

蝮蛇毒诱导小鼠心肌损伤与血清 NT-proBNP 表达的相关性

李招兵, 马小峰, 邓立普, 罗 刚

(南华大学附属南华医院心内科, 湖南 衡阳 421002)

摘要: **目的** 观察蝮蛇毒诱导的小鼠心肌损伤与血清 NT-proBNP 表达情况, 以探讨蝮蛇毒诱导心肌损伤的机制。 **方法** 96 只小鼠随机分成蝮蛇毒组和正常组, 蝮蛇毒组 1.50 mg/kg 蝮蛇毒肌注, 正常组生理盐水肌注。肌注后 1 h、12 h、24 h、48 h 时酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测血清肌钙蛋白 (cTnT) 和 N 末端 B 型尿钠肽原 (NT-proBNP) 水平, 并观察心肌组织病变。对心肌病变积分、血清 cTnT 水平与血清 NT-proBNP 水平行直线相关分析。 **结果** 蝮蛇毒组各时相点心肌病变积分和血清 NT-proBNP 表达水平高于正常组 ($P < 0.05$), 且随时间延长而增高 ($P < 0.05$); 除 1 h 组外, 蝮蛇毒组各时相点血清 cTnT 水平均高于正常组 ($P < 0.05$), 且随时间延长而增高 ($P < 0.05$)。小鼠心肌病变积分与血清 NT-proBNP 水平呈显著正相关 ($r = 0.647, P < 0.05$), 血清 cTnT 水平与 NT-proBNP 水平呈显著正相关 ($r = 0.529, P < 0.05$)。 **结论** 蝮蛇毒可致小鼠急性心肌损伤, 随时间的延长心肌损伤加重, NT-proBNP 水平增高。NT-proBNP 的合成与释放增加可能是蝮蛇毒诱导心肌损伤的机制之一。

关键词: 蝮蛇毒; 心肌损伤; N 末端 B 型尿钠肽原; 肌钙蛋白

中图分类号: R542.2 文献标识码: A

Correlation Between Myocardial Injury and Serum NT-proBNP on Mice Induced by Agkistrodon Halys Pallas Venom

LI Zhaobing, MA Xiaofeng, DENG Lipu, et al

(Department of Cardiology, the Nanhua Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421002, China)

Abstract: **Objective** Observe serum NT-proBNP levels to explore the mechanisms by Agkistrodon snake venom-mediated myocardial injury on mice. **Methods** The 96 mice were randomly divided into experimental and control groups. Experimental group was delivered by intramuscular injection of 1.50 mg/kg and control group was delivered by intramuscular injection of saline. Serum cTnT and NT-proBNP were detected by ELISA and pathological changes of myocardial were observed after 1 h, 12 h, 24 h, 48 h. Linear correlation analysis were performed in myocardial histopathologic scores, serum cTnT and NT-proBNP levels. **Results** Myocardial histopathologic scores and serum NT-proBNP levels at each time point in experimental group were higher than control group ($P < 0.05$), and increased with time ($P < 0.05$); Besides 1 h group, serum cTnT levels at each time point in experimental group were higher than control group ($P < 0.05$), and increased with time ($P < 0.05$); myocardial histopathologic scores was significantly and positively correlated with serum NT-proBNP levels ($r = 0.647, P < 0.05$); serum cTnT levels was significantly and positively correlated with serum NT-proBNP levels ($r = 0.529, P < 0.05$). **Conclusion** Agkistrodon snake venom can lead to acute myocardial injury of mice. With the extension of time, the more severe myocardial injury, the higher serum NT-proBNP levels increased significantly. Over-expression of NT-proBNP may be one of the mechanisms that agkistrodon snake venom-mediated myocardial injury.

Key words: agkistrodon snake venom; myocardial injury; N-terminal pro-brain natriuretic peptide; cTnT

在衡阳地区毒蛇咬伤主要以蝮蛇为主^[1],蝮蛇伤患者可出现休克、心绞痛、心肌梗死、心电图改变及心肌酶学指标升高,推测蝮蛇毒素能作用于心肌细胞膜、血管和凝血系统,导致心肌损伤。如何防治蝮蛇伤后心肌损伤、心力衰竭,降低其死亡率,已成为目前研究的热点。本课题组前期研究发现蝮蛇毒可导致小鼠急性心肌损伤^[2],本研究拟建立蝮蛇毒致小鼠心肌损伤模型,观察其心肌病变与积分,检测血清心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 水平及心肌 N 末端 B 型尿钠肽原 (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP) 蛋白的表达,以探讨蝮蛇毒诱导的心肌损伤与 NT-proBNP 表达的关系,为临床防治蝮蛇毒诱导的急性心肌损伤提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物与材料

鼠龄 12 周,体重 18 ± 3 g 的昆明小鼠购自南华大学医学实验动物学部,动物处置符合 2006 年国家科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。蝮蛇毒冻干粉剂购自广州市浙龙贸易发展有限公司;小鼠 cTnT 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自上海爱丁堡生物科技有限公司;小鼠 NT-proBNP ELISA 试剂盒购自武汉伊艾博科技有限公司。

1.2 动物模型的建立

本课题组前期已经初步确定 1.0 mg/kg 为蝮蛇毒模型中毒剂量,而 2.0 mg/kg 为蝮蛇毒致死剂量^[2]。在此基础上,选取 15 只小鼠随机分成 3 组,选取右大腿前中部分别肌注 1.25 、 1.50 、 1.75 mg/kg 蝮蛇毒剂量。肌注后,禁食但自由饮水,24 h 后观察小鼠中毒症状及死亡情况拟确定肌注蝮蛇毒的最佳剂量。

1.3 动物分组

96 只小鼠随机分成蝮蛇毒组和正常组,蝮蛇毒组 1.50 mg/kg 蝮蛇毒肌注,正常组生理盐水肌注,肌注后 1 h、12 h、24 h、48 h 时相点的确定均以注射完所有试剂开始计时。

1.4 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

摘除小鼠眼球取血液,3 000 rpm 离心 10 min,取上清 -20°C 保存待测。血清 cTnT 和 NT-ProBNP 严格按照试剂盒操作说明书进行检测,450 nm 波长

下 15 min 内用全自动酶标仪测定其吸光度值。

1.5 心肌病变积分的评估

采集心肌组织,HE 染色,根据 Kishimoto 等^[3]方法评估心肌病变积分,即取 5 个高倍视野/每张切片,计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野面积的百分比, $>75\%$ 计 4 分, $75\% \sim 50\%$ 计 3 分, $50\% \sim 25\%$ 计 2 分, $<25\%$ 计 1 分,无病变计 0 分。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件处理实验数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析应采用 t 检验,相关性应用直线相关分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 蝮蛇毒的最佳剂量

肌注蝮蛇毒后, 1.25 、 1.50 、 1.75 mg/kg 组小鼠均出现严重中毒症状,多表现为竖毛、毛色灰暗、毛发变得凌乱、精神萎靡、饮水减少、活动减少,其中 1.75 mg/kg 蝮蛇毒剂量组在 6 h 时死亡小鼠 1 只,在 12 h 时死亡小鼠 2 只,其余两组均无小鼠死亡现象。正常组小鼠毛色均匀有光泽,精神正常,饮水、活动均正常,实验过程中无小鼠死亡。按照实验的要求,实验小鼠应在实验过程有中毒症状,但不能出现死亡,故本实验选取 1.50 mg/kg 作为本实验小鼠肌注蝮蛇毒的最佳剂量。

2.2 一般情况及病理学观察

蝮蛇毒组小鼠出现了严重中毒症状,12 h 后完全表现为严重的竖毛、毛色灰暗、毛发变得凌乱、躁动不安、精神萎靡、饮水明显减少、活动明显减少。正常组小鼠毛色均匀有光泽,精神正常,饮水、活动均正常,实验过程中无小鼠死亡。病理结果显示蝮蛇毒组心肌细胞出现变性、坏死,间质水肿及其周围存在炎性细胞浸润;正常组心肌细胞结构较清晰,心肌间质无水肿、出血,无炎症细胞浸润,也未见变性、坏死 (图 1)。

2.3 检测指标的比较

蝮蛇毒组各时相点心肌病变积分和血清 NT-proBNP 水平高于正常组 ($P < 0.05$),且随时间延长而增高 ($P < 0.05$);除 1 h 组外,蝮蛇毒组各时相点血清 cTnT 水平均高于正常组 ($P < 0.05$),且随时间延长而增高 ($P < 0.05$) (表 1)。

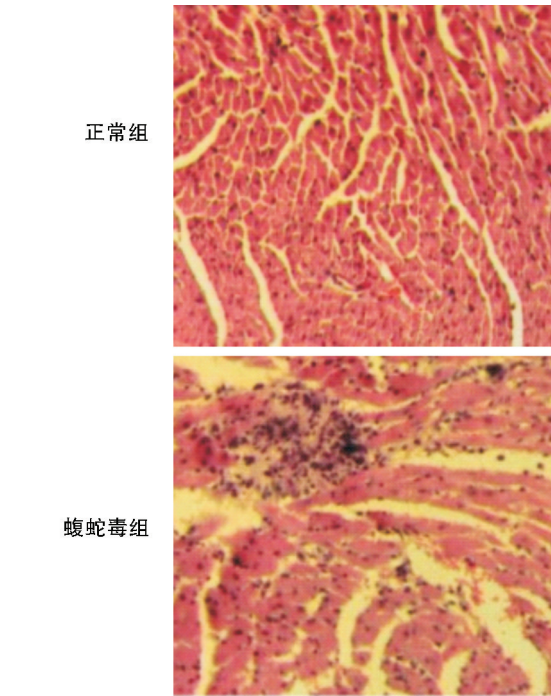


图 1 蝮蛇毒组和正常组小鼠心肌病理学改变 (HE ×400)

表 1 小鼠心肌病变积分、血清 NT-ProBNP 及 cTnT 水平的比较

指标	时间	正常组	蝮蛇毒组
心肌病变积分	1 h	0	0.43 ± 0.03 ^a
	12 h	0	1.67 ± 0.14 ^{ab}
	24 h	0	3.44 ± 0.68 ^{abc}
	48 h	0	5.02 ± 0.94 ^{abcd}
NT-ProBNP (ng/L)	1 h	57.1 ± 10.4	145.2 ± 15.2 ^a
	12 h	52.4 ± 9.1	273.4 ± 21.2 ^{ab}
	24 h	54.2 ± 8.9	355.1 ± 34.6 ^{abc}
	48 h	49.8 ± 8.3	435.1 ± 56.2 ^{abcd}
cTnT (ng/L)	1 h	12.2 ± 3.1	12.9 ± 3.8
	12 h	12.5 ± 1.7	38.6 ± 8.8 ^{ab}
	24 h	11.8 ± 2.4	76.7 ± 16.9 ^{abc}
	48 h	13.2 ± 2.1	115.5 ± 22.4 ^{abcd}

与正常组比较, a; $P < 0.05$; 与同组 1 h 比较, b; $P < 0.05$; 与同组 12 h 比较, c; $P < 0.05$; 与同组 24 h 比较, d; $P < 0.05$

2.4 心肌病变积分、血清 cTnT 水平与血清 NT-proBNP 水平的相关性

直线回归与相关分析表明:小鼠心肌病变积分与血清 NT-proBNP 水平呈显著正相关($r = 0.647, P < 0.05$);小鼠血清 cTnT 水平与血清 NT-proBNP 水平呈显著正相关($r = 0.529, P < 0.05$)。

3 讨 论

蝮蛇毒的有毒成分主要有两类:血循环毒和神经毒,其中血循环毒还包括心脏毒素。心脏毒素主要是直接损伤心肌细胞生物膜,损伤细胞膜上的许多活性酶,破坏细胞结构,改变其通透性,从而大量释放出乳酸脱氢酶、肌酸激酶、肌酸激酶-同工酶等^[4]。此外,心脏毒素还能使心肌细胞发生去极化,使心肌发生变性、出血甚至坏死,从而导致心律失常、心室纤颤,甚至心脏骤停^[5]。2006 年首次报道蝮蛇咬伤患者出现心绞痛或者心肌梗塞症状^[6]。研究发现在小鼠动物实验中发现从白眉蝮蛇毒中提取的 L-氨基酸氧化酶可导致心肌发生心肌间质水肿、变性和出血等病变^[7]。本研究发现随着时间延长,心肌病变积分和血清 cTnT 值明显升高,这说明蝮蛇毒诱导的心肌损伤具有时间依赖性。可能是由于蝮蛇毒直接作用于心肌细胞,破坏其细胞膜,使游离的 cTnT 迅速释放入血液中,一般 4 ~ 6 h 后开始升高;当损伤持续,部分结合原肌球蛋白的结合型 cTnT 也迅速解离释放,从而导致血清中 cTnT 持续升高^[8-9]。最近对离体兔心脏进行灌注时发现心脏损伤程度与蝮蛇毒的剂量呈正相关^[10]。

NT-proBNP 目前已被认为是心功能不全的标志物之一,并且很多研究证实其与心肌损伤存在一定的关系。当心肌损伤缺血、坏死,心室容量扩大或心室壁张力增加时,心室肌细胞快速合成及释放 NT-proBNP 入血,其含量与呼吸困难程度、左心室舒张末期压力、神经激素调节系统的状态相关^[11]。本研究发现蝮蛇毒组各时相点心肌病变积分、血清 cTnT 及 NT-proBNP 水平表达高于正常组,并且随着时间延长升高,表明 NT-proBNP 可能参与了蝮蛇毒诱导心肌损伤的发生发展过程,心肌损伤越严重,损伤时间越久,NT-proBNP 水平越高,能够较好地反映心肌受损程度。进一步相关性分析发现小鼠心肌病变积分、血清 cTnT 水平分别与 NT-ProBNP 表达呈显著正相关,提示 NT-proBNP 的合成与释放增加可能是蝮蛇毒诱导心肌损伤的机制之一。前期研究已证实蝮蛇毒能诱导心肌组织中 TNF- α 水平升高,结合最近的相关研究发现,蝮蛇毒诱导的炎症反应可能与 NT-proBNP 水平的升高密切相关^[2,12],对于其具体机制,还待于深一步研究。而 Shor 等^[13]调查发现,左心室功能正常的部分患者 NT-proBNP 水平明显高于 500 pg/mL,说明 NT-proBNP 水平的升高可能

存在其它机制^[13]。

参考文献:

- [1] 吴令波, 邓立普, 符秋红, 等. 629 例毒蛇咬伤者流行病学分析[J]. 中国实用医药, 2009, 4(30): 85-86.
- [2] 罗刚. 蝮蛇毒诱导的小鼠急性心肌损伤及心肌组织中 TNF- α 表达的研究[D]. 南华大学, 2010: 31-33
- [3] Kishimoto C, Kawamata H, Sakai S, et al. Enhanced production of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) by in vitro and in vivo infections with encephalo- myocarditis virus and modulation of myocarditis with an antibody against MIP-2 [J]. Virol, 2001, 75(3): 1294-1300.
- [4] 钟吉富, 喻文球, 王万春, 等. 中西医结合治疗蝮蛇咬伤多器官功能障碍综合征[J]. 蛇志, 2009, 21(1): 38-40.
- [5] 孙秋冬, 钟吉富. 中草药和抗蝮蛇毒血清联合使用干预蝮蛇咬伤致 SIRS 及 MODS 的临床探讨[J]. 亚太传统医药, 2007, 3(12): 40-41.
- [6] Frangides C, Kouni S, Niarchos C, et al. Hypersensitivity and Kounis syndrome due to a viper bite[J]. Eur J Intern Med, 2006, 17(3): 215-216.
- [7] Wei XL, Wei JF, Li T, et al. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from Agkistrodon blomhoffii ussurensis snake venom [J]. Toxicon, 2007, 50(8): 1126-1139.
- [8] González A, Ravassa S, López B, et al. Apoptosis in hypertensive heart disease: a clinical approach [J]. Curr Opin Cardiol, 2006, 21: 288-294.
- [9] Peacock WI, De MT, Fonarow GC, et al. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure [J]. N Engl J Med, 2008, 358(20): 2117-2126.
- [10] Luksic B, Brizic I, Lang BM, et al. Dose dependent effects of standardized nose-horned viper (Vipera ammodytes ammodytes) venom on parameters of cardiac function in isolated rat heart [J]. Comp Biochem Phys C, 2008, 147(4): 434-440.
- [11] Sykes MC, Mowbray AL, Jo H, et al. Reversible glutathiolation of caspase-3 by glutaredoxin as a novel redox signaling mechanism in tumor necrosis factor- α induced cell death [J]. Circ Res, 2007, 100(2): 152-154.
- [12] Papp A, Uusaro A, Parviainen I, et al. Myocardial function and haemodynamics in extensive burn trauma: Evaluation by clinical signs, invasive monitoring, echocardiography and cytokine concentrations-A prospective clinical study [J]. Acta Anaesth Scand, 2003, 47(10): 1257-1263.
- [13] Shor R, Rozenman Y, Bolhinsky A, et al. BNP in septic patients without systolic myocardial dysfunction [J]. Eur J Intern Med, 2006, 17(8): 536-540.

(此文编辑: 朱雯霞)