

本文引用:李欣春,梁 昊,胡志希,胡思远,文 阳,钟森杰,李 琳.高血压心力衰竭大鼠动物模型的研制[J].湖南中医药大学学报,2017,37(3):245-248.

高血压心力衰竭大鼠动物模型的研制

李欣春,梁 昊,胡志希*,胡思远,文 阳,钟森杰,李 琳
(湖南中医药大学中医诊断研究所,湖南 长沙 410007)

[摘要] **目的** 研制高血压引起的心衰大鼠动物模型。**方法** 将 18 只 Dahl 盐敏感性大鼠分为正常组和模型组并分别使用 0.3%NaCl 低盐饲料和 8%NaCl 高盐饲料喂养大鼠 20 周,观察大鼠行为及体征,检测大鼠血压、血清氨基末端脑钠肽前体(N-terminal Pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)含量,彩色超声多普勒检测大鼠左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)及电镜观察 HE 染色心肌细胞以及肾脏组织等。**结果** 正常组大鼠血压一直维持在 140 mmHg 左右,而模型组大鼠从进食高盐饲料后血压保持持续上升,最高可达 250 mmHg;与正常组比较,模型组的 NT-proBNP、LVEF、LVFS 在统计学上有显著差异($P<0.01$)。**结论** 本研究制作的动物模型可较好地模拟正常大鼠继发高血压病进而发展成高血压心衰大鼠模型的过程,可用于高血压心力衰竭疾病的研究。

[关键词] 高血压;心力衰竭;Dahl 盐敏感性大鼠;大鼠动物模型

[中图分类号]R285.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.03.004

Building of Hypertensive Heart Failure Rat Models

LI Xinchun, LIANG Hao, HU Zhixi*, HU Siyuan, WEN Yang, ZHONG Senjie, LI Lin

(Diagnostic Institute of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To build the rat model of hypertension heart failure. **Methods** Eighteen Dahl salt sensitive rats were divided into normal group and model group feed by 0.3% NaCl low-salt and 8% NaCl high-salt for 20 weeks, respectively. After 20 weeks, the daily behavior and physical signs of the rats were observed. The blood pressure, serum N-terminal-pro-brain-natriuretic-peptide (NT-proBNP) content of the rats were observed. The left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) were measured by color doppler ultrasound instrument. The HE dyed myocardial cells and kidney tissue were observed by electron microscope of the rats. **Results** Blood pressure of normal group rats maintained at about 140 mmHg, and blood pressure of the model group rats kept rising up to 250 mmHg after eating high-salt feed. Compared with normal group, there are significant differences in the NT-proBNP, LVEF and LVFS ($P<0.01$). **Conclusion** The rats model can well simulate the disease process that normal secondary hypertension rats develop hypertensive heart failure rats. The rat model can be used for the research of hypertensive heart failure disease.

[Keywords] hypertension; heart failure; Dahl salt sensitive rats; rat models

心力衰竭是各种心血管疾病的终末期表现和最主要的死因,其发病率高,5年存活率与恶性肿瘤相仿^[1]。我国最近一次高血压流行病学调查发现:18岁以上人群高血压患病率为 18.8%,并且随着年龄

的增加,高血压导致心衰患病率迅速增加,发病率居世界前列^[2]。而高血压性心脏病一般进展为心室肥大和纤维化,最终导致舒张性心力衰竭(dilated heart failure, DHF)。世界卫生组织研究发现,

[收稿日期]2016-09-13

[基金项目]国家自然科学基金项目(81373550)。

[作者简介]李欣春,男,在读硕士研究生,研究方向:心血管疾病证本质与诊治规律。

[通讯作者]* 胡志希,男,教授,博士研究生导师,E-mail:5471313@sohu.com。

高血压、左室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)和冠心病是导致舒张功能障碍的主要危险因素。Bonow等发现左室 DHF 中 53%~60%为高血压性心脏病,20%~26%为冠心病,10%为肥厚性心肌病。以上数据证明高血压是引起左室 DHF 的常见病因之一^[3]。DiNicolantonio 研究发现,摄入过量食盐能引起高血压及与其相关的并发症,如舒张性心力衰竭,而控制高血压可有效降低发生心力衰竭的危险^[4]。

高患病率、高住院率、高病死率及由此带来的巨大经济负担,使得心力衰竭一直为国内外医学研究的重点和热点。为了更好地研究高血压心衰疾病,迫切需要研制一种稳定、可靠,且具有较高重复性的高血压心衰动物模型。因此,本文以 Dahl 盐敏感性大鼠为材料,阐述了高血压心衰大鼠的制作以及模型评价方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级 Dahl 盐敏感性大鼠 18 只,体质量(220±10) g,由北京维通利华动物公司提供,动物合格证编号为:No.11400700134072,饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室内。

1.2 仪器与主要试剂

超低温冰箱 Forma 900 series,美国 Thermo 公司;5417R 型小型高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;SonoScape-S2N 型彩色多普勒超声诊断仪,深圳开立科技有限公司;移液枪 K39270B,200 μL,德国 Eppendorf 公司;智能无创血压计 BP-2010A,北京 Softron 公司;大鼠 NT-proBNP ELISA 试剂盒 48T, SINOESTBIO 公司,产品批号:G19031685。

1.3 造模方法

将 18 只 Dahl 盐敏感性大鼠分为正常组与模型组,每组 9 只,每 3 只老鼠一笼。正常组大鼠喂养 0.3% NaCl 低盐饲料,模型组大鼠喂养 8% NaCl 高盐饲料,每笼每天喂养饲料 60 g,水 450 mL,每 2 天换洗笼子 1 次。共喂养 20 周。

1.4 检测方法与指标

1.4.1 行为及体征观察 每天早、中、晚观察大鼠的体征、精神状态、饮食情况、活动状况。

1.4.2 血压监测 采用大鼠智能无创血压计检测大鼠的血压变化,每 15 天检测 1 次。同时,记录血压变化对大鼠的行为体征产生的影响。

1.4.3 超声心动图检测 用 SonoScape-S2N 型彩色多普勒超声诊断仪,在二维超声引导下用 M 型超声

经胸骨左心室长轴切面测量左室舒张末期内径(LVEDD),左室收缩末期内径(LVESD),求 3 个心动周期的平均值,并按照 Teichholtz 公式计算左心室射血分数(LVEF)及左室短轴缩短率(LVFS)。

1.4.4 心肌细胞和肾脏 HE 染色 取出大鼠心脏和肾脏后经固定、脱水、包埋以及切片后,将心脏切片和肾脏切片用苏木精—伊红染色法染色,在光镜下以 200 倍或 400 倍观察心肌细胞及肾单位的形态学变化。

1.4.5 血清 NT-proBNP 样本制备及检测方法 目前,NT-proBNP 是诊断心力衰竭较好的指标^[5]。大鼠经 10%水合氯醛按 4 mL/kg 计量腹腔注射麻醉后,使用采血针和采血管给大鼠腹主动脉取血,采血完毕常温静置 20 min 后,以 3 500 r/min 离心 10 min,立即提取上清液分装在离心管里放在零下 80 ℃冰箱里保存。待测时,先将血清室温放置 2 h 后,1 000 r/min 离心 15 min,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对血清进行 NT-proBNP 含量检测。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件分析,数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若数据满足正态性和方差齐性,则两组间的比较采用成组 *t* 检验法;不满足方差齐性,则采用 *t'* 检验。*P*<0.05 表明差异有统计学意义,*P*<0.01 表明差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠成活情况

造模周期内,9 只正常组大鼠均存活;9 只模型组大鼠死亡 2 只。

2.2 模型动物一般状况观察

正常组大鼠动静如常,行为正常,毛发光泽呈白色,抓取时稍有反抗,性情较温顺;模型组大鼠精神亢奋,咬笼打架,时常有大鼠腿部或尾部出血,毛发枯槁,无光泽,腹部毛发稀疏,抓取时反抗剧烈,时常跳跃反弓躯体试图咬人。

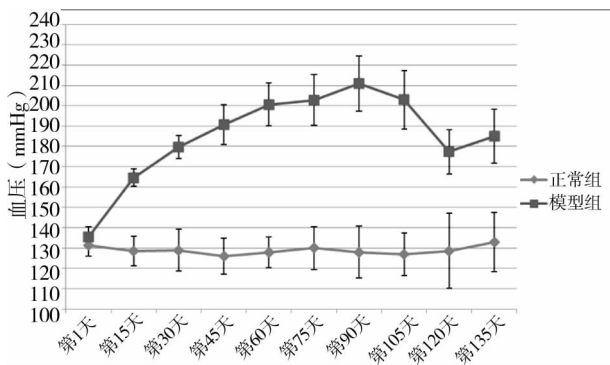
2.3 大鼠血压监测值比较

从图中得知,模型组自从喂食高盐饲料后,一直处于高血压状态,血压甚至达到 220 mmHg 以上;而喂食低盐饲料的正常组血压基本维持在 140 mmHg 以下,尚未达到高血压诊断指标(140 mmHg),难以构成心脏器质性病变,见图 1。

2.4 各组大鼠心功能参数比较

造模结束后,模型组 LVEF、LVFS 明显低于正常组,与正常组比较差异有显著统计学意义(*P*<0.01),见表 1。结合图 1,说明由于受血压影响对各组大鼠

LVEF 和 LVFS 产生了差异。



注:红线代表模型组,前 90 天统计数量:9 只,第 105 天统计数量:8 只,第 120 天统计数量:7 只。蓝线代表正常组,统计数量:9 只。

图 1 大鼠血压观测图

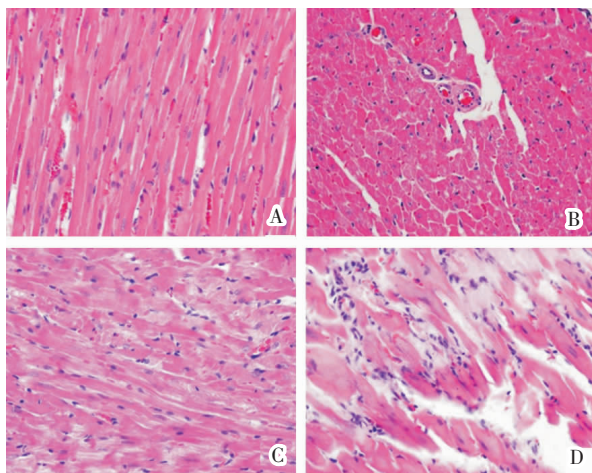
表 1 各组大鼠心功能参数比较 (% $\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVEF	LVFS
正常组	9	84.00±5.61	53.11±5.93
模型组	7	68.43±4.35*	36.29±5.12#
F 值		0.88	1.14
P 值		0.00	0.00

注:与正常组比较,* $P<0.01$ 。

2.5 心肌 HE 染色比较

正常组:心肌结构清晰,心肌闰盘、横纹清晰,横切面可见心肌纤维排列均匀、整齐,心肌细胞核位于边缘,核大小、形态正常,心肌纤维未见断裂缺损及空白区,见图 2。模型组:心肌结构模糊,心肌闰盘不清,横纹消失,肌纤维呈波浪形排列,细胞间缝隙增大,心肌细胞水肿增大或溶解,出现大量的炎症细胞。从心肌 HE 染色图片可以得知,不同组别心肌病理学形态存在较大的差异,模型组大鼠心肌细胞水肿、脱落,肌纤维溶解恰好解释了模型组大鼠 EF 以及 FS 明显降低的原因。

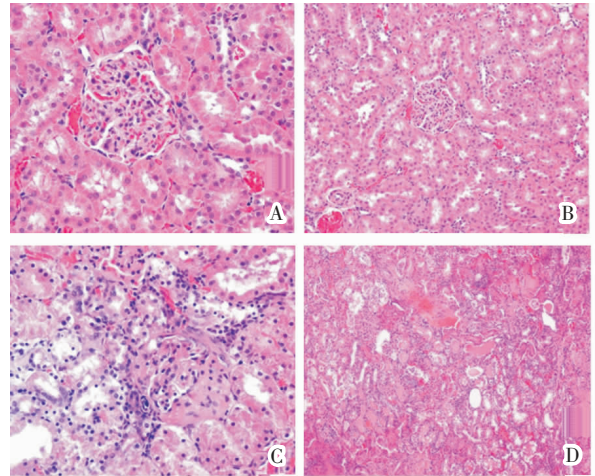


注:A-D 组分别为正常组心肌细胞纵切面、正常组心肌细胞横切面、模型组心肌细胞纵切面、模型组心肌细胞横切面。

图 2 心肌细胞显微镜观察图 (HE×400)

2.6 肾单位 HE 染色

正常组:肾小球内毛细血管清晰,基底膜无增厚或皱缩,近端小管及远端小管官腔形态大小正常,且内部均无异常管型,见图 3。模型组:肾小球内纤维化严重,只可见少量的毛细血管,基底膜皱缩,近端小管及远端小管上皮细胞空泡变性及脱落,其内部可见大量蛋白管型。



注:A-D 组分别为正常组肾单位(×400)、正常组肾单位(×200)、模型组肾单位(HE×400)、模型组肾单位(×200)。

图 3 肾单位光学显微镜图(HE)

2.7 大鼠血清 NT-proBNP 指标检测

与正常组比较,模型组 NT-proBNP 增多明显增高,两总体均数差异有统计学意义($P<0.01$),说明制作高血压心力衰竭模型较为成功,见表 2。

表 2 各组大鼠血清 NT-proBNP 比较 ($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	NT-proBNP
正常组	9	323.63±114.30
模型组	7	453.83±33.63#
F 值		14.48
P 值		0.00

注:与正常组比较,# $P<0.01$ 。

3 讨论

Dahl 种是一种遗传性盐敏感性高血压动物模型,Dahl 将大鼠的子代进行重复交配,培养出通过遗传性盐负荷使血压升高的 S 种(Dahl 盐敏感性大鼠:DSR)和正常血压的 R 种(Dahl 盐非敏感性大鼠:DRR)。将 DSR 的肾移植给 DRR 时,DRR 便产生盐敏感性高血压,反之,将 DSR 的肾与 DRR 的肾置换时,DSR 的血压转为正常,表明摄盐的确与高血压发病相关。Dahl 盐敏感性高血压大鼠是遗传性高血压大鼠的品系之一,该模型无需进行手术和专门给药,只需在

其生长过程中给予盐即可成为高血压模型^[6]。因此,依据该种大鼠生理特性,即进食高盐饲料血压即升高,而进食低盐饲料对血压无影响,本实验无需设置空白对照组,进食低盐饲料的即为正常组,而进食高盐饲料的即为模型组。另外,与进食低盐饲料的Dahl种大鼠相比,进食高盐饲料的Dahl种大鼠随着血压升高会伴有严重的肾小球硬化,血液中血管紧张素II(Angiotensin II, Ang II)含量也较少^[7]。因此,由于该种类大鼠对盐敏感程度较高,如不加以控制饮食,长期大量摄入钠盐极易引起肾小球滤过功能降低、近端小管及远端小管重吸收能力减弱导致大量蛋白丢失、血容量下降、肠道蠕动减弱^[8],以至于大鼠生命后期体格瘦小,腹部却膨隆。因此,我们在喂养的时候应控制大鼠每日饮食钠盐的含量,模型组按照平均每只大鼠每日进食1.6 g NaCl的量喂养,虽然可见模型组大鼠血压稳步上升,但是在喂养至120 d时,有2只大鼠死亡,解剖后发现膨隆的腹部里是肠管内淤积的粪便,这也和临床上肾衰竭合并肠梗阻的病例相符^[9]。鉴于此结果,我们后期还可以继续探究既可以保证高血压心衰大鼠模型成功又可以降低死亡率的每日进食钠盐含量临界值范围。也正是由于死去的2只大鼠导致在第120天测量大鼠血压时平均值降低。

实验结果显示即使模型组大鼠的左室射血分数也并没有低于40%,即该模型不是收缩期心衰;反而其射血分数一直保持在50%以上,理应是射血分数保留的心衰,符合高血压导致心力衰竭的病理变化^[10]。但是从HE染色结果得知,心肌细胞部分水肿和溶解,必然会导致心肌收缩能力减弱,因此模型组的射血分数比正常组低。NT-proBNP是B型脑钠肽(BNP)分裂后的N端片段,目前已知它血清中浓度高,半衰期较BNP长,且为一直链结构,体外生物活性稳定,易检测,可用于评价心功能^[5]。同时,有研究证实,NT-proBNP水平随美国纽约心脏病学会(NYHA)首先提出的心功能分级增加而升高,随治疗后病情缓解而呈明显下降^[11]。因此,NT-proBNP是判断心力衰竭程度的一个重要指标。

通过了解NT-proBNP对诊断心衰疾病的意义,

以及Dahl盐敏感性大鼠的生理特性,结合本实验左室射血分数、短轴缩短率和心肌HE染色结果可得知,通过高盐饲料喂养Dahl盐敏感性高血压大鼠可以很好地模拟高血压病发展为高血压心衰疾病的动态模型,可为研究高血压心力衰竭提供一个可靠的动物模型。

参考文献:

- [1] Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(1): 30-41.
- [2] 李立明,饶克勤,孔灵芝,等.中国居民2002年营养与健康状况调查[J].*中华流行病学杂志*,2005(7):478-484.
- [3] Fischer M, Baessler A, Hense HW, et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in the community. Results from a Doppler echocardiographic-based survey of a population sample[J]. *Eur Heart J*. 2003, 24(4): 320-328.
- [4] DiNicolantonio JJ, Chatterjee S, O'Keefe JH. Dietary salt restriction in heart failure: where is the evidence?[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2016, 58(4): 401-406.
- [5] Ibrahim I, Kuan WS, Frampton C, et al. Superior performance of N-terminal pro brain natriuretic peptide for diagnosis of acute decompensated heart failure in an asian compared with a western setting[J]. *Eur J Heart Fail*, 2017, 19(2): 209-217.
- [6] Pavlov TS, Levchenko V, Ilatovskaya DV, et al. Renal sodium transport in renin-deficient Dahl salt-sensitive rats [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2016, 17(3): 1-7.
- [7] Wu Y, Takahashi H, Suzuki E, et al. Impaired response of regulator of Gαq signaling-2 mRNA to angiotensin II and hypertensive renal injury in Dahl salt-sensitive rats [J]. *Hypertens Res*, 2016, 39(4): 210-216.
- [8] Nerbass FB, Pecoits-Filho R, McIntyre NJ, et al. High sodium intake is associated with important risk factors in a large cohort of chronic kidney disease patients[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2015, 69(7): 786-790.
- [9] 洪汉利,陈统清,许玉燕,等.肾病综合征并发低位小肠梗阻1例报告[J].*吉林医学*,2014(2):444-445.
- [10] Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, et al. B-type natriuretic peptides and ejection fraction for prognosis after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2003, 107(22): 2786-2792.
- [11] Richards AM. The relationship of plasma NT-proBNP to age and outcomes in heart failure[J]. *JACC Heart Fail*, 2016, 4(9): 746-748.

(本文编辑 杨 瑛)