DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0908
文章编号 1671-8852(2025)06-0709-07

程序性细胞死亡蛋白-1单抗对自身免疫性心肌炎小鼠心肌重构的影响

王明明[1] 王蕴安[1] 李 豪[1] 魏晶晶[1,2] 张鹏飞[1,2] 王素琴[1,2] 原 芳[1,2] 李 涛[3] 刘洪智[1,2]
[1]河南省人民医院/河南大学人民医院心血管内科 河南 郑州 450003；
阜外华中心血管病医院 [2]心血管内科，[3]检验科 河南 郑州 451464

摘要 目的：探讨程序性细胞死亡蛋白-1(PD-1)单抗对肌球蛋白诱导的实验性自身免疫性心肌炎(EAM)小鼠左室心肌炎症、心肌纤维化及心功能的影响，建立免疫检查点抑制剂(ICI)相关心肌炎小鼠模型。方法：选择7周龄雄性BALB/c小鼠18只，随机分为正常对照组、EAM组及EAM＋PD-1单抗组，在第0天及第7天，除正常对照组外，余实验组小鼠用100 μg充分乳化后的小鼠重链肌球蛋白(Myhc-α)皮下多点免疫；从第8天开始EAM组按每次5 mg•kg^{-1}给予同种型IgG腹腔注射，EAM＋PD-1单抗组按每次5 mg•kg^{-1}给予PD-1单抗腹腔注射，每3 d给药一次，共5次。第21天行心脏超声检查、ELISA法检测外周血cTnI、INF-γ及TNF-α水平，HE染色及免疫组化检测心肌病理改变及炎性细胞浸润情况，Masson染色检测心肌纤维化。结果：与正常对照组小鼠相比，EAM组小鼠左心室射血分数(LVEF)降低、左心室收缩末期内径(LVESD)增加；与EAM组相比，EAM＋PD-1单抗组小鼠LVEF下降及LVESD增加更显著(均$P<0.05$)。HE染色及免疫组化染色结果显示EAM组可见多种炎细胞浸润，且EAM＋PD-1单抗组小鼠炎症更加明显。Masson染色显示EAM组小鼠左室心肌间质胶原纤维明显增多；与EAM组相比，EAM＋PD-1单抗组小鼠左室心肌胶原纤维增多、胶原容积分数升高更为显著(均$P<0.05$)。ELISA检测结果显示，与对照组相比，EAM组小鼠外周血中cTnI、TNF-α和IFN-γ均升高，且EAM＋PD-1单抗组小鼠上述指标升高最为显著(均$P<0.05$)。结论：在小鼠Myhc-α两次免疫基础上，联用多次PD-1单抗腹腔注射可加重EAM小鼠心肌炎性细胞浸润、心肌损伤、心肌纤维化及心功能下降，成功建立了ICI相关心肌炎小鼠模型。

关键词 程序性细胞死亡蛋白-1；自身免疫性心肌炎；心肌纤维化
中图分类号 R542.2
文献标识码 A
开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

Effect of programed cell death protein-1 monoclonal antibody on cardiac remodeling in mice with autoimmune myocarditis

WANG Mingming[1], WANG Yun´an[1], LI Hao[1], WEI Jingjing[1,2], ZHANG Pengfei[1,2], WANG Suqin[1,2], YUAN Fang[1,2], LI Tao[3], LIU Hongzhi[1,2]
[1]Dept. of Cardiology, Henan Provincial People's Hospital & People's Hospital of Henan University, Zhengzhou 450003, Henan, China;
[2]Dept. of Cardiology, [3]Dept. of Clinical Laboratory Fuwai Central China Cardiovascular Hospital, Zhengzhou 451464, Henan, China

Abstract

Objective: To investigate the effects of programmed cell death protein-1 (PD-1) monoclonal anti-

课题来源：河南省科技发展计划项目(编号:192112310063)；河南省自然科学基金面上科学基金项目(编号:242300421291)
作者简介：王明明，男，1998—，医学硕士生，主要从事心肌炎及心力衰竭左室重构机制究，E-mail：w1710191115@163.com
通信作者：刘洪智，男，1973—，医学博士，主任医师，主要从事冠心病介入治疗及心肌炎、心力衰竭左室重构机制研究，E-mail：13073713520@163.com

body on left ventricular myocardial inflammation, myocardial fibrosis, and cardiac function in myosin-induced autoimmune myocarditis mice, and to establish a murine model of immune checkpoint inhibitor (ICI)-associated myocarditis. **Methods:** Eighteen male BALB/c mice were randomly divided into three groups: normal control group, experimental autoimmune myocarditis (EAM) group, and EAM+PD-1 inhibitor group. Mice in the EAM and EAM+PD-1 inhibitor groups received subcutaneous immunization with 100 μg mouse heavy chain myosin (Myhc-α) emulsified with complete Freund's adjuvant at a 1∶1 ratio on days 0 and 7. From day 8, the EAM group was administered isotype IgG intraperitoneally at 5 $mg \cdot kg^{-1}$ per dose, and the EAM+PD-1 inhibitor group received PD-1 inhibitor at 5 $mg \cdot kg^{-1}$ per dose intraperitoneally every three days, for a total of five doses. After 21 days of treatment, echocardiography was performed, and ELISA was used to measure circulating cardiac injury markers (cTnI) and inflammatory cytokines (IFN-γ and TNF-α) levels. Left ventricular myocardium was evaluated for pathological changes and inflammatory cell infiltration using HE staining and immunohistochemistry. Myocardial fibrosis was assessed via Masson staining. **Results:** Compared to the control group, EAM mice showed significantly reduced LVEF and increased LVESD. The reduction in LVEF was even more pronounced in the EAM+PD-1 inhibitor group than in the EAM group, with a more significant increase in LVESD. HE staining and immunohistochemistry staining revealed inflammatory cell infiltration in the EAM group, which was more severe in the EAM+PD-1 inhibitor group. Masson staining demonstrated a substantial increase in myocardial collagen fibers in the EAM group, with elevated collagen volume fraction, which was further exacerbated in the EAM+PD-1 inhibitor group than in the EAM group. ELISA results indicated elevated peripheral blood levels of cTnI, TNF-α, and IFN-γ in EAM mice compared to controls, with the highest levels observed in the EAM+PD-1 inhibitor group ($P<0.05$). **Conclusion:** In the mice with Myhc-α-induced myocarditis, combined with multiple intraperitoneal injections of PD-1 monoclonal antibody, the myocardial inflammatory cell infiltration, myocardial injury, myocardial fibrosis, and decline in cardiac function were exacerbated. This experiment successfully established a mouse model of ICI-associated myocarditis.

Key Words Programmed Cell Death Protein-1; Autoimmune Myocarditis; Myocardial Fibrosis

程序性细胞死亡蛋白-1(programmed cell death protein-1,PD-1)单抗是近十年来抗肿瘤免疫治疗领域最常用的一类免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor,ICI),显著改善了肿瘤患者的预后。其主要机制是通过单克隆抗体抑制免疫检查点PD-1的活性,恢复并提高效应T淋巴细胞特异性识别和杀伤肿瘤细胞的能力,从而增强全身抗肿瘤免疫应答反应。近50%的肿瘤患者适合ICI治疗,ICI为肿瘤患者带来显著生存获益的同时,但其广泛应用对各器官可能造成的免疫相关不良事件尤其是ICI相关的心肌炎限制了其应用[1-2]。

有大量证据[3-5]表明PD-1及其配体PDL-1(programmed cell death protein ligand-1,PDL-1)在维持心脏稳态及其免疫耐受中起重要的调控作用。有研究[6]表明,PD-1单抗可明显加重病毒性心肌炎小鼠心肌炎性细胞浸润及心肌损伤,BALB/c小鼠PD-1基因敲除可明显加重肌球蛋白诱导的$CD4^+$ T淋巴细胞浸润为特征的实验性自身免疫性心肌炎(experimental autoimmune myocarditis,EAM)的易感性,明显增加了$CD4^+$ T淋巴细胞中Th17亚群、$CD8^+$ T淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞浸润,心肌炎症反应及心肌损伤明显加重[4]。而在另一研究[7]中发现肌球蛋白和PD-1单抗给药顺序不同对BALB/c小鼠EAM心肌炎症影响不同,先给予小鼠心肌肌球蛋白免疫2周后再给予PD-1单抗可明显加重心肌炎症,但对其心功能无明显影响,而同时给予肌球蛋白和PD-1单抗并未加重心肌炎。上述研究均未进一步探讨PD-1在EAM模型左室心肌纤维化和心肌重构中的作用。

本研究探讨PD-1单抗对肌球蛋白诱导的EAM

小鼠左室心肌炎症、心肌纤维化及心肌重构的影响，也为建立ICI相关心肌炎动物模型提供一种选择。

1　材料与方法

1.1　实验材料　18只SPF级7周龄BALB/c雄性小鼠（生产许可证号：SYXK（豫）2024-0002，购自北京华阜康生物科技股份有限公司），体质量18～20 g，本实验所用动物的护理和实验程序均符合国家心血管病中心华中分中心动物中心的规定并通过伦理要求批准（伦理编号：FZX-IACUC-2024011）。主要试剂：*In Vivo* MAb anti-mouse PD-1（Bio X Cell，BE0146，美国）；心肌肌球蛋白重链α（Myhc-α）（分子式：C91H149N25O28S）（AnaSpec，AS-62554，美国）；弗氏完全佐剂（CFA）（Sigma-Aldrich，F5881，美国）；抗体：抗小鼠CD3抗体（Abcam，ab237721，美国）、抗小鼠CD4抗体（Abcam，abs158432，美国）、抗小鼠CD8抗体（Abcam，ab217344，美国）、抗小鼠F4/80抗体（Proteintech，28463-1-AP，中国）、抗小鼠LY6G抗体（Abcam，ab238132，美国）；ELISA试剂盒：小鼠γ干扰素（IFN-γ）酶联免疫吸附测定试剂盒（伊莱瑞特，E-MSEL-M0007，中国），小鼠肿瘤坏死因子α（TNF-α）酶联免疫吸附测定试剂盒（伊莱瑞特，E-MSEL-M0002，中国），小鼠心肌肌钙蛋白I（TNNI3/cTn-I）酶联免疫吸附测定试剂盒（伊莱瑞特，E-EL-M1203，中国）。

1.2　模型建立及分组　18只7周龄BALB/c雄性小鼠在SPF级动物实验室适应性饲养1周后，随机分配到3组（每组n=6）。实验分组及建模示意图见图1，实验分组及模型建立具体方法如下：

（1）对照组：在第0天和第7天给予皮下多点注射（颈后、腋窝及腹股沟处）CFA与等体积生理盐水充分乳化的乳液100 μL，后分别在第8、11、14、17、20天腹腔注射鼠源性IgG（5 mg•kg^{-1}，共5次）；

（2）EAM组：在第0天和第7天，每只小鼠用100 μg溶于50 μL生理盐水的小鼠重链肌球蛋白（Myhc-α）与等体积CFA充分乳化后皮下多点注射，后分别在第8、11、14、17、20天腹腔注射鼠源性IgG（5 mg•kg^{-1}，共5次）；

（3）EAM+PD-1单抗组：在第0天和第7天皮下注射每只小鼠Myhc-α 100 μg，用法同EAM组，后分别在第8、11、14、17、20天腹腔注射鼠源性PD-1单抗（5 mg•kg^{-1}，共5次）。

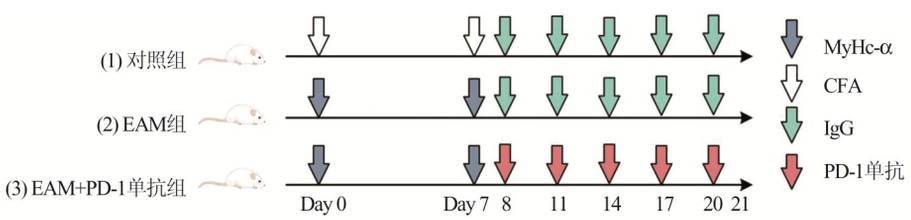


图1　实验分组及各组小鼠给药种类、给药时间节点

每天记录小鼠体质量及一般状态变化，于实验第21天行超声心动图检查，留取眼球血标本，取小鼠眼球血并室温放置1 h后4 ℃、1 000 g离心20 min收集上清，－80 ℃分装冻存；然后将小鼠颈椎脱臼法处死，新鲜无菌的条件下取出心脏并进行测量、称重，以计算心脏质量与体质量比值（HW/BW），然后平行于房室沟于左心室长轴中点处将心室分为心尖部和心底部，心底部用4%甲醛溶液固定12 h后，石蜡包埋并切片（切片厚4 μm），用于HE染色、Masson染色及免疫组化等，心尖部立即放入液氮冷冻，然后移至－80 ℃冰箱冷冻保存，以检测其他指标。

1.3　超声心动图检测小鼠心脏结构及功能　在第21天通过Vevo 2100彩色多普勒超声影像系统对经1%～2%异氟烷及0.6 L•min^{-1}氧气麻醉的小鼠进行经胸超声心动图检查。通过支持软件记录乳头肌水平的M-模式描记心肌运动，以测量左心室射血分数（LVEF）、左心室收缩末期内径（LVESD）和左心室舒张末期内径（LVEDD）。所有测量过程由对研究组设盲的经验丰富的技术人员进行。

1.4　左室心肌HE染色判断炎性细胞浸润及病理改变　取新鲜无菌心脏拍照后用4%多聚甲醛溶液固定，石蜡包埋，横切5 μm切片，行HE评估心脏炎症状态。实验中心脏炎症的严重程度评价采用以下标准：0级，无炎症浸润；1级，炎症面积＜25%；2级，25%≤炎症面积＜50%；3级，50%≤炎症面积＜75%；4级，炎症面积≥75%。炎症评估通过Image J由对研究组设盲的两名独立技术人员测量。

1.5　免疫组化染色（IHC）检测左室心肌炎性细胞浸润情况　为探究心肌炎症中淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞的浸润情况，本实验采用免疫组化

对心肌组织进行检测。首先取石蜡切片(5 μm)二甲苯脱蜡,依次梯度水化后清洗,阻断内源性过氧化物酶后分别用CD3抗体(1∶2 000,Abcam)、CD4抗体(1∶2 000,Abcam)、CD8抗体(1∶2 000,Abcam)F4/80抗体(1∶800,Proteintech)、Ly6g抗体:(1∶2 000,Abcam)一抗孵育过夜,然后用二抗孵育30 min,最后用二氨基联苯胺及苏木素孵育。在200倍显微镜下观察并对每个样本随机选取5个视野拍照获取图像,通过Image J测定炎症区域单位面积内阳性细胞数。

1.6 Masson染色检测左室心肌纤维化水平 取小鼠左心室心肌组织切片常规脱蜡至水。切片入Bouin液,置于37 ℃温箱内24 h进行媒染,然后流水冲洗至切片上黄色消失,天青石蓝染液滴染3 min,水洗。Mayer苏木素染色液滴染3 min,水洗,酸性乙醇分化液分化数秒,流水冲洗10 min。丽春红品红染色滴染10 min,水洗。磷钼酸溶液处理10 min,弃液,直接滴入苯胺蓝染色液染5 min。弱酸处理2 min,95%乙醇溶液快速脱水3次。二甲苯透明3次,每次2 min。中性树脂封固,观察。采用图像分析系统,通过灰度调节区别胶原和非胶原成分,计算心肌组织胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF),CVF=胶原纤维染色面积/总面积×100%,每张切片均随机取5个视野测量并计算平均值。

1.7 ELISA法检测外周血中心肌损伤标志物、炎性细胞因子的表达水平 在无菌条件下取小鼠眼球血后室温放置1 h,1 000 *g*离心20 min后取上清,将血清稀释后,按照ELISA检测试剂盒(Elabscience,中国)说明分别检测小鼠外周血中心肌损伤标记物cTnI、炎性细胞因子TNF-α及IFN-γ的表达水平。取适量血清滴加到酶标板孔位并覆膜37 ℃孵育90 min,甩尽液体后加入生物素化抗体工作液覆膜37 ℃孵育1 h,洗涤后加入HRP酶结合物覆膜37 ℃孵育30 min,加入底物溶液避光覆膜37 ℃孵育10 min后加入终止液并用酶标仪在450 nm波长测量各孔光密度(*OD*值)。

1.8 统计学分析 使用IBM SPSS 26和GraphPad Prism 10软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料用均数±标准差表示,通过单因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 各组小鼠实验期间均无死亡,与对照组相比,各实验组小鼠在实验开始后的第10天左右均出现明显的疲劳、毛发凌乱、对刺激的反应下降、进食及活动减少、体质量增加明显减少等现象,且EAM+PD-1单抗组的小鼠表现更为明显,症状出现也更早。解剖小鼠发现与对照组相比EAM组小鼠HW/BW增加(4.353×10^{-3} *vs* 4.995×10^{-3},$P<0.05$),且EAM+PD-1单抗组较EAM组增加更明显(5.673×10^{-3} *vs* 4.995×10^{-3},$P<0.05$);EAM+PD-1单抗组小鼠与另外两组小鼠相比可见更明显的心脏水肿、体积增大、色泽灰暗,脾脏明显增大(见图2)。

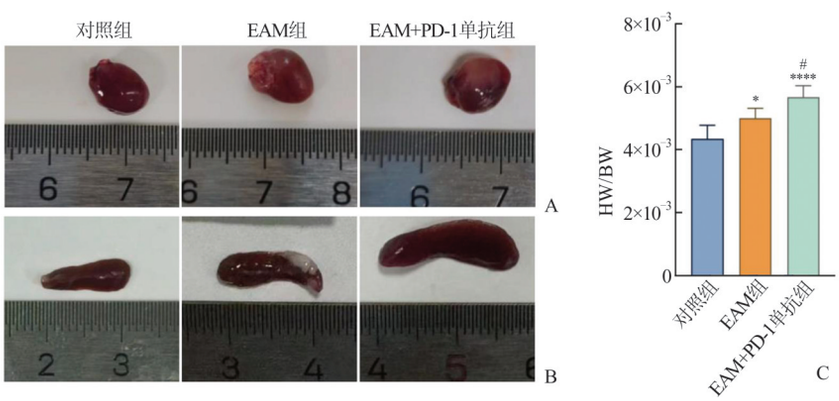


图2 联合应用小鼠重链肌球蛋白及PD-1单抗可加重小鼠心脏炎症水肿及脾脏增大

A.各组小鼠代表性新鲜心脏图片,B.各组小鼠代表性新鲜脾脏图片,C.各组小鼠心脏/体质量比值;与对照组相比,$^{*}P<0.05$,$^{****}P<0.000\ 1$;与EAM组相比,$^{\#}P<0.05$

2.2 超声心动图检测结果 在实验第21天行超声心动图评估小鼠心脏结构与心功能,结果显示与对照组小鼠相比,EAM组小鼠LVEF降低(82.06% *vs* 57.76%,$P<0.000\ 1$),LVESD增加(1.635 mm *vs* 2.565 mm,$P<0.001$),且与EAM组相比,EAM+PD-1单抗组小鼠LVEF下降(57.76% *vs* 40.61%,$P<0.001$)及LVESD增加(2.565 mm *vs* 3.046 mm,$P<0.05$)更为显著,而各实验组

LVEDD差异无统计学意义（$P>0.05$）；超声结果表明PD-1单抗可进一步加重EAM小鼠心肌重构及心功能损害，且对心肌收缩功能影响更为显著，对心肌舒张功能影响相对较小（见图3）。

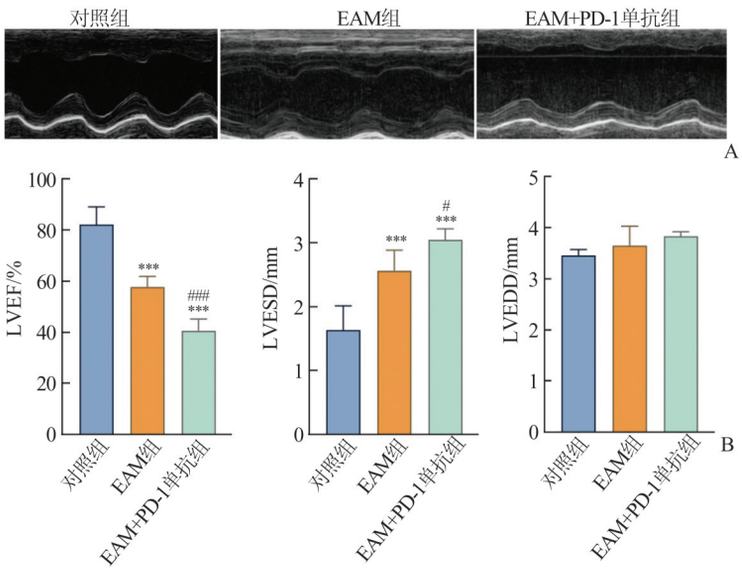


图3　各组小鼠超声心动图检测结果

A. 各组小鼠左心室M型超声心动图代表性图像；B. 各组小鼠LVEF、LVESD、LVEDD变化。LVEF：左心室射血分数；LVESD：左心室收缩末期内径，LVEDD：左心室舒张末期内径。与对照组相比，$^{***}P<0.001$；与EAM组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#\#}P<0.001$

2.3　左室心肌病理学改变　小鼠左室心肌HE染色后观察发现，对照组小鼠左室心肌细胞排列整齐、组织致密；EAM组可见心外膜下少量炎症细胞浸润，细胞形态结构尚完整；EAM+PD-1单抗组小鼠与EAM组相比左室心肌炎症更加明显，心肌炎症评分显著增加（1.167 *vs* 2.000，$P<0.05$），左心室心外膜下及各处心肌均见坏死、间质水肿形成、大量炎症细胞浸润及细胞边界不清（见图4）。

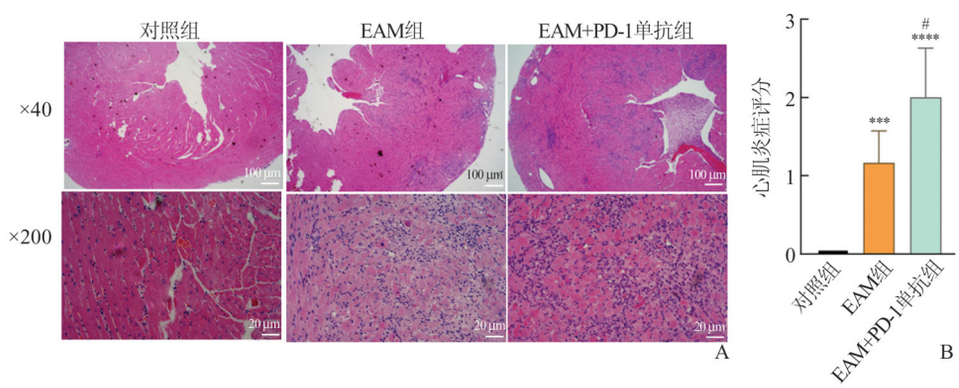


图4　联合应用小鼠重链肌球蛋白及PD-1单抗可加重小鼠心脏炎症浸润

A. 小鼠代表性心肌HE染色照片（40倍镜，标尺：100 μm；200倍镜，标尺：20 μm）；B. 各组小鼠心脏病理炎症评分，与对照组相比，$^{***}P<0.001$，$^{****}P<0.000\,1$；与EAM组相比，$^{\#}P<0.05$

2.4　左室心肌免疫组化　通过免疫组化观察各组小鼠心肌炎性细胞的浸润程度。结果显示对照组无明显炎性细胞浸润；与对照组相比，EAM组小鼠出现不同程度的巨噬细胞、中性粒细胞、$CD3^+$ T细胞、$CD4^+$ T细胞、$CD8^+$ T细胞浸润，而EAM+PD-1单抗组小鼠左室心肌上述炎性细胞浸润较另外两组均明显增多，且$CD8^+$ T细胞浸润增多明显（均$P<0.05$），炎细胞浸润多集中在靠近心外膜部位的心肌（见图5）。

2.5　左室心肌Masson染色结果　对照组小鼠左室心肌仅有少量胶原纤维，而EAM组较对照组小鼠左室心肌间质胶原纤维明显增多，胶原容积分数升高（9.114% *vs* 0.670 7%，$P<0.05$），且EAM+PD-1单抗组较EAM组小鼠左室心肌胶原纤维增多

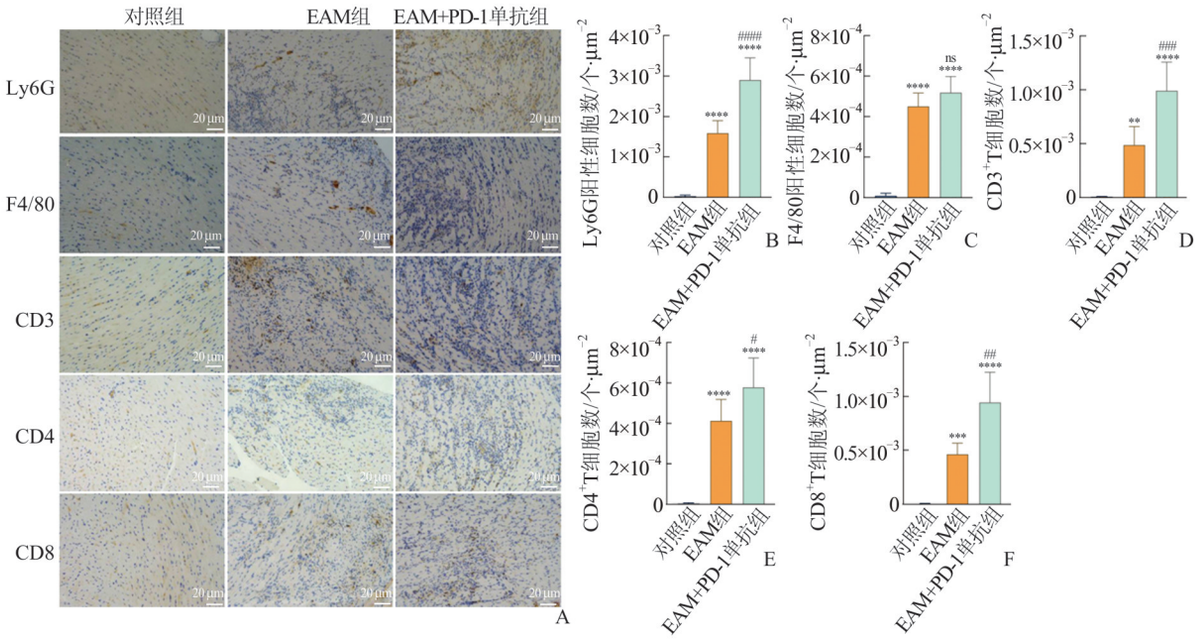


图5 联合应用小鼠重链肌球蛋白及PD-1单抗可加重小鼠心脏各种炎性细胞浸润

A. 心肌免疫组化染色显示各组小鼠不同抗体表达的照片(×200,标尺:20 μm);B. 各组心脏切片单位面积下Ly6G阳性细胞数量;C. 各组心脏切片单位面积下F4/80阳性细胞数量;D. 各组心脏切片单位面积下$CD3^+$ T细胞数量;E. 各组心脏切片单位面积下$CD4^+$ T细胞数量;F. 各组心脏切片单位面积下$CD8^+$ T细胞数量,与对照组相比,$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$,$^{****}P<0.0001$;与EAM组相比,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$,$^{\#\#\#}P<0.001$,$^{\#\#\#\#}P<0.0001$

更为显著,胶原容积分数明显升高(21.21% *vs* 9.114%,$P<0.001$),结果如图6所示。

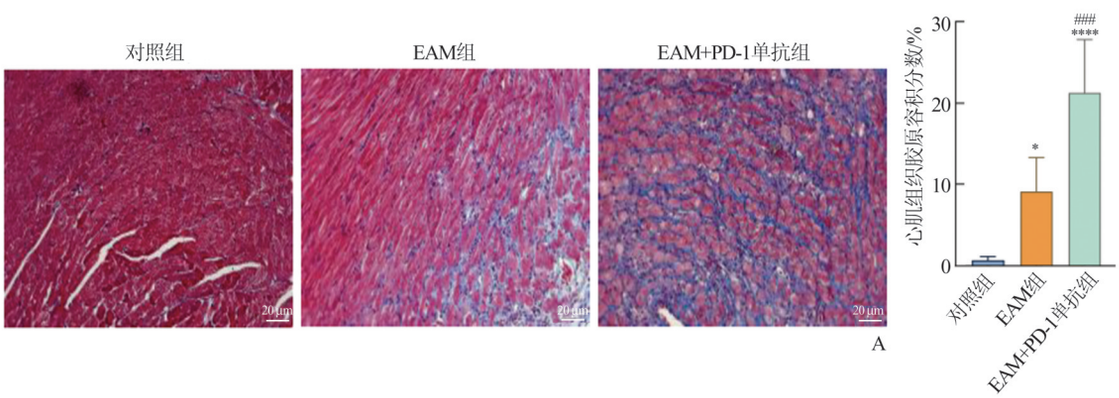


图6 联合应用小鼠重链肌球蛋白及PD-1单抗可加重小鼠心肌纤维化

A. 小鼠代表性Masson染色(×200,标尺:20 μm);B. 各组小鼠心肌组织胶原容积分数;与对照组相比,$^{*}P<0.05$,$^{****}P<0.0001$;与EAM组相比,$^{\#\#\#}P<0.001$

2.6 外周血中心肌损伤标志物、炎性细胞因子的表达水平变化 ELISA检测结果显示,与对照组相比,EAM组小鼠外周血中cTnI升高(11.49 pg·mL^{-1} *vs* 25.66 pg·mL^{-1},$P<0.05$),且与EAM组相比EAM+PD-1单抗组小鼠外周血中cTnI升高更为显著(25.66 pg·mL^{-1} *vs* 42.27 pg·mL^{-1},$P<0.05$),表明PD-1单抗明显加重了EAM组小鼠心肌的损伤;与对照组相比,EAM组小鼠外周血中炎性细胞因子TNF-α(17.25 pg·mL^{-1} *vs* 29.02 pg·mL^{-1},$P<0.01$)和IFN-γ(6.695 pg·mL^{-1} *vs* 15.27 pg·mL^{-1},$P<0.01$)升高,且与EAM组小鼠相比EAM+PD-1单抗组小鼠外周血中TNF-α(29.02 pg·mL^{-1} *vs* 37.77 pg·mL^{-1},$P<0.05$)和IFN-γ(15.27 pg·mL^{-1} *vs* 24.29 pg·mL^{-1},$P<0.01$)均进一步升高(图7),表明PD-1单抗明显加重EAM组小鼠的炎症反应。

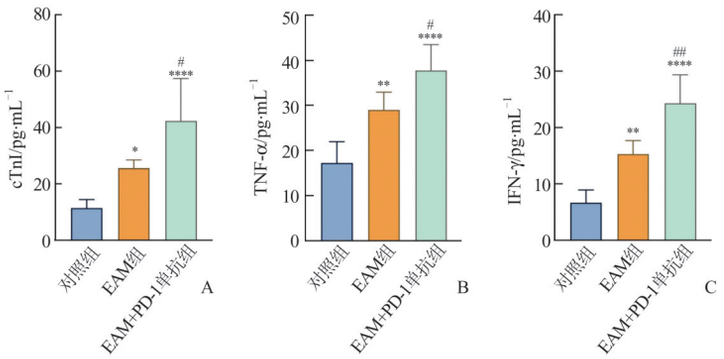


图 7　联合应用小鼠重链肌球蛋白及 PD-1 单抗可更易引起心肌组织损伤及炎症因子表达增加

A～C. 分别为各组 cTnI、TNF-α、INF-γ 水平的比较；与对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{****}P<0.000\ 1$；与 EAM 组相比，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

3　讨论

本研究运用小鼠重链肌球蛋白（Myhc-α）免疫成功建立自身免疫性心肌炎小鼠模型，EAM 组小鼠心肌出现炎性细胞浸润、心肌纤维化增多及心功能下降，而给予 PD-1 单抗后明显加重了 EAM 组心肌炎小鼠的左室心肌炎性细胞浸润程度、心肌损伤、心肌纤维化及心肌重构，且左室收缩功能明显下降。

研究[6]表明，PD-1 单抗可明显加重病毒性心肌炎小鼠心肌炎性细胞浸润及心肌损伤，PD-1 激动剂则可减轻心肌炎炎症反应及心肌损伤。BALB/c 小鼠 PD-1 基因敲除可明显加重肌球蛋白诱导的 $CD4^+$ T 淋巴细胞浸润为特征的 EAM 的易感性，明显增加了 $CD4^+$ T 淋巴细胞中 Th17 亚群、$CD8^+$ T 淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞浸润程度、心肌炎症反应及心肌损伤[4]。本研究也发现，小鼠 Myhc-α 两次免疫后再给予 PD-1 单抗，HE 染色显示心肌炎性细胞浸润明显增多，免疫组化染色半定量检测显示，心肌中大量 $CD3^+$ T 淋巴细胞、$CD4^+$ T 淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞浸润明显增加，可分泌大量的炎性细胞因子如 IL-1β、IL-6、IL-17、TNF-α 等及炎性趋化细胞因子如 CXCL9、CXCL10 等，尤其是 $CD8^+$ T 淋巴细胞亦明显增加，可分泌 IFN-γ、颗粒酶 B、穿孔素等造成心肌损伤，炎性细胞浸润情况与很多 ICI 相关心肌炎研究[8-9]结论一致。有研究表明用 TNF-α 单抗[3]或通过阻断 IFN-γ 通路[9]可明显降低 ICI 心肌炎发生发展，提示 TNF-α 及 IFN-γ 参与了 ICI 心肌炎发生发展。本研究也发现 PD-1 单抗可明显增加 EAM 组小鼠外周血中 TNF-α 和 IFN-γ 水平，明显增加了心肌损伤标记物水平，提示显著的心肌炎症反应增加了心肌损伤。

而在另一研究[7]发现肌球蛋白和 PD-1 单抗给药顺序不同对 BALB/c 小鼠自身免疫性心肌炎影响不同，先给予肌球蛋白免疫 2 周后再给予 PD-1 单抗可明显加重心肌炎症，但是该研究结果显示 EAM 及联合 PD-1 单抗干预均对心功能无明显影响，也没有研究心肌纤维化等重构指标，而同时给予肌球蛋白和 PD-1 单抗并未加重心肌炎。上述研究均未进一步探讨 PD-1 对自身免疫性心肌炎心肌纤维化和心肌重构中的影响。本研究先给予小鼠 Myhc-α 两次免疫再给予 PD-1 单抗反复注射，发现 PD-1 单抗除明显加重 EAM 小鼠心肌炎性细胞浸润及炎症反应以外，心脏彩超提示 LVEF 明显降低，LVESD 增大，表明心脏收缩功能明显下降。另外发现 PD-1 单抗明显加重了 EAM 组小鼠心肌纤维化，可能与巨噬细胞等炎性细胞与心脏成纤维细胞互作及活化有关，该机制需要进一步研究。

有研究[10-11]表明 ICI 心肌炎模型存在心脏特异性蛋白 α-肌球蛋白 $CD8^+$ T 细胞显著克隆扩增，提示心脏 α-肌球蛋白为 ICI 介导的心肌炎的候选心脏自身抗原，ICI 阻断了心肌自身抗原对淋巴细胞的外周免疫耐受机制，从而诱发自身免疫性淋巴细胞性心肌炎。基于此，本课题组选择 BALB/c 雄性小鼠为实验对象，在给予 2 次小鼠 Myhc-α 免疫的基础上，再多次给予 PD-1 单抗腹腔注射，模型组中各小鼠均出现明显的疲劳、进食及活动减少、体质量增加明显减少等现象，心脏水肿、体积增大、色泽灰暗，脾脏明显增大。结果显示出左室心肌 $CD8^+$ T 细胞、$CD4^+$ T 细胞、巨噬细胞等大量炎性细胞浸润、炎性细胞因子表达增加、心肌坏死标记物明显升高、心肌纤维化及心功能明显下降等 ICI 相关心肌炎表现，成功建立了 ICI 相关心肌炎小鼠模型；该模型具有死亡率低、成功率高、表型稳定且均质化较好，可作为研究 ICI 相关心肌炎尤其是 PD-1 相关心肌炎较为理想的动物模型。

（下转第 728 页）