

· 论 著 ·

病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡和坏死的研究

王述昀, 马沛然, 牟道玉

(山东大学医学院病理生理教研室, 山东 济南 250012)

[摘 要] 目的 探讨病毒性心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡与坏死之间的相互关系。方法 用4周龄 Balb/c 雄性小鼠腹腔接种柯萨奇 B₃ 病毒(CVB₃)制成病毒性心肌炎小鼠模型, 采用膜联蛋白 V 联合 PI 染色双参数技术(Annexin V/PI)在流式细胞仪上定量检测心肌细胞的凋亡和坏死。结果 病毒性心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡百分率和坏死百分率均显著高于正常对照小鼠($P < 0.01$), 并且心肌细胞凋亡百分率及坏死百分率均与心肌病理积分呈正相关($r = 0.70, P < 0.01$ 和 $r = 0.93, P < 0.01$)。结论 病毒性心肌炎小鼠同时存在着心肌细胞的凋亡和坏死, 两者均与心肌病理损害程度密切相关, 为病毒性心肌炎的重要病理过程。

[关 键 词] 心肌炎, 病毒性, 心肌细胞, 凋亡, 坏死, 小鼠

[中图分类号] R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)01-0005-03

Apoptosis and Necrosis of Myocardial Cells
in Mice with Viral Myocarditis

WANG Shu-Yun, MA Pei-Ran, MU Dao-Yu

Department of Pathophysiology, Shandong University College of Medicine, Jinan 250012, China

Abstract : **Objective** To investigate the relationship between apoptosis and necrosis of myocardial cells in murine myocarditis. **Methods** Four-week-old male Balb/c mice were inoculated with Coxsackievirus B₃ (CVB₃) intraperitoneally as myocarditis models. Annexin V/PI and flow cytometry were used to detect quantitatively the myocardial cell apoptosis and necrosis. **Results** The percentage of myocardial cell apoptosis and necrosis in mice with viral myocarditis was much higher than that in normal controls($P < 0.01$). Both the percentages of apoptosis and necrosis in myocardial cells were correlated positively with the myocardial histopathological score($r = 0.70$ and $r = 0.93$, respectively, $P < 0.01$). **Conclusions** There are cell apoptosis and necrosis simultaneously in myocardial cells of viral myocarditis. Both the myocardial cell apoptosis and necrosis are closely correlated with the severity of cardiopathological alterations.

Key words : Myocarditis, viral; Myocardial cell; Apoptosis; Necrosis; Mouse

细胞凋亡,即细胞程序化死亡,是不同于细胞坏死的另一种细胞死亡。近年研究发现心脏疾患中心肌细胞的死亡不仅仅由细胞坏死引起,还有部分是由于细胞凋亡造成的。我们采用膜联蛋白 V(Annexin V)联合碘化丙啶(PI)染色双参数技术即 Annexin V/PI 法定量检测了柯萨奇 B₃ 病毒(CVB₃)所致心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡与坏死,并对两者间的关系进行了研究。

1 材料和方法

1.1 病毒与动物

CVB₃(Nancy 株)由山东省医学科学院提供,在 Hela 细胞上传代繁殖,并冻融 3 次,病毒滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml。40 只 4 周龄 Balb/c 雄性小鼠由中国医学科学院实验动物研究所提供(二级实验动物)随机等分为 2 组:实验组每只小鼠腹腔接种

[收稿日期] 2001-03-27; [修回日期] 2001-09-15
[作者简介] 王述昀(1966-)女,博士,讲师。

0.1 ml $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml 的 CVB₃ 病毒液 ;对照组接种 0.1 ml 不含病毒的 Eagle 's 液。接种后 3 d ,7 d ,10 d ,14 d 每组分别处死 5 只小鼠 ,无菌取心脏 ,一半心脏用 4 %多聚甲醛固定 ,作常规病理切片 ;一半心肌组织剪碎为 0.5 mm³碎块 ,用 0.1 %胰蛋白酶消化 5 次 ,提取心肌细胞。

1.2 病理学检查及结果半定量

光镜下观察 HE 染色心肌病理改变 ,采用 Rezkalla 法^[1]计算心肌病理积分 ,即每张切片取 5 个高倍视野 ,计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野的面积之比。无病变计 0 分 ,病变 <25 %计 1 分 ,25 %~50 %计 2 分 ,50 %~75 %计 3 分 ,>75 %计 4 分。

1.3 Annexin V/PI 法定量检测心肌细胞凋亡及坏死

Annexin V/PI 试剂由北京医科大学免疫室惠赠。将提取的心肌细胞用 PBS 将细胞浓度调为 10^6 /ml ,分别加入 10 μl FITC-Annexin V 及 10 μl PI 混匀 ,室温下避光放置 15 min ,上流式细胞仪(FACSscan 美国 BD 公司)进行分析 ,FITC 受激发后发绿色荧光 ,PI 发红色荧光 ,每份标本收集 10 000 个细胞 ,在 Macintosh Quadra 650 计算机上用 Cell Quest Plot 软件分析数据 ,HP-DeskJet1200C/PS 打印机打印结果。

1.4 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间比较用 *t* 检验和相关分析。

2 结果

2.1 病理学检查

实验组小鼠均存活并出现不同程度的心肌病理改变 ,心肌组织可见局灶性炎症病变 ,以炎性细胞浸润为主 ,有散在的心肌变性坏死 ,严重者心肌广泛坏死、钙化 ;心肌病变积分平均为 2.05 ± 0.74 。对照组小鼠心肌为正常心肌表现 ,无病理改变。

2.2 心肌细胞的凋亡与坏死

正常小鼠心肌细胞也存在凋亡 ,但无坏死存在 ;病毒性心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡百分率与坏死百分率均显著高于正常对照小鼠 ($P < 0.01$) ,见表 1。凋亡百分率与坏死百分率两者呈正相关 ($r = 0.73$, $P < 0.01$) ,见图 1。正常细胞 FITC 及 PI 均低染 (FITC⁻ ,PI⁻) ,在流式细胞分析图上为左下象限细胞簇 ,见图 2A ;凋亡细胞 FITC 高染而 PI 低染 (FITC⁺ ,PI⁻) ,图上显示为右下象限细胞簇 ;坏死细胞 FITC 及 PI 均高染 (FITC⁺ ,PI⁺) ,图上显示为右上象限细胞簇 ,见图 2B。

表 1 实验组和对照组心肌细胞凋亡与坏死百分率比较

Table 1 Comparison of the percentage of cardiac cellular apoptosis and necrosis between the viral myocarditis group and the control group ($n = 5$, $\bar{x} \pm s$,%)

组别	时间	细胞凋亡	细胞坏死
对照组	第 3 天	0.08 ± 0.01	0
实验组		9.05 ± 0.93 ^a	3.29 ± 0.76 ^a
对照组	第 7 天	0.10 ± 0.01	0
实验组		13.27 ± 1.08 ^a	10.38 ± 1.25 ^a
对照组	第 10 天	0.09 ± 0.02	0
实验组		18.32 ± 1.58 ^a	11.17 ± 1.18 ^a
对照组	第 14 天	0.07 ± 0.02	0
实验组		14.26 ± 1.34 ^a	13.56 ± 1.69 ^a

注 :a * 与对照组相比 $P < 0.01$

2.3 心肌细胞凋亡与坏死和病理积分的关系

心肌细胞凋亡与坏死百分率同心肌病理积分均呈显著直线相关 ($r = 0.70$, $P < 0.01$; $r = 0.93$, $P < 0.01$) ,见图 3。

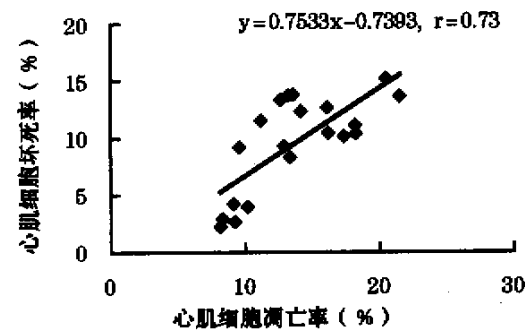


图 1 CVB₃ 心肌炎小鼠心肌细胞凋亡与坏死百分率相关分析图

Figure 1 Correlation between the percentage of myocytes apoptosis and myocytes necrosis in CVB₃ murine myocarditis

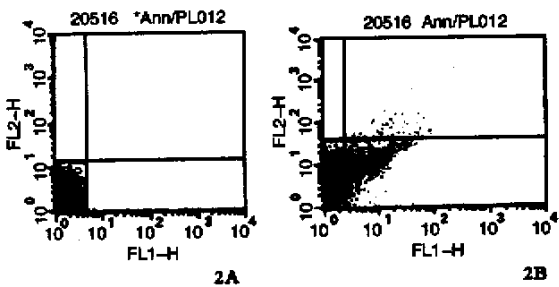


图 2 正常小鼠 (2A) 和感染 CVB₃ 第 10 天心肌炎小鼠 (2B) 心肌细胞凋亡和坏死流式分析图

Figure 2 Apoptosis and necrosis of myocardial cells with flow cytometry in the normal mouse (2A) and mouse of 10 d after CVB₃ myocarditis

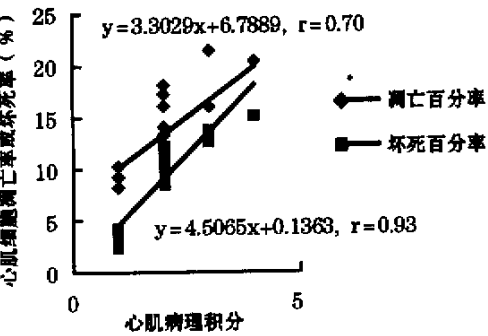


图 3 CVB₃ 心肌炎小鼠心肌细胞凋亡与坏死百分率和心肌病理积分的相关分析图

Figure 3 Correlation between the percentage of myocytes apoptosis or necrosis and the myocardial histopathological score in CVB₃ murine myocarditis

3 讨论

细胞的死亡方式有两种 :一种是病理学上的细胞坏死 ,一种是生理上的细胞程序化死亡即细胞凋亡。细胞凋亡是与坏死截然不同的两个过程 ,细胞凋亡常在有害信号的温和刺激下或个体发育中发生^[2] ,形态学特点是细胞体积小、核染色质浓缩、核仁裂解、DNA 碎片化、出现凋亡小体 ,但不诱发炎症。而细胞坏死是细胞遭受到致死性损伤后发生的细胞死亡 ,其形态学特点为细胞肿胀、细胞膜破裂、胞浆内容物外泄 ,引发组织器官发生一系列炎症反应。

细胞凋亡的定量检测常需借助流式细胞仪检查。最早出现的是 PI 染色法 ,但该方法不能检出早期凋亡细胞。目前国内外最为常用的是检测 DNA 断裂点的核酸末端标记法(TUNEL) ,该方法可检出早期凋亡细胞 ,灵敏性较高 ,但缺点是坏死细胞亦呈现阳性 ,因而特异性降低。1995 年 Vermes 首次使用荧光素标记的膜联蛋白 V(FITC-Annexin V)联合 PI 染色双参数技术定量检测凋亡细胞 ,该方法可将正常细胞、凋亡细胞、坏死细胞区分开来 ,而且细胞无需固定 ,因此该方法省时、方便 ,凋亡检出率更有特异性 ,结果更为可靠。

诱导细胞凋亡的因素很多 ,凋亡和坏死在病因方面并无严格的界限 ,同一种因素既能诱导细胞凋亡 ,也能产生坏死 ,而细胞死亡的类型取决于其所受损害的严重程度而不是损害本身的性质^[3]。病毒是调控细胞凋亡的重要因素之一。病毒感染后 ,一

方面机体运用细胞凋亡的手段 ,通过牺牲个别细胞来消除外物 ;另一方面 ,病毒为维持自身的存活与繁殖 ,调控宿主细胞凋亡 ,引起宿主病理损伤^[4]。我们通过采用 Annexin V/PI 双参数法对 CVB₃ 感染的心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡和坏死进行了定量检测 ,并同病理改变进行对照研究 ,结果发现 CVB₃ 心肌炎小鼠心肌细胞凋亡百分率和坏死百分率显著高于正常小鼠 ,且心肌细胞凋亡与坏死呈直线相关 ,两者均与病理改变程度密切相关。以上说明细胞凋亡可与细胞坏死同时存在 ,心肌细胞的死亡可能是以细胞凋亡开始的 ,随着病毒、缺血、缺氧等有害因素的刺激 ,细胞凋亡增加 ,更进一步加重细胞的缺血、缺氧 ,直到造成细胞坏死 ,使凋亡与坏死交替发生。因此 ,通过挽救、阻止心肌细胞凋亡 ,减少心肌细胞坏死 ,将会为病毒性心肌炎的治疗开辟新的途径。

[参 考 文 献]

[1] Rezkalla S , Kloner RA , Khatib G , et al. Effect of metoprolol in acute Cocksackievirus B3 murine myocarditis [J] . J Am Coll Cardiol , 1988 , 12 (8) : 412 - 414 .
[2] Majno G , Joris I. Apoptosis , oncosis , necrosis : an overview of cell death [J] . Am J Pathol , 1995 , 146 (1) : 3 - 15 .
[3] Kerr JFR , Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis : an historical perspective [A] . In : Tomei LD. The molecular Basis of Cell Death [M] . Plainview , NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1991 , 5 - 29 .
[4] Esoler LM. Park SW , Hardwick JM , et al. Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cell [J] . J Virol , 1995 , 69 (6) : 3955 - 3958 .

(本文编辑 刘丽旭)