

脓毒症心肌损伤小鼠模型的建立和评价

胡立亚 李培军 常超 刘珊 宋衍秋 赵福梅 刘婷

300070 天津医科大学(胡立亚); 300222 天津市胸科医院心外科 ICU(李培军、常超); 300222 天津市心血管病研究所(刘珊、宋衍秋、赵福梅、刘婷)

通讯作者: 李培军, Email: peijunli66@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.011

【摘要】 目的 通过腹腔注射脂多糖(LPS)建立脓毒症心肌损伤小鼠模型,为脓毒症心肌损伤的发病机制研究提供一个稳定、可靠的实验手段。**方法** 将 150 只雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为正常对照组(NC 组)、假手术组(Sham 组)及 LPS 10、12、15 mg/kg 模型组,每组 30 只。经腹腔注射相应剂量 LPS 制备脓毒症心肌损伤模型; Sham 组注射等量生理盐水; NC 组不进行任何处理。每组 15 只用于观察制模前的一般状况,于制模后 24 h 行心脏超声检查心功能,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 cTnI 水平,观察心肌组织形态学和超微结构改变;其余 15 只用于观察制模后 7 d 死亡情况。**结果** 腹腔注射 LPS 后,小鼠均出现精神萎靡、毛发竖立、腹泻等脓毒症表现。与 NC 组比较, LPS 10、12、15 mg/kg 组左室射血分数(LVEF)、左室缩短分数(LVFS)均显著降低[LVEF: 0.459 ± 0.044 、 0.432 ± 0.034 、 0.348 ± 0.064 比 0.588 ± 0.019 , LVFS: $(22.36 \pm 2.60)\%$ 、 $(20.78 \pm 1.91)\%$ 、 $(16.27 \pm 3.31)\%$ 比 $(30.55 \pm 1.30)\%$, 均 $P < 0.01$],血清 cTnI 水平显著增高(ng/L: 270.40 ± 43.50 、 281.14 ± 41.79 、 298.39 ± 42.05 比 192.59 ± 16.90 , 均 $P < 0.01$)。各剂量 LPS 组小鼠均出现心肌组织损伤,光镜下观察可见心肌纤维变性,间质水肿、出血,炎性细胞浸润等改变,透射电镜下观察可见心肌纤维排列紊乱、线粒体肿胀和嵴减少等改变,且 LPS 剂量越高损伤越严重。Sham 组各指标与 NC 组比较差异均无统计学意义。LPS 10、12、15 mg/kg 组小鼠制模后 7 d 死亡率分别为 33.3%、53.3%、86.7%; NC 组及 Sham 组小鼠无死亡。**结论** 以腹腔注射 12 mg/kg LPS 建立脓毒症心肌损伤小鼠模型较为理想。

【关键词】 脓毒症; 心肌损伤; 动物模型; 脂多糖; 小鼠

基金项目: 天津市医药卫生计划项目(2014KY32)

Establishment and evaluation of mouse models of septic myocardial injury Hu Liya, Li Peijun, Chang Chao, Liu Shan, Song Yanqiu, Zhao Fumei, Liu Ting

Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China (Hu LY); Department of Cardiovascular Intensive Care Medicine, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China (Li PJ, Chang C); Tianjin Cardiovascular Diseases Institute, Tianjin 300222, China (Liu S, Song YQ, Zhao FM, Liu T)

Corresponding author: Li Peijun, Email: peijunli66@163.com

【Abstract】 Objective Mouse models of sepsis-induced myocardial injury by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) was established in order to provide a reliable method for the research of pathogenesis of sepsis-induced myocardial injury. **Methods** According to the method of random number table, a total of 150 male C57BL/6 mice were divided into five groups: NC group, sham group, and LPS 10, 12, 15 mg/kg groups, with 30 in each group. Septic myocardial injury was induced by intraperitoneal injection LPS in mice; sham group was injected with equal 0.9% saline; while there was no treatment in mice of NC group. Fifteen of the 30 mice in each group were used to observe the general status of mice before and after LPS or saline injection. Twenty-four hours after LPS or saline injection, the left ventricular function was assessed by echocardiography, serum level of cardiac troponin (cTnI) was determined by enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), and the cardiac histomorphology and ultrastructure were observed; the other 15 mice were used to monitor the 7-day mortality after LPS or saline injection. **Results** The mice challenged to LPS displayed symptoms of sepsis, such as depression, ruffled fur, and diarrhea. Compared with NC group, left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fraction shortening (LVFS) were significantly decreased at 24 hours after LPS administration in LPS 10, 12, 15 mg/kg groups [LVEF: 0.459 ± 0.044 , 0.432 ± 0.034 , 0.348 ± 0.064 vs. 0.588 ± 0.019 , LVFS: $(22.36 \pm 2.60)\%$, $(20.78 \pm 1.91)\%$, $(16.27 \pm 3.31)\%$ vs. $(30.55 \pm 1.30)\%$, all $P < 0.01$], and cTnI levels were significantly increased (ng/L: 270.40 ± 43.50 , 281.14 ± 41.79 , 298.39 ± 42.05 vs. 192.59 ± 16.90 , all $P < 0.01$). Myocardium injury was observed in three LPS groups, myocardial fibrosis, interstitial edema, erythrocyte leakage and infiltrating inflammatory cells were observed under light-microscope; ultrastructural changes disorderly arranged in cardiac muscle fibers, mitochondrial swelling and even partly missing mitochondria cristae were found under transmission electron microscope (TEM), and the higher of the dose, the more sever of the damage. There was no significant difference between sham group and NC group. The 7-day mortality in LPS 10, 12, 15 mg/kg groups were 33.3%, 53.3% and 86.7%, respectively, while no death in the NC group and sham group. **Conclusion** For establishing the mouse model of sepsis-induced myocardial injury, intraperitoneal injection with 12 mg/kg LPS is a preferable choice in our research.

【Key words】 Sepsis; Myocardial injury; Animal model; Lipopolysaccharide; Mouse

Fund program: Health and Family Planning Commission of Tianjin of China (2014KY32)

脓毒症是指机体对感染反应失调而导致危及生命的器官功能障碍^[1],是严重创(烧)伤、感染、外科大手术后常见并发症^[2],可进一步发展为多器官功能障碍,甚至死亡。脓毒症时心脏是最常累及的器官之一,心功能障碍是脓毒症患者的一种危重表现^[3]。研究表明,重症加强治疗病房(ICU)内约60%的脓毒症患者伴心功能障碍,且病死率达70%~90%,而无心功能障碍脓毒症患者的病死率只有20%^[4]。目前脓毒症心肌损伤的发病机制尚未完全阐明,因此建立可靠的脓毒症心肌损伤动物模型,对深入研究脓毒症心肌损伤的发病机制、寻求有效防治措施具有重要意义。本研究采用单次腹腔注射脂多糖(LPS)诱导小鼠脓毒症心肌损伤,从小鼠的一般状况、死亡情况、心功能变化、血清心肌损伤标志物改变及心肌组织病理学改变等方面进行评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂:SPF级雄性C57BL/6小鼠150只,8~12周龄,体重22~28g,购自军事医学科学院实验动物中心,动物许可证号:SCXK(京)2014-0013。LPS(E.coli O111:B4,美国Sigma公司);小鼠心肌肌钙蛋白I(cTnI)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(北京Biotopped公司)。

1.2 脓毒症动物模型制备与分组:按随机数字表法分为正常对照组(NC组)、假手术组(Sham组)及LPS 10、12、15 mg/kg模型组5组,每组30只。配制1 g/L的LPS溶液,按照分组腹腔注射相应剂量的LPS溶液制备脓毒症心肌损伤模型;Sham组腹腔注射等量生理盐水;NC组不进行任何处理。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法:每组15只小鼠用于观察制模前后一般状况,并于制模后24 h取血及心肌组织进行相关指标检测;其余15只小鼠用来观察制模后7 d死亡情况。

1.3.1 动物一般状况及存活情况:观察各组小鼠制模前后的精神状态及生活习性变化;记录死亡时间。

1.3.2 心功能检测:制模后24 h行心脏超声检查,测量左室舒张期末内径(LVEDD)、左室收缩期末内径(LVESD),计算左室射血分数(LVEF)和左室缩短分数(LVFS),连续取3~5个心动周期。

1.3.3 血清cTnI测定:取心脏血1 mL,离心取血清于-20℃保存,采用ELISA法测定血清cTnI水平。

1.3.4 心肌组织病理学观察:采血后断颈处死小鼠,立即取1 mm×1 mm×1 mm心尖组织于2.5%戊二

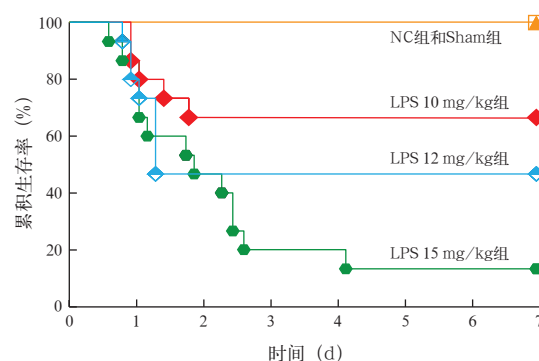
醛中固定,切片后于透射电镜下观察心肌组织超微结构。剩余的心肌组织沿左心室最大横径冠状切面取材,于10%中性甲醛溶液中固定24 h,切片(片厚3~4 μm)后于光镜下观察心肌组织病理学改变。

1.4 统计学分析:使用SPSS 22.0软件分析数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验;用GraphPad Prism 5软件绘制Kaplan-Meier生存曲线。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般状况:制模后24 h,不同剂量LPS组小鼠出现精神萎靡不振、毛发竖立松乱、活动减少、运动迟缓、对刺激反应性减弱、寒战、眼睑部出现黏稠分泌物、腹泻等脓毒症表现,随LPS剂量增加症状加重;而NC组和Sham组无上述表现。

2.2 动物存活情况(图1):NC组及Sham组小鼠无死亡;LPS 10、12、15 mg/kg组制模后7 d小鼠死亡率分别为33.3%、53.3%、86.7%。



注: NC组为正常对照组, Sham组为假手术组, LPS组为脂多糖诱导脓毒症心肌损伤组

图1 各组小鼠制模后7 d Kaplan-Meier生存曲线

2.3 心功能改变(表1;图2):与NC组比较,不同剂量LPS组LVESD显著升高,LVEF、LVFS显著降低(均 $P < 0.05$),且随LPS剂量增加变化更为显著;LVEDD仅LPS 12 mg/kg组显著低于NC组($P < 0.05$),其他各组间心功能指标差异均无统计学意义。

表1 不同剂量LPS制备脓毒症心肌损伤模型后24 h小鼠心功能指标改变($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	LVEF	LVFS(%)
NC组	15	3.74±0.22	2.60±0.16	0.588±0.019	30.55±1.30
Sham组	15	3.73±0.18	2.60±0.13	0.587±0.014	30.44±0.92
LPS 10 mg/kg组	12	3.56±0.24	2.77±0.20 ^a	0.459±0.044 ^b	22.36±2.60 ^b
LPS 12 mg/kg组	11	3.54±0.13 ^a	2.80±0.11 ^b	0.432±0.034 ^b	20.78±1.91 ^b
LPS 15 mg/kg组	10	3.65±0.31	3.06±0.32 ^b	0.348±0.064 ^b	16.27±3.31 ^b

注:LPS为脂多糖,NC为正常对照,Sham为假手术,LVEDD为左室舒张期末内径,LVESD为左室收缩期末内径,LVEF为左室射血分数,LVFS为左室缩短分数;与NC组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

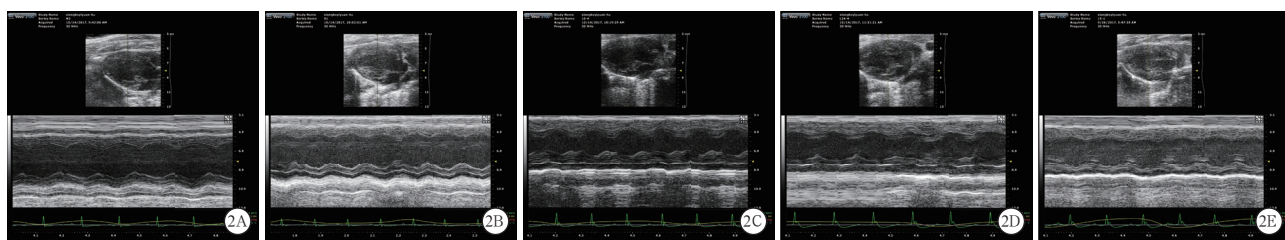


图2 各组小鼠制模后 24 h 心脏超声图像 正常对照组(NC 组, A)、假手术组(Sham 组, B)心脏结构正常, 左室收缩和舒张功能大致正常; 脂多糖(LPS) 10、12、15 mg/kg 组(C、D、E)左室收缩期末内径明显增加, 左室收缩功能降低, 且随 LPS 剂量增加, 收缩功能受损逐渐加重

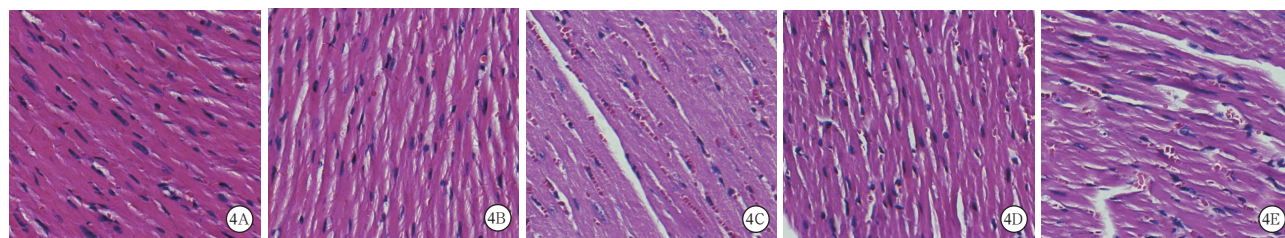


图4 光镜下观察各组小鼠制模后 24 h 心肌组织病理学改变 正常对照组(NC 组, A)和假手术组(Sham 组, B)心肌纤维排列规整, 横纹清晰可见, 心肌细胞形态正常, 胞质粉染, 核膜完整, 染色质致密、深染, 心肌间质无明显改变; 脂多糖(LPS) 10、12、15 mg/kg 组(C、D、E)心肌纤维排列不规整, 间质水肿、出血, 炎性细胞浸润, 且随 LPS 剂量增加, 心肌组织病理学改变加重 HE 染色 中倍放大

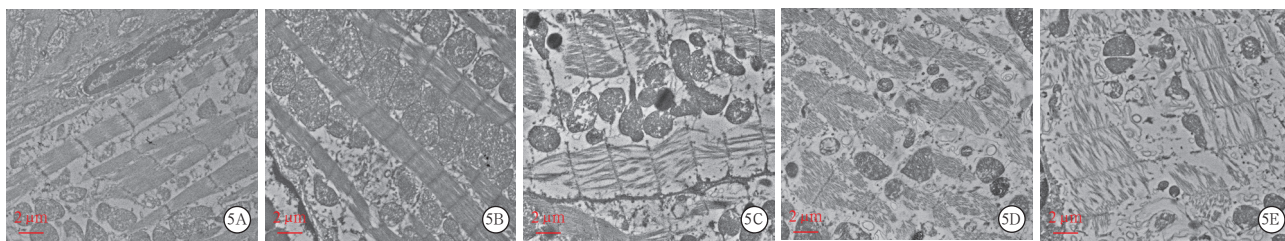
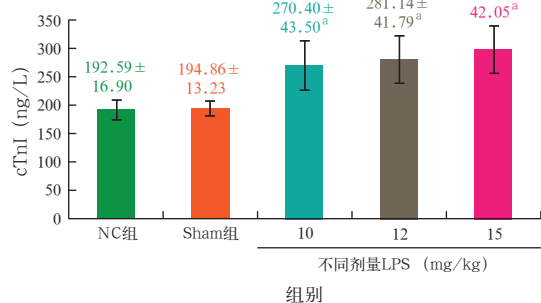


图5 透射电镜下观察各组小鼠制模后 24 h 心肌组织超微结构改变 正常对照组(NC 组, A)和假手术组(Sham 组, B)心肌纤维排列规整, 心肌细胞形态正常, 线粒体排列整齐; 脂多糖(LPS) 10、12、15 mg/kg 组(C、D、E)肌丝束分离, Z 线间距缩短, 线粒体水肿, 可见空泡变性, 且随 LPS 剂量的增加病理改变加重 铀-铅双染 $\times 3000$



注: LPS 为脂多糖, cTnI 为心肌肌钙蛋白 I, NC 为正常对照, Sham 为假手术; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.01$

图3 不同剂量 LPS 制备脓毒症心肌损伤模型后 24 h 小鼠血清 cTnI 水平改变

2.4 血清 cTnI 水平(图 3): 与 NC 组比较, 不同剂量 LPS 组血清 cTnI 水平均显著升高(均 $P < 0.01$), 且随 LPS 剂量的增加而升高。Sham 组 cTnI 水平与 NC 组比较差异无统计学意义。

2.5 心肌组织病理学改变(图 4~5): 光镜下观察, 不同剂量 LPS 组心肌纤维排列不规整, 部分心肌纤维断裂、变性, 横纹模糊消失, 染色质疏松、淡染, 间质水肿、出血, 炎性细胞浸润; 电镜下观察可见心肌纤维排列不整齐, 肌丝束分离, Z 线扭曲, Z 线间距

离缩短, 心肌细胞线粒体排列紊乱、水肿、嵴减少, 部分空泡变性, 偶见心肌细胞核固缩、核碎裂、胞质崩解等坏死改变, 且随 LPS 剂量增加逐渐加重。NC 组及 Sham 组心肌组织无上述病理学改变。

3 讨论

脓毒症心肌损伤是脓毒症和脓毒性休克的严重并发症之一, 与预后密切相关。目前认为脓毒症心肌损害的发病机制可能包括: ①促炎/抗炎反应失调^[5]; ②细胞凋亡^[6]; ③氧化应激^[7]; ④线粒体功能障碍^[8]等, 多种因素共同引起心肌结构和功能异常, 最终导致心脏衰竭, 但确切的分子机制尚未阐明。

在探讨脓毒症发生发展的过程中, 动物模型起着十分重要的作用。目前较为成熟的脓毒症动物模型主要有 3 类: ①直接注射外源性毒素; ②直接注射活的病原体; ③菌群移位模型^[9]。其中由于腹腔注射 LPS 制模方便, 可以人为精确控制感染的给药剂量, 模型的可复制性高, 能近似地反映出人类脓毒症的病理生理过程。因此, 从多个方面来看, 腹腔注射 LPS 诱导脓毒症是一种较为理想的动物模型。

超声心动图检查具有无创、简便、准确、可重复

性高等优点,能直观得到心脏结构、功能和血流动力学等相关资料,是评估心功能的重要手段^[10]。研究表明,脓毒症或脓毒性休克患者可发生左室收缩功能障碍^[11]。LVEF 和 LVFS 尽管受多种因素影响,但仍是反映心脏收缩功能较好的指标。Wang 等^[12]研究显示,经腹腔注射 LPS 诱导小鼠脓毒症心肌损伤时,LVEF 和 LVFS 显著降低。本研究结果也显示,不同剂量 LPS 组 LVEF 和 LVFS 显著低于 NC 组,提示腹腔注射 10~15 mg/kg LPS 后 24 h 脓毒症小鼠存在左心室收缩功能障碍。

cTnI 是调节横纹肌收缩的重要蛋白,被认为是心肌细胞损伤敏感性和特异性较强的标志物^[13-14]。研究表明,脓毒症或脓毒性休克时血清 cTnI 水平显著升高,与心肌受损程度成正比,且与左心室功能障碍密切相关^[15]。本实验结果显示,不同剂量 LPS 组血清 cTnI 水平均较 NC 组显著升高,且随 LPS 剂量增加而升高,提示腹腔注射 10~15 mg/kg LPS 均可诱导脓毒症心肌损伤,且与 LPS 剂量呈正相关。

研究显示,脓毒症早期即出现心肌组织病理损伤,光镜下可见心肌细胞变性、坏死、炎性细胞浸润等病理学改变^[16]。本研究中不同剂量 LPS 组在光镜和电镜下均可见一定程度的心肌损伤,且随 LPS 剂量的增加,损伤程度加重。

本实验采用单次腹腔注射不同剂量 LPS 建立脓毒症心肌损伤模型,各组小鼠均出现脓毒症症状和体征、左室收缩功能障碍、心肌损伤标志物 cTnI 明显升高,此外,光镜和电镜下观察小鼠均出现不同程度心肌组织损伤。根据脓毒症转归,较理想的脓毒症动物模型要求动物自然死亡率在 50%~70%^[17]。本研究显示,仅 LPS 12 mg/kg 组动物死亡率(53.3%)符合。表明单次腹腔注射 12 mg/kg LPS 制备脓毒症心肌损伤模型更接近临床的病理生理过程。

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] 白祥军,唐朝晖.重视脓毒症的早期诊断与临床干预[J].临床急诊杂志,2006,7(5):215-217. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5918.2006.05.001.
- [3] 庄海舟,沈潞华.脓毒症时心肌损伤发生机制研究进展[J].实用医学杂志,2008,24(24):4313-4315. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2008.24.074.
- [4] 金善子,王胜.线粒体通透性转换孔在脓毒症心肌抑制发生过程中的作用[J].中华危重病急救医学,2016,28(8):747-751. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.018.
- [5] 张何为,崔晓旭,方涛,等.人脐带间充质干细胞对脓毒症大鼠的免疫干预研究[J].中华危重病急救医学,2017,29(8):705-710. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.08.007.
- [6] 刘安雷,朱华栋,于学忠,等.脂多糖诱导脓毒症小鼠心功能障碍机制研究[J].中华急诊医学杂志,2015,24(8):825-829. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.08.004.
- [7] 高雪花,艾宇航.依达拉奉对脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用[J].中国现代医学杂志,2016,26(12):6-10. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.002.
- [8] 赵志伶,樊巧鹰,汪宗昱,等.脓毒症心肌抑制的临床表现及发病机制研究进展[J].中华危重病急救医学,2014,26(7):525-528. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.07.018.
- [9] Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury [J]. J Clin Invest, 2009, 119 (10): 2868-2878. DOI: 10.1172/JCI39421.
- [10] 吴敬医,张霞,王箴,等.超声心动图评价感染性休克患者液体反应性的临床研究[J].中华危重病急救医学,2014,26(1):36-40. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.01.008.
- [11] Palmieri V, Innocenti F, Guzzo A, et al. Left ventricular systolic longitudinal function as predictor of outcome in patients with sepsis [J]. Circ Cardiovasc Imaging, 2015, 8 (11): e003865. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.115.003865.
- [12] Wang H, Bei Y, Huang P, et al. Inhibition of miR-155 protects against LPS-induced cardiac dysfunction and apoptosis in mice [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2016, 5 (10): e374. DOI: 10.1038/mtna.2016.80.
- [13] 杨永丽,何静,肖志英.微小 RNA-499 对脓毒症患者心肌损伤的诊断价值[J].中华危重病急救医学,2015,27(3):218-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.012.
- [14] 郭俊,王夜明.脓毒症患者血清降钙素原与心肌钙蛋白 I 水平的相关性研究[J].中国中西医结合急救杂志,2015,22(5):527-530. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.05.019.
- [15] Guo J, Wang YM. A study on the correlation between serum procalcitonin and cardiac troponin I levels in patients with sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (5): 527-530. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.05.019.
- [16] 李旭成,张栋,张军,等.脓毒症心力衰竭患者血清心肌钙蛋白 I 的相关性及五参汤治疗的临床疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,2017,24(1):10-13. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.004.
- [17] 汤耀卿,李磊.脓毒症动物模型制作方略及应用[J].中华实验外科杂志,2006,23(12):1433-1434. DOI: 10.3760/j.issn.1001-9030.2006.12.001.
- [18] Tang YQ, Li L. The making strategy and application in animal models of sepsis [J]. Chin J Exp Surg, 2006, 23 (12): 1433-1434. DOI: 10.3760/j.issn.1001-9030.2006.12.001.

(收稿日期:2018-01-11)