

一种不依赖呼吸机的小鼠心肌内注射技术的建立

张逸杰 戴明彦 曹 权 陈俊婷 包明威

摘要 目的 建立一种简洁高效、不依赖辅助通气的小鼠心肌内注射的实验方法,并浅析操作细节及技巧。**方法** 44只6周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为实验组(22只)和对照组(22只)。麻醉后于左侧第4肋间隙挤出心脏,向左心室壁内注射靶向 CPT-1b(实验组)或靶向无关基因(对照组)的重组慢病毒。10周后,取心脏及后肢骨骼肌,行 RT-PCR 及 Western blot 法,检测不同组织中 CPT-1b 的 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 至16周龄,小鼠存活率 90.9%。实验组小鼠心肌中 CPT-1b 的表达显著低于对照组,而骨骼肌中 CPT-1b 的表达在两组间没有统计学差异。**结论** 心肌内注射技术所介导的 RNA 干扰高效、特异地下调了心肌组织中目标基因的表达,该技术是一种较好的将外源物质定向导入心肌组织的方法。

关键词 小鼠 心肌内注射 RNA 干扰 动物模型 手术效率

中图分类号 Q95-336

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.04.010

Establishment of a Murine Model of Intramyocardial Injection Without a Ventilator. Zhang Yijie, Dai Mingyan, Cao quan, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To establish a rapid and efficient murine model of intramyocardial injection without assisted ventilation, and comprehensively describe its details. **Methods** Six-week-old male C57BL/6J mice were randomized into experimental group (CPT group) and control group (Con group), and each group contained 22 animals. After deeply anesthetized, mice were subjected to small left thoracotomy followed by temporary cardio-exteriorization. Recombinant lentiviral vectors carrying short hairpin RNAs targeting murine carnitine palmitoyltransferase-1b (CPT-1b, for CPT group) or irrelevant gene (for Con group) were injected into left ventricular wall directly. Ten weeks later, myocardium and skeletal muscle were obtained. CPT-1b mRNA and protein levels expressed in different tissues were measured by RT-PCR and Western blot. **Results** The survival rate of all animals was 90.9% till 16 weeks of age. CPT-1b expression in the myocardium was significantly lowered in CPT group compared to Con group, while its expression in skeletal muscle was indistinguishable between the two groups. **Conclusion** Intramyocardial injection-mediated RNA interference effectively and specifically down-regulated the expression of targeted gene in the myocardium. This new technology represents a preferable approach to introduce exogenous substance into the myocardium of a mouse.

Key words Mouse; Intramyocardial injection; RNA interference; Animal models; Surgical efficiency

随着社会生活水平提高,人口老龄化加剧,以及静坐生活方式的蔓延,心血管疾病已成为最重要的死亡原因之一。现有治疗手段虽然提高了患者的生存质量,但对根治某些心脏疾病(如缺血性心肌病、扩张型心肌病)却束手无策。基因治疗和干细胞治疗方兴未艾,为治愈上述疾病提供了可能。

研究某种基因或干细胞对心脏疾病的作用,理想的方法是将其直接注入心肌组织。小鼠是心脏疾病

研究中最常用的物种,但其心脏体积小,心室壁仅 1.0~1.3mm 厚,不利于精准注射。应用小鼠构建高效的心肌内外源物质导入技术,将为心脏疾病的研究提供很大的应用价值。当前借助心肌内注射技术开展的实验主要在大鼠、猪、狗等体积较大的物种上进行,有关小鼠心肌内注射的方法报道很少,大多依赖呼吸机或高分辨率超声仪器,操作费时且穿刺易误入心室腔^[1,2]。最近,Gao 等^[3]发明一种新颖的小鼠心肌梗死模型,可快速将小鼠心脏暴露于体表。本研究所介绍的心肌内注射技术即基于此模型改动而来。为验证心肌内导入外源物质的可行性,笔者构建了重组慢病毒载体,经本方法注入小鼠心肌组织,观察其介导的 RNA 干扰是否对心肌组织内目标基因产生特异性下调作用。

材料与方法

1. 实验动物:SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 44 只,4

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81570460);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81500668);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(2042014kf0172)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科、武汉大学心血管病研究所

通讯作者:包明威,主任医师,副教授,硕士生导师,电子信箱:mbao@whu.edu.cn

周龄,体重 18.3 ± 0.7 g,购自北京华阜康生物科技公司,饲养于武汉大学人民医院动物实验中心屏障环境,自由取食。屏障内温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 45% ~ 50%,光照/黑暗比 12h:12h。将动物随机分为实验组和对照组,每组各 22 只,适应性喂养 2 周后(6 周龄)进行注射,术后继续饲养于屏障环境至 16 周龄。严格遵循实验动物使用的“3R 原则”。

2. 器械、仪器与试剂:手术器械与试剂:眼科剪,有齿弯镊,蚊氏血管钳,持针器,5-0 缝线,角针,宽胶带,解剖板,剃毛器,25 μl 微量注射器(上海高鸽公司)装配 31 gauge 注射针头,加热垫,超声耦合剂,1% 戊巴比妥钠,70% 乙醇。RT-PCR 仪器与试剂:实时定量 PCR 仪(CFX96,美国 Bio-Rad 公司),Trizol(15996-026,美国 Invitrogen 公司),反转录试剂盒(FSQ-101,中国东洋纺公司),SYBR Green 试剂盒(FP205,中国天根公司)。Western blot 法检测试剂:RIPA 裂解液(sc-24948,美国 Santa Cruz 公司),BCA 蛋白定量试剂盒(P0012S,中国碧云天公司),CPT-1b 一抗(GTX117231,美国 GeneTex 公司),GAPDH 一抗(CW0100A,中国康为世纪公司)。

3. 慢病毒制备:选取主要在心肌及骨骼肌表达的肉碱棕榈酰转移酶-1b(carnitine palmitoyltransferase-1b,CPT-1b)作为 RNA 干扰的目标基因,另选取绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)基因作为对照。构建靶向小鼠 CPT-1b(5'-CCG GGG AAT CAA CTC CTG GAA GAC TCG AG T CTT CCA GGA GTT GAT TCC TTT TTG-3')及 GFP(5'-CCG GTC ACC TTC ACC CTC TCC ACT TCT CGA GAA GTG GAG AGG GTG AAG GTG ATT TTT G-3')的慢病毒载体,分别用于实验组和对照组小鼠的心肌内注射。病毒效价 $\approx 1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

4. 术前准备:取小鼠称重,按 90mg/kg 经腹腔注射戊巴比妥钠溶液。待小鼠昏迷,痛觉反射消失,用胶带将其固定于解剖板,取自然仰卧位。使用超声耦合剂涂抹双侧眼球,避免麻醉后结膜长时间暴露而致盲。将微量注射器提前吸取病毒液备用。

5. 手术方法:手术方法如图 1 所示。术后将小鼠俯卧于加热垫($35 \sim 40^\circ\text{C}$)复苏。小鼠多于 2h 后清醒,术后 4h 可正常抓握、攀爬及取食。注射时针尖与室壁的关系如图 2A 所示,针尖与室壁厚度对比如图 2B 所示。

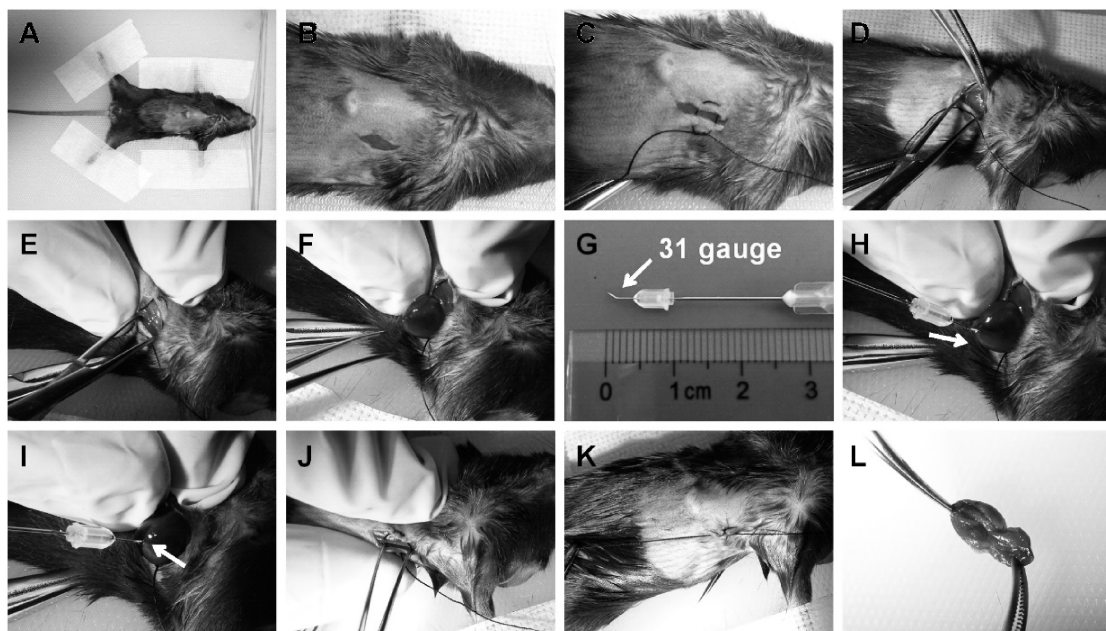


图 1 小鼠心肌内注射示意图

A. 固定、备皮、消毒术区;B. 于心前区 3~5 肋间沿左锁骨中线作 1 长约 1cm 切口;C. 沿切口缝制荷包松结备用;D. 钝性分离胸大肌和胸小肌,暴露肋骨及肋间隙;E. 使用蚊氏血管钳经第 4 肋间穿刺肋间肌及壁胸膜,并扩张穿刺孔至约 0.6cm;F. 左手食指与拇指分居小鼠胸腔两侧,示指将胸腔向穿刺孔处推挤,拇指配合发力,快速、轻柔地将心脏经由扩张的穿刺孔推送至体表。此时食指需持续压迫,避免心脏回缩至胸腔;G. 使用针尖外径 31 gauge 的自制微量注射针进行注射,其前端做一小弯折,避免刺穿心肌误入心室腔;H、I. 针尖与左心室壁呈 30° 角刺入心肌,而后平行于心室壁进针直至弯折段完全刺入心肌,推送注射器完成注射(单点注射量 5~10 μl ,为显示注射效果,图中注射物质为亚甲蓝),稍停顿 2~3s 后缓慢撤针。熟练者可进行左心室前壁与后壁两个点的注射;J. 迅速还纳心脏,挤出胸腔内残气;K. 收紧荷包关胸;L. 即刻解剖证实亚甲蓝进入左室壁

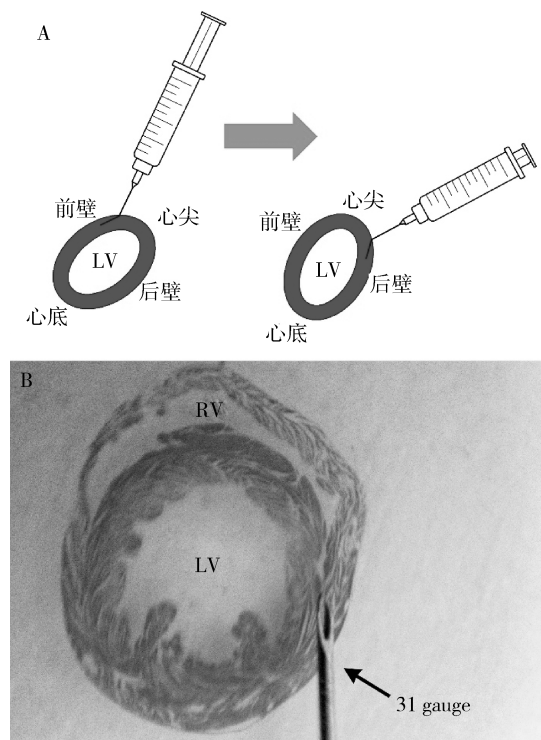


图2 心肌内注射的进针技巧

A. 左心室前壁、后壁心肌内注射的进针方式,通常推荐左心室前壁单点注射;B. 小鼠心脏横切片(HE染色)与针尖直径(31 gauge)的比较;LV. 左心室;RV. 右心室

6. 取材:16周龄时,按本研究前面叙述的方法麻醉小鼠。开胸快速剪取心脏,去除心房及大血管,仅保留心室,PBS(pH7.4)灌洗,液氮速冻后转 -80°C 保存;同法剪取后肢骨骼肌。用于RT-PCR及Western blot法检测。

7. 实时RT-PCR法检测:用Trizol法提取组织中总RNA,依照反转录试剂盒说明书合成cDNA,再按SYBR Green试剂盒说明书进行荧光定量PCR,选取GAPDH作为内参。引物序列如下:CPT-1b正向引物:5'-CCC ATG TGC TCC TAC CAG AT-3',反向引物:5'-CCT TGA AGA AGC GAC CTT TG-3';GAPDH正向引物:5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC-3',反向引物:5'-GGA TGA CCT TGC CCA CAG CC-3'。

8. Western blot法检测:使用RIPA裂解液从组织中提取蛋白,经BCA测定蛋白浓度,SDS-PAGE分离蛋白,再经转膜,一抗、二抗孵育,化学发光法显影、定影获得凝胶图像。实验中的一抗浓度为CPT-1b 1:500,GAPDH 1:1000。凝胶图像采用Image J软件分析。

9. 统计学方法:统计分析使用SPSS 18.0软件,

计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 小鼠存活情况:手术当日总病死率9.1%,原因包括:①血管钳探入胸腔过深,戳穿右室壁致大出血;②血气胸;③操作不流畅致心脏外露时间过长。术后至16周龄无死亡,零感染,每组均存活20只。解剖证实12.5%的小鼠术后出现左心室前壁与胸腔粘连。

2. 基因沉默效应的鉴定:RT-PCR结果提示,实验组小鼠心肌组织中CPT-1b的mRNA表达显著低于对照组(图3A);而骨骼肌中CPT-1b的mRNA表达在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$,图3B)。Western blot法检测结果与之相一致,实验组小鼠心肌组织中CPT-1b的蛋白表达显著低于对照组(图3C);而骨骼肌中CPT-1b的蛋白表达在两组间差异无统计学意义(图3D)。心肌内注射慢病毒显著下调了心肌组织中CPT-1b表达,但对骨骼肌中CPT-1b的表达没有影响。

讨 论

通过技术手段将外源物质直接注入心肌组织,是研究其对心脏疾病治疗作用的理想方式,可有效避免靶外器官被干预所带来的偏倚。既往已建立的心肌内定向转导技术包括开胸注射、冠状动脉内注射、高分辨率超声引导下不开胸注射、超声靶向微泡破坏技术等。然而无论哪一种技术均存在一定的不足,限制了其在小鼠模型中的应用。

传统开胸注射法依赖呼吸机,气管插管、撤管耗费大量时间,完成1只动物需要至少20min;开胸时需断开肋骨,创伤大、易感染;注射时需借助显微设备在深腔操作,而小鼠心室壁菲薄,误刺入心室腔的风险高;应用该技术时小鼠总死亡率接近20%^[1]。冠状动脉内注射依赖心导管术,仅适合猪、犬等大型物种。高分辨率超声引导下不开胸注射具有创伤小、可以反复多次注射的优点,但依赖超声设备,而小鼠极快的心率使得该技术同样面临刺穿心室壁的难度^[4]。超声靶向微泡破坏技术是理想的转导方式,但受超声探头大小及聚焦面积的限制,其适用物种的体积最少需要大鼠级别^[5]。与上述技术相比,本研究所采用技术最大的特点是高效、简洁、创伤小。操作不依赖呼吸机,简洁的流程大大缩短了手术时间。经反复练习(>800只),笔者完成单个点心肌内注射

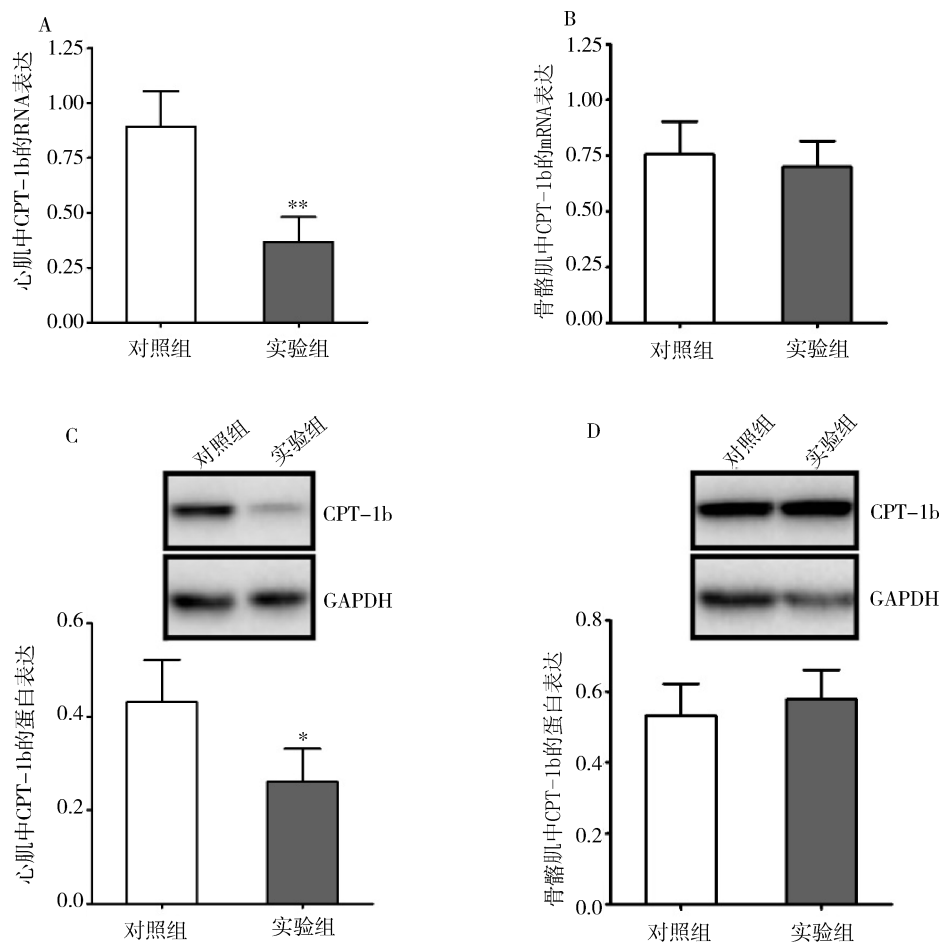


图 3 不同组织中 CPT-1b 的 mRNA 和蛋白表达水平

A. RT-PCR 结果提示,实验组小鼠心肌组织中 CPT-1b 的 mRNA 表达显著低于对照组(每组 $n=4$);B. 骨骼肌中 CPT-1b 的 mRNA 表达在两组间差异无统计学意义(每组 $n=4$)。C:Western blot 法检测结果显示,实验组小鼠心肌组织中 CPT-1b 的蛋白表达显著低于对照组(每组 $n=4$)。D:骨骼肌中 CPT-1b 的蛋白表达在两组间差异无统计学意义(每组 $n=4$);C、D 上方的图片为具有代表性的 Western blot 法检测凝胶图像,选取 GAPDH 作为内参。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$

的时间 $<1.5\text{min}$,效率是传统方法的 10 倍以上。本方法无需断肋,术中出血少,心脏暴露时间短,动物死亡率低,术后恢复极快。该技术另一个特点是注射结果稳定可靠。通过将心脏直接暴露于体表,可获得极佳的操作视野。心脏在外露时受到挤压并发生扭转,心率显著减慢(不足 100 次/分),降低了注射难度。通过将针尖弯折预处理,配合平行进针的手法,使得进针深度可控,避免了刺穿左心室壁的可能,保证了注射效果。

就操作者而言,娴熟流畅的手法是精准注射、预防动物死亡的关键。经过摸索和提炼,笔者总结手术过程中的关键细节包括:①提前吸取病毒液,确保心脏外露后可立即进针注射;②保持胸肌的完整性对术后封闭胸腔、维持负压至关重要。剪开皮肤后可清楚地看到胸大肌的轮廓,左手执弯镊将其垂直提起,右

手持蚊氏血管钳从其外缘钝性分离,暴露胸小肌。再将后者提起,从外缘沿其走行方向分离,显露第 4 肋间。此时各个肌肉都是完整的;③选择第 4 肋间开孔。经此肋间挤出心脏时,后者发生一定的扭转,左室前壁直接面对操作者(图 1H),方便进针注射。通过调整左手拇指的施力方向,还可显露左心室后壁(图 1I),熟练者可经此完成第 2 个点的注射。从第 3 肋间开孔虽然更容易挤出心脏,但后者过度扭转导致右心室面对操作者,不利于注射;④穿刺肋间肌开孔时应避免探入胸腔过深,损伤心肺引起大出血;⑤心脏外露不能大于 30s,超过该时间窗动物死亡率明显增加;⑥平行于室壁进针,避免刺穿心肌。推注过程中可见注射点周围大片室壁肿胀、苍白,提示注射物准确注入心肌。短暂停留后缓慢撤针,可有效避免注射物在心肌收缩力的作用下经注射孔溢出;⑦

术中出血无需干预,以快速流畅为首要原则,穿刺出血多可自行终止;⑧关闭胸腔前有效地将腔内残气挤出。还纳心脏后,左手拇指和示指沿与切口垂直方向挤压胸腔,将腔内气体排出,立即收紧荷包封闭胸腔。

在造模的过程中,血胸和气胸是小鼠死亡的主要原因。为有效预防,术中应避免粗暴操作,关闭荷包前务必挤走胸腔内大部分气体。对于初学者,笔者推荐左心室前壁单点注射,本课题组及其他研究均证实,单点注射可以达到满意的基因表达率^[6,7]。熟练者可尝试两点注射。

本技术不依赖设备,操作简单,心脏靶向性好,动物死亡率低,可广泛应用于小鼠心脏疾病的研究。除重组病毒及纯化干细胞,还可用于生物材料、局部治疗药物等外源物质的心肌内注射。该技术亦有其局限性,如不适合多点注射;因存在一定的胸腔粘连发生率,导致二次手术挤出心脏困难,本技术也不适用于多次注射。本模型制作方法简单快速,其所介导的 RNA 干扰可高效、特异性地下调心肌组织内目标基因的表达,是一种较好的将外源基因/药物/细胞/生物材料导入心肌组织的方法。

参考文献

- 1 Virag JA, Lust RM. Coronary artery ligation and intramyocardial injection in a murine model of infarction[J]. J Vis Exp, 2011,52:2581
- 2 Prendiville TW, Ma Q, Lin Z, *et al.* Ultrasound - guided transthoracic intramyocardial injection in mice [J]. J Vis Exp, 2014, (90): e51566
- 3 Gao E, Lei YH, Shang X, *et al.* A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse[J]. Circ Res, 2010, 107(12):1445 - 1453
- 4 Springer ML, Sievers RE, Viswanathan MN, *et al.* Closed - chest cell injections into mouse myocardium guided by high - resolution echocardiography[J]. Am J Physiol Heart CircPhysiol, 2005, 289(3):H1307 - 1314
- 5 Bish LT, Sweeney HL, Muller OJ, *et al.* Adeno - associated virus vector delivery to the heart[J]. Methods Mol Biol, 2011, 807:219 - 237
- 6 Zhang Y, Bao M, Dai M, *et al.* Cardiospecific cd36 suppression by lentivirus - mediated rna interference prevents cardiac hypertrophy and systolic dysfunction in high - fat - diet induced obese mice[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14:69
- 7 Toivonen R, Koskenvuo J, Merentie M, *et al.* Intracardiac injection of a capsid - modified ad5/35 results in decreased heart toxicity when compared to standard ad5[J]. Virol J, 2012, 9:296

(收稿日期:2015 - 09 - 11)

(修回日期:2015 - 10 - 12)

颌面部包括咀嚼系统的数字解剖学 有限元建模初步研究

叶鹏程 方一鸣 张琳琳 管建锋 陈 凯 吴立军 林崇翔

摘 要 目的 初步探究基于解剖学和影像学对颌面部包括完整咀嚼系统的数字解剖学三维有限元建模的可行性,为进一步模拟颌面部生物力学做准备。**方法** 采集第2代中国数字化人体“男性第23号”头颅CT图像、咀嚼肌MRI图像及双侧颞下颌关节盘MRI图像,以DICOM格式导入Mimics软件进行三维重建,再通过Geomagic Studio软件配准模型、优化模型并构建数字化颌面部结构,最后将单个前牙的牙体牙周精细模型导入ANSYS进行有限元分析,检验模型的实用性。**结果** 建立了一个包含全牙列牙髓、牙本质、牙骨质、牙釉质、牙周膜、上颌骨双皮质层、下颌骨双皮质层、下牙槽神经、颞下颌关节、关节盘、关节软骨、关节囊以及咀嚼肌肉系统和颌面的三维解剖学模型,以及单个前牙的三维有限元模型。**结论** 基于CT、MRI影像和解剖学,利用医学影像处理软件Mimics、Geomagic Studio及Ansys结合实构法和虚构法所建高精度颌面部模型具有全面性、先进性和实用性,可以为进一步模拟口腔医学临床中的实际问题提供理论依据。

关键词 数字解剖学 咀嚼系统 牙列 皮质骨厚度 三维有限元 生物力学

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81271663,31471146);浙江省科技计划项目(面上项目)(2010C33123);温州市科技计划项目(2012S0155);温州医科大学科研发展专项基金资助项目(QTJ06012)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院口腔颌面外科(叶鹏程、方一鸣、张琳琳、管建锋、陈凯、林崇翔);325035 温州医科大学数字化医学研究所(吴立军)

通讯作者:林崇翔,电子信箱:6785069@qq.com;吴立军,教授,电子信箱:biomech@163.com