

解除大鼠腹主动脉缩窄逆转左心室肥厚的形态学观察

冯耀光¹, 唐雅玲², 宴阳天¹, 王元星¹, 贺大璞¹, 李 峰¹, 王 双²
(南华大学 1. 附属第一医院胸心外科, 2. 心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 腹主动脉缩窄; 左心室肥厚; 逆转

[摘 要] 目的 通过解除大鼠腹主动脉缩窄逆转左心室肥厚, 并比较逆转后大鼠心脏和左心室肥厚心脏及正常大鼠心脏的形态学、胶原容积分数和凋亡指数的差别。方法 雄性 SD 大鼠 75 只, 随机分为正常组 ($n=15$)、缩窄组 ($n=30$) 和解除缩窄组 ($n=30$)。缩窄组和解除缩窄组行第 1 次手术通过缩窄腹主动脉方法建立左心室肥厚模型。术后第 5 周确认动物模型成功后, 解除缩窄组大鼠行第 2 次手术解除腹主动脉狭窄。采用心脏超声、常规病理和定量病理等多种技术方法, 对各组大鼠在第 1 次手术 (腹主动脉缩窄) 后第 5 周、第 2 次手术 (解除缩窄) 后第 4 周行形态学观察及形态学定量分析。结果 腹主动脉缩窄后第 5 周, 大鼠室间隔舒张期末厚度、左心室后壁舒张期末厚度显著增厚; 心脏质量指数、左心室质量指数、心肌胶原容积分数、心肌凋亡指数显著增加; 解除缩窄后的第 4 周, 解除缩窄组大鼠上述指标显著下降, 但仍高于正常组。结论 通过解除大鼠腹主动脉缩窄可以部分逆转左心室肥厚, 大鼠心脏形态、心肌胶原容积分数、凋亡指数有明显改善, 但与正常大鼠仍有差异。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Morphological Observation of the Reversal of Ventricular Hypertrophy in Rat by Loosening Abdominal Aortic Banding

FENG Yao-Guang¹, TANG Ya-Ling², YAN Yang-Tian¹, WANG Yuan-Xing¹, HE Da-Pu¹, LI Feng¹, and WANG Shuang²

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital; 2. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Abdominal Aorta Stenosis; Left Ventricular Hypertrophy; Reverse

[ABSTRACT] Aim To confirm the effects of left ventricular hypertrophy reversed by loosening abdominal aortic banding, and observe the changes of cardiac morphology, myocardial collagen volume fraction (CVF) and myocardial apoptotic index (AI). Methods 75 SD rats were randomly divided into the normal group (N group, $n=15$), abdominal aortic banding group (AAB group, $n=30$) and loosening abdominal aortic banding group (LAAB group, $n=30$). AAB and LAAB group received the first operation of narrowing the abdominal aorta to establish left ventricular hypertrophy model in rat. After 5 weeks, the LAAB group received the second operation of removing the abdominal aorta banding. After 5 weeks of the first operation and after 4 weeks of the second operation, heart mass index (HMI), left ventricular mass index (LVMI), interventricular septum thickness of end-diastolic (IVSTd), left ventricular posterior wall thickness of end-diastolic (LVPWTd), myocardial CVF and myocardial AI of three groups of rats were observed by general observation, ultrasonic cardiogram, myocardial Masson staining, myocardial tunel staining. Results HMI, LVMI, IVSTd, LVPWTd, myocardial CVF and myocardial AI were significantly increased in AAB group. After 4 weeks of removing the abdominal aorta banding, HMI, LVMI, IVSTd, LVPWTd, myocardial CVF and myocardial AI of LAAB group were significantly decreased compared with AAB group, but still higher than N group. Conclusion Loosening abdominal aortic banding could partly reverse the left ventricular hypertrophy.

[收稿日期] 2011-11-17
[基金项目] 湖南省自然科学基金资助 (09JJ6049)
[作者简介] 冯耀光, 博士, 副教授, 研究方向为心胸血管外科, E-mail 为 fengyaog@hotmail.com。唐雅玲, 硕士, 实验师, 研究方向为冠心病发病机制及其防治, E-mail 为 tangyaling7508@163.com。通讯作者王双, 博士, 副教授, 研究方向为冠心病发病机制及其防治, E-mail 为 wangya1105@hotmail.com。

众多流行病学调查显示,左心室肥厚是心力衰竭最为显著的独立危险因素,是心室重构具体的宏观表达,它作为心血管疾病的独立危险因子已达成共识。随着对重构心脏形态学研究的深入,人们的关注焦点已不仅仅满足于心肌细胞的大小变化,更关注于心肌纤维化和心肌细胞凋亡情况,因为后者所造成的结构改变对心脏功能的影响更大。虽然心脏瓣膜疾病是引起心力衰竭的常见原因,但由于瓣膜性心脏病的特殊性,国内外对慢性心衰的研究都把此类疾病排除在外;都认为手术治疗瓣膜自身的病变,恢复血流动力学通畅,是治疗此类疾病最好的方法。临床上也观察到通过外科修复或置换病变的瓣膜能使重构的心脏得到回缩^[1,2],但手术前后其微观形态学包括心肌细胞、间质纤维、细胞凋亡等情况变化如何?心肌肥厚逆转的程度、心肌肥厚到什么程度就无法逆转、术后辅助哪些药物治疗可以加快心肌肥厚的逆转等问题,国内外在这一方面的研究甚少^[3]。本实验旨在建立一个研究以上问题的动物实验模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

体重为 180~220 g 的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(普通级)75 只,由南华大学实验动物部提供。随机分为正常组($n=15$)、缩窄组($n=30$)和解除缩窄组($n=30$)。

1.2 大鼠腹主动脉缩窄模型的制备

大鼠手术前禁食 12 h,自由饮水。将左心室肥厚组大鼠称重后,以 3 $\mu\text{L/g}$ 的 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉后,将动物右侧卧位固定于鼠板,备皮、消毒,铺手术孔巾。于大鼠左肋缘下 5 mm 处做手术纵切口 1.5 cm,切开皮下及肌肉,打开左肾脂肪囊,在腹主动脉发出肾动脉上方约 0.5 cm 处,用 7 号注射针头(外径约 0.7 mm)紧贴腹主动脉,平行放置,用 4 号丝线将两者一起结扎(打活结),确保扎紧后,抽出注射针头,逐层缝合肌肉及皮肤。正常组除了不予以结扎腹主动脉外,其余手术过程同左心室肥厚组。术后为预防感染,常规肌肉注射青霉素(每只 5 万 U)1 周。

1.3 解除大鼠腹主动脉缩窄模型的制作

腹主动脉缩窄术后第 5 周,缩窄组和解除缩窄组大鼠经超声证实形成左心室肥厚后,按随机原则分别取 3 只大鼠留取标本,其余大鼠以 3 $\mu\text{L/g}$ 的 10% 水合氯醛腹腔内注射麻醉。解除缩窄组于大鼠

原切口,切开皮下及肌肉,分离腹腔粘连至腹主动脉发出肾动脉上方,找到线结,可见线结上部分腹主动脉局部扩张,用组织剪小心剪开线结,恢复血流通畅,逐层缝合肌肉及皮肤。缩窄组除不剪开线结外,其余手术过程同解除缩窄组。术后常规肌肉注射青霉素(每只 5 万 U)1 周。

1.4 标本采集和检测

第 1 次手术(腹主动脉缩窄)后第 5 周、第 2 次手术(解除缩窄)后第 4 周,进行以下处理:①待测大鼠以 10% 水合氯醛(3 $\mu\text{L/g}$)腹腔麻醉,心前区胸部剪毛。用频率 12 MHz 超声探头于胸骨旁左心室长轴界面分别测量舒张期末左心室后壁厚度(LVP-WTd)和舒张期末室间隔厚度(IVSTd)。同一操作人员每一心动周期取值 5 次,取其平均值。②称重,放血处死大鼠后迅速开胸,剪取心脏,剪去心脏表面脂肪、两侧心房和大血管根部,拭干后电子天平称取全心质量;沿房室沟和室间隔剪去右心室游离壁,保留室间隔,称取左心室质量,并计算心脏质量指数(HMI)和左心室质量指数(LVMI)。③左心室中部最宽处沿冠状面切取 4 mm 厚心肌组织置于 10% 甲醛液中浸泡固定后石蜡包埋,常规切片后 HE 染色分析。④Masson 染色,Image Proplus 多媒体彩色病理图像分析软件进行分析检测心肌纤维化面积,计算胶原容积分数(CVF)并取平均值。⑤Tunel 法检测细胞凋亡,计算每张切片凋亡阳性细胞核数目及其总细胞核数目比例,取其平均值为心肌凋亡指数(AI)。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件处理,结果分析采用方差分析和 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏质量指数和左心室质量指数的变化

腹主动脉缩窄后第 5 周,大鼠心脏增大,重量增加,左心室肥厚;大鼠 HMI 和 LVMI 高于正常组($P < 0.01$)。解除缩窄后第 4 周,解除缩窄组以上指标低于缩窄组($P < 0.01$),但高于正常组($P < 0.01$;表 1)。

2.2 超声心动图变化

解除腹主动脉缩窄后第 4 周,心脏超声心动图检查,缩窄组大鼠 IVSTd 和 LVPWTd 与正常组比较增加($P < 0.01$),解除缩窄组大鼠 IVSTd 和 LVP-WTd 低于缩窄组,但仍高于正常组($P < 0.05$;图 1 和表 2)。

表 1. 各组心脏质量指数变化($\bar{x} \pm s, \text{g/kg}$)

Table 1. The changes of HMI and LVMI in three groups($\bar{x} \pm s, \text{g/kg}$)

分 组	n	第 1 次手术后第 5 周		第 2 次手术后第 4 周	
		HMI	LVMI	HMI	LVMI
正常组	5	2.31 ± 0.08	1.57 ± 0.07	2.35 ± 0.15	1.62 ± 0.06
缩窄组	5	3.00 ± 0.24 ^a	2.28 ± 0.20 ^a	2.99 ± 0.14 ^a	2.14 ± 0.09 ^a
解除缩窄组	5	2.95 ± 0.20 ^a	2.14 ± 0.16 ^a	2.67 ± 0.13 ^{ab}	1.93 ± 0.13 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与缩窄组比较。

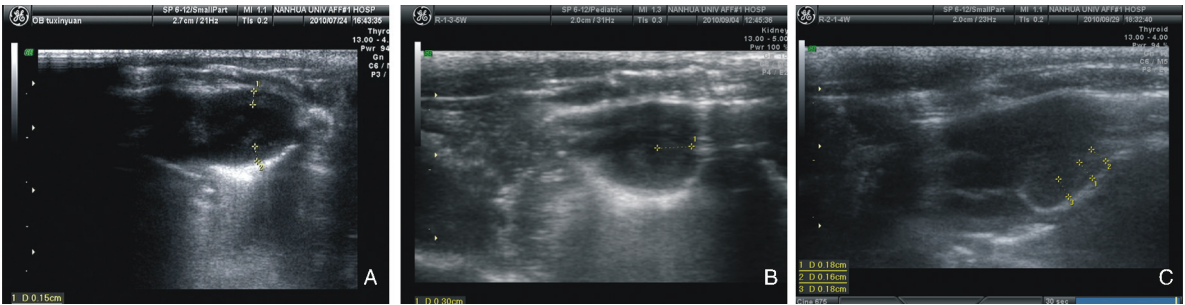


图 1. 第 2 次手术后第 4 周超声心动图变化 A 为正常组, B 为缩窄组, C 为解除缩窄组。

Figure 1. Ultrasonic cardiogram of normal group, abdominal aortic banding group and loosening abdominal aortic banding group in the fourth week after the second surgery

表 2. 第 2 次手术后第 4 周各组 IVSTd 和 LVPWTd($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)

Table 2. IVSTd and LVPWTd of three groups in the fourth week after the second surgery ($\bar{x} \pm s, \text{mm}$)

分 组	n	IVSTd	LVPWTd
正常组	5	1.65 ± 0.08	1.72 ± 0.03
缩窄组	5	2.42 ± 0.11 ^a	2.11 ± 0.11 ^a
解除缩窄组	5	2.25 ± 0.12 ^{bc}	1.94 ± 0.08 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; c 为 $P < 0.01$, 与缩窄组比较。

2.3 心肌胶原容积分数的变化

腹主动脉缩窄后第 5 周, 大鼠心肌 CVF 升高(P

< 0.01); 解除缩窄后第 4 周, 解除缩窄组心肌 CVF 低于缩窄组, 但高于正常组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$; 图 2 和表 3)。

表 3. 各组心肌 CVF 变化($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The change of myocardial CVF in three groups($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	第 1 次手术后第 5 周	第 2 次手术后第 4 周
正常组	5	1.76% ± 0.45%	1.72% ± 0.68%
缩窄组	5	3.14% ± 0.24% ^a	6.45% ± 0.52% ^a
解除缩窄组	5	2.45% ± 0.76% ^{ab}	4.96% ± 0.37% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.01$, 与缩窄组比较。

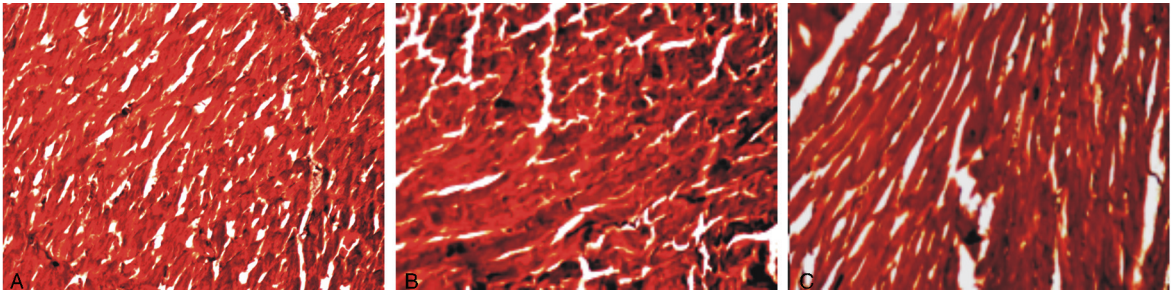


图 2. 第 2 次手术后第 4 周心肌组织 Masson 染色 A 为正常组, B 为缩窄组, C 为解除缩窄组。

Figure 2. Myocardial Masson staining in the fourth week after the second surgery

2.4 凋亡指数的变化

腹主动脉缩窄后第 5 周, 大鼠心肌凋亡指数升

高($P < 0.01$); 解除缩窄后第 4 周, 解除缩窄组心肌凋亡指数低于缩窄组, 但高于正常组, 差异具有统

计学意义($P < 0.01$;图 3 和表 4)。

表 4. 各组心肌凋亡指数的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 4. The change of myocardial apoptotic index in three group($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	第 1 次手术后第 5 周	第 2 次手术后第 4 周
正常组	5	0.11% \pm 0.02%	0.11% \pm 0.03%
缩窄组	5	5.09% \pm 0.31% ^a	2.31% \pm 0.50% ^a
解除缩窄组	5	3.12% \pm 0.62% ^{ab}	1.76% \pm 0.48% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$,与正常组比较;b 为 $P < 0.01$,与缩窄组比较。

3 讨 论

本实验利用缩窄腹主动脉方法制备左心室肥厚模型后,再解除腹主动脉缩窄的方法,逆转左心室肥厚,观察缩窄前后心脏的形态学、心肌纤维化和心肌细胞凋亡指标的动态变化,模拟外科治疗部分瓣膜性心脏病引发的心力衰竭的整个病理生理学变化过程,了解此类心脏疾病治疗恢复过程中的动态变化。

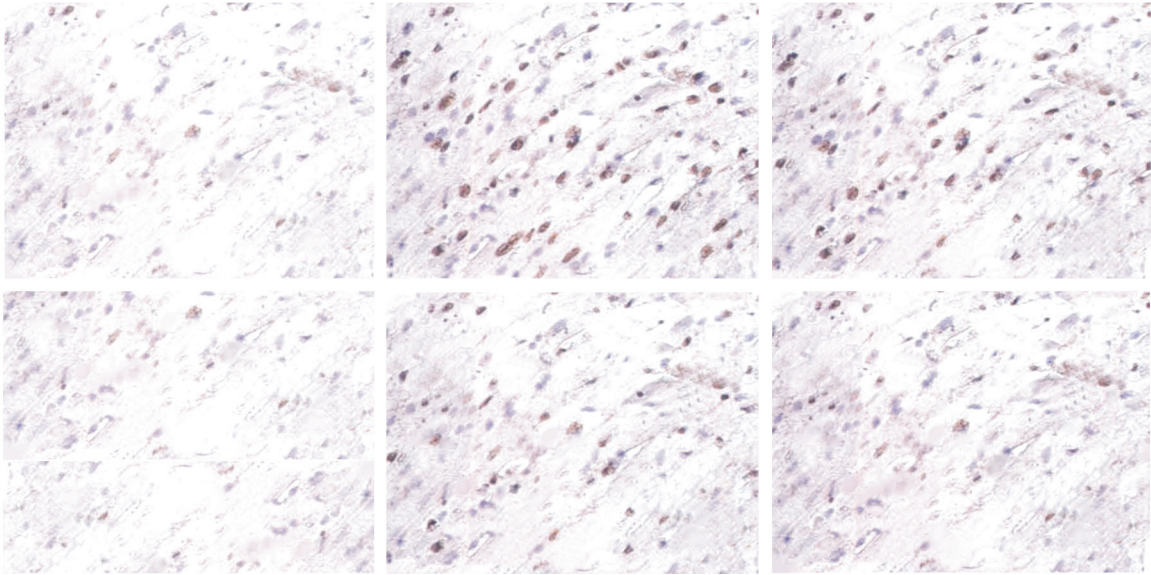


图 3. 第 1 次手术后第 5 周(上图)及第 2 次手术后第 4 周(下图)心肌细胞 Tunel 染色 从左至右依次为正常组、缩窄组和解除缩窄组。

Figure 3. Myocardial tunel staining of normal group (left), abdominal aortic banding group (middle) and loosening abdominal aortic banding group (right) in the fifth week after the first week, and in the fourth week after the second surgery

通过对大鼠行腹主动脉缩窄手术 5 周后,结果显示缩窄组大鼠 HMI 和 LVMI 明显升高;IVSTd 及 LVPWTd 增加明显。形态学观察到缩窄组心肌细胞增大、增粗,核深染、增大,细胞内心肌纤维排列紊乱,肌纤维增粗、变长,有较多分支;Masson 染色及 Tunel 染色中,发现胶原增生和心肌凋亡细胞增多。数据及形态学观察证实大鼠心脏左心室已肥厚,并成功诱导心肌纤维化和心肌细胞凋亡。腹主动脉缩窄模型是一种压力过载型心肌肥厚模型,通过缩窄腹主动脉,造成左心室做功增加。心肌代偿的最初阶段是维持心脏的正常泵血,增强心肌收缩力以使心输出量增加,然而负荷持续,心室肥厚,而室壁的张力不变。心脏启动两方面代偿机制^[4],一方面以加强心脏做功、顺应性下降来代偿;另一方面以激活神经-体液因素代偿^[5]。心肌细胞超负荷工作,可以加速其凋亡,激活神经-体液因素诱导心肌纤维

化,使心脏进入负荷增加、心肌肥大、心肌纤维化、细胞凋亡增加的恶性循环中^[6]。

本实验第 5 周通过对大鼠行第 2 次手术解除原狭窄的方法,恢复血流通畅,减轻左心室负荷,实验结果显示:解除缩窄组大鼠心肌细胞增大、增粗较缩窄组减轻,细胞内心肌纤维排列较为规律、整齐,未见肌纤维增粗、变长,有较多分支,细胞核较规则,胞浆染色均匀。缩窄组第 6 周、9 周心肌 CVF 分数均较解除缩窄组明显高。缩窄组第 6 周、9 周凋亡指数均较解除缩窄组明显高。以上结果显示心脏恢复正常血流动力学后,负荷减轻,心脏恢复正常做功,打破了负荷增加、心肌肥大、心肌纤维化、细胞凋亡增加的恶性循环,心脏心肌重构实现逆转。但解除缩窄组第 6 周、9 周心肌胶原容积分数、凋亡指数均较正常组显著增高;Masson 染色见胶原纤维较正常心肌组织仍多,并可见 Tunel 阳性细胞

较正常增多。结果表明在本实验的观察时间内大鼠心肌重构的逆转并不完全,并没有完全恢复到健康的状态。

在临床实践中也发现同样的规律,很多经心脏外科手术治疗后的患者心脏功能、形态在术后较长一段时间内难以恢复,有些患者心肌重构到一定程度后甚至无法恢复。以获得性主动脉瓣狭窄病例为例,在瓣膜狭窄病变的过程中,主动脉狭窄造成的左心室流出道梗阻,左心室后负荷增加,左心适应性的左心室肥大,尽管这是一种适应后负荷增加的需要,但也有不利的影响,增加了心肌的耗氧量,诱发心肌细胞凋亡和纤维化^[7]。目前的治疗以主动脉瓣膜置换术为主,手术后可以排除或减轻主动脉狭窄所造成的左心室负荷增加。当左心室的收缩压和后负荷被明显降低后,可改善心脏射血和心排量,并能降低左心室充盈压。术后临床随访表明:心脏会在一年后明显回缩,但不可能恢复完全正常状态,因为压力负荷增加使胶原含量增加,持续的胶原含量增加引起左心室壁的僵硬度过正常。

左心室肥厚的发病机制具有多元性和复杂性,与血流动力学、神经内分泌、细胞因子等因素有关,这些刺激因素通过各种信号的转导通路作用于细胞核内,使心脏的胚胎型基因表达上调^[8],蛋白合成增加,心肌细胞体积增大,造成心脏宏观增大。负荷增加造成的缺氧和内分泌及细胞因子构成的复杂网络的刺激,诱发心肌纤维化和加速心肌细胞凋亡。主动脉狭窄造成左心室肥厚的机制类似于获得性瓣膜狭窄原因所造成的心室肥大,血流动力学是腹主动脉狭窄模型导致心室肥厚的重要原因,纠正后可以逆转形态学的微观改变,但未达到完全逆转。

目前,心脏疾病的治疗已不仅仅局限在改善症状,最终目的更在于提高生存率和改善生活质量。大量研究证实心肌肥大是发生心力衰竭的组织结构基础和前期病变,因此尽早进行干预,逆转心肌肥大已成为共识。目前药物干预已获肯定的有血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARB)和醛固酮受体拮抗剂等,它们分别阻止血管紧张素的合成、阻止血管紧张素Ⅱ与AT1受体结合及醛固酮与其受体结合,从而减少或阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的作用而发挥抑制心肌肥厚的作用。还有研究提出非选择性组蛋白乙酰化酶抑制剂可以改变血管紧张素Ⅱ相关原癌基因的表达,治疗血管紧张素Ⅱ和主动脉狭窄导致的心脏肥大^[9]。但现有所有药物干预方面的研究是侧重于预防心肌肥厚的发生,针对已经形成

的心肌肥大,药物的治疗作用尚需要更多的研究证实。特别是在外科已经解除了引发心肌肥厚的始动因素后,哪些药物及药物如何组合更能促使术后心肌重构更彻底、更快速的逆转,临床上对此类问题国内外都没有大宗的循证临床研究。

本实验研究模拟了部分心脏外科手术术后疾病转归的自然病程,为进一步研究心肌重构逆转过程中心肌细胞超微结构以及基因表达等其他相关指标的变化特点,及术后辅助药物应用的筛选提供了一个动物实验平台和研究基础。

[参考文献]

- [1] Xun XL, Qin S, Lei H, et al. Simvastatin ameliorates rat ventricular remodeling after myocardial infarction: the role of phosphorylating extracellular signal-regulated kinase/2 [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(2): 258-261.
- [2] Peterson JT, Hallak H, Johnson L, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure [J]. Circulation, 2001, 103(18): 2 303-309.
- [3] Capasso JM, Palackal T, Olivetti G, et al. Severe myocardial dysfunction induced by ventricular remodeling in aging rat hearts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1990, 259(4): H1 086-096.
- [4] Berry JM, Naseem RH, Beverly A, et al. Models of cardiac hypertrophy and transition to heart failure [J]. Drug Discovery Today: Disease Models, 2007, 4(4): 197-206.
- [5] Schlaich MP, Schobel HP, Hilgers K, et al. Impact of aldosterone on left ventricular structure and function in young normotensive and mildly hypertensive subjects [J]. Am J Cardiol, 2000, 85(10): 1 199-206.
- [6] Delaney J, Chiarello R, Villar d, et al. Regulation of c-fos, c-fun and c-myc gene expression by angiotensin II in primary cultured rat astrocytes: Role of ERK1/2 MAP kinases [J]. Neurochem Res, 2008, 33(3): 545-550.
- [7] Schäfer S, Ellinghaus P, Janssen W, et al. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling [J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(1): 30-39.
- [8] Utschneider KM, Watson CE, Tong J, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor vildagliptin improves β -cell function and insulin sensitivity in subjects with impaired fasting glucose [J]. Diabetes, 2008, 57(1): 108-113.
- [9] Ying L, Shuang Y. Angiotensin II induces cardiomyocyte hypertrophy probably through histone deacetylases [J]. Tohoku J Exp Med, 2009, 219(1): 17-23.

(此文编辑 曾学清)