

黄芪对柯萨奇 B₃病毒感染培养大鼠心肌细胞 Ca²⁺内流及该病毒 RNA 复制的影响*

郭 棋¹ 彭天庆¹ 杨英珍¹ 顾全保² 赵剑星²

内容提要 本研究结果发现, 黄芪对柯萨奇 B₃病毒(CVB₃)感染大鼠心肌细胞及正常对照心肌细胞的 Ca²⁺内流均呈显著抑制作用($P < 0.01$, $P < 0.05$); 若在病毒感染 1 h 后加黄芪, 经 48 h 培养, 对正常对照及感染细胞的 Ca²⁺内流亦有抑制作用($P < 0.05$); 同时细胞中 CVB₃-RNA 含量显著少于病毒对照组($P < 0.001$)。提示黄芪具有钙拮抗作用, 可减少病毒感染引起的心肌 Ca²⁺内流量, 有可能减轻感染细胞的继发性 Ca²⁺损伤; 且对细胞中病毒 RNA 的复制具有抑制作用, 显示了其在病毒性心肌炎临床治疗上的应用价值。

关键词 病毒性心肌炎 柯萨奇 B₃病毒 黄芪 钙内流

Effect of Astragalus membranaceus on Ca²⁺ Influx and Coxsackie Virus B₃ RNA Replication in Cultured Neonatal Rat Heart Cells Guo Qi, Peng Tian-qing, Yang Ying-zhen, et al Zhongshan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai (200032).

The effect of *Astragalus membranaceus* (AM) on Ca²⁺ influx across the myocardial plasma membrane and coxsackie virus B₃(CVB₃)-RNA replication in cultured neonatal rat heart cells infected with CVB₃ was investigated. It was found that the Ca²⁺ influx could be inhibited significantly ($P < 0.01$) by AM after infection of heart cells for 48 h. In addition, when the cultured heart cells infected with CVB₃ and treated with AM for 48 h, the Ca²⁺ influx of infected heart cells also could be inhibited by AM ($P < 0.05$) and the amounts of CVB₃-RNA in myocytes were significantly decreased than that in infected control group ($P < 0.001$). These phenomena suggested that AM could exert the effects of decreasing the secondary Ca²⁺ damages, and improving the abnormal myocardial electric activity, and inhibiting replication of CVB₃-RNA in myocardium. Thus, it is a rational choice to treat patients with AM in viral myocarditis.

Key words Coxsackie virus B₃, viral myocarditis, Ca²⁺ influx, *Astragalus membranaceus*

病毒直接侵犯心肌及其引起的自身免疫反应, 是导致病毒性心肌炎的主要发病机理^(1~3)。这两种因素均可使心肌内 Ca²⁺超负荷^(3, 4), 这种继发性的 Ca²⁺损伤将进一步加重心肌病变。黄芪(*Astragalus membranaceus*, AM)作为一种中药制剂, 我们曾观察到其对感染的心肌细胞具有保护作用, 并可显著改善细胞动作电位的异常^(5, 6)。本研究应用放射性同位素⁴⁵Ca²⁺示踪技术及光敏生物素标记 cDNA 探针进行的柯萨奇 B₃病毒(CVB₃)-RNA 核酸杂交技术⁽⁷⁾, 旨在观察黄芪对 CVB₃感染培养心肌细胞的 Ca²⁺内流及其对感染细胞中 CVB₃-RNA 复制的影响, 并探

讨黄芪的临床应用价值。

材料与方法

1 培养心肌细胞及病毒感染 出生 1~3 天的 Sprague-Dawley 大鼠(由上海医科大学实验动物部提供), 取其心室肌用 0.1%胰蛋白酶分次消化细胞⁽⁴⁾, 所得的细胞悬液经纯化培养, 分装于 24 孔组织培养板, 每孔中 1 ml 生长液含 5×10^5 细胞, 生长液用含 20%小牛血清的 Eagle's MEM 液置 37°C 培养。18 h 后, 将已呈规律搏动的各孔心肌细胞分为两组: 病毒感染组和正常对照组, 弃上清液后, 在前组细胞中加 0.5 ml 含 100 50%组织感染率(TCID₅₀) CVB₃(Nancy 株, 在培养心肌细胞上测定 TCID₅₀为 10^{-4})的生长液, 后组仅加生长液。37°C 温育 1 h 后,

* 国家自然科学基金资助课题(No.39170359)

1. 上海医科大学中山医院(上海 200032); 2. 中国科学院上海细胞生物研究所

各组弃上清,加生长液 1 ml/每孔,置 37°C 培养观察。

2 黄芪处理及 Ca^{2+} 内流测定

2.1 心肌细胞感染 48 h 后黄芪处理 用无 Ca^{2+} -Ringer 液洗涤细胞 3 次。实验分组为:正常对照、病毒对照、黄芪对照、病毒加黄芪组。前两组加 $(\text{Ca}^{2+})_0$ 为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ringer 液,后两组另加含黄芪注射液(每支 2 ml,含黄芪生药 4 g,批号为 840308,由上海医科大学中山医院药剂科自制)0.2 mg/ml 的生长液,置 37°C 作预处理 5 min 后,各孔弃上清,加入含 1 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (1 mCi/0.1 ml, DOPOUT 产品)的标记液每孔 250 μl (后两组含黄芪);置 37°C 温育,分别在 1、5、10 min 取出吸去 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 标记液,采用冷镭法⁽⁴⁾即含 1 mmol/L 镭离子的 7% 山梨醇(冰浴)快速洗涤 3 次,每孔加 0.5 ml 5% 十二烷基磺酸钠(SDS)置室温 2 h,混匀后每孔取 200 μl 样品在液闪计数器(BECKMAN LS 6500)上测定每分钟脉冲数(cpm)。按 Lowry 法测定各组的每孔蛋白平均含量。结果按下法计算:

$$\text{Ca}^{2+}\text{内流量} = \frac{\text{cpm 数} \times [\text{Ca}^{2+}]_0 (\text{nmol})}{\text{总 cpm} \times \text{蛋白量} (\text{mg})}$$

2.2 心肌细胞感染 CVB₃ 后 1 h 加黄芪处理 在培养 48 h 后依上法洗涤细胞,实验分组同上,均用不含黄芪之 $(\text{Ca}^{2+})_0$ 为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的含 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 之 Ringer 液标记各组细胞。亦在 1、5、10 min 时取出,洗涤、计数方法同上。

3 CVB₃-cDNA 探针的制备 将克隆有 CVB₃ 全长 cDNA 质粒 pSPT 18(简称 pCVB₃-RI,由德国 Max Planck 生物化学研究所 Kandolf 教授惠赠)转化大肠杆菌 DH 5 a,进行质粒扩增,超离心回收和纯化,限制性内切酶 EcorI 酶切后,低熔点凝胶电泳分离得到 2.6 Kb 长的 DNA 片段(位于 CVB₃ 全长 cDNA 的 5' 端)。然后经缺口翻译标记地高辛,具体步骤见说明书(德国 Boehringer Mannheim 公司)。

4 RNA-cDNA 斑点杂交及其阳性信号的定量扫描 将 2.2 中的各组检测标本在感染 48 h 后,取相同含量的总 RNA (5 μg),分别在尼龙膜(购自德国 Boehringer Mannheim 公司)上进行点样。杂交前处理、杂交(杂交时间为 24 h)及显色(显色时间统一为 3 h)主要参照试剂盒说明书(德国 Boehringer Mannheim 公司)。在岛津 CS-910 扫描仪上对阳性杂交信号逐个进行扫描,并经计算机整合出其反射峰面积(μm^2)。具体 RNA-cDNA 斑点杂交及阳性信号的定量扫描方法参考文献⁽⁷⁾。

结 果

1 黄芪对 CVB₃ 感染心肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响

1.1 感染 48 h 后即刻加入黄芪 黄芪对照组较正常对照组的心肌细胞在各时间点(1、5、10 min)的心肌细胞 Ca^{2+} 内流显著减少($P < 0.05$),病毒加黄芪组则较病毒对照组对感染心肌细胞的 Ca^{2+} 内流抑制更强($P < 0.01$)。见附表。

附表 黄芪对正常及感染心肌细胞 Ca^{2+} 内流的抑制效应 ($\bar{x} \pm S$)

组别	n	Ca^{2+} 内流量(nmol/mg Pro)		
		1 min	5 min	10 min
正常对照	3	0.232 $\pm$ 0.039	0.291 $\pm$ 0.036	0.332 $\pm$ 0.030
黄芪对照	3	0.163 $\pm$ 0.021*	0.199 $\pm$ 0.030*	0.235 $\pm$ 0.049*
CVB ₃	3	0.651 $\pm$ 0.023	0.582 $\pm$ 0.053	0.672 $\pm$ 0.082
CVB ₃ +黄芪	3	0.427 $\pm$ 0.016 Δ	0.365 $\pm$ 0.014 Δ	0.453 $\pm$ 0.024 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与 CVB₃ 组比较, $\Delta P < 0.01$

附表示黄芪具备钙拮抗作用,既可抑制正常心肌的 Ca^{2+} 内流,又可显著减少病毒感染引起的心肌细胞 Ca^{2+} 内流增加。

1.2 CVB₃ 感染 1 h 加入黄芪 经 48 h 培养后,测定 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入的各时间点,病毒加黄芪组较病毒对照的心肌细胞 Ca^{2+} 内流亦显著减少($P < 0.05$)。说明黄芪对感染心肌细胞的保护作用亦体现在抑制其过高的 Ca^{2+} 内流,及保持其胞膜的性状及功能。

2 黄芪对培养心肌细胞 CVB₃-RNA 复制作用

2.1 CVB₃-cDNA 探针斑点杂交特异性 病毒对照组及病毒加黄芪组各标本细胞总 RNA 与 cDNA 探针杂交后均有阳性信号出现,黄芪对照组和正常对照组标本细胞总 RNA 杂交后未发现任何阳性信号。同时 CVB₃-cDNA 探针与质粒 pPST 18 DNA 杂交无阳性信号发现。

2.2 杂交信号扫描结果 阳性杂交信号经反射扫描后得到的反射峰面积反映被检测 CVB₃-RNA 的相对含量。结果表明,在心肌细胞总 RNA 含量相同(5 μg)的情况下,病毒加黄芪组阳性杂交信号反射峰面积($548 \pm 291 \mu\text{m}^2$)显著小于病毒对照组($2929 \pm 1354 \mu\text{m}^2$), $P < 0.001$,可见黄芪在培养心肌细胞中能有效地抑制 CVB₃-RNA 的复制。

讨 论

目前已知病毒性心肌炎的发病与病毒本身的溶细胞作用及免疫因素有关^(1~3)。近来的研究证实,上述

几种因素均可导致心肌的 Ca^{2+} 内流增加而致心肌细胞出现 Ca^{2+} 超负荷^(3, 4)。故近来有学者认为该现象也是心肌炎和扩张性心肌病的发病机理之一⁽³⁾。黄芪作为一种补气药, 在本室以往的研究中已经表明其对感染心肌具有保护作用⁽⁵⁾, 并可明显改善感染细胞的异常动作电位⁽⁶⁾及调节免疫功能⁽⁸⁾。本研究结果表明: (1)在病毒性心肌炎细胞模型上, 黄芪可显著抑制感染细胞中 CVB₃ 的核酸复制, 从而减轻病毒对心肌的直接损伤。(2)黄芪具备钙拮抗剂的作用, 可显著减少感染细胞的 Ca^{2+} 内流增加, 从而减轻心肌 Ca^{2+} 超负荷对细胞的进一步损伤。显示黄芪治疗病毒性心脏病有很好的应用前景。

参 考 文 献

1. Lawrence HC. Studies of virus-induced myocardial injury in mice: value of the scid mutation on different genetic backgrounds and combined with other mutations. *Lab Animal Sci* 1993; 43(2): 133.
2. Huber S, Polgar J, Moraska A, et al. T lymphocyte responses in CVB₃-induced murine myocarditis. *Scand J Infect Dis* 1993; suppl 88: 67.
3. Tominaga M, Matsumori A, Horie M, et al. Activation of Ca-permeable cation channels by myocarditis-associated antibody in guinea pig ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1993; 91: 1231.
4. 郭 棋, 杨英珍, 顾全保, 等. 病毒感染对培养心肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响. *中华医学杂志* 1993; 73(9): 562.
5. Yang YZ, Jin PY, Guo Q, et al. Treatment of experimental Coxsackie B₃ viral myocarditis with Astragalus membranaceus in mice. *Chin Med J* 1990; 103(1): 14.
6. Rui T, Yang YZ, Zhou TS, et al. Effect of Astragalus membranaceus on electrophysiological activities of acute experimental Coxsackie B-3 viral myocarditis in mice. *Chin Med Sci J* 1993; 8: 203.
7. 彭天庆, 徐 岩, 杨英珍. cDNA 探针检测柯萨奇 B₃ 病毒 RNA. *中华医学检验杂志* 1994; 17(1): 29.
8. 吴伟忠, 杨英珍, 金培英. 黄芪对 BALB/c 小鼠感染 Coxsackie B₃ 病毒后 T 细胞免疫的影响. *中国病毒学* 1992; 7(2): 129.

(收稿: 1995-02-27 修回: 1995-04-06)

通腑软膏敷脐对腹部术后胃肠功能恢复的临床观察

侯 勇 方秀萍 王秀菊

1993 年~1995 年 1 月, 我们对腹部术后患者应用通腑软膏敷脐, 观察其对胃肠功能恢复的影响。现报告如下。

临床资料 本组共 131 例, 随机分为治疗组 68 例和对照组 63 例。治疗组男 31 例, 女 37 例; 年龄 16~76 岁, 平均 46.0 ± 2.3 岁; 行胃大部切除术 14 例, 胆系手术 24 例, 阑尾切除术 21 例, 其他腹部手术 9 例。对照组男 29 例, 女 34 例; 年龄 16~75 岁, 平均 44.6 ± 3.1 岁; 行胃大部切除术 13 例, 胆系手术 22 例, 阑尾切除术 19 例, 其他腹部手术 9 例。

治疗方法 治疗组以通腑软膏(甘遂、大黄、冰片按 6:3:1 比例, 由本院制剂室制备)敷脐, 术后即用, 每次 10 g 左右, 每日 2 次, 以纱布覆盖, 至排便后停用, 其他均按术后常规处理。对照组只按术后常规处理。

结 果 治疗组在术后肠鸣音恢复、肛门排气、排便和饮食恢复时间均早于对照组, 胃肠减压时间和术后静脉输液总量也均少于对照组, 各项指标两组比较均有显著差异($P < 0.01$), 见附表。治疗组无因用药所致的任何副作用及并发症发生。

附表 两组术后胃肠功能恢复时间及补液量比较 ($\bar{x} \pm S$)

组别	例数	肠鸣音恢复	肛门排气	排便	饮食恢复	胃肠减压	补液
				(h)			(L)
治疗	68	$21.6 \pm 10.7^*$	$37.3 \pm 17.0^*$	$41.9 \pm 17.6^*$	$42.3 \pm 20.5^*$	$72.0 \pm 12.0^*$	$5.2 \pm 1.9^*$
对照	63	41.1 ± 15.9	65.8 ± 23.2	77.9 ± 24.9	71.2 ± 35.4	96.0 ± 24.0	7.7 ± 3.4

注: 与对照组比较, $*P < 0.01$; 行胃肠减压治疗组 21 例, 对照组 19 例

讨 论 腹部手术后由于麻醉、手术操作和原发病的影响, 临床多出现不同程度的痛、胀、吐、闭等阳明腑实证候。根据中医“六腑以通为用”和脐疗的经络脏腑相关学说, 对腹部手术患者术后即用通腑软膏

敷脐, 方以甘遂为主药, 取其峻下之力, 辅以大黄通腑泄热, 借冰片渗透之性, 共同作用于神阙穴, 深入肠内, 使腑气得通, 诸症即消。腹部术后即用, 既防且治。由于本法较之内服等方法具有简廉、方便、安全和适用范围广的优点, 故值得临床推广。