

· 实验研究 ·

中西医结合治疗小鼠柯萨奇 B₃ 病毒性心肌炎的实验研究*

熊丁丁 杨英珍 宿燕岗 胡 英 陈灏珠

内容提要 **目的:** 观察中西医结合治疗小鼠柯萨奇 B₃ (CVB₃) 病毒性心肌炎 (VMC) 的疗效。**方法:** 腹腔接种 CVB₃ 病毒液以建立 VMC 模型。随机等分为对照、黄芪、牛磺酸和辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 单独用药组及黄芪分别加牛磺酸、CoQ₁₀ 治疗组以及三药联合治疗组。观察 7 组在死亡率、心电图、心肌中 CVB₃ RNA 含量及心肌形态学改变差别。**结果:** 黄芪联合牛磺酸和 CoQ₁₀ 治疗可明显降低小鼠的死亡率及急性期异常心电图的发生率; 黄芪具有一定的抗病毒能力, 联合牛磺酸后抗病毒能力增强。而 CoQ₁₀ 则无明显抗病毒作用; 三种药物均可减轻心肌的病变程度, 尤以三药联合的作用为好。**结论:** 黄芪、牛磺酸和 CoQ₁₀ 对 VMC 小鼠均有一定的疗效, 联合使用可使疗效增强。

关键词 病毒性心肌炎 黄芪 牛磺酸 辅酶 Q₁₀

Experimental Study on Treatment of Viral Myocarditis in Mice by Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Xiong Dingding, Yang Yingzhen, Su Yangang, et al *Ministry of Health Key Laboratory of Viral Heart Diseases, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital of Shanghai Medical University, Shanghai (200032)*

Objective: To clarify the effects of Astragalus Membranaceus (AM) combined with taurine and/or coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) on coxsackievirus B₃ (CVB₃) murine myocarditis. **Methods:** Viral myocarditis model was created by intraperitoneal inoculation with CVB₃ solution and were treated by saline, AM, taurine, CoQ₁₀, AM + taurine, AM + CoQ₁₀, AM + taurine + CoQ₁₀, respectively. The mortality, ECG, CVB₃-RNA in myocardium and myocardial histopathologic changes were observed. **Results:** AM combined with taurine and CoQ₁₀ could significantly reduce the mortality of the mice and the incidence of abnormal ECG at acute stage. CVB₃-RNA was significantly reduced in AM treated group, especially in AM + taurine group. No anti-virus effect was found in CoQ₁₀ group. All drugs could lighten myocardial histopathologic changes and the effect could be enhanced by combined treatment. **Conclusions:** AM, taurine and CoQ₁₀ have some curative effects on CVB₃ murine myocarditis, AM combined with taurine and CoQ₁₀ is the best.

Key words viral myocarditis, Astragalus Membranaceus, taurine, coenzyme Q₁₀

病毒性心肌炎 (Viral Myocarditis, VMC) 至今尚无特异有效的治疗方法。我们以往的研究表明黄芪、牛磺酸对 VCM 均有一定的疗效^(1,2), 而辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 具有细胞改善能量代谢和心功能的作用⁽³⁾。本研究将观察它们联合治疗实验性 VMC 的疗效, 为其临床应

用提供实验依据。

材料与方法

1 材料

1.1 病毒 柯萨奇 B₃ 病毒 (CVB₃, Nancy 株) 由美国 ATCC 引入, 于 Hep-2 细胞中扩增后, 病毒滴度为 10⁹ TCID₅₀/ml。

1.2 动物 雄性 4 周龄 BALB/C 小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供。

* 本课题获上海市领先专业及国家九·五攻关课题资助

卫生部病毒性心脏病重点实验室, 上海医科大学中山医院, 上海市心血管病研究所 (上海 200032)

1.3 药物 黄芪注射液(4g/2ml):上海福达制药有限公司产品,批号 950701;牛磺酸:Sigma 公司产品;CoQ₁₀(10mg/片):上海普康制药厂生产。

2 动物模型与分组 280 只小鼠分别腹腔接种 0.1ml CVB₃ 病毒液以建立 VMC 模型。随机等分为 7 组,A 组:生理盐水对照组;B 组:黄芪治疗组;C 组:牛磺酸治疗组;D 组:CoQ₁₀ 治疗组;E 组:黄芪加牛磺酸治疗组;F 组:黄芪加 CoQ₁₀ 治疗组;G 组:黄芪加牛磺酸加 CoQ₁₀ 治疗组。

3 给药方法 在接种病毒 30min 后开始给药。黄芪注射液 0.1ml 腹腔注射;牛磺酸 50mg、CoQ₁₀ 2mg 及生理盐水灌胃给药。每日给药 1 次,持续 1 周。

毒性实验:各组取 10 只,观察其 21 天内的死亡率及心肌形态学变化。

4 取材及切片方法 感染后第 8 天及 21 天,各组分别取 15 只小鼠或剩余存活小鼠,记录心电图后处死取心脏,置 4% 多聚甲醛固定。石蜡包埋后沿左室长轴,每隔 1mm 连续切片 2 张,分别贴于载玻片上,供原位杂交及病理学检查。

此外,取 10 只非感染小鼠用于毒性试验,按上述剂量及方法给予黄芪和牛磺酸,持续 1 周,观察其死亡率及心肌形态。

5 心电图检查 记录小鼠清醒状态时的心电图,测定异常心律、传导异常、异常 Q 波。

6 原位杂交及其结果相对定量 按地高辛随机引物 DNA 探针标记试剂盒(BM 公司)说明制备 CVB₃ cDNA 探针;按原位杂交常规方法检测心肌中 CVB₃ RNA⁽⁴⁾。在图像分析上,每张切片随机取 5 个高倍镜视野,测定一定面积内阳性信号面积和阳性信号平均灰度值的乘积,按下列公式计算 CVB₃ RNA 阳性信号指数:CVB₃ RNA 阳性信号指数 = 阳性信号的面积 × 阳性信号平均灰度值 × 100/测定面积。

7 病理检查及半定量分析 常规 HE 染色,光镜下(200 倍)观察心肌的病理改变,并参考 Rezkalla 的方法⁽⁵⁾计算心肌病理组织学积分,即每张切片随机取 5 个高倍镜视野,计算每个视野中炎症与坏死面积与视野中整个心肌切片面积之比:无病变计 0 分,病变面积 <25% 计 1 分,25% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 75% 计 3 分,>75% 计 4 分。

8 统计学分析 实验所得数据均用($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较用方差分析,率的比较用 χ^2 检验。

结 果

1 各组小鼠死亡率 A、B、C、D、E、F 和 G 组在 21 天内的死亡率分别为 64%、40%、50%、50%、20%、20% 和 10%。统计学表明 G 组与 A 组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

2 心电图改变 所有小鼠感染前行心电图检查,均未发现异常变化;感染后第 8 天,各组取 15 只小鼠复查心电图,部分可见窦房及房室传导阻滞和异常 Q 波等异常变化。各组异常心电图发生率依次分别为 93.3%、45.0%、53.3%、53.3%、26.7%、26.7% 和 6.0%。统计学显示,药物治疗均能明显降低小鼠急性感染期异常心电图的发生率(与 A 组比较, $P < 0.05$)。其中,G 组明显强于单一用药组($P < 0.05$),而单一用药组之间无明显差异($P > 0.05$),两药联合治疗组间与一药或三药联合治疗组相比也无显著性差异($P > 0.05$)。感染后第 21 天,所有存活鼠心电图均未见异常。

3 原位杂交检测心肌中 CVB₃ RNA 及结果相对定量 大多数 CVB₃ 感染小鼠心肌组织切片中可见部分心肌纤维染成紫蓝色。CVB₃ RNA 阳性信号指数如表 1 所示,经统计学分析表明:(1)B、E、F 和 G 组 CVB₃ RNA 阳性信号指数均明显低于其他组($P < 0.01$),E 和 G 组又明显低于 B 和 F 组($P < 0.01$),但 E 组与 G 组间、B 组与 F 组间无显著性差异($P > 0.05$);C 组阳性信号指数低于 A 组但无显著性差异($P > 0.05$),D 组与 A 组也无显著性差异($P > 0.05$)。结果提示:黄芪具有一定的抑制心肌中 CVB₃ RNA 复制的作用,且与牛磺酸联合治疗抗病毒作用更强,而 CoQ₁₀ 则无明显的抗病毒作用。

表 1 各组小鼠心肌中 CVB₃ RNA 阳性信号指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CVB ₃ RNA 阳性信号指数	
	感染后第 8 天	感染后第 21 天
A	31.95 ± 2.05(15)	19.10 ± 0.71(8)
B	21.75 ± 2.61* ^{△△} (15)	13.10 ± 0.99* ^{△△} (11)
C	27.05 ± 1.90(15)	18.00 ± 2.55(10)
D	31.70 ± 3.96(15)	19.55 ± 0.78(10)
E	13.45 ± 3.18* ^{△△} ○●(15)	6.70 ± 1.83* ^{△△} ○●(13)
F	20.45 ± 2.21* ^{△△} (15)	12.00 ± 1.83* ^{△△} (13)
G	13.45 ± 2.05* ^{△△} ○●(15)	6.60 ± 1.50* ^{△△} ○●(15)

注:与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 C 组比较,[△] $P < 0.01$;与 D 组比较,[△] $P < 0.01$;与 B 组比较,○ $P < 0.01$,与 F 组比较,● $P < 0.01$;()内为鼠数

表 2 CVB₃ 感染小鼠心肌病理变化积分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	感染后第 8 天			感染后第 21 天		
	鼠数	炎性浸润	坏死	鼠数	炎性浸润	坏死
A	15	3.33 ± 0.60 [△]	3.13 ± 0.50 [△]	8	2.63 ± 0.48 [△]	2.50 ± 0.50 [△]
B	15	2.13 ± 0.62* ^{△▲○}	2.00 ± 0.52* ^{△▲○}	11	1.73 ± 0.45* ^{△▲○}	1.55 ± 0.50* ^{△▲○}
C	15	2.00 ± 0.52* ^{△▲○}	1.93 ± 0.57* ^{△▲○}	10	1.80 ± 0.40* ^{△▲○}	1.60 ± 0.49* ^{△▲○}
D	15	2.07 ± 0.57* ^{△▲○}	2.00 ± 0.52* ^{△▲○}	10	1.88 ± 0.40* ^{△▲○}	1.60 ± 0.49* ^{△▲○}
E	15	1.47 ± 0.50* [△]	1.27 ± 0.44* [△]	13	1.15 ± 0.53* [△]	1.08 ± 0.47* [△]
F	15	1.33 ± 0.47* [△]	1.27 ± 0.44* [△]	13	1.23 ± 0.42* [△]	1.23 ± 0.57* [△]
G	15	0.40 ± 0.49*	0.33 ± 0.47*	15	0.33 ± 0.47*	0.27 ± 0.40*

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 G 组比较,[△] $P < 0.05$,与 E 组比较,[▲] $P < 0.05$,与 F 组比较,[○] $P < 0.05$

4 病理组织学检查 感染后第 8 天和 21 天,多数小鼠心肌有单核细胞浸润及坏死等心肌炎改变,各组心肌病理组织变化积分,见表 2。所有药物治疗组心肌炎性和坏死等病理改变均明显轻于 A 组($P < 0.05$);B、C 和 D 组无显著性差异($P > 0.05$),且均比 G 组严重($P < 0.05$),G 组小鼠病变程度最轻(和其他组比较, $P < 0.05$)。

5 毒性试验 观察期间非感染小鼠用药后无死亡,小鼠心肌均未见病理改变。

讨 论

VMC 尚无有效治疗措施。黄芪的有效成分具有抗病毒和调节免疫功能等作用。我们以往的研究发现其对 VMC 动物及患者均有较好的疗效,其机制主要有:减轻心肌的炎症浸润及坏死程度;降低心肌中 CVB₃ RNA 及病毒滴度;改善由 CVB₃ 引起的外周血、脾脏及心肌中总 T 细胞、辅助 T 细胞及毒性 T 细胞异常分布;减轻心肌细胞异常电活动^[1]。牛磺酸是正常心肌中固有的一种游离氨基酸,其对正常心功能的维持有重要作用,对心力衰竭、心肌缺血、高血压及心律失常等也均有明显的疗效^[2]。此外,氧自由基的过度产生、心肌细胞能量代谢异常均是 VMC 病心肌损害的重要机制,而 CoQ₁₀ 具有改善心肌能量代谢、清除氧自由基等作用,对各种原因引起的心功能不全均有一定的疗效^[3]。因而,选用这三种药分别及联合治疗实验性 VMC,并比较它们的疗效以寻求治疗 VMC 的最佳途径。

VMC 小鼠死亡率主要与心肌病变的程度及心律失常等因素有关;心电图也能较好的反映心肌病变程度,传导异常和异常 Q 波是 VMC 小鼠的主要心电图变化,且有心电图改变者,多数有病理损害;原位杂交是一项敏感性较强、特异性较高的检测心肌 CVB₃ RNA 的方法,CVB₃ RNA 阳性信号指数的高低可部分反映心肌 CVB₃ RNA 的复制水平;病理和原位杂交检

查的切片均取材于心脏的多个不同部位,因而共检查结果也能较好的反映整个心脏的情况。Rezkalla 介绍的心肌组织病变的半定量方法^[5]则是一种能较直接地评价心肌病变程度的手段。因此,我们采用上述方法和指标来评价药物治疗 CVB₃ 小鼠 VMC 的疗效。

本研究结果显示:(1)黄芪联合牛磺酸和 CoQ₁₀ 治疗可明显降低 CVB₃ 感染小鼠的死亡率;(2)三药均可降低 VMC 小鼠急性期 VMC 小鼠异常心电图的发生率,但三药联合治疗的效果最好;感染后第 21 天,可能由于小鼠心肌损害均有一定程度的恢复及心功能的改善等原因,心电图均恢复正常;(3)黄芪具有一定的抗病毒能力,联合牛磺酸后抗病毒能力增强。而 CoQ₁₀ 则无明显抗病毒作用,其治疗 VMC 小鼠的机制可能与清除氧自由基、改善心肌能量代谢和心功能有关;(4)上述三种药物均可减轻 VMC 小鼠心肌的病变程度,尤以三药联合的作用为甚,而两药联合又优于单一用药;(5)实验用药剂量对小鼠心脏无病理损害。上述结果提示:黄芪、牛磺酸和 CoQ₁₀ 对 VMC 小鼠均有一定的疗效,它们联合使用可使疗效增强,尤以三药联合的效果最好。

参 考 文 献

1. 杨英珍. 黄芪治疗病毒性心肌炎. 上海医药 1995;(2):28—31.
2. 宿燕岗. 牛磺酸及其在心血管系统疾病中的应用. 国外医学心血管病分册 1996;23(3):138—142.
3. Mretensen SA. Perspective on therapy of myocardial diseases with coenzyme Q10. Seventh International Symposium on the Biomedical and Clinical Aspects of Coenzyme Q₁₀ Copenhagen, Denmark. 1992:11.
4. 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京:人民军医出版社, 1996:137—141.
5. Rezkalla S, Kloner RA, Khatib G, et al. Beneficial effects of captopril in acute coxsackievirus B3 murine myocarditis. Circulation 1990;81:1039—1040.

(收稿:1997-07-21 修回:1998-04-30)