

黄芪对培养大鼠心肌细胞感染 Cocksackie B-2 病毒的电生理研究

上海医科大学中山医院 上海市心血管病研究所

袁卫龙 陈灏珠 杨英珍 杨学义 林佑善 金佩英

中国科学院上海生理研究所 周泰生

内容提要 本文报道应用常规细胞内微电极技术记录原代单层培养大鼠搏动心肌细胞感染 Cocksackie B-2 病毒后不同时间的电生理参数变化和同时期在倒置相差显微镜下观察的心肌细胞搏动频率、节律、搏动%及细胞病变。在此基础上,研究黄芪对Cocksackie B-2 病毒感染体外培养搏动大鼠心肌细胞电活动的影响。结果提示从病毒感染后 24~96 h, 黄芪对心肌细胞搏动频率、节律、搏动%、细胞病变和各项电生理参数等均有明显保护作用,心肌细胞的结构和功能均维持在大致正常状态。本文结果可为黄芪防治病毒性心肌炎提供新的线索。

在应用常规细胞内微电极技术稳定地记录到原代单层培养大鼠搏动心肌细胞电活动参数的基础上,我们研究了培养大鼠搏动心肌细胞感染 Cocksackie B-2 病毒后的电活动变化,结合在倒置相差显微镜下所见细胞搏动情况和细胞病变(CPE),观察了中药黄芪对感染Cocksackie B-2病毒的培养心肌细胞的保护作用。

材料和方法

出生 1~4 天的 Sprague-Dawley 大鼠心室肌,用 0.1%胰蛋白酶溶液分次消化细胞,细胞制备及培养按本所常规方法进行^[1]。生长液用含 20%小牛血清的 MEM Eagle's 液。Cocksackie B-2 病毒(ATCC VR29)在 Hep-2 细胞中传代三次,在大鼠心肌细胞中用 Reed 法测 50%组织感染率^[1]。黄芪注射液(4g/2ml,批号:861106)系由黄芪生药经水煮醇沉之水溶液,由上海医科大学华山医院中草药制剂室提供。

细胞悬液分装每瓶 $4 \times 10^5/5\text{ml}$, 37°C 孵育 24 小时后,病毒对照组和黄芪实验组每瓶细胞各加 2.5ml

含 100 个 50%组织感染率的 Cocksackie B-2 病毒,正常对照组各加 2.5ml 生长液。37°C 孵育 1 h 后,病毒对照组和正常对照组分别加生长液至每瓶总量为 5ml。黄芪实验组每瓶各加含 1g 黄芪生药的生长液 2.5ml, 37°C 孵育,每天在倒置相差显微镜下观察细胞搏动频率、节律、搏动%和 CPE, CPE 判别标准同前文^[2]。在感染病毒后 24、48、72 和 96 h 分别取样做电生理学研究。全部实验共培养 10 批,计 200 瓶心肌细胞。

电位测定:以不加小牛血清的 Eagle's 生长液作循环灌流,流速 3 ml/min,恒温 37°C, pH 7.0~7.2。灌流液内充以含 95%氧和 5%二氧化碳的混合气,流量每分钟 0.5L。玻璃微电极尖端直径小于 0.5 μ ,充灌了 3mol/L KCl,端电阻 50m Ω 。从培养瓶中取出长有心肌细胞的盖玻片,放入浴槽内,玻璃微电极以 45°角刺入细胞,整个操作都在倒置显微镜下进行。玻璃微电极在心肌细胞内稳定 5~10min,搏动频率及各项电活动参数趋于稳定后拍照记录。

表 1 黄芪对培养搏动大鼠心肌细胞感染 Cocksackie B-2 病毒后搏动%和 CPE 的影响 (M $\pm$ SD)

组别*	搏 动 %				CPE			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
A	98.1 $\pm$ 4.1	97.9 $\pm$ 9.2	93.7 $\pm$ 11.2	90.0 $\pm$ 10.7	—	—	—	—
B	75.7 $\pm$ 19.9**	61.1 $\pm$ 19.1**	38.4 $\pm$ 24.5**	27.9 $\pm$ 18.6**	±	+	+++	++++
C	81.9 $\pm$ 15.3***	69.7 $\pm$ 19.2***	62.3 $\pm$ 21.1***	65.8 $\pm$ 24.7***	±	±	+	+

* A: 正常组; B: 感染病毒组; C: 感染病毒加黄芪组, 下表同。与 A 组比较**P<0.01; 与 B 组比较***P<0.05, CPE: ±, 病变心肌细胞在 25% 以内; +, 超过 25%; ++, 超过 50%; +++, 超过 75%

结 果

一、细胞搏动%及CPE:见表1。接种病毒前细胞以100~150次/min基本上呈同步节奏性搏动。接种病毒后48h,细胞搏动变慢而不规则,搏动幅度变小,胞浆内出现毒性颗粒和空泡;72h后,CPE明显,结构模糊,足突短缩、变细或消失,搏动快慢不等,强弱不匀,半数以上细胞停搏。96h后,仅有少数幸存细胞呈不规则蠕动,细胞变圆、成堆、团缩,部分细胞崩解并脱离瓶壁。

感染病毒后24h,黄芪实验组和病毒对照组细

胞的搏动频率和搏动%无显著差异,但黄芪实验组细胞很少出现节律失常;48h后,黄芪实验组细胞形态和内部结构尚属正常,胞浆内可见少许毒性颗粒和空泡,细胞搏动匀齐、有力。72h和96h后,约30%细胞停搏,这些停搏细胞的足突消失,形态似纺锤形,但仍贴壁良好。其余细胞搏动频率和节律恒定,细胞形态大致正常,但细胞浆内明显可见到毒性颗粒和空泡。正常对照组细胞形态正常,搏动频率和节律恒定。

二、电活动参数变化:见表2。病毒对照组细胞的电活动变化在形态学改变之前出现,感染病毒24小时

表2 黄芪对培养搏动大鼠心肌细胞感染Coxsackie B-2病毒后电活动参数的影响 (M±SD, n=360)

组别	感染时间	RP (mV)	APA (mV)	V _{max} (V/S)	APD 50 (ms)	APD 100 (ms)
A	24 h	59.1±15.5	74.7±10.4	12.3±3.4	82.4±12.1	188.2±21.4
	48 h	55.9±10.8	75.2±12.9	11.1±2.8	75.6±11.1	177.6±14.1
	72 h	51.0±8.1	68.9±10.0	11.5±2.6	78.5±10.8	178.4±24.9
	96 h	49.8±5.8	70.8±11.5	10.6±4.2	80.8±10.9	172.5±27.9
B	24 h	32.7±9.0*	39.1±13.3*	2.9±1.9*	77.2±23.8	161.3±41.1
	48 h	32.3±10.2*	35.7±14.5*	2.1±1.8*	66.1±17.6	132.9±34.2
	72 h	29.8±10.4*	34.8±11.3*	2.1±1.4*	60.7±18.2*	132.9±25.1*
	96 h	25.0±10.1*	24.2±9.1*	1.4±1.4*	57.1±12.1*	130.3±36.9*
C	24 h	46.3±10.0**	59.3±13.1**	5.9±1.9**	72.2±7.2	145.9±13.7
	48 h	45.3±6.5**	56.1±10.7**	4.6±1.8**	69.6±7.6	137.8±21.4
	72 h	46.2±10.2**	58.0±10.9**	4.9±2.1**	67.0±9.1	128.2±16.5
	96 h	47.0±7.2**	59.6±10.4**	6.7±2.6**	71.2±5.9**	138.9±19.9

*与A组同期比较, P<0.01; **与B组同期比较, P<0.05

后,细胞形态尚未出现明显改变,搏动频率和节律即已出现异常,表现为二联律、三联律和短串阵速,电位形态上表现为节律不齐,振幅和形态多变,细胞对玻璃微电极机械刺激极为敏感,细胞膜脆弱易被刺穿,玻璃微电极尖端易被细胞碎片堵塞,微电极难以稳定在细胞内。从感染病毒24h开始,静息电位(RP)负值降低,0相最大上升速率(V_{max})减慢,动作电位振幅(APA)和超射(OS)值缩小,动作电位时程(APD)缩短。随着感染时间的延长,各项电参数进一步减低,停搏细胞数逐日增加。感染病毒96h后,约70%细胞停搏,电活动消失,少数幸存细胞的各项电活动参数均明显低于正常。

黄芪实验组细胞在实验过程中搏动频率和节律恒定,电位幅度和形状正常,心肌细胞对微电极穿刺的反应和微电极稳定在细胞内的时间与正常对照组细胞相仿。在感染病毒24h后,各项电活动参数低于正常对照组,但明显高于病毒对照组。且在整个实验期

间,从感染病毒24~96h,取不同时间的标本作电生理实验,从多方面比较,黄芪实验组细胞的电活动均维持相对稳定状态,各项电参数不因感染病毒时间不同而有任何显著差异。全文实验共穿刺360个心肌细胞,各组不同时间观察的样本数见表3。

表3 三组不同时间观察的心肌细胞数 (n=Σ360)

组别	观 察 细 胞 (个)			
	24h	48h	72h	96h
A	20	20	20	20
B	25	47	22	23
C	40	35	42	46

讨 论

在病毒感染早期,细胞病变尚不影响收缩蛋白的合成与装配,肌原纤维结构正常,因此细胞仍能搏动,由于细胞膜的完整性破坏,流动性和通透性增加,引

起一系列生化物质的变化,导致电活动参数的变化,由于细胞内钾大量流到细胞外,钾平衡电位(E_k)等改变使得RP负值降低,钠、钙通道的启闭随之相应变化,钠通道失活,钙通道激活,导致 V_{max} 减慢,APA和OS值随之相应缩小,由于钠、钾、钙通道的启闭失常和钠—钙交换紊乱诸因素的共同作用,使得APD缩短,随着感染病毒时间延长,细胞病变加重,各项电活动参数均进一步减低,停搏的细胞数逐日增加,到感染病毒后96h,多数心肌细胞死亡崩解,电活动消失。因为是原代单层培养,细胞受病毒损害机会均等,所以病变进展一致,到感染病毒96h后,多数心肌细胞达不可逆损伤阶段,本文结果提示病毒对心肌细胞有直接损害作用,这与文献报道相符(2,3)。

黄芪是一种补气药,临床用途很广,侯云德等(4)曾就黄芪有效成分的生物学活性进行研究,发现黄芪所含氨基酸、生物碱和黄酮类,具有抗病毒、促进抗体形成、延长细胞体外存活等作用。杨英珍等(5)研究了黄芪对培养的大鼠搏动心肌细胞感染Coxsackie B-2病毒的影响。发现黄芪对Coxsackie B-2病毒感染培养大鼠搏动心肌细胞的亲心肌酶谱、细胞病变、细胞毒性和超微结构改变等均有明显保护作用。并观察到黄芪能改善病毒性心肌炎患者的左心室功能(6)。

本文结果提示,在Coxsackie B-2病毒感染早期应用黄芪,具有明显的保护作用,从感染病毒后24~96h,黄芪实验组的各项电活动参数,稳定地维持在略低于正常对照组水平,提示黄芪实验组心肌细胞虽经受病毒损伤,细胞的结构与功能尚能保持在

较正常状态,各项指标显著高于病毒实验组。黄芪抗病毒作用的机理尚不明了,设想黄芪具有干扰素诱生剂作用或干扰素样作用(5)。作者等曾观察黄芪对正常心肌细胞电活动的影响,发现本文所用剂量对正常心肌细胞电活动没有影响。由于黄芪来源充足,有丰富的临床应用经验,无毒性,值得进一步从实验室角度研究其药理作用。本实验可为黄芪在防治急性病毒性心肌炎方面的应用提供新的线索。

(本文承上海医科大学生物物理教研室梁子钧教授、汤昱副研究员指导,特此致谢)

参 考 文 献

1. Yang YZ, et al. Coxsackie B-2 virus infection in rat beating heart cell culture. J Virol Methods 1985; 12: 217.
杨英珍,等.急性病毒性心肌炎发病机理的探讨.中华微生物学和免疫学杂志 1987; 7(2):92.
2. 杨英珍,等.免疫脾细胞及Coxsackie B-2病毒对小鼠心肌细胞超微结构的影响.上海医科大学学报 1987; 14(5): 363.
3. 侯云德,等.黄芪某些生物学活性的有效部分的研究.中西医结合杂志 1984; 4(7):420.
4. Yang YZ, et al. Effect of Astragalus membranaceus injection on Coxsackie B-2 virus infected rat beating heartcell culture. Chinese Medical Journal 1987; 100(7):595.
5. 杨英珍,等.黄芪对病毒性心肌炎患者左心室功能的影响.中国中西医结合研究会心血管专业第一次学术交流会议论文集 1988; 9:20.

姜泥贴敷至阴穴转胎 106 例

解放军94医院 王留宽 蔡汝慧 宋若渠

我们近5年来对经B超检查确诊为臀位的106例孕妇,采用姜泥贴敷至阴穴转胎,并用B超观察结果,报告如下。

资料和方法 本组106例孕妇,年龄20~30岁。孕第一胎98例,孕第二胎8例。妊娠时间28~40周,全部经过B超检查确诊为臀位。治疗方法:将新鲜生姜捣成泥状,分别贴敷于双侧至阴穴,然后用塑料薄膜包裹,使姜泥始终保持潮湿状态,如干燥可重新更换。自贴敷后24小时即行B超复查,观察转胎情况。如未转正,可继续贴敷2~3天后行B超复查。

仪器应用 Aloka SSD—250 型线阵式实时超声显像仪,探头频率3.5MHz,采用腹部常规探查,寻找确

定胎头位置。

结 果 本组106例孕妇经姜泥贴敷胎位转正82例(77.35%),无效24例(22.65%)。转正中有36例(43.90%)经贴敷一天后转为头位,余者多在3~4天内转为头位,最长不超过7天。82例中孕第一胎77例,孕第二胎5例,一般以孕33周前经姜泥贴敷疗效最好。

体 会 我们根据阳动阴静之道理,采用大辛大温之生姜贴敷于至阴穴,以其温通气血,使胎儿活动增加而助成胎位的回转。82例胎位转正孕妇中有13例(15.85%)复转为臀位1~2次,继续至阴穴贴敷,多数能转成头位,但对此类孕妇应注意用腹带固定。

**Immune Restoration of Local Xenogeneic Graft-Versus-Host Reaction in Cancer Patients
in Vitro and Reversal of Cyclophosphamide-Induced Rat's Immune Suppression
in Vivo by Fractionated *Astragalus membranaceus***

Chu Datong(储大同), Sun Yan(孙燕), Lin Juanru(林娟如)

Wendy Wong(李秀如)*, Giora M. Mavligit*

Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing

**M. D. Anderson Cancer Centre, University of Texas, Houston, USA*

Through the process of fractionation, purification by gel filtration chromatography and thereafter the screening with an in vitro local xenogeneic graft-versus-host reaction (XGVHR) model, a fraction was identified as a potent immunorestorative agent and was designated "Fraction 3" (F3). Using the XGVHR in vitro as a model assay for T cell function again, F3 was studied on mononuclear cells (MNC) from 13 cancer patients and exhibited significant immunorestorative activity, with an increase in local XGVHR (compared to untreated cells) of $151.34 \pm 46.02 \text{ mm}^3$ vs $57.80 \pm 16.44 \text{ mm}^3$, $P < 0.001$. The in vitro augmented immune reactions induced by F3 in cancer patients also significantly exceeded the local XGVHR observed in the untreated MNC derived from 9 normal donor controls ($94.15 \pm 9.16 \text{ mm}^3$, $P < 0.005$). In a newly developed in vivo XGVHR animal model, pretreatment of rats with F3 resulted in a significant abrogation of the local XGVHR with a reversal of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide from $99.42 \pm 9.2 \text{ mm}^3$ (positive control) to $39.78 \pm 8.3 \text{ mm}^3$ ($P < 0.001$). This reversal was complete as the volume of the abrogated local XGVHR was comparable to that of the negative control (no cyclophosphamide-priming, saline injection only) $34.79 \pm 5.69 \text{ mm}^3$ ($P > 0.1$). These results suggest that F3 retained the immunopotentiating activity of the original crude extract and form the rational basis for the use of *Astragalus* in immunotherapy.

(Original article on page 351)

Effect of *Astragalus membranaceus* on Electrical Activities

of Coxsackie B-2 Virus-Infected Rat Beating Myocardial Cells in Culture

Yuan Weilong(袁卫龙), Chen Haozhu(陈颢珠), Zhou Taisheng*(周泰生), et al

Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Shanghai Medical University;

**Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai*

Beating Myocardial cell cultures of neonatal rats were prepared in vitro and infected with coxsackie B-2 virus. The cells were evaluated in the post-infected period for changes in beating percentage and cytopathic effect (CPE), alterations in the electrical activities by standard microelectrode techniques, and the protective effect of *Astragalus membranaceus* (AM) on coxsackie B-2 virus-infected neonatal rat myocardial cell cultures was observed. The beating percentage began to decrease in the infected group at 24 hr and only $27.9 \pm 18.6\%$ was beating at 96 hr after virus challenge, premature beats, tachycardia and fibrillation occurred commonly during the experiment. Meanwhile the CPE appeared rapidly from 1+~3+ at the same interval. Resting potential, action potential amplitude, duration and rate of upstroke were shown a significant decrease through 24~96 hr ($P < 0.01$). In contrast, the beating and electrical activities were nearly normal and less CPE was shown in myocardial cells treated with AM 1 hr after virus challenge through 24~96 hr ($P < 0.05$). The results suggest that AM may be valuable in prophylaxis and treatment of acute coxsackie B-2 virus caused myocarditis.

(Original article on page 355)