

· 实验研究 ·

肿瘤坏死因子- α 单抗对小鼠病毒性心肌炎的影响

张敏, 黄星原, 麦根荣, 刘兴莲

(武汉大学人民医院儿科, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 目的 探讨细胞间粘附分子-1(ICAM-1)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在心肌炎发病中的作用及TNF- α 单克隆抗体预处理对其的影响,为临床治疗提供实验依据。方法 Balb/c 雄性小鼠随机分为三组:正常对照组、柯萨奇 B₃ 病毒感染组和病毒感染加 TNF- α 抗体干预组,采用光镜、电镜和免疫组织化学测定不同时期心肌病理变化、超微结构改变和心肌 ICAM-1 与 TNF- α 的表达。结果 光镜和电镜结果显示干预组心肌病理变化和超微结构改变较感染组减轻;免疫组织化学结果显示干预组 ICAM-1 及 TNF- α 的表达较感染组减轻(7 d: 14.71 ± 1.94 vs 18.80 ± 2.62 , $P < 0.01$ 和 16.70 ± 2.90 vs 20.63 ± 1.95 , $P < 0.05$; 14 d: 17.49 ± 2.58 vs 23.51 ± 3.50 , $P < 0.01$ 和 19.29 ± 3.21 vs 24.64 ± 2.97 , $P < 0.01$);感染组 TNF- α 与 ICAM-1 的表达呈正相关($r = 0.706$, $P < 0.05$),TNF- α ,ICAM-1 的表达与心肌病变积分呈正相关($r = 0.737$, $P < 0.05$; $r = 0.693$, $P < 0.05$)。结论 TNF- α 与 ICAM-1 在病毒性心肌炎小鼠的发生发展中发挥重要作用,抗 TNF- α 单克隆抗体抑制其表达,对受损心肌有保护作用。 [中国当代儿科杂志,2005,7(3):249-252]

[关键词] 病毒性心肌炎;细胞间粘附分子-1;肿瘤坏死因子- α ;小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)03-0249-04

Effect of anti-TNF-alpha monoclonal antibody on viral myocarditis in mice

Min ZHANG, Xing-Yuan HUANG, Gen-Rong MAI, Xing-Lian LIU. Department of Pediatrics, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China (Email: zm7562@163.com)

Abstract: Objective This study was aimed to investigate the expressions of ICAM-1 and TNF- α in viral myocarditis and the effect of anti-TNF-alpha monoclonal antibody on viral myocarditis in mice. **Methods** Sixty-six male Balb/c mice were randomly assigned into an Infection group ($n = 30$), an Intervention group ($n = 18$) and a Normal control group ($n = 18$). The Infection and Intervention groups were inoculated intraperitoneally with 0.2 mL TCID50 10^{-6} /mL coxsackie B₃ (CVB₃) solution. Anti-TNF-amAb [0.1 mL/(kg·d)] was additionally administered starting at 1 day before CVB₃ virus inoculation until day 5 in the Intervention group. On the 7th and 14th days after virus inoculation, the changes of histopathology and ultrastructure of myocardium were studied with light and electron microscopy. The expressions of ICAM-1 and TNF- α were detected by immunohistochemical method. **Results** Myocardium histopathology of mice in the Normal control group was normal. Myocardial necrosis and cellular infiltration were more prominent in the Infection group than in the Intervention group. ICAM-1 and TNF- α were expressed in the myocardium of Normal control group at a very low level, which were significantly lower than those in the Infection and Intervention groups. The expressions of ICAM-1 and TNF- α were dramatically reduced in the Intervention group compared with those in the Infection group. In the Infection group, a positive correlation was found between the expressions of ICAM-1 and TNF- α ($r = 0.706$, $P < 0.05$); and both ICAM-1 expression and TNF- α expression were positively related to pathological scores of myocardium ($r = 0.737$, $P < 0.05$; $r = 0.693$, $P < 0.05$). **Conclusions** ICAM-1 and TNF- α may play important roles in the pathogenesis of viral myocarditis. Anti-TNF-alpha monoclonal antibody has protective effects on myocardial tissues by inhibiting the ICAM-1 and TNF- α expression. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(3): 249-252]

Key words: Viral myocarditis; Inter cellular adhesion molecule-1; Tumor necrosis factor-alpha; Mice

病毒性心肌炎的发病与免疫因素有关,细胞间粘附分子-1(inter cellular adhesion molecule-1, ICAM-1)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)在病毒性心肌炎免疫病理过程中的作

用已受到广泛关注。为进一步探讨粘附分子和细胞因子在病毒性心肌炎发生发展中的作用,我们检测病毒性心肌炎小鼠心肌 ICAM-1 和 TNF- α 的表达,同时研究抗 TNF- α 单克隆抗体(anti-tumor necros-

isfactor- α monoclonal antibody, anti-TNF- α Ab) 预处理对其的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组

4~6周龄 Balb/C 雄性小鼠 66 只, 体重 12~14 g, 合格证 SCXK(鄂)2003-0005, 购于湖北省医学科学院。随机分为三组: 正常对照组(对照组, $n=18$)、柯萨奇 B₃(coxsackievirus B₃, CVB₃) 病毒感染组(感染组, $n=30$) 和 CVB₃ 病毒感染加 TNF- α 抗体干预组(干预组, $n=18$)。

1.2 病毒性心肌炎模型制作

CVB₃Nancy 株为湖北省医学科学院保存, 半数组织感染致死量 TCID₅₀ 为 10^{-6} /mL。感染组和干预组腹腔接种 0.2 mL TCID₅₀ 10^{-6} /mL 的 CVB₃ 病毒液, 对照组腹腔接种 0.2 mL 不含病毒的 Eagle's 液, 定病毒接种日为 0 d; 干预组在病毒接种前 1 d 开始腹腔注射 anti-TNF- α Ab(美国, eBioscience 公司), 每只 0.1 mg/(kg·d) 溶于 0.9% 生理盐水 0.1 mL 中, 连续 6 d, 对照组和感染组腹腔注射等量生理盐水。

1.3 标本采集

接种后第 7, 14 d 各组随机抽取 5 只小鼠断颈处死取心脏。将心脏沿左室中线切为两半, 一半用 10% 甲醛固定待作病理组织学和免疫组织化学检查, 另一半用 2.5% 戊二醛固定待作电镜检查。第 14 d 取心肌组织前称取小鼠体重(body weight, BW) 和心脏重量(heart weight, HW), 计算 HW(mg)/BW(g) 比值。

1.4 心肌病理组织学检查

常规苏木素-伊红染色, 光镜下观察心肌病理变化。每张切片在高倍镜下任选 5 个视野, 计算心肌病变积分。心肌病理评分标准: 0 分: 无心肌损害; 1 级: 1 或 2 个小病灶; 2 级: 数个小病灶; 3 级: 多个大病灶或严重的大病灶心肌损害; 4 级: 多个大病灶, 弥漫性浸润或坏死。

1.5 ICAM-1 和 TNF- α 的表达

抗鼠 ICAM-1 单克隆抗体(美国, Santa Cruz 公司), 抗鼠 TNF- α 多克隆抗体(美国, Biological 公司), 采用免疫组织化学方法, 石蜡包埋, 5 μ m 连续切片, 微波修复, 一抗工作浓度为 1:100, 操作按照试剂盒说明进行, DAB 染色, 苏木素复染, 以 PBS 代替一抗作阴性对照, 胞浆处有棕黄色或棕褐色颗粒状物质为阳性。结果采用 HPIAS-2000 图像分析软

件分析: 在 400 倍高倍镜下任选 5 个不重叠视野, 测定表达阳性信号指数, 阳性信号指数 = 阳性信号面积 $\times$ 阳性信号平均灰度/测定面积 $\times$ 100。

1.6 电子显微镜检查

心肌组织经 2.5% 戊二醛固定后, 按常规方法固定、脱水、渗透、包埋后制成超薄切片, 在透射电镜下观察、拍照。

1.7 统计学分析

采用 SPSS11.5 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, 相关分析采用直线回归法, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 心脏重量/体重(mg/g)

对照组 HW/BW 为 4.5 ± 0.2 , 感染组和干预组分别为 6.1 ± 0.4 和 5.4 ± 0.2 , 与对照组相比, 差异有极显著性($P < 0.01$), 干预组与感染组相比, 差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 心肌病理改变

对照组未见病变; 在接种 CVB₃ 后第 7 d 和 14 d, 感染组和干预组均可见大量的单核细胞浸润、局灶性心肌坏死等心肌炎病理改变, 感染组病变较重, 可见大片状及弥漫性炎性细胞浸润及心肌细胞坏死, 干预组较感染组减轻, 炎性浸润及心肌细胞坏死病灶少, 且均为小灶性。心肌病理变化积分见表 1。

表 1 抗 TNF- α 单克隆抗体对小鼠病毒性心肌炎心肌病理变化积分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	心肌病变积分	
	第 7 d	第 14 d
对照组	0	0
感染组	2.36 ± 0.57^a	2.84 ± 0.71^a
干预组	1.40 ± 0.47^{ab}	1.64 ± 0.50^{ab}

a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与感染组比较, $P < 0.05$

2.3 ICAM-1 和 TNF- α 的表达

对照组心肌未见 TNF- α 和 ICAM-1 阳性表达或呈弱表达(图 1A, 图 2A); 感染组炎症灶内浸润细胞及周围的心肌细胞胞浆内可见 TNF- α 阳性表达(图 1B), 炎性细胞及炎性灶周围心肌细胞及血管内皮细胞胞浆内可见 ICAM-1 阳性表达(图 2B); 干预组 TNF- α 和 ICAM-1 的表达较感染组减弱(图 1C, 图 2C)。TNF- α 和 ICAM-1 表达阳性信号指数见表 2。

表2 各组心肌组织中 TNF- α 和 ICAM-1 表达阳性信号指数
($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	第7d		第14d	
	TNF- α	ICAM-1	TNF- α	ICAM-1
对照组	2.37 $\pm$ 0.77	1.92 $\pm$ 0.52	2.40 $\pm$ 0.65	1.91 $\pm$ 1.06
感染组	20.63 $\pm$ 1.95 ^a	18.80 $\pm$ 2.62 ^a	24.64 $\pm$ 2.97 ^a	23.51 $\pm$ 3.50 ^a
干预组	16.70 $\pm$ 2.90 ^{ab}	14.71 $\pm$ 1.94 ^{ac}	19.29 $\pm$ 3.21 ^{ac}	17.49 $\pm$ 2.58 ^{ac}

a 与对照组比较, $P < 0.01$; b 与感染组比较, $P < 0.05$; c 与感染组比较, $P < 0.01$

2.4 心肌电镜检查

对照组未见病变, 线粒体排列整齐、规则(图3A); 感染组心肌细胞变性、坏死, 表现线粒体肿胀、嵴断裂减少, 呈空泡样改变(图3B), 肌丝溶解、断裂, 染色质边集, 细胞核异性变出现分叶; 干预组病变减轻, 线粒体可见轻度肿胀、嵴排列稍稀疏(图3C)。

2.5 TNF- α 和 ICAM-1 阳性信号指数与心肌病理

变化相关性分析

TNF- α 与 ICAM-1 阳性信号指数呈正相关($r = 0.706, P = 0.023$); TNF- α 、ICAM-1 阳性信号指数与心肌病变积分呈正相关($r = 0.737, P = 0.015$; $r = 0.693, P = 0.026$)。

3 讨论

病毒性心肌炎发病机制至今尚未完全阐明。目前认为病毒感染后的免疫反应是病毒性心肌炎发生发展的主要机制。ICAM-1 是免疫反应时细胞与细胞接触过程中起重要作用的粘附分子, 广泛存在血管内皮细胞、心肌细胞等多种细胞上, 在促进白细胞进一步粘附、激活及浸润中发挥作用^[1]。TNF- α 是一种主要由激活的单核巨噬细胞产生的具有多种生物学效应的细胞因子^[2]。研究表明 TNF- α 在病毒性心肌炎的炎症反应中起重要的作用^[3], 是机体

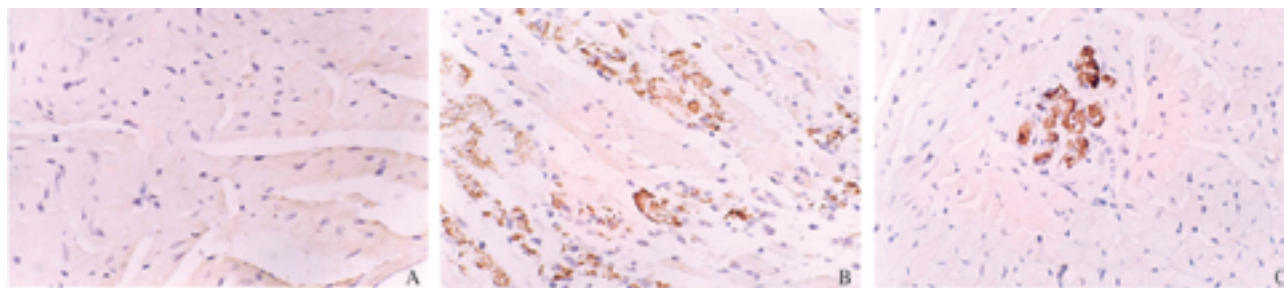


图1 各组心肌 TNF- α 的表达 (SP $\times 400$) A: 对照组; B: 感染组; C: 干预组

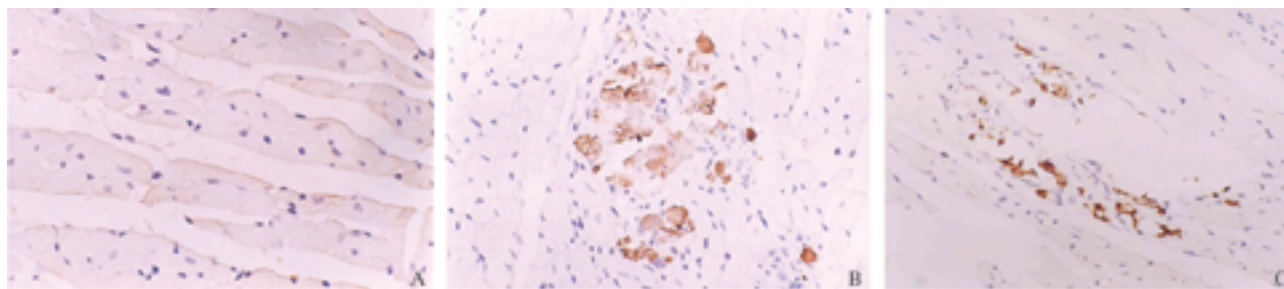


图2 各组心肌 ICAM-1 的表达 (SP $\times 400$) A: 对照组; B: 感染组; C: 干预组

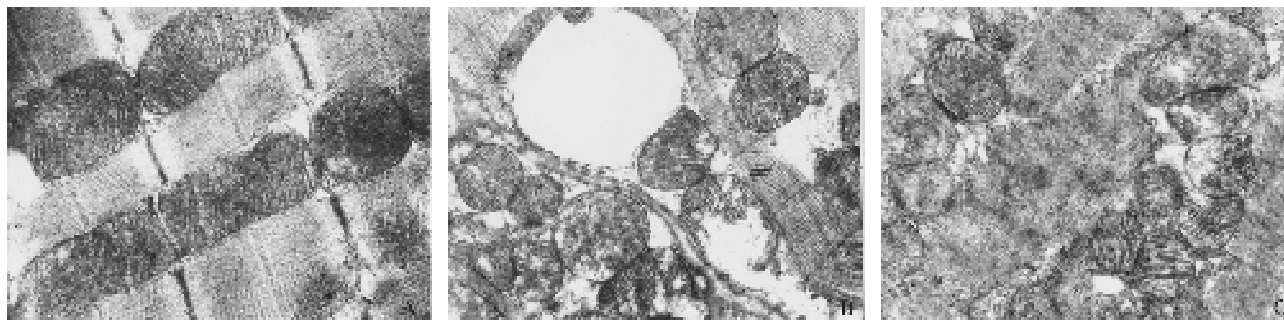


图3 各组心肌组织电镜改变 ($\times 17\,000$) A: 对照组; B: 感染组; C: 干预组

内重要的炎性介质,参与炎症反应,具有抗感染作用,诱发其它因子的释放,协同引起对机体的损害作用。目前认为 TNF- α 损伤心肌的主要机制可能与 TNF- α 激活内皮细胞、招募炎症细胞、增加炎症细胞因子的产生及抑制心肌收缩力等有关^[4]。

本实验结果表明 TNF- α 与 ICAM-1 阳性信号指数呈正相关,推测 TNF- α 在上调细胞粘附分子的表达,促进炎症细胞聚集粘附及活化的过程中起重要作用。TNF- α 等细胞因子可直接上调 ICAM-1 的表达水平^[5],粘附分子在细胞表面的表达,大多需要细胞因子的刺激并呈时间依赖性升高,TNF- α 在炎症中的一个重要作用是有效的导致粘附分子表达,导致中性白细胞在炎症部位聚集,引起组织损害^[6]。CVB₃感染机体后,由于病毒成分等刺激,激活体内单核巨噬细胞,产生并释放 TNF- α 等炎症细胞因子,机体在异常的 TNF- α 作用下,受损心肌作为抗原诱发体液和细胞免疫反应引起心肌损伤。在 TNF- α 等细胞因子作用下,通过 ICAM-1 与 LFA-1 结合,可招募中性粒细胞至炎症或免疫反应部位,促进中性粒细胞的粘附,在病毒性心肌炎炎症发生及免疫反应中起重要作用。

CVB₃病毒感染小鼠后 14 d 心脏重量/体重之比增加,7 d 和 14 d 心肌均可见 ICAM-1 和 TNF- α 阳性表达,14 d 表达水平增高明显,TNF- α 与 ICAM-1 阳性表达多分布在炎症灶内浸润细胞及周围的心肌细胞胞浆内。TNF- α 、ICAM-1 阳性信号指数与心肌病变积分呈正相关,表明病毒性心肌炎心肌组织的病理变化与粘附分子及细胞因子有关,揭示 ICAM-1 及 TNF- α 在心肌炎的发生发展中起重要作用。应用抗-TNF- α 单克隆抗体治疗后 TNF- α 及 ICAM-1 的表达较感染组减轻,心肌坏死及细胞浸润改善,细胞超微结构破坏减轻,心脏重量/体重之比减轻,与国外报道在脑心肌炎病毒感染所致病毒性心肌炎鼠模型中使用抗 TNF- α 相关抗体阻断细胞

因子可使心肌炎鼠的心肌细胞炎症反应明显改善相一致^[7]。在接种病毒前应用抗-TNF- α 单克隆抗体对 TNF- α 与 ICAM-1 的表达水平具有明显下调作用,有效地抑制了 TNF- α 和 ICAM-1 在心脏的表达,减少免疫效应细胞对心肌的攻击,从而减轻心肌的炎症浸润及坏死,维持其结构及功能完整。

TNF- α 与 ICAM-1 在病毒性心肌炎发病中具有重要的调节作用,应用抗-TNF- α 单克隆抗体对病毒性心肌炎受损心肌有保护作用,可能与抑制 TNF- α 与 ICAM-1 的表达有关。对 TNF- α 与 ICAM-1 在病毒性心肌炎发病中的研究深入,有望为临床防治病毒性心肌炎提供广阔应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Rothlein R. Overview of leukocyte adhesion [J]. *Neurology*, 1997, 49(5 Suppl 4): s3-s4.
- [2] Tabet JY, Lopes ME, Champagne S, Su JB, Merlet P, Hittinger L. Inflammation, cytokines and anti-inflammatory therapies in heart failure [J]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 2002, 95(3): 204-212.
- [3] Feldman AM, McNamara D. Myocarditis [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(19): 1388-1398.
- [4] Sack M. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 94(1-2): 123-135.
- [5] Sadeghi MM, Collinge M, Pardi R, Bender JR. Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction; involvement of an inhibitory G protein [J]. *J Immunol*, 2000, 165(5): 2712-2718.
- [6] Iwasaki M, Saito K, Sekikawa K, Yamada Y, Wada H, Mizuta K, et al. Tumor necrosis factor-alpha from bone marrow-derived cells is not essential for the expression of adhesion molecules in lipopolysaccharide-induced nasal inflammation [J]. *Cytokine*, 2003, 21(3): 129-136.
- [7] Yamada T, Matsumori A, Sasayama S. Therapeutic effect of anti-tumor necrosis factor-alpha antibody on the murine model of viral myocarditis induced by encephalomyocarditis virus [J]. *Circulation*, 1994, 89(2): 846-851.

(本文编辑:王霞)