维普资讯 http://www.cqvip.com

83-84

分子生物学在病毒性心脏病研究中的应用

病毒性心脏病，分子生物学，心肌炎，

临床学院内科 陈建斌 综述 饶邦复 审校

中图分类号 R453 R540.2

病毒性心脏病(VHD)是指与病毒感染有关的心脏病，包括病毒性心肌炎(VMC)及部分扩张型心肌病(DCM)，其发病率日益增加。小核糖核酸(RNA)病毒中的柯萨奇B组病毒(CVB)是该病的主要病原体。据文献报道，CVB引起的心肌炎(MC)约占急性VMC的40－50%。CHD的诊断有赖于病原体的检测。分子生物学中的核酸杂交技术，就是基于对待检核酸序列的研究，人工体外合成与之互补的全长核苷酸链或核苷酸片段，与标本中待检核酸进行杂交，从而达到检测核酸片段的目的。其主要优点是无需标本上完整的活性病毒，只要有感染中或感染后遗留的核酸片段就可检测到，因而不论发病早期、慢性期均可应用。目前常用的有三种方法，即斑点杂交(slot－blot)、聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction，PCR)及原位杂交(in instu)。Klump[1]以全长CB_3复制DNA(cDNA)确定了CB_3RNA序列，发现CB_3与其它CB(CB_1及CB_4)间核苷酸序列同源性为80%。肠道病毒核酸(EV_sRNA)核苷酸序列高度同源性的研究，开辟了核酸杂交技术的新纪元，为合成可以检测多种EV_sRNA的探针提供了基础。而前者的应用，无疑将明显提高标本中EV_sRNA的检出率。

1 动物实验

VHD模型动物心肌标本EV_sRNA的检测及其致病机理探讨可以为人VHD研究提供方法学。Weiss等[2]用CB_3特异探针检测CB_3感染小鼠心肌标本，阳性率为85.7%；刘晶星等[3]用CB_3m感染BALB/C系小鼠，心肌标本经扩增后与cDNA探针杂交，阳性率为85.2%；Kandolf等[4]、Easton[5]报道用原位杂交技术在DCM小鼠心肌中，EV_sRNA检出率分别为21%及46%。有实验还表明，病毒感染后可在心肌组织中持续存在一段时间，慢性VMC及部分DCM心肌中亦有病毒持续性感染。Okada等[8]使用含5'端基因序列的cDNA探针检测CB_3感染的C_3H/He系小鼠心肌，从感染后第2天至21天均能检测到CB_3基因片段；Weel等[7]在脑神经病毒感染的小鼠心肌标本中，于病程的第42天尚检测到病毒核酸；Kyu等[6]从VMC向DCM转化的小鼠心肌标本，于病毒感染后第90天仍检出EV_sRNA。核酸杂交技术的应用，不仅在VHD小鼠心肌标本中检测到EV_sRNA，而且也是研究其发病机理的有效方法。Easton[5]使用原位杂交技术发现标记的cDNA探针与EV_sRNA杂交信号明确定位于心肌细胞内；受累心肌呈多灶性、随机性分布；病毒在细胞间存在直接播散趋势；心肌组织中的血管内皮细胞中也发现阳性杂交信号，提示可能与病毒的血源扩散有关。Kandolf等[4]研究结果也同样提示病毒在心肌细胞中存在直接扩散的可能。刘晶星等[3]、解立颖等[9]除支持上述观点外，还发现在感染初期，病毒核酸主要出现在心外膜、心耳及心肌四周，随着疾病的进展，病毒逐渐扩展到整个心脏；于感染后第9天，心肌病变达高峰。有研究还显示，病毒侵犯心肌细胞后存在于胞浆中，并在其中进行复制[10,11,12]。

2 临床研究

2.1 心肌组织病毒核酸检测

从1986年起国内外学者就将核酸杂交技术应用于人VHD的研究，明确了人类部分MC、DCM与病毒感染有关，心肌炎后病毒持续性感染有发展成DCM的趋势。Bowles等[13]用CB_2基因RNA的3'保守区域肠道病毒组特异的cDNA探针，以斑点杂交法在MC、DCM患者左室EMB(经皮心内膜心肌活检技术)标本中，EV_sRNA检出率为52%(9/17)；3年后作者又报告了因心脏移植术被置换的终末期DCM，阳性率为28.5%[14]。Kandolf等[4]于1987年最先应用CB_3 cDNA探针及原位杂交技术检测MC、DCM患者EMB标本中EV_sRNA，阳性率分别为24.2%(23/95)及17%(8/47)，其中尤以近期发病、有心力衰竭者阳性率最高。Jin等[15]应用PCR法检测临床拟诊MC及DCM右室EMB标本，EV_sRNA检出率分别为7%(2/28)、15%(3/20)；随访病理改变符合MC，且EV_sRNA阳性者，当心肌形态学已无异常时，但心肌中EV_sRNA仍为阳性，持续数月后EV_sRNA方转为阴性；在DCM中发现阳性EV_sRNA信号的心肌可不伴有活动性MC病理改变；其他心脏病及正常心脏对照组EMB标本中均未检得EV_sRNA。上述结果提示急性心肌炎后残留病毒基因的持续存

维普资讯 http://www.cqvip.com

在可致DCM。Archard等[16]在MC、DCM右室EMB标本中，EV_sRNA检出率分别为47%(21/47)、43%(35/82)，且心功能愈差、病理损害越重，阳性率越高，提示心肌组织中EV_sRNA存在可作为患者预后不良的一个标志。病毒在心肌持续存在，除直接破坏细胞外，在疾病末期可能调变心肌基因表达；此外，病毒持续存在可引发继发性免疫介导性心肌损害；多因素共同作用，心肌损害进行性发展，最终导致DCM、充血性心力衰竭。

近两年来国内研究结果表明，我国部分MC、DCM与病毒感染有关，部分MC急性期后心肌中存在病毒持续性感染。李武等[17]使用原位杂交技术检测25例MC右室EMB标本巨细胞病毒，结果6例标本的心肌细胞、4例标本的血管内皮细胞，7例标本的心肌间质检出了阳性杂交信号。彭天庆[18]、李延文[19]、牛美娟等[20]分别报道了他们各自的研究结果，采用不同的方法检测MC及DCM右室EMB标本EV_sRNA，阳性率分别为40%(2/5)、33.3%(2/6)及45%(18/40)，对照组心肌中均未发现阳性杂交信号；李氏等还发现克山病也与EV_sRNA感染有关，在6例克山病心肌标本中5例检出病毒基因。

也有学者认为EV_sRNA并非DCM发病的主要因素，而且在DCM的病因中为非特异性。Weiss等[2]在11例，Grasso等[21]在21例DCM患者心肌本中均未检出EV_sRNA；Keeling等[22]在50例DCM、75例其他心脏病心肌标本中，检出率为12%及17%。迄今，各学者在MC、DCM心肌标本EV_sRNA检出率差异较大，其原因可能有：①所用检测方法不同；②使用的探针不同；③心肌病毒基因检测所取标本至关重要，若取材盲目、局限，可缺乏代表性而使敏感性不高；④在急性期、重症患者取材阳性率较高；⑤实验条件及操作者存在差异；⑥感染心肌的病毒不能被现有的探针检出等。

2.2 血液病毒核酸的检测

从心肌检出病毒核酸对MC，DCM的病因诊断具有客观性，但EMB属有创检查手段，大多数病人难以接受，进而有学者积极探讨用PCR法检测患者血液病毒核酸。Grasso等[21]对21例DCM患者血液进行检测，无1例检出EV_sRNA；Jin等[15]检测14例临床拟诊MC、DCM患者血标本，包括1例组织学显示心肌病变处于急性期，且心肌中已检测到EV_sRNA的患者，也均为阴性。但国内学者却获得了较高的检出率。李延文等[18]在119例MC、37例正常人血液中，EV_sRNA检出率分别为49.6%及5.4%，其中急、慢性MC血白细胞中EV_sRNA检出率分别为62.5%、43%，而血浆及血白细胞中检出率分别为22%及55%，差异均有显著性。许其侠等[24]在161例急性MC血液中EV_sRNA检出率为57.8%。用PCR法检测血EV_sRNA具有以下优点：①无创，易为患者接受；②在急性期可快速获取准确的病毒感染证据；③特异性高于其它血清学检测方法。但血EV_sRNA毕竟不能直接反映心肌本身，因此只能作为急性MC近期病毒感染的一个快速、简便、仅具中低度病原学相关性的辅助诊断手段。

上述众多证据提示部分MC、DCM与病毒感染有关，部分DCM是VMC的慢性并发症。但尚有许多问题亟待澄清，仍有众多机理有待于探讨：①心肌中病毒核酸的存在究竟是伴随现象(属携带状态)，还是MC、DCM的直接发病原因；②病毒在心肌中何种条件下进行复制、怎样复制；③心肌中病毒基因持续存在与DCM自身免疫改变的关系；④MC患者外周血和心肌中病毒基因阳性者经抗病毒治疗能否降低DCM发病率；⑤VHD经抗病毒治疗能否改善预后；⑥从不同环节探讨病毒对MC、DCM的致病机理，为针对性治疗提供理论基础。

参考文献

1.Klump WM,et al.J Viriol,1990;64(4):1573
2.Weiss LM,et al.Am J Pathol,1991;138:497
3.刘晶星，等.中华微生物及免疫学杂志，1991;11(6):345
4.Kandolf R,et al.Proc Natl Acad Sci USA,1987;84(1):6272
5.Easton AJ,Elgin RP.J Gen Virol,1988;69:285
6.Okada I,et al.Int J Exp Path,1992;73:721
7.Weel M,et al.Circulation,1992;86:1605
8.Kyu B,et al.Circulation,1992;86:52
9.解立颖，等.中华微生物及免疫学杂志，1993;13(2):128
10.Mall G,et al.Eur Heart J,1991;12(SupplD):121.
11.张红毅，等.病毒学报 1989;5(3):241.
12.沈茜，等.中华微生物及免疫学杂志 1991;11(3):193.
13.Bowles NE,et al.Lancet,1986;1:1120
14.Boules NE,et al.Circulation,1989;80:1128
15.Jin O,et al.Circulation,1992;82:8
16.Archard LC,et al.Eur Heart J,1991;12(Suppl D):56
17.李 武，等.中华心血管病杂志1994;22(5):356
18.彭天庆，等.中华心血管病杂志1995;23(2):111
19.李延文，等.中华心血管病杂志1995;23(4):268
20.牛美娟，等.中华心血管病杂志1995;23(5):367
21.Grasso M,et al.Am J Pathol,1992;69:658
22.Keeling PT,et al.Br Heart J,1992;69:554
23.李延文，等.上海医科大学学报1993;20(6):472
24.许其炎，等.中华心血管病杂志1995;23(2):122

(收稿日期 1996－06－14)