

文章编号 1006-8147(2017)06-0498-04

论 著

# 慢性间歇缺氧心房重构模型的建立

张凯,王卫定,赵志强,张跃,袁梦,李广平

(天津医科大学第二医院心脏科,天津市心血管病离子与分子机能重点实验室,天津心脏病研究所,天津300211)

**摘要** 目的:通过慢性间歇缺氧的方法建立大鼠心房颤动(AF)纤维化模型。方法:16只SD雄性大鼠随机分为慢性间歇缺氧组(模型组)和空白对照组,每组8只,慢性间歇缺氧组大鼠置于低压氧舱中,循环充入氮气与氧气,每次循环时间为300s,其中充入氮气时间为210s,充入氧气时间为90s,使舱内氧浓度波动于8%~21%之间。空白对照组普食喂养,未作干预。第31天称重后行超声心动图检查评价心功能并处死大鼠,留取组织进行相应实验,Masson染色并分析心房纤维化程度。结果:模型组大鼠心房纤维化程度与对照组相比明显增加( $P<0.05$ ),模型组大鼠肺动脉压力与对照组相比明显升高。结论:慢性间歇缺氧可导致大鼠心房纤维化,其可以被用来作为研究AF与心房结构重构的重要研究平台。

**关键词** 心房颤动;慢性间歇缺氧;模型

中图分类号 R541.7\*5

文献标志码 A

## Establishment of atrial remodeling model with chronic intermittent hypoxia

ZHANG Kai, WANG Wei-ding, ZHAO Zhi-qiang, ZHANG Yue, YUAN Meng, LI Guang-ping

(Department of Cardiology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Key Laboratory of Ionic-Molecular Function of Cardiovascular Disease, Tianjin Institute of Cardiology, Tianjin 300211, China)

**Abstract Objective:** To establish fibrosis model of atrial fibrillation (AF) through chronic intermittent hypoxia in rat. **Methods:** Sixteen SD male rats were randomly divided into chronic intermittent hypoxia group (model group) and control group ( $n=8$ ). Model group rats were placed in a chamber, which was periodically filled with nitrogen and oxygen. The time for filling with nitrogen was 210 s, and the time for filling oxygen was 90 s. Concentration of oxygen in chamber was between 8% and 21%. Control group was not intervened. The rats were sacrificed after the examination of echocardiography in the thirty-first day. The tissue of atrial was taken for Masson stain to analyze the degree of atrial fibrosis. **Results:** The degree of atrial fibrosis in model group was significantly higher than that in control group ( $P<0.05$ ). The pressure of pulmonary artery in model group was significantly higher than that in control group. **Conclusion:** Chronic intermittent hypoxia can lead to atrial fibrosis in rats, which can be used as an important research platform for AF and atrial remodeling.

**Key words** atrial fibrillation; chronic intermittent hypoxia; model

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是目前临床上最常见的心律失常之一<sup>[1]</sup>,也是21世纪心血管领域的难题之一,虽然近些年来,AF的治疗取得了长足的进步,但仍然存在很多问题需要进一步探索研究,对于AF的防控还没有找到根本的切入点。AF电重构与结构性重构存在密切关系,是AF产生和维持的基础<sup>[2]</sup>。心房纤维化是最重要的心房结构重构之一,同时心房纤维化也可能是AF发生发展的基质之一<sup>[3]</sup>,因此心房纤维化模型也常被用来作为研究AF心房重构的重要研究平台。由于大鼠间歇缺氧纤维化模型是目前较为认可的AF模型之一<sup>[4-6]</sup>,我们拟通过此法建立大鼠AF心房纤维化模型,观察模型大鼠心房肌组织纤维化程度以及纤维化相

关因子的表达,同时探究离子通道、基因和蛋白表达的变化。之后将探究相关药物对AF模型的干预作用,以探讨药物对AF电重构和结构重构的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 雄性成年Sprague-Dawley大鼠16只,由奥易德实验用品有限公司提供;调控式低压氧舱,由南京新飞分析仪器制造有限公司生产;自制鼠笼;氧气,天津医科大学第二医院氧气站提供;氮气,坤腾气体公司提供;多功能自动脱水机,徕卡显微系统(上海)有限公司生产;生物组织包埋机,天津天利航空机电有限公司生产;试验用小动物呼吸机(HX-101E),成都泰盟软件有限公司生产;小动物超声心动图仪;Masson染色试剂盒,南京建成科技有限公司生产。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠慢性间歇缺氧模型建立 雄性成年

基金项目 国家自然科学基金面上项目基金资助(81570304)

作者简介 张凯(1991-),男,硕士在读,研究方向:心律失常;通信作者:李广平,E-mail:tjcardiol@126.com。

Sprague-Dawley 大鼠 16 只,体质量约 220~250 g,随机分为慢性间歇缺氧组(模型组)与空白对照组,每组 8 只,普食喂养。将模型组大鼠放入自制鼠笼,置于调控式低压氧舱的密闭舱中,舱内设有氧浓度分析装置,可根据舱内氧浓度开放关闭充气阀门。设定程序并调整流量表,氧气流量为 5 L/min,使密闭舱中氧气浓度逐渐升高,当密闭舱中氧浓度达 21% 时,分析仪自动关闭氧气阀门停止充气,当舱中氧浓度再次低于 20% 时,氧气阀门再次打开,持续时间为 90 s。90 s 后仪器跳转阀门,氮气阀门自动打开充入氮气,设定氮气流量为 10 L/min,使密闭舱中氧气浓度逐渐降低,当密闭舱中氧浓度达 8% 时,仪器自动停止充气,使密闭箱中氧浓度逐渐降低至 8% 并维持至少 50 s,当舱内氧浓度再次高于 9% 时,氮气阀门再次打开,持续时间为 210 s,1 次循环时间为 300 s。第 1 天缺氧时间为 2 h,之后每天增加 1 h,直至每日缺氧 6 h,共 30 d(图 1)。



图 1 慢性间歇缺氧心房重构模型建立过程示意图

Fig 1 Establishment of the atrial remodeling model with chronic intermittent hypoxia

1.2.2 超声心动图检查 模型建立 30 d 后,大鼠称重后采用气体麻醉的方法麻醉,固定于动物平台上,使用小动物超声仪行心脏彩超检查,图像采集分析使用 VisualSonics Vevo2100 成像系统(图 2)。



图 2 心脏彩超检查示意图

Fig 2 Process of cardiac color Doppler ultrasound examination

采集数据包括左房内径(LAd)、左室舒张末内径(LVDd)、左室收缩末内径(LVSd)、右室舒张末内径(RVDd)、右室收缩末内径(RVSd)、肺动脉加速时间(PAT)、左室后壁厚度(LVPW),并根据数据估算

左室射血分数(LVEF)与肺动脉压力,根据 Haham 提出的公式( $79-0.45 \times \text{PAT}$ )定量计算平均肺动脉压力(mPAP)。根据 Teichholtz 法( $V=7.0/(2.4+D) \times D^3$ )测量 LVEF。计数资料分别测量 3 个心动周期取平均值。

1.2.3 取材及病理学实验方案 心脏彩超检查完成后,使用 10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,麻醉成功后将大鼠固定于动物平台上,固定四肢,延胸骨中线剪开皮肤,分离皮下组织,暴露心脏后,剪取心脏后置于预冷的 PBS 缓冲液中清洗干净,去除脂肪组织,留取心房组织(分为左右心房两部分),固定于 4% 的中性甲醛溶液中,固定时间为 24~72 h,之后使用脱水机脱水,过程为:50%乙醇 1 h,60%乙醇 1 h,70%乙醇 1 h,80%乙醇 1 h,90%乙醇 1 h,95%乙醇 I 1 h,95%乙醇 II 1 h,无水乙醇 I 1 h,无水乙醇 II 1 h,二甲苯无水乙醇混合液(1:1)30 min,二甲苯 I 1 h,二甲苯 II 1 h,石蜡 I 1.5 h,石蜡 II 1.5 h。之后使用生物组织包埋机石蜡包埋,蜡块于 4℃ 存放 24 h 后切片(厚度为 5  $\mu\text{m}$ ),烘箱 60℃ 烘干 1~2 h,进行相应病理学染色。苏木素-伊红(H-E)染色,用于观察心房组织一般形态学变化;Masson 染色,包括核染、浆染、分色、复染 4 部分,组织中的纤维成分呈现为蓝色,正常心肌呈现为红色,观察心房组织纤维化程度,同时测定胶原分数  $\{(\text{蓝色面积}/(\text{红色面积}+\text{蓝色面积})) \times 100\%\}$ ,每张玻片在 10×40 倍视野下随机拍摄 5 张照片,在 10×20 倍视野下随机拍摄 3 张照片,分别计算每张图片胶原分数,图像分析采用显微镜图像分析软件(Image-Pro Plus7.0),左右心房分别测定胶原分数,并进行统计学分析。

1.3 统计学分析 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,实验数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,双侧  $P < 0.05$  认为存在统计学差异。

## 2 结果

2.1 胶原分数 如表 1 所示两组大鼠心房胶原分数比较,模型组大鼠心房纤维化程度明显高于对照组,胶原分数计算结果存在统计学差异,慢性间歇缺氧可导致心房纤维化程度明显增加。此外,模型组大鼠心房组织致密性降低,走行紊乱,可见断裂。如图 3 所示,模型组大鼠心房肌 Masson 染色显示纤维成分明显增加,心房纤维化程度明显高于对照组。

2.2 心脏彩超 模型组大鼠的平均肺动脉压力(mPAP)较对照组明显升高( $P=0.033$ ),两组大鼠其他心脏彩超数据无明显统计学差异( $P > 0.05$ )(表 2)。

综上,模型组大鼠心房肌纤维化程度明显高于对照组,差异有统计学意义。提示本模型的建立达到预期目标。

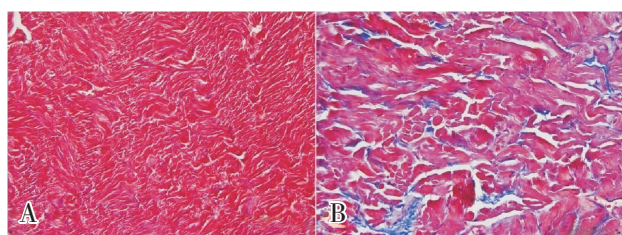


表 1 两组大鼠心房胶原分数 ( $\bar{x}\pm s, \%$ )Tab 1 Comparison of collagen fraction between two groups ( $\bar{x}\pm s, \%$ )

组别	左房胶原分数(400 倍)	P	右房胶原分数(400 倍)	P	左房胶原分数(200 倍)	P	右房胶原分数(200 倍)	P
模型组	4.26±3.94	<0.001	4.92±4.79	0.001	5.92±4.74	0.076	7.67±4.12	0.003
空白组	1.00±0.77		1.05±0.72		2.44±1.95		3.57±1.83	

表 2 两组大鼠心脏彩超数据 ( $\bar{x}\pm s$ )Tab 2 Results of cardiac color doppler ultrasound for the two groups ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	Lad/mm	LVDd/mm	LVSD/mm	LVEF/%	PAT/ms	mPAP/(mmHg)
模型组	8	3.81±1.29	6.69±0.64	4.35±0.50	74.35±2.1	27.62±4.91	66.57±2.21
对照组	8	3.39±0.41	6.28±0.70	4.25±0.60	72.51±4.32	38.65±2.31	61.61±1.04
P		0.144	0.587	0.160	0.301		0.033



A.对照组 B.模型组

图 3 两组大鼠心房组织 Masson 染色结果( $\times 400$ )Fig 3 Results of Masson stain for the two groups( $\times 400$ )

### 3 讨论

心房纤维化是 AF 最重要的病理改变, 心房的结构重构进而导致电重构, 其中涉及离子通道和多条信号通路的变化, 这些信号通路的改变调控相关的炎症和纤维化因子, 促进心肌纤维化。目前研究较多的通路包括 PI3K/Akt/MAPK 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、TGF- $\beta$ /Smad2 信号通路<sup>[7-8]</sup>, 还涉及多种因子的改变<sup>[9]</sup>, 如基质金属蛋白酶(MMPs)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)、凋亡相关蛋白 4(PDCD4), 其均可能参与心房纤维化的进程。此外, 相关研究<sup>[10-12]</sup>显示某些微小核糖核苷酸(microRNA)在心房纤维化进程中起着重要的调控作用, microRNA(miRNA)是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, 它们参与转录后基因表达调控, 研究较多也比较肯定的与心肌纤维化有关的有 microRNA-1 (miR-1)、miR-21、miR-26、miR-29、miR-133b、miR-146 和 miR-378 等等。miRNAs 如何对心房离子通道重构、心肌纤维化及成纤维细胞进行调控, 通过什么信号通路仍需进一步研究。相关研究<sup>[12]</sup>显示, miR-21 作用于靶基因 *spry1*、*PTEN*、*PDCD4* 从而激活相关通路, 并通过一定途径调控离子通道的改变<sup>[13]</sup>, 在心房纤维化的过程中起着重要作用。而上述结果仍需更多的研究及良好的研究平台进一步证实, 因而 AF 心房纤维化模型的建立至

关重要。

毫无疑问, 疾病研究的最佳对象是患者, AF 机制和基质的研究涉及病理学、分子生物学、细胞学等多个学科, 因而获取心房组织进行研究是必不可少的过程, 由于涉及道德、伦理等方面的问题, 难以获取 AF 患者的心房组织, 因而动物实验成为最优选择。目前 AF 动物模型的建立有很多种, 包括犬心房快速起搏模型和兔糖尿病 AF 模型等<sup>[14-15]</sup>, 此外相关文献也提出主动脉缩窄心衰后心房重构 AF 模型、心肌梗死心房重构 AF 模型和基因敲除大鼠 AF 模型等<sup>[9]</sup>, 但以大鼠间歇缺氧心房纤维化模型较为贴近大多数 AF 的发病机制和基质。此外, 大鼠体积较小、生长周期较短以及基因表达的可操作性, 使得其作为模型具有一定优势。

本模型的建立具有重要的实际意义, 其有助于进一步探究 AF 的发病机制与基质, 寻找 AF 治疗的新靶点, Ramos 等<sup>[6]</sup>利用小鼠间歇缺氧心房纤维化模型探究了间充质干细胞的干预作用, 研究结果表明间充质干细胞可以改善心房纤维化, 降低阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)导致的机体炎症反应。后续我们拟从心电生理学、细胞学、分子生物学水平进行观察研究, 进一步认识 AF 的基质和机制, 进而探讨 AF 心房纤维化相关的基因、调控因素及信号通路。此外我们将探究相应药物对模型的影响, 探索干预 AF 的可行方法, 尤其针对 AF 心房纤维化的上游干预靶点。此外, 本模型的建立也是研究 OSA 的良好平台, 还有助于进一步了解 OSA 促发 AF 的机制。

实验结果显示, 模型组大鼠的心房纤维化程度明显增加, 与对照组大鼠相比统计学差异明显, 左房 200 倍视野测定的胶原分数所得 P 值为 0.076, 综合对比来看, 仍可认为存在差异, 即模型组与对照组大鼠的心房胶原分数存在统计学差异。超声心

动图结果显示,模型组大鼠肺动脉压力明显高于对照组( $P=0.033$ ),模型组大鼠心房心室尚未出现结构性改变,但可以观察到部分模型组大鼠出现左、右心室室壁增厚伴不规则运动,提示正处于心房心室结构改变的初期。此外,由于动物数量的限制,尚需更大规模的实验进一步证实,后续将进行分子生物学相关的实验进一步探究。本实验的结果提示慢性间歇缺氧房颤心房纤维化模型的建立达到预期目标。此模型的建立对进一步认识 AF 的基质和机制,探索干预 AF 的可行途径具有一定意义。

#### 参考文献:

- [1] Wann L S, Curtis A B, January C T, et al. 2011 ACCF/AHA/HRS focused update on the management of patients with atrial fibrillation (Update on Dabigatran)[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(11): 1330
- [2] Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, et al. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: A translational appraisal[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(1): 265
- [3] Everett T H 4th, Olgin J E. Atrial fibrosis and the mechanisms of atrial fibrillation[J]. *Heart Rhythm*, 2007, 4(3 Suppl): 24
- [4] Nishida K, Michael G, Dobrev D, et al. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities[J]. *Europace*, 2010, 12(2): 160
- [5] Riley G, Syeda F, Kirchhof P, et al. An introduction to murine models of atrial fibrillation[J]. *Front Physiol*, 2012, 8(3): 296
- [6] Ramos P, Rubies C, Torres M, et al. Atrial fibrosis in a chronic murine model of obstructive sleep apnea: mechanisms and prevention by mesenchymal stem cells[J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 54
- [7] Qu Y C, Du Y M, Wu S L, et al. Activated nuclear factor- $\kappa$ B and increased tumor necrosis factor- $\alpha$  in atrial tissue of atrial fibrillation[J]. *Scand Cardiovasc J*, 2009, 43(5): 292
- [8] Katoh Y, Nakazato Y J. Can we predict electroanatomical remodeling of left atrium in patients with non-valvular atrial fibrillation by transforming growth factor- $\beta$  and tissue inhibitor of metalloproteinase-1[J]. *Circ J*, 2011, 75(3): 536
- [9] Diao S L, Xu H P, Zhang B, et al. Associations of MMP-2, BAX, and Bcl-2 mRNA and protein expressions with development of atrial fibrillation[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 1497
- [10] Jalife J, Kaur K. Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. Trends in cardiovascular medicine[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2015, 25(6): 475
- [11] Wang J, Wang Y, Han J, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in the left atrium of patients with nonvalvular paroxysmal[J]. *Heart Rhythm*, 2015, 12(5): 1018
- [12] Santulli G, Iaccarino G, De Luca N, et al. Atrial fibrillation and microRNAs[J]. *Front Physiol*, 2014, 5: 15
- [13] Barana A, Matamoros M, Dolz-Gaiton P, et al. Chronic atrial fibrillation increases microRNA-21 in human atrial myocytes decreasing L-type calcium current[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2014, 7(5): 861
- [14] Satoh A, Niwano S, Niwano H, et al. Aliskiren suppresses atrial electrical and structural remodeling in a canine model of atrial fibrillation[J]. *Heart Vessels*, 2017, 32(1): 90
- [15] Fu H, Liu C, Li J, et al. Impaired atrial electromechanical function and atrial fibrillation promotion in alloxan-induced diabetic rabbits[J]. *Cardiol J*, 2013, 20(1): 59

(2017-01-04 收稿)

(上接第 492 页)

#### 参考文献:

- [1] Mao Y, Keller E T, Garfield D H, et al. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(1/2): 303
- [2] Swartz M A, Iida N, Roberts E W, et al. Tumor microenvironment complexity: emerging roles in cancer therapy[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2473
- [3] Fleming J M, Miller T C, Quinones M, et al. The normal breast microenvironment of premenopausal women differentially influences the behavior of breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. *BMC Med*, 2010, 8: 27
- [4] Cichon M A, Degnim A C, Visscher D W, et al. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2010, 15(4): 389
- [5] Saito R A, Micke P, Paulsson J, et al. Forkhead box F1 regulates tumor-promoting properties of cancer-associated fibroblasts in lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2644
- [6] Joyce J A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(6): 513
- [7] Franco O E, Shaw A K, Strand D W, et al. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(1): 33
- [8] Erez N, Truitt M, Olson P, et al. Cancer-Associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate Tumor-Promoting inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent manner[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(2): 135
- [9] Allaoui R, Bergenfelz C, Mohlin S, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted CXCL16 attracts monocytes to promote stroma activation in triple-negative breast cancers[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13050
- [10] Heldin C H, Rubin K, Pietras K, et al. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(10): 806
- [11] Neri S, Hashimoto H, Kii H, et al. Cancer cell invasion driven by extracellular matrix remodeling is dependent on the properties of cancer-associated fibroblasts[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(2): 437
- [12] Gascard P, Tlsty T D. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(9): 1002

(2017-01-16 收稿)