

# 小型猪射血分数保留心力衰竭模型的建立

曹浩<sup>1</sup>, 陆超<sup>1</sup>, 董云<sup>2</sup>, 王竹林<sup>1</sup>, 李苑<sup>3</sup>, 范慧敏<sup>1</sup>, 刘中民<sup>1</sup>

(1. 同济大学附属东方医院心外科;

2. 同济大学附属东方医院心超室;

3. 同济大学附属东方医院心衰研究所)

**摘要:**目的: 经左胸小切口建立小型猪升主动脉缩窄模拟射血分数保留的心力衰竭动物模型。

方法: 巴马香猪 (15-20Kg) 12 只随机分为升主动脉缩窄组(AoB, n=6)和假手术组(Sham, n=6)。经左胸第三肋间小切口开胸, 切开心包, 分离主肺动脉间隔, 用丝带套绕并缩窄升主动脉, 升主动脉缩窄面积为 50%; 假手术组仅行开胸处理。术后 2 月行心脏超声检查评估主动脉缩窄程度、左房大小、左室容积、左室射血分数及左室舒张功能等; 大体及组织病理学检查观察左室重塑及心肌细胞变化等情况。结果: 本组实验动物无死亡, 术后 2 月 AoB 组动物精神差, 活动能力下降。超声心动图检查显示: 术前两组间左房大小、左室容积、左室射血分数及左室舒张功能比较无显著性差异; 术后 2 月, 随着动物生长, AoB 组升主动脉缩窄面积达到 80% 以上, 左心室呈明显向心性肥厚; AoB 组左心室舒张末容积[(46.8±4.4)ml]、左心室收缩末容积[(16.3±1.1)ml]、左室舒张功能减低(E/e': 12.91±1.23), 与 Sham 组比较(P<0.05); 左心房直径[(30.6±2.9)mm]、左心室射血分数为[(60.9±4.1)%]与 Sham 组比较差异无统计学意义(P>0.05)。解剖见 AoB 组左心室呈明显向心性肥厚, 室壁僵硬; HE 染色和 Masson 染色见 AoB 组心肌细胞变性萎缩, 排列紊乱, 心肌间质胶原纤维增生明显。结论: 经左胸小切口能成功建立小型猪升主动脉缩窄模型, 该模型可用于射血分数保留的心力衰竭研究的动物模型, 且具有创伤小、可重复的特点。

**关键词:** 小型猪; 升主动脉缩窄; 射血分数保留心力衰竭; 动物模型

**中图分类号:** Q 9 5 - 3 3

## Technique for the Establishment of Miniature Pigs Model of Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction

Cao Hao<sup>1</sup>, Lu Chao<sup>1</sup>, Dong Yun<sup>2</sup>, Wang Zhulin<sup>1</sup>, Li Yuan<sup>3</sup>, Fan Huimin<sup>1</sup>, Liu Zhongmin<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiovascular Surgery, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, 200123 Shanghai, China;

2. Department of Echocardiograph, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, 200123 Shanghai, China;

3. Institute of Heart Failure, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, 200123 Shanghai, China)

**Abstract:** Objective: To explore the feasibility of establishing an miniature pig model of ascending aortic stenosis to simulating heart failure with a preserved ejection fraction. Methods: Bama miniature

**基金项目:** 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (编号: 20130072120062, 20130072120063); 国家自然科学基金 (编号: 81470393, 81400070); 上海市科学技术委员会 (编号: 13411951402); 上海市卫生与计划生育委员会 (编号: ZY3-LCPT-2-1003); 上海市浦东新区科委 (编号: Pkj2013-z03, PWZxq2014-01)

**作者简介:** 曹浩 (1973-), 男, 讲师, 主治医师, 硕士, 干细胞治疗心衰

**通信联系人:** 李苑 (1979-), 女, 助理研究员, 心衰综合治疗. E-mail: liyuan\_0806@126.com

pigs (15-20 Kg) were randomly assigned to the aortic banding group (AoB, n=6) and the sham-operation group (Sham, n=6). The former underwent pericardial opening and aortic banding through small incision on the left third intercostal space (stenosis area of about 50%), and Sham animals received pericardial opening without AoB. 2 months after surgery, cardiac function and myocardial remodeling was assessed comprehensively by echocardiography, heart anatomy and histological analyses. Results: All animals survived. Post-operation 2months, the AoB group animals were poor in spirits and activity ability. Echocardiography showed that preoperative left atrial size, left ventricular volume, left ventricular ejection fraction and left ventricular diastolic function between the two groups was no significant difference; Two months after surgery, the ascending aorta stenosis area of AoB group animal was up to more than 80% with the animal growth, and the left ventricle is obviously centripetal hypertrophy; Pigs with aortic banding exhibited significant left ventricular end-diastolic volume [LVEDV: (46.8±4.4) ml], left ventricular end-systolic volume [LVESV : (16.3±1.1) ml] and left ventricular diastolic function ( $E/e'$ : 12.91±1.23) compare with Sham group; however, other parameters, including left atrium diameter [LA diameter: (30.6±2.9)mm] and ejection fraction [EF: (60.9±4.1)mm], were not impaired in pigs with aortic banding. Left ventricular of AoB group was obviously centripetal hypertrophy, ventricular wall stiffness by anatomy; Histological examinations (HE&Masson stain) revealed that AoB group exhibited myocardial cell degeneration atrophy, disordered arrangement, interstitial fibroblasts hyperplasia. Conclusion: We successively established of miniature pigs model of ascending aortic stenosis with less-invasive and reproducible features. The method provided the ideal animal model for the research of HFpEF.

**Keywords:** Miniature Pigs; Ascending Aortic Stenosis; Heart Failure with a Preserved Ejection Fraction; Animal Model

## 0 引言

随着老龄化社会的来临,心力衰竭(Heart failure, HF)正在成为影响人类健康的首要因素。心衰患者中大约一半患者的心脏射血分数是下降的,称为EF降低的心衰(HF with a reduced ejection fraction, HFrEF),而另外一半患者的射血分数没有明显的下降( $LVEF \geq 45\%$  or 50%),称为EF保留的心衰(HF with a preserved ejection fraction, HFpEF)<sup>[1]</sup>。关于HFrEF研究和治疗方案很多,但大多数针对HFpEF的临床药物研究证实是无效的<sup>[2]</sup>。高血压被认为与HFpEF高度相关,而HFpEF独特的病理变化以及高血压在心衰发展过程中所起作用,我们知之甚少。建立压力超负荷诱发的心肌肥厚动物模型对研究高血压导致心肌重塑的变化及预后有重要意义,有文献报道缩窄猪升主动脉模型可以用于评估HFpEF治疗方案<sup>[3]</sup>。我们通过左胸小切口,用丝带捆扎升主动脉(Aortic Banding, AoB)建立小型猪升主动脉缩窄模型,建立了一种稳定、可重复的压力超负荷左室肥厚动物模型,可以模拟HFpEF的病理变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 动物与分组:

普通级巴马香猪12只,雄性,体重15-20kg,购于中国泰州试验用小型猪培育基地【SCXK(苏)2011-0002】。完全随机分为升主动脉缩窄组(AoB组),每组6只;假手术组(Sham组)每组6只。

80 1.1.2 仪器和设备:

美国 Matrx VME 2 通用动物麻醉机, 心电监护仪 (美国 Midmark 公司 Cardell Touch Veterinary Vital Sign Monitor ), 超声诊断仪 (Philips CX50, 探头 S5-1), 显微图像采集系统 (德国 Leica DMIRB), 开胸手术器械一套。

1.2 麻醉

85 术前禁食 8h, 氯胺酮 10~20mg/kg+咪唑安定 5mg 肌注, 之后耳缘静脉留置静脉针, 丙泊酚 10-15ml/h 静脉推泵维持。经口气管内插管, 麻醉机辅助通气。通气频率 16~18 次/分, 潮气量 10~12 mL/kg, 氧浓度 100%。四肢连心电极, 连续心电监测。耳缘静脉建立静脉通路, 输注 0.9%生理盐水补充血容量, 速率 125ml/h。

1.3 动物模型的建立

90 小型猪右侧卧位固定, 开胸前琥珀酰胆碱 100mg 静推, 左第三肋间开胸, 切开胸主动脉远端部分心包, 悬吊心包, 暴露升主动脉和肺动脉 (图 1A), 分离主肺动脉间隔, 将丝带套绕升主动脉 (图 1B), 测量升主动脉周长并捆扎升主动脉, 通过缩小升主动脉的周长将升主动脉横截面积缩窄 50% (图 1C), 充分止血, 鼓肺排气, 分层缝合, 关胸, 不放置胸腔引流管 (图 1D), 术后肌注抗生素 3 天。假手术组分离升主动脉但不进行结扎, 其余操作同手术组。

95

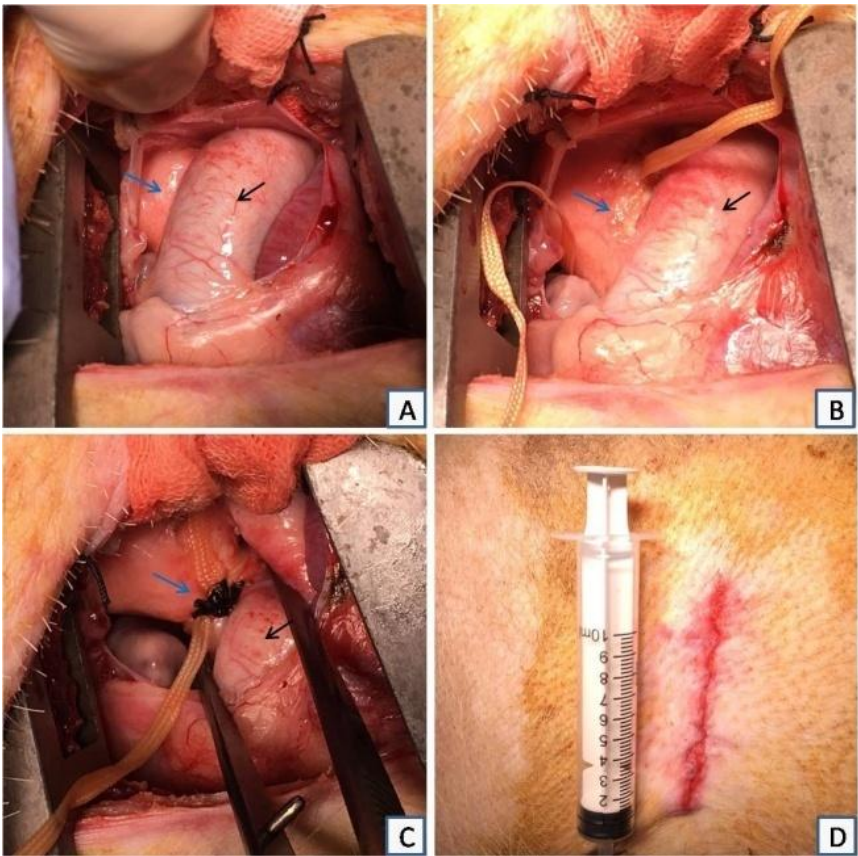


图 1 手术过程 A 左胸切口, 暴露升主动脉肺动脉 B 升主动脉套绕丝带 C 结扎丝带缩窄升主动脉面积约 50% D 术后切口 (蓝色箭头: 升主动脉, 黑色箭头: 肺动脉)

## 1.4 检测指标

### 1.4.1 超声心动图检查

术前和术后 2 月，行超声心动图检查。巴马香猪麻醉后，通过超声进行以下数据测量：升主动脉狭窄程度（Stenosis）、左心房舒张末直径（LA diameter）、左室舒张末容积（LVEDV）、左室收缩末内径（LVESV）、左心室射血分数（EF）、左室舒张情况（E/e'）。各参数连续测量 5 个心动周期并计算平均值。

### 1.4.2 大体及组织病理学检测

做完心超，心脏内注射氯化钾处死，迅速开胸取出升主动脉及心脏，用 4℃磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.40）冲洗干净，观察升主动脉狭窄情况及左心室心肌厚度及心腔大小。取左心室经福尔马林固定，经乙醇梯度脱水后石蜡包埋，切片后行苏木素-伊红（HE）染色及 Masson 染色，显微镜下观察心肌改变。

## 1.5 统计学方法：

采用 SPSS 13.0 统计软件分析。数据以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。组间比较采用 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 一般情况：

本组动物无死亡。随着动物长大，而升主动脉狭窄处无法扩张，因此其狭窄程度逐渐加重。术后二月，AoB 组动物活动能力下降，休息时，症状不明显，活动后有气喘。

### 2.2 超声心动图检查：

术前心超结果提示：两组升主动脉均无狭窄，两组间 LA diameter、LVESV、LVEDV、LVEF、E/e' 比较无显著性差异。术后二月，AoB 组升主动脉狭窄率可达到 80% 以上，Sham 组无狭窄；AoB 组左心室射血分数下降，但 EF 值在 50% 以上，Sham 组 EF 在正常范围（图 2）；AoB 组左心房扩大不明显、左室心肌明显增厚、心室腔变小、左心室舒张功能减低；与 Sham 组比较，LVESV、LVEDV 显著变小（ $P < 0.05$ ）、E/e' 变大（ $P < 0.05$ ）、LA diameter 增加不明显（ $P > 0.05$ ）、EF 值稍降低（ $P > 0.05$ ）。（表 1）



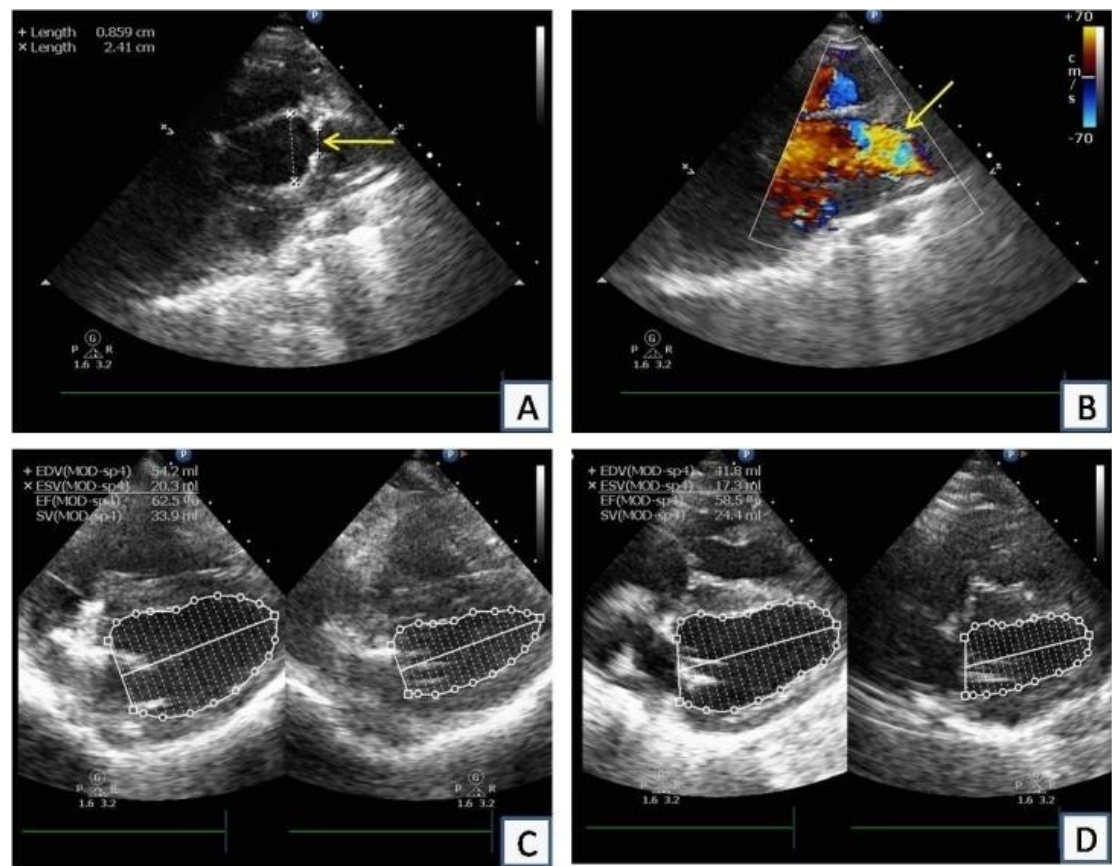


图2 术后2月心超检查 A AoB组术后2月升主动脉缩窄明显(箭头所示) B AoB组升主动脉缩窄后有湍流(箭头所示) C Sham组射血分数62.5% (图中所示) D AoB组射血分数58.5% (图中所示)

130

表1 超声心动图检查示心脏参数变化( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

	术前		术后2月	
	Sham	AoB	Sham	AoB
Body Weight(Kg)	18.8±1.5	18.6±1.8	30.2±4.2	28.1±3.4
Stenosis(%)	0	0	0	80.2±4.5
LA diameter(mm)	26.0±2.4	25.9±3.1	29.5±2.5	31.6±2.9
LVEDV(ml)	40.2±3.6	42.1±2.9	53.5±3.8	46.8±4.4*
LVSDV(ml)	15.6±1.1	16.9±1.3	19.3±1.5	16.3±1.1*
EF(%)	63.6±5.2	64.4±6.1	63.8±5.4	60.9±4.1
E/e'	6.19±0.18	6.22±0.11	6.11±0.26	12.91±1.23*

\*: 与同期 Sham 组比较有显著性差异 (P<0.05)

135

### 2.3 升主动脉及心肌大体观察:

Sham 组升主动脉内膜光滑,无明显扩张及增厚,AoB 组升主动脉捆扎处内膜隆起;Sham 组左心室心肌厚度正常,心腔大小正常,AoB 组左心室心肌明显增厚,心腔变小(图3)。

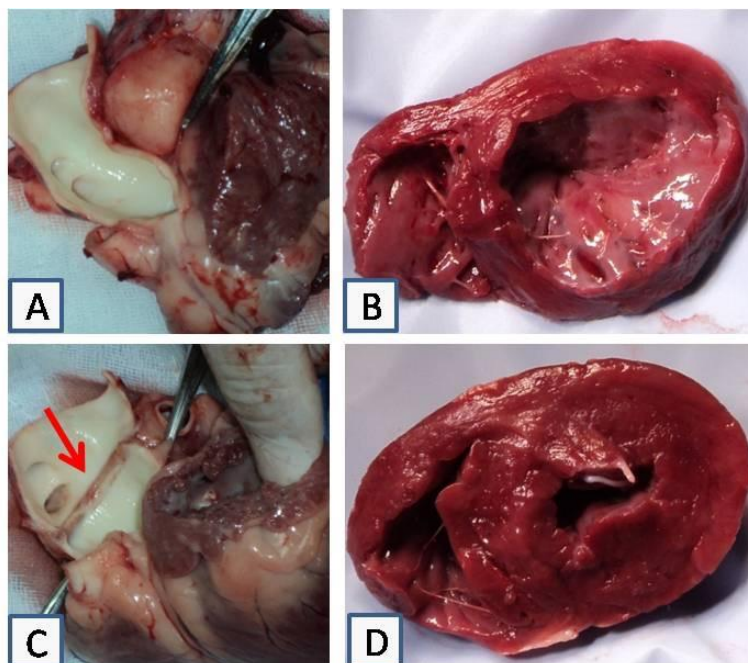


图3 大体和病理改变 A Sham 组升主动脉内膜光滑 B Sham 组左心室心肌正常 C AoB 组升主动脉捆扎处内膜隆起(箭头所示) D AoB 组左心室心肌肥厚

### 2.4 组织病理学观察 (HE&Masson 染色):

Sham 组心肌细胞大小正常,排列整齐, AoB 组部分心肌细胞变性萎缩,排列紊乱心肌间质胶原纤维增生明显(图4)。

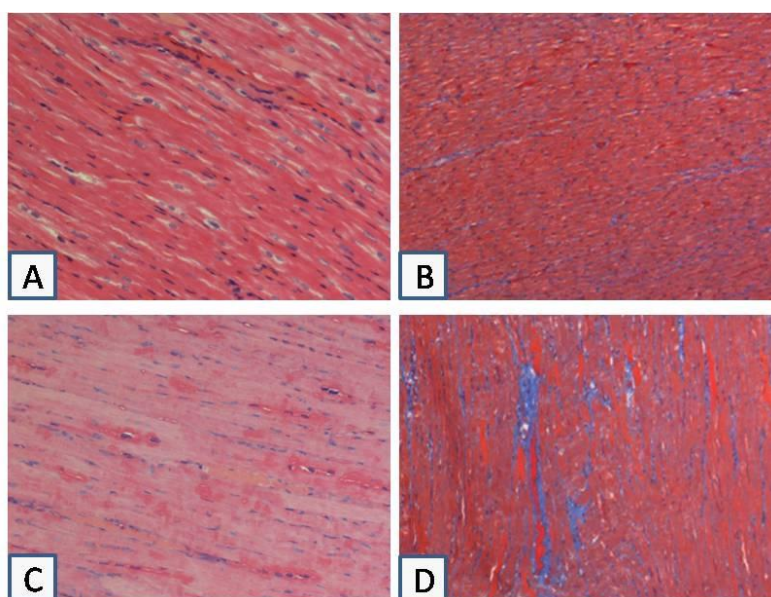


图4 A Sham 组心肌组织 HE 染色(×200) B Sham 组心肌组织 Masson 染色(×100) C AoB 组心肌组织 HE 染色(×200) D AoB 组心肌组织 Masson 染色(×100)

### 3 讨论

HF 可以分为 EF 降低的 HF (HFrEF) 和 EF 保留的 HF (HFpEF), 近年来 HFpEF 患者住院的数量赶上了 HFrEF 患者, 并有超过的趋势<sup>[4]</sup>。HFpEF 是心脏舒张功能下降, 而收缩功能正常或接近正常, 并常合并高血压、糖尿病、肥胖、肾功能异常等<sup>[5]</sup>。关于 HFrEF 有大量的研究文献, 而关于 HFpEF 的认识是严重不足的。HFpEF 心肌重塑常表现为心肌间质纤维化、左室向心性肥厚和左房扩大<sup>[6]</sup>。影响 HFpEF 机制和治疗研究的重要瓶颈是缺少合适的动物模型。目前用于 HFpEF 研究的动物模型有缩窄主动脉增加左心后负荷、制造糖尿病、肥胖等内环境、肾包裹制作高血压等诱导产生 HFpEF<sup>[7]</sup>。

高血压是严重心脏病的一个主要的危险因素, 对 HFpEF 也是一个重要因素, HFpEF 患者合并高血压比率是 55-86%, 因此, 许多 HFpEF 动物模型研究的涉及后负荷增加和左心室向心性肥厚 (如横向主动脉缩窄或全身动脉高血压) 是毫不奇怪<sup>[8]</sup>。尽管有大量啮齿类动物模型, 帮助我们理解 HFpEF 左室舒张功能障碍的基本原因和机制, 但其心脏大小、结构和功能与大的哺乳动物的心脏, 特别是人类的心脏相比, 差别很大。因此, 要阐明 HFpEF 舒张功能障碍的病理生理, 建立模拟人 HFpEF 的心脏功能衰竭的大动物实验模型十分必要<sup>[9]</sup>。猪和人类的心血管系统相似, 并在兴奋-收缩耦联方面有许多共同特点<sup>[10]</sup>, 小型猪体型小, 饲料消耗低, 管理操作方便, 是理想的模型动物。

本实验参考 Ishikawa 等<sup>[3]</sup>的方法基础上, 通过左胸小切口用丝带捆扎缩窄升主动脉的方法建立小型猪 AoB 模型。手术操作简单, 术后无死亡。升主动脉缩窄过重导致急性左心衰竭常常是该类模型死亡的原因<sup>[11]</sup>。多数文献报道, 通过控制跨狭窄处的压差来建立主动脉缩窄模型<sup>[12,13]</sup>, 但考虑到跨狭窄处的压差受多种因素影响, 如血压、麻醉深度、药物等, 且操作过程繁琐, 我们通过控制狭窄面积来建立主动脉缩窄模型, 开始我们将主动脉横截面积缩窄约 50%, 随着动物的生长, 主动脉也逐渐增粗, 而狭窄处受丝带限制, 无法扩张, 因此狭窄程度越来越重, 术后二月, 狭窄程度可达到 80% 以上, 动物也因为对狭窄程度的逐步适应, 而不易发生左心衰竭而死亡。术后二月, 模型组体重较 Sham 组轻, 活动能力下降。超声心动图可以无创地观察房室大小、室壁厚度、心室活动及检测心脏功能指标变化, 并且操作简单, 结果可靠。本研究结果显示, 术后 2 月模型动物左心室室壁厚度显著增加, 心腔变小, 表现为向心性肥厚, 左房增大不明显, 可能与观察时间不够有关, 左室收缩功能较 Sham 组有所下降, 但 EF>50%, 左室舒张功能减低。大体及病理学检查可见 AoB 组左室显著增厚, 部分心肌细胞变性萎缩, 排列紊乱, 心肌间质胶原纤维增生明显。

我们通过控制主动脉横截面积建立小型猪升主动脉瓣缩窄模型成功地模拟了 HFpEF 的病理生理变化, 避免了控制跨狭窄处的压差建立模型的一些不稳定因素, 具有操作简单、创伤小、可复制等特点, 为进一步研究 HFpEF 提供良好的动物模型。

## [参考文献] (References)

- 185 [1] Volpe M, McKelvie R, Drexler H. Hypertension as an underlying factor in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *J Clin Hypertens* (Greenwich). 2010 Apr; 12(4):277-83.
- [2] Nativi-Nicolau J, Ryan JJ, Fang JC. Current therapeutic approach in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Heart Fail Clin*. 2014 Jul;10(3):525-38.
- 190 [3] Ishikawa K, Aguero J, Oh JG, Hammoudi N, Fish LA, Leonardson L, Picatoste B, Santos-Gallego CG, Fish KM, Hajjar RJ. Increased stiffness is the major early abnormality in a pig model of severe aortic stenosis and predisposes to congestive heart failure in the absence of systolic dysfunction[J]. *J Am Heart Assoc*. 2015 May 20;4(5). pii: e001925.
- [4] Steinberg BA, Zhao X, Heidenreich PA, Peterson ED, Bhatt DL, Cannon CP, Hernandez AF, Fonarow GC; Get With the Guidelines Scientific Advisory Committee and Investigators. Trends in patients hospitalized with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction: prevalence, therapies, and outcomes[J]. *Circulation*. 195 2012 Jul 3;126(1):65-75.
- [5] Leite-Moreira AF. Current perspectives in diastolic dysfunction and diastolic heart failure[J]. *Heart*. 2006 May;92(5):712-8.
- [6] Borlaug BA1, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment[J]. *Eur Heart J*. 2011 Mar;32(6):670-9.
- 200 [7] Conceição G, Heinonen I, Lourenço AP, Duncker DJ, Falcão-Pires I. Animal models of heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Neth Heart J*. 2016 Apr;24(4):275-86.
- [8] Oktay AA, Shah SJ. Current perspectives on systemic hypertension in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Curr Cardiol Rep*. 2014 Dec;16(12):545.
- 205 [9] Dubi S, Arbel Y. Large animal models for diastolic dysfunction and diastolic heart failure-a review of the literature[J]. *Cardiovasc Pathol*. 2010 May-Jun;19(3):147-52.
- [10] Milani-Nejad N, Janssen PM. Small and large animal models in cardiac contraction research: advantages and disadvantages[J]. *Pharmacol Ther*. 2014 Mar;141(3):235-49.
- 210 [11] Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Sep;281(3):H1104-12.
- [12] Xiong Q, Zhang P, Guo J, Swingen C, Jang A, Zhang J. Myocardial ATP hydrolysis rates in vivo: a porcine model of pressure overload-induced hypertrophy[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Aug 1;309(3):H450-8.
- 215 [13] Marshall KD, Muller BN, Krenz M, Hanft LM, McDonald KS, Dellsperger KC, Emter CA. Heart failure with preserved ejection fraction: chronic low-intensity interval exercise training preserves myocardial O<sub>2</sub> balance and diastolic function[J]. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Jan 1;114(1):131-47.