

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*

张书刚 余步云

(附属第三医院内科)

提 要 用26例风湿热患者外周血淋巴细胞和血清分别加到原代培养的人胚心肌细胞和心肌间质细胞中,观察其对上述两种细胞的毒性作用,结果发现:①风湿性心脏病患者外周血T淋巴细胞和血清抗心肌抗体对心肌细胞和心肌间质细胞均有毒性作用。②单纯风湿性关节炎患者和风湿性心脏病风湿活动静止期患者外周血T淋巴细胞和血清对心肌细胞和心肌间质细胞无毒性作用。提示体液免疫和细胞免疫均参与风湿性心脏病的发病机制。

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清楚。大多数人认为本病是由A组溶血性链球菌感染引起的自身免疫性疾病。大量研究证实该菌和哺乳类动物机体组织存在多种交叉抗原^[1,2]。Kaplan和Meyeserian等发现患者血中存在与哺乳动物心肌起交叉反应的抗体^[3,4]。国内外一些作者证实风湿热患者血清抗心肌抗体对体外培养的心肌细胞有毒性作用,但人们也发现有些风湿性心脏病患者血清中检测不到抗心肌抗体。尸体解剖的心肌损害部位也无此抗体,而表现为风湿性肉芽肿——风湿小结。这均提示细胞免疫可能参与风湿热的发病机制。但是,用患者外周血淋巴细胞攻击体外培养心肌细胞,探讨细胞免疫在发病中的作用的报道甚少。作者用风湿热患者外周血淋巴细胞和血清分别加到体外原代培养的人胚心肌细胞和心肌间质细胞中,观察其细胞毒性作用探讨细胞免疫和体液免疫在风湿性心脏病发病中的作用。

对象和方法

研究对象

风湿热患者26例:其中:①风湿性心脏病

14例,男性3例、女性11例,年龄16~57岁;②单纯风湿性关节炎6例,男性1例、女性5例,年龄10~51岁。③风湿性心瓣膜病风湿活动静止期患者6例,男性2例、女性4例,年龄18~52岁。诊断标准按1982年修订Jones标准。实验设立正常对照8例,均为近期内无链球菌感染,既往无风湿热病史及其它心脏病的正常人。

研究方法

1. 心脏细胞培养 方法基本同李连达等介绍的方法并加以改良^[5]。取4~6个月水囊引产的胎儿心室肌,剪成1mm²的小块,用Hank液冲洗后,以0.06%的胰蛋白酶(美国Difco)消化成单个心脏细胞,用含20%小牛血清的199培养液调成细胞浓度为1×10⁷/ml的悬液。此悬液中含心肌细胞和间质细胞(包括内皮细胞和成纤维细胞),由于心肌细胞贴壁生长较间质细胞晚,本实验按Blondel等的方法将两者分开^[6]。具体方法为将上述心脏细胞悬液在37℃培养3~6h,见有细胞开始贴壁时,轻摇培养瓶,让未贴壁的细胞浮起,吸出瓶内细胞悬液加到另一空瓶中(简称甲瓶,主要含心肌细胞),原瓶中加入等量含20%小牛血清的199培养液(简称乙瓶,主要含间质细

* 国家教委博士点基金资助课题

胞), 继续37℃培养3~5d, 细胞长成单层用于实验。经上法分离的单层细胞, 经PAS糖原染色鉴定^[7]。甲瓶中心肌细胞约占86.64%, 乙瓶中间质细胞约占91.14%。

2. 淋巴细胞毒性试验 无菌取患者外周血(肝素抗凝)5ml, 用Ficoll-Conray淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, 用含10%~20%小牛血清的199培养液配成 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 的细胞悬液。取上述单层细胞甲、乙瓶各1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。封闭瓶口, 在37℃下培养24h后测培养液中LDH活性, 培养后LDH与培养前LDH之差为培养后LDH活性升高值。同时在显微镜下观察有无细胞坏死脱壁情况。

3. 血清细胞毒性试验 用含10%小牛血清的199培养液, 按1:5稀释病人血清。取培养的细胞甲、乙各1瓶。吸去培养液, 加入等量的上述病人稀释血清, 轻摇后吸出少量培养液测LDH活性, 37℃培养30min后加入补体(原瓶中培养液量的1/5), 20℃下置2h, 再在37℃下2h, 按上方法测培养液中LDH活性。

实验结果

外周血淋巴细胞毒性试验

14例风湿性心脏病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后培养液LDH活性升高 $78.54 \pm 80.94\text{U}$ 和 $47.58 \pm 39.67\text{U}$ 。两组心脏细胞均见有片状细胞坏死脱壁。而8例正常对照组两种心脏细胞培养液LDH活性无升高相反呈现负值, 分别为 $-69.63 \pm 47.9\text{U}$ 和 $51.5 \pm 29.44\text{U}$, 同时也未发现细胞有坏死脱壁现象。6例单纯风湿性关节炎患者外周血淋巴细胞毒性试验结果, 试验后培养液中LDH活性无升高反而降低, 分别为 $-92.67 \pm 75.83\text{U}$ 和 $-98.33 \pm 84.95\text{U}$ 。也未见有细胞坏死脱壁。6例风湿性心瓣膜病风湿活动静止期患者外周血淋巴细胞毒性试验, 实验前后两种心脏细胞培养液中LDH活性无升

高反而降低, 分别为 $-31 \pm 43.43\text{U}$ 和 $-39.67 \pm 34.22\text{U}$, 镜下也未见细胞坏死脱壁现象。风湿性心脏病组淋巴细胞毒性试验前后两种心脏细胞培养液中LDH活性明显高于正常对照组($t=4.7, P<0.001$ 和 $t=6.14, P<0.001$), 高于单纯风湿性关节炎组($t=4.41, P<0.001$ 和 $t=5.34, P<0.001$)也高于风湿性心瓣膜病风湿活动静止期组($t=3.1, P<0.001$ 和 $t=4.68, P<0.001$)。以上结果提示风湿性心脏病患者外周血中存在对心肌细胞和心肌间质细胞有毒性作用的淋巴细胞(主要为T淋巴细胞), 而单纯风湿性关节炎和风湿性心瓣膜病风湿活动静止期患者外周血中则无此种淋巴细胞。说明细胞免疫在风湿性心脏病发病中具有重要作用。

血清细胞毒性试验

14例风湿性心脏病患者血清(另加补体)加到单层的心肌细胞和心肌间质细胞中, 测定试验前后培养液中LDH活性升高值为 $108.78 \pm 158.38\text{U}$ 和 $99.11 \pm 147.68\text{U}$, 8例正常对照组分别为 $-30.88 \pm 24.12\text{U}$ 和 $-71.44 \pm 63.35\text{U}$, 前者可见有片状细胞坏死脱壁而后者则无。6例单纯性风湿性关节炎患者血清对两种心脏细胞毒性试验前后LDH活性不升高反而降低, 分别为 $-51.25 \pm 34.32\text{U}$ 和 $-81.75 \pm 58.07\text{U}$, 镜下也未见细胞坏死脱壁现象。与风湿性心脏病比较有显著性差异($t=2.79, P<0.02$ 和 $t=3.29, P<0.01$), 6例风湿性心瓣膜病风湿活动静止期患者血清对两种心脏细胞毒性试验前后LDH活性无升高反而降低, 分别为 -24.25 ± 16.28 和 $-34 \pm 19.42\text{U}$ 。镜下也未见细胞坏死脱壁, 与风湿性心脏病比较有显著性差别($t=2.12, P<0.05$ 和 $t=2.167, P<0.05$), 而与正常对照组、单纯风湿性关节炎组比较, 差别均无显著性($P>0.05$)。

讨论

风湿热的发病机制至今仍不完全明了, 但多数作者认为是A组溶血型链球菌感染后引起

的一种自身免疫性疾病。人们对免疫复合物的作用, 体液免疫和细胞免疫在本病的发病机制中的意义愈来愈重视。但实验性研究均限于在动物体中进行, 应用原代培养的人胚心肌细胞研究体液免疫和细胞免疫在发病中的作用尚未见报道。

早在60年代就发现风湿热患者血清中存在抗心肌抗体, 此后又证实此抗体可被链球菌吸附。Lida 等^[8]用风湿热病人血清加到培养的人心脏细胞株细胞和成纤维细胞株细胞中, 发现血清只对成纤维细胞有毒性作用, 对心脏细胞无毒性作用, 本研究结果与 Lida 等结论存在较大不同。本研究发现急性风湿性心脏炎患者血清对体外培养的胎儿心肌细胞和心肌间质细胞有毒性作用; 单纯风湿性关节炎、静止期风心病患者血清对心肌细胞和间质细胞均无毒性作用。两实验存在不同结论的原因可能为:

①Lida 实验仅观察了5例风湿热病人。未对不同临床类型和病期的病人加以区别地观察, 本实验发现风湿性心瓣膜病风湿活动静止期和单纯风湿性关节炎患者血清对两种心脏细胞无毒性作用; ②所用细胞不同, Lida 所用心脏细胞为细胞株, Yang 等证实^[9], 经3次以上传代的细胞往往呈现类似成纤维细胞的生物学特征, 传代次数越多, 抗原性越弱。本实验采用原代培养的心脏细胞, 未经传代, 抗原性保持较好, 实验更接近人体生理情况。

近年来, 人们开始注意到细胞免疫在风湿热发病中的作用^[10], 国外曾有人用鼠心脏细胞和人心脏细胞株细胞做研究, 发现风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞对上述细胞有毒性作用。本研究改用原代培养的人胚心脏细胞, 使实验更接近人体, 结果也发现风湿性心脏炎患者外周淋巴细胞(主要指T淋巴细胞)对心脏细胞有毒性作用。更进一步说明细胞免疫在风湿性心脏炎发病机制中具有重要作用。

本研究说明, 体液免疫和细胞免疫均参与风湿性心脏炎的发病, 但两者在发病的不同阶段以及临床类型或临床表现不同的风湿热发病

机制中所起的作用是否相同有待进一步研究。

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. Goldstein I, et al. Immunological relationship between streptococcus: A polysaccharide and structural glycoproteins of heart valve. *Nature* 1967;213:44
3. Kaplan MH, Yesarian ME. An Immunological crossreaction between group A streptococcal cell and human heart tissue. *Lancet* 1962;1:780
4. Shastry P, 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(2):87
5. 李连达, 李映秋. 心肌细胞培养研究的进展. *细胞生物学杂志* 1982;4:6
6. Blondel B, Roijen I, Cheneval JP. Heart cells in culture: A simple method for increasing the proportion of myoblasts *Experientia* 1971;27:356
7. Iris SP. Identification of cardiac myocytes in vivo and in vitro by the presence of glycogen and myofibrils. *Exp Cell Res* 1973;76:243
8. Lida N. Cytotoxicity assay against cultured heart cell in rheumatic heart disease. *Jpn Circ J* 1978;42:387
9. Yang LC, et al. Streptococcal-induced cell-mediated-immune destruction of cardiac myofibers in vitro. *J Exp Med* 1977;146:344
10. Kemeny E, et al. Identification on mononuclear cells and T cell subsets in rheumatic valvulitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;52(2):225

(1993-03-04收稿 1993-07-03修回)

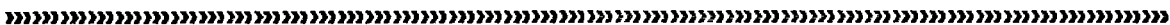
CYTOTOXIC EFFECTS OF LYMPHOCYTS AND SERA OF RHEUMATIC FEVER PATIENTS ON HEART CELLS

Zhang Shugang Yu Buyun

(Third Affiliated Hospital)

Peripheral lymphocytes and sera from 26 patients suffered from rheumatic fever were tested against primary cultured human fetal myocardial cells and heart interstitial cells to observe their toxicity effects. The results showed: (1) the lymphocytes and sera from the rheumatic myocarditis patients had the cytotoxic effects on the myocardial cells and interstitial cells; (2) lymphocytes and sera from rheumatic arthritis patients and rheumatic heart disease patients without active rheumatic fever did not show any cytotoxic activities against the interstitial cells and myocardial cells. These results indicate that the cellular and humoral immunity might play an important role in the pathogenesis of rheumatic carditis.

Key words rheumatic fever; myocarditis; immune



· 新成果 ·

直流电神经刺激器

课题负责 陈光晔

(孙逸仙纪念医院)

该研究仪器是专利产品, 是根据人体神经电位差原理制成。外观如同钢笔大小, 操作简便, 易于消毒, 为解剖和修复神经提供客观依据, 避免或减少神经的损伤, 适用于各手术科术中识别颅神经和周围神经, 鉴别运动神经和感觉神经, 验证神经的功能或神经吻合是否正确对位, 刺激效应达100%。采用该仪器解剖识别颅神经和周围神经, 尤其对面神经解剖可使病人免遭毁容, 确保病人身心健康, 有显著社会效益。该仪器与国外同类产品相比, 更具有创造性和新颖性, 达到国际领先水平, 该成果由孙逸仙纪念医院口腔科陈光晔教授等人完成, 1992年获广东省医药卫生科技进步二等奖。

(陈丽芳)