

· 基础研究 ·

后负荷增加所致心力衰竭模型小鼠气虚证评价

廉洪建 于 雪 郑 磊 任卫全 郭淑贞

摘要 目的 探讨后负荷增加所致的慢性心力衰竭模型小鼠的证候,进行气虚证客观评价。**方法** 350 只 4 周龄 SPF 级雄性昆明(KM)小鼠随机分为假手术组(150 只)和模型组(200 只),各组分为术后 2、4、6、8、12 周亚组,假手术亚组每组 30 只,模型组亚组每组 40 只。采用主动脉弓缩窄术制备后负荷增加小鼠心力衰竭模型。收集两组 2、4、6、8、12 周小鼠宏观表征、一般状态及心脏超声指标,记录两组术后 2、4 周旷场自主行进总距离。**结果** 与假手术组同期动物比较,模型组小鼠术后 2 周表现出不同程度的活跃度降低、精神状态不振;术后 4 周表现出活跃度降低、精神状态不振、目光无神、自主活动减少、抓取反抗降低;术后 4 周旷场实验自主行进总距离降低($P < 0.05$);术后 6 周左室射血分数、左室短轴缩短率降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 术后 4~12 周模型组小鼠出现与气虚证候相关的宏观表征、一般状态、心脏超声指标的改变,符合气虚证候要素诊断。

关键词 主动脉弓缩窄;气虚证;心力衰竭

Evaluation of Qi Deficiency Syndrome in Heart Failure Mice Caused by Elevated Afterload LIAN Hong-jian, YU Xue, ZHENG Lei, REN Wei-quan, and GUO Shu-zhen School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing(100029)

ABSTRACT Objective To investigate the syndrome nature and objective evaluation of qi deficiency of chronic heart failure mice caused by elevated afterload. **Methods** Totally 350 KM mice (male, 4 weeks old) were randomly assigned to sham-operated (150) group and transverse aortic constriction (TAC, 200) group. Both groups were randomly divided into 2, 4, 6, 8 and 12 weeks subgroup, 30 in each sham-operated subgroup, 40 in each TAC subgroup. TAC was performed to induce heart failure. Macroscopic indications, general state of mice, as well as echocardiography were observed at 2, 4, 6, 8, 12 weeks after surgery respectively. Meanwhile, the distance-moved in open field test was recorded at 2 and 4 weeks after surgery. **Results** Compared with the mice in sham-operated group, lassitude and decreased activity to different extent were appeared in TAC group at 2 weeks after surgery. Besides reduced activity and lassitude, reduced spontaneous activity and less resistance to grab were observed in TAC group at 4 weeks after surgery. Meanwhile, moved-distance was decreased ($P < 0.05$). Ejection fraction and shortening fraction of left ventricle were decreased in TAC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) at 6 weeks after surgery. **Conclusion** Mice with heart failure met the criteria of qi deficiency syndrome including macroscopic indications, general state and echocardiography of mice from 4 weeks to 12 weeks after TAC surgery.

KEYWORDS transverse aortic constriction; qi deficiency; heart failure

慢性心力衰竭(简称慢性心衰)在临床中有很高的发病率及病死率^[1],早已成为全球性的公共卫生难

题。在心力衰竭临床治疗中,中医药疗效肯定,并有其自身优势^[2]。“病证结合”动物模型是中药药效评价的有效方法^[3]。同时,鉴于小鼠基因组与人类基因组高度同源^[4],小鼠生理生化指标及其调控机制与人类相同或相似^[5]。因此,探索适用于中医药基础研究和中药临床前药效评价的小鼠慢性心衰“病证结合”动物模型具有重要的意义。本研究是在主动脉弓缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)诱导后负荷增加所致小鼠心力衰竭动物模型的基础上,对模型动

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81470191);教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-13-0692);北京中医药大学杰出青年人才项目(No. 2015-JYB-XYQ002)

作者单位:北京中医药大学中医学院(北京 100029)

通讯作者:郭淑贞, Tel: 010 - 64286153, E-mail: guoshz@bucm.edu.cn

DOI: 10. 7661/j.cjim. 20180426. 173

物的宏观表征、行为学指标、心功能指标进行动态采集分析,依据权威证候诊断标准对模型小鼠可能出现的“阳虚、气虚、血瘀、水停”^[6]证候中的气虚证证候进行评价,是对慢性心衰“病证结合”动物模型的有益探索。

材料与方法

1 动物 4 周龄 SPF 级雄性昆明(KM)小鼠 350 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];实验动物饲养于北京中医药大学科研中心动物室,环境温度为 20~25℃,12 h/12 h 昼夜规律喂养。本研究通过北京中医药大学伦理委员会审批,本研究严格遵守《赫尔辛基宣言》基本原则。

2 主要仪器及药品 小动物呼吸机(美国 SAR-1000 ventilator);Vevo2100 超声仪(加拿大 Visual Sonics);小鼠外科显微手术器械;旷场箱。异氟烷:上海雅培制药有限公司,批号:246885U;戊巴比妥钠:Sigma 公司,分析纯;生理盐水:石家庄四药公司,批号:130104406。

3 气虚证候诊断标准 参照 1986 年 5 月修订的“中医虚证辨证参考标准”^[7],根据临床等效性原则,本研究将标准转化设定为模型动物出现:目光无神、精神状态不振、活跃度降低、自主活动减少、抓取反抗度降低中的三项即可诊断为具备气虚证候要素。

4 分组及造模 350 只小鼠随机分为假手术组(150 只)和模型组(200 只),各组分为术后 2、4、6、8、12 周亚组,假手术亚组每组 30 只,模型组亚组每组 40 只。模型组参考相关文献的主动脉弓缩窄术造模方法^[8]制备后负荷增加小鼠心力衰竭模型。将各主动脉弓缩窄术组小鼠称重、麻醉、固定、气管插管,于左侧第 2 肋间开口,逐层开胸,暴露主动脉弓并缩窄,常规缝合关胸。假手术组只穿线不进行 TAC,其他步骤与模型组相同。在各组的实验终点,采用 Vevo2100 超声仪及配置的相应探头(MS-400 型号),中心频率 30 MHz,标准帧频 449 fps,检测主动脉弓缩窄处血液流速值,以血流流速 > 2 400 mm/s 作为模型动物纳入标准。符合纳入标准的模型组动物用于后续研究。

5 观察指标及方法

5.1 宏观表征采集 以慢性心衰临床常见证候要素及其对应的症状体征^[6]作为依据,参考课题组前期建立的大鼠宏观表征采集方法^[9]及小鼠宏观表征采集相关文献^[10],自制 TAC 小鼠宏观表征采集表,用

于各时间点小鼠宏观表征采集。

5.2 旷场实验 对假手术组和模型组术后 2、4 周小鼠进行了旷场试验。实验装置由旷场反应箱和记录分析系统两个部分组成。小鼠旷场反应箱高度约为 35 cm,底边为正方形,边长 75 cm,旷场箱内壁涂黑,底面用黄线平均分为 25 个 15 cm × 15 cm 小方格,用小动物行为记录分析系统(Smart 1.0, Panlab)记录并计算固定时间内小鼠自主活动总距离。

5.3 心脏超声检测 采用 Vevo2100 超声仪检测心功能,检测指标包括:左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室重量(left ventricular mass, LVM)、计算左心室重量/体重指数。

6 统计学分析 采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$,两组数据符合正态分布时,采用独立样本 *t* 检验比较分析;两组数据不符合正态分布时,采用非参数检验分析;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 宏观表征结果 与假手术组同期比较,模型组小鼠术后 2 周表现出不同程度的活跃度降低、精神状态不振,不满足气虚证候要素诊断。术后 4 周表现出目光无神、精神状态不振、活跃度降低、自主活动减少、抓取反抗降低,满足气虚证候要素的诊断。术后 6 周和 8 周上述状态持续存在。术后 12 周具备目光无神、精神状态不振、活跃度降低、自主活动减少、抓取反抗降低表现,个别动物出现鼻体浮肿胀大或(及)出现足底浮肿,按之凹陷,皮毛不齐,足底不洁,有个别动物出现呼吸窘迫,前肢抬高伴随身体僵硬状态随之死亡的情况。

2 旷场实验结果 模型组术后 2 周及 4 周小鼠旷场实验平均自主活动总距离分别为(2 007.91 ± 838.56) cm, (1 433.80 ± 693.99) cm,假手术组 2 周及 4 周小鼠旷场实验平均自主活动总距离分别为(2 157.20 ± 728.85) cm, (1 912.68 ± 678.63) cm。与假手术组同期比较,模型组术后 2 周旷场实验平均自主活动总距离减少,但差异无统计学意义(*P* > 0.05);模型组术后 4 周旷场实验平均自主活动总距离减少(*P* < 0.05)。

3 超声心动图检测结果

3.1 两组小鼠心脏舒缩功能指标比较(表 1) 两组术后 2、4 周 LVEF 及 LVFS 比较,差异无统计学

意义($P > 0.05$);与假手术组同期比较,模型组术后 6、8、12 周 LVEF 及 LVFS 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。模型组 LVEF 及 LVFS 呈逐渐降低趋势。

表 1 两组小鼠心脏舒缩功能指标 (% , $\bar{x} \pm s$)				
组别	n	时间	LVEF	LVFS
假手术	10	2 周	73.26 $\pm$ 9.88	42.80 $\pm$ 8.87
	10	4 周	76.44 $\pm$ 5.12	44.74 $\pm$ 4.50
	10	6 周	73.22 $\pm$ 7.93	42.36 $\pm$ 6.71
	10	8 周	72.06 $\pm$ 8.80	41.43 $\pm$ 8.70
	10	12 周	59.54 $\pm$ 8.19	31.86 $\pm$ 5.64
模型	10	2 周	71.99 $\pm$ 18.28	42.92 $\pm$ 14.55
	10	4 周	65.36 $\pm$ 18.46	37.60 $\pm$ 14.74
	10	6 周	55.79 $\pm$ 18.71 *	30.14 $\pm$ 11.91 **
	10	8 周	52.76 $\pm$ 18.01 **	28.15 $\pm$ 12.00 **
	10	12 周	39.82 $\pm$ 16.35 **	20.21 $\pm$ 9.87 **

注:与假手术组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 两组小鼠左心室质量指标比较(表 2) 与假手术组同期比较,模型组术后 2、4、6、8、12 周 LVM 及左心室重量/体重指数升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 两组小鼠左心室质量指标比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	时间	LVM(mg)	左心室重量/体重 (mg/g)
假手术	10	2 周	133.47 $\pm$ 36.67	3.41 $\pm$ 0.84
	10	4 周	149.21 $\pm$ 34.15	3.55 $\pm$ 0.42
	10	6 周	176.40 $\pm$ 36.17	3.78 $\pm$ 0.79
	10	8 周	149.75 $\pm$ 20.31	3.54 $\pm$ 0.46
	10	12 周	203.90 $\pm$ 34.16	4.09 $\pm$ 0.51
模型	10	2 周	170.30 $\pm$ 36.13 *	5.08 $\pm$ 0.98 **
	10	4 周	201.68 $\pm$ 45.13 *	4.86 $\pm$ 0.79 **
	10	6 周	234.70 $\pm$ 57.80 *	5.16 $\pm$ 0.91 **
	10	8 周	269.43 $\pm$ 62.99 **	5.78 $\pm$ 1.34 **
	10	12 周	298.19 $\pm$ 29.49 **	6.25 $\pm$ 1.04 **

注:与假手术组同期比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

心力衰竭动物模型制备方法有很多,而主动脉弓缩窄术后小鼠模型是还原压力超负荷导致心肌代偿性肥厚到失代偿性心力衰竭的理想模型^[11],在心衰的生理机制研究及药理研究中应用广泛^[12,13]。TAC 模型的缩窄程度与心肌肥大的严重程度及心肌肥厚进展时间窗密切相关^[14]。TAC 缩窄了无名动脉与左颈总动脉间的主动脉弓,心脏每搏输出量保持相同时,心脏克服阻力(后负荷)及排血做功量随缩窄程度的升高而增加,而缩窄程度升高的情况下,缩窄处的血液流速加大。因此,主动脉弓缩窄处血液流速能够在一定程度上反映 TAC 缩窄程度和压力后负荷增加的大小。本实验将 TAC 术后小鼠主动脉弓缩窄处血流值达到正常值

3 倍(800 mm/s $\times$ 3 = 2 400 mm/s)作为筛选标准,能够对模型动物的疾病进展程度进行控制。本研究选用的模型制备及筛选方法的可靠性在既往研究中有所论述^[8]。本次研究中模型组小鼠 LVM 及左心室/体重指数的结果与相关研究报道^[15]相符,验证了本研究 TAC 术后成功诱导后负荷增加而引起的心肌肥厚病理生理过程。

本研究以成熟稳定的疾病动物模型为基础,通过对实验动物宏观表征的动态观察,辅以可量化的生物学指标,对模型动物的证候属性进行动态、全面的评价,从而构建既具有疾病特征,又具备证候表型的病证结合动物模型。“病证结合”动物模型与病因造模、药物造模、病理造模、病因病理结合造模等模型相比,其具备稳定性、可靠性、应用性强的优势^[16],更符合临床实际,能更准确地阐明中医学理论,并保留中医学传统理论体系之精髓。其中,实验动物证候判别标准的建立是病证结合动物模型评价的难点与关键,笔者认为应遵循临床证候诊断标准,并通过相似临床意义的等效转化来实现。

1986 年 5 月修订的“中医虚证辨证参考标准”规定对气虚证的诊断标准如下:神疲乏力,少气懒言,自汗,舌胖有齿印,脉虚等症状中具备三项^[8]。该标准是从气的养神、推动、固摄、气化功能多角度评价。而鉴于小鼠舌象(实验中观察到舌象变异度极大)信息不可靠、脉诊、问诊信息无法获得,因此对小鼠气的固摄、气化功能难以客观评价。因此,本研究主要从气的养神、推动功能方面进行评价。根据临床等效性原则,将小鼠气虚证诊断标准设定为:目光无神、精神状态不振、活跃度降低、自主活动减少、抓取反抗度降低中满足三项即可诊断为具备气虚证候要素。

虽然动物证候评价相关研究常存在中医学传统四诊信息的缺失,但某些指标可以用来评价特定的证候属性。超声心动是目前临床上应用较多的用来评价心脏舒缩功能重要的生理指标之一,心气虚与心脏舒缩功能下降关系密切^[17],同时 LVEF、LVFS 能够很好的评价心气虚证^[18]。旷场实验在众多的行为学检测实验中,具有较强的操作性、无创性、标准化、客观化、计量化等优势,有研究证明旷场实验自主行进总距离指标能够较好的计量实验动物气虚程度^[19]。因此本研究选用了超声心动及旷场实验自主行进总距离这两个客观、可量化的指标,对实验动物的气虚证候进行辅助评价。此外,由于本研究超声检测室与动物房独立,因此各时间点小鼠行心脏超声检测后处死,故采用独立样本方法。

与同期假手术组动物比较,模型组动物宏观表征在术后 2 周尚不满足气虚证候诊断标准中的三项条件,故不满足气虚证候要素诊断。术后 4 周起,模型动物具备诊断标准中三项以上,满足气虚证候要素的诊断,且至术后 12 周持续存在。旷场实验研究结果显示,术后 4 周模型组自主行进总距离显著低于同期假手术组,支持模型组动物气虚证候要素的诊断。由于该模型随着疾病进展,症状、体征存在持续加重,因此,推测从术后 4 周起,该阳性指征持续存在。术后 2~12 周,模型组动物的心功能整体呈逐步下降趋势。术后 6 周起,LVEF、LVFS 显著降低,支持模型动物符合气虚证候要素的诊断。术后 4 周,LVEF、LVFS 也有一定程度的降低,也反映了模型动物气虚程度的渐进变化。

综上所述,以临床气虚证诊断标准作为参考,以实验动物宏观表征为主要诊断依据,结合行为学指标、心脏超声等客观指标,模型组动物在 TAC 术后 4 周起符合气虚证候要素诊断,且气虚证候要素在术后 4~12 周持续存在。该病证结合的动物模型的建立将为心衰气虚证基础研究和中药新药研究提供重要支持。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 顾东风,黄广勇,吴锡桂,等.中国心力衰竭流行病学调查及其患病率[J].中华心血管病杂志,2003,31(1):3-6.
- [2] 张培影,李志刚.中西医结合治疗心力衰竭的优势、劣势及趋势[J].中医杂志,2014,55(5):449-450.
- [3] 王阶,郭丽丽.病证结合多目标优化提高防治冠心病新药研究水平[J].中国中药杂志,2015,40(17):3402-3405.
- [4] Bradley A. Mining the mouse genome [J]. Nature, 420(6915): 512-514
- [5] 林兆宇,高翔.小鼠的遗传学研究[J].生命科学,2006,18(5):437-441.
- [6] 张鹏,赵慧辉,陈婵,等.慢性心力衰竭常见证候和证候要素的现代文献研究[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2378-2381.
- [7] 沈自尹.中医虚证辨证参考标准[J].中西医结合杂志,1986,6(10):598.

- [8] 廉洪建,冯玄超,啜文静,等.创伤较小的小鼠主动脉弓缩窄术的建立[J].中国比较医学杂志,2015,25(2):42-45,79.
- [9] 刘蕾,郭淑贞,陈建新,等.大鼠宏观体征采集探讨证候的方法学评述[J].北京中医药大学学报,2009,32(10):653-656.
- [10] 方肇勤,潘志强,付晓伶,等.小鼠四诊采集项目标准的建议[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(9):692-694.
- [11] 李军,尚海豹,刘庆春,等.微创手术致主动脉弓狭窄在小鼠心力衰竭模型制作中的应用[J].山东医药,2014,54(12):5-7,112.
- [12] Dong A, Mueller P, Yang F, et al. Direct thrombin inhibition with dabigatran attenuates pressure overload-induced cardiac fibrosis and dysfunction in mice[J]. Thromb Res, 2017, 159: 58-64.
- [13] Furuzono S, Meguro M, Miyauchi S, et al. A novel aldosterone synthase inhibitor ameliorates mortality in pressure-overload mice with heart failure [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 795: 58-65.
- [14] 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): 1703-1708.
- [15] 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,2008,18(11):24-29,86.
- [16] 彭丹虹,王燕萍,刘晓琪,等.中医病证结合动物模型评价体系的现状分析[J].中华中医药学刊,2017,35(8):2027-2030.
- [17] 史载祥,廖家桢,武泽民,等.“心气虚”患者左心室功能的研究[J].中医杂志,1982,23(12):58-61.
- [18] 金红姝,林水森,杨戈,等.心气虚证大鼠模型心功能变化的超声评价[J].山东中医药大学学报,2007,31(1):75-77.
- [19] 方肇勤,潘志强,汤伟昌,等.小鼠“四诊工作站”构建与操作标准探讨[J].上海中医药大学学报,2006,20(1):42-46.

(收稿:2016-08-09 在线:2018-05-07)

责任编辑:邱禹