

· 论 著 ·

黄芪和大青叶治疗小鼠病毒性心肌炎的对比研究

李小青, 张国成, 许东亮, 卫文峰, 李如英

(第四军医大学西京医院儿科, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的** 通过中药单剂黄芪、大青叶治疗小鼠病毒性心肌炎(VMC)的疗效观察, 探讨 VMC 的有效治疗措施。**方法** Balb/C 小鼠给予柯萨奇病毒 B3(CVB3)稀释液腹腔注射后, 随机分为感染对照组、黄芪治疗组和大青叶治疗组, 于 CVB3 感染后第 3, 5, 7, 10, 14, 21 天分批处死, 作 HE 染色, 比较各组小鼠心肌病变积分, 并行心肌组织病毒分离。于感染后第 7 天各组小鼠电镜观察心肌细胞超微结构改变。**结果** 黄芪治疗组自 CVB3 感染后第 5~21 天、大青叶治疗组在 CVB3 感染后第 5 天和 7 天时, 其心肌病变积分较感染对照组明显减轻 ($P < 0.05$)。而大青叶治疗组 CVB3 感染后第 10~21 天心肌病变积分与感染对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。电镜观察发现感染对照组小鼠心肌细胞线粒体肿胀、嵴断裂、肌浆网扩张、肌丝溶解, 治疗组上述病变轻, 且大青叶治疗组可见大量溶酶体。病毒分离结果显示 3 组小鼠 CVB3 感染后第 3 天即可分离出病毒, 阳性率均为 66.7%, 第 5~10 天 3 组均为 100%, 第 14 天感染组病毒分离阳性率为 33.3%, 治疗组均未分离到病毒, 第 21 天时 3 组均未分离出病毒。不同时间点的 3 组间病毒分离阳性率差异无显著性 ($P > 0.05$)。**结论** 黄芪具有保护心肌的作用。大青叶在 CVB3 感染早期对 VMC 的病理改变具有显著影响。

[中国当代儿科杂志, 2003, 5(5): 439-442]

[关键词] 病毒性心肌炎; 黄芪; 大青叶; 治疗; 小鼠

[中图分类号] R-33; R542.2⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)05-0439-04

Control Study of Astragalus Membranaceus and Folium Isatidis in Treatment of Murine Viral Myocarditis

Xiao-Qing LI, Gao-Cheng ZHANG, Dong-Liang XU, Wen-Feng WEI, Ru-Ying LI. Department of Pediatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Email: xjkerke@fmmu.edu.cn)

Abstract: **Objective** To study the curative effect of two Chinese traditional medicines, astragalus membranaceus and folium isatidis, on murine viral myocarditis (VMC). **Methods** Balb/C mice were injected intraperitoneally with a diluted solution of coxsackievirus B3 (CVB3), and then randomly divided into three groups: infected control group, astragalus membranaceus treated group and folium isatidis treated group. The mice were sacrificed on days 3, 5, 7, 10, 14 and 21 after injection. The myocardial pathological score was estimated and viruses from myocardium were separated. In addition, the myocardial ultrastructure was detected under electron microscope on day 7 of post-injection. **Results** Compared with the myocardial pathological score of the infected control group, those of both the astragalus membranaceus treated group (from day 5 to day 21) and folium isatidis treated group (on day 5 and day 7 post-injection) were significantly decreased ($P < 0.05$). There was no difference in the myocardial score after 10 days of infection between the folium isatidis group and the infected control group. The ultrathin section of myocardium in the infected control group revealed mitochondrial swelling, mitochondrial crista rupture and sarcoplasmic reticulum dilatation under electron-microscope. The pathological changes were relieved after treatment in both the astragalus membranaceus and folium isatidis groups. Moreover, there were a lot of lysosomes in myocardium of the folium isatidis treated group. The results of viral isolation were positive on day 3 of post-infection in the three groups, with the same positive rate of 66.7%. The same positive rate of viral isolation (100%) was also found from day 5 to day 10 of post-infection in the three groups. On day 14 of post-infection, the positive viral isolation was noted only in the infected control group (33.3%) but failed in all three groups on day 21 of post-infection. **Conclusions** Astragalus membranaceus may have a protective effect on

[收稿日期] 2003-01-02; [修回日期] 2003-04-02

[作者简介] 李小青(1971-), 女, 硕士, 主治医师, 现在陕西省西安市儿童医院。主攻方向: 小儿心血管疾病。

[通讯作者] 张国成, 陕西省西安市第四军医大学西京医院儿科, 邮编: 710032。

myocardial cells. Folium isatidis could relieve myocardial lesions in the early stage of CVB3-induced myocarditis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(5): 439-442]

Key words: Viral myocarditis; Astragalus membranaceus; Folium Isatidis; Treatment; Mouse

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)为临床常见的心脏疾患,其发病机制目前尚不十分清楚,一般认为该病的发生与病毒感染及机体的自身免疫反应有关。临床治疗尚需进一步改善疗效。本实验通过中药黄芪、大青叶单剂治疗小鼠 VMC 的疗效观察,探讨 VMC 有效的药物治疗措施。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒 柯萨奇病毒 B3(Coxsackievirus B3, CVB3)Nancy 毒株(由本实验中心提供)滴入生长状态良好的单层 Hep-2 细胞(由本实验中心提供)中,发生细胞病变后连传 3 代,离心 3 000 转/min,取上清液,采用 Reed-Muench 微量法滴定病毒效价为 10^4 TCID₅₀, -30℃ 保存待用。

1.1.2 动物 Balb/C 小鼠 60 只,6~8 周龄,体重 16~18 g,二级,雄性,由第四军医大学动物实验中心提供。将 60 只小鼠随机分为 3 组,每组 20 只,其中一组为感染对照组,其余两组为黄芪治疗组、大青叶治疗组。

1.1.3 药物 大青叶 30 g,水煎、过滤、浓缩,使其生药含量为 0.43 g/ml, 0.1 kPa 高压灭菌,4℃ 保存备用。购黄芪口服液成药,其生药含量为 2.0 g/ml。

1.2 方法

1.2.1 药物剂量的选择 20 g 小鼠每日药物用量按小鼠和人(60 kg)的体表面积之比 1:387.9 计算,每日小鼠平均用量为 0.78 g/kg。

1.2.2 动物的感染与给药 60 只 Balb/C 小鼠经腹腔注射 100 TCID₅₀ CVB3 稀释液 0.1 ml 30 min 后,治疗组分别给予各自剂量黄芪和大青叶灌胃,每日 1 次,连续 14 d。感染对照组小鼠每日给予生理盐水 0.5 ml 灌胃,连续 14 d。

1.2.3 病理 各组小鼠在接种 CVB3 后的第 3,5,7,10,14,21 天随机取 3 只小鼠眼球取血处死,于无菌条件下取心脏标本,待作心肌组织病毒分离及常规 HE 染色,观察病理改变。取第 7 天各组小鼠心脏,常规透射电子显微镜观察。

心肌病理改变:HE 染色,光镜下根据 Rezkallad 等^[1]方法,计算心肌病变(炎症浸润及坏死)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,<25%计 1 分,25%~50%计 2 分,50%~75%计 3 分,>75%计 4 分。

1.2.4 病毒分离法 心肌组织标本,0.1 mol/L PBS 洗 2 次,组织匀浆器将其破碎,2 000 r/min 离心 15 min,取上清液 -70℃ 冻存,反复冻融 3 次后,将上清液用针头滤器(0.22 μm 孔径)过滤,取过滤液 500 μl 接种于生长状态良好的 Hep-2 细胞上,加含 7% 小牛血清的 1640 维持液,于 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养,48~72 h 内观察细胞病变情况。以上过程均于无菌条件下进行。

1.3 统计学分析

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验。计数资料记录各组阳性例数,计算百分率(%),组间比较采用 Fisher 精确检验。

2 结果

2.1 心肌组织光镜检查结果

常规 HE 染色,光镜下观察发现,病毒感染后第 5 天心肌组织有炎性细胞浸润,感染后第 7 天心肌组织有大量炎性细胞浸润及点片状坏死灶。病变以 7~10 d 时最显著。黄芪治疗组自病毒感染后第 5~21 天、大青叶治疗组在感染后第 5 天和 7 天时,其心肌病变积分较感染对照组明显减轻($P < 0.05$)。而大青叶治疗组感染后第 10~21 天的心肌组织病变积分与感染对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 心肌组织电镜检查结果

感染对照组小鼠心肌电镜检查显示线粒体肿胀、嵴断裂、肌浆网扩张、肌丝溶解、血管内皮细胞肿胀。见图 1。治疗组中上述病变减轻,血管内皮细胞无肿胀,其中以黄芪治疗组病变最轻。见图 2。大青叶治疗组可见大量溶酶体。见图 3。

2.3 心肌组织病毒分离结果

3 组小鼠接种 CVB3 后第 3 天即可分离出病毒,第 5~10 天全部阳性,随后病毒分离转为阴性。不同时间点各组间病毒分离阳性率两两比较差异无显著性($P > 0.05$)。见表 2。

表1 VMC小鼠心肌组织病变积分

Table 1 Myocardial histopathological scores of mice with viral myocarditis (n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
感染组	0.20±0.41	2.22±1.37	3.27±0.96	2.60±1.06	2.33±0.98	1.40±0.83
黄芪组	0.13±0.35	0.60±0.51 ^a	1.53±0.52 ^a	1.80±0.77 ^a	1.40±0.99 ^a	0.53±0.52 ^a
大青叶组	0.33±0.49	0.67±0.72 ^a	1.80±1.01 ^a	2.33±0.90	2.00±1.07	1.00±0.76

注：a 与感染组比较 P<0.05

表2 VMC小鼠心肌组织病毒分离阳性率

Table 2 Positive rate of virus isolation from murine myocardium 例(%)

组别	例数	3 d	5 d	7 d	10 d	14 d	21 d
感染组	3	2(66.7)	3(100)	3(100)	3(100)	1(33.3)	0
黄芪组	3	2(66.7)	3(100)	3(100)	3(100)	0	0
大青叶组	3	2(66.7)	3(100)	3(100)	3(100)	0	0

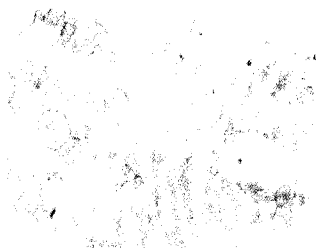


图1 感染对照组肌浆网扩张(TEM×8 000)
Figure 1 Sarcoplasmic reticulum dilated in infected control mice (TEM×8 000)

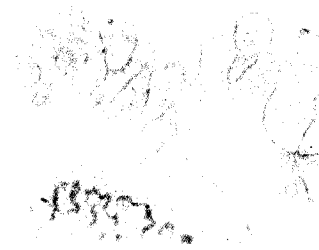


图2 黄芪治疗组肌浆网轻度扩张(TEM×10 000)
Figure 2 Dilation of sarcoplasmic reticulum alleviated in astragalus membranaceus treated group (TEM×10 000)

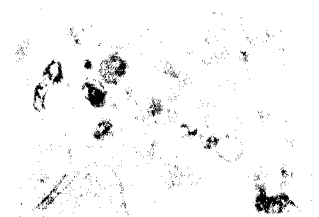


图3 大青叶治疗组可见大量溶酶体(TEM×15 000)
Figure 3 A lot of lysosomes appeared in the myocardium of mice treated by folium isatidis (TEM×15 000)

3 讨论

VMC是临床常见病,肠道病毒尤其是 CVB3 是引起 VMC 的最常见原因。其详细的发病机制仍未完全阐明。Klingel 等^[2]报道,在感染早期(3 d 内)病毒在血中达到高滴度,而心脏的改变尚不明显,3 d 后心脏逐渐出现心肌细胞的损害,感染 10 d 后因为强烈的免疫反应使心脏损害明显。本实验结果显示,不论感染对照组或药物治疗组,小鼠心肌病理改变以第 7~10 天最明显,且病毒分离结果表明在 CVB3 感染小鼠后第 3 天始,至第 14 天均能分离到病毒,此与国内外文献报道一致^[3]。

VMC 由于缺乏有效的抗病毒药物,在常规对症和支持治疗的基础上先后尝试过非激素类抗炎药、 β 受体阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂、氧自由基清除剂以及免疫抑制疗法,均取得一些疗效。本文通过中药单剂治疗小鼠 VMC 的疗效观察,发现大青叶治疗组病毒感染后第 3 天、10 天、14 天、21 天其心肌组织病变积分与感染对照组差异无显著性,大青叶治疗组 CVB3 感染后第 5 天、第 7 天及黄芪治疗组小鼠 CVB3 感染后第 5~21 天,其心肌病变积分低于感染对照组,表现为心肌坏死灶数量和范围显著减少,炎细胞浸润减轻,提示黄芪和大青叶对病毒性心肌炎均有一定疗效。黄芪又名绵黄、独根、二人抬,为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,其化学成分主要为单糖、多糖、皂甙、黄酮、氨基酸和微量元素等。心肌细胞培养显示黄芪能显著减少病毒感染后酶释放和细胞破坏,改善心肌电活动^[4],并抑制感染细胞经 L 型通道的跨膜钙内流和稳定 L

型钙通道^[5]、抑制病毒复制;心肌炎动物模型证明其能显著降低死亡率、心电异常率、心肌病变程度和心肌内病毒复制^[6],调节T细胞亚群分布^[7]。临床实践也证明黄芪对改善VMC临床症状、体征及心电图疗效显著,已作为治疗VMC的常规药物之一。

大青叶对CVB3所致VMC的治疗作用目前尚未见报道。但据其他研究提示大青叶具有抗菌、抗病毒、增强免疫、解热等功能。本实验大青叶治疗组小鼠在CVB3感染后第5天、第7天其心肌病变积分较感染对照组明显减轻,这表明在小鼠VMC早期大青叶可能通过抑制病毒合成,增强白细胞的吞噬作用,降低毛细血管通透性等作用改善和保护心肌细胞。本研究电镜结果显示,大青叶治疗组小鼠心肌细胞内有大量溶酶体,与黄芪治疗组及对照组比较有明显差异。这一现象尚未在其他心肌炎研究中报道,有待深入研究。溶酶体为细胞浆内单层脂蛋白膜包绕的内含一系列酸性水解酶的小体,溶酶体膜的内表面有一层带电荷的糖蛋白,保护膜不受水解酶的作用,而且,溶酶体膜具有独特的滤过性质,只允许分子量小的物质通过。这就保证了大分子的水解酶不能自由逸出到胞质,保护细胞免于自身消化。当致病因子(如病毒、细菌)进入机体后,溶酶体首先起到防御作用以保护机体免受致病因子的损伤。我们认为在小鼠VMC早期,大青叶可能通过某种机制刺激细胞内溶酶体增多,进而吞噬、消化、分解进入细胞内的CVB3,达到减轻病毒本身对心肌细胞的溶细胞作用。但大青叶治疗组在CVB3感染后10~21d时心肌病变与感染对照组比较无差别,可能与大量异物储积在溶酶体内使溶酶体膜损伤,导致其通透性升高,溶酶体酶释放到心肌组织

间隙致细胞自溶有关。

本实验研究提示,黄芪对心肌具有保护作用,确可作为临床治疗CVB3心肌炎的一个中药制剂。大青叶在CVB3感染早期对VMC的病理改变具有显著影响,这有助于CVB3心肌炎的治疗。而黄芪和大青叶联合应用治疗VMC是否有更好的疗效有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Rezkalla S, Kloner RA, Khatib G, Khatib R. Beneficial effects of captopril in acute coxsackievirus B3 murine myocarditis [J]. *Circulation*, 1990, 81(3): 1039-1046.
- [2] Klingel K, Kandolf R. The role of enterovirus replication in the development of acute and chronic heart muscle disease in different immunocompetent mouse strains [J]. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1993, 88(1): 79-85.
- [3] Gebhard JR, Perry CM, Harkin S, Lane T, Menal I, Asensio VC, et al. Coxsackievirus B3-Induced Myocarditis: Perforin Exacerbates Disease, But Plays No Detectable Role in Virus Clearance [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(2): 417-428.
- [4] 袁卫龙,陈珠,杨英珍,等. 黄芪对培养大鼠心肌细胞感染Coxsackie B2病毒的电生理研究 [J]. *中西医结合杂志*, 1989, 9(4): 355-357.
- [5] 刘恭鑫,杨英珍,顾全保,郭棋,虞勇. 黄芪对感染病毒大鼠心肌细胞L型钙通道的效应 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1998, 18(增刊): 49-51.
- [6] 熊丁丁,宿燕岗,杨英珍,陈灏珠. 黄芪、牛磺酸及辅酶Q10联合治疗病毒性心肌炎实验研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 1997, 25(5): 329.
- [7] 吴伟忠,杨英珍,金佩英. 黄芪对BALB/C小鼠感染Coxsackie B3病毒后T细胞免疫的影响 [J]. *中国病毒学*, 1992, 7(2): 129-133.

(本文编辑:俞燕)

· 消息 ·

《中国儿童保健杂志》征订启事

《中国儿童保健杂志》属教育部主管、西安交通大学与中华预防医学会联合主办的技术性杂志。1993年创刊,1998年批准为国家级正式刊物。杂志以反映中外儿童保健学的学术动态和科研成果,交流优生、优育、优教知识及儿童管理经验,介绍新的适宜技术,提高儿保工作者素质,促进儿童正常发展为宗旨。几年来,本刊深受国内外儿保界专家、教授及广大基层儿保工作者的喜爱,被誉为我国儿童保健专业指导性杂志,并进入国家中文医学科学核心期刊,被国内七家大型知名数据库收录。本刊为双月刊,大16开本,92页,每期定价10.00元,全年60.00元。

开辟的栏目:科研论著、专家笔谈、应用论著、综述、基础研究论著、经验交流、基层儿保园地等。服务对象:全国各地图书馆、资料库、儿科医师、儿保医师、幼儿园及中、小学的保健医师以及妇幼保健的相关人员。国际国内统一刊号:ISSN 1008-6579, CN 61-1346/R。发行方式:全国各地邮局发行,代号:52-180。也可直接汇款至编辑部订阅。编辑部地址:陕西省西安市西五路中段157号西安交通大学第二医院中国儿童保健杂志编辑部,邮编:710004,电话:(029)7679391,传真:(029)7276092,电子邮箱:cjchcl@163.com。