

病毒性心肌炎猝死模型的建立

成建定, 陈玉川, 胡丙杰, 程海鹰, 王曙光

(中山医科大学法医病理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】建立小鼠轻度病毒性心肌炎及其猝死模型。【方法】以Coxsackie B₃病毒感染Balb/c小鼠造成小鼠轻度病毒性心肌炎,以低剂量乌头碱为诱因,诱发心肌炎小鼠产生室性心律失常致死。【结果】感染小鼠出现轻度心肌炎改变。随心率离散度(HRD)的下降,从28~36 min⁻¹, 17~25 min⁻¹至8~13 min⁻¹递减,心肌炎小鼠经乌头碱诱发心律失常致死的比率增高,室性心律失常的出现率依次递增至33%, 64%, 89%。【结论】成功地建立了轻度病毒性心肌炎及其猝死模型。心肌电生理不稳定与一过性危险因素的相互作用可能为轻度病毒性心肌炎猝死的机制之一。

关键词: 心肌炎/病理学; 疾病模型, 动物; 猝死, 心脏

中图分类号: R542.21 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0421-04

Establishment of Sudden Death Model in Mice with Viral Myocarditis

CHENG Jian-ding, CHEN Yu-chuan, HU Beng-jie, CHENG Hai-ying, WANG Shu-guang

(Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To establish the model of sudden death in mice with mild viral myocarditis.【Methods】Mild viral myocarditis model was produced in Balb/c mice by Coxsackie virus B₃. Fatal ventricular arrhythmias in mice with myocarditis were induced by giving mice a small amount of aconitine.【Results】Mild viral myocarditis model was successfully produced in mice. The rate of ventricular arrhythmias caused by aconitine increased (from 33%, 64% to 89%) with the decrease (HRD from 28~36 min⁻¹, 17~25 min⁻¹ to 8~13 min⁻¹) of heart rate dispersion in mice with myocarditis.【Conclusion】Mild viral myocarditis model is successfully established in mice. The interplay of instability of myocardial electrophysiology and transient risk factor may be responsible for sudden death in mice with mild viral myocarditis.

Key words: myocarditis/pathology; disease model, animal; sudden death, cardiac

光镜下心肌细胞变性、坏死不明确,间质炎细胞浸润较少,猝然死亡而诊断为轻度心肌炎猝死的案例近年有增多趋势^[1]。与此同时,人们亦关注到正常人、急性暴力死或其他非心性猝死的尸检中,心肌间质出现不同程度炎细胞浸润的比率高达5%~20%^[2]。因此,光镜下心肌细胞变质不明显,间质炎细胞浸润较少的组织学改变是否符合轻度心肌炎的诊断,轻度/局灶性心肌炎能否导致猝死已引起广泛争议,是法医学检案中亟待解决的难题之一^[1,2]。为探索轻度心肌炎猝死的机制及其法

医病理学诊断方法,我们成功地建立了病毒性心肌炎猝死的动物模型,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 动物与病毒

Balb/c小鼠,4~5周龄,雌雄不拘,体质量15~20g,共132只,由本校动物实验中心提供。嗜心性Coxsackie B₃病毒Nancy株,系美国引进,由上海医科大学中山医院卫生部病毒性心脏病重点

收稿日期: 2000-01-28

基金项目: 广东省自然科学基金(950301);“211工程”重点学科建设课题

作者简介: 成建定(1973-),男,江西都昌人,博士生,陈玉川,教授,导师。

实验室提供。毒种经原代人胚肾细胞传代、繁殖,反复冻融 3 次,超声振荡 3 000 r/min,离心 30 min,取上清病毒液分装,经测 TCID₅₀(组织细胞半数感染率)为 10^{-8.5}, -40 °C 冻存备用。

1.2 病毒接种

82 只鼠随机分为 2 组。实验组 70 只,每只腹腔内接种含 10^{3.5} TCID₅₀ 的病毒稀释液 0.15 mL,对照组 12 只,每只腹腔内注射等量的原代人胚肾细胞裂解、离心上清液。常规饲养小鼠。

1.3 心率离散度(heart rate dispersion, HRD)计算

另 50 只鼠随机分为 3 组,经氯胺酮(40 mg/kg)及戊巴比妥钠(80 mg/kg)腹腔注射联合麻醉后,1~3 组经腹腔分别给予异丙肾上腺素(8 mg/kg, $n=15$)、毛果芸香碱(5 mg/kg, $n=15$)、生理盐水(10 mL/kg, $n=20$)。以四道生理记录仪描记小鼠心电图,观察心率变化,依据简易心率变异性(heart rate variability, HRV)测算原理^{3,4},计算 20 min 小鼠 HRD:每 min 取 3 个稳定的瞬时心率(四道生理记录仪根据心电图每个 RR 间期数值自动转换成瞬时心率并显示出来),记录 20 min,共 60 个心率,计算其标准差即 HRD。

1.4 小鼠心电图记录、HRD 测定及对乌头碱的反应性观察

小鼠感染后 4~15 d 内,按上述方法麻醉,在四道生理记录仪上记录体表肢体导联心电图,计算 HRD 值,之后,按 120 μ g/kg 腹腔注射乌头碱(aconitine),观察小鼠室性心律失常出现率。所有 HRD 值均在下午 1:00 至 5:00 测定。对照组于饲养 10~15 d 后作上述处理。

1.5 病理学观察

观察小鼠心脏大体病变及 HE 染色的组织形态学改变,按 Rezkalla 方法^[5]计算心肌病变积分。

1.6 统计学方法

表 1 中百分率数据采用精确概率法作两两比较,表 1 原始数据 HRD 变量与室性心律失常出现率(P)作 Logistic 回归分析。余用 t 检验。

2 结果

2.1 动物表现

实验组小鼠于感染后第 3 天开始发病,行动迟缓,毛色灰暗,不思饮食,并出现自然死亡。感染后第 3~4 天自然死亡 8 只,第 5~6 天自然死亡鼠较

多,达 14 只,第 7 天后,每天仅 1~2 只鼠自然死亡,第 10 天后小鼠活力接近正常,无自然死亡。对照组小鼠无异常表现,未出现自然死亡。

2.2 小鼠 HRD 的测定

各组鼠测得的心率离散度 r (HRD)/min⁻¹ 为:异丙肾上腺素组:35.5 \pm 4.1;毛果芸香碱组:55.3 \pm 8.9;生理盐水组:45.9 \pm 8.6。将异丙肾上腺素组与生理盐水组,毛果芸香碱组与生理盐水组均数作比较,经 t 检验, $P < 0.05$ 。结果显示,刺激心交感神经/迷走神经,HRD 值下降/升高。

2.3 感染小鼠心电图、HRD 及对乌头碱的反应性

感染鼠心电图的改变率达 70%,主要改变为部分 P 波倒置,异常 Q 波,2:1 至 4:1 房室传导阻滞,偶见室性早搏。对照组未见异常心电图改变。感染鼠 HRD 明显下降,32 只病鼠 HRD 为 23.5 \pm 9.8,对照组 12 只鼠 HRD 为 41.8 \pm 7.3,两组均数比较,经 t 检验, $P < 0.01$ 。对照组 HRD 同生理盐水组 HRD(45.9 \pm 8.6)比较,经 t 检验, $P > 0.05$,表明正常鼠 HRD 值较稳定。感染鼠经腹腔注射乌头碱后,典型变化(15 例)为:经 7~20 min 潜伏期,出现室性早搏,随之转为室性心动过速,最后出现缓慢的自主心律,注药后 30~70 min 以死亡告终(图 1)。非典型改变(4 例)为:7~20 min 潜伏期后,出现心率变慢,房室传导阻滞,短阵室速,自主心律直至死亡。另有部分小鼠(13 例)未出现明显的室性心律失常,注药后观察 60 min 后断颈处死。对照组 12 例仅 2 例出现室性心律失常(预实验以 200 μ g/kg 剂量腹腔注射乌头碱,正常鼠室性心律

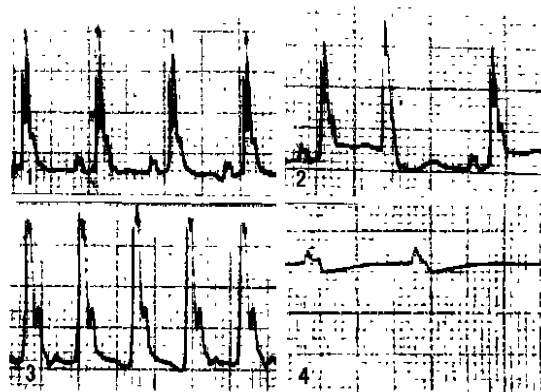


图 1 病毒性心肌炎小鼠经乌头碱诱导后室性心律失常的变化过程

Fig. 1 The process of ventricular arrhythmias induced by aconitine in murine with viral myocarditis

1. Normal ECG; 2. Ventricular premature beats; 3. Ventricular tachycardia; 4. From automatic rhythm to arrest.

失常的诱发率为 100%)。病鼠 HRD 在 8~13, 17~25, 28~36 min^{-1} 等 3 个范围内呈聚齐现象, 故依此范围分为 A, B, C 3 组, 各组室性心律失常出现率(表 1)。

表 1 感染鼠与对照鼠经乌头碱诱导室性心律失常的出现率

Group ¹⁾	r (HRD)/ min^{-1}	n/N	%
A	8~13	8/9	89 ²⁾
B	17~25	7/11	64 ²⁾
C	28~36	4/12	33 ²⁾
Control	41.8±7.3	2/12	17 ²⁾

1) A, B, C represent infectious mice with different HRD; 2) Compared with other group $P < 0.01$. n = cases of ventricular arrhythmia, N = total cases

从上表可知, 随 HRD 下降, 小鼠经诱导室性心律失常的出现率(P_h , 介于 0~1 之间)增高。由于 HRD 分组具不确定性, 进一步将 HRD 变量与 P_h 作 Logistic 回归分析, 得回归模型 $\text{logit}(P_h) = 3.9858 - 0.1430r$ (HRD), 经 χ^2 检验, $\chi^2 = 20.58$, $\nu = 1$, $P = 0.0000$, 结果表明 HRD 与 P_h 呈量效关系, HRD 越小, P_h 越大。

2.4 病理学观察

2.4.1 大体观察 部分感染鼠心外膜下见片状出血, 20% 的感染鼠心外膜出现白色点状、条状、斑片状病变, 心肌切面无明显异常。部分自然死亡的感染鼠肝脏出现片状坏死。对照组无特异性改变。

2.4.2 HE 染色 感染后 1~3 d 心肌未见异常。第 4 天, 心肌细胞出现肿胀、局灶性颗粒变性, 心外膜见少量淋巴细胞浸润; 第 5 天, 可见单个心肌细胞溶解; 第 6 天病变明显, 可见心肌细胞小灶性坏死、崩解, 周围见单核细胞、淋巴细胞浸润(图 2)。病变于感染后 7~9 d 达高峰, 第 13 天后开始减轻。光镜下感染 4~15 d 的实验鼠病变的检出率为 89.5%。依 Rezkalla 方法^[3] 计算心肌病变积分, 本实验组全部心肌病变积分均在 2 分以下, 属轻度心肌炎改变。对照组偶见心外膜下少数淋巴细胞浸润, 余无异常。

3 讨论

3.1 HRD 的测算及其意义

心率变异性(heart rate variability, HRV)是反

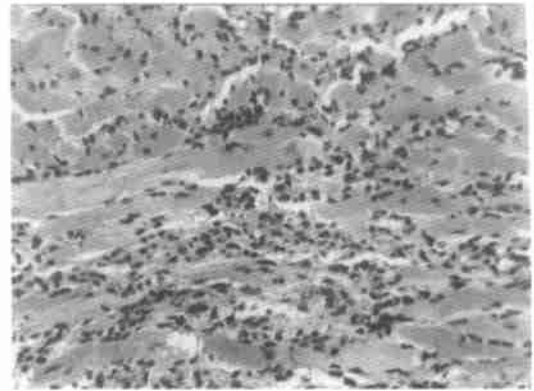


图 2 小鼠病毒性心肌炎心肌病理改变

Fig. 2 The pathological changes of myocardial tissue in murine viral myocarditis (HE×100)

The alteration of cardiomyocytes and the infiltration of inflammatory cells were seen in infected murine

映心脏交感—副交感神经张力及其平衡状态的重要指标, HRV 下降提示迷走神经张力下降和/或交感神经张力增高^[4]。郭应军^[3]介绍过简易 HRV 时域测定法, 即测算心率骤增次数: 计算单位时间内心率突然增加至少 $> 10/\text{min}$ 且持续 3~5 min 的次数。国外新近有人^[4]运用床边 1 min 深呼吸 HRV 测试来预测心性猝死, 其方法为记录深呼吸时 1 min 心电图, 将最小及最大 RR 间期换算成瞬时心率, 两者相减所得值 $< 10/\text{min}$ 为 HRV 下降。

为准确而简便地估测小鼠 HRV, 我们以 HRV 的定义及上述原理为依据, 提出 HRD 的概念及计算方法: 记录小鼠麻醉状态下 20 min 稳定的瞬时心率 60 个, 通过其标准差来反映心率离散度。HRD 能否粗略反映 HRV 呢? 我们在实验中设了两个检验组(分别刺激心交感神经和迷走神经), 结果发现: 刺激心迷走/交感神经, HRD 值升高/下降; 与这两种状态下 HRV 变化的规律相一致。这表明, 我们建立的 HRD 测算法亦为 HRV 时域分析的简易计算法, 能粗略反映小鼠心脏自主神经对心血管系统的调节功能。

3.2 病毒性心肌炎猝死模型的建立

法医学检案中, 常遇到轻度不典型心肌炎猝死案例^[1, 2], 这类心肌炎性改变不典型, 多数未累及心传导系统, 往往难以解释死因。尽管有学者指出, 心肌炎无论炎症是否累及心传导系统均可引起猝死^[1], 但不典型心肌炎猝死的机制仍未阐明。

以冠心病为主的心性猝死的机制, 目前较认同的是心电衰竭学说^[7], 即内、外因素的交互作用。内因指心脏电生理异常, 是恶性心律失常发生的前

决条件,但通常不会致死。外因指一过性危险因素,如pH值改变,电解质紊乱,冠脉痉挛,血小板集聚,药物,神经活动异常等,促使电生理不稳定的心肌发生致命性心律失常。近年来发现,HRV降低是猝死的独立危险因素,比心室晚电位、复杂室早等指标能更准确地预测心性猝死^[8]。HRV降低,反映了心脏自主神经活动失调,交感神经活动占优势,如心肌 β_1 受体被兴奋,通过细胞内腺苷酸环化酶和蛋白激酶的介导,使钙离子分布不均,心肌复极离散度和电不稳定性增加,从而使心肌电生理特性改变,室颤阈值下降,易受一过性危险因素的影响致猝死^[9]。病毒性心肌炎时,心脏自主神经功能亦可受损使HRV降低^[10],心肌电生理特性改变,易发生室性心律失常。

实验发现心肌炎小鼠HRD值下降,粗略反映HRV下降,提示心肌炎小鼠心脏自主神经功能失调,心肌电生理异常。研究还发现,随HRD值下降,心肌炎小鼠经低剂量乌头碱诱发室性心律失常致死的概率 P_h 增高,提示心肌炎小鼠心肌电生理状态愈不稳定,在一过性危险因素(如药物)的诱导下,愈易发生室性心律失常致猝死。藉此,本实验建立起小鼠轻度病毒性心肌炎猝死模型。模型成功的依据为:①全部实验鼠呈轻度心肌炎改变;②通过心电图记录,剔除了模型中心传导系统受累的病鼠;③HRD值计算简便,能真实可信地粗略反映HRV的变化程度及规律;④模型制作简便,思路新颖,重复性好。

本实验猝死模型的建立,提示轻度心肌炎亦可发生猝死,猝死的机理可能与心肌电生理不稳定与一过性危险因子的交互作用有关,支持了心性猝死的心电衰竭假说,为阐明轻中度心肌炎猝死机制提供了理论依据,为进一步研究轻度病毒性心肌炎猝

死提供了必要的实验材料。

参考文献:

- [1] 肖伯坤,孙跃刚.急性病灶性间质性心肌炎猝死(附22例报告)[J].中国法医学杂志,1995,10(2):102.
- [2] 成建定,陈玉川,胡丙杰.病毒性心肌炎纤维连接蛋白的免疫组化初步研究[J].法医学杂志,1999,15(1):9.
- [3] 郭应军.心率变异的研究进展[J].右江民族医学院学报,1998,20(3):477.
- [4] Katz A, Liberty I F, Porath A, *et al.* A simple bedside test of 1 minute heart rate variability during deep breathing as a prognostic index after myocardial infarction[J]. Am Heart J, 1999, 138 (1 pt 1): 32.
- [5] Rezkalla S, Kloner R A, Khatib G, *et al.* Beneficial effects of captopril in acute coxsackie virus murine myocarditis[J]. Circulation, 1990, 81(3): 1039.
- [6] Cripps T R. Prognostic value of reduced heart rate variability after myocardial infarction clinical evaluation of a new analysis method[J]. Br Heart J, 1991, 65(1): 14.
- [7] 王湘生.心脏性猝死[M].长沙:湖南科学技术出版社,1994.91~93.
- [8] Vanoli E, Adamson P B, Ba Lin, *et al.* Heart rate variability during specific sleep stages. A comparison of healthy subjects with patients after myocardial infarction [J]. Circulation, 1995, 91(7): 1918.
- [9] Janse M J, Wit A L. Electrophysiological mechanism of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction[J]. Physiol Rev, 1989, 69(4): 1049.
- [10] 吴本清,朱松杰,徐位仁.病毒性心肌炎室性早搏与心脏自主神经功能的关系[J].中国实用儿科杂志,1999,14(2):107.

(编辑 黄小延)

·新成果·

视网膜母细胞瘤 RB 基因生殖细胞性突变 筛查与症状前基因诊断

课题负责人 张清炯,等

(中山医科大学眼科中心,广东广州 510060)

本研究在总结国内外同类研究优缺点的基础上,创立了异源双链-SSCP法并用RBI基因突变筛查,提高了突变检出率和突变检测的可靠性。通过不同方法分析RB患者的肿瘤和血RBI基因,揭示RBI基因生殖细胞突变以微小突变为主,黄种人与白种人相比其突变特点没有各种族差异。发现除个别特殊突变外,大多数肿瘤表型与突变类型无关。认为视网膜瘤及RB眼球癌与RBI基因密切相关,对RB眼球癌应毫不迟疑尽早行眼球摘除,对视网膜瘤病人及其子女应进行严密的观察与遗传咨询。在此基础上在国内率先开展常规RB临床基因诊断服务,提供明确风险预测。成果于1999年获广东省科学技术进步三等奖。

(陈丽芳)