

等^[12]建立的检测方法相比,检测仪器更为普遍,且检测波长即为 280nm,一般蛋白纯化仪器均具备此检测波长,不用再配备 260nm。虽进样量加大,其检出最低限也大幅降低,样品用量也在可接受范围内,也正是因此,使其在精密度、准确度等方面更优于之前的检测方法。除此之外,吡啶衍生物的检测方法还有气相法、HPLC 及波谱(氢谱)法,这些方法的检测下限仅为微克/毫升($\mu\text{g/ml}$)级别,在现行药典中规定,吡啶在药品中的残留限度为 0.02%。因此,利用上述方法基本可以达到检测要求。

在专属性验证过程中发现,如果在多糖原液中直接添加 CDAP 不需滤过,对检测没影响,但在实际反应物中,在游离 CDAP 出峰之前,还会出现另外的峰,会影响到检测结果,经滤过后此峰消失,说明此峰分子质量要 $>10\text{kDa}$,因此推断,该物质应该是由在活化过程中 CDAP 反应不彻底,游离的 CDAP 又与衍生后衍生物的己二酸二酰肼(ADH)上的氨基结合,形成高分子。因此,该高分子物质的出现,可能会从实质上降低衍生率,所以,在后续疫苗生产中应继续优化条件,降低该物质的出现,可提高衍生率,降低 CDAP 的用量。同时,根据检测结果,该高分子吡啶衍生物出现的含量也在纳克(ng)级别,远低于药典规定的限度,不会对疫苗的安全性造成危害。

参考文献

- 1 Zarei AE, Almeshdar HA, Redwan EM. Hib vaccines: past, present, and future perspectives [J]. J Immunol Res, 2016, 2016:7203587
- 2 Zanella RC, Brandileone MCC, Andrade AL, et al. Evaluation of *Haemophilus influenzae* type b carrier status among children 10 years after the introduction of Hib vaccine in Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo

- Cruz, 2015, 110(6):755-759
- 3 Beurret M, Hamidi A, Kreeftenberg H. Development and technology transfer of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines for developing countries [J]. Vaccine, 2012, 30(33):4897-4906
- 4 王明清,管娇琼,朱文勇,等. B 型流感嗜血杆菌疫苗的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2015, 44(6):155-157
- 5 Joachim K, Meir W. 1-Cyano-4-dimethylamino pyridinium tetrafluoroborate as acylylating agent for the covalent attachment of ligand to polysaccharide resins [J]. FEBS Lett, 1983, 154(1):209-210
- 6 Jin Z, Chu C, Robbin JB, et al. Preparation and characterization of group A meningococcal capsular polysaccharide conjugates and evaluation of their immunogenicity in mice [J]. Infect Immunol, 2003, 71(9):5115-5120
- 7 吴雅楠,王明清,朱文勇,等. 通过 CDAP 活化多糖制备 b 型流感嗜血杆菌荚膜多糖-D 蛋白疫苗初探 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(12):22-25
- 8 熊慧玲,王公孝,谭柯,等. 1-氰基-4-二甲基氨基吡啶·四氟化硼活化 A 群脑膜炎球菌多糖制备的结合疫苗的免疫原性及其工艺稳定性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(12):1497-1502
- 9 谢茂超,陈明拓,姜晓,等. 铜绿假单胞菌 3 型 O-特异性多糖-破伤风类毒素结合疫苗的制备及其免疫特性分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 25(12):1565-1568
- 10 陈玉秋,何建东,范荣坤,等. 22F 型肺炎球菌荚膜多糖的活化及其多糖蛋白结合物的免疫原性 [J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(5):479-487
- 11 萧在澜,徐永浩,刘佳,等. CDAP 活化制备 C 群脑膜炎球菌结合疫苗原液的稳定性试验 [J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(5):27-32
- 12 马庆华,傅元欣,冯潇,等. 疫苗中残余 CDAP 检测方法的建立 [J]. 微生物学免疫学进展, 2011, 39(4):34-39

(收稿日期:2016-05-04)

(修回日期:2016-05-31)

压力负荷诱导的大鼠舒张性心力衰竭模型的改良及效果探讨

刘 静 崔海峰 李思耐 林 谦

摘 要 目的 利用改良术式制备压力负荷诱导大鼠舒张性心力衰竭模型并探讨其效果。方法 Wistar 大鼠 40 只随机分为正常组、腹主动脉缩窄 0.6、0.7 及 0.8mm 组。3 组模型大鼠利用改良术式将腹主动脉分别缩窄至 0.6、0.7、0.8mm,观测术后大鼠存活率。术后 8 周及 12 周进行超声心动检测,术后 12 周检测血流动力学舒张功能指标。结果 术后模型组存活率分别为:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81373779)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院(刘静、李思耐、林谦);中国中医科学院医学实验中心(崔海峰)

通讯作者:林谦,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:13910565673@126.com

缩窄 0.6mm 组 46.7%, 缩窄 0.7mm 组 66.7%, 缩窄 0.8mm 组 80%。超声心动图:与对照组比较,缩窄 0.6mm 组:术后 8 周 LVPWd(2.34 ± 0.51 mm)、LVmass(1.42 ± 0.20 g)、E/e(11.62 ± 8.45) 显著增加($P < 0.05$); 术后 12 周 LVPWd(2.47 ± 0.50 mm)、LVmass(1.75 ± 0.31 g)、E/e(19.67 ± 4.28) 显著增加,IVRT(19.68 ± 4.05 ms) 显著缩短($P < 0.05$),其他指标差异无统计学意义($P > 0.05$);且 E/e 组内比较差异有统计学意义($P < 0.05$);缩窄 0.7mm 组:术后 8 周,仅 LVIDd(8.55 ± 0.56 mm)显著增加($P < 0.05$),其余指标差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 12 周, LVPWd(2.16 ± 0.37 mm)、LVmass(1.44 ± 0.16 g)、E/e(10.51 ± 5.32) 显著增加($P < 0.05$),其他指标差异无统计学意义($P > 0.05$);且 E/e 组内比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。缩窄 0.8mm 组:术后第 8 周及 12 周各指标差异均无统计学意义($P > 0.05$)。血流动力学:模型 3 组术后 12 周 LVEDP(23.66 ± 10.41 、 16.75 ± 4.68 、 14.83 ± 5.92 mmHg) 均较正常组显著升高($P < 0.05$);缩窄 0.6mm 组及缩窄 0.7mm 组 Tau 值(11.32 ± 3.33 、 9.01 ± 2.74 ms)较正常组显著延长($P < 0.05$);缩窄 0.6mm 组 -dp/dt 值(-36343.30 ± 991.95)较正常组显著降低($P < 0.05$)。结论 缩窄 0.6mm 组术后第 8 周出现舒张性功能不全,术后第 12 周出现舒张性心力衰竭,成模速度快且模型稳定,但存活率低;缩窄 0.7mm 术后 12 周才出现舒张性功能障碍,成模速度较慢但存活率相对较高。改良术式操作简便,可降低手术危险性,具有较广阔的应用前景,更适合于舒张性功能不全模型的制备。

关键词 舒张性心力衰竭 腹主动脉缩窄 动物实验 模型制备

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.010

Observation on the Validity of Modified Operation for Pressure Load Induced Heart Failure with Preserved Ejection Fraction Model Establishment in Rats. Liu Jing, Cui Haifeng, Li Sinai, et al. Dongfang Hospital Attached to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract Objective To explore the validity of modified operation for pressure load induced heart failure with preserved ejection fraction(HFPEF) model establishment in rats. **Methods** Forty Wistar rats were divided into no intervention, constricting 0.6mm, 0.7mm and 0.8mm of abdominal aorta groups randomly. We observed death rate of rats in these groups at the point of 4 weeks after operation, and compared the parameters of echocardiography between these groups at the points of 8, 12 weeks after operation, and of hemodynamic at the point of 12 weeks after operation. **Results** Death rate: 46.7% of constricting 0.6mm group, 66.7% of constricting 0.7mm group and 80% of constricting 0.8mm group. Parameters of echocardiography: When compared with no intervention group, LVPWd(2.34 ± 0.51 mm), LVmass(1.42 ± 0.20 g) and E/e(11.62 ± 8.45) of constricting 0.6mm group increased statistically significantly($P < 0.05$) at the point of 8 weeks after operation; moreover, LVPWd(2.47 ± 0.50 mm), LVmass(1.75 ± 0.31 g) and E/e(19.67 ± 4.28) increased statistically significantly($P < 0.05$) at the point of 12 weeks after operation, however IVRT(19.68 ± 4.05 ms) decreased statistically significantly($P < 0.05$); when compared within groups, only E/e showed statistical significance at the point of 12 weeks after operation($P < 0.05$). When compared with no intervention group, only LVIDd(8.55 ± 0.56 mm) of constricting 0.7mm group increased statistically significantly($P < 0.05$) at the point of 8 weeks after operation, however LVPWd(2.16 ± 0.37 mm), LVmass(1.44 ± 0.16 g) and E/e(10.51 ± 5.32) increased significantly($P < 0.05$) at the point of 12 weeks after operation; when compared within groups, only E/e showed statistical significance($P < 0.05$) at the point of 12 weeks after operation. No significant difference was detected in all parameters in constricting 0.8mm group no matter at the point of 8 or 12 weeks after operation($P > 0.05$). Parameters of hemodynamic: when compared with no intervention group, all groups showed statistical difference in LVEDP(23.66 ± 10.41 , 16.75 ± 4.68 , 14.83 ± 5.92 mmHg) ($P < 0.05$); for Tau value, statistical differences were only detected in groups of constricting 0.6mm and 0.7mm(11.32 ± 3.33 , 9.01 ± 2.74 ms), ($P < 0.05$), but for -dp/dt, only constricting 0.6mm group showed statistical difference(-36343.30 ± 991.95), ($P < 0.05$). **Conclusion** The rats of constricting 0.6mm group showed signs of diastolic dysfunction at the point of 8 weeks after operation, and signs of HFPEF at the point of 12 weeks after operation, which HFPEF model establishment was faster and more stable but with a higher death rate. Although with a lower death rate, the HFPEF model establishment was barely satisfactory in constricting 0.7mm group. The modified operation for pressure load induced HFPEF model establishment is easy to handle and bears lower surgical risk, which will have a wider prospect and be more suitable for the preparation of diastolic dysfunction model.

Key words HFPEF; Constriction of abdominal aorta; Animal experiment; Model preparation

舒张性心力衰竭又被称为收缩功能正常的心力衰竭或收缩功能保留的心力衰竭(heart failure with preserved ejection fraction, HFPEF)。流行病学调查显示,舒张性心力衰竭在心力衰竭患者中所占比例为

40%~71%,与收缩性心力衰竭具有相似的病死率,而高血压是其主要病因^[1-4]。在压力负荷诱导的大鼠 HFPEF 模型中,常见的制备方法有自发性高血压大鼠培育法、注射药物法、钳夹肾动脉法、腹主动脉缩

窄法等。其中,腹主动脉缩窄法因操作流程简单、成功率较高、模型效果稳定,从而更有利于 HFPEF 的实验研究。但目前,该方法的传统术式因对腹腔器官创伤大,操作繁琐而限制了该法的应用。基于此,笔者选择相对传统术式创伤小、操作简便的改良术式进行模型的制备,并对其效果进行了探讨。

材料与方法

1. 实验动物:实验动物为清洁级 6 周龄健康雄性 Wistar 大鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2012-0001。60 只大鼠,体重 210~220g,随机分为正常组、腹主动脉缩窄 0.6、0.7、0.8mm 组 4 组,每组各 15 只。

2. 主要试剂与仪器:手术器械(160mm 直尖皮肤剪、100mm 弯头眼科镊、100mm 眼科剪、140mm 持针器),10% 水合氯醛,脱毛膏,7% 医用乙醇,碘伏,医用无菌脱脂棉球,0.9% 氯化钠注射液,80 万单位青霉素购自华北制药公司(批号:H13020657),5ml 注射器,0.6mm×25.0mm 深蓝色注射器针头,0.7mm×31.0mm 黑色注射器针头,0.8mm×31.0mm 深绿色注射器针头,4-0 非吸收涤纶编织线(1/2,4×12 双针),2-0 非吸收真丝编织线(3/8,7×17 单针),实验动物保温毯、电子天秤、手术灯,高分辨率小动物超声影像系统(Vevo770 high resolution imaging system)购自加拿大 Visual Sonics 公司,多通道生理记录仪(MP150)购自美国 Biopac System 公司。

3. 造模方法:术前将 0.6mm×25.0mm,0.7mm×31.0mm,0.8mm×31.0mm 注射器针头针尖磨平,并弯曲成 L 形备用,大鼠禁食 24h,称重后 10% 水合氯醛注射液行腹腔麻醉,0.3ml/100g,退去右侧腹部全部毛发,左侧卧位固定于手术台,手术视野皮肤、手术器械做无菌处理;采用改良术式,以右髂腰区约 12 肋下与腰方肌交角处为手术路径,做一长 2~3cm 的纵行切口,依次切开皮肤、筋膜及肌肉,即可直接暴露出右肾及包裹其周围的脂肪囊,在肾门左侧处用弯圆头眼科镊钝性轻微或不剥离肾脂肪囊的情况下,可见到一条动脉几乎呈直角横跨下腔静脉与腹主动脉相连,该动脉即右肾上腺动脉,用无菌脱脂小棉球向腹侧推拉右肾,使手术视野更清晰,以辨清腹主动脉发出右肾上腺动脉的分支点,在分支点上方约 2mm 处,分离腹主动脉,然后用 4-0 非吸收涤纶缝合线将规格与预缩窄直径相同的预制注射器针头和该段腹主动脉一起结扎,再轻轻抽出针头,造成腹主动脉在结扎点处恢复再通的内径为所用注射器针头的外径。最后使脏器

归位,以 4-0 非吸收涤纶线缝合肌肉,2-0 非吸收真丝编织线缝合皮肤,碘伏涂擦,无菌纱布覆盖;术后将手术大鼠置于动物保温毯上,避免其术后体温过低,待其苏醒后移至动物饲养笼。术后给予青霉素 20 万 U/d,肌内注射,共 3 天,以预防腹腔感染,大小鼠维持饲料喂养,自由饮水。

4. 指标观测:(1)一般情况:术后每 4 周观察大鼠的体重、精神状态、食欲、活动量。有无发绀、呼吸困难等舒张性心力衰竭临床表现。(2)超声心动图检测:利用 Vevo 770 高分辨率小动物超声心动检测系统,分别于术后 8、12 周行小动物超声心动图检查,大鼠脱毛后用 3% 异氟烷吸入麻醉,仰卧位固定于 37℃ 恒温加热板上,持续吸入 1.5%~3.0% 异氟烷,四肢与心电图电极相连用于记录肢 II 导心电图,心率保持在 360 ± 20 次/分,探头置于大鼠胸骨前:①左心室短轴位 M 型超声测量舒张末期左心室后壁厚度(LVP-Wd)、舒张末期左心室内径(LVIDd)、左心室心肌重量(LVmass)、左心室射血分数(EF)等指标;②于标准心尖四腔心切面用脉冲多普勒测量二尖瓣舒张早期血流峰值(E)、舒张晚期血流峰值(A)、E 峰减速时间(DT)、等容舒张期持续时间(IVRT),并计算 E/A 比值;③组织多普勒 TDI 观察二尖瓣环室间隔部舒张早期运动速率频谱(e)、舒张晚期运动速率频谱(a),并计算 e/a、E/e 比值。(3)血流动力学检测:术后 12 周,经右侧颈总动脉插管行左心导管检查,测量左心室收缩末期压力(LVESP)、左心室舒张末期压力(LVEDP)、压力上升最大速率($+dp/dt_{max}$)和压力下降最大速率($-dp/dt_{max}$)及等容舒张期松弛时间常数 Tau 值。

5. 统计学方法:使用 SPSS 18.0 统计软件统计数据,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间及组内比较采用 *t* 检验或非参数检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠术后 4 周存活率:肾上腹主动脉缩窄 0.6mm 组 7 只大鼠、缩窄 0.7mm 组 3 只大鼠、0.8mm 组 1 只大鼠死于 72h 围手术期;肾上腹主动脉缩窄 0.6mm 组 1 只大鼠、缩窄 0.7mm 组 2 只大鼠、0.8mm 组 2 只大鼠死于急性心力衰竭。各组存活率分别为肾上腹主动脉缩窄 0.6mm 组 46.7%,0.7mm 组 66.7%,0.8mm 组 80%。从高到低分别为缩窄 0.8mm 组、缩窄 0.7mm 组、缩窄 0.6mm 组。

2. 一般情况观察:各缩窄组术后开始出现毛发干燥无光泽、食欲不振、行动迟缓等症状。除缩窄

0.8mm 组,大部分大鼠 4 周开始出现不同程度的发绀、劳力性呼吸困难、活动减少、对外界刺激反应迟钝等心室舒张性功能不全症状。术后第 12 周,缩窄 0.8mm 组大鼠开始出现轻度劳力性呼吸困难,其余各组劳力性呼吸困难加重,尤其是缩窄 0.6mm 组大部分大鼠静息时也可见呼吸困难。

3. 超声心动图检测:术后第 8 周及第 12 周,缩窄 0.6mm 组 EF 与正常组相比差异有统计学意义 ($P > 0.05$),但 EF 仍高于 50%,其余各组无意义;术后第 8 周及第 12 周,缩窄 0.6mm 组 LVPWd、LVmass、E/e

值均较正常组升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且 E/e 组内比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而 E/A、e/a、DT 值与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),IVRT 仅在第 12 周时较正常组降低 ($P < 0.05$);缩窄 0.7mm 组术后第 8 周 LVId 较正常组升高 ($P < 0.05$),第 12 周, LVPWd、LVmass、E/e 升高 ($P < 0.05$),且 E/e 组内比较有意义 ($P < 0.05$),其余指标与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);术后第 8 周及第 12 周,缩窄 0.8mm 组超声心动图各指标与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 1)。

表 1 各组大鼠超声心动图指标比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	正常组		缩窄 0.6mm 组		缩窄 0.7mm 组		缩窄 0.8mm 组	
	8 周	12 周	8 周	12 周	8 周	12 周	8 周	12 周
EF (%)	85.41 ± 7.30	86.35 ± 5.37	69.44 ± 3.28 *	60.34 ± 5.38 *	78.30 ± 3.95	80.23 ± 6.77	83.15 ± 7.36	84.11 ± 7.57
LVPWd (mm)	1.92 ± 0.49	1.91 ± 0.13	2.34 ± 0.51 *	2.47 ± 0.50 *	2.08 ± 0.17	2.16 ± 0.37 *	2.30 ± 0.46	2.11 ± 0.40
LVId (mm)	7.35 ± 0.56	7.71 ± 0.55	7.99 ± 0.95	7.74 ± 0.82	8.55 ± 0.56 *	8.51 ± 0.84	7.85 ± 0.81	8.33 ± 0.70
LVmass (g)	0.91 ± 0.15	0.97 ± 0.13	1.42 ± 0.20 *	1.75 ± 0.31 *	1.30 ± 0.13	1.44 ± 0.16 *	0.91 ± 0.11	1.03 ± 0.18
E/A	1.15 ± 0.18	1.26 ± 0.21	1.24 ± 0.19	1.11 ± 0.22	1.10 ± 0.09	1.20 ± 0.23	1.14 ± 0.19	1.06 ± 0.14
e/a	1.00 ± 0.29	1.16 ± 0.84	0.90 ± 0.12	0.99 ± 0.22	1.10 ± 0.24	1.01 ± 0.22	1.14 ± 0.18	1.10 ± 0.26
E/e	6.55 ± 3.42	7.38 ± 4.38	11.62 ± 8.45 *	19.67 ± 4.28 *#	6.51 ± 2.81	10.51 ± 5.32 *#	7.14 ± 3.00	6.11 ± 3.11
DT (ms)	17.99 ± 6.39	16.17 ± 6.75	14.05 ± 4.53	13.56 ± 2.35	18.19 ± 6.05	18.59 ± 7.54	16.74 ± 5.24	14.42 ± 7.36
IVRT (ms)	24.92 ± 2.67	23.97 ± 2.96	21.31 ± 2.24	19.68 ± 4.05 *	24.94 ± 4.29	27.00 ± 2.58	26.01 ± 4.28	25.60 ± 4.04

与正常组同期比较, * $P < 0.05$;与同组别 8 周比较, # $P < 0.05$

4. 血流动力学检测:术后第 12 周,改良手术各组 LVESP、+ dp/dt Max 与正常组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);LVEDP 较正常组均显著升高 ($P < 0.05$);只有缩窄 0.6mm 组 - dp/dt Max 较正常组显著

降低 ($P < 0.05$),其余各组 - dp/dt Max 变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$);缩窄 0.6mm 组及 0.7mm 组 Tau 值较正常组升高 ($P > 0.05$,表 2)。

表 2 12 周各组大鼠血流动力学指标比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标	正常组	缩窄 0.6mm 组	缩窄 0.7mm 组	缩窄 0.8mm 组
LVESP (mmHg ^Δ)	124.59 ± 24.16	127.10 ± 12.66	123.34 ± 13.36	122.42 ± 28.45
LVEDP (mmHg ^Δ)	3.17 ± 6.90	23.66 ± 10.41 *	16.75 ± 4.68 *	14.83 ± 5.92 *
+ dp/dt Max	6119.46 ± 1825.65	5132.43 ± 1198.85	5240.98 ± 828.98	4690.98 ± 1603.38
- dp/dt Max	-5076.02 ± 1101.99	-3643.30 ± 991.95 *	-4466.59 ± 835.62	-4269.17 ± 1185.47
Tau (ms)	7.93 ± 1.20	11.32 ± 3.33 *	9.01 ± 2.74 *	8.01 ± 1.93

与正常组比较, * $P < 0.05$; ^Δ1mmHg = 0.133kPa

讨 论

舒张性心力衰竭的定义一直是心血管领域的一个难点,2007 年发表于欧洲心脏病杂志的专家共识提出界定舒张性心力衰竭较恰当的术语应该是:拥有正常射血分数的心力衰竭 (heart failure with normal ejection fraction, HFNEF)或射血分数保留的心力衰竭 (heart failure with preserved ejection fraction, HFPEF)。同时提出舒张性心力衰竭的诊断应包括两个方面:①有舒张性不良的证据;②EF > 50%,其中舒

张性不良证据应满足出现充血性心力衰竭的症状或体征 (如心悸、劳力性呼吸困难、发绀、水肿等),及左心室舒张功能不良的实验室证据 (如有创的心导管检查、无创的超声心动图检查),并重点强调了舒张功能超声指标的重要性^[5]。

心脏舒张始于等容舒张期,在此期左心室压力持续快速下降,当低于左心房压时,二尖瓣打开,开始快速的早期充盈,最后心房收缩,完成左心室全部的前负荷,整个过程可以描述为心肌松弛 - 负压抽吸 - 顺

应性充盈 - 心房收缩的一个动态、连续的力学演变^[6]。任何一个病理因素,若引起心室肌松弛损害、心室顺应性下降(心室壁僵硬增加)或心房收缩无力,都可导致心室被迫升高压力,来完成足够的充盈容量,最终演变为舒张功能障碍^[7]。可见影响心室舒张的因素关键为心室主动弛张和被动顺应的两个过程,根据心室松弛型和顺应性受影响的阶段和程度,左心室舒张期功能障碍可分为4级^[8]:松弛异常(1级,左心室松弛性降低)、左心室充盈假性正常化(2级,左心室松弛性与顺应性降低的交界期或左心室顺应性降低)、可逆性充盈受限(3级,左心室松弛性与顺应性严重降低)及晚期不可逆性充盈受限(4级,左心室松弛性与顺应性不可逆性降低),而多普勒超声的二尖瓣血流形态能较好的区分不同等级的左心室舒张障碍,如 $E/A < 1$,则可能提示左心室松弛异常, $1.5 < E/A < 2$,则可能提示可逆性充盈受限, $E/A > 2$,则可能提示晚期不可逆性充盈受限。然而, E/A 取值即使在正常范围内,也并不能肯定左心室舒张功能是正常的,可能处于左心室充盈假性正常化阶段,这是从心室肌弛张受损向充盈受限的过渡型,由于左心室腔扩大与重构,心室僵硬大,左心室舒张压增高,流经二尖瓣口血流的A峰速度减慢,而左心房压及容量明显增大,使左心室舒张早期的跨瓣压力阶差增大,流经二尖瓣口血流加速,E峰不减小,故 E/A 比值不变小,可见 E/A 比值由于受左心房驱动压的影响,无法区别正常的舒张功能和舒张功能的假性正常化。故临床上现将 E/e 比值作为左心室舒张功能不良的结论性证据,因其消除了左心室松弛和年龄影响以及来自于左心房的前负荷对E和e的相似影响,且可预测左心室充盈压,与左心室舒张功能密切相关^[8]。

美国ACC/AHA/ASE推荐的2003版更新的超声《心动图临床应用指南》中,多普勒超声心动图的舒张功能参数中界定: $E/e > 15$,则可作为左心室舒张功能不全结论性证据; E/e 为8~15,可作为左心室舒张功能不全提示证据,但非结论性证据; $E/e < 8$,不作为左心室舒张功能不全证据,但非排除证据^[6]。此外,在2007年诊断HFPEF的专家共识中还将可以反映左心室松弛性的参数,包括等容舒张期持续时间(IVRT)、二尖瓣血流E峰减速时间(DT)、左心室舒张末期压力(LVEDP)、压力下降的最大速率($-dp/dt$)、舒张期持续时间(Tau or T)作为评判HFPEF的重要证据,其中有创心导管检查中的LVEDP升高($> 16\text{mmHg}$)、 $-dp/dt$ 降低、Tau值延长均可以作为诊

断HFPEF的明确证据,而IVRT与DT值因易受心室负荷状态、心率、年龄等因素影响,且左心房压明显增高时会出现假性正常化,敏感度和特异性相对较低^[5]。

本研究中各组EF均 $> 50\%$,LVESP与正常组比较无意义,表明收缩功能保留。缩窄0.6mm组于术后第12周LVPWd、LVmass升高显著,表明因腹主动脉缩窄后前后负荷增加,导致左心室重构而出现向心性肥厚; $E/e(19.67 \pm 4.28, > 15)$ 、LVEDP($23.66 \pm 10.41\text{mmHg}, > 16\text{mmHg}$)显著升高, $-dp/dt$ 有意义的降低及Tau值有意义的延长,可作为缩窄0.6mm组出现舒张性心力衰竭的结论性证据。缩窄0.6mm组术后8周及缩窄0.7mm组术后12周LVPWd、LVmass均升高, E/e 为8~15,且缩窄0.7mm组LVEDP升高至16mmHg以上,Tau延长,但 $-dp/dt$ 比较无意义,这些证据提示缩窄0.6mm组术后8周及缩窄0.7mm组术后12周可能出现了左心室舒张功能不全,而并未出现HFPEF。缩窄0.8mm组术后12周虽然出现了LVEDP的升高,可能是左心室为保障有效射血而使充盈压升高的代偿性表现。综上所述,经改良术式制备的缩窄0.6mm组压力负荷模型在本研究中于术后第8周出现舒张性功能不全,术后第12周出现HFPEF,成模速度快且模型稳定,但死亡率高($> 50\%$);而压力负荷致心力衰竭的动物实验中,0.7mm为较常规应用的结扎直径,本实验中于术后12周才出现舒张性功能障碍,虽然该模型组死亡率偏低(66.7%),但致HFPEF的成模速度较慢。因此,如何制备死亡率低、模型稳定、成模时间短的压力负荷致HFPEF的模型仍是需要不断深入研究的课题。

值得一提的是,改良术式相较于传统术式,最大的优点在于,以右髂腰区、腹膜后位作为手术路径,操作时不会触及到腹膜及其所包裹的腹腔脏器,从而避免了传统术式可能造成的肝叶牵拉、肠道扭转、胆管和下腔静脉损伤等,从而避免了术后出现肠梗阻、肝脏撕裂、胆管断裂、下腔静脉出血等并发症,从而可以降低大鼠死亡率。本研究在早期研究成果的基础上进一步对术式的操作进行了探索与改良,以右髂腰区约12肋下与腰方肌交角处为手术路径,只需轻微或不剥离肾周脂肪囊就可以找到右肾上动脉,使术中出血和感染的风险大大降低,且更节省时间^[9]。因此,在HFPEF对心力衰竭防治具有越来越重要的意义以及传统术式在压力负荷致HFPEF模型制备中仍占有重要地位的背景下,笔者认为此改良术式具有较广阔的应用前景,且更适合于舒张性功能不全模型的制备。(下转第52页)

效率高、创伤小、原位灭活肿瘤彻底、并发症少等优点^[11]。本组患者 1、3、5 年累计生存率分别为 91.5%、71.1%、57.4%，第 1、3 年的累计生存率与上述报道相似。

不管采取哪种治疗方法，复发转移都是影响肝癌患者生存的重要因素。肝癌手术切除后也有较高的复发率，其 2 年复发率和 5 年复发率分别为 50% 和 75%。当然，微波消融后也面临着复发的的问题，本组患者中，1、2 年复发率分别为 39.3% 和 53.8%，与其他临床报道一致。但高暴露及低暴露队列的复发转移率均低于无暴露队列，说明中医药治疗能减少肝癌消融治疗后的复发转移。另外本研究发现，高暴露组的复发转移率却高于低暴露组，进一步分析发现有部分患者消融后并没有早期进行中医治疗，出现复发转移后才开始服用中药并坚持了较长时间，统计时也将这部分患者归入了高暴露组，这是本回顾性研究的不足之处，故需要前瞻性研究予以证实。由此推断对于微波消融术后的原发性肝癌患者，联合中医药治疗可能会减少复发转移。

有研究认为肝癌的治疗效果取决于对癌灶的杀灭和对正常肝组织的保护两方面，只有综合治疗才可能提高其总体疗效^[12]。中医药治疗又提高机体免疫力、抗肝纤维化、改善肝功能等作用，从而缓解中晚期肝癌患者的临床症状，能改善患者的生活质量，在一定程度上延缓病程进展。良好的肝功能储备是肝癌患者长期生存的关键因素，肝功能改善后有可能在一定程度上使生存期延长。本组患者中，高暴露及低暴露队列的生存率较无暴露有所提高，是否与中医药具有改善患者的肝功能、抗纤维化、提高机体的免疫力等作用有关，有待于前瞻性研究进一步证实。

参考文献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69–90
- 2 Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in China: past, present and future[J]. Semin Cancer Biol, 2011, 21(1): 59–69
- 3 Dong BW, Zhang J, Liang P, *et al.* Sequential pathological and immunologic analysis of percutaneous microwave coagulation therapy of hepatocellular carcinoma [J]. Int J Hyperthermia, 2003, 19(2): 119–133
- 4 Liang P, Wang Y. Treatment of malignant liver tumors with percutaneous microwave ablation: complications among a 1136 Patients Cohort[J]. Radiology, 2009, 251(3): 933–940
- 5 Izumi N, Asahina Y, Noguchi O, *et al.* Risk factors for distant recurrence of hepatocellular carcinoma in the liver after complete coagulation by microwave or radiofrequency ablation[J]. Cancer, 2001, 91(5): 949–956
- 6 Tang ZY. From the biological of viewpoint of liver cancer[J]. J Med Res, 2008, 37(1): 1–3
- 7 Lu MD, Xu HX, Xie XY, *et al.* Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(11): 1054–1060
- 8 Wang Z, Liang P, Dong B, *et al.* Prognostic factors and recurrence of small hepatocellular carcinoma after hepatic resection or microwave ablation: a retrospective study[J]. J Gastrointest Surg, 2008, 12(2): 327–337
- 9 Itoh S, Ikeda Y, Kawanaka H, *et al.* Efficacy of surgical microwave therapy in patients with unresectable hepatocellular carcinoma[J]. Ann Surg Oncol, 2011, 18(13): 3650–3656
- 10 Leneioni R, Cioni D, Crecetti L, *et al.* Early – stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long – term results of percutaneous image guided radiofrequency ablation[J]. Radiology, 2005, 234(3): 961–967
- 11 Liang P, Yu J, Yu XL, *et al.* Percutaneous cooled – tip microwave ablation under ultrasound guidance for primary liver cancer: a multicentre analysis of 1363 treatment – naive lesions in 1007 patients in China [J]. Gut, 2012, 61(7): 1100–1101
- 12 Gish RG, Marrero JA, Benson AB. A multidisciplinary approach to the management of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterol Hepatol, 2010, 6(3 Suppl6): 1–16

(收稿日期: 2016–07–10)

(修回日期: 2016–08–02)

(上接第 38 页)

参考文献

- 1 Owan TE, Hodge DO, Herges RM, *et al.* Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction[J]. New Engl J Med, 2006, 355(3): 251–259
- 2 Borlaug BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis and treatment [J]. Eur Heart J, 2011, 32(6): 670–679
- 3 Chamberlain AM, Sauver JL, Gerber Y, *et al.* Multimorbidity in heart failure: a community perspective [J]. Am J Med, 2015, 128(1): 38–45
- 4 Oktay AA, Shah SJ. Current perspectives on systemic hypertension in heart failure with preserved ejection fraction[J]. Curr Cardiol Rep, 2014, 16(12): 272–274
- 5 Paulus WJ, Tschöpe C, Sanderson JE, *et al.* How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart fail-

ure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology[J]. Eur Heart J, 2007, 28(20): 2539–2550

- 6 Ommen SR, Nishimura RA. A clinical approach to the assessment of left ventricular diastolic function by doppler echocardiography: update 2003[J]. Heart, 2003, 89(suppl3): 18–23
- 7 Sharma K, Kass DA. Heart failure with preserved ejection fraction mechanisms, clinical features, and therapies[J]. Circ Res, 2014, 115(1): 79–96
- 8 Jeong EM, Dudley SC Jr. New diagnostic and therapeutic possibilities for diastolic heart failure[J]. R I Med J, 2013, 97(2): 35–37
- 9 杨涛, 张伟, 张雷. 大鼠腹主动脉缩窄模型的制备及其效果的探讨[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(1): 24–26

(收稿日期: 2016–04–30)

(修回日期: 2016–05–25)