衰竭^[19-20]。因此本模型可用于糖尿病致舒张性心力衰竭的研究,缺点是成模周期较长。

2.3.2 一次性大剂量链脲佐菌素诱导法

SD 成年大鼠按 55 mg/kg 剂量一次性腹腔注射链脲佐菌素,注射后第 3 周可出现稳定的糖尿病心肌病状态^[21]。另有用雄性 C57BL/6J 小鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素,可出现稳定的糖尿病心肌病状态^[22]。这是一种可靠且实用性强的糖尿病心肌病动物模型的制备方法。

3 缺血致舒张性心力衰竭

缺血已被证实是导致舒张功能不全的原因之一。急性缺血时,心脏迅速发生炎症、心室松弛、水肿、及纤维化改变,当与心肌肥大和代谢紊乱同时发生时,可引起舒张功能不全,可突发导致 DHF。而慢性缺血主要引起心肌纤维化以及瘢痕组织增加,导致 LV stiffness 增加,引起舒张功能下降^[23]。

冠状动脉结扎法^[24,25]:使用体重 250 g 左右的雄性 SD 大鼠,置肺动脉圆锥和左心耳间,距主动脉根部约 3 mm,用 5-0 号无创伤性丝线结扎左冠状动脉主干。术后第 2 周开始,LVEF 下降至 65% 左右,但 FS、E/A 值、LVIDd 和 LVIDs 都发生改变($P < 0.05$),直到第 6 周 $+dp/dt_{max}$ 、 $-dp/dt_{min}$ 、LVEDP、

LVESP、平均动脉压(MAP)、舒张压(DBP)和收缩压(SBP)等都发生改变($P < 0.05$),但 LVEF 仍然大于 50%^[26]。该模型表现的症状和神经内分泌系统的激活方式与心衰病理过程相似,能很好地模拟心肌梗死后心力衰竭的急性期和代偿期两个病理阶段。此外,还有一些造模方式如单级、双极电凝法,冠状动脉栓塞法,冠状动脉血栓形成法等,这些造模方式不同,但原理与冠状动脉结扎法相似。

4 其他

血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)致舒张性心力衰竭:将 Ang II 按 0.2 mg/(kg·d)剂量渗透泵接种在 8 周龄雄性小鼠皮下 4 周,左室舒张功能如:EMI、DWS、LVEDP、左室等容舒张时间和左室等容舒张时间常数都发生明显改变,但 LVM、LVIDd、LVIDs 和 LVEF 均未发生改变。这种造模方式在不增加系统动脉血压的情况下,制作 DHF 表型,这种模型可能为研究 DHF 机制提供了新方向^[27]。

5 小结与展望

随着 DHF 发病率的升高,对其基础机制的研究也逐渐受到重视,而选择合适的动物模型是深入研究的重要前提。在具体机制不明确的情况下,从临床流行病学调查得到的引发舒张性心力衰竭的可能诱因入手,来制备动物模型,会更加真实的模拟人类舒张性心力衰竭的发病机制。DHF 诱因很多,病程进展处于不同阶段,心功能、神经内分泌、血流动力学以及组织形态学改变都不同,因此单一的动物模型不能模仿所有阶段的发展变化,需要综合利用不同模型的特点来研究 DHF 的整体变化。

对于不同特点的动物模型,可以根据各自课题的研究方向进行选择。比如研究方向是糖尿病心肌病,就可以选择 OLETF 肥胖大鼠、db/db 小鼠和链脲佐菌素(STZ)诱导法等模型;如研究方向是高血压诱导压力超负荷致 DHF,则可以选择 Dahl-盐负荷法、醋酸脱氧皮质酮/西方饮食法、自发性高血压大鼠、主动脉缩窄法和肺动脉缩窄法诱导的模型;若研究心肌梗死方向,则可以选择冠状动脉结扎、电凝等诱导的模型。总之,手术方法所致的心衰模型较为符合临床实际,可操作性强,个体间差异小,值得推广应用;而药物或饮食诱导的模型个体间差异比较大,并且成模时间不稳定。另外,根据心衰的发病机制,DHF 模型随着病程进展,最终均会发展为心衰,并且由于制备模型的条件有所不同,DHF 出现的时间点会有差异,所以在模型制备后随时检测心

功能的改变十分必要。

参 考 文 献

- [1] Butler J, Fonarow GC, Zile MR, et al. Developing therapies for heart failure with preserved ejection fraction [J]. *JACC: Heart Failure*, 2014, 2(2): 97–112.
- [2] Yancy CW, 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]. *Am Coll Cardiol*. 2013, (62): 147–239. *Circulation*, 2013, 128: e240–e327
- [3] Cheng S, Xanthakis V, Sullivan LM, et al. Correlates of echocardiographic indices of cardiac remodeling over the adult life course; longitudinal observations from the Framingham Heart Study [J]. *Circulation*. 2010, 122(6): 570–578.
- [4] Doi R, Masuyama T, Yamamoto K, et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure; systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats [J]. *J Hypertens*, 2000, 18(1): 111–20.
- [5] Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y, et al. Ca^{2+} entry mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33: 1408–1416.
- [6] Takeda Y, Sakata Y, Higashimori M, et al. Noninvasive assessment of wall distensibility with the evaluation of diastolic epicardial movement [J]. *J Cardiac Fail*, 2009, 15(1): 68–77.
- [7] Schwarzl M, Hamdani N, Seiler S, et al. A porcine model of hypertensive cardiomyopathy: implications for heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(9): 1407–1418.
- [8] Gómez-Garre Dulcenombre, González-Rubio Ma Luisa, Muñoz-Pacheco Paloma, et al. Rosuvastatin added to standard heart failure therapy improves cardiac remodeling in heart failure rats with preserved ejection fraction [J]. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12: 903–912.
- [9] Wahlquist C, Jeong D, Rojas-Muñoz A, et al. Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart [J]. *Nature*, 2014, 508 (7497): 531–535.
- [10] Sheng JJ, Feng HZ, Pinto JR, et al. Increases of desmin and α -actinin in mouse cardiac myofibrils as a response to diastolic dysfunction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 99: 218–229. pii: S0022–2828(15)30104–8. doi:10.1016
- [11] Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, et al. SIRT3-AMP-activated protein kinase activation by nitrite and metformin improves hyperglycemia and normalizes pulmonary hypertension associated with heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Circulation*, 2016, 133: 717–731.
- [12] 孙艳侠, 王国干. 心力衰竭动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(7): 73–78.
- [13] 杨泉, 王瑞芳, 何昆仑, 等. 舒张性心力衰竭大鼠循环及组织交感活性与肾胺酶的相关性研究 [J]. *中国心血管杂志*, 2014, 19(5): 372–375.
- [14] 梁逸强, 潘朝铤, 何新兵, 等. 压力超负荷致心力衰竭动物模型的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(1): 76–78.
- [15] Kitahori K, He HM, Kawata M, et al. Development of left ventricular diastolic dysfunction with preservation of ejection fraction during progression of infant right ventricular hypertrophy [J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2(6): 599–607.
- [16] Mátyás C, Németh BT, Oláh A, et al. Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 19. doi: 10.1002/ejhf.711
- [17] Kouzu H, Miki T, Tanno M, et al. Excessive degradation of adenosine nucleotides by up-regulated AMP deaminase underlies afterload-induced diastolic dysfunction in the type2 diabetic heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 80: 136–145.
- [18] Reil JC, Hohl M, Reil GH, et al. Heart rate reduction by If-inhibition improves vascular stiffness and left ventricular systolic and diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34: 2839–2849.
- [19] 董世芬, 洪纓, 孙建宁, 等. 实验性糖尿病心肌病大鼠模型建立及心脏功能和结构相关性分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(6): 457–462.
- [20] Li LZ, Liao GN, Yang G, et al. High-fat diet combined with low-dose streptozotocin injections induces metabolic syndrome in Macaca mulatta [J]. *Endocrine*, 2015, 49(3): 659–668.
- [21] 张春虹, 臧伟进, 徐静, 等. 建立糖尿病心肌病动物模型方法的实验研究 [J]. *卫生研究*, 2006, 35(6): 707–711.
- [22] Suematsu Y, Miura SI, Goto M, et al. LCZ696, an angiotensin receptor-neprilysin inhibitor, improves cardiac function with the attenuation of fibrosis in heart failure with reduced ejection fraction in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Eur J Heart Fail*, 2016, 18(4): 386–393.
- [23] Martos R, Baugh J, Ledwidge M, et al. Diastolic heart failure: evidence of increased myocardial collagen turnover linked to diastolic dysfunction [J]. *Circulation*, 2007, 115(7): 888–895.
- [24] Moey M, Gan XT, Huang CX, et al. Ginseng reverses established cardiomyocyte hypertrophy and postmyocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure [J]. *Circ Heart Fail*, 2012, 5: 504–514.
- [25] Kemi OJ, MacQuaide N, Hoydal MA, et al. Exercise training corrects control of spontaneous calcium waves in hearts from myocardial infarction heart failure rats [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(1): 20–26.
- [26] Gan XT, Ettinger G, Huang CX, et al. Probiotic administration attenuates myocardial hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat [J]. *Circ Heart Fail*, 2014, 7: 491–499.
- [27] Regan J, Mauro AG, Carbone S, et al. A mouse model of heart failure with preserved ejection fraction due to chronic infusion of a low subpressor dose of angiotensin II [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309: H771–H778.

[收稿日期] 2016–09–06