

实验性病毒性心肌炎心肌 MHC II 类抗原的表达

成建定, 陈玉川, 孔德晖, 郭 薇, 刘水平

(中山医科大学法医病理学教研室, 广东 广州 510080)

摘 要: 【目的】研究病毒性心肌炎(VMC)心肌组织相容性抗原 II 类(MHC II 类抗原)的表达特点, 探索轻度、不典型 VMC 的法医病理学诊断方法。【方法】以 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 的 Coxsackie B₃ 病毒接种 Balb/c 小鼠, 诱导小鼠轻度 VMC。用免疫组化技术检测 VMC 小鼠心肌 MHC II 类抗原的表达。【结果】VMC 小鼠心肌组织内 MHC II 类抗原异常表达, 部分心肌细胞膜局灶性 MHC II 类抗原阳性。【结论】心肌 MHC II 类抗原的异常表达参与了轻度 VMC 的发病机制; 心肌 MHC II 类抗原-LSAB 染色可望成为诊断轻度、不典型 VMC 的免疫病理学指标。

关键词: 心肌炎; 组织相容性抗原 II 类/诊断应用; 病理学; 法医学

中图分类号: R542.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2001)06-0431-02

Expression of MHC II Antigen on Myocardium in Experimental Viral Myocarditis

CHENG Jian-ding, CHEN Yu-chuan, KONG De-hui, GUO Wei, LIU Shui-ping

(Department of Forensic Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of histocompatibility antigens class II (MHC II antigen) on myocardium in acute viral myocarditis (VMC) and study the diagnostic method for mild atypical VMC in the field of forensic pathology. 【Methods】Mild VMC model was induced in Balb/c mice by Coxsackie virus B₃. The hearts were studied LSAB-immunohistochemically with anti-MHC II antibody. 【Results】Aberrant expression of MHC II antigen was found in the myocardium of mice with VMC. Focal sarcolemmal staining for MHC II antigen was observed in some cardiomyocytes. 【Conclusion】Aberrant expression of MHC II antigen in myocardium is involved in the pathogenesis of acute mild VMC. MHC II antigen-LSAB immunohistochemical staining is expected to be an immunopathological index for diagnosing mild atypical VMC.

Key words: myocarditis; histocompatibility antigens class II/diagnostic use; pathology; forensic medicine

轻度、不典型病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)猝死的案例近年有增多趋势。然而,这类光镜下心肌细胞改变不明确,间质炎细胞浸润较少的组织学改变是否符合心肌炎的诊断,已引起广泛的争议,是临床病理心内膜心肌活检诊断和法医学猝死鉴定中亟待解决的难题之一^[1~3]。为探索较灵敏和特异的轻度、不典型 VMC 的法医病理学诊断方法,我们对实验性轻度 Coxsackie B₃ VMC 心肌组织内主要组织相容性复合物(major histocompatibility complexes, MHC) II 类抗原的表达规律进行

研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及试剂

Coxsackie B₃ 病毒株(TCID₅₀ 为 $10^{-8.5}$),由复旦大学卫生部病毒性心脏病重点实验室提供。4~5 周龄 Balb/c 小鼠,雌雄各半,由本校动物中心提供。小鼠抗小鼠 MHC Class-2(即 I-A^D)抗体(工作浓度 1:200),由 Immuno-tontact 公司生产。免疫

收稿日期: 2001-04-20

基金项目: 广东省自然科学基金(950301);“211 工程”重点学科建设课题

作者简介: 成建定(1973-),男,江西都昌县人,博士,讲师

组化超敏 LSAB 试剂盒(适用于一抗为小鼠源性抗体在小鼠组织上染色),由迈新公司生产。

1.2 心肌炎模型的建立

82 只鼠随机分为 2 组,实验组 70 只,每只腹腔内接种内含 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 的病毒稀释液 0.15 mL,对照组 12 只,每只腹腔内注射等量的原代人胚肾细胞裂解、离心上清液。感染后 3~15 d 内,小鼠自然死亡或经处死后,取心脏沿心室中段横切,常规固定、脱水、石蜡包埋后连续切片(厚 5 μ m)。对照组于饲养 10~15 d 后作上述处理。

1.3 常规显微镜观察

对以上石蜡切片进行 HE 染色,光镜观察心肌病变。

1.4 免疫组化染色

随机取感染后 4~15 d 内经处死小鼠 24 例心肌石蜡切片作 MHC II 类分子 LSAB 免疫组化染色。对照组 12 例作同样处理。按文献报道的方法^[4],对 MHC II 类抗原在心肌组织内表达的强度进行半定量记分(MHC II antigen staining score, MS):血管内皮弱阳性,0~1 分;血管内皮阳性较强,2 分;血管内皮强阳性,心肌膜局灶性阳性,3 分;血管内皮强阳性,弥漫性、多灶性心肌膜阳性,4 分。大于或等于 2 分判为阳性。

1.5 统计学处理

各实验组同对照组比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 常规显微镜观察

感染后第 4 天,心肌细胞出现局灶性颗粒变性;第 5 天,可见单个心肌细胞溶解;第 6 天,可见心肌细胞小灶性坏死,周围见单核、淋巴细胞浸润。病变于第 7~9 天达高峰,第 13 天后开始减轻。心肌内既可见心肌明显坏死的炎症坏死区,亦见少量炎细胞浸润而心肌变质不明显的炎细胞浸润区。依 Rezkalla 方法^[5],全部心肌病变积分均在 2 分以下,属轻度 VMC 改变。对照组心肌未见明显异常。按文献[1, 2]将急性期病程划分为 4 期:A1(早期,感染后 4~5 d),A2(发展期,感染后 6~7 d),A3(高峰期,感染后 8~12 d),A4[消退期,感染后(13~15) d]。

2.2 MHC II 类抗原免疫组化染色

对照组 12 例,心肌间质血管壁部分呈阳性/弱阳性,心肌细胞膜呈阴性(图 1)。本组 MHC II 类

抗原的表达强度半定量记分(MS)为 0.50 ± 0.80 。

实验组 24 例,18 例呈阳性反应。心肌组织炎细胞浸润区部分淋巴细胞、单核-巨噬细胞阳性,部分心肌细胞膜可见阳性;无炎细胞浸润区可见部分心肌细胞膜呈局灶性阳性(图 2)。间质血管壁呈阳性或强阳性。血管壁及心肌膜的阳性分布在心肌组织内呈散在均匀性,与是否邻近炎细胞浸润灶无相关。A1~A4 各组心肌 MS 分别为 1.60 ± 1.14 ($n=5$), 2.00 ± 1.00 ($n=5$), 2.63 ± 1.06 ($n=8$), 2.50 ± 1.05 ($n=6$)。各组 MS 同对照组比较, $P < 0.05$ 。C 组及 A1~A4 组阳性染色例数分别为 2, 3, 3, 7, 5。

3 讨论

3.1 小鼠轻度 VMC 心肌 MHC II 类抗原的表达特点

Herskowitz 等^[4](1990)运用放射免疫技术,首次证实心肌 MHC II 类抗原异常表达是活动性心肌炎的标记;此后, Hufnagel 等^[6, 7](1991, 1993)及 Wojnicz 等^[8](1998)亦有相似发现。但由于研究病例的病种、病程混杂,检材处理及检测方法迥异,对于 VMC 时,自身免疫炎症的定性标记—心肌膜 MHC II 类抗原阳性究竟存在与否,早期、轻度 VMC 心肌组织有否 MHC II 类抗原的异常表达,各家报道不一,缺乏系统的研究和实验依据。本研究发现:①病程早期, MHC II 类抗原即出现异常增高表达;各病程中,均有部分病鼠心肌膜 MHC II 类抗原阳性。②MHC II 类抗原在血管壁、心肌膜的异常表达在心肌中呈散在、均匀分布,有别于心肌炎的组织病理学分布特点(炎细胞浸润、心肌变质呈局灶性分布),这对于随机抽取检材检测有否免疫炎症具有重要意义。③实验组及对照组的阳性分别为 18/24, 2/12, 故 MHC II 类抗原的异常表达作为免疫炎症的标记,对指示心肌炎具有较好的敏感性(18/24)及特异性(18/20)。

3.2 MHC II 的免疫染色与不典型 VMC 的免疫病理学诊断

临床病理活体和法医学检案中,常遇到光镜下心肌变质不确切,炎细胞浸润较少的病例,出现这种心肌改变的可能情况有^[1~4, 9]:①早期心肌炎,病变尚未充分发展。②轻度心肌炎,病变形态不典型。③典型心肌炎,但病灶局限,取材处恰为病变

(下转第 442 页)

II和第VI外显子,占21%和10%^[9]。在其他国家亦不断有新突变的报道^[10],我们首次研究中国人IDUA突变,未检测到上述突变,提示中国人IDUA改变可能具有自己的特点。

(本文图2,3见插页1)

参考文献:

- [1] Peters C, Shapiro E G, Krivit W. Hurler syndrome: past, present and future [J]. J Pediatr, 1998, 133(1): 7.
- [2] 于洪枫. 粘多糖贮积症的分子遗传学进展 [J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(2): 86.
- [3] Scott H S, Bunge S, Gal A, et al. Molecular genetics of mucopolysaccharidosis type I; diagnosis, clinical and biological implications [J]. Hum Mutat, 1995, 6: 288.
- [4] Scott H S, Guo X H, Hopwood J J, et al. Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene [J]. Genomics, 1992, 13(4): 1311.
- [5] Lee-Chen G J, Lin S P, Tang Y F, et al. Mucopolysaccharidosis type I; characterization of novel muta-

tions affecting α -L-iduronidase activity [J]. Clin Genet, 1999, 56(1): 66.

- [6] Teng Y N, Wang T R, Hwu W L, et al. Identification and characterization of -3c-g acceptor splice site mutation in human α -L-iduronidase associated with mucopolysaccharidosis type IH/S [J]. Clin Genet, 2000, 57: 131.
- [7] Scott H S, Nelson P V, Litjens T, et al. Multiple polymorphisms within the α -L-iduronidase gene (IDUA); implications for a role in modification of MPS-I disease phenotype [J]. Hum Mol Genet, 1993, 2: 1471.
- [8] Scott H S, Litjens T, Hopwood J J, et al. A common mutation for mucopolysaccharidosis type I associated with a severe Hurler syndrome phenotype [J]. Hum Mutat, 1992, 1: 103.
- [9] Yamagishi A, Tomatus S, Fukuda S, et al. Mucopolysaccharidosis type one; identification of common mutations that cause Hurler and Scheie syndromes in Japanese populations [J]. Hum Mutat, 1996, 7: 23.

(编辑 张敏瑞)

(上接第432页)

轻微组织。④非心肌炎,正常人及某些暴力死亡者的心肌可有少量炎细胞浸润,与不典型心肌炎酷似。以上因素给轻度、不典型VMC的诊断带来了困难。本研究结果提示,利用MHC II类抗原在VMC心肌组织中的表达特点,有可能较为灵敏、准确地识别上述3类不典型心肌炎改变。Herskowitz等^[4]发现,心肌缺血及继发的炎细胞浸润性改变均不诱导心肌MHC II类抗原异常表达。因此,MHC II-LSAB染色对于轻度、不典型VMC的免疫病理学诊断可能具有较大的应用价值,我们将在人体标本上作进一步研究和验证。

(本文图1,2见插页4)

参考文献:

- [1] 成建定,陈玉川,胡丙杰,等.病毒性心肌炎猝死模型的建立 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(6): 421.
- [2] 成建定,陈玉川,胡丙杰,等.实验性病毒性心肌炎纤维连接蛋白的免疫组化研究 [J]. 中国法医学杂志, 2000, 15(4): 200.
- [3] 成建定,陈玉川,胡丙杰.病毒性心肌炎纤维连接蛋白的免疫组化初步研究 [J]. 法医学杂志, 1999, 15(1): 9.
- [4] Ahvie Herskowitz, Aftab A A, David A N, et al. Induction of major histocompatibility complex antigens within the myocardium of patients with active myocarditis; a non-

histologic marker of myocarditis [J]. J Am Coll Cardiol, 1990, 15(3): 624.

- [5] Rezkalla S, Kloner R A, Khatib G, et al. Beneficial effects of captopril in acute Coxsackie virus murine myocarditis [J]. Circulation, 1990, 81(3): 1039.
- [6] Hufnagel G, Maisch B. Expression of MHC class I and II antigens and the IL-2 receptor in rejection, myocarditis and dilated cardiomyopathy [J]. Eur Heart J, 1991, Suppl D: 137.
- [7] Hengstenberg C, Hufnagel G, Haverich A, et al. De novo expression of MHC class I and class II antigens on endomyocardial biopsies from patients with inflammatory heart disease and rejection following heart transplantation [J]. Eur Heart J, 1993, 14(6): 758.
- [8] Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wodniecki J, et al. Immunohistological diagnosis of myocarditis. Potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury [J]. Eur Heart J, 1998, 19(10): 1564.
- [9] Reinhard D, Marc S, Burkhard M. Immunohistochemical techniques improve the diagnosis of myocarditis in case of suspected sudden infant death syndrome (SIDS) [J]. Foren Sci Int, 1999, 105(1): 83.

(编辑 黄小延)

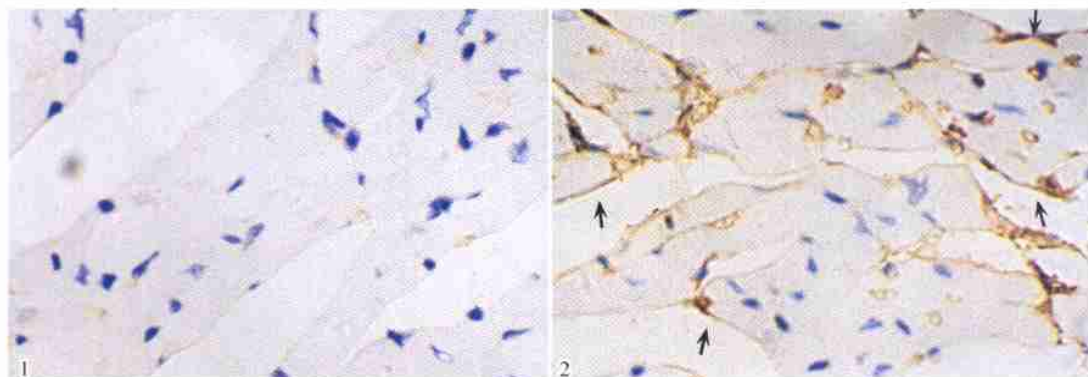


图 1 对照组心肌细胞 MHC II 类抗原阴性染色

图 2 心肌炎组部分心肌膜灶性 MHC II 类抗原阳性染色

Fig. 1 Negative staining for MHC II antigen on cardiomyocytes in the control group (LSAB × 400)

Fig. 2 Focal sarcolemmal staining for MHC II antigen on some cardiomyocytes in viral myocarditis (LSAB × 400)

(上接封 2)

(778.9 ± 109.4) $\mu\text{g/L}$ 。与治疗前比较无显著差异, $P > 0.05$ 。动态观察血清 sICAM-1 水平, 发现完全应答者血清 sICAM-1 在 12 周即达到最低, 此后维持在低水平; 部分应答者血清 sICAM-1 缓慢下降, 治疗结束时显著下降, 随访 24 周, 虽 sICAM-1 略有回升, 但与治疗结束时比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。无应答者 sICAM-1 维持在高水平(图 1)。

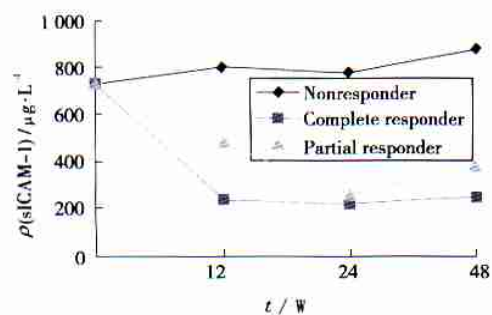


图 1 干扰素治疗对慢性肝炎患者血清 sICAM-1 的影响

Fig. 1 Effect of interferon treatment on serum sICAM-1 value in patients with CHB

W: weeks for t of interferon treatment

3 讨论

本结果显示, CHB 患者血清 sICAM-1 水平比正常对照明显升高; 慢性肝炎重度血清 sICAM-1 水平 > 慢性肝炎中度 > 慢性肝炎轻度; 且血清 sICAM-1 水平与血清 SB、ALT 呈显著正相关关系, 与国外研究结果一致^[3,4]。慢性乙型肝炎患者血清 sICAM-1 与肝组织炎症和肝细胞损害密切相关, 可作为反映肝脏炎症及肝细胞损害的参考指标。

本研究中 CHB 患者应用干扰素治疗后, 完全应答和部

分应答者血清 sICAM-1 水平均明显下降, 而无应答者血清 sICAM-1 无显著变化, 这与 Nouri-Aria 等^[5]报道的丙型肝炎病例相似。这可能与干扰素应答者肝细胞表达 ICAM-1 下调有关^[5]。我们发现, 干扰素治疗完全应答者、部分应答者及无应答者的血清 sICAM-1 曲线呈不同的模式。即完全应答者 sICAM-1 下降迅速并维持在低水平, 部分应答者血清 sICAM-1 呈缓慢下降, 无应答者血清 sICAM-1 下降不明显。因此, 在干扰素治疗期间, 动态观察血清 sICAM-1 的变化, 对预测干扰素治疗效果, 调整干扰素剂量和干扰素疗程可能具有实用价值。

参考文献:

- [1] Mochida S, Ohno A, Arai M, et al. Role of adhesion molecules in the development of massive hepatic necrosis in rats[J]. Hepatology, 1996, 23(2): 320.
- [2] Nouri-Aria K T, Koskinas J, Tibbs C J, et al. Serum intercellular adhesion molecule-1 levels in chronic hepatitis C: association with disease activity and response to interferon α [J]. Gut, 1995, 36(4): 599.
- [3] Horiike N, Onji M, Kumamoto I, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 in serum in chronic hepatitis B and C [J]. J Gastroenterol, 1994, 29(4): 455.
- [4] Zöhrens G, Armbrust T, Pirzer U, et al. Intercellular adhesion molecule-1 concentration in sera of patients with acute and chronic liver disease: relationship to disease activity and cirrhosis [J]. Hepatology, 1993, 18(4): 798.
- [5] García-Monzón C, García-Buey L, García-Sánchez A, et al. Down-regulation of intercellular adhesion molecule 1 on hepatocytes in viral chronic hepatitis treated with interferon alfa-2b[J]. Gastroenterology, 1993, 105(2): 462.

(编辑 黄小延)