

应用促凝血活性试验诊断风湿性心脏炎^①

余步云^② 张帆 戴陆军 张书刚 古洁若

汤美安 周汉建 陈国庆 梁慧

(中山医科大学附属第三医院内科,广州,510630)

提 要 用 A 组溶血性链球菌特异性菌膜抗原作为刺激物,测定 94 例风湿性心脏炎患者外周血淋巴细胞促凝血活性(procoagulant activity, PCA),阳性率为 82.98%,高于血沉(ESR)、C 反应蛋白(CRP)、循环免疫复合物(CIC)、抗心肌抗体(AHRA)和抗链“O”(ASO)的阳性率。本研究还测定了 90 例健康人、60 例静止期风湿热、20 例急性风湿性关节炎、94 例其它疾病的 PCA 值作比较,证明该试验在诊断风湿性心脏炎具有较好的特异性(特异度为 88.30%)。研究提示:①PCA 是目前诊断风湿性心脏炎最有价值的检测方法;②体液免疫和细胞免疫共同参与风湿性心脏炎发病机制,而细胞免疫可能占更为重要的地位。

关键词 链球菌;促凝血活性;风湿热

中图分类号 R 593.21; 392.1; 378.12

1986 年以来,美国和其他经济发达国家出现新的地区性风湿热流行,再度引起医学界对本病的关注。近年临床所见,轻症和不典型病例占较大的比例,诊断上存在困难,尤以瓣膜病风湿活动的诊断难度较大,但至今尚缺乏灵敏性高,特异性好的实验室方法可协助临床诊断。本研究采用特异性的链球菌菌膜抗原作为刺激物,测定风湿性心脏炎患者的外周血淋巴细胞促凝血活性(procoagulant activity, PCA),作为细胞免疫指标,探讨在诊断风湿性心脏炎的价值,比较体液免疫和细胞免疫机制在风湿性心脏炎发病中所处的地位。

1 对象和方法

1.1 病例与分组

全部病例选自 1988 年 9 月至 1992 年 12 月本院内、儿科住院和门诊患者。分组:①风湿性心脏炎组:94 例,男 25 例,女 69 例,平均年龄 31.12 ± 15.39 岁。②静止期风湿热组:60 例,男 15 例,女 45 例,平均年龄 31.73 ± 15.43 岁。③健康对照组:为体检健康者,90 例,男 42 例,

女 48 例,平均年龄 29.91 ± 8.20 岁。上述 3 组年龄结构经 F' 检验, F' 值为 0.4865, $P > 0.05$,证实 3 组年龄之间无显著差异。风湿性心脏炎 94 例中,包括急性初发风湿性心脏炎 29 例、迁延型风湿性心脏炎 25 例、瓣膜病风湿活动 40 例。上述病例均符合 1965 年修订的 Jones 标准^[1]。静止期风湿热系指风湿热临床症状消失,实验室检查恢复正常,经半年以上追踪,证实无风湿活动者。④急性风湿性关节炎:20 例。⑤对照疾病 94 例(含上呼吸道感染 11 例、结缔组织病 27 例、病毒性心肌炎 16 例、冠心病 22 例、其它感染或内脏病 18 例)。④、⑤组均检测 PCA 以作对照。

1.2 检测方法

1.2.1 A 组溶血性链球菌特异性抗原的制备 菌株先经 Oxoid 分组抗血清鉴定,通过扩大增菌后于 4℃ 冰溶条件下置超声碎菌器中,以 100 000Hz 频率振荡,多次离心后,将末次离心沉淀物悬浮于 0.01mol/L PBS 中,取少量作细菌培养,证明无残菌生长,所得即为菌膜抗原。

1.2.2 PCA 测定 取患者鲜血 3 ml,加入 3.8% 枸橼酸钠抗凝,用去 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的

① 国家教委博士点科研基金资助课题

② 第一作者 60 岁,女,教授

Hank 液等量稀释后,用 Ficoll-Hypaque 分离淋巴细胞,用 Hank 液洗涤2次,再用含 10%灭活小牛血清的1640培养液调成 1×10^6 个/ml 浓度,等量分成两管,其中一管加入 A 组链球菌特异性抗原,另一管加入等量培养液,置 37℃培养 20 h,取出后用 Hank 液洗涤,各取 0.1 ml 置 37℃浴箱中,加入 0.1 ml 正常人血浆,摇匀孵育 1 min 后加入 0.025 mol/L CaCl₂ 0.1 ml,同时记录血浆凝固时间,按下式计算 PCA 缩短时间百分率。

$$PCA(\%) = \frac{T \text{ 抗原}(-) - T \text{ 抗原}(+)}{T \text{ 抗原}(-)} \times 100$$

计算式中 T 抗原(-)为未加链球菌特异性抗原管的血浆凝固时间,T 抗原(+)为加入该特异性抗原管的血浆凝固时间。PCA 正常上限为 11.5%,系根据 $\bar{x} + 1.64s$ 计算所得。

1.2.3 对照检查项目 红细胞沉降率(ESR,魏氏法)、C 反应蛋白(CRP,火箭电泳

法)、循环免疫复合物(CIC,PEG-6 000 比浊法)、抗心肌抗体(AHRA,间接免疫荧光法)、抗链球菌溶血素“O”(ASO,乳胶凝集法),上述各实验项目均与 PCA 试验同时取血样本。

1.3 统计学处理

本研究中,采用卡方检验对两组阳性率进行比较,对单因素多个样本均数比较,则先进行方差齐性检验,若各组方差齐用 F 检验,若方差不齐用近似 F 检验(即 F' 检验),结论证实各总体均数不等后,再采用 Newman-Keuls 检验进行两两比较,最后得出统计学结论。

2 结 果

2.1 风湿性心脏病组 PCA 值明显增高

风湿性心脏病组的 PCA 值明显增高,与风湿热静止期和健康人比较,有显著统计学差异(表1)。

表1 风湿性心脏病组 PCA 值与风湿热静止期组和健康对照组比较

组 别	<i>n</i>	PCA ($\bar{x} \pm s$)	<i>q</i>	<i>P</i>
风湿性心脏病组	94	17.44 ± 6.48		
静止期风湿热组	60	5.71 ± 3.03	22.203	<0.01
健康对照组	90	6.22 ± 3.23	21.238	<0.01

$$F' = 127.575 \quad P < 0.05$$

2.2 各临床亚型风湿性关节炎组 PCA 值比较

风湿性心脏病各临床亚型的 PCA 值明

显高于急性风湿性关节炎,有显著统计学差异,说明风湿热时,只有出现心脏受累,PCA 才会明显增高(表2)。

表2 风湿性心脏病组3种亚型与急性风湿性关节炎组 PCA 值的比较

组 别	<i>n</i>	PCA ($\bar{x} \pm s$)	<i>q</i>	<i>P</i>
风湿性心脏病组				
急性初发风湿性心脏病	29	15.71 ± 7.04	6.716	<0.01
迁延型风湿性心脏病	25	18.15 ± 5.99	8.729	<0.01
瓣膜病风湿活动	40	18.36 ± 6.25	8.903	<0.01
急性风湿性关节炎组	20	7.57 ± 6.19		

$$F' = 16.840 \quad P < 0.01$$

2.3 风湿性心脏炎组与对照疾病组 PCA 值比较

风湿性心脏炎组与各对照疾病组 PCA 值比较,有显著统计学差异(表3)。

表3 风湿性心脏炎组与对照疾病组 PCA 值的比较

组 别	n	PCA($\bar{x}\pm s$)	q	P
风湿性心脏炎组	94	17.44±6.48		
对照疾病组				
上呼吸道链球菌感染	11	6.96±3.31	8.919	<0.01
结缔组织病	27	7.13±6.94	8.774	<0.01
病毒性心肌炎	16	7.06±3.81	8.834	<0.01
冠心病	22	6.27±6.66	9.506	<0.01
其它感染和内脏病	18	5.59±3.20	10.077	<0.01

$F' = 15.1886 \quad P < 0.01$

2.4 PCA 增高阳性率比较

风湿性心脏炎组和风湿热静止期组、健康人组 PCA 增高阳性率比较,显示82.98%风湿性心脏炎患者可有 PCA 增高(表4)。

表4 3组 PCA 增高阳性率比较

组 别	总例数	PCA 增高	
		n	阳性率(%)
风湿性心脏炎组	94	78	82.98
静止期组	60	2	3.33
健康对照组	90	4	4.44

2.5 各对照疾病组的 PCA 阳性率及特异性
阳性率为5.56%~14.81%,PCA 正常(真阴性)例数为83例,PCA 增高(假阳性)例数为11例。应用诊断性试验四格表检测 PCA 的特异性(用特异度表示):

$$\begin{aligned} \text{PCA 特异度} &= \frac{\text{真阴性}}{\text{假阳性} + \text{真阴性}} \\ &= \frac{83}{11 + 83} = 88.3\% \end{aligned}$$

表5 PCA 阳性率与其他实验室检查阳性率比较

检测例数	阳性		χ^2	P
	n	%		
PCA	94	78	82.98	
ESR	56	33	58.90	10.5501 <0.005
CRP	63	12	19.05	63.0195 <0.005
CIC	64	38	59.38	10.8697 <0.005
AHRA	50	14	28.00	33.8530 <0.005
ASO	56	24	42.83	25.9610 <0.005

2.6 PCA 阳性率与其他实验室检查比较

风湿性心脏炎患者各项实验室检查指标的阳性率比较结果(表5)。

PCA 在反映风湿活动性方面较 ESR、CRP 敏感,在反映免疫状态方面,较体液免疫指标 CIC 和 AHRA 阳性率高;在反映链球菌感染及链球菌免疫反应方面,较 ASO 优异。以上比较均有显著统计学差异。

3 讨 论

近年的实验室研究证明:已致敏的淋巴细胞再接触特异性抗原所产生的淋巴因子,可刺激巨噬细胞产生组织因子,激发外源性凝血作用,促进局部纤维素沉着,导致凝血活性增高。Geczy 等^[2,3]把流行性腮腺炎病毒抗

原和结核菌素抗原加于已致敏的淋巴细胞中,孵育后,发现其促凝血作用显著强于未经特异性抗原孵育的白细胞,且其促凝血活性的增高与采用结核菌素作为抗原注射皮肤后所出现的迟缓皮肤反应呈线性关系,故认为本方法是一个敏感性较高,重复性较好,简易可行的细胞免疫检测方法,优于淋巴细胞移动抑制因子测定和淋巴细胞转化试验。PCA试验近年先后用于多种疾病如甲状腺病、脑炎、系统性红斑狼疮等的研究^[4],所采用的刺激物有外毒素、抗原抗体复合物,同型的白细胞、植物血凝素等,但采用链球菌菌膜作为特异性刺激物,用于风湿热和风湿性心脏病的诊断方面,国内外尚未见报道。

风湿热的病理学特征是阿孝夫小结,其中含大量的巨噬细胞和T淋巴细胞。在亚急性期,心内膜、心肌间质中有纤维素沉积,提示这种纤维素的沉积可能是由于免疫细胞介导和外源性凝血系统被激活的结果。本研究采用链球菌菌膜抗原作刺激原诱导PCA,说明A组溶血性链球菌抗原免疫刺激特性,也证实风湿性心脏病的发病机制存在明显的细胞免疫异常。本文应用CIC和抗心肌抗体作为体液免疫指标,所测出的结果两者虽有一定的阳性率,但显著低于PCA试验,这说明在风湿性心脏病的发病机制中有体液免疫和细胞免疫共同参与,这一结论与我们过去的研究结果相一致^[5],但两者相比较,后者可能占更重要的地位^[6],此一发现值得进一步研究证实。

自1994年Jones提出风湿热的诊断标准以来,人们一直寻找具有较好敏感性和特异性的实验室诊断方法,但未能达到目的。迄今Jones标准四度修订,仍在诊断上存在不少困难。近年我国所流行的风湿热病例,仍以轻症和不典型居多,占42%~76%。临床上的漏诊是难以估量的。在过去10多年,国内外大量的实验室研究集中在体液免疫方面,如免疫球蛋白、补体、抗心肌抗体的测定等,结果发现上述指标都是非特异性的。虽然抗心肌抗

体的意义较大,在风湿性心脏病的阳性率相对高于其他心脏受累的情况(例如病毒性心肌炎、急性心肌梗塞、心肌病、心脏手术后等),但总的来说,抗心肌抗体多在风湿热较急性阶段呈短暂的阳性,加上其非特异性的缺点,故对其意义还有不少争议。本研究通过大量病例的对比,发现PCA试验在风湿性心脏病的灵敏性为82.98%,特异性为88.30%,不但在敏感性方面优于其他指标,在特异性方面也是目前任何一项化验室检查所不能与之比拟的。

应该指出的是本研究结果发现风湿性关节炎的PCA值明显低于心脏病各临床亚型,此可能由于本方法所采取的特异性抗原(链球菌菌膜抗原)仅对心肌有交叉抗原性,而对关节组织无交叉抗原性,故不能诱导关节炎患者的PCA产生。根据这一特点,PCA试验能否用于风湿热病者有无心脏受累情况的判断,值得进一步探讨,这将对指导本病的治疗和评价其预后有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Committe report. Jones criteria(revised) for guidance in the diagnosis of rheumatic fever. *Circulation*, 1965,32(10):664
- 2 Geczy CL, Meyer PA. Leukocyte procoagulant activity in man; an in vitro correlate of delayed-type hypersensitivity. *J Immunol*, 1982, 128(1): 331
- 3 Geczy CL, Farram E, Moon DK, et al. Macrophage procoagulant activity as a measure of cell-mediated immunity in the mouse. *J Immunol*, 1983, 130(6):2743
- 4 Cole EM, Sweet J, Levys GA. Expression of macrophage procoagulant activity in murine systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 1986, 78(10):887
- 5 张书刚,余步云.风湿热患者外周血淋巴细胞和血清对体外培养的人胚心脏细胞的毒性作用. *中山大学学报*, 1993, 14(4):310
- 6 张书刚,余步云,黄宜厚.应用体外培养的的心脏细

胞研究风湿热免疫发病机制. 见: 中华医学会编辑. 第三次全国心血管病学术会议论文汇编. 第三次全国心血管病学术会议. 武汉: 1988. 北京: 中

华医学会, 1988: 53

(1993-12-13 收稿 1994-03-10修回)

PROCOAGULANT ACTIVITY ASSAY IN THE DIAGNOSIS OF RHEUMATIC CARDITIS

Yu Buyun Zhang Fan Dai Lujun Zhang Shugang Gu Jieruo
Tang Mei'an Zhou Hanjian Chen Guoqing Lian Hui

(Department of Internal Medicine, 3rd Affiliated Hospital,
Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510630)

A specific antigen from group A streptococcal cell membrane was prepared and used as a stimulant to test the peripheral blood lymphocyte procoagulant activity (PCA) in 94 cases with rheumatic carditis. The positive rate was 82.98% which was much higher than that of ESR, C reactive protein, circulating immunocomplex, anti-heart-reactive antibodies and anti-streptolysin "O". PCA assays were also performed on 90 cases of normal controls, 60 cases with inactive rheumatic fever, 20 cases with rheumatic arthritis and 94 cases with other diseases than rheumatic fever. The results showed that PCA possesses good specificity (88.30%) for the diagnosis of rheumatic carditis and appears to be superior to the other tests commonly used for rheumatic fever. It appears that both humoral and cellular immune mechanisms are involved in the pathogenesis of rheumatic carditis, the latter being of more significance.

Key words streptococcus; procoagulant activity; rheumatic fever



(上接第158页)

1987, 122(12): 1479

4 Mindell ER. Chordoma. J Bone Joint Surg (Am), 1981, 63: 501

6 Le Charpentier Y, Bellefqih S, Boisnic S, et al. Chordomas. Ann Pathol, 1988, 8(1): 25

5 Sundaresan N, Huvos AG, Krol G, et al. Surgical treatment of spinal chordomas. Arch Surg,

(1993-03-10收稿 1993-11-23修回)