

· 实验研究 ·

风心病患者淋巴细胞和血清对心脏 细胞毒性与临床类型的关系^①

张书刚^② 余步云

(中山医科大学附属第三医院内科,广州,510630)

提 要 对 27 例不同临床表现的风湿性心脏炎患者分别观察外周血淋巴细胞和血清对原代培养的人胚心肌细胞和心肌间质细胞的毒性作用。结果发现:1. 急性典型发作的风湿性心脏炎(包括初发和风湿性心瓣膜病伴急性典型风湿活动)患者外周血淋巴细胞和血清对心肌细胞和心肌间质细胞均有毒性作用;2. 慢性迁延而症状不典型的风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞对上述心肌细胞有毒性作用而血清则对上述细胞无或仅有轻微毒性作用;3. 静止期的风湿性心瓣膜病患者,无论外周血淋巴细胞和血清对上述心脏细胞均无毒性作用。

关键词 风湿热;心肌炎;免疫

中图分类号 R593.21

风湿热的发病机制目前尚不明了,一般认为是 A 组溶血性链球菌感染后引起的自身免疫性疾病^[1]。关于体液免疫和细胞免疫在本病发病中的作用,国内外均有一些报道。本室^[2]曾用风湿热和风湿性心脏炎患者,血清和外周血淋巴细胞,分别加到体外培养的人胚心脏细胞中,观察其对心脏细胞的毒性作用,结果发现:①风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞和血清对心脏细胞均有毒性作用;②单纯风湿性关节炎和风湿性心脏病风湿静止期患者外周血淋巴细胞和血清对心脏细胞无毒性作用,提示体液免疫和细胞免疫均参与风湿性心脏炎的发病机制。近年,血清心肌抗体测定已被用于临床,成为风湿性心脏炎的实验室诊断手段之一。但多数报告其阳性率在风湿性心脏炎患者不足 50%^[3,4],可能的解释有二种:其一,目前抗心肌抗体测定方法多为以哺乳类心肌冷冻切片做底物,用间接免疫荧光法测定,方法敏感性不够,不能检出低滴度抗心肌抗体;其二,部份患者血清中无此抗体或抗体已消失,病变的活动是由其它如细胞免疫介导的。故此,本研究根据临床

表现,病程长短将病人进行分组,以探讨细胞免疫和体液免疫与疾病的病程和临床表现的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象与分组

27 例风湿性心脏病患者,其中 9 例为急性典型发作组(急性发病,有发热、关节炎或关节痛、心悸、心电图显示心肌损害、心律失常、血沉升高、C-反应蛋白异常);慢性迁延活动组 10 例(隐匿起病,上述症状轻而不典型,血沉、C-反应蛋白基本正常,有时仅表现为心力衰竭难以控制,风湿活动持续 3 个月以上,有慢性迁延活动倾向);静止期风心病组 8 例(无任何风湿活动征象)。上述病例诊断均符合 1984 年修订的 Jones 标准,排除了其它原因所致的心脏病。

1.2 研究方法

1.2.1 原代培养人胎心脏细胞方法^[2] 取 4~6 月水囊引产的胎儿心脏心室肌,用 0.06%胰蛋白酶消化,用含 20%小牛血清的 199 培养液配成 1×10^6 个细胞/ml 的单个细

① 国家教委博士点基金资助课题

② 第一作者,34 岁,男,讲师、博士

胞悬液。根据心肌细胞贴壁生长较间质细胞慢的特点,按 Blondel 等的方法将二种细胞分开,待细胞长成单层后用于实验。

1.2.2 淋巴细胞毒性试验^[2] 无菌取外周血(肝素抗凝)5ml,分离出淋巴细胞,用含10%~20%小牛血清的199培养液配成 1×10^8 /ml的细胞悬液。取心肌细胞和心脏间质细胞各一瓶,加入等量淋巴细胞悬液,轻摇后吸出少量培养液测乳酸脱氢酶(LDH)活性(比色法)。封闭瓶口,在37℃培养24h后,测培养液中的LDH活性,将培养后测得LDH减去培养前的LDH之差,为培养前后LDH活性升高值,同时在显微镜下观察有无细胞坏死脱壁。

1.2.3 血清细胞毒性试验^[2] 用含10%小牛血清的199培养液,按1:5稀释病人血清。取心肌细胞和心脏间质细胞各一瓶,各加入上述病人稀释血清,轻摇后吸出少量培养液测LDH活性,37℃置30min后加入补体(原瓶中培养液量的1/5量),20℃下置2h,测培养液中LDH活性。试验前后LDH活性升高值计算方法同上。并观察有无细胞坏死脱壁。

2 实验结果

2.1 3组患者外周血淋巴细胞对心肌细胞和心肌间质细胞毒性试验结果,见表1

表1 3组患者淋巴细胞对心脏细胞毒性试验前后LDH升高值(U)¹⁾

	急性典型发作组 $\bar{x} \pm s$	慢性迁延活动组 $\bar{x} \pm s$	静止组 $\bar{x} \pm s$
心肌细胞组	111.4 ± 64.02	75.20 ± 56.57	-30.63 ± 37.86
心肌间质细胞组	43.89 ± 24.96	46.15 ± 31.35	-39 ± 29.90

* 方差齐性检验 $P=0.205$ 方差齐

急性典型发作组患者外周血淋巴细胞对上述二种心脏细胞毒性试验前后LDH升高值与慢性迁延活动组之间无显著性差别($Q=2.04 P>0.05$ 和 $Q=0.24 P>0.05$),但与静止组相比,则高于静止组($Q=7.57 P<0.01$ 和 $Q=8.78 P<0.01$)。前二组显微镜观察均见有片状细胞坏死脱壁,后者则无此现象。慢性迁延活动组LDH升高远大于静止组,有显著性差别($Q=5.78 P<0.01$ 和 Q

$=8.34 P<0.01$)。以上结果说明无论是急性初发还是慢性迁延活动的风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞对心肌细胞和心肌间质细胞有细胞毒性作用。而静止期患者则无此作用。提示细胞免疫与风湿性心脏炎的发病有密切关系。

2.2 3组患者血清对心肌细胞和心肌间质细胞毒性试验前后LDH升高值,见表2。

表2 3组患者血清对二种心脏细胞毒性试验前后LDH升高值(U)¹⁾

	急性典型发作组 $\bar{x} \pm s$	慢性迁延活动组 $\bar{x} \pm s$	静止组 $\bar{x} \pm s$
心肌细胞组	265.53 ± 102	-7.76 ± 54.9	-28.63 ± 18.38
心肌间质细胞组	233.89 ± 113.86	-7.50 ± 89.14	-30.81 ± 18.56

1) 方差齐性检验 $P<0.0003$, 方差不齐。用近似方差分析

比较血清对二种心脏细胞毒性试验前后 LDH 升高值,除急性典型发作组明显升高

外,慢性迁延活动组和静止期组均无升高反而有所降低(这可能是因为试验开始前,由于原代培养时剪碎和消化过程中部份心脏细胞受损而于培养时坏死释放了LDH,而试验前虽弃去原代培养的培养液,不可能完全除去LDH,在细胞毒性试验中LDH活性逐渐降低所致)。前者与后二者比较有显著性差别(其 F' 和 P 值分别为 $F'=51.25 P<0.0001$, $F'=72.22 P<0.0001$ 和 $F'=26.07 P=0.0001$, $F'=47.23 P=0.0001$)。观察也发现急性典型发作组血清对上二种心脏细胞毒性试验后心肌细胞和间质细胞均有片状细胞坏死脱壁而后二组则无此现象。慢性迁延活动组与静止期组比较,LDH变化无显著性差别($F'=1.27 P=0.28$ 和 $F'=0.65 P=0.44$)。上述实验看出血清(血清中的抗心肌抗体)对心脏细胞毒性仅见于急性典型发作组患者,而慢性迁延活动组和静止期组患者血清无此作用。

综合上述二组试验结果,提示在急性典型发作组患者细胞免疫和体液免疫均参与其心脏炎的发病机制,而在慢性迁延活动组则主要是细胞免疫参与心脏炎发病,体液免疫作用较弱或不参与其发病机理。

3 讨 论

虽然风湿热的发病机制尚未明了,但已被公认是一种由A组溶血性链球菌感染后引起的自身免疫性疾病^[5,6]。并证实风湿热患者血清中存在能与哺乳类心肌起交叉反应的抗体^[6]。此抗体能在体外对培养的人心肌细胞产生免疫攻击。近年来,人们又注意到细胞免疫也参与风湿热的发病^[7]。本室用风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞,加到体外培养的人心肌细胞中混合培养,发现淋巴细胞可对心肌细胞产生免疫攻击作用,引起心肌细胞坏死,证实了细胞免疫在风湿性心脏炎发病中的作用。

细胞免疫和体液免疫在风湿热发病机制中的意义的研究,文献上虽有一些报道,但仅

仅侧重于二者之一,至于细胞免疫和体液免疫在发病机制中的作用与临床类型或临床表现的关系的研究,尚未见报道。在过去对风湿性心脏炎患者的实验研究中,发现仅有30%~50%病人血清中检测到抗心肌抗体。这提示一部份病例体液免疫机制在发病中可能不起主导作用。故本实验将风湿性心脏炎病人分为急性典型发作组和慢性迁延活动组,同时观察其体液免疫和细胞免疫在发病过程中的作用。结果发现急性典型发作组风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞对心肌细胞和心肌间质细胞均有毒性作用,慢性迁延活动组病人外周血淋巴细胞对心肌细胞和心肌间质细胞均有毒性作用,但血清对上述二种细胞则无毒性作用。本研究用Ficoll-Conray淋巴细胞分离液分离患者外周血淋巴细胞后,未进一步将其中的T淋巴细胞和B淋巴细胞分开,直接将其加到心肌细胞和心肌间质细胞中进行混合培养。但由于混合培养时间短(24h内),且培养体系内无补体成份,因此B淋巴细胞介导的体液免疫不可能参与细胞毒反应。综上所述,本研究提示风湿性心脏炎急性典型发作期,体液免疫和细胞免疫均参与其发病机制,但在慢性迁延活动期其发病机制可能主要为细胞免疫,体液免疫作用较小或无此作用机制。本结果提示我们,在临床工作中应注意这种由细胞免疫介导的慢性迁延、不典型风湿活动的风湿性心脏炎的诊断及治疗,这对改善本病的预后具有重要意义。由于本实验病例有限,这主要是因为人胚心肌来源困难,不能进行大样本实验,所得结论又属首次提出,故有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Zabriskie JB, Freimer EH. An immunological relationship between the group A streptococcus and mammalian muscle. *J Exp Med* 1966, 124: 661
- 2 张书刚,余步云. 风湿热患者外周血淋巴细胞和

- 血清对心脏细胞的毒性作用. 中山医科大学学报,1993,14(4): 310
- 3 杨贤招,余步云,王焕珍,等. 抗心肌反应性抗体在心脏病的临床诊断意义. 实用医学杂志, 1989,5(2): 2
- 4 Shastry P, Naik S, Joshi M, et al. Persistence of heart reactive antibodies (HRA) in acute rheumatic fever (ARF) and rheumatic heart disease (RHD) Patient. J Clin Lab Immunol, 1988,27: 87
- 5 Cunningham MW, McCormack JM, Talaber LR, et al. Humman momoclonal antibodies re-active with antigens of the group A streptococ-cus and human heart. J Immunol, 1988, 141, 2760
- 6 Kravs W, Dale JB, Beachey EH. Identification of an epitope of type I streptococcal M protein that is shared with a 43-KDa protein of human myocardium and renal glomeruli. J Immunol, 1990,145: 4089
- 7 Lida N. Cytotoxicity assay against cultured heart cell in rheumatic heart disease. Jpn Circ J,1978,42: 387

(1994-04-27 收稿 1994-05-17 修回)

RELATIONSHIP BETWEEN THE CYTOTOXICITY OF THE LYMPHOCYTS AND SERA ON HEART CELLS AND CLINICAL MANIFESTATIONS OF RHEUMATIC FEVER

Zhang Shugang Yu Buyun

(Medicine Department of Thirt Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University of Medical Sciences,Guangzhou, 510630)

With the cytotoxic test of peripheral lymphocyt and sera of the rheumatic myocarditis patients against the primery cultured human fetal myocardial cells and heart interstitial cells, 27 cases were studied. The results showed that: (1)the Lymphocyt and sera from the rheumatic myocarditis patients with acute onset and typical clinical manifestations had the cytotoxic activities against myocardial cells and interstitial cells; (2)the Lymphocyt from the patients with mild and insidious onset and atypical manifestations had the cytotoxic effects on the myocardial cells and interstitial cells also, but the sera from these patients did not have this effects; (3)both the lymphocyt and serum from the patients with inactive rheumatic fever did not show the cytotoxic effects on the above cells.

Key words rheumatic fever; myocarditis; immune