维普资讯 http://www.cqvip.com

第10卷第3期
1995年9月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

Vol. 10, No. 3
Sep., 1995

病毒性心肌炎发病机理的实验研究*

——T细胞亚群和抗心肌抗体检测

王西栋** 陈晨华 于修平 董杰德 仇素英

（山东医科大学微生物教研室，济南 250012）

提要 以柯萨奇B_3病毒（CVB_3）感染Balb/c小鼠建立心肌炎模型，检测了小鼠脾脏中T细胞亚群和血清中的抗心肌抗体，并进行了心脏病毒分离及组织病理学检查。结果显示，病毒感染后5天，脾脏中Thy1.2$^+$（T_g）增高，7—15天降低，第21天恢复正常。L3T4$^+$（Tc/Ts）于病毒感染后5—21天均明显高于对照组。L3T4$^+$（Th/i）于病毒感染后7天开始增高，直到21天均明显高于对照组，病毒感染后15天，抗心脏肌球蛋白抗体开始增高，第21天继续增高。病毒感染后3—5天，心脏病毒分离均为阳性；第7天部分小鼠心脏中仍可分离出病毒；第15天心脏病毒分离为阴性。病毒感染后7—21天，心肌坏死、间质炎细胞浸润等病理变化进行性加重。上述结果提示，病毒感染本身和免疫因素都可能参与心肌炎的发病。

关键词 柯萨奇病毒B_3，动物模型，心肌炎，T细胞亚群，抗心肌抗体

近年来，病毒性心肌炎（VM）的发病率显著上升。许多研究证实，该病的发生主要与肠道病毒、特别与B组柯萨奇病毒感染有关[1]。其发病机理目前尚未十分清楚，本研究旨在通过心肌炎动物模型，探讨病毒和免疫因素在VM发病中的作用。

材料与方法

I 材料

1.1 病毒 柯萨奇病毒B_3（CVB_3），亲心肌病毒株为本室保存的毒种。扩增后效价为10^8TCID$_{50}$，−70℃保存。

1.2 动物 Balb/c小鼠，6周龄，健康雌性，由北京医科大学动物室提供。

1.3 抗体

1.3.1 大鼠抗小鼠Thy1.2$^+$（T_g）、Lyt2$^+$（Tc/s）、L3T4$^+$（Th/i）单克隆抗体IgG，由北京医科大学免疫室提供。

1.3.2 荧光抗体为异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠IgG，由卫生部武汉生物制品研究所提供。

1.3.3 酶标抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG，由北京华美生物工程公司提供。

本文于1994年7月16日收到，11月16日修回

* 本文为国家自然科学基金资助课题

** 现在地址：山东省枣庄市二卫校 邮编 277500

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 方法

2.1 动物接种 试验组24只，对照组20只。试验组腹腔接种0.1ml中含10^6TCID$_{50}$ CVB$_3$液，对照组注射无菌生理盐水。

2.2 标本的采集 病毒感染后3、5、7和15天取心脏作病毒分离。感染后5、7、15和21天摘眼球取血，分离血清，用于抗心肌抗体检测。同时取心、脾分别作组织病理学检查和T细胞亚群检测。

2.3 T细胞亚群检测 按Kishimoto[2]报道的方法分离脾细胞，用PBS(pH7.2)调细胞至2×10^6个/ml，分装4支小管，每管加脾细胞1ml，4000r/min离心2分钟。弃上清，分别加入大鼠抗小鼠Thy1.2$^+$、Lyt2$^+$、L3T4$^+$单克隆抗体，每管100μl，对照管加PBS。混匀，4℃作用30分钟，4000r/min离心2分钟洗三遍。加荧光抗体，每管加100μl，4℃作用30分钟。

4000r/min离心2分钟洗三遍，铺片，置荧光显微镜下观察，计数200个细胞中荧光阳性细胞数，计算阳性率。

2.4 抗心肌抗体检测

2.4.1 抗原的制备 本研究所提取的抗原为心脏肌球蛋白的重链，其提取方法按Pollard[3]报道并略加修改，简述如下：

取健康Balb/c小鼠的心脏，剪碎，用PBS(pH7.2)洗两遍，加10倍量提取液(0.5mol/L KCl，0.1mol/L $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$，10mmol/L EDTA，1mmol/L DTT，8mmol/L Na_2SO_3，pH7.0)，匀浆。冰浴振荡10分钟，48000g离心30分钟，收集上清液，沉淀加5倍量提取缓冲液再提取。集两次上清，加3倍量2mmol/L$MgCl_2$，混匀，用0.5mol/L乙酸调pH至6.4，冰浴振荡10分钟，30000g离心30分钟。沉淀溶在KI-ATP缓冲液(0.6mol/L KI，5mmol/L ATP，5mmol/L DTT，1mmol/L $MgCl_2$，2mmol/L咪唑，pH7.0中。逐渐加入硫酸铵，使最终浓度为35—42%，4℃过夜，48000g离心20分钟。沉淀再溶在KIA—ATP缓冲液中，层析，选用Sephadex G 200凝胶，2.6×100cm层析柱，用KCl洗脱液(0.6mol/L KCl，10mmol/L咪唑，10mmol/L DTT，pH7.0)洗脱。收集洗脱液，测OD值。将收集的第一峰液体用饱和硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$，10mmol/L EDTA，50mmol/L $Na_4P_2O_7 \cdot 12H_2O$，pH8.0)透析。48000g离心20分钟，沉淀再溶在50mmol/L ($Na_4P_2O_7 \cdot 12H_2O$)溶液中，蛋白质定量为1mg/ml以上各步均在4℃下操作。

2.4.2 抗心肌抗体检测 用ELISA检测血清中的抗心肌抗体，按Neu[4]报道的方法操作。

2.5 组织病理学检查 常规处理心脏标本，切片，H-E染色，镜检。

2.6 心脏病毒分离 常规处理心脏标本，盲传三代进行病毒分离。

2.7 统计方法 数据用$\bar{X}$±SD表示，两个样本均数间比较用t检验。

结 果

1 T细胞亚群的改变

接种病毒后5天，脾脏中Thy1.2$^+$增高，7—15天降低。Lyt2$^+$于接种病毒后5天开始增高，7—21天进一步增高。L3T4$^+$于7—21天均明显增高(表1)。

2 抗心肌抗体产生的动态

病毒感染后5—7天，血清中抗心肌球蛋白抗体无明显增高，而感染后15天开始增高，第21天抗体滴度进一步增高(表2)。

3 接种病毒小鼠心脏病毒分离情况

病毒感染后3—5天，小鼠心脏病毒分离均为阳性，第7天阳性率降为60%，第21天转为阴性(表3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1　感染小鼠脾脏T细胞亚群的改变

Table 1　The changes of lymphocyte subsets in the spleen of infected mice (%)

	5天 days		7天 days		15天 days		21天 days	
	实验组 Experiment group n=5	对照组 Control group n=5	实验组 Experiment group n=5	对照组 Control group n=5	实验组 Experiment group n=5	对照组 Control group n=5	实验组 Experiment group n=5	对照组 Control group n=5
脾脏 Spleen(%)								
Thy1.2+	27.77±0.52☆☆	25.57±1.01	20.57±0.48☆☆☆	26.81±2.15	19.75±1.14☆☆☆	25.86±1.44	24.16±1.69	25.37±1.25
Lyt2+	18.48±0.33☆	17.75±0.38	19.01±0.30☆☆	16.26±1.47	20.06±0.97☆☆☆	17.51±0.78	21.19±1.63	18.38±0.64
L3T4+	13.34±0.23	13.55±1.24	15.70±0.75☆	13.49±0.73	18.38±2.34☆☆	14.21±0.36	16.44±0.50☆☆	14.27±1.35

Note: ☆P<0.05　☆☆P<0.01,　☆☆☆P<0.001

表2　ELISA检测感染鼠血清中抗心肌抗体

Table 2　Detection of serum anti-cardiac antibodies in CVB3 infected mice by ELISA (OD value)

时间(天) Time (day)	实验组 Experiment group $\bar{X}$±SD n=5	对照组 Control group $\bar{X}$±SD n=5	t检验 t test
5	0.28±0.16	0.27±0.15	P>0.05
7	0.27±0.14	0.27±0.12	P>0.05
15	0.56±0.12	0.26±0.13	P<0.01
21	0.67±0.10	0.27±0.13	P<0.01

表3　接种病毒小鼠心脏病毒分离结果

Table 3　The results of isolation of virus in the heart of BALB/C mice

感染天数 Infected days	例数 Number	阳性数 Positive number	阳性率 Positive percentage(%)
3	4	4	100
5	5	5	100
7	5	3	60
15	5	0	0

维普资讯 http://www.cqvip.com

4 心脏组织病理学检查结果

分别于接种后5、7、15、21天进行心脏组织病理学检查，每次3例，共12例，小鼠均未见死亡现象。接种病毒后5—21天，心脏组织病理改变进行性结重，心肌坏死及溶解经历了由轻至重、由小到大的演变过程(图1—4)。

图1 接种病毒后5天，心肌呈灶性和片状坏死，坏死区灶性溶解。

图2 接种病毒后7天，心肌呈片状坏死，坏死心肌溶解广泛。

图3 接种病毒后15天，心肌呈片状坏死，坏死心肌溶解更广泛。

图4 接种病毒后21天，右室明显扩张，心肌坏死溶解，心外膜淋巴细胞浸润。

Fig 1 5 days after CVB3 inoculation, myocardium showed focal and piece necrosis and small lysis. (HE×300)

Fig 2 7 days after CVB3 inoculation, myocardium showed piece necrosis and extensive lysis. (HE×600)

Fig 3 15 days after CVB3 inoculation, myocardium showed piece necrosis and more extensive lysis. (HE×600)

Fig 4 21 days after inoculation, right vintricle of heart showed dilated and epicardium was lymphocyte infiltrated. (HE×300)

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

柯萨奇病毒在自然界中普遍存在,人类易受其感染,约50%的受染者有症状,其中约5%引起心脏疾患。柯萨奇B组病毒是VM的重要病原,临床上约50%的心肌炎由该病毒引起[1],但其致病机理尚不十分清楚,一般认为病毒感染本身是VM的直接诱因[5]。本研究发现CVB_3感染Balb/c小鼠后3—5天,心脏病毒分离均为阳性,感染后7天,阳性率为60%,第15天转为阴性。病理学检查显示,病毒感染5—21天心肌坏死、崩解及炎细胞浸润进行性加重,与文献报道一致[6]。感染早期病毒分离阳性,病理改变较轻,可能与病毒直接侵染心肌有关。感染后15天,心肌病毒分离阴性,但病变加重,显然病毒本身的因素已不能解释此期病变,可能是免疫病理反应所致。研究证明,T细胞从病毒感染后5—21天均发生变化,表现为脾脏$Lyt2^+$细胞和$L3T4^+$细胞增高,其改变与心脏病理改变一致,说明T细胞亚群在病毒性心肌炎的发病中确实起着重要作用。文献所道[5,7],T细胞可溶解心肌细胞和引起炎症反应,并认为致细胞病变的主要是$Lyt2^+$细胞,而$L3T4^+$细胞则主要引起炎症反应。本研究对$Thy1,2^+$细胞的检测结果不甚规律,其参与心肌损伤的作用尚不甚清楚。作者认为脾脏中$Lyt2^+$细胞和$L3T4^+$细胞可通过血液循环等途径进入心脏组织。通过释放免疫因子和直接破坏心肌细胞诱导心肌炎。Kishimoto等[2]实验发现VM小鼠模型,外周血和脾脏所有T细胞均降低,与本文结果不甚一致。

病毒感染后1周,病毒分离阳性,且T细胞已发生改变,但病变较轻,而感染后15天,病变加剧,与血清抗心脏肌球蛋白抗体的产生及滴度成正相关。据此推断,该抗体可能参与心肌炎的发病。文献报道[4],CVB_3感染的小鼠产生的抗心肌抗体主要作用于心脏球蛋白的重链,它可通过T细胞介导的免疫引起心肌损伤[8],同时$L3T4^+$细胞的增高,可促进B细胞产生该抗体。抗心肌抗体从病毒感染后15天开始产生,第21天血清中的滴度进一步增加,与文献报道结果一致[4,9,10]。该抗体产生的机制尚不清楚,可能与病毒感染使心脏肌球蛋白暴露有关[11]。总之,病毒性心肌炎是由多因素引起的,病毒感染是其发病的直接诱因,而免疫因素则起着重要作用。研究心肌炎的发病机理,对心肌炎的临床治疗有着重要理论意义。

参 考 文 献

1 Woodruff JF. Viral myocarditis. A review. Am J Pathol, 1980; 101(2): 427-479

2 Kishimoto C, Ph. D, Misaki T, *et al*. Serial immunologic identication of lymphocyte subsets in murine coxsackie B_3 myocarditis; different kinetics and significance of lymphocyle subsets in the heart and peripherical blood. Circulation, 1988; 77(3): 645-653

3 Pollard TD. Purification of nonmusele myosin. Method Enzymol, 1982; 85: 331-337

4 Neu N, Beisel KW, Traystman MD, *et al*. Autoantibodies specific for the cardiac myosin isoform are found in mice susceptible to coxsackievirus B_3-induced myocarditis. J Immunol, 1987; 2488-2492

5 杨曼珍,郭棋,金佩英,等. 急性病毒性心肌炎发病机理的探讨. 中华微生物学和免疫学杂志, 1987; 7(2): 92-94

6 刘晶星,陆德源,沈鼎鸿,等. 病毒性心肌炎致病机理的实验研究. 上海第二医科大学学报, 1990; 10(1): 18-21

7 Estrin M, Huber SA, Ph D. Coxsackievirus B3-induced myocarditis. Am J Pathol, 1987; 127(2): 335-341

维普资讯 http://www.cqvip.com

8 Smith SC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T cell modialed disease. J Immunol, 1991; 147(2): 2141-2147

9 Alvaarez FL, Neu N, Rose NR, *et al*. Heart-specific autoantibodies induced by coxsackievirus B3. Clinical Immunology Immunopathology, 1987; 43: 129-139

10 Wolfgram LJ, Beisel KW, Rose NR. Heart-specific autoantibodies following murine coxsackievirus B3 myocarditis. J Exp Med, 1985; 161: 1112-1121

11 Neu N, Craig SW, Rose NR, *et al*. Coxsackievirus induced myocarditis in mice: cardiac myosin autoantibodies do not cross-react with the virus. Clin Exp Immunol, 69: 566-574

Studies on the Pathogenic Mechanism of Viral Myocarditis ——Assay of Lymphocyte Subsets and Anti-cardiac Antibodies

Wang Xidong Chen Chenhua Yu Xiuping Dong Jiede Qiu Suying

(*Department of Microbiology, Shangdong Medical University, Jinan* 250012)

In this study, we established myocarditis model by using coxsackie type B3 inoculation. Results of the study revealed the following: 5 days after inoculation, the percentage of Thyl cells in the spleen of infected mice was increased, then it was decreased significantly on day 7, 15 and 21. $L3T4^+$ subsets were increased on days 7, 15 and 21. Anti-cardiac antibodies in the serum of infected mice were increased after inoculation. Virus was isolated from all the hearts of infected mice on days 3 and 5. The percentage of positive viral isolation were decreased on day 7. Focal necrosis appeared in the myocardium with small lymphocytes infiltration on day 5. Myocardiac necrosis and inflammatory cell infiltration became more severe on day 7. and the ventricular cavity began to dilatate on days 15. Capillary and fibroblast in the necrotic area appeared on day 21. The above results revealed that T lymphocyte subsets, anti-cardiac antibodies and virus itself all may be associated with viral myocarditis.

Key words Coxsackie virus type B3, Animal model, Myocarditis, T lymphocyte subsets, Anti-cardiac antibody