



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108553195 A
(43)申请公布日 2018.09.21

(21)申请号 201711481809.0

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市徐汇区枫林路180号

(72)发明人 吴剑 邹云增 游洁芸 王时俊
黄家园 丁志文 杨春杰 康乐
姜红

(74)专利代理机构 上海容慧专利代理事务所
(普通合伙) 31287

代理人 于晓菁

(51)Int.Cl.

A61D 1/00(2006.01)

A61B 8/06(2006.01)

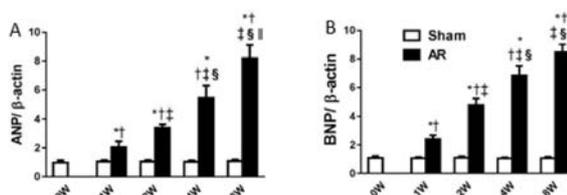
权利要求书1页 说明书6页 附图9页

(54)发明名称

一种建立心脏容量超负荷小鼠模型的方法

(57)摘要

本发明公开了一种建立心脏容量超负荷的小鼠模型的方法。在高频超声引导下,经右侧颈总动脉用内置金属丝套管中的金属丝一次或多次破坏主动脉瓣引起主动脉瓣血液返流,造模过程中随时监测主动脉弓处血流多普勒超声,直到返流程度满意。本发明明显优于现有的动静脉瘘造模方法。本发明建立方便操作、返流量化、重复性好的主动脉瓣返流手术小鼠模型,为容量超负荷心脏重构的转化医学研究提供新型、满意模拟临床病变的模式动物。本发明还可用于与压力超负荷性模型进行心脏重构的差异表达,为阐明两类超负荷心脏重构差异的分子机制奠定基础,并为临床上对不同类型的心脏肥大疾病进行个性化诊疗提供重要参考。



1. 一种建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,通过在高频超声引导下,一次或多次损伤小鼠主动脉瓣,导致主动脉血流返流。

2. 如权利要求1所述的建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 小鼠麻醉后,将小鼠仰卧固定在加热板上,将小鼠四肢末端涂抹导电膏后与加热板的导电区域贴紧;

2) 经右侧颈总动脉插入一根内置金属丝的套管;

3) 在高频超声引导下,清楚显示主动脉瓣根部,将套管前行至主动脉瓣口前,把内置金属丝从套管中伸出并戳破部分主动脉瓣膜;

4) 造模过程中随时监测主动脉弓处血流多普勒超声,当舒张期逆行血流峰值速度达到 $0.4 \pm 0.02\text{m/s}$ 时认为造模成功;

5) 取出套管和金属丝,关闭右侧颈总动脉缺口,缝合颈部皮肤;

6) 小鼠术后给予镇痛。

3. 如权利要求2所述的建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,步骤1)中所述麻醉采用的方式为腹腔注射氯胺酮和甲苯噻嗪。

4. 如权利要求2所述的建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,步骤1)中所述麻醉采用的方式为吸入异氟烷。

5. 如权利要求2所述的建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,步骤2)中所述金属丝为钢丝。

6. 如权利要求2所述的建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,步骤3)和4)中,当舒张期逆行血流峰值速度低于 0.2m/s 时反复戳主动脉瓣,直到返流程度满意为止。

7. 如权利要求2所述的建立容量超负荷模型的方法,其特征在于,步骤6)中所述镇痛使用的镇痛剂为美洛昔康。

8. 如权利要求1或2所述的建立容量超负荷模型的方法在与压力超负荷性模型进行心脏重构的差异表达中的应用。

一种建立心脏容量超负荷小鼠模型的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及一种在高频超声引导下,通过破坏小鼠主动脉瓣,建立心脏容量超负荷模型及对其进行评价的方法。

背景技术

[0002] 心血管疾病在西方发达国家和在我国,已逐渐成为发病率和病死率首因,造成严重的社会经济负担。从源头上发掘心血管病的发病机制并据此进行针对性的防治显得尤为紧迫和必要。心脏的机械应力超负荷(mechanical overload)表现为心脏承受异常升高的机械应力,是各种心血管疾病的病因或并发症,其直接触发心脏重构。机械应力超负荷可分为压力超负荷和容量超负荷两大类。其中,容量超负荷主要作用于心动周期的舒张期(前负荷),引起离心性心脏肥大。容量超负荷不但见于瓣膜病,如主动脉瓣返流、二尖瓣返流,在高血压心脏病终末期、心肌梗死、扩张性心肌病和机体过度运动中,也伴随着容量超负荷的现象。由此可见,发掘容量超负荷导致的离心性心脏重构机制和进行相应的靶向药物干预,意义重大。然而,相比于压力超负荷如汗牛充栋般的研究成果,人们对容量超负荷的研究深度和广度却明显受限,主要原因之一就在于缺乏可方便操作、高效量化、稳定复制的小动物模型。

[0003] 心脏主动脉瓣膜返流病变表现为闭合性不足的瓣膜返流,心脏承受容量超负荷,引起离心性心脏肥大,可为长期的亚临床性,并具有渐进性、退行性的特点。随着人口老龄化的发展,加上随着经济生活改善、膳食不平衡,脂糖类代谢异常、高血压、年龄已取代传统上的风湿性心脏病等因素成为导致瓣膜病的高危因素。相应地,在转化医学研究中,于动物整体水平,稳定建立高度模拟人类心血管疾病的模型,发挥其在体结构功能分析、发病机制探讨、药物新靶点寻找以及药效动力学评价等作用,使之成为心血管疾病防治研究的规范化工具,会为临床心血管疾病的防治提供重要参考,因而具有非常重要的科学意义和临床意义。此外,小鼠由于饲养周期短、操作方便、其基因组明确且与人类有较高相关性、便于开展基因修饰等优势,已经成为心血管疾病研究的主流模式动物。同时,随着微创手术器械和技术的发展,制作容量超负荷手术小鼠模型已具备条件。近年来,有使用超声观察瓣膜返流情况下,血流震荡对血管重构影响的报道。但遗憾的是,该研究并不包含容量超负荷心脏重构的内容。因此,研发和使用合适的容量超负荷小鼠模型,将为容量超负荷心脏肥大、心力衰竭的发病机制研究和临床个性化诊疗发挥重要的推动作用。

[0004] 此前曾有少量报道容量超负荷心脏重构的小鼠模型。相对用得较多的是动静脉瘘模型。虽然这一模型能够表现瓣膜漏导致的心脏功能失代偿的特征,但其没有瓣膜病中最典型的舒张期“返流”特征,并在临床上出现了非特征性的右心室肥大。此前也有实验室试图经右颈总动脉对主动脉瓣造模,但效果不满意。具体为:在2002年和2007年,国际上有两个研究小组,尝试使用压力导管(因为可同时测量主动脉压来判断造模成功与否),经右颈总动脉破坏主动脉瓣,形成主动脉瓣返流。但是,由于未能准确获知主动脉瓣的位置,常常出现压力导管穿破主动脉造成大出血的情况;而且压力导管头端相对于小鼠主动脉瓣来说

较为粗大,极易造成极重度返流,导致死亡率大大增加。正因为高死亡率和低成功率,通过搜索Pubmed和Google Scholar可以发现,这两个研究小组此后再无小鼠主动脉瓣返流模型报道。有鉴于此,美国心脏协会(AHA)发布的针对Animal Models of Heart Failure(心衰的动物模型)发表的官方文件陈述,其并不认可动静脉痿模型为返流性的瓣膜病模型,因而亟待建立高度模拟具有主动脉瓣膜临床特征性病变的新型疾病小鼠模型。

发明内容

[0005] 为解决现有技术的上述缺陷,本发明提供了一种建立容量超负荷模型的方法。通过在高频超声引导下,一次或多次损伤小鼠主动脉瓣,导致主动脉血流返流,前负荷增加,心脏出现离心性肥厚,从而实现临床瓣膜病变的较好模拟。

[0006] 进一步,本发明所述建立容量超负荷模型的方法包括以下步骤:

[0007] 1) 小鼠麻醉后,将小鼠仰卧固定在加热板上,将小鼠四肢末端涂抹导电膏后与加热板的导电区域贴紧;

[0008] 2) 经右侧颈总动脉(right common carotid artery,RCCA)插入一根内置金属丝的套管;

[0009] 3) 在高频超声引导下,清楚显示主动脉瓣根部,将套管前行至主动脉瓣口前,把内置金属丝从套管中伸出并戳破部分主动脉瓣膜;

[0010] 4) 造模过程中随时监测主动脉弓处血流多普勒超声,当舒张期逆行血流峰值速度达到 $0.4 \pm 0.02\text{m/s}$ 时认为造模成功;

[0011] 5) 取出套管和金属丝,关闭右侧颈总动脉缺口,缝合颈部皮肤;

[0012] 6) 小鼠术后给予镇痛。

[0013] 优选地,步骤1)中所述麻醉采用的方式为腹腔注射氯胺酮和甲苯噻嗪,其中氯胺酮的用量优选为145-155mg/kg,最佳为150mg/kg,甲苯噻嗪的用量优选为9-11mg/kg,最佳为10mg/kg。

[0014] 在本发明的另一种优选方式中,步骤1)中所述腹腔麻醉采用的方式为吸入异氟烷;优选地,用3%的异氟烷诱导麻醉,1.5%的异氟烷维持麻醉。

[0015] 优选地,步骤2)中所述金属丝为钢丝,所述钢丝的直径优选为0.15-0.17mm,最佳为0.16mm;所述套管的内径大小合适套住上述钢丝,其材质可以为塑料,优选为生物相容性材料。

[0016] 优选地,步骤3)和4)中,当舒张期逆行血流峰值速度低于 0.2m/s 时可反复戳主动脉瓣,直到返流程度满意为止。

[0017] 优选地,步骤4)通过超声血流多普勒,测量主动脉弓的血流动力学参数。

[0018] 优选地,步骤6)中所述镇痛使用的镇痛剂为美洛昔康,优选的镇痛方式为皮下注射,剂量优选为0.11-0.15mg/只,最佳为0.13mg/只。

[0019] 本发明方法进一步通过心重/体重比(HW/BW),RT-PCR测量心脏肥大标记物、Western blot测量靶蛋白变化,能够为该容量超负荷心脏重构模型提供优异的评价标准。

[0020] 近年问世的小动物高频超声,可以清晰显示小鼠的颈总动脉、主动脉、主动脉瓣和左心室,为导管在体内的定位创造了条件。高频超声仪自带的彩色多普勒和脉冲多普勒可以较好地显示主动脉血流形态和流速,为实时动态监测返流程度、实现可控性控制返流程

度提供了方便。

[0021] 由于右颈总动脉直接连通主动脉,但难以通过肺循环进左心房,因此本发明通过右总动脉针对主动脉瓣造模较之二尖瓣更行之有效。

[0022] 本发明采用手术模型,可避免基因修饰模型所必需的过量小鼠饲养、基因鉴定的步骤,也可避免物理、化学诱导模型里难以控制的对全身组织器官的非特异性作用。因而,构建容量超负荷小鼠手术模型具有得天独厚的优势,更有利于特异性地研究离心性心脏肥大的发病机制、高通量筛选靶基因、以及后续针对性地进行临床前药效观察。同时,随着微创手术器械和技术的发展,选择小鼠通过破坏主动脉瓣制作容量超负荷手术小鼠模型已具备条件。

[0023] 本发明在高频超声引导下,通过破坏小鼠主动脉瓣,建立方便操作、返流量化、重复性好的主动脉瓣返流手术小鼠模型,为容量超负荷心脏重构的转化医学研究提供新型、满意模拟临床病变的模式动物。

[0024] 本发明构建的容量超负荷模型,可用于与经典的压力超负荷性模型进行心脏重构的差异表达,为阐明两类超负荷心脏重构差异的分子机制奠定基础,并为临床上对不同心脏肥大进行个性化诊疗提供重要参考。

[0025] 本发明提供的建立心脏容量超负荷小鼠模型的方法具有以下有益技术特征:

[0026] 1) 该模型是第一个高度模拟临床瓣膜病变导致的左室容量超负荷手术小鼠模型,有望在容量超负荷心脏研究中起到建立标杆的作用。

[0027] 2) 通过高频超声,全过程实时、动态、微创、安全地观察小鼠主动脉返流程,并可控性调整返流至满意程度。

[0028] 3) 手术模型可避免基因修饰模型所必需的过量小鼠饲养、基因鉴定的步骤,也可避免物理、化学诱导模型里难以控制的对全身组织器官的非特异性作用。

[0029] 4) 该模型使用小鼠,较之大动物,具有价廉、繁殖迅速、基因组与人类基因组高度同源、对其进行的基因修饰已被广泛使用等优点。

附图说明

[0030] 图1显示的是用于破坏主动脉瓣的套管和金属丝(下行刻度单位为cm);

[0031] 图2显示的是导丝(套管和金属丝)在高频超声下的影像;

[0032] 图3显示的是主动脉弓血流;注意在真手术(主动脉瓣返流手术)小鼠的心脏舒张期,有明显反向血流;而在假手术(除了不破坏主动脉瓣膜,其他步骤同真手术)小鼠的心脏舒张期,未见反向血流;

[0033] 图4显示可根据需要构建不同返流程度的心脏容量超负荷模型,在基底线以上的血流表示主动脉反向血流;

[0034] 图5显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠主动脉弓血流的变化;

[0035] 图6显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室长轴M型超声图的变化;

[0036] 图7显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室舒张末期内径变化;

[0037] 图8显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室收缩末期内径变化;

[0038] 图9显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室舒张末期后壁厚度变化;

[0039] 图10显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室收缩末期后壁厚度变化;

- [0040] 图11显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室射血分数变化；
- [0041] 图12显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室缩短分数变化；
- [0042] 图13显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力变化；
- [0043] 图14显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力变化速率；
- [0044] 图15显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室收缩末期压力变化；
- [0045] 图16显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室舒张末期压力变化；
- [0046] 图17显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力收缩速率峰值变化；
- [0047] 图18显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力舒张速率峰值变化；
- [0048] 图19显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠心脏大体标本变化；(A) 心脏外观, 标尺=1mm；(B) 左室短轴H&E染色, 标尺=1mm；
- [0049] 图20显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠心脏肥大标记物的变化, (A) 和 (B) 分别代表ANP和BNP的相对变化；
- [0050] 图21显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠心脏靶蛋白Akt的变化；
- [0051] 图22显示的是术后2周主动脉弓处血流多普勒超声图像；
- [0052] 图23显示的是术后2周左室长轴M型超声图像；
- [0053] 图24显示的是术后2周心脏大体标本；
- [0054] 图25显示的是术后2周针对Akt等常见促肥大因子的蛋白质印迹结果。

具体实施方式

[0055] 实施例1心脏容量超负荷小鼠模型的建立

[0056] 对于实施主动脉瓣返流手术(真手术)的小鼠用氯胺酮(150mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)腹腔麻醉后,将小鼠固定在加热板上,将小鼠四肢末端涂抹导电膏后与加热板的导电区域贴紧。随后,经右侧颈总动脉(right common carotid artery,RCCA)插入一根内置0.16mm直径钢丝1的27G套管2(图1和2所示)。在高频超声引导下,清楚显示主动脉瓣根部,将套管前行至主动脉瓣口前,把内置钢丝从套管中伸出并戳破部分主动脉瓣膜(图2所示)。造模过程中随时监测主动脉弓处血流多普勒超声,当舒张期逆行血流峰值速度达到0.4m/s左右时认为造模成功。此时可见小鼠整个主动脉弓在舒张期出现明显反向血流(图3所示)。当舒张期逆行血流峰值速度较低时可反复戳主动脉瓣,直到返流程度满意为止。取出套管和钢丝,关闭RCCA缺口,缝合颈部皮肤。所有小鼠术后均给予美洛昔康(0.13mg/只)皮下注射镇痛。如在操作过程中戳破主动脉或颈总动脉大血管,可对该小鼠行安乐死。对于假手术小鼠,除了不破坏主动脉瓣膜,其他步骤同真手术。

[0057] 实施例2量化控制返流程度的实现

[0058] 通过小动物高频超声对主动脉弓血流进行无创实时的监测,可以量化掌握返流程度,根据实验需要,制作出不同返流程度的小鼠模型(图4)。这比起以往的造瘘后无法量化评估造瘘严重程度的动静脉瘘容量超负荷模型,是一个巨大的优势。

[0059] 实施例3适度返流状态下,术前和术后1周,2周,4周和8周的小鼠左心结构和心功能变化

[0060] 图5所示为手术后1周、2周、4周、8周的小鼠主动脉弓反向血流明显,且在术后各时间点未见明显变化;图6所示为术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室长轴M型超声图的

变化,可见左室内径明显扩大;图7为左室舒张末期内径增加明显,图8为左室收缩末期内径增加明显;图9为左室舒张末期后壁厚度在手术两周后有轻度增加,图10为左室收缩末期后壁厚度在手术两周后有轻度增加;图11为左室射血分数从术后4周起明显下降,图12为左室缩短分数从术后4周起明显下降。* $P < 0.05$ vs. sham, † $P < 0.05$ vs. pre-AR, ‡ $P < 0.05$ vs. 1W, § $P < 0.05$ vs. 2W。

[0061] 实施例4术前和术后1周,2周,4周和8周的小鼠侵入性血流动力学变化

[0062] 小鼠在各观察时间终点前行Millar压力导管进行有创性地监测血流动力学变化。图13显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力变化,可发现术后随时间变化,收缩压和舒张压均升高;图14显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力变化速率,可发现随时间变化,左室压力变化速率减小;图15显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室收缩末期压力变化,术后1周开始升高;图16显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室舒张末期压力变化,术后1周开始升高;图17显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力收缩速率峰值变化,术后2周开始降低;图18显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠左室压力舒张速率峰值变化,术后1周开始降低。

[0063] 实施例5术前和术后1周,2周,4周和8周的小鼠心脏大体标本变化

[0064] 图19显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠心脏大体标本变化,术后1周开始即明显增大;(A)心脏外观,标尺=1mm;(B)左室短轴H&E染色,标尺=1mm。

[0065] 实施例6术前和术后1周,2周,4周和8周的小鼠心脏肥大标记物的变化

[0066] 图20显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠心脏肥大标记物的变化,(A)和(B)分别代表ANP和BNP的相对变化,术后一周开始即明显增加。; † $P < 0.05$ vs. pre-AR, ‡ $P < 0.05$ vs. 1W, § $P < 0.05$ vs. 2W, || $P < 0.05$ vs. 4W。

[0067] 实施例7术前和术后1周,2周,4周和8周的小鼠心脏靶蛋白Akt的变化

[0068] 图21显示的是术前和术后1周、2周、4周、8周的小鼠心脏靶蛋白Akt磷酸化程度的变化,术后一周最高,此后随时间变化下降,但仍高于对应的假手术组; † $P < 0.05$ vs. pre-AR, ‡ $P < 0.05$ vs. 1W。

[0069] 实施例8该容量超负荷(AR)模型与经典压力超负荷(TAC)模型心脏差异

[0070] 图22显示的是术后2周主动脉弓处血流多普勒超声图像,TAC组血流峰值增加明显,AR组血液返流明显;图23显示的是术后2周左室长轴M型超声图像,TAC组心肌肥厚明显,AR组内径扩大明显;图24显示的是术后2周心脏大体标本,TAC组和AR组心脏外观均明显肥大;图25显示的是术后2周针对JNK、p-38、ERK1/2、CaMKII、calcineurin、Akt、 β -arrestin-2等常见促肥大因子的蛋白质印迹结果,检测的大部分促肥大因子在TAC组表达或激活程度明显,在AR组变化较轻或无变化。

[0071] 两类模型均出现明显心脏肥大,其中TAC模型致向心性肥厚,AR模型致离心性肥厚,且TAC组心肌纤维化更加明显。Shamt:TAC的假手术组;TAC:主动脉缩窄组;Shama:AR的假手术组;AR:主动脉瓣返流组;calcineurin:钙调神经磷酸酶;ERK:胞外信号调节激酶。* $P < 0.05$ vs. Shamt; † $P < 0.05$ vs. TAC。

[0072] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思做出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术

方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

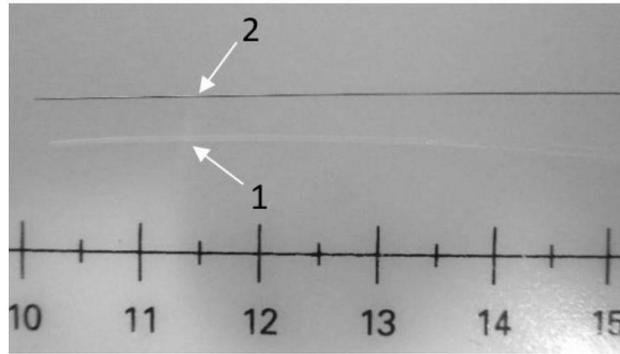


图1

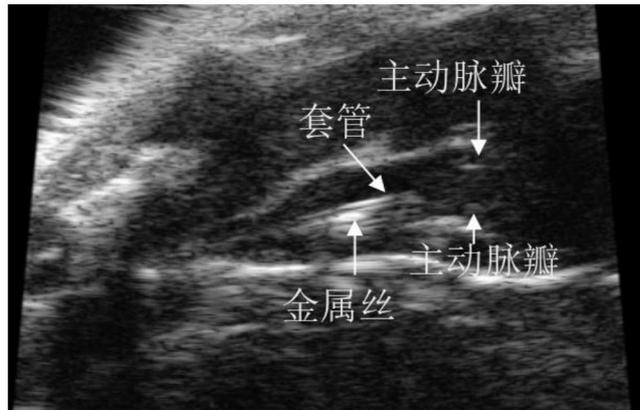


图2

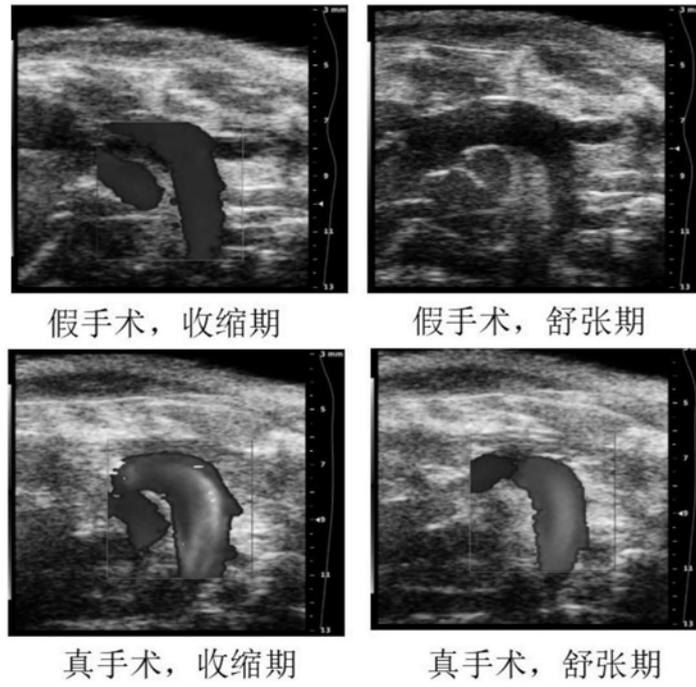


图3

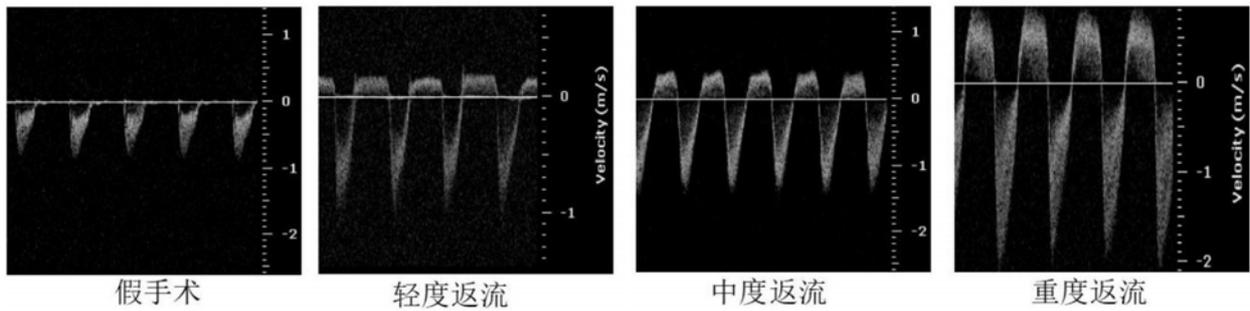


图4

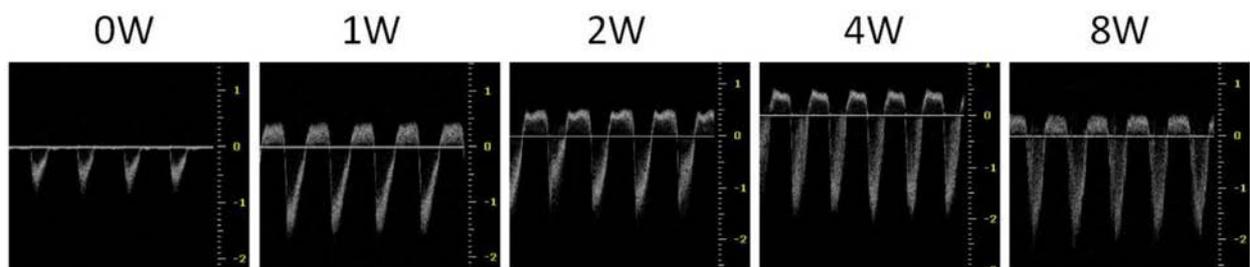


图5

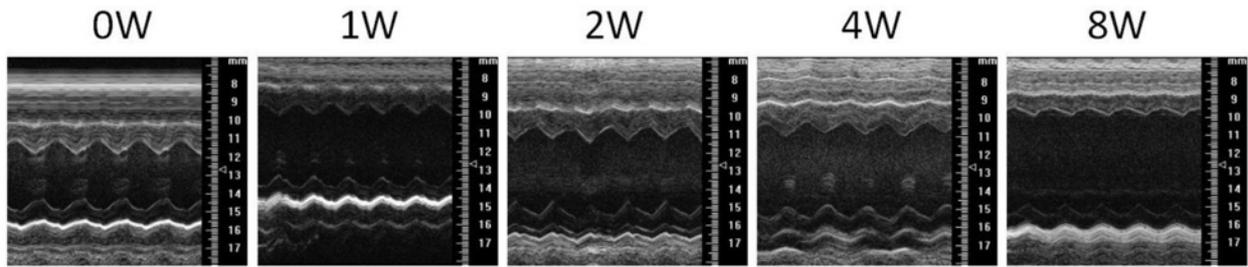


图6

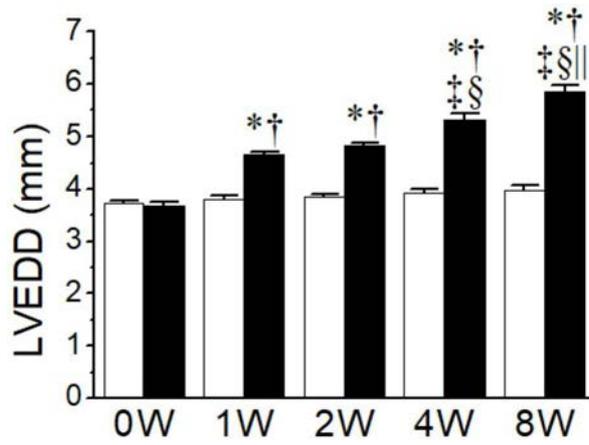


图7

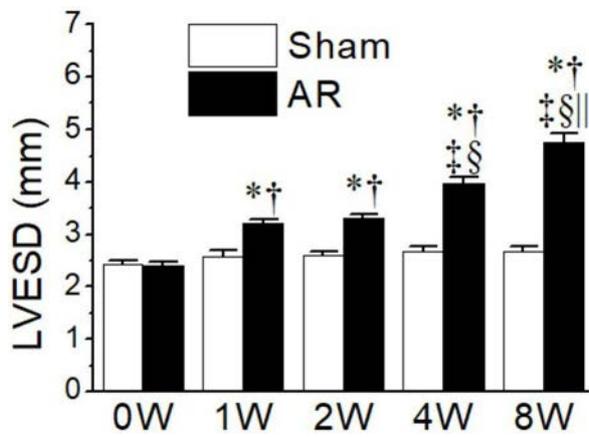


图8

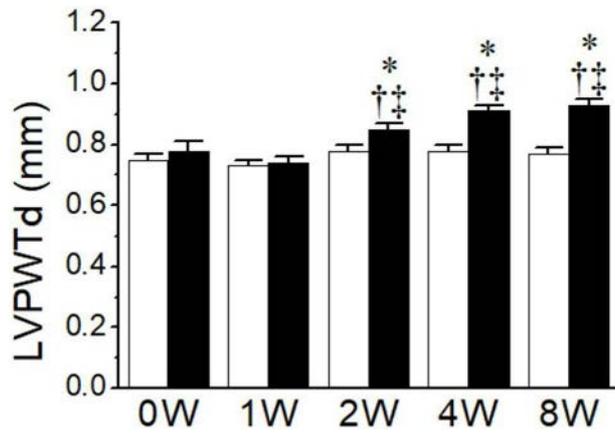


图9

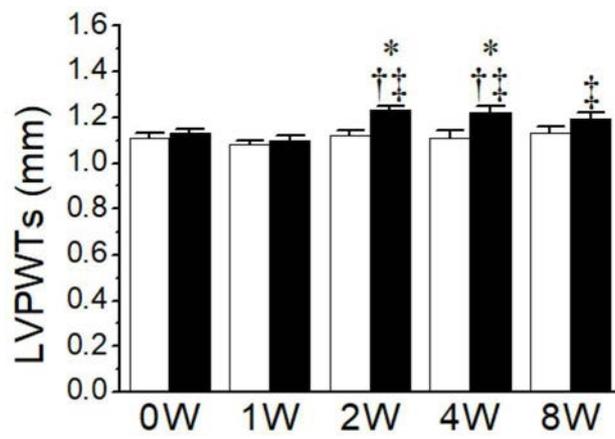


图10

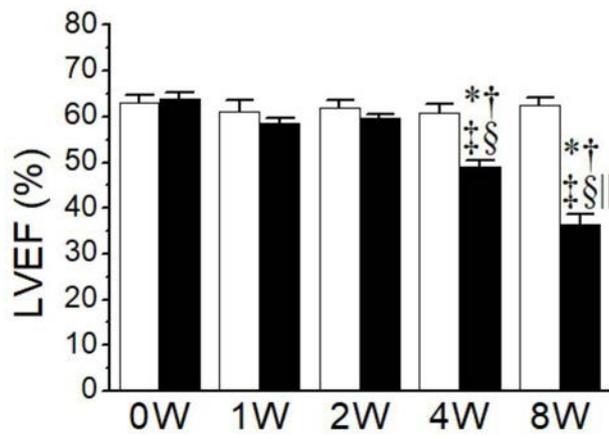


图11

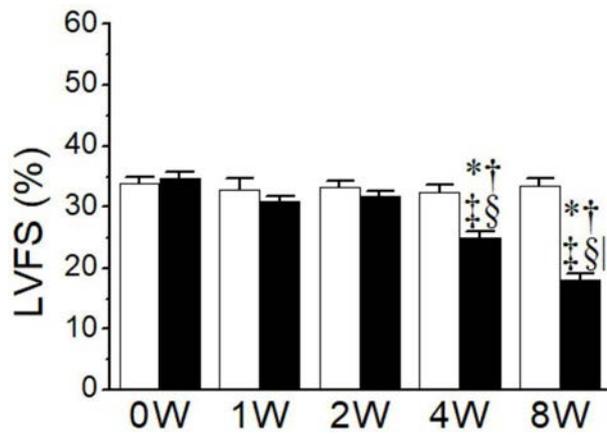


图12

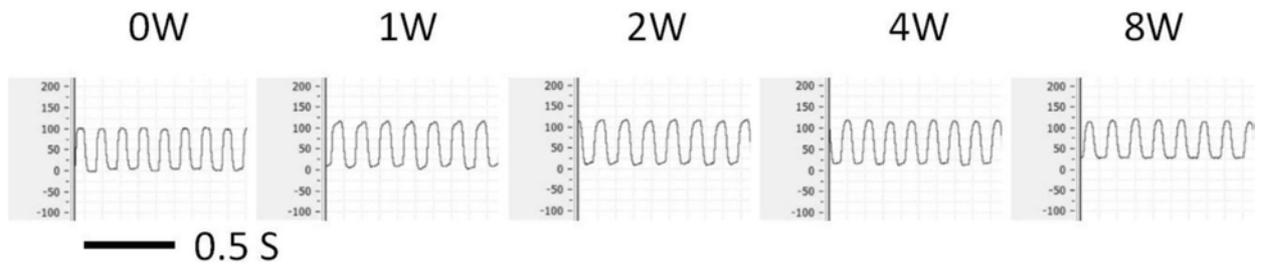


图13

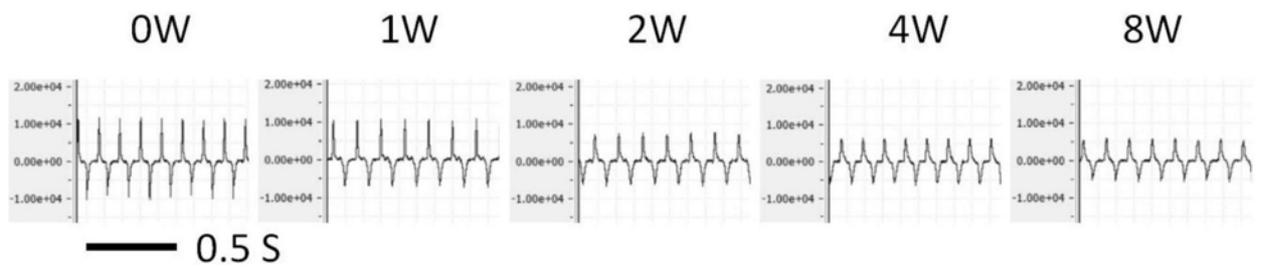


图14

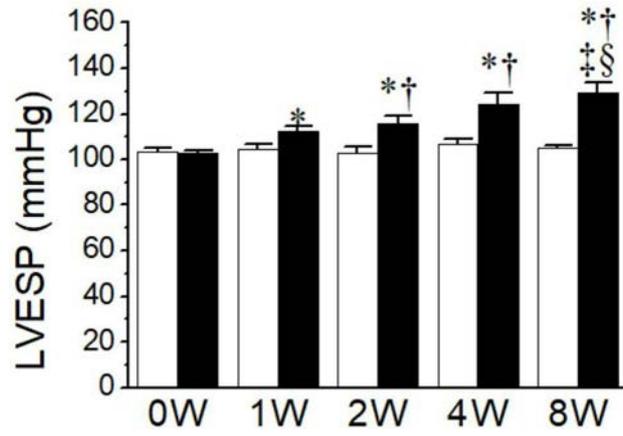


图15

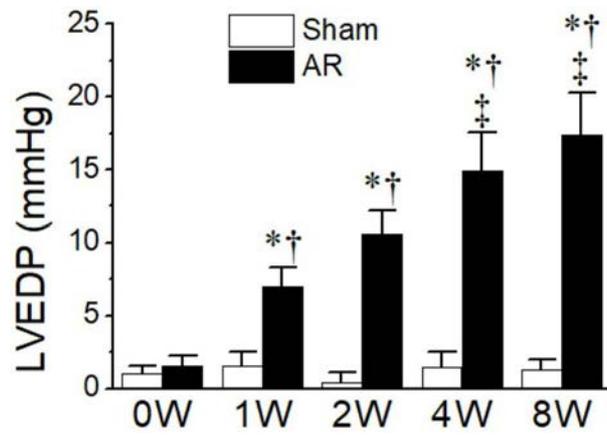


图16

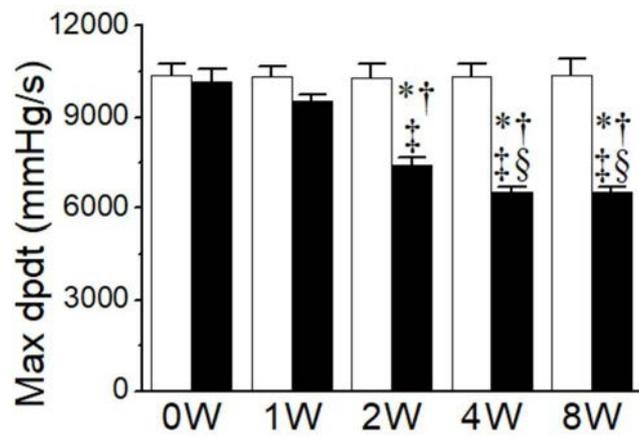


图17

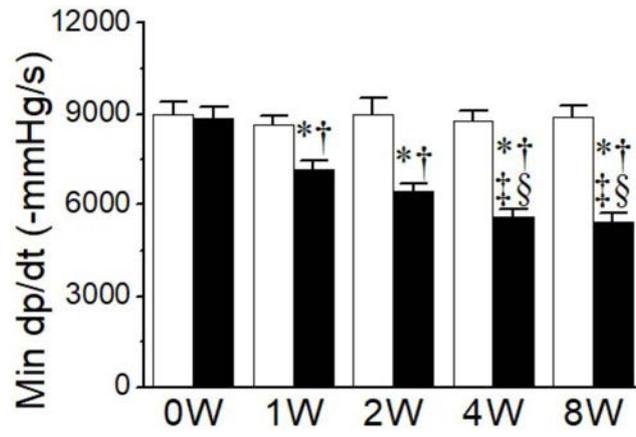


图18

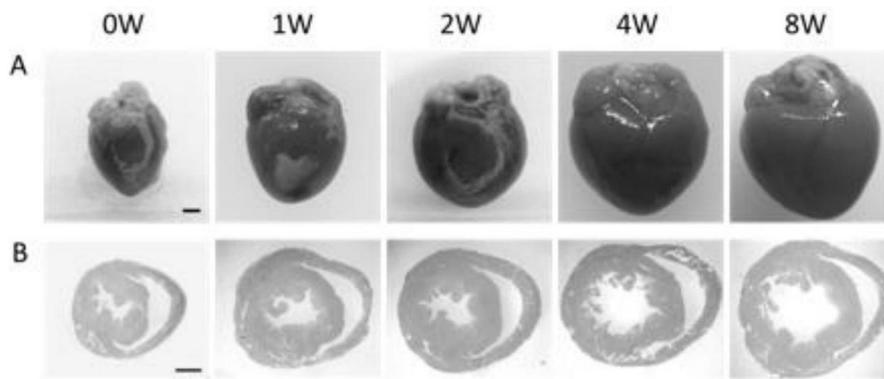


图19

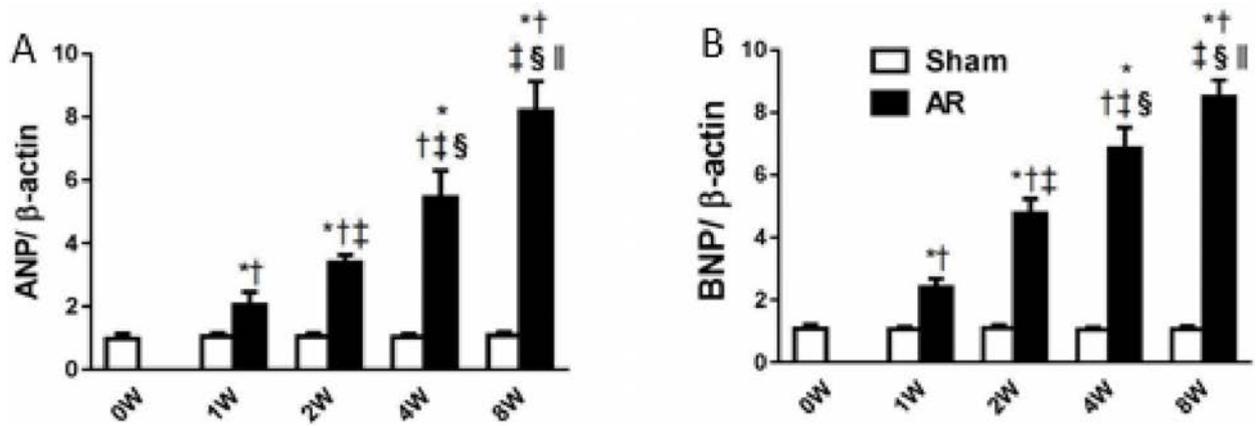


图20

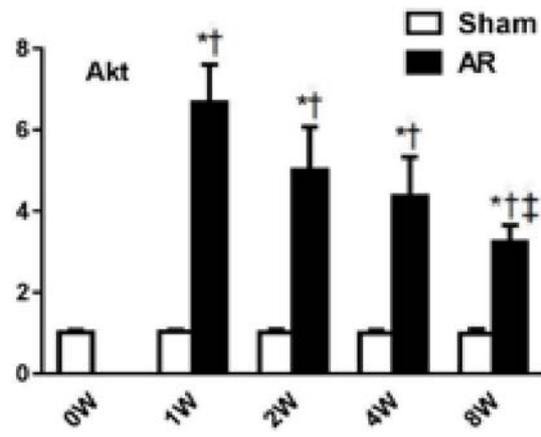


图21

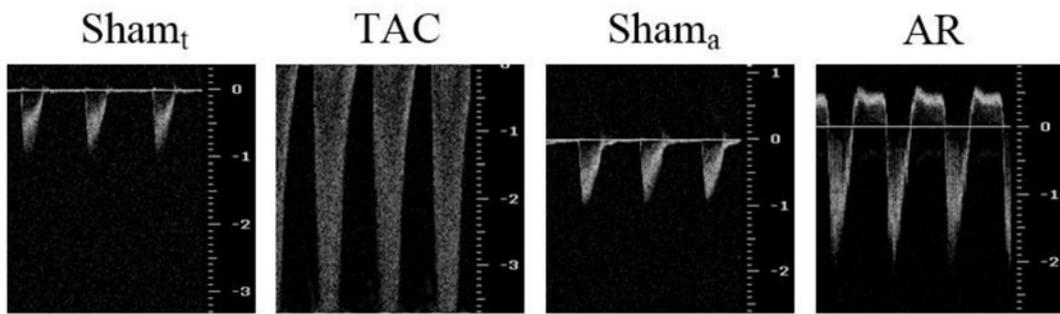


图22

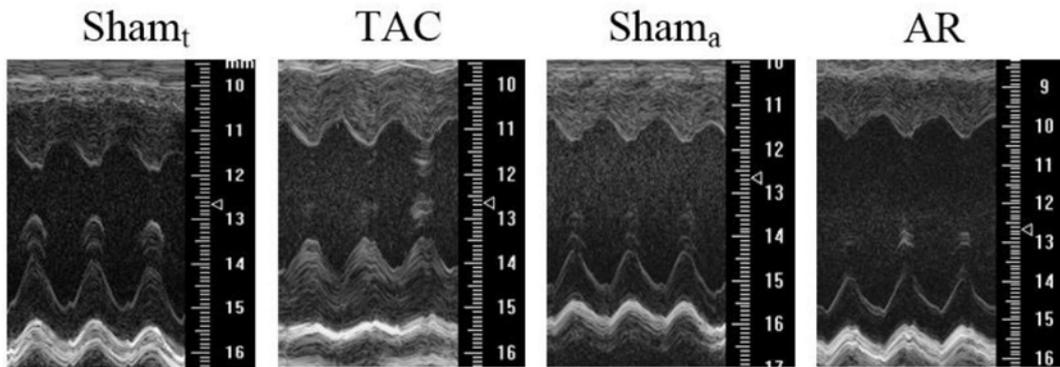


图23

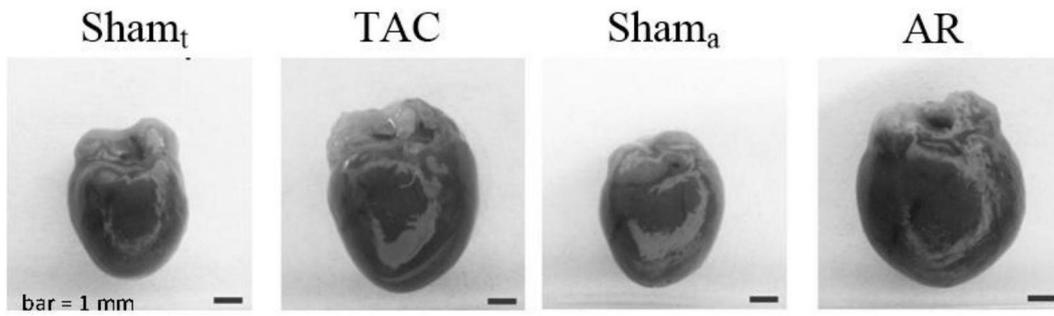


图24

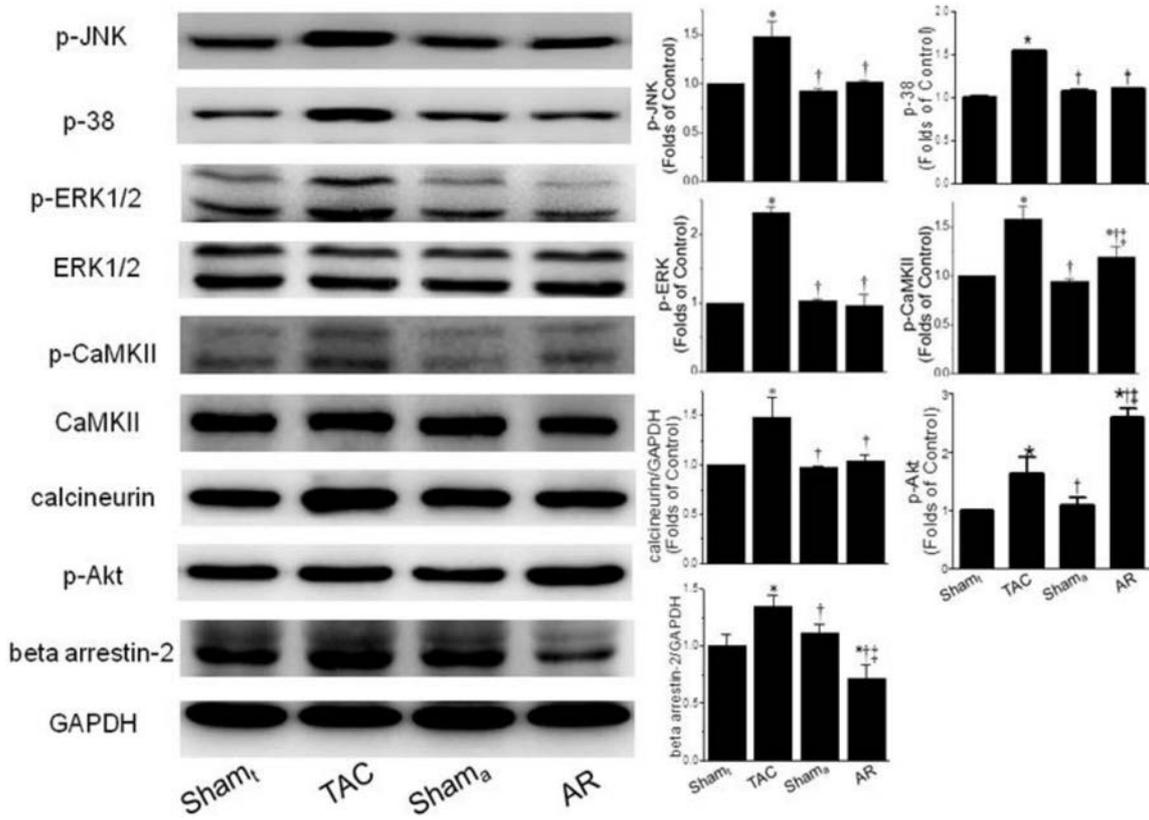


图25

专利名称(译)	一种建立心脏容量超负荷小鼠模型的方法		
公开(公告)号	CN108553195A	公开(公告)日	2018-09-21
申请号	CN201711481809.0	申请日	2017-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属中山医院		
[标]发明人	吴剑 邹云增 游洁芸 王时俊 黄家园 丁志文 杨春杰 康乐 姜红		
发明人	吴剑 邹云增 游洁芸 王时俊 黄家园 丁志文 杨春杰 康乐 姜红		
IPC分类号	A61D1/00 A61B8/06		
CPC分类号	A61D1/00 A61B8/06 A61B8/488 A61B34/20 A61B2034/2063		
代理人(译)	于晓菁		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种建立心脏容量超负荷的小鼠模型的方法。在高频超声引导下，经右侧颈总动脉用内置金属丝套管中的金属丝一次或多次破坏主动脉瓣引起主动脉瓣血液返流，造模过程中随时监测主动脉弓处血流多普勒超声，直到返流程度满意。本发明明显优于现有的动静脉瘘造模方法。本发明建立方便操作、返流量化、重复性好的主动脉瓣返流手术小鼠模型，为容量超负荷心脏重构的转化医学研究提供新型、满意模拟临床病变的模式动物。本发明还可用于与压力超负荷性模型进行心脏重构的差异表达，为阐明两类超负荷心脏重构差异的分子机制奠定基础，并为临床上对不同类型的心脏肥大疾病进行个性化诊疗提供重要参考。

