



· 论 著 ·

程序性死亡 [蛋白] -1 抑制剂诱导小鼠心肌炎模型的建立

陈怡帆^{1, 2, 3}, 程蕾蕾^{2, 3, 4}, 沈毅辉^{2, 3, 4}, 张 卉^{2, 3, 4}, 汪雪君^{2, 3, 4}, 许宇辰^{1, 2, 3},葛均波^{1, 2, 3}

1. 复旦大学附属中山医院心内科, 上海 200032;
2. 上海市心血管病研究所, 上海 200032;
3. 国家放射与治疗临床医学研究中心, 上海 200032;
4. 复旦大学附属中山医院心脏超声诊断科, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 程序性死亡 [蛋白] -1 (programmed death-1, PD-1) 抑制剂诱发的心肌炎亟待通过动物模型探究治疗靶点。本研究旨在探索此类自身免疫性心肌炎小鼠模型的最佳造模方法。方法: 选取6周龄健康雄性BALB/c小鼠30只, 分别编号并随机分为对照组 (control组)、自身免疫性心肌炎组 (Tn I组) 和免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 相关心肌炎组 (Tn I+anti-PD-1组), 每组10只。除control组外, 分别于第1、7天给小鼠皮下注射0.1 mL含有0.25 mg小鼠心肌Tn I肽段的完全弗氏佐剂。Tn I+anti-PD-1组自第7天起, 每次5 mg/kg腹腔注射PD-1抑制剂, 每2 d给药1次, 共5次, 累积剂量25 mg/kg。观察小鼠的一般状态、死亡率、心脏指数、超声心动图、心肌病理学改变、血清肌酸激酶 (creatinase, CK) 及CK同工酶 (CK isoenzyme, CK-MB) 水平。结果: 与control组相比, 造模第21、56天, Tn I和Tn I+anti-PD-1组体重均显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$), 两组间体重有显著差异 ($P<0.05$), 进食量均显著下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)。两组的死亡率在第21天分别为0%和10%, 在第56天分别为10%和20%。第56天, Tn I组心脏指数未显著增加 ($P>0.05$), Tn I+anti-PD-1组显著增加 ($P<0.05$), 且左心室射血分数 (ejection fraction, EF) 显著下降 ($P<0.001$)。急性心肌炎期, Tn I组心外膜下见少量炎症细胞浸润, Tn I+anti-PD-1组心外膜下见大量炎症细胞浸润, 心肌细胞坏死。扩张型心肌病期, Tn I组炎症细胞浸润减少, 心肌细胞轻度边界不清、空泡化, Tn I+anti-PD-1组细胞坏死、空泡化、核畸形更显著。第56天, Tn I+anti-PD-1组血清CK、CK-MB显著升高 ($P<0.001$), 且较Tn I组升高更明显 (CK: $P<0.01$; CK-MB: $P<0.05$)。结论: 建立了PD-1抑制剂诱导的、低死亡率的小鼠心肌炎模型, 以心肌急性自身免疫炎症性改变、左心室EF下降、心肌酶谱升高为突出特征。设计合成了特殊的小鼠心肌Tn I肽段, 强化了PD-1抑制剂的造模效果。

[关键词] 程序性死亡 [蛋白] -1抑制剂; 免疫检查点抑制剂相关心肌炎; 小鼠; 模型

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.07.004

中图分类号: R542.2+1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2022)07-0606-08

Establishment of a mouse myocarditis model induced by programmed death-1 inhibitor CHEN Yifan^{1,2,3}, CHENG Leilei^{2,3,4}, SHEN Yihui^{2,3,4}, ZHANG Hui^{2,3,4}, WANG Xuejun^{2,3,4}, XU Yuchen^{1,2,3}, GE Junbo^{1,2,3} (1. Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Shanghai 200032, China; 3. National Clinical Research Center for Interventional Medicine, Shanghai 200032, China; 4. Department of Echocardiography, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: CHENG Leilei, E-mail: cheng.leilei@zs-hospital.sh.cn.

基金项目: 国家自然科学基金 (82170359); 上海介入治疗工程技术研究中心 (19DZ2250300); 国家放射与治疗临床医学研究中心 (19MC1910300)。

第一作者: 陈怡帆 (ORCID: 0000-0001-9161-8268), 博士, E-mail: 21111210020@m.fudan.edu.cn。

通信作者: 程蕾蕾 (ORCID: 0000-0003-0677-7892), 博士, 主任医师, E-mail: cheng.leilei@zs-hospital.sh.cn。

[**Abstract**] **Background and purpose:** Myocarditis induced by programmed death-1 (PD-1) inhibitors is in urgent need of animal models to explore therapeutic targets. The study aimed to figure out the best modeling method of this typical autoimmune myocarditis in mice. **Methods:** Thirty 6-week-old healthy male BALB/c mice were numbered and randomly divided into control group, autoimmune myocarditis group (Tn I group) and immune checkpoint inhibitor (ICI)-related myocarditis group (Tn I +anti-PD-1 group), 10 in each group. Except for the control group, mice were subcutaneously injected with 0.1 mL complete Freund's adjuvant containing 0.25 mg of mouse cardiac Tn I peptide on day 1 and day 7, respectively. From day 7, Tn I +anti-PD-1 group received intraperitoneal injection of PD-1 inhibitor at 5 mg/kg each time, once every 2 d, for a total of 5 times with a cumulative dose of 25 mg/kg. The general state, mortality, cardiac index, echocardiography, myocardial pathology and the levels of creatine kinase (CK) and CK isoenzyme (CK-MB) in serum were observed. **Results:** Compared with control group, the mass of mice in both Tn I and Tn I +anti-PD-1 groups decreased significantly on day 21 and day 56 ($P<0.05$, $P<0.01$), and there was a significant difference between these 2 groups ($P<0.05$). Both had significantly decreased food intake (compared with control group, $P<0.05$, $P<0.01$). The mortality rates were 0% and 10% on day 21, and 10% and 20% on day 56 in Tn I and Tn I +anti-PD-1 groups, respectively. On day 56, no significant increase in cardiac index could be observed in Tn I group ($P>0.05$), while a significant rise of cardiac index ($P<0.05$) with a decrease in left ventricular ejection fraction (EF) ($P<0.001$) were detected in Tn I +anti-PD-1 group. During the acute myocarditis stage, mild subepicardial inflammatory infiltration was found in Tn I group; Severe subepicardial inflammatory infiltration and myocardial cell necrosis were seen in Tn I +anti-PD-1 group. During the dilated cardiomyopathy stage, the infiltrated inflammatory cells in Tn I group decreased, mild boundaries unclear and cytoplasm vacuolization could be observed; Tn I +anti-PD-1 group also had decreased inflammatory infiltration while underwent more severe cell necrosis and vacuolization with nuclear atypia. On day 56, serum CK and CK-MB in Tn I +anti-PD-1 group rose significantly ($P<0.001$), which was more obvious compared with Tn I group (CK: $P<0.01$; CK-MB: $P<0.05$). **Conclusion:** A PD-1 inhibitor-induced myocarditis model with low mortality was established in mice, characterized by acute and chronic autoimmune myocardial inflammation, decreased ejection fraction and increased myocardial enzyme spectrum. A mouse cardiac Tn I peptide fragment was particularly designed and synthesized for modeling.

[**Key words**] Programmed death-1 inhibitor; Immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis; Mouse; Model

免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitor, ICI) 已成为恶性肿瘤治疗的新热点^[1], 但也诱发了以ICI相关心肌炎 (ICI-associated myocarditis, ICIAM) 为代表的免疫相关不良反应^[2], 其发生率虽仅为0.21%~3.30%, 但死亡率却高达27.0%~67.0%, 居免疫相关不良反应之首^[2-4]。程序性死亡 [蛋白] -1 (programmed death-1, PD-1) 抑制剂是应用最广的ICI, 其诱发的ICIAM已成为肿瘤治疗不可忽视的问题^[5], 亟待通过动物模型探究治疗靶点。既往的小鼠心肌炎症损伤模型均存在成模率低、病变范围小、造模方式与临床治疗方案差异大等问题^[6-10], 尚未有成熟的PD-1抑制剂诱导的自身免疫性心肌炎模型。因此, 本实验拟建立一种能模拟PD-1抑制剂诱导的自身免疫性心肌炎发病过程的小鼠模型, 为其机制研究及药物筛选评价奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

30只6周龄健康雄性BALB/c小鼠, 体重

(22.5 ± 2.5) g (南京卡莱斯生物科技有限公司, 生产许可证号: 320114000129353)。本实验经复旦大学附属中山医院伦理委员会批准, 实验操作符合3R原则。

1.2 动物分组及模型建立

30只小鼠编号并随机分为3组: 对照组 (control组)、自身免疫性心肌炎组 (Tn I组) 和ICI相关心肌炎组 (Tn I +anti-PD-1组), 每组10只。除control组外, 分别于第1、7天给小鼠皮下注射0.1 mL含有0.25 mg小鼠Tn I [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 设计序列: HARVDKVD EERYDVEAKVTKNITEIADLTQKI YDLRGKFKRPTLRRVRIS] 肽段的完全弗氏佐剂 (美国Sigma公司)。Tn I +anti-PD-1组自第7天起, 按每次5 mg/kg给予腹腔注射PD-1抑制剂 (InVivoMab anti-mouse PD-1), 每2 d给药1次, 共5次, 累积剂量为25 mg/kg。Control组每次给予与Tn I +anti-PD-1组同等剂量的生理盐水腹腔注射。本研究使用的Tn I (0.25 mg) 和anti-PD-1剂量 (每次5 mg/kg) 是基于已发表的研

究^[7, 11]。各组于造模第1、21、56天检测心脏功能和分子水平变化。

1.3 一般状态

造模前: 分别给小鼠称重。造模后: 记录小鼠每日进食量, 观察其一般情况变化, 记录死亡情况。

1.4 心脏指数

第56天将小鼠全部处死, 开胸, 沿主动脉根部游离出心脏, 用手术剪将大血管残端、筋膜和脂肪组织剔除, 分离出全心, 灌注预先配制好的磷酸盐缓冲盐溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) 冲去残留血液, 滤纸吸水, 分析天平称量全心湿质量, 计算心脏指数 (cardiac index): 心脏指数=全心湿质量 (mg)/小鼠体重 (g)。

1.5 二维超声心动图

第1、56天用Vevo2100超声系统 (加拿大Visual Sonics公司) 进行二维超声心动图检查, 采用30 MHz高频扫描探头采集图像。小鼠吸入异氟烷麻醉后平卧, 胸前区备皮。在胸骨旁左室长轴切面左室内径最大处显示M型图像, 连续采集15 s, 分析左心室射血分数 (ejection fraction, EF)。

1.6 病理学检查

第56天将小鼠处死后, 小鼠心脏用10%多聚甲醛溶液固定24 h, 用石蜡包埋, 然后制成厚5 μm 的水平切片。用H-E染色, 选取光镜下的代表性图像 (放大40倍) 进行分析。出现以下病理学特征之一可被判定为发生心肌炎: 急性心肌炎期, 心外膜下及心肌间质弥漫性炎症细胞浸润, 心肌细胞坏死和间质水肿^[12]; 扩张型心肌病期, 心肌细胞边界模糊、纤维紊乱, 细胞核排列不规则, 部分细胞核固缩、碎裂, 心肌间质空泡样改变^[13]。

小鼠肺、肝脏、肾脏、小肠分别用10%多聚甲醛溶液固定24 h, 用石蜡包埋, 然后制成5 μm 厚的水平切片。分别进行H-E、Masson染色并选取光镜下的代表性图像 (放大40倍) 进行分析。出现以下病理学特征之一可被判定为发生Tn I、

PD-1对其他器官的损害: 出现弥漫性炎症细胞浸润, 间质水肿、空泡样改变、纤维化增加, 细胞坏死和细胞核固缩、碎裂^[13]。

1.7 血清生物标志物

第56天眼眶取500~1 000 μL 血液, 2 000 \times g离心20 min, 取上清液300 μL , 24 h内用酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (武汉云克隆科技股份有限公司, SEA109Mu, MEA479Mu) 检测血清肌酸激酶 (creatin kinase, CK) 和CK同工酶 (CK isoenzyme, CK-MB)。

1.8 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 使用Graphpad Prism 8.0软件进行Turkey法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况

造模前control组、Tn I组和Tn I+anti-PD-1组小鼠体重分别为(22.4 \pm 1.6)、(21.8 \pm 1.8)和(22.4 \pm 1.2) g, 各组间差异无统计学意义 ($P>0.05$); 造模第21、56天, 与control组相比, Tn I组和Tn I+anti-PD-1组的体质量均显著下降 [第21天: (22.8 \pm 1.5) g vs (19.5 \pm 1.2) 和 (18.7 \pm 1.0) g, P 均 <0.05 ; 第56天: (22.7 \pm 1.4) g vs (19.0 \pm 1.3) 和 (17.1 \pm 0.4) g, P 均 <0.01], 且Tn I+anti-PD-1组较Tn I组的体质量也显著下降 [第21天: (18.7 \pm 1.0) g vs (19.5 \pm 1.2) g, $P<0.05$; 第56天: (17.1 \pm 0.4) g vs (19.5 \pm 1.2) g, $P<0.05$, 图1A]。

造模开始后, 与control组相比, Tn I组和Tn I+anti-PD-1组进食量均显著下降 [第21天: (4.7 \pm 0.2) g vs (4.0 \pm 0.3) g, $P<0.05$, (4.7 \pm 0.2) g vs (3.5 \pm 0.1) g, $P<0.01$; 第56天: (4.8 \pm 0.2) g vs (3.4 \pm 0.1) g, $P<0.05$, (4.8 \pm 0.2) g vs (2.4 \pm 0.2) g, $P<0.01$,

图1B]，伴精神状况差、活动强度减弱，Tn I +anti-PD-1组更严重。Control组至第56天均无小鼠死亡；Tn I组至第21天无小鼠死亡，死亡率为0%，与control组相比，差异无统计学意义 ($P>0.05$)，第56天累计1只死亡，死亡率为10%，与control组相比，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Tn I +anti-PD-1组第21天累计1只死亡，死亡率为10%，第56天累计2只死亡，死亡率为20%，与control组相比，差异均有统计学

意义 ($P<0.05$, $P<0.01$, 图1C)。

2.2 心脏指数

第56天将小鼠全部处死，分离全心并称量心脏湿质量，计算各组心脏指数。第56天，与control组相比，Tn I组的心脏指数未显著增加 [(4.6 ± 0.2) mg/g vs (4.4 ± 0.2) mg/g, $P>0.05$]，而Tn I +anti-PD-1组的心脏指数显著增加 [(5.4 ± 0.1) mg/g vs (4.4 ± 0.2) mg/g, $P<0.05$, 图1D]。

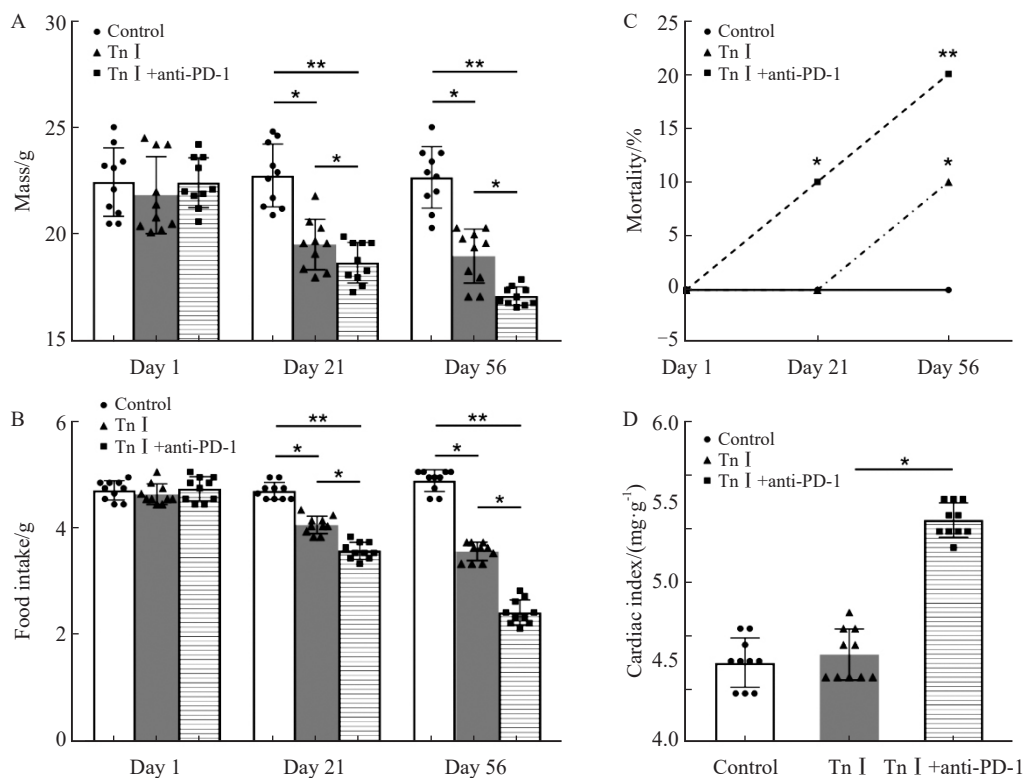


图1 小鼠一般状态、死亡率及心脏指数

Fig. 1 General status, mortality and cardiac index of mice

A: Changes in mice body weight; B: Changes in mice daily food intake; C: Changes in mice mortality; D: Mice cardiac index. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

2.3 二维超声心动图

采用Vevo2100超声系统对小鼠进行二维超声心动图检查。图2A为造模第56天扩张型心肌病期典型M型超声图像。与control组相比，Tn I +anti-PD-1组的左心室EF显著下降 ($45.3\pm 5.2\%$ vs $63.7\pm 4.6\%$, $P<0.001$)，且较Tn I组下降更显著 ($58.6\pm 2.8\%$ vs $63.7\pm 4.6\%$, $P<0.01$, 图2B)。

2.4 心肌病理学改变

造模第21、56天分别取小鼠心脏以多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片行H-E染色。每组1只小鼠的典型病理学切片如图3所示。

第21天急性心肌炎期：control组心肌细胞排列整齐、组织致密，该组10只小鼠均具有此特征；Tn I组见心外膜下少量炎症细胞浸润，细胞形态结构尚完整，该组9只小鼠具有此特征；

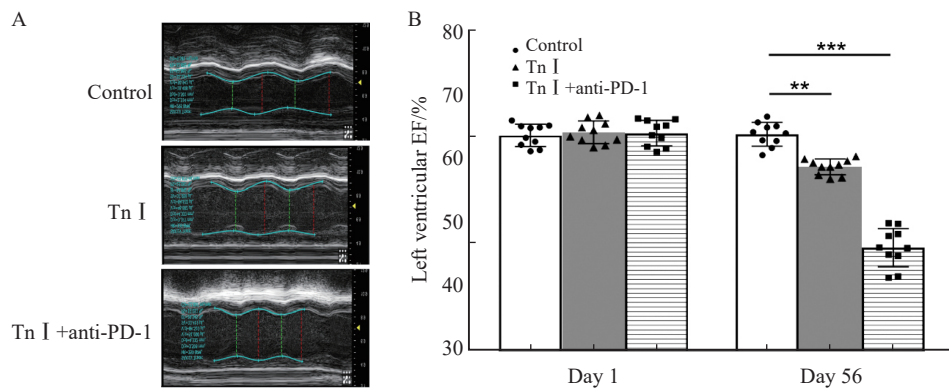


图2 扩张型心肌病期典型M型超声心动图图像及左心室EF

Fig. 2 Typical M-mode echocardiographic images and left ventricular EF during dilated cardiomyopathy stage

A: Typical M-mode echocardiography images of mouse in dilated cardiomyopathy stage; B: changes in mice left ventricular EF. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

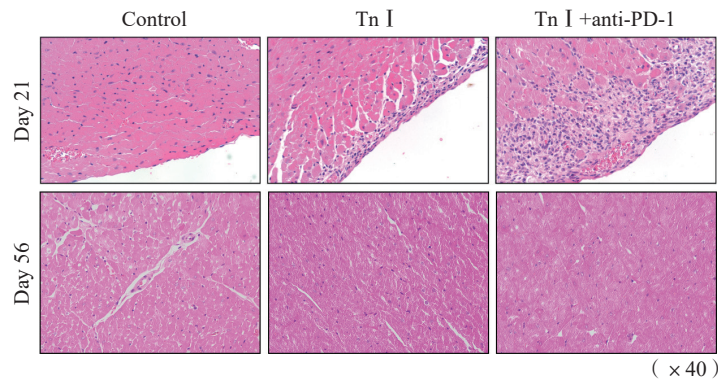


图3 心肌H-E染色

Fig. 3 H-E staining of myocardium

H-E staining of myocardium in acute myocarditis phase on day 21 and dilated cardiomyopathy phase on day 56.

Tn I +anti-PD-1组心外膜下大量炎症细胞浸润, 细胞边界不清、坏死, 间质水肿形成, 该组10只小鼠均具有此特征, 死亡的1只小鼠病理学改变最典型(图3)。

第56天扩张型心肌病期H-E染色: control组心肌细胞仍排列整齐、形态正常, 该组10只小鼠均具有此特征; Tn I组较第21天, 浸润的急性炎症细胞明显减少, 但心肌细胞有轻度边界不清、间质空泡化, 该组10只小鼠均具有此特征, 死亡的1只小鼠该改变最典型; Tn I +anti-PD-1组急性炎症细胞浸润减少, 但细胞边界不清、纤维紊乱、间质空泡化更显著, 部分细胞核呈异形、多核、核固缩、碎裂等病理学改变, 该组9只小鼠具有此特征, 其中死亡的2只小鼠病理学改变更

显著(图3)。

2.5 其他器官病理

造模第56天分别取小鼠肺、肝脏、肾脏、小肠, 以多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片行H-E、Masson染色。每组1只小鼠的典型病理学切片如图4所示。Control组和Tn I +anti-PD-1组肺、肝脏、肾脏、小肠的细胞排列规则、形态基本正常, 无明显炎症细胞浸润和间质水肿、纤维化增加, 无明显细胞坏死及细胞核固缩、碎裂, control组和Tn I +anti-PD-1组的10只小鼠均具有以上特征。H-E染色下, Tn I组肺、肝脏、肾脏、小肠则出现不同程度的炎症细胞浸润, 细胞排列及形态紊乱, 相比于以上两组, 出现明显间质水肿、空泡样改变, 以及细胞坏死和核固缩、碎

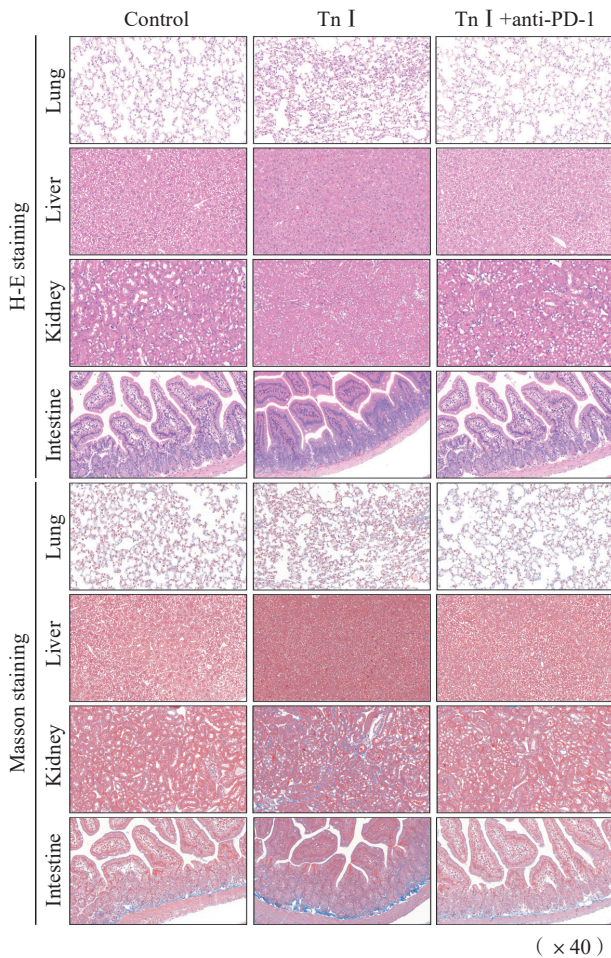


图4 其他器官H-E和Masson染色

Fig. 4 H-E and Masson staining of myocardium

H-E and Masson staining of lung, liver, kidney and intestine on day 56.

裂；Masson染色下，各器官出现较明显的纤维增生性改变，Tn I组的10只小鼠均具有以上特征。

2.6 血清生物标志物

第56天各组小鼠眼眶取血，2 000 × g离心20 min，取上清液检测CK和CK-MB水平。与control组相比，Tn I +anti-PD-1组小鼠血清CK和CK-MB显著升高 [CK：(2 833.0 ± 115.7) U/L vs (1 025.0 ± 74.8) U/L；CK-MB：(86.4 ± 2.6) U/L vs (40.3 ± 3.5) U/L，*P*均 < 0.001]，且较Tn I组升高更显著 [CK：(2 833.0 ± 115.7) U/L vs (1 578.0 ± 99.7) U/L，*P* < 0.01；CK-MB：(86.4 ± 2.6) U/L vs (58.8 ± 5.6) U/L，*P* < 0.05，图5]。

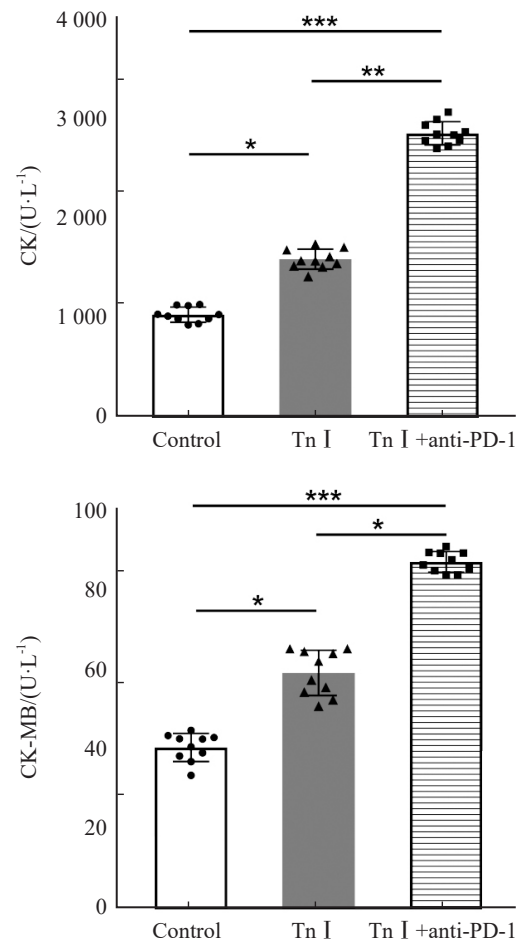


图5 血清生物标志物

Fig. 5 Serum biomarkers

Levels of serum CK and CK-MB in mice on day 56. *: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01; ***: *P* < 0.001.

3 讨 论

防治PD-1抑制剂诱发的ICIAM是免疫治疗的热点^[14]，小鼠模型具有简单、经济、重复性高的特点。因此，建立模拟PD-1抑制剂诱导心肌炎发病的小鼠模型，是促进其机制研究及药物筛选评价的有效方法。

目前已有小鼠自身免疫性心肌炎模型和PD-1抑制剂诱导的心肌损伤模型。其中，第一种多以重组肌球蛋白重链-α诱导^[9]、直接细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4) 和PD-1基因敲除^[15]、柯萨奇病毒感染^[16]构建，但其大多只

能建成急性心肌炎模型,未能模拟出慢性期心脏扩张、纤维结构紊乱等特点,成模率不足60%,心肌病变范围仅15%~40%,甚至有脾脏、胰腺等免疫反应强于心脏本身的情况^[15],且成本高、重复性差、与临床PD-1抑制剂给药方法差异大^[9, 11, 15],这些均极大地干扰了模型的有效性评估。第二种虽成模率能达到70%~90%,但通常需与程序性死亡[蛋白]配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)抑制剂联合、短时间大剂量给药(6~10 d,每天各5~10 mg/kg),难以反映真实的ICIAM用药和发病过程,其心肌损伤程度较第一种模型更轻,心肌病变面积仅为10%~20%,血清心肌酶波动常无显著差异^[7, 17],与部分患者能由PD-1抑制剂诱发3~4级免疫性心肌炎差距大。综上,这两种模型均不是模拟人类ICIAM发病过程及特点的理想模型。

PD-1抑制剂多以每2 d给药5~10 mg/kg以模拟临床治疗方案,但其累积剂量超过30 mg/kg时小鼠急性炎症期的死亡率高达40%,且造成广泛的肺、肠、肾、肝等靶器官外急性炎症浸润,严重影响造模成功率^[7, 18]。Tn I是引起ICIAM的主要自身免疫反应抗原,有研究^[11]曾以2次0.25 mg Tn I皮下注射构建自身免疫性心肌炎模型。构建小鼠Tn I肽段诱导自身免疫性心肌炎,再以PD-1抑制剂强化,有望增加成模率,减少靶器官外损伤。因此,本实验采用的造模方案为:每次5 mg/kg腹腔注射PD-1抑制剂,每2 d给药1次,共持续5次,累积剂量25 mg/kg,同时辅以2次0.25 mg Tn I诱导,既可以使小鼠生物学变化更接近患者的真实情况,又可以避免短时大量给药而增加死亡率。小鼠体重、进食和死亡率是评价其一般状态和造模成功率的重要指标^[19],Tn I+anti-PD-1组在急、慢性心肌炎期体重和进食情况下降更显著,提示在Tn I诱发自身免疫心脏损伤的同时,ICI更加重了此损伤,与小鼠死亡率随anti-PD-1累积剂量增加而上升的趋势相近。尽管如此,本方法anti-PD-1组小鼠死亡率仍不高于20%,保证了造模成功率。

左心室EF是心功能评估较重要的指标之一,有研究^[20]报道,PD-1抑制剂诱发ICIAM致左心室EF下降。Tn I+anti-PD-1组左室EF下降较Tn I组更显著,提示PD-1抑制剂不仅能在有Tn I等心肌炎诱发基础的环境下诱导ICIAM,更可能下

调免疫负反馈通路,加重炎症和心肌损伤。心脏指数的变化也为此提供了佐证,心脏指数能直接反映心肌增生肥厚并间接提示心室重构、左心功能不全^[21]。Tn I组该指数无显著增加,而Tn I+anti-PD-1组则显著增加,进一步证明了联用Tn I和anti-PD-1能造成更典型的自身免疫性心肌损伤。

H-E染色是评估心肌细胞形态变化、判断炎症细胞浸润的重要手段^[22]。既往自身免疫性心肌炎模型以心肌坏死、间质水肿、小簇状单核细胞和CD62L⁻CD4⁺ T细胞、CD3⁺CD8⁺ T细胞、CD68⁺巨噬细胞的浸润为特征,未见明显心肌纤维化^[8-9]。PD-1抑制剂诱导的心肌损伤模型也仅见4%~8%的间质性心肌纤维化^[7, 10]。本研究模型的心肌病理学改变与上述两种模型差异较大,除能观察到大量急性炎症细胞浸润,还能继续随访慢性扩张型心肌病期的特点,Tn I+anti-PD-1组无论急、慢性心肌炎期细胞形态异常都最显著,尤其是出现心肌纤维紊乱、空泡化等慢性特征性改变。CK和CK-MB在心肌损伤的全程中都可维持较高水平^[23]。本研究模型在慢性期仍有明显的CK和CK-MB升高,提示联合用药造成显著而长期的心肌损伤,这是既往模型不具备的,突出了本研究模型的长期稳定性和有效性。

本研究探索出一种全新、效果良好的小鼠自身免疫心肌炎模型的构建方法。通过给予小鼠腹腔注射PD-1抑制剂和皮下注射经特殊设计的小鼠Tn I肽段来构建模型,并确定了合理而成熟的剂量和给药间隔,有效地提高了建模的成功率和稳健性,且方法简单易行,便于推广。同时,也为ICIAM发病机制研究、治疗药物筛选、药物疗效评价提供了经济实用的实验对象。

本研究模型仍存在一定的局限性。首先,剂量关系上,不同的单次给药和累积给药剂量对各评价指标的影响需进一步探索,以模拟临床PD-1抑制剂多种治疗方案的心肌损伤效果。其次,时间关系上,指标采集点时间间隔较长,可设置更多采集点,以评估各指标随时间推移的动态的变化趋势。

本实验建立了一种PD-1抑制剂诱导的、低死亡率的小鼠心肌炎模型,以心肌急慢性自身免疫炎性改变、左心室EF下降、心肌酶谱升高为突出特征。同时,设计合成了一种特殊的小鼠心肌

Tn I 肽段, 强化了PD-1抑制剂的造模效果。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] BARZAMAN K, MORADI-KALBOLANDI S, HOSSEINZADEH A, et al. Breast cancer immunotherapy: current and novel approaches [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107886.
- [2] CHHABRA N, KENNEDY J. A review of cancer immunotherapy toxicity: immune checkpoint inhibitors [J]. *J Med Toxicol*, 2021, 17(4): 411-424.
- [3] CHEN C, WU B, ZHANG C Y, et al. Immune-related adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: an updated comprehensive disproportionality analysis of the FDA adverse event reporting system [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107498.
- [4] GODBERT B, PETITPAIN N, LOPEZ A, et al. Hepatitis B reactivation and immune check point inhibitors [J]. *Dig Liver Dis*, 2021, 53(4): 452-455.
- [5] EDERHY S, VOISIN A L, CHAMPIAT S. Myocarditis with immune checkpoint blockade [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(3): 290-291.
- [6] 付国强, 曹义战, 何乾锋, 等. N-3不饱和脂肪酸对C57BL/6 PD-1基因敲除小鼠心房结构重构的影响 [J]. *山西医科大学学报*, 2016, 47(1): 1-5.
FU G Q, CAO Y Z, HE Q F, et al. Effects of N-3 polyunsaturated fatty acids on atrial structure remodeling by inhibiting atrial myocytes oxidative stress in C57BL/6 PD-1^{-/-} mice [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2016, 47(1): 1-5.
- [7] CHEN Y X, LIU Y Z, WANG Y, et al. Prevotellaceae produces butyrate to alleviate PD-1/PD-L1 inhibitor-related cardiotoxicity via PPAR α -CYP4X1 axis in colonic macrophages [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 1.
- [8] BUQUÉ A, GALLUZZI L. Modeling tumor immunology and immunotherapy in mice [J]. *Trends Cancer*, 2018, 4(9): 599-601.
- [9] TAJIRI K, IMANAKA-YOSHIDA K, TSUJIMURA Y, et al. A new mouse model of chronic myocarditis induced by recombinant bacille calmett-eguèrin expressing a T-cell epitope of cardiac myosin heavy chain-A [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 794.
- [10] NISHIMURA H, MINATO N, NAKANO T, et al. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses [J]. *Int Immunol*, 1998, 10(10): 1563-1572.
- [11] BOCKSTAHLER M, FISCHER A, GOETZKE C C, et al. Heart-specific immune responses in an animal model of autoimmune-related myocarditis mitigated by an immunoproteasome inhibitor and genetic ablation [J]. *Circulation*, 2020, 141(23): 1885-1902.
- [12] BOCKSTAHLER M, SALBACH C, MÜLLER A M, et al. LNA oligonucleotide mediates an anti-inflammatory effect in autoimmune myocarditis via targeting lactate dehydrogenase B [J]. *Immunology*, 2022, 165(2): 158-170.
- [13] PALUDAN S R, PRADEU T, MASTERS S L, et al. Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(3): 137-150.
- [14] 中国抗癌协会整合肿瘤心脏病学分会, 中华医学会心血管病学分会肿瘤心脏病学学组, 中国医师协会心血管内科医师分会肿瘤心脏病学专业委员会, 等. 免疫检查点抑制剂相关心肌炎监测与管理中国专家共识(2020版) [J]. *中国肿瘤临床*, 2020, 47(20): 1027-1038.
Society of Integrative Cardio-Oncology China Anti-Cancer Association, The Cardio-Oncology Group of The Chinese Society of Cardiovascular Diseases of Chinese Medical Association, Chinese College of Cardiovascular Physicians Specialized Committee on Cardio-Oncology Chinese Medical Doctor Association, et al. Chinese expert consensus on the surveillance and management of immune checkpoint inhibitor-related myocarditis (2020 version) [J]. *Chin J Clin Oncol*, 2020, 47(20): 1027-1038.
- [15] WEI S C, MEIJERS W C, AXELROD M L, et al. A genetic mouse model recapitulates immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis and supports a mechanism-based therapeutic intervention [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(3): 614-625.
- [16] GU X H, LI Y C, CHEN K X, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate viral myocarditis through activating AMPK/mTOR-mediated autophagy flux pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7515-7530.
- [17] TAY W T, FANG Y H, BEH S T, et al. Programmed cell death-1: Programmed cell death-ligand 1 interaction protects human cardiomyocytes against T-cell mediated inflammation and apoptosis response in vitro [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): E2399.
- [18] CHEN Y X, LIU Y W, XIONG X L, et al. PD-1 inhibitor causes pathological injury to multiple organs in a Lewis lung cancer mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 105: 108551.
- [19] KIM W, CHU T H, NIENHÜSER H, et al. PD-1 signaling promotes tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells and gastric tumorigenesis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(3): 781-796.
- [20] MARTINI E, KUNDERFRANCO P, PEANO C, et al. Single-cell sequencing of mouse heart immune infiltrate in pressure overload-driven heart failure reveals extent of immune activation [J]. *Circulation*, 2019, 140(25): 2089-2107.
- [21] LONG E, BABL F E, OAKLEY E, et al. Cardiac index changes with fluid bolus therapy in children with sepsis—an observational study [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2018, 19(6): 513-518.
- [22] YU S Y, DONG B, FANG Z F, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(10): 4886-4898.
- [23] ZWIRNER J, ANDERS S, BOHNERT S, et al. Screening for fatal traumatic brain injuries in cerebrospinal fluid using blood-validated CK and CK-MB immunoassays [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 1061.

(收稿日期: 2022-03-08 修回日期: 2022-04-10)