



创伤较小的小鼠主动脉弓缩窄术的建立

廉洪建, 冯玄超, 啜文静, 薛晓兴, 王伟, 郭淑贞

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

【摘要】 目的 探索一种对小鼠创伤较小的主动脉弓缩窄术的手术方法。**方法** 32 只雄性昆明(KM)小鼠, 随机分为假手术 10 只及模型(主动脉弓缩窄术)组 22 只;模型组动物麻醉后仰卧位固定,行气管插管接通呼吸机。右侧卧位重新固定,左侧第二肋间开胸,分离主动脉弓并用 5-0 真丝编织线将其套扎在 26G 注射器针头行缩窄操作,缩窄后退出针头,关胸。假手术组动物同期行开胸,而不进行缩窄操作,其余操作步骤与模型组相同。造模期间及造模后 4 周记录动物死亡情况;于术后 4 周对两组小鼠行心脏超声及心脏病理学检测。**结果** ①模型组总死亡率约为 32%。②超声心动图结果:模型组主动脉弓缩窄处血流速率均大于 2 400 mm/s;假手术组主动脉弓缩窄处血流速率均小于 900 mm/s。与假手术组比较,模型组左室收缩末期内径(LVSD)、左心室收缩期容积(LVSV)、左心室重量(LV mass, LVM)、左心室重量指数(LV mass index, LVMI)明显增加($P < 0.05$);射血分数(EF)、左心室缩短分数(FS)显著降低($P < 0.05$)。③病理切片可见血管扩张及血管壁增厚表现。**结论** 本造模方法能够成功增加心脏后负荷,诱导后负荷增加所致的心肌肥厚病理生理过程。与国内报道较多的劈开胸骨的造模方法相比,该造模方法对模型动物的损伤更小,在与心肌肥厚病理生理机制及相关药效研究中具有很大的应用价值。

【关键词】 主动脉弓缩窄;左室肥厚;压力超负荷;小鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 02-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.002.011

Establishment of a mouse model of transverse aortic constriction with less invasive injury

LIAN Hong-jian, FENG Xuan-chao, CHUO Wen-jing, XUE Xiao-xing, WANG Wei, GUO Shu-zhen
(School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To explore a method of establishment of a mouse model of transverse aortic constriction (TAC) with less invasive injury. **Methods** Thirty-two male KM mice were randomly divided into two groups: sham-operation (SH) group ($n = 10$) and transverse aortic constriction (TAC) group ($n = 22$). Mice of the TAC group were placed in a supine position under anesthesia. The endotracheal intubation tube was then connected on a rodent ventilator. After that, the mice were replaced in the right lateral decubitus position. Thoracotomy was performed to the second rib and to separate the transverse aorta. A 26G blunt needle was inserted into the transverse aorta, and a small piece of 5-0 silk thread was used to tightly ligate the needle inserted in the transverse aorta. The same operation was performed on the mice of sham group, except for the ligation of the transverse aorta. Then the open chest was closed and the skin was sutured. The death of mice during and post operation was recorded. Echocardiographic assessments, heart weight and histological examination of the myocardium were performed at 4 weeks after surgery. **Results** ① The total death rate of TAC modeling

[基金项目] 国家自然科学基金(81102829);教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-13-0692)。

[作者简介] 廉洪建(1986-),男,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治心血管疾病的应用基础研究。

[通讯作者] 王伟,男,博士,教授,博士生导师;郭淑贞,女,副教授,硕士生导师,E-mail: ss3008@126.com。

was 32%. ②The blood flow velocities of the ligation of transverse aorta were all above 2400 mm/s in the TAC group, but all below 900 mm/s in the SH group. Compared with that in the sham operation group, the LVSD, LVDV, LVM, and LVMI were significantly increased ($P < 0.05$), and the EF and FS were significantly decreased in the TAC group ($P < 0.05$). ③Histopathological examination showed vascular dilation and thickening of the blood vessel wall. **Conclusions** The method of establishing a mouse model of transverse aortic constriction can successfully induce pressure overload, resulting in myocardial hypertrophy and heart failure. Compared with the widely reported literature in our country, this method does not need to split the sternum and causes less invasive injury. Therefore, it may have good application value in myocardial hypertrophy-related pathophysiological and pharmacodynamics studies.

[Key words] Transverse aortic constriction; Left ventricular hypertrophy; Pressure overload; Heart; Mice

主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)所致的压力超负荷所致的心肌肥厚模型是一种较为常用的研究心肌肥厚病理生理过程的动物模型^[1],其常用于心血管相关药物、分子生物学研究^[2]。由于转基因技术的发展,采用小鼠作为实验动物研究心血管疾病逐渐得到更多的运用,所以小鼠主动脉弓缩窄术具有特别的意义。但由于小鼠血管细小且位置较深,手术操作难度大且容易引起出血导致死亡。国内关于小鼠主动脉弓缩窄术方法文献较少,其中多以前正中中线劈开胸骨后开胸的操作方法常见^[3,4]。这种手术操作方法对实验动物创伤较大。本研究介绍一种无需劈开胸骨进行主动脉弓缩窄的手术方法,并通过对能够反映心功能的超声指标的检测,以验证该造模方法的可靠性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组:4 周龄 SPF 级雄性昆明(KM)小鼠 32 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[生产许可证号:SCXK(京)2012-0001];随机分为假手术 10 只及主动脉弓缩窄术组 22 只,并于术后观察 4 周。实验动物使用许可证号:SYXK(京)2011-0024。

1.1.2 主要仪器:小动物呼吸机(SAR-1000 ventilator 美国)、鹅颈冷光源、小鼠外科显微手术器械、Vevo2100 超声仪(Visual Sonics 加拿大)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的制备:

1.2.1.1 称重与麻醉:雄性昆明(KM)小鼠(25 g ~ 30 g)称重,经戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉。

1.2.1.2 固定、气管插管和机械通气:麻醉后,用 PE 胶带将小鼠四肢仰卧位粘固于自制小鼠板上,门齿用细线固定以保持气道通畅。将固定小鼠的鼠

板水平置于桌面上,颈部放置冷光源鹅颈灯照明;用压舌板轻轻将舌牵引至口腔外,随后将压舌板抵住舌根轻柔向上提,可见冷光源照射下的咽部有明显的圆形亮点即为气管开口;将自制气管插管(22G 静脉套管针外鞘作为气管插管)缓缓插入气管,随后接通呼吸机即可;呼吸频率 90 ~ 100 次/min,潮气量 0.3 ~ 0.4 mL。(气管插管成功时,小鼠胸廓呼吸频率与呼吸机频率相同,腹部无异常起伏。)成功操作气管插管后,将小鼠重新固定为右侧卧位,小鼠左侧上肢方向指向头部方向固定,以求充分暴露胸廓。

1.2.1.3 开胸:胸廓碘伏消毒,于小鼠左侧第二肋间隙逐层开胸,开胸切口大小约为 7 mm;用自制拉钩固定切口并充分暴露胸腔内的心、肺、胸腺、脂肪等组织;分离胸腺与脂肪以暴露主动脉弓;用尖部磨制较细的无齿弯镊沿胸腺与脂肪间轻轻分离,逐渐显露隐藏在胸腺与脂肪后的主动脉弓(该过程需轻柔、缓慢),以便充分暴露无名动脉与左侧颈总动脉的分叉处,右手持经弯镊改制的钩状弯镊从无名动脉与左侧颈总动脉的分叉处对侧轻轻探入,包绕过主动脉弓后壁,从无名动脉与左侧颈总动脉的分叉处探出并夹持 5-0 真丝编织线,随后将夹持 5-0 真丝编织线的钩状弯镊提出使得丝线包绕过主动脉弓;将自制的“L”形 26G 垫扎针置于主动脉弓垂直上方,随后夹持真丝编织线的两端捆扎在该垫扎针上,打结后将垫扎针轻轻退出,剪断结旁多余线头,完成主动脉弓缩窄。假手术组动物仅行开胸操作,而不进行缩窄操作,其余操作步骤与模型组相同。

1.2.1.4 关胸:用 4-0 带线缝合针逐层关胸、缝皮。切口消毒。

1.2.1.5 脱离呼吸机:缝合后,进行试验性脱离呼吸机而保留气管插管。若脱机后小鼠呼吸平稳正常,则可以完全脱机;若小鼠呼吸缓慢,可以适当延

长脱机时间。

1.2.1.6 术后处理及日常记录:术后防止小鼠体温过低要将小鼠置于电热毯上,待其苏醒后放入饲养笼中并给与饮水。记录术中及术后两组动物的死亡数量,同时解剖并记录死亡原因。

1.2.2 超声心功能评价方法及观察指标:使用 Vevo2100 超声仪(Veeco 加拿大)及配置的相应探头(MS-400 型号),中心频率 30MHz,标准帧频 449fps,于术后 4 周行心脏超声检查。胸部褪毛,异氟烷呼吸麻醉,仰卧位。于主动脉弓切面行彩色多普勒获得其血流图像;于左胸骨旁短轴切面,左心长轴切面获得左室 M 型超声心动图和左心室二维图像。长轴及短轴切面下,每一测量点记录 10 个心动周期;获得左室收缩末期内径(LVIDs)、左室舒张末期内径(LVIDd)、左室后壁收缩期厚度(LVPWs)、左室后壁舒张期厚度(LVPWd)、左室前壁舒张末期厚度(LVAWd)、左室前壁收缩末期厚度(LVAWs)、计算左室短轴缩短率(FS%)、左心室射血分数(LV ejection fraction, EF%)、左心室舒张期容积(LVDV)、左心室收缩期容积(LVSV)、左心室心肌质量(LV mass)、左心室重量(LV mass, LVM)、左心室重量指数(LV mass index, LVMI)。

1.2.3 病理组织学检测:将心脏沿水平切面切取上下两部分,下部分组织经多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察。

1.2.4 统计学方法:计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 20.0 统计软件包,两组间采用独立样本 t 检验比较分析。

2 结果

2.1 TAC 小鼠模型的存活率及并发症

我们在实验中观察到,主动脉弓缩窄术中及

术后死亡原因主要是主动脉弓破裂及大血管损伤。手术操作过程中及术后 24 h 模型组死亡 4 只,成活 18 只,术后存活率约为 82%;术后 4 周模型组总计死亡 7 只,存活 15 只,模型组存活率约为 68%。术后 4 周假手术组共计死亡 0 只,存活 10 只;

2.2 超声结果

术后 4 周,主动脉弓切面下,模型组动物无名动脉与左侧颈总动脉间可见缩窄线;主动脉弓缩窄处血流速率超过 2 400 mm/s;假手术组血流速率均低于 900 mm/s。结果表明该手术模型能够显著增加心脏后负荷。术后 4 周模型组与假手术组比较:左室收缩末期内径(LVIDs)、左室收缩期容积(LV Vol;s)、左室重量(LV mass, LVM)、左室重量指数(LV mass index, LVMI)明显增加($P < 0.05$);射血分数(EF)、左心室缩短分数(FS)显著降低($P < 0.05$)。结果表明:模型组动物心脏重量增加、顺应性降低,心功能有所下降。左室后壁收缩期厚度(LVPWs)、左室前壁舒张末期厚度(LVAWd)、左室前壁收缩末期厚度(LVAWs)差异无明显意义(表 1);

2.3 组织形态学结果

术后 4 周,模型组与假手术组相比,动脉血管管腔变大,血管壁增厚,血管壁外侧结缔组织增生,向附近心肌组织渗透。心肌细胞较为肥大,心肌纤维束增宽,心肌纤维外的成纤维细胞增多;假手术组,心肌细胞无肥大,心肌纤维外的成纤维细胞无异常增多;动脉无扩张及血管壁增厚表现(图 1,见封二)。

3 讨论

主动脉弓缩窄术小鼠模型是还原压力超负荷导致心肌代偿性肥大到失代偿性心衰病理生理发

表 1 术后 4 周心脏彩超指标变化($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Changes of cardiac ultrasonic parameters at 4 weeks after operation

组别 Group	动物 数 n	左室前壁舒 张末期厚度 LVAWd(mm)	左室前壁收缩 末期厚度 LVAWs(mm)	左室舒张末 期内径 LVIDd(mm)	左室收缩末 期内径 LVIDs(mm)	左室后壁舒 张期厚度 LVPWd(mm)	左室后壁收缩 期厚度 LVPWs(mm)
模型	15	1.19 $\pm$ 0.24	1.65 $\pm$ 0.26	4.47 $\pm$ 0.34	3.26 $\pm$ 0.38 *	1.18 $\pm$ 0.33	1.48 $\pm$ 0.28
假手术	10	1.10 $\pm$ 0.14	1.63 $\pm$ 0.17	4.32 $\pm$ 0.42	2.74 $\pm$ 0.51	0.98 $\pm$ 0.20	1.39 $\pm$ 0.17
左心室射血分数 EF(%)	左室短轴缩短率 FS(%)	左心室收缩期容积 LVSV	左心室舒张期容积 LVDV	体重指数 LVMI	左心室重量 LV M		
52.47 $\pm$ 10.04 *	27.15 $\pm$ 6.67 *	43.55 $\pm$ 12.18 *	91.77 $\pm$ 16.88	4.88 $\pm$ 1.05 *	194.00 $\pm$ 35.86 *		
66.60 $\pm$ 9.02	37.01 $\pm$ 6.98	29.49 $\pm$ 12.48	84.98 $\pm$ 19.19	3.48 $\pm$ 0.56	153.86 $\pm$ 27.85		

注:模型组与假手术组比较,* $P < 0.05$;

Note. TAC group vs. sham-operation group * $P < 0.05$.

展过程的理想模型,造模过程略微复杂,但病变程度可控,模型稳定、重复性好。

本实验结果中,模型组动物主动脉弓缩窄处血流速率超过 2 400 mm/s;假手术组血流速率均低于 900 mm/s。结果表明该手术模型已经成功的引起了心脏后负荷的增加。国外文献报道,严重的主动脉弓缩窄术后 3 d 即可出现左室肥厚^[5],其心肌肥厚的进展速度与缩窄的严重程度有关。本实验中,术后 4 周模型组超声结果左室收缩末期内径(LVIDs)、左心室收缩期容积(LVDV)、左心室重量(LV mass, LVM)、左心室重量指数(LV mass index, LVMI)均明显增加,提示了心脏重量增加,心功能有所下降,符合相关文献报道。模型组动物组织形态学可见血管和心肌细胞的病理变化,包括血管管腔变大,血管壁增厚,血管壁外侧结缔组织增生,并向附近心肌组织渗透;心肌细胞肥大,心肌纤维束增宽,心肌纤维外的成纤维细胞增多等表现。其表现均属心肌肥厚的病变表现,进一步证实该方法能够可靠的增加心脏后负荷,并诱导心肌肥厚的发生。

根据笔者实验中的体会,该造模方法中应当重点注意以下操作步骤:(1)若遇到特殊情况,气管插管 3 次不成功时,不可继续尝试,防止术后喉头水肿导致窒息死亡。(2)开胸阶段避免损伤乳内动脉引起大失血。(3)分离主动脉弓及穿线时,动作务必轻柔缓慢,防止器械划伤大血管及重要组织。(4)在缩窄点行缩窄操作时,结扎力度应松紧适当,力度过紧容易导致主动脉弓破裂出血。(5)关胸缝合时,避免损伤肺脏、大血管等。

本造模方法与国内多数文献报道的劈开胸骨后行缩窄术的方法不同,其术后存活率虽与国内报

道的其他手术方法存活率相当^[6],但该方法无需劈开胸骨进入胸腔,而仅是将小鼠右侧卧位以左侧第二肋间隙直接开胸,从而极大的减少了对实验动物骨骼及胸腺等部位组织的损伤。除此之外,实验动物术后体能恢复很快,术后苏醒后即可自由活动,饮食饮水,无需实验人员特殊护理,不会增加实验人员的工作量。该造模方法尚具有操作步骤简单、操作时间短等优点,在与心肌肥厚病理生理机制及相关药效研究中具有很大的应用价值。

参考文献:

- [1] Hu P, Zhang D, Swenson L, et al. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003,285(3):H1261-1269.
- [2] Moore XL, Tan SL, Lo CY, et al. Relaxin antagonizes hypertrophy and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Endocrinology*, 2007,148(4):1582-1589.
- [3] 李晓梅,马依彤,杨毅宁,等. 小鼠主动脉弓缩窄模型的建立及评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008,(11):24-9, 86.
- [4] 张焕基,黄辉,张坤,等. 无呼吸机支持下小鼠主动脉弓缩窄模型优化法评价 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013,(05):19-22.
- [5] Liao Y, Ishikura F, Beppu S, et al. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic-banded mice: necropsy validation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002,282(5):H1703-1708.
- [6] 李晓梅,马依彤,杨毅宁,等. 不同品系小鼠主动脉弓缩窄压力负荷模型的比较 [J]. *实验动物与比较医学*, 2008,(04):209-214.

[修回日期]2014-11-15