

# 风湿性心脏病心肌细胞凋亡 与细胞因子的相关性

余红敏 乔彬 吴莉莉 蒋玉燕 司敏 许复郁 李少燕

(106 医院,山东济南 250022; 山东医科大学附属医院 济南 250001)

**摘要** 为探讨风湿性心脏病患者的**细胞凋亡**现象及其与细胞因子的相关性,对 20 例风心病换瓣者术中留取的新鲜瓣膜或心肌组织,采用原位杂交间接法检测 AP,并分别用放免法和双抗体夹心 ELiSa 法测定血清中的肿瘤坏死因子(TNF-a)及白细胞介素-6(ILc-6)。结果 20 例风心病患者心肌和心瓣膜标本中 AP 阳性 9 例占 45%;其血清中 TNF-a 为(4.81 ±2.67)μg/L,ILc-6(43.48 ±19.60)ng/L,均明显高于 AP 阴性组(3.05 ±1.23)μg/L、和(28.90 ±1.03)ng/L( $P < 0.05, 0.01$ ),且心功能越差者 TNF-a 及 ILc-6 的浓度越高。**结果表明 AP 参与风心病的病理生理过程,细胞因子为这一 AP 现象的诱导因素。**

**关键词** 风湿性心脏病 细胞凋亡 细胞因子

晚近研究表明**细胞凋亡(AP)**涉及多种心血管疾病<sup>[1]</sup>。这种 AP 现象是一种在基因调控下发生的细胞主动死亡过程。为进一步研究 AP 发生与细胞因子的关系,我们对此进行初探。

## 1 对象与方法

1.1 对象 选择非风湿活动期的风心病换瓣患者 20 例。男 8 例,女 12 例。年龄 35 ~ 58 岁,平均 45 岁。心功能 NYHA 分级 Ⅱ级 6 例、Ⅲ级 9 例、Ⅳ级 5 例。以 5 例意外交通事故死亡者作心肌 AP 对照。其中男 3 例,女 2 例;平均年龄 35 岁。以 20 例健康查体者的血清作细胞因子对照。其中男 10 例,女 10 例;年龄 25 ~ 45 岁,平均 32 岁。

1.2 方法 留取换瓣手术中新鲜心肌组织或心瓣膜 5 ~ 10mm(其中二尖瓣 12 例,主动脉瓣 3 例,心肌组织 5 例)即刻置入 10% 甲醛溶液中固定。AP 检测采用原位杂交间接法:使用美国 ZYMED 公司 2K-8008 试剂盒,常规制备 4μm 石蜡切片,捞片于硅烷化载玻片上,置恒温箱 65 °C 24h;二甲苯二级脱蜡,梯度酒精脱水;水洗后置于 IN 盐酸 60 °C 裂解 30min, PBS 洗 3 次,每次 5min,0.5% 蛋白酶 K 消化,室温下 10min,切片置于 pH6.0 枸橼酸缓冲液中,放入微波处理仪 94 °C 处理 10min, PBS 洗 3 次;加入 1:1000 正常小牛血清,再加 10ml 杂交液(生物素化探针),37 °C 孵育 1h,再以 PBS

洗 3 次,每次 5min。DAB 显色 5min,切片水洗后淡染 Harris 苏木素 10s;10% 盐酸酒精分化 2min,充分水洗 0.5% 氨水返蓝,充分水洗,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜观察。细胞因子检测:TNF-a 采用放免法测定;ILc-6 采用双抗体夹心 ELiSa 法。全部受试者均于晨空腹采静脉血 3ml,分离血浆 -20 °C 冰箱保存待测。

各组细胞因子检测数据先求出  $\bar{x} \pm s$ ,再采用  $t$  检验,AP 检测率采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 心肌 AP 检测 AP 阳性按每 10 个高倍镜视野查见 3 ~ 5 个凋亡小体为弱阳性(+),每 10 个高倍镜视野查见 10 个以上凋亡小体为阳性(+) ,每 10 个高倍镜视野查见 30 个以上凋亡小体为强阳性(++) ,(附照片)。结果 20 例风心病患者心肌组织 AP 阳性者 9 例,占 45%。5 例交通事故死亡者心肌 AP 均为阴性。两者经统计学处理为显著性差异( $P < 0.05$ )。9 例 AP 阳性者 6 例心功能 Ⅱ级的有 4 例为 AP(+),9 例心功能 Ⅲ级的有 3 例 AP 为 (+),5 例心功能 Ⅳ级的有 2 例 AP 为 (++)。即心功能愈差,AP 的阳性程度愈高。

2.2 细胞因子测定 风心病患者组血清中 TNF-a 及 ILc-6 含量均分别明显高于健康查体组( $P < 0.01, 0.05$ ,表 1),且心功能越差 TNF-a、ILc-6 的浓度越高。

表1 风心病患者血清 TNF- $\alpha$ 与 ILc-6检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/L}$ )	ILc-6( $\text{ng/L}$ )
正常组	20	1.28 $\pm$ 0.38	10.83 $\pm$ 6.81
风心病组	20	3.92 $\pm$ 2.86	39.24 $\pm$ 10.76
心功能 级	6	2.35 $\pm$ 0.35	24.32 $\pm$ 11.08
心功能 级	9	3.53 $\pm$ 1.01	37.65 $\pm$ 14.92
心功能 级	5	5.89 $\pm$ 1.36	58.76 $\pm$ 16.82

与正常组比  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ;与 、 级比  $P < 0.01$

2.3 AP与细胞因子的关系 AP阳性患者血清 TNF- $\alpha$ 及 ILC-6浓度显著高于AP阴性患者( $P < 0.05, 0.01$ ,表2)。

表2 AP阳性及阴性患者血清 TNF- $\alpha$ 及 ILc-6浓度( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF- $\alpha$ ( $\mu\text{g/L}$ )	ILC-6( $\text{ng/L}$ )
AP阳性	11	3.05 $\pm$ 1.23	28.90 $\pm$ 1.03
AP阴性	9	4.81 $\pm$ 2.67*	43.28 $\pm$ 19.60

与AP阴性组比 \* $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$

### 3 讨论

AP是一种特殊的自身程序性细胞死亡形式。这种由局部生理性或病理性刺激引起的AP现象是受基因或其他生物活性物质调控的。以往认为心肌细胞不发生AP<sup>[2]</sup>,但目前文献报道各种损伤均可诱导心肌发生AP,如

缺血、再灌注、机械性牵张和由心瓣膜病变引起的压力负荷超载等,心肌细胞可在心瓣膜病慢性压力负荷过重的情况下发生AP,细胞数目的减少及心肌组织的纤维化这些病理性改变则是造成心肌功能障碍的主要决定因素<sup>[3]</sup>。而心肌细胞的减少则可能就是由AP所致。本组风心病患者心肌细胞或心瓣膜中45%的AP阳性结果,提示AP参与风心病的病理生理过程。我们认为这种AP现象的发生可能系通过风湿活动的反复发作引起瓣膜充血、肿胀、纤维化及腱索乳头肌的粘连,这些均可导致不同程度的心肌损伤而诱导心肌AP,最终导致心力衰竭。

国外有研究表明细胞因子,TNF- $\alpha$ 及白介素是AP的促发因素,并可能是通过一定信号的传递方式激活生存或死亡相关基因,由此控制细胞的死亡<sup>[4]</sup>。本组风心病患者心功能愈差其细胞因子的浓度愈高,AP阳性程度亦愈重。AP(+)较AP(-)患者血清中细胞因子的浓度明显增高又进一步表明细胞因子对心肌AP现象的发生发展关系密切。有人报道TNF- $\alpha$ 可直接损伤心肌纤维,使细胞间质分

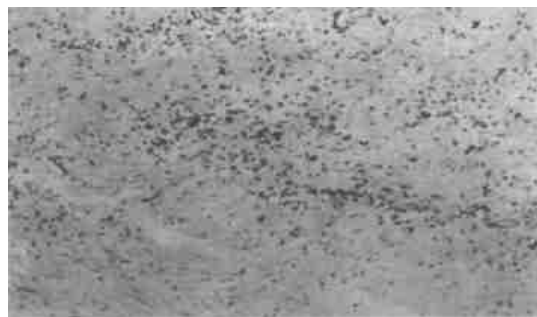


图1 AP阳性A 原位杂交  $\times 100$  AP(+)

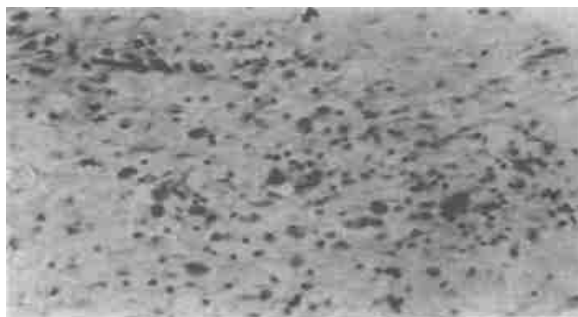


图2 风心病患者AP阳性片 原位杂交  $\times 100$  AP(+)

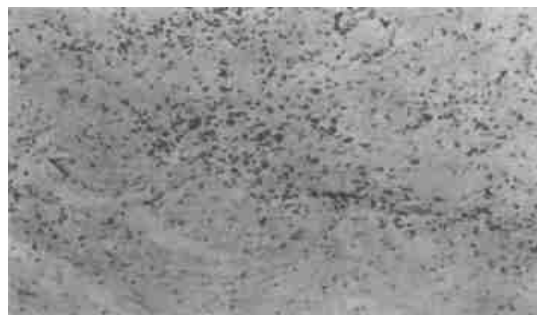


图3 AP强阳性片 原位杂交  $\times 100$  AP(++)

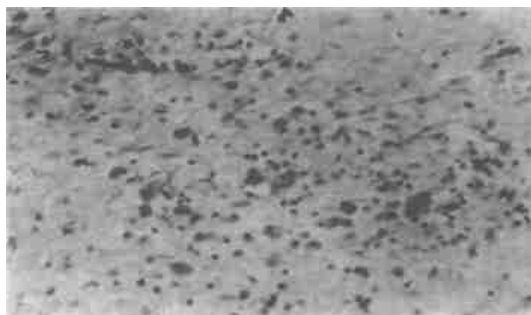


图4 风心病患者AP阴性片 原位杂交  $\times 100$

# 胆固醇脂质体对兔肾盂输尿管交界处平滑肌细胞的损害作用

严泉剑 郭金龙 刘恩靖 王洪同

(148 医院,山东周村 255300)

**摘要** 为探讨胆固醇脂质体 cholestrol liposome,对兔肾盂输尿管交界处平滑肌细胞的损伤作用,分离幼兔肾盂输尿管交界处平滑肌,采用复合酶消化法行原代培养,人工制作胆固醇胆固醇脂质体,按不同浓度作用细胞后行显微镜、原位包埋电镜观察,电镜示经胆固醇脂质体作用后的平滑肌细胞部分细胞器肿胀、扩张、微丝有明显分开、减少趋势、提示胆固醇可引起平滑肌细胞膜、细胞器的损害。

**关键词** 平滑肌细胞 细胞培养

笔者等通过体外肾盂输尿管交界处平滑肌(UPS)细胞培养方法,观察胆固醇脂质体(cholestrol liposome,CL)对 ups 细胞的损害作用,旨在为高胆固醇血症可引起肾盂输尿管交界处平滑肌损伤提供证据。

## 1 材料和方法

**1.1 UPS 细胞培养** 按文献 [1,2] 的方法取 1 月龄新西兰幼兔 1 只,氯胺酮麻醉后,无菌操作分离肾盂输尿管交界处,刮去表面结缔组织,置入加有培养液的直径 3cm 培养皿中,于解剖显微镜下仔细剥离筋膜和微小血管,放入超净间,依次采用 0.05% 胶原酶(Ⅰ型, Sigma)和 0.125% 胰酶消化后行原代培养。培养液采用美国 GIBCORPMI-1640 和 DMEM 培养基,浙江金华清湖犊牛应用研究站产胎牛血清。传代细胞经 Actin 染色(ABC 法),阳性率达 90% 以上。

**1.2 CL 的制备** 采用 New 等的改良方法<sup>[3]</sup>,用上海化学试剂厂产 50mg 胆固醇(分析纯),混合北京海淀区微生物培养基制品厂

100mg 鸡蛋卵磷脂,按摩尔比 1:1 制作 CL,保存于 4℃ 并于当天使用。使用前用 0.45μm 微孔滤膜过滤后,以 3 倍浓度的 DMEM 或 RPMI-1640 含血清培养液调至所需浓度。

**1.3 显微镜观察** 将 CL 按 B 组 0.5g/L 和 C 组 1.0g/L 浓度分别加入种植第四代细胞的培养皿中,与 A 组(正常组)一起同时在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 20h,经 PBS 漂洗后用奥地利产倒置显微镜观察细胞结构特征变化。

**1.4 透射电镜观察** 均采用原位包埋法,将细胞传代种植于六孔培养板,待快长满时,按以上分组,每组设 2 孔,继续培养 20h,行原位包埋,日本产 JEM-2000EX 电镜观察细胞超微结构变化。

## 2 结果

**2.1 显微镜观察** 倒置显微镜下 3 组培养的 ups 细胞呈纤维样单层生长,正常胞质内透明无杂质,加入 CL 的两组细胞质内均见浓密,大小不等点状颗粒,随 CL 浓度增加,细胞受抑加重,其中 B 组细胞明显增殖,除胆固醇脂质体

裂,重新分布并使毛细血管液体渗出造成心肌水肿,同时细胞因子还可诱发心肌细胞的诱导型一氧化氮合成酶导致细胞死亡的增加<sup>[5]</sup>,据此表明细胞因子在 AP 中起重要的诱导作用。

## 参考文献

1 刘京波. 细胞凋亡与心血管疾病. 心血管病学进展, 1997, 18(1): 6  
2 Jay N, Cohn Michael R, Kenneth R, et al. Report of the

national heart lung and blood institute special emphysema panel on heart failure research. *Circulation*, 1997, 95(4): 766

3 Harris Perlman, Luc Maillard, Kevin Krasinski, et al. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation*, 1997, 95(4): 981

4 谢志泉, 刘伊丽. 心血管疾病细胞凋亡的现状与意义. *国外医学(心血管分册)*, 1999, 26(1): 3

5 Pinsky DJ, Yang Y, Aji W, et al. Nitric oxide induce apoptosis of adult rat cardiac myocytes. *Circulation*, 1995, 92(1): 565

(收稿: 1999-06-14 修回: 1999-08-10)