

·论著·

黄芪对心肌炎心肌穿孔素及 外周血 TNF- α 的影响

蒋丽敏¹, 魏克伦², 李薇¹

(1. 沈阳军区 202 医院儿科, 辽宁沈阳 110003; 2. 中国医科大学附属二院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 儿童病毒性心肌炎(VMC)发病率高,临床上缺乏有效的治疗药物。该研究旨在探讨黄芪注射液治疗小鼠柯萨奇 B₃(CVB₃)病毒性心肌炎的疗效及其机制。方法 24 只 Balb/C 鼠腹腔感染柯萨奇病毒 B₃ 亲心肌细胞株后,随机等分为两组:黄芪治疗组(黄芪注射液 10 g/kg,腹腔注射,每天 1 次,连续 7 d)和对照组(同法每天注射等容积注射用水)。实验第 8 天留取心肌和血液标本,进行心肌病理检查,逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)法检测心肌穿孔素(PFP)mRNA 表达及放免法检测外周血肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。结果 ①黄芪治疗组心肌组织病理改变明显轻于对照组;②黄芪治疗组心肌 PFP mRNA 的表达明显低于对照组[(1.10 $\pm$ 0.07) vs (1.31 $\pm$ 0.12)]($P < 0.01$);③黄芪治疗组血清 TNF- α 含量明显低于对照组[(2.39 $\pm$ 0.21) ng/ml vs (2.97 $\pm$ 0.32) ng/ml] ($P < 0.01$)。④PFP mRNA 表达水平与血清 TNF- α 含量呈显著正相关($r = 0.84$, $P < 0.01$)。结论 黄芪注射液对病毒性心肌炎有明显的治疗作用,其机制可能是通过减轻病毒性心肌炎中 PFP 介导的细胞毒性作用和炎症反应。 [中国当代儿科杂志,2003,5(6):527-529]

[关键词] 黄芪注射液;心肌炎;穿孔素;肿瘤坏死因子- α ;小鼠

[中图分类号] R725.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2003)06-0527-03

Effects of Astragalus Injection on Expression of Perforin in Myocardial Infiltrating Cells and Serum TNF- α in Mice with Acute Myocarditis

Li-Min JIANG, Ke-Lun WEI, Wei LI. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: jlm025@elekbird.com.cn)

Abstract: **Objective** Viral myocarditis frequently occurs in children, but no effective medicines for clinic treatment have been found. This paper aims at studying the effect and mechanism of astragalus injection in the treatment of acute murine myocarditis caused by Coxsackievirus B₃. **Methods** Acute viral myocarditis was induced in 24 Balb/c mice by injection of Coxsackievirus B_{3m}(CVB_{3m}) intraperitoneally. Half of the mice were administered astragalus injection with a dosage of 10 g/kg daily for 7 days (astragalus-treated group). The remained received the same amount of normal saline and were used as the control group. On the 8th day after CVB_{3m} infection, the pathological changes of myocardium were studied. Myocardial perforin expression was detected by reverse transcription-polymerase chain reactin (RT-PCR) and serum TNF- α level was measured by radioimmunoassay. **Results** The astragalus-treated group showed a significant reduction in myocardial lesions compared with that in the control group. The myocardial perforin expression in the astragalus-treated group was much lower than that in the control group [(1.10 $\pm$ 0.07) vs (1.31 $\pm$ 0.12); $P < 0.01$]. The serum TNF- α level was also significantly lower in the astragalus-treated group than that in the control group [(2.39 $\pm$ 0.21) vs (2.97 $\pm$ 0.32; $P < 0.01$)]. The myocardial perforin expression was significantly positively correlated with the serum TNF- α level ($r = 0.84$, $P < 0.01$). **Conclusions** Astragalus has protective effects against viral myocarditis by reducing perforin-mediated cytotoxicity and inflammatory reaction.

[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(6): 527-529]

Key words: Astragalus; Myocarditis; Perforin; TNF- α ; Mouse

[收稿日期] 2003-01-24; [修回日期] 2003-06-06

[作者简介] 蒋丽敏(1964-),女,博士研究生,主治医师。主攻方向:病毒性疾病的药物治疗。

[通讯作者] 蒋丽敏,沈阳 202 医院儿科,邮编:110003。

柯萨奇 B 组病毒 (Coxsackievirus B, CVB) 性心肌炎多发于儿童,尤其在新生儿病死率高,但目前尚无有效的治疗药物。细胞介导的免疫损伤在病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 发病中起重要作用。近年来国外较多研究发现,细胞介导的靶细胞损伤主要由穿孔素 (perforin, PFP) 介导,而国内这方面的研究较少。本实验在 Balb/ C 小鼠急性 VMC 模型上研究黄芪对心肌 PFP mRNA 表达水平的影响,并探讨其治疗机制,为临床有效的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型^[1]及实验分组

4~6 周龄 Balb/ C 小鼠,由中国医科大学实验动物中心提供。黄芪注射液,2 g/ ml,上海福达制药有限公司生产,批号: 000617。柯萨奇病毒 B₃ (CVB_{3m}) Nancy 株引自首都儿科研究所,连续传代 3 次后,病毒的半数组织感染量 (TCID₅₀) 为 10⁻⁶。24 只小鼠腹腔接种含 2000 TCID₅₀ 的 CVB_{3m} 病毒液 0.2 ml 后,随机分为黄芪治疗组及对照组,每组 12 只。黄芪治疗组每天腹腔注射黄芪注射液 10 g/ kg,每天 1 次,连续 7 d,对照组则每天腹腔注射相同容量的注射用水,两组动物在相同条件下饲养。

1.2 标本取材

接种病毒后第 8 天,在小鼠眼球后取血约 1 ml,分离血清,留做肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 含量测定,然后无菌摘取心脏,沿左室长轴将心脏一分为二,一半置 4 % 多聚甲醛固定,一半置 - 70 °C 冷冻。

1.3 方法

1.3.1 心肌组织病理检查 心肌标本经 4 % 多聚甲醛固定、石蜡包埋后,沿左室轴线自心尖部起连续切取两张切片,常规 HE 染色,光镜下观察心肌病理变化。

1.3.2 心肌组织 PFP mRNA 表达水平测定 采用异硫氰酸胍一步法提取心肌总 RNA,用逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 测定 PFP mRNA 表达。PFP 引物序列: 5-A GGCA GCTGCTAA TATCAA T-3 和 5-TGTGCTGTTTCTTCTTCTCG-3,同时以 β-肌动蛋白 (β-Actin) 引物进行 PCR 扩增,作为参照。β-actin 引物序列: 5-TGTATGCCTCTGGTCGTACCAG-3 和 5-ACAGA GTACTTGCGCTCAGGAG-3。扩增参数: 94 °C 3 min, 94 °C 40 s, 54 °C 1 min, 72 °C 1 min, 重复循环 32 次后, 72 °C 延伸 5 min。扩增产物经 1.5 % 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,用 Kodak 成像分析

系统扫描测定 PCR 产物电泳条带的密度,计算 PFP 产物的相对量。计算公式: PFP 相对量 = PFP 产物电泳条带密度/β-actin 产物电泳条带密度。

1.3.3 血清 TNF-α 含量测定 采用放免法测定,试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。

1.4 统计学分析

数据以均数 ± 标准差表示,用 SPSS 软件进行 t 检验及相关分析。

2 结果

2.1 心肌病理改变

两组小鼠心肌均有不同程度病毒性心肌炎的病理改变,表现为灶性或弥漫性以单个核细胞为主的炎性细胞浸润及炎性灶周围心肌细胞的变性坏死。对照组病变较重,小鼠心肌细胞可见大片状弥漫性炎症细胞浸润及心肌细胞坏死;黄芪治疗组病变较轻,炎症浸润及心肌细胞坏死灶少,且均为小灶性。(图 1, 2。见封 II)。

2.2 心肌 PFP mRNA 表达

所有 PFP 及 β-actin 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,所示条带分别为 481 bp 和 690 bp,符合设计片段大小,且心肌 PFP 扩增产物的片段大小与阳性对照相同,因此可确定产物分别为 PFP 及 β-actin。条带密度扫描及半定量分析显示:对照组小鼠心肌组织 PFP mRNA 的表达较高,黄芪治疗组小鼠心肌组织 PFP mRNA 的表达明显减少,两者差异有显著性 (P < 0.01)。见表 1。

2.3 血清 TNF-α 含量

与对照组相比黄芪治疗组小鼠血清 TNF-α 含量明显降低,差异有显著性 (P < 0.01)。见表 1。

表 1 两组心肌 PFP mRNA 水平及血清 TNF-α 含量的比较
Table 1 Comparison of myocardial PFP mRNA and serum TNF-α level

(n = 12, $\bar{x} \pm s$)		
组别	PFP mRNA	TNF-α (ng/ ml)
对照组	1.31 ± 0.12	2.97 ± 0.32
黄芪治疗组	1.10 ± 0.07	2.39 ± 0.21
t	7.48	5.12
P	< 0.01	< 0.01

2.4 血清 TNF-α 含量与心肌 PFP mRNA 水平的相关性分析

直线回归与相关性分析显示心肌 PFP mRNA

水平与血清 TNF- α 含量呈显著正相关 ($r = 0.84$, $P < 0.01$)。

3 讨论

病毒的直接溶细胞作用及细胞介导的免疫损伤在病毒性心肌炎发病中起重要作用,而免疫损伤中细胞介导的细胞毒性作用 (cell-mediated cytotoxicity, CMC) 日益受到重视。病毒性心肌炎 CMC 损伤靶细胞主要由 PFP 介导。PFP 是一种存在于激活的自然杀伤细胞及细胞毒性 T 淋巴细胞等细胞胞浆颗粒中的蛋白,当这些细胞接触靶细胞时,PFP 被释放至靶细胞膜,在钙离子存在的条件下,PFP 单体能插入靶细胞膜,且多个 PFP 单体可聚合成直径为 15~20 nm 的跨膜孔道,使细胞膜的通透性增加,导致靶细胞膜发生渗透性溶解,同时,与 PFP 同存于胞浆颗粒中的颗粒酶等,也可通过 PFP 孔道进入靶细胞,激活内切酶系统,使 DNA 降解而致细胞凋亡^[1,2]。

病毒性心肌炎的发病与细胞因子有密切关系^[3-6],目前 TNF- α 是公认的参与心肌损伤的炎性细胞因子,TNF- α 与病毒性心肌炎的心肌损伤过程及病情程度密切相关,对其检测可作为临床判断病毒性心肌炎患儿病情及预后的指标。黄芪注射液对心脏有非洋地黄类正性肌力作用^[7],黄芪能改善病毒性心肌炎患者的左室功能^[8]。体内实验表明,黄芪皂甙能提高病毒性心肌炎小鼠存活率,维持感染鼠正常体温,减少心肌酶 LDH 和 AST 的释放,降低心肌匀浆的病毒滴度,并可改善心肌病理变化^[9,10]。体外实验发现,黄芪皂甙能抑制感染柯萨奇 B₃ 病毒的心肌细胞释放 LDH,并使培养液中病毒滴度下降^[11]。黄芪治疗病毒性心肌炎的机理可能是通过提高患者的免疫功能以及直接保护因病毒感染的心肌细胞而达到的,通过以 PFP 为代表的细胞介导的细胞毒性作用 (CMC) 的研究尚未见报道。

在本实验中,黄芪治疗组小鼠心肌病理改变较对照组轻,心肌组织 PFP mRNA 的表达水平明显低于对照组,而炎症指标血清 TNF- α 亦同步下降,且两者之间具有显著的正相关。结果提示,黄芪对病

毒性心肌炎具有明显的治疗作用,并且证实了黄芪能抑制 PFP 的作用。黄芪治疗病毒性心肌炎的作用机制可能是:①直接的抗病毒作用和诱导干扰素,减轻对心肌细胞的损害。②免疫调节作用,限制 PFP 等介导的细胞毒性作用造成的免疫损伤。③膜稳定作用,增强抵抗能力。④改善心肌微循环,增加冠脉血流量^[12]。

[参 考 文 献]

[1] Seko Y, Skinkai Y, Kawasaki A, Yagita H, Okumura K, Yazaki Y. Evidence of perforin-mediated cardiac myocyte injury in acute murine myocarditis caused by Coxsackievirus B3 [J]. J Pathol, 1993, 170(1): 53 - 55.

[2] Liu CC, Walsh CM, Young JDE. Perforin: structure and function [J]. Immunology Today, 1995, 16(2): 194 - 201.

[3] 黄卫彤,黄宏思,韦英群,韦中盛,潘红飞. 儿童病毒性心肌炎细胞因子的检测及其临床意义 [J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(2): 221 - 222.

[4] 刘中娟,任凤琴,鲍晓力,程显芬. 小儿病毒性心肌炎患者 TNF- α 检测的临床价值及其与 CK-MB 和 LDH1 关系的研究 [J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(4): 456.

[5] 张松,饶邦复. 肿瘤坏死因子- α mRNA 在小鼠病毒性心肌炎中的表达与意义 [J]. 中华病理学杂志, 2002, 31(3): 250 - 252.

[6] Wada H, Saito K, Kanda T, Kobayashi I, Fujii H, Fujigaki S, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice [J]. Circulation, 2001, 103: 743 - 749.

[7] 朱伯卿,戴瑞鸿,龚志铭,沈筱同,蒋美芬. 黄芪注射液对心脏正性肌力作用的研究 [J]. 上海中医杂志, 1987, 21(1): 47.

[8] 杨英珍,单越芬,赵惠扬,李志善,诸骏仁,浦寿月,等. 黄芪对病毒性心肌炎患者左室功能的影响 [J]. 上海医科大学学报, 1989, 16(2): 87.

[9] 丁继军,章同华,沈茜. 黄芪皂甙对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的保护作用 [J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(9): 666 - 668.

[10] Peng T, Yang YZ, Kieseemann H, Kandolf R. The inhibitory effect astragalus membranaceus on Coxsackie B3 virus RNA replication [J]. Chin Med Sci J, 1995, 10(3): 146.

[11] 丁继军,章同华,沈茜. 黄芪皂甙对培养乳鼠心肌细胞感染柯萨奇 B3 病毒的保护作用 [J]. 第二军医大学学报, 1992, 13(6): 532 - 535.

[12] 薛全福,戴顺岭,吴云清. 川芎、黄芪对金黄地鼠颊囊微循环的作用 [J]. 中华医学杂志, 1986, 66(7): 409.

(本文编辑:谢珉)

黄芪对心肌炎心肌穿孔素及外周血 TNF-α 的影响

(正文见第 527 页)

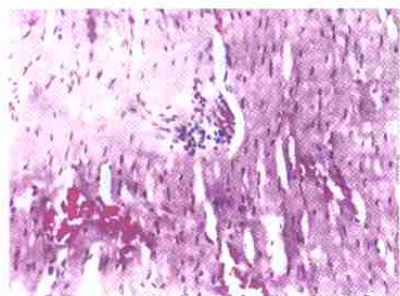


图 1

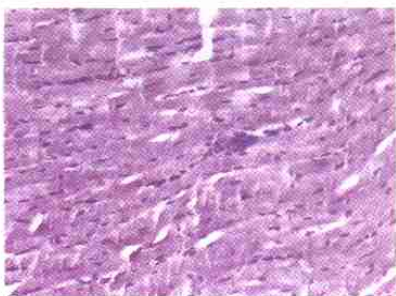


图 2

图 1 对照组心肌炎细胞浸润、出血、坏死 (HE × 400)

Figure 1 Infiltration of inflammatory cells, hemorrhage and necrosis in myocardium of control group (HE × 400)

图 2 治疗组心肌损害减轻, 偶见局灶性炎细胞浸润 (HE × 400)

Figure 2 Occasional focal inflammatory cells infiltration in treatment group (HE × 400)

新生儿颅内出血的 B 超 CT 及 MRI 的诊断特性比较

(正文见第 550 页)

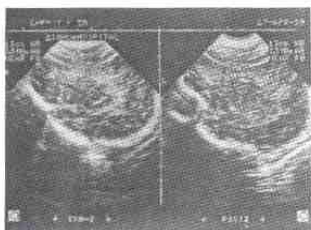
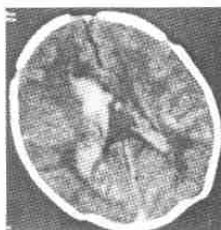


图 1

A



B



C

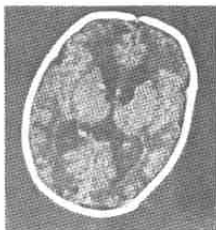
图 1 SEH 图像。34 周, 2 410 g, Apgar 评分 6-8-5, 生后 18 天内反复机械通气 3 次。

A: B 超旁矢状面 (16 日龄), 显示右侧丘脑尾状核沟室管膜下回声增强, 其中心部位形成小囊腔, 显示出血部分已吸收。B: CT 横断面 (30 日龄), 显示右侧脑室前角下方室管膜下呈增高密度影。C: MRI T1 加权像横轴位 (34 日龄), 显示右侧丘脑尾状核沟室管膜下呈高信号。



图 2

A



B



C

图 2 IVH 图像。39⁺周, 3 170 g, 轻度窒息, 生后早期频繁惊厥史。

A: B 超旁矢状面 (7 日龄), 显示右侧室管膜下及双侧脑室内回声增强, 以右侧为甚。B: CT 横断面 (8 日龄), 显示右侧室管膜下及双侧脑室内高密度影, 以右侧为甚。C: MRI T1 加权像横轴位 (8 日龄), 显示右侧室管膜下及双侧脑室内呈高信号, 以右侧为甚。

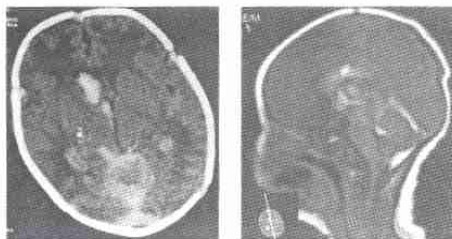


图 3

A



B

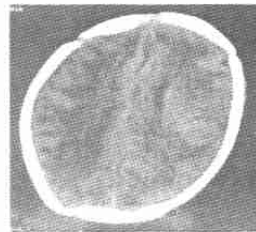
图 3 SDH 和 SAH 图像。

A: CT 横断面 (8 日龄), 显示侧脑室前、后角以及三脑室内密度增高 (IVH)。天幕孔周围以及中线后部及窦汇处见片状高密度影。B: MRI T1 加权像矢状位 (8 日龄), 显示侧、三、四脑室以及小脑延髓池均呈高信号 (IVH, 继发 SAH)。在天幕孔周围, 沿大脑大静脉、直窦、窦汇以及乙状窦行进部位内呈现均匀高信号。

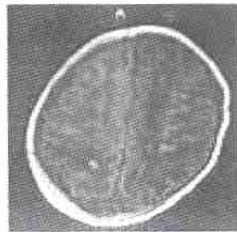


图 4

A



B



C

图 4 点状 IPH 图像。37⁺周, 2 200 g, 惊厥入院。

A: B 超旁矢状切面 (12 日龄), 显示脑室周围未见异常回声。B: CT 横断面 (11 日龄), 显示双侧白质区低密度。C: MRI T1 加权像横轴位 (11 日龄), 显示脑室周围白质内呈点状高信号。