

❖ 实验研究

Value of strain technique for detecting myocardial injury and cortistatin for alleviating myocardial injury in obese mice

JING Yishu¹, WU Dan², YAN Ru³, PAN Lu², MA Xueping³, MA Xin²,
WAN Fuxin¹, LIU Shujing¹, SU Xiuli¹, DU Huan¹, WANG Qin^{2*}

(1. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Department of Cardiac Function Examination, 3. Department of Cardiology,

General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective** To observe the value of strain technique for detecting myocardial injury and cortistatin for alleviating myocardial injury in obese mice. **Methods** A total of 48 male C57BL/6 mice were randomly divided into obese group, cortistatin group or normal group (each $n=16$). Mice in obese group and cortistatin group were fed with high-fat diet, while those in normal group were fed with normal diet for 11 weeks. Then mice in cortistatin group were intraperitoneally injected with cortistatin $120 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ for 2 weeks, while those in other 2 groups were injected with the same amount of physiological saline. Cardiac ultrasound biomicroscopy (UBM) and transmission electron microscopy were performed, the expression level of inflammatory factors were tested, and the findings were compared among 3 groups. The efficacy of strain technique for detecting myocardial injury was evaluated, and the cardioprotective effect of cortistatin was observed. **Results** No significant difference of conventional cardiac ultrasound parameters was found (all $P>0.05$), while significant differences of strain parameters were detected among 3 groups (all $P<0.05$). Strain parameters of obese group were significantly lower than those of cortistatin group and normal group (all $P<0.05$). Myocardial ultrastructures were impaired in obese group compared with those in cortistatin group and normal group, and the expression of NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) and serum IL-1 β in obese group were significantly higher than those in cortistatin group and normal group (all $P<0.05$). Myocardial ultrastructures had no significant abnormalities in cortistatin group. **Conclusion** The strain technique could effectively detect myocardial injury, and cortistatin could alleviate myocardial injury in obese mice.

[Keywords] mice; strain; obesity; cardiomyopathies; ultrasonography; cortistatin

DOI:10.13929/j.issn.1003-3289.2023.10.008

应变技术用于检出肥胖小鼠心肌损伤及评估皮质抑素减轻该损伤的价值

井一淑¹, 吴丹², 燕茹³, 潘璐², 马学平³, 马鑫², 万富鑫¹,
刘姝靖¹, 苏秀丽¹, 杜欢¹, 王琴^{2*}

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院心脏中心

功能检查部, 3. 心内科, 宁夏银川 750004)

[摘要] **目的** 观察应变技术用于检出肥胖小鼠心肌损伤及皮质抑素减轻该损伤的价值。 **方法** 将 48 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为肥胖组、皮质抑素组及正常组, 每组 16 只; 对肥胖组和皮质抑素组小鼠以高脂饲料饲养、正常组以

[基金项目] 宁夏自然科学基金(2023AAC02060)、宁夏医科大学 2022 年校级科研项目(XM2022020)。

[第一作者] 井一淑(1990—), 女, 陕西延安人, 在读硕士, 主治医师。研究方向: 心脏超声。E-mail: 605748658@qq.com

[通信作者] 王琴, 宁夏医科大学总医院心脏中心功能检查部, 750004。E-mail: 13995290877@163.com

[收稿日期] 2023-06-12 **[修回日期]** 2023-08-07

正常饲料饲养 11 周,之后对皮质抑素组腹腔注射皮质抑素 $120 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,对肥胖组和正常组腹腔注射等量生理盐水 2 周。行心脏超声生物显微镜(UBM)、透射电镜,检测炎症因子表达水平,观察组间差异,评估应变技术检出心脏损伤的效能及皮质抑素对于心脏的保护作用。**结果** 3 组小鼠常规心脏超声参数差异均无统计学意义(P 均 >0.05),而应变参数差异均有统计学意义(P 均 <0.05);肥胖组各应变参数显著低于皮质抑素组和正常组(P 均 <0.05)。肥胖组心肌超微结构受损,NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(Caspase-1)及血清 IL-1 β 水平较皮质抑素组及正常组显著增高(P 均 <0.05);皮质抑素组心肌超微结构未见明显异常。**结论** 利用应变技术可有效检出肥胖小鼠早期心肌损伤;皮质抑素能有效减轻肥胖小鼠心肌损伤。

[关键词] 小鼠;应变;肥胖;心肌病;超声检查;皮质抑素

[中图分类号] R654.2; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2023)10-1477-05

肥胖患者体内各种内源性危险信号可激活 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体而生成白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等,促进炎症反应并造成组织损伤^[1]。皮质抑素为环状神经肽,具有强大的抗炎作用^[2-5]。超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy, UBM)是一种新型高频超声检查仪,可较精确地评估小动物心脏结构及功能。本研究采用 UBM 观察应变技术检测肥胖小鼠心肌损伤,以及皮质抑素减轻该损伤的价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 48 只 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 $20 \sim 30 \text{ g}$ [实验动物使用许可证号:SCXK(宁)2020-0001],适应性饲养 1 周后开始实验。本实验获宁夏医科大学实验动物伦理委员会批准(IACUC-NYLAC-2022-044)。

1.2 主要试剂及仪器 皮质抑素-14(MCE, HY-P1932),NLRP3 抗体(Abmart, T55651),半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)抗体(Abmart, M025280S);小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(Abmart, AB-J0247B);UBM(VisualSonics, Vevo2100),荧光显微镜(Olympus, BX43)及透射电镜(Hitachi, H7650)。

1.3 建立模型及干预 将 48 只小鼠随机分为肥胖组、皮质抑素组和正常组,每组 16 只;于无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级屏障内饲养,期间小鼠自由采食、饮水。以高脂饲料饲养肥胖组和皮质抑素组,以正常饲料饲养正常组,定时记录小鼠体长和体质量,以第 11 周末肥胖组和皮质抑素组内小鼠体质量和 Lee 指数 $[\sqrt[3]{\text{体质量}(\text{g})} \times 1000/\text{体长}(\text{cm})]$ 均大于正常组 $\bar{x}+1.5s$ 为建模成功。之后对皮质抑素组腹腔注射皮质抑素 $120 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,肥胖组和正常组小

鼠腹腔注射等量生理盐水 $120 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,均持续 2 周,期间继续上述饲养方案。

1.4 UBM 检测 以 2%异氟烷麻醉小鼠,胸部脱毛、备皮后保定于检查台,控制其心率为 $400 \sim 500$ 次/分^[6]。采用 UBM 配置的 MS-400 探头(频率 30 MHz,带宽 $18 \sim 38 \text{ MHz}$,纵向及横向分辨率分别为 50 及 $110 \mu\text{m}$)进行扫查,获得室间隔舒张末期厚度(interventricular septal thickness at end-diastolic, IVSD)、室间隔收缩末期厚度(interventricular septal thickness at end-systolic, IVSS)、左心室后壁舒张末期厚度(left ventricular posterior wall end-diastolic thickness, LVPWD)、左心室后壁收缩末期厚度(left ventricular posterior wall end-systolic thickness, LVPWS)、左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径(left ventricular end-systolic diameter, LVESD)、左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)、二尖瓣口舒张早期血流速度(mitral early diastolic velocity, E)及舒张晚期血流速度(mitral lately diastolic velocity, A),并计算 E/A。采用应变技术定量分析软件(VisualSonics, Vevo LAB 5.5.0)分别于左心室长轴切面和乳头肌左心室短轴切面描记心内、外膜,获取左心室心肌整体纵向应变、整体径向应变及整体圆周应变参数。以上参数均由同一医师(医师 1)进行测量,取连续 3 个心动周期的平均值作为结果;之后随机选取 10 只小鼠,间隔 2 周后分别由医师 1 及另一医师(医师 2)进行测量,将结果用于重复性检验。

1.5 透射电镜观察 麻醉状态下以颈椎脱臼法处死小鼠,分离心脏后取左心室前壁心肌 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ 制成超薄切片,以透射电镜观察心肌超微结构。

1.6 免疫荧光染色 将小鼠心肌组织制成石蜡切片,经脱蜡、0.5% Triton-100 孵育、过氧化氢阻断内源性过氧化物酶、抗原修复、血清封闭、一抗(1:100)、二抗

(1:100)、麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA) (1:250) 及 DAPI 封片拍照后观察其 NLRP3、Caspase-1 炎症因子表达水平,并以 ImageJ 软件定量评估平均荧光强度。

1.7 检测 IL-1 β 于处死小鼠前摘眼球取血,室温下静置 1 h 后以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液;采用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 IL-1 β 表达水平。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计分析软件。以 $\bar{x} \pm s$ 表示正态分布的计量资料,采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验进行多组间及两组间比较。以组内相关系数(intra-class correlation coefficient, ICC) 评价观察者间及观察者内一致性; ICC > 0.75 为一致性好。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

肥胖组 12 只、皮质抑素组 10 只小鼠造模成功。

2.1 常规心脏超声参数 3 组小鼠常规心脏超声参数差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表 1。

表 1 肥胖组、皮质抑素组及正常组小鼠常规心脏超声指标比较

组别	IVSD (mm)	IVSS (mm)	LVPWD (mm)	LVPWS (mm)	LVEDD (mm)	LVESD (mm)	LVEF (%)	LVFS (%)	E/A
肥胖组(n=12)	0.92±0.14	1.23±0.11	0.72±0.09	1.00±0.11	3.68±0.28	2.38±0.37	65.44±8.30	35.69±6.56	1.52±0.34
皮质抑素组(n=10)	0.93±0.13	1.26±0.12	0.69±0.07	0.95±0.11	3.75±0.39	2.48±0.46	63.70±8.40	34.35±5.98	1.59±0.24
正常组(n=16)	0.83±0.08	1.16±0.16	0.68±0.05	0.97±0.11	3.43±0.32	2.15±0.34	68.13±8.33	37.56±6.31	1.55±0.32
F 值	2.75	1.99	0.57	0.65	2.94	2.15	0.86	0.79	0.11
P 值	0.08	0.15	0.57	0.53	0.07	0.13	0.43	0.46	0.90

2.2 心脏应变参数 3 组小鼠心脏应变参数差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。相比正常组及皮质抑素组,肥胖组小鼠整体纵向、径向及圆周应变均减低(P 均 < 0.05)。见图 1 及表 2。

2.3 透射电镜 肥胖组小鼠心肌内见大量脂滴,肌原纤维排列不整齐,局部断裂溶解,线粒体增生、聚集成团;皮质抑素组肌原纤维排列尚整齐,未见局部断裂溶解,线粒体数量结构正常;正常组肌原纤维排列整齐,肌节 Z 线清晰平直,线粒体数量结构正常。见图 2。

2.4 免疫荧光染色 肥胖组小鼠心肌内 NLRP3、Caspase-1 炎症因子表达均高于皮质抑素组及正常组(P 均 < 0.05)。见图 3。

2.5 IL-1 β 水平 肥胖组、皮质抑素组及正常组小鼠血清 IL-1 β 水平分别为(8.49±1.43)pg/ml、(6.64±1.52)pg/ml 及(5.28±1.46)pg/ml,3 组间差异有统计学意义(F=7.17, P=0.01);肥胖组 IL-1 β 水平高于皮质抑素组和正常组(P 均 < 0.05)。

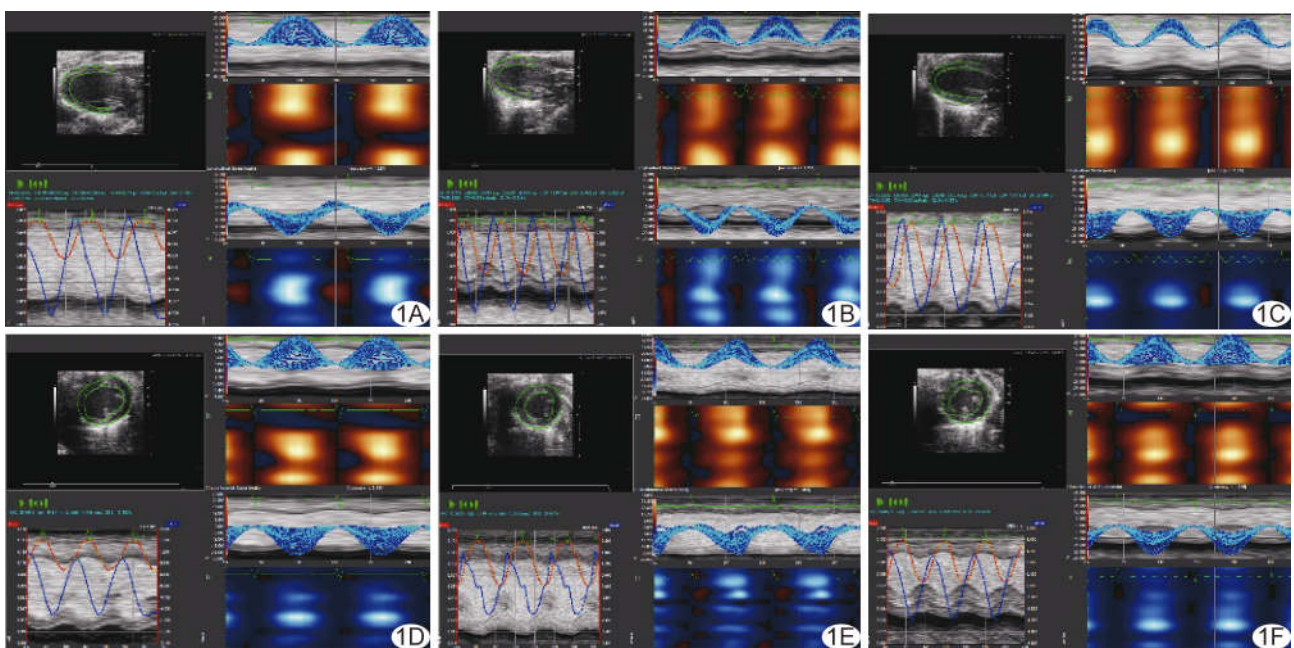


图 1 小鼠心脏应变超声图像 A. 肥胖组整体纵向应变; B. 皮质抑素组整体纵向应变; C. 正常组整体纵向应变; D. 肥胖组整体圆周应变; E. 皮质抑素组整体圆周应变; F. 正常组整体圆周应变

2.6 重复性检验 观察者间及观察者内测量整体纵向应变、整体径向应变及整体圆周应变结果的一致性均好(ICC均>0.75)。

3 讨论

NLRP3 炎症小体由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和前 Caspase-1 (pro-Caspase-1) 组成, 可通过促进免疫/炎症反应, 介导细胞凋亡和坏死、心肌纤维化、心肌血管重塑等, 降低心脏收缩和舒张功能^[7-8]。肥胖患者体内存在多种内源性危险信号, 可激活 NLRP3 炎症小体, 切割生成具有活性的 IL-1 β 等, 促进炎症反应^[9]。干预 NLRP3 炎症小体激活可能为防治肥胖人群心肌损伤的新靶点。

皮质抑素是生长抑素家族中的环状神经肽类物质, 在关节炎、炎症性肠病、肺炎和脓毒症等中发挥强大抗炎作用^[2-5]; 同时, 作为新型心血管保护肽, 对多种心血管疾病具有重要保护作用^[10]。

表 2 肥胖组、皮质抑素组及正常组小鼠心脏应变指标比较

组别	整体纵向应变	整体径向应变	整体圆周应变
肥胖组(n=12)	-13.27±2.79*#	16.07±3.91*#	-14.73±2.20*#
皮质抑素组(n=10)	-18.12±2.68	20.14±2.30	-18.44±3.58
正常组(n=16)	-20.62±5.92	22.72±3.68	-19.86±4.41
F 值	6.71	7.91	4.55
P 值	0.01	0.00	0.02

注: * :与正常组比较 P<0.05; #:与皮质抑素组比较 P<0.05

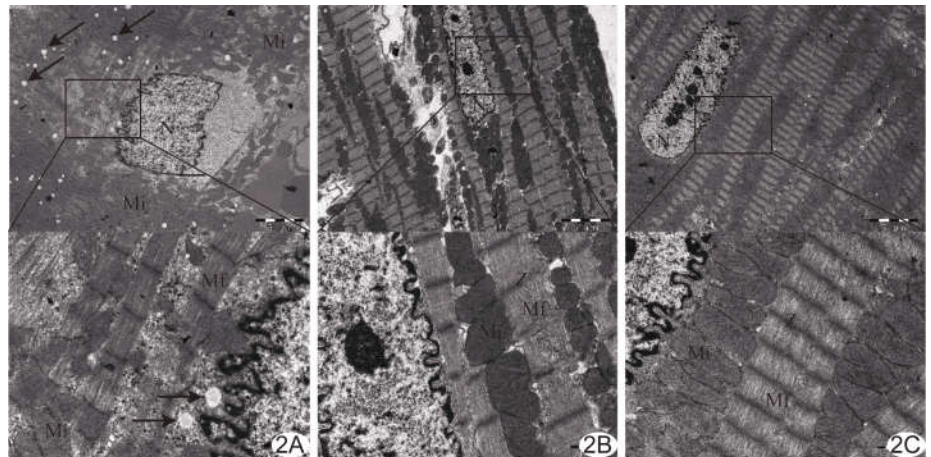


图 2 小鼠心肌透射电镜图 A. 肥胖组; B. 皮质抑素组; C. 正常组 (上排放大倍数为×5 000, 下排为×20 000; N:细胞核, Mi:线粒体, Mf:肌原纤维, 箭:脂滴, * :肌原纤维局部断裂溶解)

UBM 可实时、清晰显示小动物心脏及大血管等结构, 并进行精确测量及多样数据后处理。心肌应变指心肌组织在单位时间内相对于其原始形状的变形程度, 是 UBM 检测心肌功能的新指标。斑点追踪应变技

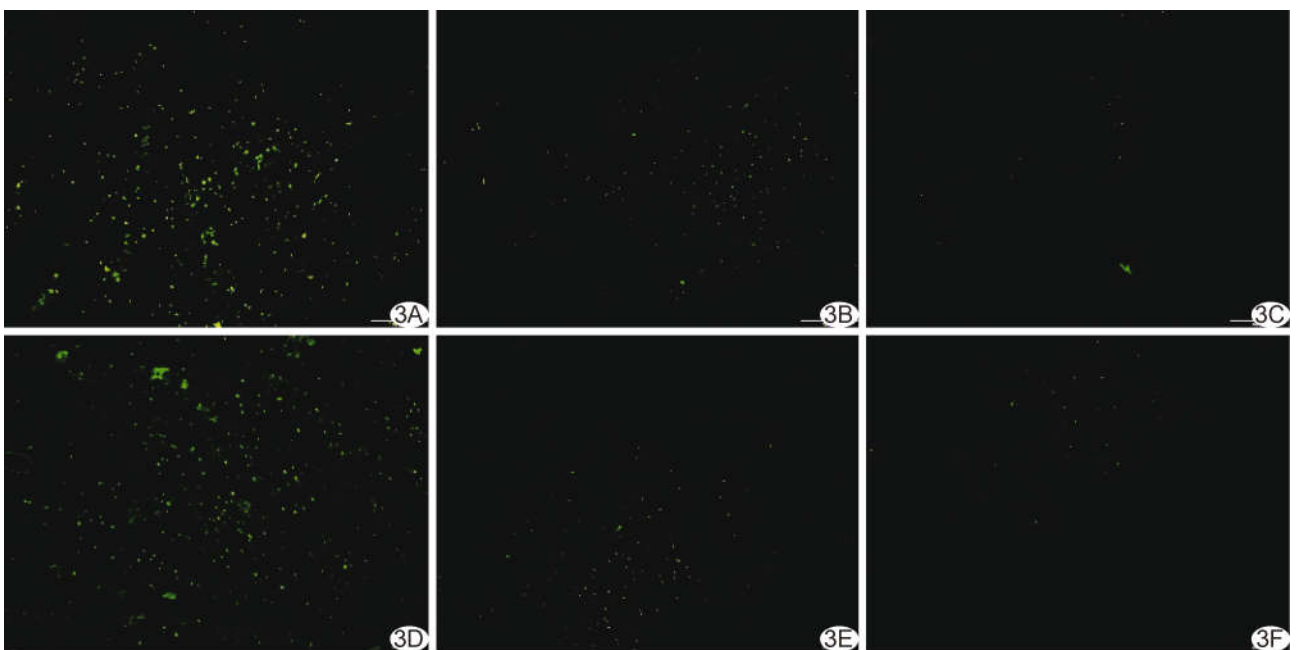


图 3 小鼠炎症因子免疫荧光染色图(×200) A. 肥胖组 NLRP3; B. 皮质抑素组 NLRP3; C. 正常组 NLRP3; D. 肥胖组 Caspase-1; E. 皮质抑素组 Caspase-1; F. 正常组 Caspase-1

术的优势在于无角度依赖性、可进行分层或节段心肌功能评估^[11],较常规超声更为灵敏^[12-13]。利用应变定量分析软件对 UBM 图像进行后处理,以斑点追踪技术追踪心肌组织内微小回声斑点的运动,可获得应变等力学参数。本团队前期研究^[14-15]已证实应变技术对检出肥胖小鼠早期心肌损伤具有重要意义。本研究 3 组小鼠常规超声指标差异均无统计学意义,而肥胖组整体纵向应变、整体径向应变及整体圆周应变均较其他 2 组减低,且电镜结果进一步证实肥胖组小鼠心肌存在超微结构损害,提示应变技术能较常规超声更敏感地发现左心室心肌损伤,与 ZHANG 等^[16-17]的结果一致。

同时,本研究中,相比肥胖组,皮质抑素组小鼠心肌超微结构损伤得到明显改善,整体应变参数亦高于肥胖组,表明皮质抑素对于心肌损伤具有保护作用。ZHANG 等^[18]研究表明,皮质抑素可消除脓毒症对 NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白表达激活的影响,抑制 IL-1 β 释放,从而减轻心肌损伤。本研究亦发现皮质抑素可抑制肥胖对 NLRP3 和 Caspase-1 表达激活的影响及 IL-1 β 释放,提示皮质抑素对肥胖小鼠的心肌保护作用与其抑制 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 有关。

综上,UBM 应变技术可有效检出肥胖小鼠早期心肌损伤,而皮质抑素能减轻该损伤。本研究未设立不同皮质抑素浓度梯度组以深入探讨皮质抑素的抗炎作用,有待后续加以完善。

[参考文献]

- [1] SHARMA B R, KANNEGANTI T D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22(5): 550-559.
- [2] ZHAO Y, LI Y, QU R, et al. Cortistatin binds to TNF- α receptors and protects against osteoarthritis [J]. *EBioMedicine*, 2019, 41: 556-570.
- [3] ROL Á, TODOROVSKI T, MARTIN-MALPARTIDA P, et al. Structure-based design of a Cortistatin analogue with immunomodulatory activity in models of inflammatory bowel disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1869.
- [4] BARRIGA M, BENITEZ R, FERRAZ-de-PAULA V, et al. Protective role of cortistatin in pulmonary inflammation and fibrosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(21): 4368-4388.
- [5] WEN Q, DING Q, WANG J, et al. Cortistatin-14 exerts neuroprotective effect against microglial activation, blood-brain barrier disruption, and cognitive impairment in sepsis-associated encephalopathy [J]. *J Immunol Res*, 2022, 2022: 3334145.
- [6] 高嘉梦, 胡兵, 申锴. 小鼠超声心动图的实验操作现状与建议 [J/CD]. *中华医学超声杂志(电子版)*, 2020, 17(1): 85-89.
- [7] PELLEGRINI C, MARTELLI A, ANTONIOLI L, et al. NLRP3 inflammasome in cardiovascular diseases: Pathophysiological and pharmacological implications [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 1890-1926.
- [8] PINAR A A, SCOTT T E, HUUSKES B M, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome to treat cardiovascular fibrosis [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 209: 107511.
- [9] HUANG Y, XU W, ZHOU R. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [10] LIANG J, BAI Y, CHEN W, et al. Cortistatin, a novel cardiovascular protective peptide [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, 9(4): 394-399.
- [11] VOIGT J U, CVIJIC M. 2- and 3-dimensional myocardial strain in cardiac health and disease [J]. *JACC Cardiovascular imaging*, 2019, 12(9): 1849-1863.
- [12] 曾丽琴, 张军, 拓胜军, 等. 二维斑点追踪成像技术评价早期单纯性肥胖大鼠左心室收缩功能 [J]. *中国医学影像技术*, 2018, 34(4): 481-485.
- [13] 郑哲岚, 蒋冰倩. 超声斑点追踪技术在评估心脏功能中的临床应用及进展 [J]. *浙江医学*, 2022, 44(11): 1125-1129, 1138.
- [14] 高娜, 马鑫, 燕茹, 等. 应变技术定量评价肥胖小鼠左心室心肌收缩功能与早期炎症的关系 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2022, 30(7): 678-683.
- [15] 王琴, 马鑫, 徐静, 等. 应用超声生物显微镜观察肥胖小鼠心脏早期炎症损伤的改变 [J]. *中国医学影像学杂志*, 2020, 28(9): 643-646.
- [16] ZHANG X, KONG S, WU M, et al. Impact high fat diet on myocardial strain in mice by 2D speckle tracking imaging [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2021, 15(2): 133-137.
- [17] 张君, 李欣, 刘娟, 等. 分层应变技术评价多柔比星干预大鼠左心室心肌功能 [J]. *中国医学影像技术*, 2023, 39(8): 1160-1164.
- [18] ZHANG B, LIU Y, SUI Y B, et al. Cortistatin inhibits NLRP3 inflammasome activation of cardiac fibroblasts during sepsis [J]. *J Card Fail*, 2015, 21(5): 426-433.