

心血管疾病 小动物实验手册

主编 马依彤



人民卫生出版社

心血管疾病小动物 实验手册

主编 马依彤

副主编 杨毅宁 刘芬

编者 (按姓氏笔画为序)

马翔 (新疆医科大学第一附属医院)

向阳 (新疆医科大学第一附属医院)

李晓梅 (新疆医科大学第一附属医院)

张健发 (新疆医科大学第一附属医院)

陈铀 (新疆医科大学第一附属医院)

高晓明 (澳大利亚墨尔本贝克心脏研究所)

人民卫生出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

心血管疾病小动物实验手册/马依彤主编. —北京:
人民卫生出版社, 2008. 4

ISBN 978 - 7 - 117 - 09983 - 7

I. 心… II. 马… III. 心脏血管疾病 - 实验动物 -
模型 - 手册 IV. R54 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 027347 号

心血管疾病小动物实验手册

主 编: 马依彤

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010 - 67605754 010 - 65264830

印 刷: 三河市宏达印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 850 × 1168 1/32 印张: 8.5

字 数: 217 千字

版 次: 2008 年 4 月第 1 版 2008 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978 - 7 - 117 - 09983 - 7/R · 9984

定 价: 56.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010 - 87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

序

模式动物的综合利用是目前疾病模型建立的趋势之一。作为重要的实验模式动物,小鼠和人类在基因水平上高度同源,其生理生化指标及其调控机制和人类相同或相似,人类疾病动物模型研究多以小鼠为对象,其对医学研究的发展产生了重大影响。

本书主要介绍小鼠显微外科手术技术及其在心血管动物模型制作中的应用。编者多为工作在心血管领域科研第一线、有丰富实践经验的专家学者,在长期研究和实验的基础上,广泛参考了国内外类似著作,基于当前的心血管疾病小动物实验操作技术,全面介绍了各种心血管疾病动物模型的建立方法和应用等内容。在简要介绍原理的同时,提供了最新进展和相关文献,在实例操作后对结果进行了相应的分析讨论,以期有较强的实际指导作用;在内容框架上以具代表性的典型实验为单元,具体介绍了实验的方法、步骤、仪器、试剂种类与用量以及实验注意要点等,力图使所写内容对实际操作者有所借鉴,旨在对读者的研究和实验起到切实的参考指导作用。

本书内容简明、扼要,概括了当前小鼠心血管疾病实验技术领域国内外最经典的研究成果和技术方法,是一本内容全面系统、实用性强的实验指南类工具书。可供从事心血管领域疾病研究和应用开发的相关技术人员参考使用。

胡大一

前言

在过去一个世纪的研究中，小鼠作为建立人类各种疾病的动物模型的优选实验动物已经逐渐得到广大医学研究工作者的认可。小鼠的基因组改造技术成熟，且生理生化和发育过程和人类基本相同，基因组和人类 90% 同源，对环境和药物的反应也与人类极其相似，并具有成熟的基因工程改造技术手段，拥有大量的近交系品系，实验结果有很好的一致性和可比性。小鼠疾病模型基本上可以真实模拟人类疾病的发病过程及对药物的反应。同时由于小鼠寿命短，生命力强，表型稳定，容易繁殖和培养，及实验中所需消耗品少、实验周期短，能够进行重复实验及研究等优点，小鼠已被列为标准实验动物并广泛的应用于医学研究的各个领域。近十年来，国内外应用小鼠复制心脏疾病动物模型而进行心脏疾病的病理生理及机制研究已成为心脏病学研究的前沿课题。

由于应用小鼠建立常见心脏疾病模型需要较高的实验技术要求，国内外尚无标准、系统的小鼠心脏疾病模型建立方法资料和资源库，这种状况严重阻碍了我国利用小鼠动物模型研究心血管疾病发病机制的进程，本书编者通过国际、国内的合作和学习，不断完善现有的实验设备和操作技术，初步建立了心脏疾病动物模型的实验平台，在查阅大量国内外文献的基础上，本书全面、系统地总结了各种心脏疾病动物模型的制作方

法，系统地介绍小鼠心脏动物模型制作过程及相关技术要点。本书共十二章，包含小鼠的常用品系介绍、小鼠饲养方法、小鼠胸部及循环系统结构、麻醉、基本外科技术、各种心脏疾病动物模型的建立方法、超声和核磁检测方法等，内容由浅入深，辅以图解，希望本书能成为科研工作人员的有价值的参考书。

由于本书编者知识水平有限，目前开展工作不够全面，掌握资料不够充分，加之时间仓促，本书中涉及的内容不是十分完善。尽管所有编者在编写过程中尽了最大努力，但是书中部分内容及措辞仍可能有不够恰当之处，在此恳请各位读者不吝赐教，批评指正。

编者

2008年3月5日

目录

绪论	1
第一部分 小鼠实验动物学概述	9
第一章 常用品系小鼠的选择和饲养	11
第一节 小鼠生物学特性	11
第二节 心脏疾病模型建立常用小鼠品系	18
第三节 小鼠的饲养和管理	22
第二章 小鼠胸部及心脏应用解剖	28
第一节 小鼠胸部解剖	28
第二节 小鼠心脏及循环系统应用解剖	30
第三章 小鼠动物实验手术器械要求	39
第一节 小鼠心脏疾病模型建立必备手术器械	39
第二节 小鼠心脏疾病模型建立所需设备	43
第四章 小鼠麻醉的药品和方法	50
第一节 小鼠麻醉前准备	50
第二节 麻醉方法	52
第三节 小鼠麻醉常用的药品及剂量	55
第四节 麻醉剂对小鼠循环功能的影响	59
第五节 小鼠气管插管技术及机械通气	61
第五章 小鼠动物实验常规技术	66

第一节	小鼠的固定和体位	66
第二节	小鼠的编号、分组及除毛方法	73
第三节	小鼠动物实验常规操作	76
第二部分	小鼠心脏疾病模型建立的方法学	87
第六章	小鼠缺血性心脏疾病模型的建立	89
第一节	小鼠心肌梗死模型的建立	90
第二节	小鼠缺血性心脏破裂模型的建立	105
第三节	小鼠缺血性心力衰竭模型的建立	109
第四节	小鼠在体心肌缺血/再灌模型的建立	113
第五节	小鼠缺血性心脏疾病模型的评价	118
第七章	小鼠心室压力超负荷型心衰模型的建立	137
第一节	小鼠升主动脉缩窄模型的建立	138
第二节	小鼠主动脉弓缩窄模型的建立	145
第三节	小鼠腹主动脉缩窄模型的建立	155
第四节	小鼠两肾一夹模型的建立	161
第五节	小鼠肺动脉缩窄模型的建立	166
第八章	小鼠容量超负荷心力衰竭模型的建立	171
第一节	小鼠主动脉瓣反流模型的建立	171
第二节	小鼠动静脉痿模型的建立	177
第九章	小鼠离体灌流技术	184
第一节	Langendorff (LF) 离体心脏灌注模型	184
第二节	Working heart (WH) 离体心脏灌注模型	190
第三节	小鼠离体心脏缺血后适应模型的建立及评价	194
第三部分	模型评价方法	203
第十章	小鼠心脏超声检查及评价方法	205
第一节	心脏超声在小鼠心脏疾病模型中的应用进展	205

第二节	小鼠心脏超声检查方法·····	210
第十一章	小鼠血流动力学和心电评价方法·····	231
第一节	小鼠颈总动脉插管技术及血流动力学 评价·····	231
第二节	小鼠心电评价方法·····	238
第十二章	小鼠心脏核磁、核素显像的应用·····	245
第一节	小鼠心脏核磁影像的应用·····	245
第二节	小鼠心脏核医学影像技术的应用·····	253

绪论

随着人类社会的进步，全球经济一体化的快速发展，不同地区的自然、人文环境及传统生活方式已发生了急剧的变化。人类面临的疾病也发生了相应的改变，冠心病、高血压等心血管疾病已逐渐取代传染性疾病而成为 21 世纪全球公共健康问题。与此同时，随着生命科学的进展，人类对自身疾病的研究也越发深入。在心血管疾病发病机制的研究领域，国内外学者通过对遗传修饰小鼠心脏疾病模型的分析研究，已逐步实现了心血管疾病基础研究的跨越式发展。

近 20 年来，比较医学和动物实验技术的长足进步促进了疾病动物模型的小型化。由于小鼠全基因组草图的绘制完成及小鼠基因敲除技术的完善，目前可以通过基因工程、药物及显微外科等方法，根据研究目的设计、建立各种小鼠心血管疾病模型，特别是转基因小鼠的应用，使得对于心血管疾病发病机制的研究层次从病理生理学向分子生物学深入；这一优势目前仍难以被其他种属的动物所取代。在应用小鼠作为研究对象进行相应科学研究的同时，国内外研究者解决了一系列技术难题，创立和发明较为系统、规范的小鼠心脏功能形态评价方法和专用仪器设备，从而使以往仅仅适用于人体和大型动物的实验方法和评价体系应用于小鼠，保证了科学研究的准确性和真实性。由于小鼠与人类在基因水平上的高度同源、小鼠的生理

生化指标及其调控机制和人类相同或相似，因此针对小鼠疾病模型的研究成果就有很大的可能性是可以推演到人类；同时，小鼠生命周期短，繁殖快，饲养管理费用低，实验耗材用量少，能在短期内观察从幼年到衰老的全部生理过程，现已成为生物医学研究中广泛使用的实验动物，也是当今世界上研究最详尽的哺乳类实验动物。因此，目前在心血管疾病的基础研究中，小鼠作为研究对象已经成为趋势，并逐步取代其他种属的实验动物成为公认的主流动物实验平台。

一、小鼠的比较医学优势

1. 遗传学优势 自20世纪初，小鼠的遗传学研究从宠物农场进入哈佛大学的实验室只有短短一百年的历史。由于在1990年启动人类基因组计划时小鼠就被列为五种核心模式生物之一，所以小鼠基因组计划是最早启动的非人基因组计划。到了2002年，小鼠C57BL/6J近交系基因组的研究相继取得了成果：5月小鼠的16号染色体基因图谱被首先被绘制出来，并发现其与人类的21号染色体是高度同源的；8月小鼠的全基因组图谱完成；12月小鼠基因组测序基本完成。研究者们分析了96%小鼠基因组序列；在这其中有99%的基因能在人的基因组序列中找到同源序列，证实了小鼠与人类在基因水平上的高度同源。至此小鼠的研究进入了一个新阶段。

由于小鼠近交系、突变系和工具小鼠品系种类繁多，小鼠遗传学已成为发育生物学、功能基因组学和疾病机理研究的核心研究领域，小鼠也成为最重要的模式生物之一。在此基础上，近年来，不同小鼠近交系品系特异的微卫星标记或单核苷酸多态性不断被发现，小鼠生理生化表型分析手段和数据也越来越完善，这些前期工作导致了目前大规模的基因剔除计划、基因突变计划及构建和分析重组近交系计划的实施。使得小鼠基因组改造手段非常成熟，应用转基因小鼠进行人类疾病研究可能构成未来10~20年中生命科学和医学研究领域的最重要

的内容之一。

2. 生物学优势 小鼠作为模式生物相对于其他物种有什么优势? 首先, 从进化的角度上来看, 与狗、猴等大型哺乳动物相比, 小鼠作为哺乳动物的代表有其不可动摇的地位。除了小鼠以外的四种模式动物都至少在 2.7 亿年前就在进化上与人类走到了不同的分支, 而小鼠在 6 千万年前还和人类共同拥有一个祖先。从生理功能的角度来看, 小鼠的生理生化指标及其调控机制和人类相同或相似, 因此小鼠的研究成果就有很大的可能性是可以推演到人类。并且和小鼠的分子生物学研究同步的是小鼠的生理生化数据的积累。国外各种专门用于小鼠的代谢、心血管、呼吸、骨骼、血液、行为等生理功能检测仪器设备和方法在过去几十年中得到的迅速发展, 比较医学的研究使得我们可以将小鼠的特定生理生化功能和人类进行比较分析。

其次, 小鼠的繁殖能力强, 生殖周期短。通常实验用的近交系如 C57BL 小鼠一胎生育 5 ~ 10 只幼鼠, 而远交群的小鼠的生殖能力更强。这些幼鼠在 8 周之后就能达到性成熟的状态, 开始繁殖下一代。同时小鼠没有亲子相残的习性, 这样生产后的雌鼠和幼鼠仍可以和雄鼠同笼。这样不但确保了幼鼠的成活率, 同时也能提高交配的频率, 确保了繁殖的高效率。小鼠交配时会形成阴栓, 这有助于判断交配的时间, 对研究中判断不同发育阶段十分重要。因为其他动物的受精时间通常要通过观察交配行为来确定, 而小鼠的这种特性就使研究人员不必时刻注意实验动物的行为, 为工作提供了便利。由此小鼠受孕和生育过程容易观察和控制, 使得受精卵基因修饰成为可能, 并且表型的变化能够在子代中迅速表达。

再次, 小鼠生命周期短, 寿命平均 2 ~ 3 年, 人类的慢性疾病及疾病的发生、演变及转归能在短时间内全面观察。如缩窄主动脉制作小鼠左心室慢性心力衰竭动物模型, 能在 4 ~ 12 周观察到心衰发生、发展和形成较稳定的心力衰竭的病理生理表现。如果实施干预和治疗措施, 可以在短期内观察和评价实

施的效果，大大缩短了科学研究的实验周期和成本。

小鼠的大多数品系比较温顺，容易抓取和进行实验操作。小鼠在长期繁育过程中形成了各种实验用近交品系，使用具有基本一致遗传背景的近交系小鼠所得出的实验结果容易在不同的实验室得到重复，这就使实验结果更加真实可信。

3. 经济学优势 随着人类跨入 21 世纪，科学研究也随之发生了日新月异的进步，全球各国对科学研究的投入也相应加大，如何提高科学研究的效益成为日益受到关注的问题。特别是生命科学研究，主要以实验动物为研究对象，实验动物的培育和管理是科研投入的重要部分，也是科研成本的主要计算项目。由于大型实验动物繁殖和生长周期较长，前期投入多，因此购买价格不菲；同时由于动物实验伦理学的要求，对科学研究中使用实验动物的数量和要求存在严格的限制和规定。如果全部应用大动物进行科学基础研究，科研预算将急剧增加。因此小鼠具有其他物种难以比拟的经济学优势。由于小鼠饲养繁殖的低成本，品系种类繁多，因此价格较为低廉。更为重要的是，在科学实验中，小鼠个体所需要的实验药品和耗材远远低于大型实验动物的用量，例如同一种腹腔麻醉剂，大鼠的剂量是小鼠的 10~20 倍，大型哺乳动物是小鼠 1000 倍；在保证科学实验实施的条件下，应用小鼠将极大地节约科研资源，降低科研成本，取得最优的经济学效益。

4. 饲养管理优势 小鼠饲养及管理设施相对较为简单，由于小鼠体积小，可以在有限的空间内进行大规模饲养，因而十分利于进行大规模的动物实验。其次，小鼠属杂食性动物，有随时采食习性，对饲料的要求不高，喜吃含淀粉高的颗粒饲料；饲料配比和加工较为简易，有利于大批量繁殖和饲养管理。

二、小鼠在生物医学中应用

小鼠在科学研究中的使用数量是首屈一指的。在哺乳类实

验动物中,由于小鼠体小,饲养管理方便,易于控制,生产繁殖快,研究最为广泛,有明确的质量控制标准,已拥有大量的近交系、突变系和封闭群,近年来遗传工程小鼠的培育迅速增加,因此在各种实验研究中,用量最大,用途最多,在心血管疾病的研究领域也已被广泛使用。

1. 安全性和毒性试验 常选用小鼠进行心血管系统新药及化工产品的安全实验,急性、亚急性、慢性、毒性试验,还可做致畸、致癌致突变试验,半数致死量测定等。

2. 药物的筛选 小鼠常用于心血管系统药物安全性评价、治疗效果评价、效价测定及生物制品检定。小鼠特别适合于药物急性毒性实验,测定药物或化学制剂的半数致死量(LD₅₀)和药物致癌性试验。筛选试验多半从小鼠做起,筛选各种药物对疾病有无防止作用,通过筛选获得每个药物的疗效效果后,再用其他动物进一步肯定。

3. 心血管系统遗传相关疾病的研究 由于小鼠生长繁殖周期短,已培育成许多近交系及突变系,为心血管遗传学研究提供了十分方便的条件。小鼠的毛色基因已研究得比较清楚,因此毛色常作为小鼠遗传学分析中的遗传标记和品系鉴定的依据之一。具有遗传性疾病的突变系为研究人类遗传性疾病的病因、发病机理和治疗,提供了自然的模型动物。如家族性肥胖、自发性高血压等都有相应的突变系小鼠可供研究使用。

转基因小鼠可用于研究基因的功能、表达和调节,探索疾病的分子遗传学基础和基因治疗的可能性和方法。小鼠品系多,并存在遗传上相关的许多同源近交系,重组近交系等。重组近交系小鼠是将双亲品系的基因自由组合和重组产生一系列的子系,这些子系是小鼠基因相关分析的重要工具,主要用于研究基因定位及其连锁关系。同源近交系小鼠常用来研究多态性基因位点的多效性,基因的效应和功能以及发现新的等位基因。在心血管疾病研究领域人们希望通过建立过度表达、转入或敲除某一基因的小鼠种系,观察心功能的改变,明确该基

因在复杂的心血管疾病中的作用及其机制。

4. 年龄相关研究 研究发现心血管系统许多疾病如冠心病、高血压等，老龄是其发病增加的重要危险因素。小鼠寿命短，传代时间短，使他们在老年学研究中极为有用，能在短期内复制出生到死亡的整个过程，能完整观察小鼠的衰老及其对心血管系统造成的影响。

5. 内分泌疾病的研究 小鼠自发或诱发的内分泌腺结构的缺陷常引起类似人类的内分泌疾病，为心血管系统疾病研究提供料好的模型基础。如可诱导胰岛发育不全造成的肥胖症研究高血压和冠状动脉粥样硬化等疾病。

三、我国小鼠研究现状

由于种种原因，我国小鼠比较医学和基因组改造相关工作研究起步晚、规模小，制约了我国功能基因组研究，相关疾病的动物模型研究也因此成为致病机理研究和生物医药研究开发的瓶颈。由于小鼠生物学的制约，必须建立专门用于小鼠的代谢、心血管、呼吸等生理功能检测仪器设备和评价方法，国外在过去几十年中得到的迅速发展，采用目前高技术手段对小鼠心脏形态、功能和血流动力学进行评价，如：高频心脏超声和超微心脏导管；使得我们可以将小鼠的特定生理生化功能进行分析。但国内目前尚缺乏系统的研究，这些因素制约着我国心血管疾病基础研究工作的深入开展。

近年来，在国家科技部、国家自然科学基金委员会、中国科学院及有关地方政府的资助下，我国科技工作者利用小鼠模式生物开展了生物技术、基因识别、基因表达谱、基因功能、个体发育、疾病发病机制及药理、毒理方面的研究，取得了一系列重要科研成果。2001年，科技部启动了“十五”攻关重点项目“国家遗传工程小鼠资源库的建立”，该项目于2005年顺利结题。资源库建立了完善的转基因、基因剔除和化学诱变等小鼠基因组改造技术服务平台，三年多来已为国内外研发

机构建立了遗传工程小鼠品系 100 余种, 其中基因剔除品系 30 余种, 这些小鼠品系中包括糖尿病、肥胖症、白内障、肢体残废、发育缺陷、心血管系统障碍等多种人类疾病的动物模型。除此之外, 我国已建立了相应的生物研究中心, 2000 年 9 月在上海建成南方模式生物研究中心, 主要任务是围绕国家目标, 承担国家和地方科技项目, 开展基础和应用基础研究。同时, 为相关科研机构或企业提供模式生物技术服务。中心现已相继建立了 140 多种转基因或基因剔除小鼠品系, 涉及人类重大疾病 10 余种, 如白血病、肿瘤、乙型肝炎、糖尿病、骨质疏松症、心血管疾病、神经精神性疾病等。另外, 军事医学科学院、中国医学科学院及复旦大学等研究院所, 已利用小鼠条件性基因剔除技术对骨关节炎致病基因的功能及其在发病机制中的作用进行了卓有成效的研究; 开展了细菌人工染色体克隆的小鼠转基因研究; 利用转座子插入技术, 建立了一批突变小鼠模型。值得一提的是, 2005 年, 上海市科委立项 300 个基因 (总基因数的 1%) 的基因剔除计划, 以期和国际上的小鼠研究同步。

总之, 我国利用小鼠大规模构建人类疾病模型和开展新基因功能研究的科学基础已经形成, 我们完全有能力在国际功能基因组学和疾病模型研究中取得应有的地位。因此, 进一步建立规范化的小鼠动物实验方法和标准, 并完善与之相应的比较医学研究势在必行, 建立相应的学科和人才队伍是亟待解决的问题。

参 考 文 献

1. 林兆宇, 高翔. 小鼠的遗传学研究. 生命科学, 2006, 18: 437-441.
2. Silver L M. Mouse genetics: Concepts and applications. Oxford: Oxford University Press, 1995.
3. Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone

- fusion genes. *Nature*, 1982, 300: 611-615.
4. Hrabe de Angelis M H, Flaswinkel H, Fuchs H, et al. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet*, 2000, 25: 444-447.
 5. Cox R D, Brown S D. Rodent models of genetic disease. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13: 278-283.
 6. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 1998, 39: 60-76.
 7. Schaper W, Winkler B. Of mice and men-the future of cardiovascular research in the molecular era. *Cardiovascular Research*, 1998, 39: 3-7.
 8. Doevendans PA, Daemen MJ, De Muinck ED, et al. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular Research*, 1998, 39: 34-49.
 9. Cuppen E. Haplotype-based genetics in mice and rats. *Trends Genet*, 2005, 21 (6): 318-322.
 10. Kass DA, Hare JM, Georgakopoulos D. Murine Cardiac Function: A Cautionary Tail. *Circ Res*, 1998, 82: 519-522.