

C57BL/6 小鼠放射性心脏损伤 动物模型的建立及血清标志物的探讨

符天晓¹, 周菊英¹, 焦 旻²

摘要 目的 探讨放射性心脏损伤动物模型建立方法和相关血清标志物。方法 雌性 C57BL/6 小鼠 28 只, 随机分为 3 组: 对照组 (4 只), 18 Gy 放疗组 (12 只), 25 Gy 放疗组 (12 只)。每周测小鼠体重, 分别于照射后第 0、8、16 周, 取心肌组织行 HE 染色, 观察心脏病理组织改变并进行评分; 采集下腔静脉血检测心肌肌钙蛋白 I (cTnI)。结果 与对照组比较, 放疗组小鼠的体重开始呈下降趋势后缓慢上升。放疗组小鼠的心肌组织存在明显的组织病理学改变, 早期以急性炎症为主, 后期以进行性纤维化为特征; 随着受照剂量的增加, 炎症反应和纤维化程度加重, 病变时间提前。cTnI 随时间变化呈升高趋势, 和剂量大小、病理学表现均呈相关性。结论 成功建立放射性心脏损伤动物模型。cTnI 可作为评价心脏损伤动物模型的无创性指标。

关键词 放射性心脏损伤; 动物模型; 评价方法; 肌钙蛋白

中图分类号 Q 95-3; R 818.74

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0922-04

1970 年, Fajardo et al^[1] 首次证实射线能引起心脏损伤, 自此放射性心脏疾病 (radiation-induced heart disease, RIHD) 这一名词得以确定, 该疾病越来越引起相关研究者的重视。胸部放射治疗过程中不可避免地使一定体积的心脏组织受到照射, 从而发生 RIHD, 多见的是迟发性心脏损伤^[2-3]。临床资料显示, 轻度 RIHD 表现为血清酶升高、心功能降低、心率失常及心电图异常, 重度为急慢性心包炎、心肌炎, 最终导致心肌硬化和冠心病^[4-5]。心脏已被公认为是胸部放疗的剂量限制器官之一^[6]。该研究旨在建立 C57BL/6 小鼠放射性心脏损伤模型, 并初步探索可靠的评价标准, 为 RIHD 的临床研究提供可靠的基础研究依据。

2015-03-20 接收

基金项目: 国家青年自然科学基金项目 (编号: 81302382)

作者单位: 苏州大学¹ 附属第一医院肿瘤放疗科、² 放射医学与公共卫生学院, 苏州 215006

作者简介: 符天晓, 男, 主管技师;

焦 旻, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

jiaoyang@suda.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 C57BL/6 小鼠, SPF 级, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自苏州大学实验动物中心。在恒温 (22±2) °C、湿度 (50±10)%、正常光照中适应性饲养 1 周后实验。

1.1.2 仪器及试剂 模拟定位机 (荷兰核通公司); 自制 C57 固定木板; 1% 戊巴比妥钠 (美国 Sigma); PRIMUS M 型直线加速器 (德国西门子公司); 强生 vitros5600 型全自动生化分析仪 (美国强生公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组^[7-8] 将实验动物随即分为 3 组: 对照组 4 只 (不做任何处理), 18 Gy 放疗组 12 只, 25 Gy 放疗组 12 只。

1.2.2 建立动物模型 首先用 1% 戊巴比妥钠 1 ml 进行腹腔麻醉, 待动物麻醉成功后, 利用自制木板固定小鼠, 在模拟定位机下确定小鼠心脏轮廓。照射方法: 机架角 = 0°, 6 MV 能量的 X 射线采用源皮距 (source skin distance, SSD) = 100 cm 方法垂直照射。照射剂量: 根据小鼠心脏大小及深度分别计算各剂量组所需出束剂量, 具体公式为: $Mu = Dd \times 100 / PDD(r, d, SSD) \times Sc(rc) \times Sp(r) \times Kc$ 。其中肿瘤量 (Dd) 分别为 18、25 Gy; 查表可得百分深度量 (PDD)、准直器散射因子 (Sc)、体模散射因子 (Sp); 托架因子 (Kc = 0.946)。照射结束待动物麻醉清醒后送回动物房, 试验过程中无动物死亡。

1.2.3 动物模型的评价 观察小鼠活动、饮食、体重变化。小鼠于放疗后每周称重 1 次; 分别于第 8 周、第 16 周处死小鼠, 收集下腔静脉抗凝全血测定心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)。开胸取心脏 (注意保留心房), 用 10% 福尔马林固定心脏, 常规石蜡包埋切片后 HE 染色, 光镜下观察心肌组织结构, 予病理评分。具体评分标准 0 级: 正常心肌结构, 心肌细胞无萎缩与肥大, 无空泡, 横纹清晰,

心肌排列整齐,心内、外膜均无异常,血管和间质无变化;1级:散在的单个心肌细胞表现为局部肌浆溶解和空泡,而邻近的心肌细胞仍正常;2级:小至中等范围的成簇心肌细胞表现有萎缩、肌浆溶解和空泡,可见小灶性心肌细胞坏死;3级:大范围弥漫性心肌细胞萎缩、肌浆溶解或空泡,有较明显的坏死。根据情况,可在1~2级、2~3级之间评分,如1.5、2.5等^[9]。

1.3 统计学处理 采用SPSS 11.5软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

2 结果

2.1 体重及生长情况观察 与对照组比较,18 Gy放疗组和25 Gy放疗组小鼠的体重开始呈下降趋势,1周后缓慢上升(图1),小鼠在后期出现厌食、形体消瘦、心脏体表投影区域脱毛、活动缓慢等现象;而对照组小鼠体重呈增长趋势,饮食、活动一切正常,皮毛柔顺亮泽,小鼠未见死亡。

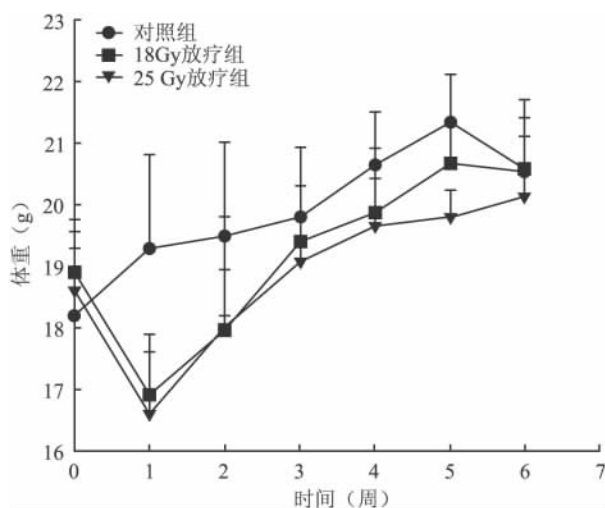


图1 放射性心脏损伤小鼠体重趋势图($\bar{x} \pm s$)

2.2 组织病理变化 HE染色可见对照组小鼠心肌组织无渗出和充血水肿,肌纤维排列正常,结构清晰(图2A)。而18 Gy放疗组的心肌组织病变初期(照射后8周)以炎性渗出为主,主要表现为心肌间充血水肿(图2B);25 Gy组伴有炎性细胞的浸润,切片中尚见到一些无核的细胞,似脂肪细胞(图2C);照射16周后,18 Gy放疗组小鼠的心肌组织以进行性纤维化为特征,表现为心肌间隙增宽,肌纤维排列紊乱,横纹不清晰,纤维蛋白渗出(图2D);25

Gy组出现局灶性心肌变性以及肌浆凝聚(图2E)。

对照组心肌病理评分为0分,第8周18 Gy与25 Gy放疗组病理评分均上升。18 Gy放疗组与对照组比较差异无统计学意义,而25 Gy放疗组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。第16周,18 Gy、25 Gy放疗组与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

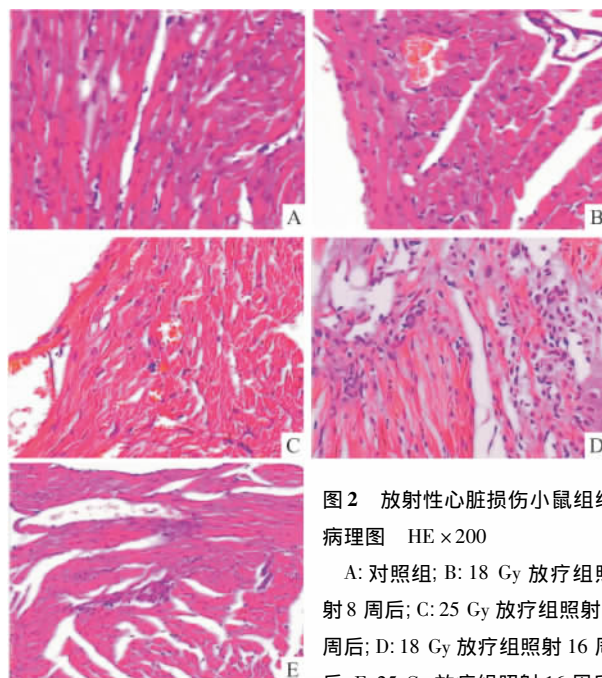


图2 放射性心脏损伤小鼠组织病理图 HE × 200

A: 对照组; B: 18 Gy放疗组照射8周后; C: 25 Gy放疗组照射8周后; D: 18 Gy放疗组照射16周后; E: 25 Gy放疗组照射16周后

表1 放射性心脏损伤小鼠病理评分表($\bar{x} \pm s$)

时间	对照组 (n=4)	18 Gy 放疗组 (n=12)	25 Gy 放疗组 (n=12)
第8周	0.00 ± 0.00	0.42 ± 0.66	1.00 ± 0.55**
第16周	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.41**	2.08 ± 0.38**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 cTnI 检测结果 在第8周和第16周,与对照组比较,放疗组小鼠血清中cTnI含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);在第8周,与18 Gy放疗组比较,25 Gy放疗组小鼠血清中cTnI含量升高,差异无统计学意义(表2)。在第16周,25 Gy放疗组小鼠血清中cTnI含量最高,与18 Gy放疗组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。研究显示,小鼠血清

表2 放射性心脏损伤小鼠血清中cTnI含量($\bar{x} \pm s$)

时间	对照组 (n=4)	18 Gy 放疗组 (n=12)	25 Gy 放疗组 (n=12)
第8周	0.10 ± 0.03	0.15 ± 0.05*	0.19 ± 0.03*
第16周	0.11 ± 0.03	0.25 ± 0.04*	0.32 ± 0.03*#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与18 Gy放疗组比较: # $P < 0.05$

中 cTnI 含量与放射剂量、时间均呈明显的相关性,提示 cTnI 作为血清标志物可用于评价放射性心脏损伤模型的程度。

3 讨论

近年来,动物模型的建立和应用在研究 RIHD 的发病机制、病理生理学改变中起到重要的作用。目前,动物模型建立的方法有很多,但是放射靶区确定、剂量选择以及评判标准尚不明确。本试验在模拟定位机下观察每只小鼠的心影、运动范围,严格控制放疗靶区为 2.0 cm × 1.5 cm,并根据射野定位片设计不规则挡铅区域,物理师严格校准加速器,精确计算剂量,使心脏得到精确照射。本研究中除心脏损伤外,周围组织均正常,未发生炎症和纤维化等病理改变,符合放射性心脏损伤动物模型建立标准。

射线对心脏损伤的主要靶细胞是心肌间丰富的毛细血管内皮细胞,导致炎症、凝血与血栓、冠状动脉粥样硬化。这些反应影响了冠状动脉的血流以及微循环对心肌的供血,从而引起放射性心脏损伤。白蕴红等^[10]人以钴 60 伽玛射线 30 Gy 照射 SD 大鼠心脏,发现大鼠心脏呈三型改变:① 变性渗出型:心肌充血、出血,心肌间有纤维蛋白渗出及炎性细胞浸润,部分心肌细胞变性,局灶性肌浆凝聚,此型病变多见于照射后 0.5 和 1 个月,之后呈减轻、发生减少趋势;② 坏死型:多位于心内膜下,心肌有点片状坏死病灶,另外,尚见一些心肌细胞呈空泡状,似脂肪细胞,此型变化最早见于单次照射 30 Gy 后 2 个月;③ 纤维化型:最早见于单次照射 30 Gy 后 3 个月,始见小的成纤维细胞团,于照射后 6 个月,见心肌间局部纤维细胞增多和胶原纤维增生。本实验中病理学变化和以上研究结果相似。

心脏属于晚反应器官,传统的心电图改变往往出现较晚,发生时间为 3 ~ 5 年^[11]。心肌细胞内有大量的心肌酶,由于心肌细胞的缺血、坏死会导致细胞膜通透性增加,使得各种酶释放入血液,血清心肌酶升高。RIHD 单次破坏心肌细胞数量较少,传统心肌酶如肌酸激酶(creatine kinase,CK)、CK 同工酶(CK-MB)敏感度不高;CK 及 CK-MB 存在于心肌细胞胞质外,还存在于骨骼肌细胞胞质中,特异性不高。肌钙蛋白仅存在于心肌细胞,是心肌损伤的特异性血清标志物。当心肌细胞受到损伤,肌钙蛋白的血清浓度(3 ~ 6 h)可升高 10 ~ 100 倍,而 CK、CK-

MB(3 ~ 8 h)仅升高 2 ~ 20 倍,肌钙蛋白对诊断心肌损伤敏感性高。同时,肌钙蛋白升高持续时间长达 2 ~ 3 周,而 CK、CK-MB 仅持续几天,肌钙蛋白诊断时间窗宽^[12]。本实验选择 cTnI 作为血清标志物用于评价模型心脏损伤,具有特异性敏感性高、诊断时间窗宽等特点。实验中取下腔静脉血 cTnI 检测,不同实验组 cTnI 检测结果和放疗剂量大小呈相关性;随时间变化,检验结果和心脏的晚反应病理变化特点相吻合。

综上所述,以 C57BL/6 小鼠心脏作为靶区精确放疗,单次剂量 25 Gy,放疗后 16 周可成功建立放射性心脏损伤小鼠模型,可用于放射性心脏损伤疾病研究。病理切片及评分可作为评价建模成功与否的标准,cTnI 可作为无创性方法用来评价动物模型。

参考文献

- [1] Fajardo L F, Stewart J R. Experimental radiation-induced heart disease. 1. Light microscopic studies[J]. *Am J Pathol*, 1970, 59(2): 229 - 316.
- [2] Gustavsson A, Osterman B, Cavallin-Ståhl E. A systematic overview of radiation therapy effects in Hodgkin's lymphoma[J]. *Acta Oncol* 2003, 42(5 - 6): 605 - 19.
- [3] Giraud P, Cosset J M. Radiation toxicity to the heart: physiopathology and clinical data[J]. *Bull Cancer*, 2004, 91 Suppl 3: 147 - 53.
- [4] 李兴凤. 放射性心脏损伤 10 例临床分析[J]. *山东医药*, 2007, 47(26): 108 - 10.
- [5] 郭兆娇, 杨林. 放射治疗导致心脏损害及其检测与防护[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1353 - 4.
- [6] Stewart J R, Fajardo L F. Radiation-induced heart disease: an update[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1984, 27(3): 173 - 94.
- [7] 徐久宏, 高耀明, 张军宁, 等. 大鼠心脏放射损伤对内皮素-1 和心肌肌钙蛋白 I 表达水平的影响[J]. *苏州大学学报*, 2011, 31(3): 354 - 6.
- [8] 吕鹏, 臧爱民. 血清肌钙蛋白 I 在放射性心脏损伤中的变化及右丙亚胺对其影响[J]. *长治医学院学报*, 2013, 27(2): 94 - 6.
- [9] 周明东. 神经调节蛋白用于心血管疾病治疗的方法和组合物[P]. 中国专利 CN 101007027 A: 2007 - 08 - 01.
- [10] 白蕴红, 王德文. 大鼠放射性心脏的病理学观察[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 1994, 14(5): 329 - 30.
- [11] Allavena C, Conroy T, Aletti P. Late cardiopulmonary toxicity after treatment for Hodgkin's disease[J]. *Br J Cancer*, 1992, 65(6): 908 - 12.
- [12] 郭玮, 潘柏申. 心肌肌钙蛋白 - 心肌损伤的确定生化标志物[J]. *上海医学检验杂志*, 2000, 15(1): 81 - 3.

益赛普对脓毒症大鼠心肌损伤与炎症因子表达的影响

李登辉 胡德林 李亚南 台运成 方林森 余又新

摘要 目的 研究早期应用益赛普对脓毒症大鼠心肌损伤及炎症因子表达的影响,并就其对心肌损伤机制的影响进行初步探讨。方法 108只雌性清洁级SD大鼠随机分为假手术组、脓毒症组与治疗组,假手术组行盲肠探查术,脓毒症组和治疗组两组行盲肠结扎穿孔术制作脓毒症模型,治疗组加用益赛普以干预,均在3、9、24、36、48、72h时相点留取标本,每时相点6只大鼠。ELISA法检测大鼠血清心肌肌钙蛋白(cTnI)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)浓度,Western blot法检测心肌核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)的表达,数据结果采用析因设计方差分析。结果 ①脓毒症组与治疗组血清cTnI、TNF- α 、IL-1、NF- κ B p65水平均高于假手术组($P < 0.05$),两组浓度均于3h达峰值,而后逐渐下降。治疗组每个时相点均低于脓毒症组;②血清TNF- α 、

IL-1浓度均与血清cTnI表达呈显著正相关性。结论 脓毒症大鼠心肌早期发生损伤,应用益赛普能够降低血清TNF- α 、IL-1的释放及心肌组织NF- κ B p65的表达,减少机体炎症反应,起到保护心脏的作用。

关键词 益赛普;脓毒症;心肌损伤;肌钙蛋白I;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1;核转录因子- κ B p65

中图分类号 R 631; R 392

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0925-04

心肌损伤是脓毒症常见的并发症,发生率约50%^[1]。其作用机制尚未明确,研究^[2]表明大量炎症介质的释放是造成心肌等损伤的主要原因之一。益赛普目前临床上主要应用于中度及重度活动性类风湿关节炎、成人中度至重度斑块状银屑病、活动性强直性脊柱炎等的治疗。但其在脓毒症大鼠心肌损伤的保护作用方面研究甚少,该研究通过对盲肠穿孔所致脓毒症大鼠模型使用益赛普,观察脓毒症大鼠早期血清心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、白

2015-04-24 接收

基金项目:安徽省卫生厅科研基金(编号:09A067)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院烧伤科,合肥 230032

作者简介:李登辉,男,硕士研究生;

胡德林,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: hdl0522@163.com

Establishment of irradiation induced heart injury in C57 mice model and identification of serum marker

Fu Tianxiao¹, Zhou Juying¹, Jiao Yang²

(¹Dept of Oncological Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Soochow University,

²School of Radiation Medicine and Public Health of Soochow University, Suzhou 215006)

Abstract Objective To establish and investigate C57BL/6 mice model of radiation induced heart injury and serum marker. **Methods** Twenty eight female C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: normal group ($n = 4$), 18 Gy radiation therapy group ($n = 12$), 25 Gy radiation therapy group ($n = 12$). The mice were weighed every week. Respectively, 0, 8 and 16 weeks after irradiation, the pathological changes of myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and made pathological score. Inferior vena cava blood was collected to take cardiac troponin I (cTnI) test. **Results** Compared with the normal group, the weight of radiation group went down first then went up slowly. The myocardial tissue from mice had obvious histopathological changes. Acute inflammation was the main change in the early days. At the late stage, progressive fibrosis was the main characteristic. With the increase of the dose, the inflammatory reaction and fibrosis degree had aggravated, pathological changes had occurred earlier. cTnI showed a trend of higher performance over time, and had a correlation with pathology. **Conclusion** We successfully established radiation induced myocardial injury model. As a noninvasive serum marker, cTnI can be used as the evaluation standard of radiation induced myocardial injury animal model.

Key words radiation induced heart injury; animal model; evaluation method; cardiac troponin I