

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.22.011

C57BL/6 小鼠 PD-1 基因敲除后炎症与心房电重构的关系研究

付国强 曹义战 仲月霞 何乾锋 王伯良[△]

(第四军医大学唐都医院急诊科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:研究 C57BL/6 小鼠在 PD-1 基因敲除后体内炎症升高对房颤发病易感性的影响。**方法:**对两组动物进行了观察:C57BL/6 小鼠和 C57BL/6-PD-1 基因敲除小鼠(各组均为 15 只,雄性,6-8 周龄)。应用流式细胞仪微球芯片捕获技术对比了实验组与对照组的血清炎性细胞因子表达水平,应用多导电生理记录仪检测了实验组与对照组心房有效不应期和有效不应期离散度。**结果:**和对照组相比较,C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠血清炎性细胞因子水平明显升高,C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠心房肌有效不应期较对照组减低,而有效不应期离散度则明显升高。**结论:**PD-1 基因敲除后出现的机体内炎性细胞因子水平的升高导致了 C57BL/6 小鼠的心房电重构,并由此使得 C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠心房纤颤发病易感性升高。

关键词:PD-1 基因敲除;炎性细胞因子;心房电重构;心房纤颤

中图分类号:Q95-3;R541.75 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)22-4249-03

PD-1 Deficiency Results in Atrial Electricity Remodeling in C57BL/6 Mice

FU Guo-qiang, CAO Yi-zhan, ZHONG Yue-xia, HE Qian-feng, WANG Bo-liang

(Department of emergency, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of PD-1 deficiency in the pathogenesis of atrial fibrillation. **Methods:** Two groups of mice were used to carry out our experiment: C57BL/6 group (15 mice, male, 6-8 weeks) and C57BL/6-PD-1^{-/-} group (15 mice, male, 6-8 weeks), the expression of inflammatory cytokines: interleukin (IL)-2, (IL)-4, (IL)-6, (IL)-10, (IL)-17, interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor(TNF) were determined by cytometric bead array, the atrial effective refractory period (AERPs) were determined by more conductive physiological recorder. **Results:** Inflammatory cytokines increased significantly in the PD-1^{-/-} group compared with that in the C57BL/6 group; Mean while, the PD-1^{-/-} group presented a shorter atrial effective refractory period and an increased dAERP. **Conclusion:** The higher level of inflammatory cytokines in the PD-1^{-/-} mice results in atrial electricity remodeling in C57BL/6 mice, which lead to atrial fibrillation.

Keywords: PD-1 deficiency; Inflammatory cytokines; Atrial electricity remodeling; Atrial fibrillation

Chinese Library Classification: Q95-3; R541.75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)22-4249-03

前言

房颤是临床最常见的心律失常,在普通人群中的发病率约为 2%,且随着年龄的增长发病率迅速升高,在 80 岁以上人群中房颤的发病率超过了 9%^[1]。房颤危害严重,相比非房颤患者。房颤患者脑卒中、心衰及全因死亡率均明显升高^[2]。由于血栓栓塞、心力衰竭等诸多并发症,房颤被认为是心血管病患者死亡的独立危险因素^[3]。房颤的发病机制比较复杂,目前普遍认为房颤起源于存在于心房的多发折返环,但对于多发折返环的产生机制仍然未得到完全阐明。近年来炎症与房颤发病的关系得到了许多人的关注,流行病学和病例对照研究均提示炎症可能是房颤的致病因素^[4],临床观察证实房颤患者心肌组织重塑与纤维化与炎症反应密切相关^[5]。但炎症导致房颤的具体病理生理机制到目前仍然不明确。

程序性死亡因子-1(programmed death-1,PD-1)是 T 细胞

表面的 CD28 家族的一个重要的负性共刺激分子,该基因的缺失可以增强 T 细胞活性,提高体内的炎症水平。由于机体的高炎症状态,PD-1 基因敲除小鼠会出现多种自身免疫性疾病。其中有学者研究发现 PD-1 基因敲除(PD-1^{-/-})小鼠心脏局部有大量的炎性细胞浸润^[6],甚至出现了致死性的心肌炎^[7]。PD-1^{-/-}小鼠的高炎症状态是否会对房颤的发病产生影响尚不清楚。本研究对比了 C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠和 C57BL/6 小鼠体内炎性细胞因子的表达,同时检测了两组小鼠心房肌有效不应期变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6 PD-1 基因敲除小鼠(即 C57BL/6-PD-1^{-/-}小鼠)由日本京都大学的 Tasuku Honjo 教授免费转让,实验组和对照组小鼠各 15 只,雄性,6-8 周龄。实验前均饲养于第四军医大学基础部神经生物教研室 SPF 级实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 流式细胞仪微球芯片捕获技术 (Cytometric Bead Array, CBA)检测炎性细胞因子表达

应用鼠 Th1/Th2/TH17 细胞因子检测试剂盒 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)同时检测七种细胞因子(IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A.TNF 和 IFN- γ)。该试剂盒可以检测出血清

作者简介:付国强(1976-),男,博士研究生,第四军医大学唐都医院急诊科主治医师、讲师,研究方向:急危重症的基础与临床研究
[△]通讯作者:王伯良(1963-),男,副主任医师、副教授、科主任,研究方向:急危重症的基础与临床研究

(收稿日期:2014-02-24 接受日期:2014-03-23)

中 pg 级别的炎性细胞因子。

流式细胞微球芯片捕获技术原理:首先将不同捕获抗体包被在不同荧光强度的微球上形成捕获微球,然后和待测样品溶液混合,微球上的特异性抗体就与血清中相应的抗原或蛋白结合,再加入荧光标记的检测抗体,形成“三明治”夹心复合物,最后上流式细胞仪进行检测。鼠 Th1/Th2/TH17 细胞因子检测试剂盒可以同时检测七种细胞因子,通过微球上不同的荧光强度来区分细胞因子,在本研究中微球上的荧光强度在氩激光器激活下在 650 nm 达到峰值,在 BD FACScalibur 流式细胞仪(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)通过 FL4 检测。PE 荧光标记的血清样本荧光强度在 FL2 检测。

把 50 μ L 血清和 PE 标记的检测抗体和捕获微球在避光和室温条件下共孵育 2 小时,缓冲液清洗未结合的抗体,重悬于 250 μ L 缓冲液中上机检测。标准品制备后,通过专用的 CBA 分析软件,炎性细胞因子标准曲线被用于量化分析检测样品中每一种细胞因子的浓度,在本研究中定标后标准曲线的相关系数(R²)均大于 0.99。

1.2.2 心房肌有效不应期检测 参考 Etzion 等^[8]的方法用于小鼠心房肌有效不应期检测。各组实验小鼠均通过腹腔内注射戊

巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,麻醉完成后给予气管插管和呼吸机辅助呼吸,在右侧第四肋间隙开胸,将自制电极(与华南医电公司合作)依次放置在右心房的心耳、高侧壁、低侧壁和游离壁。在机械通气过程中,动脉血气酸碱度被调整在 7.35-7.45 之间。心房有效不应期的检测在 100 ms 周期进行,每 6 次 S1 刺激后附加一次额外刺激 S2,最初的额外刺激偶联间期设定在 30 ms (100 ms 周期),偶联间期设定为每 6 次刺激递增 5 ms,直到额外的刺激导致一次心房捕获。然后将额外刺激周期减少 5 ms 后,再每次递增 1 毫秒直到再次发生心房捕获,我们将没有导致心房捕获的最长的 S1S2 间期确定为心房有效不应期。

1.3 统计学处理

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,应用 SPSS 统计软件对资料进行分析,实验数据应用两样本 T 检验比较, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 炎性细胞因子

与对照组相比,血清炎性细胞因子在 C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠组明显升高,有统计学意义,见表 1。

表 1 C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠血清炎性细胞因子浓度 (pg/ML) 比较 (* $P<0.001$ # $P<0.01$)

Table 1 Comparison of inflammatory cytokine levels between the PD-1^{-/-} and the C57BL/6 mice (* $P<0.001$ # $P<0.01$)

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17A	TNF	IFN- γ
PD-1 ^{-/-}	3.95 $\pm$ 1.1*	7.19 $\pm$ 1.1*	165.21 $\pm$ 42.5*	1212.35 $\pm$ 300.4*	42.03 $\pm$ 8.5*	36.49 $\pm$ 8.21*	22.1 $\pm$ 4.72*
C57	2.80 $\pm$ 0.6	3.11 $\pm$ 0.4	35.47 $\pm$ 6.0	208.8 $\pm$ 57.3	8.05 $\pm$ 1.8	24.55 $\pm$ 4.29	5.17 $\pm$ 1.27

2.2 心房有效不应期检测

在各个检测部位,C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠组心房有效不应期均较对照组明显缩短(RAA:42.47 $\pm$ 0.74vs.41.73 $\pm$ 1.03;LRA:

42.87 $\pm$ 0.99vs.41.47 $\pm$ 1.17;HRA:42.80 $\pm$ 0.94vs.41.87 $\pm$ 1.19;ARA:42.60 $\pm$ 1.45vs.41.53 $\pm$ 1.30),而有效不应期离散度则明显升高(2.73 $\pm$ 1.44 vs. 1.53 $\pm$ 0.92 ms),有统计学意义。见图 1

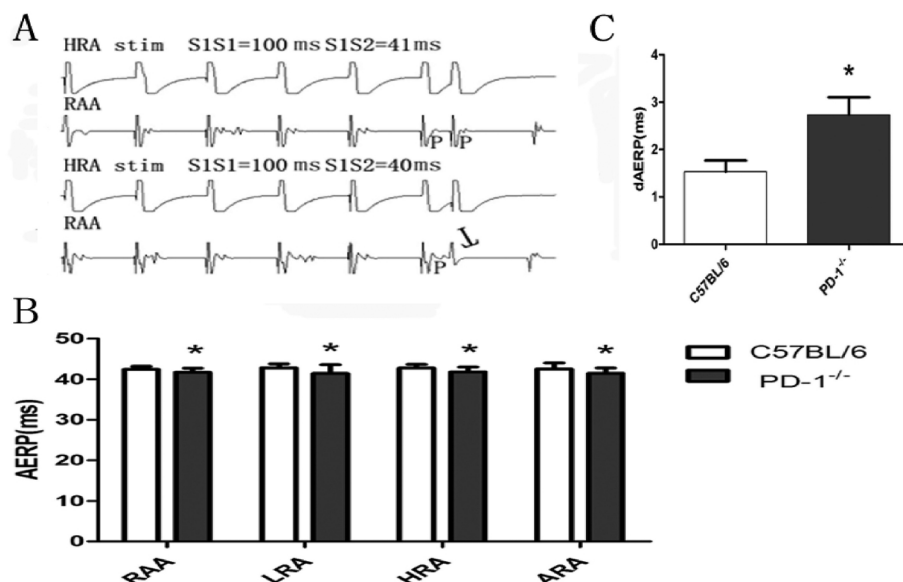


图 1 C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠(B)和 C57BL/6 小鼠电生理检查:A: C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠心房有效不应期检测:S1S2=41 毫秒时出现心房捕获及房室传导,但 S1S2=40 毫秒时,未引起有效的心房捕获,定义 41 毫秒为 RAA 的有效不应期。B: C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠心房有效不应期(AERPs)比较。RAA:右心耳;LRA:右房低侧壁;HRA:右房高侧壁;ARA:右房游离壁。* $P<0.05$ 。C: C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠和 C57BL/6 小鼠心房有效不应期离散度(dAERP)比较,* $P<0.05$

Fig. 1 Electrophysiological examination in C57BL/6 and C57BL/6-PD-1^{-/-} mice: A: Recordings from a PD-1^{-/-} mouse during S1S2 protocol.

Note successful AV conduction at S1S2 of 41 ms and block at S1S2 of 40 ms. B: Comparison of AERP between the C57BL/6 and the PD-1 deficient mice:

RAA, right atrial appendage; LRA, low lateral right atrium; HRA, high lateral right atrium; ARA, anterior right atrium. * $P<0.05$; C: Comparison of dispersion of AERP between the C57BL/6 and the PD-1 deficient mice. * $P<0.05$

3 讨论

PD-1 是属于 CD28 家族的负性共刺激分子,它可以诱导表达于 CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞、自然杀伤细胞、B 细胞以及活化的单核细胞^[9],它的配体主要有 PD-L1 和 PD-L2,PD-1-PD-Ls 途径在外周 T 细胞免疫抑制的诱导和维持方面发挥着重要作用,PD-1 基因敲除后会引起 T 细胞易于激活,从而提高机体炎症水平^[9]。

炎症与房颤发病关系密切,炎性细胞因子能够导致心脏局部组织炎症反应,使得心房肌细胞出现变性、坏死、凋亡,促进心房肌纤维化及瘢痕形成。而心肌纤维化及心肌疤痕形成被认为是心房肌的非均一性和各向异性增加及传导速度减慢的病理学基础^[10],后者的出现有利于心房折返的形成^[11],从而促进房颤的发生和持续^[12-14]。出现这一现象的本质在于炎症参与了心肌电重构,研究发现心脏外科手术术后伴随的炎症状态能够影响心房组织的电结构,而且炎症程度和心房电传导的不均一性、房颤的维持时间呈正相关^[15]。在这一过程中,炎性细胞因子发挥着重要作用,过度表达的 TNF 能够下调连接蛋白 40^[16]、Kv4.2、Kv4.3、Kv1.5 和 KChIP-2 的表达^[17,18],下调连接蛋白 40 能够降低心脏传导,使得房性心律失常的易感性增加。而钾离子通道相关蛋白生成的减少能够减低相应的钾电流活动,从而降低心房有效不应期。

在本研究中,尽管两组实验动物都生活在相同的环境,并给与相同的水和饲料饲养,但是在它们生活环境中的病原体(细菌、病毒等)能够更大程度的激活 C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠体内的炎性过程,使得它们血清中出现了高浓度的细胞因子。以高浓度的炎性细胞因子为代表的机体高炎症状态导致心房有效不应期的缩短和有效不应期离散度的增加。

心房电重构引起的电生理变化,是房颤发生和维持的基质^[19],研究表明心房有效不应期的缩短和有效不应期离散度的增加能够促进心房内多发折返环生成,从而使得房颤易于发生^[20]。由此我们推断由于心房电重构,C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠心房纤颤易感性将明显增加。我们以 C57BL/6-PD-1^{-/-} 小鼠为实验对象,发现在 PD-1 基因敲除后机体高炎症状态是心房的电重构的致病原因,这对进一步阐明炎症和房颤发病之间的关系具有一定的参考意义,同时以此为理论依据,提示抗炎性细胞因子预防和治疗房颤也有可能成为一种可行的临床途径。

参考文献(References)

- [1] Richard LP Newly diagnosed atrial fibrillation [J]. New England Journal of Medicine, 2004,351(23): 2408-2416
- [2] 何森,王斯,陈晓平. 心房颤动发病机制的研究进展[J]. 华西医学, 2012, 27(5): 794-797
He Sen, Wang Si, Cheng Si-ping, The research progress of the pathogenesis in atrial fibrillation[J]. Journal of huaxi medicine, 2012, 27(5): 794-797
- [3] Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, et al. Impact of Atrial Fibrillation on the Risk of Death: The Framingham Heart Study [J]. Circulation, 1998,98(10): 946-952
- [4] 高淑萍,葛利军,栾红. 心房颤动与炎症关系的研究进展[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(2): 182-183
Gao Shu-ping, Ge Li-jun, Luan Hong, The research progress of relationship between atrial fibrillation and inflammation [J]. Journal

- of Ningxia medicine, 2011, 33(2): 182-183
- [5] Verma S, Wang CH, Li SH, et al. A self-fulfilling prophecy C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis [J]. Circulation, 2002, 106(8): 913-919
- [6] Giancchetti, Elena D, Domenico V, et al. Recent insights into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in immunological tolerance and autoimmunity[J]. Autoimmunity Reviews, 2013[ahead of publish]
- [7] Wang J, Okazaki IM, Yoshida T, et al. PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice [J]. Int Immunol, 2010, 22(6): 443-452
- [8] Etzion Y, Mor M, Shalev A, et al. New insights into the atrial electrophysiology of rodents using a novel modality: the miniature-bipolar hook electrode[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295 (4): H1460-469
- [9] Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, et al. Role of the PD-1 pathway in the immune response[J]. Am J Transplant, 2012, 12(10): 2575-2587
- [10] Chen PS, Turker I. Epicardial adipose tissue and neural mechanisms of atrial fibrillation [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012, 5 (4): 618-620
- [11] Lin YK, Chen YC, Chen JH. Adipocytes modulate the electrophysiology of atrial myocytes: implications in obesity-induced atrial fibrillation [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 10(5): 293
- [12] 曾广伟,郑强,刘雄涛,等. 阿托伐他汀对肥胖家兔心房肌及心外膜脂肪中致心房颤动炎症因子的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(7): 1260-1262
Zeng Guang-wei, Zheng Qiang-sun, Liu Xiong-tao, et al. Influence of atorvastatin on inflammatory factors from the atrium and epicardial adipose tissue of obese rabbits [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(7): 1260-1262
- [13] Nagashima K, Okumura Y, Watanabe I, et al. Does location of epicardial adipose tissue correspond to endocardial high dominant frequency or complex fractionated atrial electrogram sites during atrial fibrillation? [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012, 15 (4): 676-683
- [14] Najib MQ, Ganji JL, Raizada A, et al. Epicardial fat can mimic pericardial effusion on transoesophageal echocardiogram [J]. Eur J Echocardiogr, 2011, 12(10): 804
- [15] Ishii Y. Inflammation of Atrium After Cardiac Surgery Is Associated With Inhomogeneity of Atrial Conduction and Atrial Fibrillation [J]. Circulation, 2005, 111(22): 2881-2888
- [16] Sawaya SE, Rajawat YS, Rami TG, et al. Downregulation of connexin40 and increased prevalence of atrial arrhythmias in transgenic mice with cardiac-restricted overexpression of tumor necrosis factor [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(3): 1561-1567
- [17] Kawada H, Niwano S, Niwano H, et al. Tumor necrosis factor- α downregulates the voltage gated outward K⁺ current in cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible cause of electrical remodeling in diseased hearts[J]. Circ J, 2006, 70(5): 605-609
- [18] Petkova-Kirova PS, Gursoy E, Mehdi H, et al. Electrical remodeling of cardiac myocytes from mice with heart failure due to the overexpression of tumor necrosis factor- α [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(5):2098-2107
- [19] Lau CP, Tse HF, Siu CW, et al. Atrial electrical and structural remodeling: implications for racial differences in atrial fibrillation [J]. Cardiovasc Electrophysiol, 2012, 23(Suppl 1): s36-40
- [20] Sharma D, Li G, Xu G, et al. Atrial remodeling in atrial fibrillation and some related microRNAs [J]. Cardiology, 2011,120(2): 111-121