

心肌肥厚模型建立方法的研究进展

赵祎镞*, 李丹露(哈尔滨医科大学附属第一医院药学部, 哈尔滨 150001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)05-0473-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.05.30

摘要 目的:归纳总结心肌肥厚模型的建立方法。方法:以“心肌肥厚”等为关键词,查阅1991年1月至2013年3月中国知网和PubMed数据库中关于心肌肥厚模型的相关文献,根据诱发心肌肥厚的不同因素,分别从细胞水平和动物水平对建立心肌肥厚模型的方法及评价指标和方法进行综述。结果与结论:建立心肌细胞肥大模型的方法多数是通过分离并培养Wistar/SD大鼠的乳鼠心室肌细胞,并在此基础上给予不同药物刺激来诱导细胞肥大;建立动物心肌肥厚模型的方法有皮下或静脉注射肾上腺素类药物和手术两种。细胞水平建模的方法具有细胞专属性,能够排除成纤维细胞的影响;药物诱导动物心肌肥厚模型操作简单,能够模拟肾上腺素分泌量增加导致心肌肥厚的病理过程;手术主要是通过缓慢的病理变化模拟心肌肥厚,更接近真实病理过程。评价心肌肥厚模型建立方法的指标主要有全心质量指数和左心室质量指数,评价方法有心脏超声、免疫组化及Marker蛋白分析法。选择适宜的建模方法并进行正确评价,可为药物干预心肌肥厚疾病的基础研究提供科学的依据。

关键词 心肌肥厚;动物模型;建立方法;细胞肥大;研究进展

心肌肥厚过程中伴随着心脏结构和功能的改变,其病理变化以室间隔与室后壁中部肥厚最常见,也称之为非对称性肥厚。患者长期处于此病理状态可导致心力衰竭甚至猝死^[1-2]。心肌肥厚在普通人群中的发病率是0.2%,男女性别比例为2:1,患者的平均年龄为40岁左右,是40岁以下患者主要的死亡原因之一^[3]。因此,预防并及时治疗心肌肥厚成为人们日益关心和逐渐深入研究的热点。

为了进一步明确心肌肥厚的发病机制和作用途径,国内外的研究学者分析各种心肌肥厚患者的发病原因,不断建立和验证不同的心肌肥厚模型。目前,关于模型的研究领域主要集中在从动物和心肌细胞水平模拟心肌肥厚的发生发展过程。通过适宜的心肌肥厚模型,评价不同药物的治疗效果,可为临床上治疗心肌肥厚奠定基础。因此,笔者以“心肌肥厚”等为关键词,查阅1991年1月至2013年3月中国知网和PubMed数据库中关于心肌肥厚模型的相关文献,首次归纳总结了目前广泛采用的建立心肌肥厚模型的方法,同时分析了不同建模方法的特点,不仅为试验中适宜建模方法的选择与评价奠定了基础,还为药物干预肥厚疾病的基础研究提供了科学的建模依据。

1 导致心肌肥厚的因素^[4-5]

主要因素是机械刺激导致心肌肥厚。血流动力学超负荷,压力/容量超负荷均造成心室壁张力增加,从而引起心肌细胞肥大^[6]。同时血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)可以通过血管紧张素受体1(AT1)使信号转导激活因子(STAT3)活化,参与调节核中转录因子的表达,从而刺激心肌细胞肥大^[7]。儿茶酚胺类物质中异丙肾上腺素(ISO)和去甲肾上腺素(NA)能够分别激动β受体和α1肾上腺能受体,导致促进原癌基因表达和心肌细胞肥大。研究表明,内皮素1(ET-1)可以通过激活促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)诱导心肌细胞肥大;前列腺F2α(PGF2α)也能启动下游蛋白激酶C(PKC)与肌醇三磷酸(IP3)信号分子,促进心肌细胞肥大的发生^[8]。此外,缺血、缺氧以及各种炎症因子均可导致心肌细胞的应激反应,从而导致心肌肥厚。

2 建立体外、体内心肌肥厚模型的方法

目前的肥厚模型主要分成两种:一种是通过动物模型模拟稳定的代偿性肥厚发展到心肌功能衰竭和心室扩张的过程;另一种是在细胞水平模拟肥大过程,以此明确人类心肌肥

厚的调控机制,为更好地缓解或治疗心肌肥厚奠定基础。

2.1 诱导心肌细胞肥大的方法

目前,体外建立心肌细胞肥大的模型多数是通过分离并培养Wistar/SD大鼠的乳鼠心室肌细胞,在此基础上给予不同药物刺激达到诱导细胞肥大的目的。例如,通过ISO诱导心肌细胞48h,显微镜下观察心肌细胞外观状态改变,主要表现在心肌细胞面积明显增加,心房利钠肽(ANP)、脑利钠肽(BNP)、β-肌球蛋白(β-MHC)等肥大相关基因的表达增加,其变化趋势与肥厚心脏组织中的改变类似^[9-10]。此外苯丙肾上腺素(PE)和AngⅡ都可以刺激心肌细胞增大,模拟诱导心肌细胞肥大^[11-13]。Pan ZW等^[14]采用50 μmol/L PE孵育心肌细胞48h后,经免疫荧光观察与统计学分析,肥大细胞面积增加至对照组的1.3倍。Wang S等^[15]证明0.1 μmol/L AngⅡ能够诱导心肌细胞肥大,主要的肥厚Marker蛋白表达显著增加。上述试验证明,细胞水平上给予ISO、PE和AngⅡ均能诱导心肌细胞肥大,此方法具有细胞专属性,能够排除成纤维细胞的影响,成功地模拟心肌细胞的肥大过程。

2.2 动物心肌肥厚模型的建立方法

尽管体外可以模拟心肌肥大过程,但是细胞水平不能完全替代动物水平研究,不是所有的体外试验结论在活体动物中都能得到重复验证。因此,许多研究者开始探索建立动物心肌肥厚模型。根据导致心肌肥厚的不同诱因,目前建立动物心肌肥厚模型的方法有两种:第一种是皮下或静脉注射肾上腺素类药物;第二种是通过手术建立心肌肥厚模型。

2.2.1 药物诱导。该方法主要是采取每天注射ISO、AngⅡ、PE等肾上腺素药物的方式。胡河等^[16]通过对新西兰大耳兔的耳缘静脉连续注射0.3 mg/(kg·d)的ISO 7 d,解剖心脏后测得大耳兔左心室质量和心室壁厚度明显增加,结果表明心肌肥厚模型成功建立。但是这种给药方式存在局限性,即不能完全地模拟生理分泌肾上腺素的过程。在试验操作过程中,剂量过大可能导致动物的死亡,剂量过小则不能成功地建立肥厚模型。为了提高实验动物的生存率,以及尽可能模拟体内病理过程,如今多选择皮下埋泵方式,即药物通过缓释泵平稳注入动物体内。此方法不仅提高动物的成模率^[17],还降低了动物死亡率^[17-18]。Takeshita D等^[19]利用埋泵给药的方式考察不同剂量的ISO对心肌肥厚的影响。Sun B等^[20]皮下埋泵给予AngⅡ,7 d后建立病理性心肌肥厚,肥厚组织中骨形态发生蛋白4(BMP4)的蛋白表达量显著增加,研究表明BMP4的异常表达易导致心肌细胞凋亡、间质纤维化等现象。此外,AngⅡ

* 主管药师,博士。研究方向:临床药理学、医院药学、药物制剂。电话:0451-85553804。E-mail: zhaoyilci@yahoo.cn

[1.4 mg/(kg·d), 皮下埋泵]连续给药8周,能使 C57BL/6J 和 Balb/c 小鼠的心脏、肺脏以及肝脏质量明显增加,并伴随着间质纤维化,其中 Balb/c 小鼠表现为扩张型心肌病^[21]。综上所述,药物诱导动物心肌肥厚的模型具有操作简单的优势,能够模拟肾上腺素分泌量增加导致心肌肥厚的病理过程。

2.2.2 手术建立。随着压力负荷的不断增大,高血压和主动脉狭窄的患者出现心肌肥厚现象^[10]。模拟上述情况建立了手术模型,其中胸主动脉缩窄法的使用率较高,这种方法能够模拟血管狭窄导致的血压升高,以及血压长期升高引起的心室壁厚度的增加^[22-24]。胸主动脉缩窄法的操作步骤如下:对实验动物实施腹腔麻醉,气管插管后联通呼吸机;随后沿胸骨中线开胸并剥离暴露出胸主动脉,将 26 Gauge 针头平行于主动脉弓放置,选择 7~0 号线进行结扎;最后抽出针头,逐层缝合胸骨与皮肤,术后肌肉注射 2 d 青霉素钠预防感染。大量研究表明,小鼠经胸主动脉结扎缩窄 2~4 周后,小鼠心脏质量明显增加,经苏木精-伊红(HE)染色观察心肌细胞面积明显增加,在 mRNA 和蛋白水平上都能检测到 ANP、BNP、 β -MHC 等肥厚 Marker 指标的表达增加^[25-26]。胸主动脉缩窄法能够模拟心肌肥厚,当小鼠动脉结扎超过 8 周,心脏射血分数将显著降低,呈现心力衰竭的状态。

除了结扎胸主动脉,国内外研究人员还采用腹主动脉缩窄法建立心肌肥厚模型。该方法需要翻转并移动腹腔内脏器官,暴露腹主动脉,手术具有一定难度。与胸主动脉缩窄法比较,虽然可以降低开胸操作造成的损伤,但是此手术对动物内脏肠胃的牵拉较强,某种程度上影响了建模的成功率。术后 2 周,大鼠体重质量明显增加,压力测定显示心率和压力显著升高($P<0.01$)。通过病理学观察,大鼠结扎 4 周后细胞核变大、细胞排列混乱,呈现肥大状态^[27-28]。研究表明,缩窄血管的方法主要是经过缓慢的病理变化模拟心肌肥厚,更接近肥厚疾病的真实病理进程。

此外,结扎肾动脉血管也可以造成血压的升高,模拟由肾性高血压诱发的心肌肥厚过程^[12]。根据临床上容量超负荷引起心肌肥厚的原理,对大鼠动静脉进行造瘘,造瘘后由于动脉血流入下腔静脉,使得心脏回心血量增加,进而心脏容量负荷增加,最终导致心肌肥厚。手术操作主要是用血管夹阻断下腔静脉的血流,然后用针头刺穿静脉壁、静-动脉联合壁,退出针头后缝合静脉壁的伤口,松开血管夹,下腔静脉变红则表明造瘘成功。

3 各种肥厚模型建立方法的比较

大量试验证明,体外、体内均能成功地建立心肌肥厚模型。上述心肌肥厚模型分别存在着优点和局限性,其中动物水平模型可以通过增加压力负荷刺激心室壁增厚,并且伴随着心脏功能的改变;而细胞水平肥大模型是以心肌细胞为载体研究肥厚的作用机制以及药物干预细胞肥大的调控通路。心肌肥厚模型建立方法的特点分析见图 1。

综上所述,需要根据试验研究的不同侧重点,选择适宜的建模方法。

4 心肌肥厚模型建立方法的评价

针对不同的建立心肌肥厚模型的方法,通常选择适宜的指标进行评价。目前,广泛认可的评价指标包括:观察动物心脏、左心室质量的变化情况,计算不同建模方法的质量指数;心脏超声检查分析心脏结构的改变情况;通过免疫染色分析细胞面积的改变;测定心肌肥厚过程中 Marker 基因的 mRNA 及蛋白水平的变化。评价的具体方法如下。

4.1 全心质量指数和左心室质量指数

在动物心肌肥厚模型中,随着建模时间的延长,动物心脏

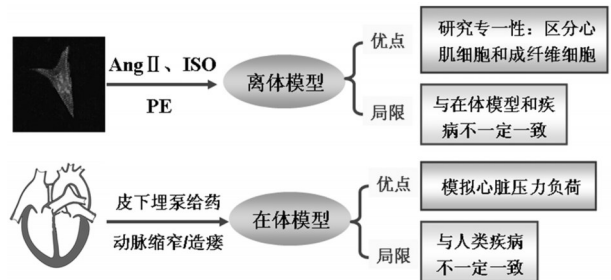


图 1 心肌肥厚模型建立方法的特点分析

的质量会逐渐增加,而且以左心室质量的变化为主。通常以动物的全心质量指数(Heart weight/body weight, HW/BW)和左心室质量指数(Left ventricular weight/heart weight, LVW/HW)作为标准评价心肌肥厚模型。根据建立心肌肥厚模型的不同方法,全心质量指数和左心室质量指数的平均增加比例在 15%~40%^[24-26]。

4.2 心脏超声检查

评价动物心肌肥厚模型时,需要对各组的心脏功能及形态结构进行心脏彩超检查。分别测定小鼠的心率、射血分数、短轴收缩分数、左室后壁厚度、室间隔期厚度的变化。如果模型动物的心室后壁、室间隔厚度明显增加,则证明此方法能够成功地建立肥厚模型。

4.3 免疫组化分析

选取典型的心脏置于多聚甲醛中固定,组织切片经苏木精和 HE 染色观察各组细胞面积与排列的变化。结果表明,HE 染色后观察到细胞面积明显增加、排列紊乱,表明建模方法适宜。

4.4 心肌肥厚 Marker 蛋白的分析

ANP 是一种参与调节血压的肽类激素,具有强大的利尿活性。BNP 主要来源于心室,其结构与功能与 ANP 类似。当心室压力明显增加时,可以检测到血浆中 BNP 也显著升高。目前许多国家都推荐使用 BNP 作为评价心血管疾病的重要检测指标之一^[29-31]。另有研究表明, β -MHC 基因的表达参与心脏发育、压力负荷、心肌肥厚等过程,在左心室压力增加的时候,能够刺激 β -MHC 基因再次表达^[32-33]。目前,ANP、BNP 和 β -MHC 是公认的心肌肥厚过程中的 Marker 蛋白,因此可依据上述 3 种基因在 mRNA 或者蛋白水平的改变来评价心肌肥厚模型的建立效果。

5 结语

根据目前国内外的文献报道,本文总结了建立心肌肥厚模型的方法,即胸/腹主动脉缩窄法、静脉造瘘法、皮下注射肾上腺素能药物、药物诱导心肌细胞等方法。其中主动脉缩窄建立肥厚模型的方法能够模拟临床上动脉瓣狭窄及肾性高血压患者伴随的心肌肥厚疾病,而体外 ISO 等药物诱导细胞肥大的模型则是模拟体内肾上腺素类物质异常分泌引起的心肌肥厚。上述建模方法都是经典的且被国内外研究者广泛认可的。研究表明,只有接近临床肥厚患者实际患病过程的模型,才具有更高的研究价值,在此基础上才能深入发现心肌肥厚疾病的发生发展机制,最终为减少和改善心肌肥厚及相关治疗药物的研发和应用奠定科学的理论基础。

参考文献

- [1] Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies[J]. *Pharmacology Therapeutics*. 2010, 128(1):191.
- [2] 戴文建,王以光.心肌肥厚分子机制研究进展[J].*心血管*

- 病理学进展,2009,30(1):47.
- [3] 吴平生.肥厚型心肌病流行病学及分子遗传学特点[C].北京:第5届国际心血管热点论坛:心脏交叉论坛,2013.
- [4] 王迪浚.病理生理学[M].北京:人民卫生出版社,1994:469.
- [5] 张军.心肌细胞肥大病理生理研究进展[J].中国社区医师,2011,13(15):9.
- [6] Pluim BM, Zwinderman AH, Vander LA, *et al.* The athlete's heart: a meta-analysis of cardiac structure and function[J]. *Circulation*,2000,101(3):336.
- [7] Kodama H, Fukuda K, Pan J, *et al.* Leukemia inhibitory factor, a potent cardiac hypertrophic cytokine, activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes[J]. *Circ Res*,1997,81(5):656.
- [8] Molkentin JD, Dorn IG. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy[J]. *Annu Rev Physiol*,2001,63:391.
- [9] Backs J, Olson EN. Control of cardiac growth by histone acetylation deacetylation[J]. *Circ Res*,2006,98(1):15.
- [10] 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.
- [11] Van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets[J]. *J Clin Invest*,2007,117(9):2369.
- [12] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1026-1030.
- [13] Freund C, Schmidt-Ullrich R, Baurand A, *et al.* Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II -and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo[J]. *Circulation*,2005,111(18):2319.
- [14] Pan ZW, Zhang Y, Mei DH, *et al.* Scutellarin exerts its anti-hypertrophic effects via suppressing the Ca²⁺-mediated calcineurin and CaMK II signaling pathways[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*,2010,381(2):137.
- [15] Wang S, Han HM, Pan ZW, *et al.* Choline inhibits angiotensin II -induced cardiac hypertrophy by intracellular calcium signal and p38 MAPK pathway[J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*,2012,385(8):823.
- [16] 胡河,秦牧,刘韬,等.异丙肾上腺素致兔心肌肥厚模型的在体心脏电生理研究[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2012,26(2):149.
- [17] Leenen FH, White R, Yuan B. Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2001,281(6):H2410.
- [18] Kitagawa Y, Yamashita D, Ito H, *et al.* Reversible effects of isoproterenol-induced hypertrophy on in situ left ventricular function in rat hearts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2004,287(1):H277.
- [19] Takeshita D, Shimizu J, Kitagawa Y, *et al.* Isoproterenol-induced hypertrophied rat hearts: does short-term treatment correspond to long-term treatment? [J]. *J Physiol Sci*,2008,58(3):179.
- [20] Sun B, Huo R, Sheng Y, *et al.* Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*,2013,61(2):352.
- [21] Peng HM, Yang XP, Carretero OA, *et al.* Angiotensin II -induced dilated cardiomyopathy in Balb/c but not C57BL/6J mice[J]. *Exp Physiol*,2011,96(8):756.
- [22] Berry JM, Naseem RH, Rothermel BA, *et al.* Models of cardiac hypertrophy and transition to heart failure[J]. *Drug Discovery Today: Disease Models*,2007,4(4):197.
- [23] Zhong M, Alonso CE, Taegtmeyer H, *et al.* Quantitative PET imaging detects early metabolic remodeling in a mouse model of pressure-overload left ventricular hypertrophy in vivo[J]. *J Nucl Med*,2013,54(4):609.
- [24] Westphal C, Schubert C, Prella K, *et al.* Effects of estrogen, an ER α agonist and raloxifene on pressure overload induced cardiac hypertrophy[J]. *PLoS One*,2012,7(12):e50802.
- [25] Dong DL, Chen C, Huo R, *et al.* Reciprocal repression between microRNA-133 and calcineurin regulates cardiac hypertrophy. A novel mechanism for progressive cardiac hypertrophy[J]. *Hypertension*,2010,55(4):946.
- [26] Zhao YL, Wang C, Wu JW, *et al.* Choline protects against cardiac hypertrophy induced by increased after-load [J]. *Int J Biol Sci*,2013,9(3):295.
- [27] 王彦珍,孙胜,蔡莉蓉,等.大鼠腹主动脉狭窄高血压心肌肥厚模型的优化[J].军医进修学院学报,2004,25(3):231.
- [28] 张淑华,葛郁芝,冯莉莉,等.腹主动脉部分缩窄术建立大鼠心肌肥厚模型[J].江西医药,2008,43(10):1035.
- [29] Gravning J, Ahmed MS, Edvardsen T, *et al.* CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload[J]. *Int J Cardiol*,2013,168(13):224.
- [30] Yang J, Zhu HH, Chen GP, *et al.* Inhibition of farnesyl pyrophosphate synthase attenuates angiotensin II -induced cardiac hypertrophy and fibrosis in vivo[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2013,45(3):657.
- [31] Althurwi HN, Tse MM, Abdelhamid G, *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibitor, tups, protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy[J]. *Br J Pharmacol*,2013,168(8):1794.
- [32] Wang J, Xu J, Wang Q, *et al.* Reduced cardiac fructose 2,6 bisphosphate increases hypertrophy and decreases glycolysis following aortic constriction[J]. *PLoS One*,2013,8(1):e53951.
- [33] Di Domenico M, Casadonte R, Ricci P, *et al.* Cardiac and skeletal muscle expression of mutant β -myosin heavy chains, degree of functional impairment and phenotypic heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Cell Physiol*,2012,227(10):3471.

(收稿日期:2013-04-16 修回日期:2013-05-27)