

· 基础研究 ·

小鼠病毒性心肌炎中 Fas/FasL 异常表达的研究

张彬 朱健华 姚登福 宋建平

【摘要】 目的 探讨柯萨奇病毒 B₃ (CVB₃) 所致小鼠病毒性心肌炎 (VM) 心肌细胞损伤的变化, 观察 Fas/FasL 介导的细胞凋亡在心肌损伤中的作用。方法 采用 CVB₃ 制备小鼠病毒性心肌炎动物模型, 心肌组织切片 HE 染色了解心肌损伤情况; 电镜检测观察心肌组织中的细胞凋亡; 同时采用免疫组化、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 两种方法检测心肌炎小鼠不同时期心肌组织中 Fas 与 FasL 基因转录与蛋白的表达。结果 光镜观察见对照组小鼠心肌组织无异常改变, 实验组病鼠可见心肌细胞坏死和单核、淋巴细胞浸润, 后期可见纤维化; 电镜观察对照组心肌中未检出凋亡细胞, 而病鼠心肌凋亡细胞检出率较高 58.33% (7/12 例), 且细胞凋亡多存在于炎症病灶周围的心肌细胞及病灶处炎性浸润细胞; 感染后第 7~14 天的病鼠心肌组织中, 主要表达于心肌细胞的 Fas mRNA 及蛋白和主要表达于浸润淋巴细胞的 FasL mRNA 及蛋白均明显增强; FasL 蛋白表达水平与心肌病变积分呈正相关 ($r = 0.9082, P < 0.001$)。结论 小鼠病毒性心肌炎中心肌损伤坏死与心肌细胞凋亡共存, 通过 Fas/FasL 基因路径介导的心肌细胞凋亡与病毒性心肌炎的发病过程有关。

【关键词】 小鼠; 柯萨奇病毒 B 组; 心肌炎; T 淋巴细胞; 抗原, CD₃; 凋亡

Abnormal expression of Fas/FasL in murine acute myocarditis caused by Coxsackie virus B₃

ZHANG Bin, ZHU Jianhua, YAO Dengfu, et al

Affiliated Hospital, Nantong Medical College, Nantong 226001, China

【Abstract】 Objective To examine myocardial cell death in murine acute myocarditis caused by Coxsackie virus B₃ (CVB₃) and whether the Fas/Fas ligand (FasL) system plays a role in myocardial damage (especially in the myocyte apoptosis) and the development of VM. Methods One hundred and thirty BALB/c mice were included in the experiment. Fifteen mice in experimental group inoculated with CVB₃ and five mice in control group injected with Eagle's minimum essential medium (MEM) were sacrificed 5, 7, 10, 14, 21, 28 days post-inoculation (p. i.). Light microscopy and electronmicroscopy were used to examine the inflammation, necrosis and apoptosis in myocardium. The expression of Fas and FasL protein in myocardium was determined by immunohistochemistry. Fas mRNA and FasL mRNA were analyzed by polymerase chain reaction (RT-PCR). Results (1) The myocardial lesions were observed on the 5th day p. i., became much more obvious on the 7th to 14th day, and recovered gradually from the 21th to 28th day p. i.. The mice in control group did not show any sign of inflammation. (2) Apoptosis of myocytes was seen in seven of twelve myocarditis mice under electronmicroscopy. Apoptotic cells including myocytes (around the nucleus) and infiltrating lymphocytes were detected in the myocardium of myocarditis mice by electronmicroscopy, but apoptotic cells were not observed in the mice of control group. (3) In experimental group, Fas protein expressed mainly in myocytes and FasL protein expressed mainly in infiltrating lymphocytes and increased remarkably from 7th to 14th days as compared with control group ($P < 0.001$). The dynamic changes of FasL protein expression showed a significant positive correlation with the changes of myocardial histopathologic scores ($r = 0.9082, P < 0.001$). Fas mRNA in experimental group increased remarkably from 7th to 14th days p. i. as compared with control group ($P < 0.001$). Conclusion These findings suggest that cell death via necrosis and apoptosis at the same time exists in murine acute myocarditis caused by CVB₃. Apoptosis of cardiomyocytes and lymphocytes is one of the mechanisms of myocardial injury in VM, and myocardium damage mediated by the cytotoxic T lymphocytes through Fas/FasL pathway might play an important role in the development of VM.

【Key words】 mice; Coxsackie virus B; myocarditis; T lymphocyte; antigens, CD₃; apoptosis

过去一直经典地认为心肌细胞属终末分化的细胞, 它们的死亡都被认为是坏死, 然而近年来已有许

收稿日期: 2003-06-23

作者单位: 226001 南通市, 南通医学院附属医院 (张彬、朱健华、姚登福); 215006 苏州市, 苏州大学第一附属医院心内科 (宋建平)

作者简介: 张彬, 男, 1969 年 5 月生, 江苏省如皋市人, 医学硕士, 主治医师。Tel: 0513-5052599

多关于心脏疾病中存在着心肌细胞凋亡的报道, Fas/FasL 系统则是这些研究中最有意义的发现, 其与凋亡在心肌细胞损伤中的作用越来越受到人们的关注。至于心肌细胞损伤尤其是细胞凋亡, 在 VM 的病程、病变程度及其与 Fas/FasL 表达的关系如何, 少有报道。本研究采用免疫组化、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)两种方法检测心肌炎小鼠不同时期心肌组织中 Fas 与 FasL 基因转录与蛋白的表达, 探讨 Fas/FasL 系统与 VM 小鼠心肌损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 VM 模型制作和标本的留取 随机将购自复旦大学动物实验中心 6 ~ 8 周龄, 雄性, 清洁级 BALB/c 小鼠分成 2 组: 实验组 90 只, 每只腹腔接种 0.1 ml 由上海复旦大学附属中山医院病毒所提供的 CVB₃ 病毒液。对照组 40 只, 腹腔注射等量用于稀释 CVB₃ 的 Eagle's MEM 液。对照组于腹腔注射后第 0、5、7、10、14、21、28 天随机取小鼠 5 只, 实验组于接种 CVB₃ 后相同时点随机取小鼠 10 只, 摘眼球留取外周血, 然后断脊处死, 取其心脏留取心肌标本: 心肌组织半数冻存于 -70℃ 冰箱, 待做 RT-PCR; 半数用 4% 甲醛固定, 待做 HE 染色、免疫组化; 每批取对照组和病鼠各 2 只的心尖部心肌少许用 4% 戊二醛固定, 待做电镜检测。

1.2 病理学检查 常规 HE 染色, 光镜下观察心肌病理变化, 并计算心肌病变积分。即每张切片取 5 个视野, 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的面积之比。无病变计 0 分, < 25% 计 1 分, 25% ~ 50% 计 2 分, 50% ~ 75% 计 3 分, > 75% 计 4 分。

1.3 透射电镜观察 将留取之心肌标本加入 10 ml 预冷的 4% 戊二醛固定液, 4℃ 条件下固定; 后送电镜室制片、染色, 透射电镜下观察细胞超微结构的形态学变化。

1.4 免疫组化检测 Fas、FasL 抗原 应用购自武汉博上德生物工程有限公司免抗大鼠多克隆抗体 Fas、FasL 及 SABC 复合物, 按说明书 SABC(热修复)法进行免疫组化检测, DAB 染色, 以 PBS 取代一抗和二抗作空白对照, 光镜下观察结果。阳性结果判断: 以病变部位细胞上出现棕黄色颗粒为阳性表达。阳性强度判断: 每个切片取 5 个高倍镜视野, 测量心肌组织中阳性染色面积与整个视野的百分比, 无显色计 0 分, 显色面积 < 25% 计 1 分, 显色面积 25% ~ 50% 计 2 分, 显色面积 > 50% 计 3 分。

1.5 分子生物学观察 TRIzol 总 RNA 提取液、RT-PCR 试剂盒购自 Life Technologies 公司。采用 TRIzol 一步法提取总 RNA, 按 RT-PCR 试剂盒说明书之步骤进行逆转录及 PCR。引物序列: Fas 5'-GACCAGAATAC-CAAGTGA-3'; 5'-TCTGTTCCTGTGTCTTGG-3'; FasL: 5'-ATGGTCTCTGCTGGCTCTGCT-3', 5'-GTTEAGGGGCTG-GTTGTTCG-3'; 内参照基因 β -actin: 5'-TGGAACTCTGTG-GCATCCATGAA-3', 5'-TAAACGCAGCTCACTAACAGTCC-G-3'; 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。可分别扩增 436 bp 的 Fas cDNA、360 bp 的 FasL cDNA 及 349 bp 的 β -actin cDNA 序列。扩增条件为 Fas: 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 循环 30 次; FasL: 退火温度 57℃, 余条件同前。以 MBI Fermentas 的 PUC 19 DNA/MspI Maker 作为标准分子量参照进行产物鉴定, 在 0.5 × TBE 电泳缓冲液中电压为 80 V 电泳 1 h, 紫外透射灯下观察结果; FasL PCR 产物紫外透射灯下作定性观察; 另用上海四星图像分析仪, 测定 PCR 产物电泳条带的密度积分, 计算 Fas 产物的相对量。计算公式: Fas 相对量 = Fas 产物电泳条带密度/ β -actin 电泳条带密度 × 100%。

1.6 统计学分析 资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 STATA 7.0 统计软件进行处理, 组间比较采用方差分析, 方差分析后的两两比较采用 Bonferroni 法; FasL 与病变积分间的相关关系应用直线相关分析; Fas mRNA 的表达随时间的变化趋势应用曲线回归分析。

2 结果

2.1 心脏大体标本 小鼠感染 CVB₃ 后第 7 ~ 14 天心脏大体解剖可见心外膜下心肌出现白色点状、块状或条索状病变, 右房为著; 随着时间的推移, 这种病变出现率逐渐减低, 但仍有个别很严重。

2.2 组织细胞形态学观察 (1) 光学显微镜: 对照组各时点留取的心肌标本, HE 染色后光镜下观察均未见心肌细胞坏死及炎性细胞浸润, 病变积分均为 0。实验组小鼠感染 CVB₃ 病毒后第 5 天即有心肌损伤改变, 但间质一般无炎性细胞浸润; 感染后第 7 天, 心肌细胞见明显的坏死、周围出现炎性细胞浸润(主要是单核细胞和淋巴细胞); 感染第 10、14 天时小鼠的心肌病变达到高峰; 感染后第 21 天部分炎性病灶开始吸收, 偶见旧、新病灶交替出现, 纤维细胞开始增生; 第 28 天多数病灶吸收, 大部分小鼠心肌内炎性细胞浸润减少, 可见心肌纤维排列紊乱、疏松、纤维化。病鼠各时点心肌病变积分详见表 1。(2) 电镜: 对照组小鼠心肌电镜检查未见异常(图 1)。病鼠心肌

表 1 Fas、FasL 蛋白在 CVB₃ VM 小鼠心肌标本中不同时期的表达 (n = 5; $\bar{x} \pm s$)

组 别	病理病变积分	Fas	FasL
对照组	0	0.4 ± 0.1	0
实验组			
第 5 天	0.5 ± 0.2 ^{▲▲▲}	0.7 ± 0.2 ^{▲▲▲}	0.7 ± 0.2 ^{▲▲▲}
第 7 天	2.1 ± 0.3 ^{▲▲▲}	1.6 ± 0.4 [*]	1.4 ± 0.2
第 10 天	3.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2 [*]	1.8 ± 0.3
第 14 天	2.8 ± 0.1	1.7 ± 0.2 [*]	1.6 ± 0.3
第 21 天	2.0 ± 0.2 ^{▲▲▲}	1.4 ± 0.2 ^{*^}	1.2 ± 0.4 [^]
第 28 天	1.6 ± 0.2 ^{▲▲▲}	0.8 ± 0.2 ^{▲▲▲}	1.0 ± 0.3 ^{▲▲}
F 值	92.02	30.30	12.51
P 值	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

注:与对照组相比, * P < 0.001; 实验组与第 10 天峰值比较, ▲ P < 0.05, ▲▲ P < 0.01, ▲▲▲ P < 0.001

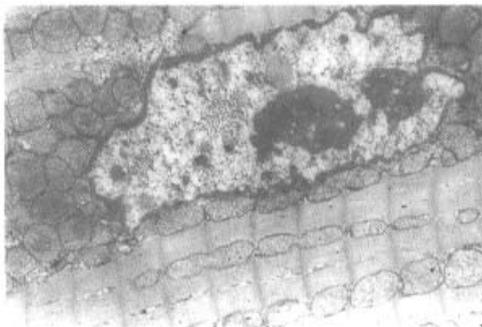


图 1 未接种 CVB₃ 之对照组小鼠心肌超微结构(电镜, 5 × 1000)

标本中凋亡心肌细胞检出率较高(7/12 例), 见图 2, 且细胞凋亡多存在于炎症病灶周围的心肌细胞及病灶处炎性浸润细胞, 还可见于血管内皮细胞及间质细胞; 各期病鼠心肌中均存在心肌细胞凋亡, 肌原纤维不连贯, 特别是 I 带细丝消失明显, 线粒体不完整, 嵴结构不清楚、断裂、严重空泡样变, 细胞核异形态、染色质浓缩边聚、凋亡小体形成; 感染 7 ~ 14 d 超微结构改变最明显; 至感染 28 d 鼠, 心肌细胞病变仍明显, 心肌细胞中央有肌原纤维死后残体, 周围肌原纤维改变较轻, 线粒体仍有上述改变, 但程度有所改善。

2.3 免疫组化检测 Fas 及 FasL 抗原表达结果 实验组中, Fas 蛋白阳性染色细胞多为分布于炎症灶周围的心肌细胞、少量浸润细胞, FasL 阳性染色细胞主要为病灶内的浸润细胞及周围的心肌细胞。由表 1 可见, Fas 和 FasL 蛋白表达均于第 7 天明显增

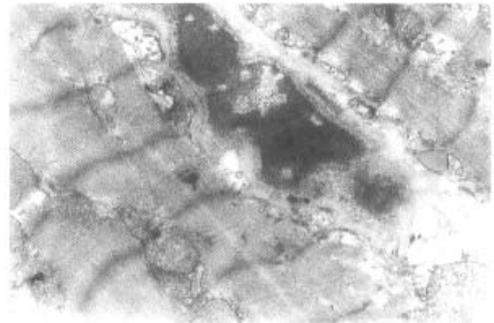


图 2 接种 CVB₃ 后 7 d 病鼠心肌超微结构(电镜, 6 × 1000)

加, 第 10 ~ 14 天达高峰(图 3), 第 21 ~ 28 天下降。而且 FasL 蛋白表达水平与病变积分关系呈正相关 ($r = 0.9082, P < 0.001$)。

2.4 RT-PCR 检测 Fas mRNA、FasL mRNA 在 CVB₃ 心肌炎小鼠心肌中的表达 由表 2 可见, CVB₃ 心肌炎小鼠 Fas mRNA 第 5 天即明显升高, 第 10 ~ 14 天达高峰, 第 21 天开始逐渐下降。定性 RT-PCR 显示, 实验组小鼠心肌组织中 FasL mRNA 检出率为 76.67% (23/30), 而正常对照组未检出(0/5)。

表 2 Fas mRNA 在 VM 小鼠心肌组织各期的改变 (n = 5; $\bar{x} \pm s, \%$)

组 别	Fas/ β -action
对照组	11.80 ± 8.20
实验组	
第 5 天	29.00 ± 9.62
第 7 天	33.80 ± 7.46 [*]
第 10 天	40.80 ± 11.32 ^{**}
第 14 天	36.00 ± 10.15 [*]
第 21 天	25.60 ± 6.31
第 28 天	20.80 ± 13.88
F 值	8.53
P 值	0.036

注:与对照组相比, * P < 0.05, ** P < 0.01

3 讨论

3.1 病毒性心肌炎中心肌细胞损伤 过去一直经典地认为心肌细胞属终末分化的细胞, 它们的死亡都被认为是坏死。然而自从凋亡被描述为不同于坏死的过程, 近年来已有许多关于心脏疾病中存在着心肌细胞凋亡的报道¹⁻³, 这些研究最终使人们改变了心肌

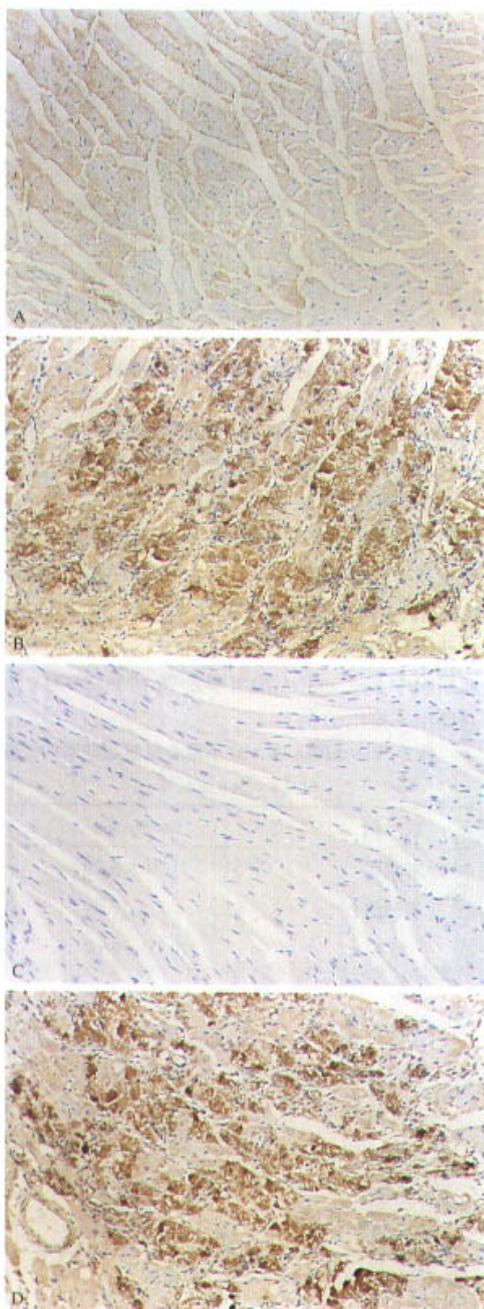


图 3 免疫组化结果(DAB 染色, 20×2.5)

A. 未接种 CVB₃ 之对照组小鼠心肌中 Fas 蛋白的表达; B. 接种 CVB₃ 10 d 时病鼠心肌中 Fas 蛋白的表达; C. 未接种 CVB₃ 对照组小鼠心肌中无 FasL 蛋白的表达; D. 接种 CVB₃ 10 d 时病鼠心肌中 FasL 蛋白的表达

损伤即细胞坏死这种观点。1994 年 Kawano 等¹² 首先报道心肌炎患者心肌标本中存在许多凋亡的心肌细胞, 结果提示凋亡可能是心肌炎心肌损害的机制之一;

Debiasi 等¹⁴ 也发现 VM 心肌损伤与心肌细胞凋亡有关, 阻断凋亡的信号转导途径可能治疗心肌炎有效。有研究发现 VM 模型上凋亡细胞的分布区域不尽相同, 尽管可检出 CVB₃, 但凋亡细胞检出率亦不同。这些可能是所用实验动物品系不同的缘故。

电镜超微结构的观察是诊断细胞凋亡最可靠的指标。本实验中我们用电镜观察实验性 VM 的心肌细胞凋亡, 结果发现电镜检测对照组未见心肌细胞凋亡, 而实验组小鼠心肌病灶周围的心肌细胞和病灶内的浸润炎性细胞均可见核染色质明显固缩、边集及凋亡小体, 电镜结果亦支持心肌细胞凋亡的存在。但本实验未能直接揭示两者间谁占主要地位, 如上所述这方面文献报道亦有争议。

3.2 Fas/FasL 介导的细胞毒作用在病毒性心肌炎发病中的作用 Fas/FasL 系统是近年来细胞凋亡研究中最有意义的发现, 其与凋亡在心肌细胞损伤中的作用越来越受到人们的关注。当激活的细胞毒 T 淋巴细胞 (CTL) 经 Fas/FasL 与靶细胞结合时, 便可将凋亡信号转入后者, 从而使靶细胞在数小时内发生凋亡。有研究已证实 CVB₃ 心肌炎小鼠心肌中浸润的单核细胞可表达 FasL。Huber¹⁵ 发现病毒感染可诱导培养心肌细胞及活体心肌细胞 Fas 分子表达上调, 提示 Fas/FasL 介导的细胞毒作用可能与 CTL 损伤心肌有关。在 VM 发病过程中, Fas/FasL 可能涉及两方面的作用: 激活的 CTL 一方面可杀伤病毒感染的心肌细胞以终止病毒感染; 另一方面, CTL 通过 Fas/FasL 诱导其自身凋亡, 控制其介导的细胞毒作用而不至于对心肌造成持续损害。有研究发现 CVB₃ 心肌炎小鼠心肌浸润细胞的 FasL 水平和心肌病变程度呈正相关性, 表明 Fas/ FasL 的作用可能在于调控心肌损伤。因此, 可以想像, 一旦 Fas/ FasL 的调节作用失常, 将导致 CTL 对心肌组织产生严重而持续的损伤。

本研究的结果显示, 电镜检查对照组 2 例未见凋亡, 而各期病鼠可见凋亡之心肌细胞及炎性浸润细胞 (7/12); 切片免疫组化显示, 多数浸润细胞表达 FasL 蛋白, 病灶周围心肌组织及部分浸润细胞可见 Fas 蛋白表达, RT-PCR 亦提示心肌组织中 Fas mRNA 表达上调, 与对照组相比 7~14 d 明显增高, FasL 蛋白表达水平与病变积分关系呈正相关。因此可以推断 VM 病鼠心肌组织中存在 Fas/ FasL 介导的细胞凋亡, 它与心肌细胞坏死共同参与了病毒性心肌炎的发病过程。

参考文献

- 1 张旭晨. 心血管疾病与细胞凋亡. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1998, 18:335-337.
- 2 Kawano H, Okada R, Kauano Y, et al. Apoptosis in acute and chronic myocarditis. Jpn Heart J, 1994, 35: 745-750.
- 3 Huber SA. Coxsackievirus-induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice. Lab Invest, 1997, 76: 691-701.
- 4 Debiase RL, Edelstein CL, Sherry B, et al. Calpain inhibition protects against virus-induced myocardial injury. J Virol, 2001, 75: 351-361.
- 5 Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induce apoptosis in cardiac myocytes. Cardiovasc Res, 2000, 45:579-587.

· 经验交流 ·

介入治疗对老年心肌梗死合并心源性休克患者死亡率的影响

安丽萍 安闯玲 伍海安 陈国俊

回顾分析 1992~1996 年与 1997~2001 年之间急性心肌梗死合并心源性休克的老年患者住院病死率,旨在探讨早期血管成形术对急性心肌梗死合并心源性休克的老年患者住院病死率的影响。

1 临床资料

此研究包括 156 名(年龄 ≥ 65 岁)符合急性心肌梗死合并心源性休克的老年患者,其中 70 名为 1992~1996 年之间住院患者,86 名为 1997~2001 年之间患者。分别记录两组患者的年龄、性别、临床疾患(高血压、糖尿病、心绞痛、脑卒中、心衰、梗死位置)及治疗特点。

利用 χ^2 检验比较两组患者年龄、临床疾患及治疗特点,短期预后用住院病死率表示,对于可能影响住院病死率的潜在混淆因素用 Logistic 回归分析,比较两组死亡率用 χ^2 检验。

2 结果

1997~2001 年之间有 80 例在主动脉内气囊反搏术(intra-aortic balloon counter pulsation, IABCP)基础上行介入治疗,治疗前冠状动脉造影显示 TIMI 血流为 0~I 级,其中 54 例行支架植入术,26 例行单纯球囊扩张术。介入治疗后 TIMI 血流 III 级,成功率为 88%。另外有 3 例仅用 IABCP 治疗,其中 2 例撤掉 IABCP 后即死亡,仅有 1 例生存。使用介入治疗后老年心梗合并心源性休克患者住院死亡率明显下降。在 >65 岁组,死亡率从 1992~1996 年的 79% 下降到 1997~2001 年的 65%;在 >75 岁组死亡率从 86% 下降至 74%;当用 Logistic 回归分析校正年龄、临床特点对死亡率的影响后,1997~2001 年之间住院死亡率仍然明显下降,从 79% 下降至 46%。尽管两组患者有一部分行溶栓治疗,但溶栓再通率较低,溶栓后的死亡率仍高达 72%。在 1997~2001 年组有 6 例

未行介入治疗,除 1 例行 IABCP 后生存外,其余均死亡,死亡率为 83%,明显高于介入治疗组。

由此可见,由于 1997~2001 年组患者早期使用了血管成形术,从而使死亡率明显地下降。

3 讨论

GUSTO-I 和 GUSTO-III 研究表明,早期血管重建、年龄低及男性患者是休克患者住院生存率的独立预测因素^[1-3]。PTCA 后梗死相关血管重建率为 78%~94%,比静脉溶栓血管再通率高。心源性休克的患者不用介入性方法治疗,死亡率 $>80%$,梗死相关血管的紧急开放可以挽救患者的生命。急诊 PTCA 治疗急性心肌梗死合并心源性休克的预后主要受泵衰竭时间的影响,刚发病和严重泵衰竭几个小时的患者预后明显不同^[4]。由于心源性休克的预后极差,故应尽早考虑对患者行血管再通术,以挽救患者生命。

参考文献

- 1 Holmes DR Jr, Bates ER, Kleiman NS, et al. Contemporary reperfusion therapy for cardiogenic shock: the GUSTO-I trial experience. The GUSTO-I Investigators. J Am Coll Cardiol, 1995, 26:668-674.
- 2 Hasdai D, Holmes DR Jr, Califf RM, et al. Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: predictors of death. GUSTO Investigators. Am Heart J, 1999, 138 (1 Pt 1):21-31.
- 3 Berger PB, Holmes DR Jr, Stebbins AL, et al. Impact of an aggressive/invasive catheterization and revascularization strategy on mortality in patients with cardiogenic shock in the Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries (GUSTO-I) trial. An observational study. Circulation, 1997, 96:122-127.
- 4 邵耕,主编.现代冠心病学.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1994.394-412.

收稿日期:2002-12-08

作者单位:150036 哈尔滨市,黑龙江省医院心血管内科

作者简介:安丽萍,女,1967 年 8 月生,吉林省扶余县人,在读医学博士,副主任医师。Tel:13936585265