



(扫描二维码查看原文)

· 论著 ·

川崎病小鼠模型心功能演变过程研究

姜萍¹, 焦富勇², 张雪梅¹, 张丹¹, 赵颖¹, 赵欣¹, 王俊香¹, 金晶¹, 曹玲¹

【摘要】 背景 探究川崎病(KD)的发病机制对临床有效诊治KD具有重要意义。目的 探究KD小鼠模型的心功能演变过程。方法 本实验时间为2020年1月。随机选择50只BALB/c小鼠并分为模型组30只和对照组20只。首先制备干酪乳杆菌细胞壁成分(LCWE)的终液,然后采用LCWE诱导KD小鼠模型。采用小动物高频超声检测对照组及模型组小鼠建模后2 d、15 d、30 d心功能指标,采用M超记录左心室壁运动情况,同步记录左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD)、左心室射血分数(LVEF)及左心室短轴缩短率(LVFS);对照组及建模后2 d、15 d、30 d模型组分别处死1只小鼠并取出心脏标本进行病理检查。结果 M超检查结果显示,建模后2 d,模型组6只(占20.0%)小鼠出现左心室壁运动幅度略减低;建模后15 d,模型组13只(占44.8%)小鼠出现左心室壁运动幅度明显减低;建模后30 d,模型组8只(占28.6%)小鼠仍处于左心室壁运动幅度减低状态。建模后2 d模型组小鼠LVESD和LVFS低于对照组($P < 0.05$);建模后15 d模型组小鼠LVEDD、LVESD、LVEF及LVFS低于对照组($P < 0.05$);建模后30 d模型组小鼠LVEDD、LVEF及LVFS低于对照组($P < 0.05$)。病理检查结果显示,建模后2 d,小鼠心脏组织结构正常,内膜及肌壁间局部可见中性粒细胞浸润;建模后15 d,小鼠心外膜高度肿胀,可见大量中性粒细胞、少量单核细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润;建模后30 d,小鼠左冠状动脉管壁增厚,弹性纤维不连续,心外膜血管扩张,间质水肿,可见淋巴细胞浸润及纤维结缔组织弥漫轻度增生。结论 利用LCWE诱导KD小鼠模型,能够动态观察KD小鼠心功能演变过程,模拟KD对心脏功能的影响。

【关键词】 川崎病;小鼠;超声心动图;心功能

【中图分类号】 R 543 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.129

姜萍, 焦富勇, 张雪梅, 等. 川崎病小鼠模型心功能演变过程研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(6): 73-76. [www.syxnf.net]

LOU P, JIAO F Y, ZHANG X M, et al. Cardiac functional evolution in mice model of Kawasaki disease [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29(6): 73-76.

Cardiac Functional Evolution in Mice Model of Kawasaki Disease LOU Ping¹, JIAO Fuyong², ZHANG Xuemei¹, ZHANG Dan¹, ZHAO Ying¹, ZHAO Xin¹, WANG Junxiang¹, JIN Jing¹, CAO Ling¹

1. Ultrasonic Diagnostic Center, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

2. Children's Hospital, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China

Corresponding author: ZHANG Xuemei, E-mail: 280189013@qq.com

【Abstract】 **Background** Exploring the pathogenesis of Kawasaki disease (KD) is of great significance for the effective diagnosis and treatment of KD. **Objective** To investigate the cardiac functional evolution in mice model of KD. **Methods** The experiment time was January 2020. Fifty BALB/c mice were randomly selected and divided into model group ($n=30$) and control group ($n=20$). First, the final liquid of lactobacillus casei cell wall component (LCWE) was prepared, and then the mouse model of KD was induced by LCWE. High frequency ultrasound was used to detect the indexes of cardiac function in control group and model group at 2, 15 and 30 days after modeling. M-ultrasound was used to record the left ventricular wall motion; the indexes of cardiac function including left ventricular end diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end systolic diameter (LVESD), left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS); one mouse in the control group and the model group was killed at 2, 15 and 30 days after modeling, and the heart samples were taken out for pathological examination. **Results** The results of M-ultrasound showed that the left ventricular wall motion of 6 mice (20.0%) in the model group was slightly decreased 2 days after modeling; the left ventricular

基金项目: 陕西省国际科技合作计划项目(2021KW-66)

1.710068 陕西省西安市, 陕西省人民医院超声诊断中心 2.710068 陕西省西安市, 陕西省人民医院儿童病院

通信作者: 张雪梅, E-mail: 280189013@qq.com

wall motion of 13 mice (44.8%) in the model group was significantly decreased 15 days after modeling; and the left ventricular wall motion of 8 mice (28.6%) in the model group were still decreased 30 days after modeling. The LVESD and LVFS in the model group were lower than those of the control group 2 days after modeling ($P > 0.05$); the LVEDD, LVESD, LVEF and LVFS in the model group were lower than those of the control group and 15 days after modeling ($P < 0.05$); the LVEDD, LVEF and LVFS in the model group were lower than those in the control group 30 days after modeling ($P < 0.05$). Pathological examination showed that, 2 days after modeling, the structure of heart tissue was normal, and neutrophil infiltration could be seen in the inner membrane and muscle wall; 15 days after modeling, the epicardium of the mice was highly swollen, with a large number of neutrophils, a small number of monocytes, lymphocytes and other inflammatory cells infiltration; 30 days after modeling, the left coronary artery wall of the mice was thickened, elastic fiber was discontinuous, epicardial vessels were dilated, interstitial edema, lymphocyte infiltration and diffuse mild hyperplasia of fibrous connective tissue were observed.

Conclusion The LCWE-induced mouse model of KD can observe the cardiac function evolution of KD and simulate the effect of KD on cardiac function.

【Key words】 Kawasaki disease; Mice; Echocardiography; Cardiac function

川崎病 (Kawasaki disease, KD) 又称为小儿皮肤黏膜淋巴结综合征, 是一种以全身中小动脉炎症病变为主要特征的急性免疫系统疾病^[1], 其病因不明。相关研究表明, KD 可能与感染、遗传和超抗原因素有关^[2-3]。KD 好发于 5 岁以下儿童, 其可导致患儿发生严重心血管病变, 以冠状动脉损伤最为严重, 包括冠状动脉扩张和冠状动脉瘤形成, 最终导致患儿心肌缺血、心肌梗死等, 目前其已取代风湿热而成为我国小儿后天性心脏病的主要病因之一^[4]。本研究通过干酪乳杆菌细胞壁成分 (lactobacillus casei cell wall extract, LCWE) 诱导小鼠 KD 模型, 并观察其心功能的演变过程, 旨在探讨 KD 对心功能的影响。

1 材料和方法

1.1 LCWE 制备 本实验时间为 2020 年 1 月。将干酪乳杆菌 (贝纳细胞生物保存管理中心, 第 134415 号) 培养于乳酸菌肉汤培养基中 24 h, 在对数生长期收集细菌, 添加 4% SDS 裂解, 4 000 r/min 离心 30 min (离心半径 8 cm), 使用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 反复冲洗, 加入 250 μ g/ml RNase、DNase 和胰蛋白酶, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 4 h, 使用 PBS 再次清洗后收集细菌碎片, 并取 1 g 湿重加入 5 ml PBS, 冰浴, 使用超声细胞破碎仪处理 2 h (超声 5 s、间隙 5 s, 功率 300 W), 将处理后的溶液离心 1 h (4 $^{\circ}$ C, 15 600 r/min、离心半径 8 cm), 配置成 LCWE 的终液。

1.2 动物制备 随机选择 50 只 BALB/c 小鼠 [北京维顿利华实验动物技术有限公司, 生产许可证 SCXK (北京) 2016-0006, 销售许可证 SYXK (陕西) 2012-005], 体质量 (17.0 \pm 0.5) g, 无特定病原体, 将其分成模型组 30 只和对照组 20 只, 并分别编写序号。模型组小鼠经腹腔注射 LCWE 的终液, 单次注射 0.5 ml; 对照组小鼠不做任何处理。

1.3 方法 检测对照组及模型组小鼠建模后 2 d、15 d、30 d 心功能指标, 具体如下: 将小鼠胸口毛脱掉, 放

入密封盒中, 吸入异氟烷将其麻醉, 仰卧位固定在检查台上, 同步记录小鼠心率。将超声探头固定在检查支架上, 当小鼠心率稳定在 400~500 次/min 时, 胸口涂抹超声耦合剂, 进行超声检查, 通过调节检查支架的角度及探头方向而探查小鼠左心室长轴切面, 采用 M 超记录左心室壁运动情况, 同时记录左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD) 和左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD), 并计算左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 及左心室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS), 连续采集 5 个心动周期, 并储存于后台, 所用仪器为加拿大 VISUALSONIC 公司 Vevo3100 型高分辨率小动物超声心动图仪, 选用 Mx400 单晶片机械扇扫宽频探头, 固定聚焦深度为 1.2 cm。

1.4 病理检查 对照组及造模后 2 d、15 d、30 d 模型组分别处死 1 只小鼠并取出心脏标本, 立即置于体积分数为 10% 的甲醛溶液固定。常规脱水、透明、石蜡包埋、连续切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色及弹力纤维染色 (EVG), 使用光学电子显微镜 (德国蔡司 Zeiss Axio lab.A1) 进行观察。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理。计量资料先行正态性检验及方差齐性检验, 符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左心室壁运动情况 M 超检查结果显示, 对照组小鼠左心室壁运动幅度正常。造模后 2 d, 模型组 6 只 (占 20.0%) 小鼠出现左心室壁运动幅度略减低, 其中左心室前壁减低 2 只、左心室后壁减低 4 只; 造模后 15 d, 模型组 13 只 (占 44.8%) 小鼠出现左心室壁运动幅度明显减低, 其中左心室壁普遍减低 5 只、左心室前壁减低 3 只、左心室后壁减低 5 只; 造模后 30 d, 模型组 8

只(占28.6%)小鼠仍处于左心室壁运动幅度减低状态,其中左心室壁普遍减低4只、左心室前壁减低2只、左心室后壁减低2只,见图1。

2.2 左心功能指标 造模后2 d模型组小鼠LVESD和LVFS低于对照组,差异有统计学意义(t 值分别为2.149、2.097, P 值均 < 0.05);造模后15 d模型组小鼠LVEDD、LVESD、LVEF及LVFS低于对照组,差异有统计学意义(t 值分别为4.167、2.434、2.930、3.716, P 值均 < 0.05);造模后30 d模型组小鼠LVEDD、LVEF及LVFS低于对照组,差异有统计学意义(t 值分别为3.604、2.986、3.184, P 值均 < 0.05),见表1。

表1 对照组与模型组小鼠LVEDD、LVESD、LVEF及LVFS($\bar{x} \pm s$)
Table 1 LVEDD, LVESD, LVEF and LVFS of the control group and the model group

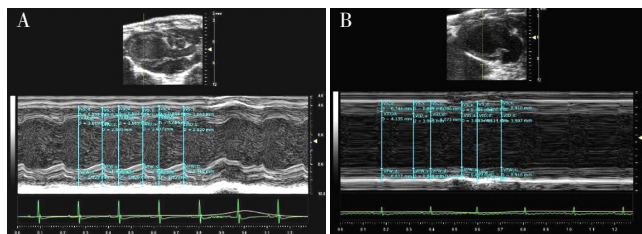
组别	只数	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LVEF (%)	LVFS (%)
对照组	20	4.32 ± 0.67	3.10 ± 0.37	54.11 ± 9.18	26.27 ± 4.78
造模后2 d模型组	30	4.07 ± 0.91	2.79 ± 0.48 ^a	49.44 ± 10.39	22.44 ± 6.09 ^a
造模后15 d模型组	29	3.53 ± 0.44 ^a	2.73 ± 0.52 ^a	42.27 ± 14.46 ^a	18.83 ± 7.02 ^a
造模后30 d模型组	28	3.72 ± 0.22 ^a	2.96 ± 0.31	43.05 ± 12.74 ^a	20.55 ± 5.93 ^a

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$; LVEDD=左心室舒张末期内径, LVESD=左心室收缩末期内径, LVEF=左心室射血分数, LVFS=左心室短轴缩短率

2.3 病理检查结果 病理检查结果显示,造模后2 d,小鼠心脏组织结构正常,内膜及肌壁间局部可见中性粒细胞浸润,见图2A;造模后15 d,小鼠心外膜高度肿胀,可见大量中性粒细胞、少量单核细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,其内(左)冠状动脉管腔扩张及少量心肌细胞坏死崩解,见图2B;造模后30 d,小鼠左冠状动脉管壁增厚,弹力纤维不连续,心外膜血管扩张,间质水肿,可见淋巴细胞浸润及纤维结缔组织弥漫轻度增生,见图2C。

3 讨论

KD主要是T淋巴细胞亚群失衡后机体免疫系统异常活跃、内皮细胞受损,从而引发的血管炎症,其常累



注:A为对照组小鼠,M超检查显示左心室壁运动幅度正常;B为造模后15 d模型组小鼠,M超检查显示左心室壁运动幅度减低

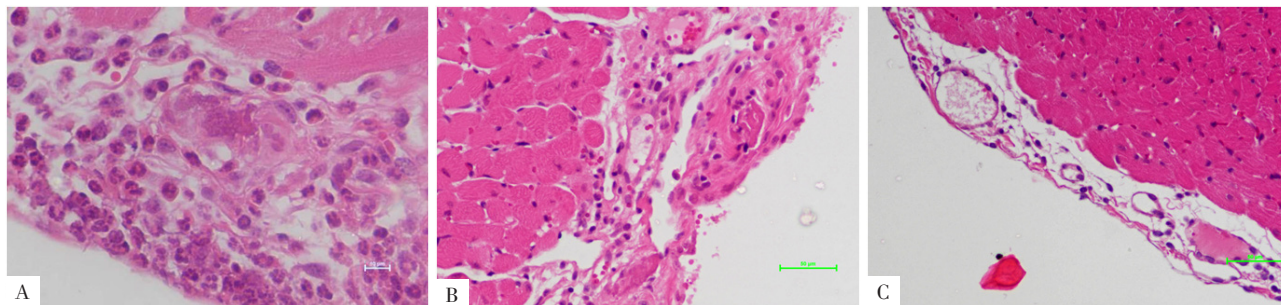
图1 M超检查结果

Figure 1 Test results of M-ultrasound

及人体的多个脏器。既往研究表明,72%~91%的KD会引起心脏病变^[5]。KD最常累及冠状动脉,可引发冠状动脉扩张、冠状动脉瘤形成,严重者形成血栓,进而导致冠状动脉狭窄甚至闭塞^[6]。1979年,LEHMAN利用LCME在小鼠身上成功诱导出动脉炎症,主要使中动脉、冠状动脉及大动脉根部受累,能很好地模拟冠状动脉损伤过程,是较成熟的动物实验模型^[7]。

高频超声心动图可以直观、清晰地显示小鼠心脏结构,可动态观察心脏改变,且具有无创性^[8]。M超可以记录小鼠心脏的运动幅度,测量左心室大小,并客观评价心功能变化^[9],是一种较理想的检查方式。但小鼠心功能指标的参考范围目前并未明确,故本实验将正常小鼠作为对照。

研究表明,通过观察心室壁节段性运动可较早评估冠状动脉缺血情况^[10]。本研究结果显示,造模后2 d,模型组6只(占20.0%)小鼠出现左心室壁运动幅度略减低,对照组与造模后2 d模型组小鼠LVEDD和LVEF比较差异无统计学意义,提示KD急性期心脏受损程度可能还没有影响心功能,这与KD患儿急性期临床表现基本一致(疾病第1周内,患儿超声心动图通常是正常的^[11]),也说明该阶段KD尚未侵犯到心脏。本研究结果显示,造模后15 d,模型组13只(占44.8%)小鼠出现左心室壁运动幅度明显减低,LVEDD、LVESD、LVEF和LVFS低于对照组,病理检查结果显示小鼠心



注:A为造模后2 d,B为造模后15 d,C为造模后30 d

图2 模型组小鼠病理检查结果

Figure 2 Pathological examination results of the model group

外膜高度肿胀,可见大量中性粒细胞、少量单核细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,该阶段模型组小鼠心脏已符合KD心肌炎表现。KD患儿心肌炎表现主要是左心室收缩功能不全和心动过速,其中导致左心室收缩功能不全的主要原因是弥漫性心肌炎性损伤引起的心肌纤维化^[12],最终可使患儿发生充血性心力衰竭。既往研究表明,KD患儿心肌炎发生早、急性左心功能不全出现短暂^[13]。本研究结果显示,造模后30 d,模型组8只(占28.6%)小鼠仍处于左心室壁运动幅度减低状态,LVEDD、LVEF及LVFS低于对照组。本研究结果还显示,KD模型小鼠异常的室壁运动节段主要出现在左心室前壁及后壁,而左心室前壁和后壁是左冠状动脉前降支及回旋支的供血区域^[14]。冠状动脉炎管壁的炎性细胞浸润及内皮细胞肿胀,导致冠状动脉狭窄和心肌微灌注异常^[15],使心肌呈现出供血不足的表现。

综上所述,利用LCWE诱导KD小鼠模型,能够动态观察KD小鼠心功能演变过程,模拟KD对心脏功能的影响。但由于小鼠在测量过程中受到外力、环境及麻醉等影响,会使其心脏发生短暂的运动异常,即出现假阳性表现,因此实验过程中可以延长观察、记录时间或让小鼠短暂休息后再次测量,尽量避免假阳性结果及影响实验的准确性。

作者贡献: 姜萍进行文章的构思与设计,并撰写论文;焦富勇进行研究的实施与可行性分析;姜萍、赵颖、赵欣、王俊香、曹玲进行数据收集、整理、分析;张丹、金晶进行结果分析与解释;张雪梅进行论文的修订;焦富勇、张雪梅负责文章的质量控制及审校;姜萍、张雪梅对文章整体负责,监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 孔慧,都鹏飞.儿童川崎病[J].中华全科医学,2016,14(4): 518-519.

[2] DIONNE A, DAHDAH N. Myocarditis and Kawasaki disease [J]. Int J Rheum Dis, 2018, 21(1): 45-49. DOI: 10.1111/1756-185X.13219.

[3] 胡秀芬,温宇.丙种球蛋白无反应型川崎病的发病机制及治疗进展[J].中华实用儿科临床杂志,2017,32(21): 1612-1616.

HU X F, WEN Y. Pathogenesis and treatment of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease [J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2017, 32(21): 1612-1616.

[4] HA S, SEO G H, KIM K Y, et al. Epidemiologic study on Kawasaki disease in Korea, 2007-2014: based on health insurance review & assessment service claims [J]. J Korean Med Sci, 2016, 31(9): 1445-1449. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.9.1445.

[5] MCCRINDLE B W, ROWLEY A H, NEWBURGER J W, et al.

Diagnosis, treatment and long-term management of Kawasaki disease: a scientific statement for health professionals from the American Heart Association [J]. Circulation, 2017, 135(17): e927-999. DOI: 10.1161/cir.0000000000000484.

[6] KIM K Y, KIM D S. Recent advance in Kawasaki disease [J]. Yonsei Med J, 2016, 57(1): 15-21. DOI: 10.3349/ymj.2016.57.1.15.

[7] 张新艳,卢慧玲.川崎病动物模型及其发病机制研究进展[J].生物医学研究,2017,5(1): 1-11.

[8] 张博,潘晓芳,贾晓东,等.运动负荷超声心动图联合运动心电图对严重冠状动脉病变的诊断价值[J].中国超声医学杂志,2019,35(6): 499-502.

ZHANG B, PAN X F, JIA X D, et al. Diagnostic value of exercise stress echocardiography combined with exercise electrocardiography in significant coronary lesion [J]. Chinese Journal of Ultrasound in Medicine, 2019, 35(6): 499-502.

[9] 黄凌霁,邓又斌,刘娅妮.腺苷负荷对正常小鼠心肌应变的影响[J].中华超声影像学杂志,2018,27(1): 77-82. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4477.2018.01.019.

HUANG L Y, DENG Y B, LIU Y N. Effects of adenosine stress on myocardial strain in healthy mice [J]. Chinese Journal of Ultrasonography, 2018, 27(1): 77-82. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1004-4477.2018.01.019.

[10] TREMOULET A H, JAIN S, KIM S, et al. Rationale and study design for a phase I / II a trial of anakinra in children with Kawasaki disease and early coronary artery abnormalities (the ANAKID trial) [J]. Contemp Clin Trials, 2016, 48: 70-75. DOI: 10.1016/j.cct.2016.04.002.

[11] DE GRAEFF N, GROOT N, OZEN S, et al. European consensus-based recommendations for the diagnosis and treatment of Kawasaki disease—the SHARE initiative [J]. Rheumatology: Oxford, 2019, 58(4): 672-682. DOI: 10.1093/rheumatology/key344.

[12] HARADA M, YOKOUCHI Y, OHARASEKI T, et al. Histopathological characteristics of myocarditis in acute-phase Kawasaki disease [J]. Histopathology, 2012, 61(6): 1156-1167. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04332.x.

[13] 王晓燕.超声心动图对小儿川崎病冠状动脉病变的研究价值[J].影像研究与医学应用,2018,2(16): 122-123.

[14] 黄红梅,刘艳午,曹礼庭,等.三维斑点追踪成像评价冠心病患者左心室缺血心肌节段应变[J].中国医学影像技术,2015,31(8): 1202-1206.

[15] KAROGIANNIS N, SENIOR R. Contrast echocardiography for detection of myocardial perfusion abnormalities: a clinical perspective [J]. Herz, 2017, 42(3): 287-294. DOI: 10.1007/s00059-017-4536-7.

(收稿日期:2021-03-15;修回日期:2021-05-12)

(本文编辑:谢武英)