

· 实验研究 ·

黄芪总皂甙对病毒性心肌炎小鼠心肌损伤及肌浆网钙泵的影响*

陆 曙 张寄南 杨 笛 徐晋丹 陈相健 方五旺 马文珠

内容提要 目的:观察黄芪总皂甙(AS)及黄芪注射液(AI)对病毒性心肌炎(VMC)小鼠心肌损伤的保护作用及其对心肌肌浆网钙泵的影响。方法:腹腔接种柯萨奇 B₃ 亲心肌病毒株建立小鼠 VMC 模型,分成模型组、AS 组、AI 组及正常对照组,分别观察各组小鼠死亡率、心肌病理变化、血清心肌肌钙蛋白 I(cTnI)含量及心肌肌浆网钙泵(SERCA)活力等指标。结果:模型组死亡率高于对照组($P=0.0042$)、AS 组及 AI 组($P<0.05$);cTnI 含量显著高于对照组($P<0.001$),也高于 AS 组($P<0.025$)及 AI 组($P<0.05$)。AS 及 AI 组的心肌坏死和炎症等病理改变则轻于模型组($P<0.01$)。模型组心肌 SERCA 活力显著低于对照组($P<0.001$),AS 组($P<0.01$)及 AI 组($P<0.05$)。结论:AS 和 AI 对 VMC 小鼠心肌损害具有不同程度的保护作用,AS 是黄芪治疗 VMC 的有效成分;改善 VMC 小鼠心肌 SERCA 的活力,可能是黄芪及 AS 保护感染病毒小鼠心肌免受损害的作用机制之一。

关键词 病毒性心肌炎 黄芪总皂甙 肌浆网钙泵

Effects of Astragaloside in Treating Myocardial Injury and Myocardial Sarco/Endoplasmic Ca^{2+} -ATPase of Viral Myocarditis Mice Lu Shu, Zhang Jinan, Yang Di, et al. *Institute of Cardiovascular Diseases, The First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing (210029)*

Objective: To investigate the effects on myocardial injury and sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase of viral myocarditis mice treated with Astragaloside (AS) and Astragalus Injection (AI). **Methods:** Viral myocarditis model was created by intraperitoneal inoculation with coxsackievirus B_{3m}(CVB_{3m}) solution and were divided into model, AS, AI and normal control groups. The mortality, myocardial pathological changes, serum cardiac troponin I (cTnI) and the activity of myocardial Sarco/Endoplasmic Ca^{2+} -ATPase (SERCA) were observed. **Results:** The mortality of model was higher than that of the normal control ($P=0.0042$), AS and AI ($P<0.05$). The serum level of cTnI of model was significantly higher than that of the normal control ($P<0.001$), AS ($P<0.025$) and AI ($P<0.05$). The myocardial necrosis and inflammatory changes of AS and AI groups were alleviated than that of model ($P<0.01$). The activity of myocardial SERCA of model were significantly lower than that of normal control ($P<0.001$), AS ($P<0.01$) and AI ($P<0.05$). **Conclusions:** AS and AI have some protecting effects on myocardial injury of viral myocarditis mice. AS is the effective component of *Astragalus membranaceus* in treating viral myocarditis. One of the mechanisms of *Astragalus membranaceus* and AS for viral myocarditis mice depriving of the myocardial injury may be due to improve the activity of myocardial SERCA in the mice.

Key words viral myocarditis, Astragaloside, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

黄芪治疗病毒性心肌炎(VMC)具有一定的疗效^{〔1〕}。但黄芪含有多种皂甙、黄酮、多糖,以及氨基酸、亚油酸、生物碱、胆碱、 β -谷甾醇等复杂的化学成分。

为深入探讨其药效及作用机制,本研究观察了黄芪总皂甙对病毒性心肌炎小鼠心肌损伤的保护作用及其对心肌肌浆网钙泵的影响。

材料和方法

1 动物 4 周龄雄性纯种 BALB/c 小鼠(南京医

* 国家“九五”科技攻关项目(卫生部,卫科教计发[1996]第 85 号)

的部分内容

南京医科大学第一附属医院心血管病研究所(南京 210029)

科大学动物中心提供), 共 84 只。

2 病毒 柯萨奇 B₃ 亲心肌病毒株(CVB_{3m}), 由上海第二医科大学微生物学教研室刘晶星教授赠送。病毒原液效价, 50% 组织感染率(TCID₅₀)为 10⁻⁶。

3 药物和试剂 (1) 黄芪总皂甙注射液(AS): 黄芪总皂甙由南京中医药大学中医药研究院从蒙古黄芪中提取, 为淡黄色粉末, 经鉴定为三萜类皂甙; 参照文献⁽²⁾以黄芪甲甙(中国药品生物制品检定所出品)为标准测定, 所提黄芪总皂甙中含 26% 的黄芪甲甙。以生理盐水溶解, 调 pH 至 7.4, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得 1mg/ml 的 AS, 分装备用。(2) 黄芪注射液(AI, 4g/2ml), 上海福达制药有限公司产品, 批号 970206。(3) 试剂: 对-硝基酚(p-NP)、对-硝基苯磷酸(p-NPP)、Hepes、EGTA、TritonX-100 均购自 Sigma 公司, 其余为国产分析纯。

4 病毒感染及分组给药 BALB/c 小鼠随机分成 4 组。模型组(感染加生理盐水), 22 只; AS 组(感染加 AS), 26 只; AI 组(感染加 AI), 18 只; 对照组, 18 只。模型组、AS、AI 组分别于实验当天每鼠腹腔注射 0.1ml, 2 × 10⁴ TCID₅₀ 的 CVB_{3m}; 对照组每鼠腹腔注射 0.1ml 不含病毒的培养液。于病毒感染后开始, 模型组及对照组小鼠每只每天腹腔注射生理盐水 0.15ml, AS 组小鼠则每只腹腔注射 AS 0.15ml, AI 组每只小鼠腹腔注射 AI 0.15ml; 各组小鼠均连续 7 天腹腔注射。

5 标本取材 于实验第 8 天, 从小鼠眼眶取血, 分离血清待检。取血后处死, 取心脏中下 1/3 处的部分心肌, 用 10% 福尔马林固定待用。取其余心室肌组织, -70℃ 保存备用。

6 观测指标

6.1 统计小鼠死亡率。

6.2 心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI) 血清 cTnI 含量, 采用本室建立的改良 Bodor 夹心 ELISA 法测定⁽³⁾, 浓度单位为 μg/L。

6.3 病理组织学检查 10% 福尔马林固定的心肌用石蜡包埋后作连续切片, HE 染色, 光镜下观察心肌的病理改变, 并参考文献方法⁽⁴⁾计算心肌病理组织学积分。每张切片计算其中心肌坏死及炎症面积与整个心肌切片面积的比值: 无病变计 0 分, 病变面积 < 25% 计 1 分, 25% ~ 50% 计 2 分, 50% ~ 75% 计 3 分, > 75% 计 4 分。

6.4 肌浆网钙泵(Sarco/Endoplasmic Ca²⁺-ATPase, SERCA)活力 心肌 SERCA 活力, 采用本室改良建立的 p-NPP 法测定⁽⁵⁾。反应体系含心肌匀浆,

20mmol/L Hepes, pH7.4, 1mmol/L MgCl₂, 1mmol/L EGTA, 0.01% TritonX-100, 100mmol/L KCl, 加或不加 0.8mmol/L CaCl₂, 预温 37℃ 10min, 加 10mmol/L p-NPP 37℃ 反应 30min, 结束时用冷缓冲液终止反应, 在波长 410nm 处测定 p-NP 生成量, 与标准 p-NP 浓度曲线比较, 并与时间及组织蛋白量相比即得 SERCA 活力单位(μmol/g pro·min)。

7 统计学分析 均数组间比较用 *t* 检验, 率的比较用 χ^2 检验, cTnI 数据用秩和检验。

结 果

1 各组小鼠死亡率 模型组、AS 及 AI 组在 7 天内的死亡率分别为 36.4%、7.7%、5.6%, 对照组无死亡。经统计学 χ^2 检验, 模型组死亡率显著高于对照组 ($P=0.0042$)、也高于 AS 及 AI 组 ($P<0.05$)。

2 血清心肌肌钙蛋白 I 变化 对照组、模型组、AS 及 AI 组的血清 cTnI 含量(μg/L)分别为: 0 ($n=8$)、6.79 ± 5.53 ($n=9$)、1.50 ± 3.67 ($n=12$) 及 1.5 ± 2.36 ($n=13$)。经秩和检验分析表明: 模型组 cTnI 含量显著高于对照组 ($P<0.001$), 也明显高于 AS 组 ($P<0.025$) 及 AI 组 ($P<0.05$)。AS 组与 AI 组及对照组比较, 差异无显著性; 而 AI 组与对照组比较, 则有显著性差异 ($P<0.05$)。

3 病理组织学改变 感染 CVB_{3m} 后第 8 天模型组、AS 及 AI 组小鼠心肌可见不同程度的崩解坏死、钙化、炎性细胞浸润等心肌炎病理改变, 对照组则无明显病理改变。各组坏死及炎性细胞浸润的病理积分见表 1。模型组与 AS 及 AI 组比较, 其心肌坏死和炎症的程度均显著加重 ($P<0.01$); AS 与 AI 组比较, 差异无显著性。

表 1 CVB_{3m} 感染小鼠心肌病理变化积分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	心肌坏死	炎性浸润
模型	14	3.14 ± 0.86	3.36 ± 0.74
AS	12	1.75 ± 1.28*	1.50 ± 0.67*
AI	17	2.12 ± 1.06*	1.88 ± 1.05*

注: 与模型组比较, * $P<0.01$

4 心肌肌浆网钙泵变化 对照组、模型组、AS 及 AI 组的心肌 SERCA 活力(μmol/g pro·min)分别为: 1.99 ± 0.29 ($n=8$)、0.82 ± 0.41 ($n=9$)、1.68 ± 0.50 ($n=12$) 及 1.32 ± 0.54 ($n=13$)。经 *t* 检验, 模型组心肌 SERCA 活力显著低于对照组 ($P<0.001$), 也低于 AS 组 ($P<0.01$) 及 AI 组 ($P<0.05$)。AI 组 SERCA 活力明显低于对照组 ($P<0.05$), 但与 AS 组比较差异无显著性差异 ($P>0.05$)。

讨 论

临床及实验研究认为,黄芪对 VMC 具有较好的疗效⁽¹⁾。本实验则进一步探讨了其有效成分黄芪总皂甙(AS)对 VMC 小鼠心肌损伤的保护作用以及可能的作用机制。

心肌肌钙蛋白 I(cTnI)是一项新的敏感而特异的心肌损伤指标。文献报道柯萨奇病毒感染后小鼠既有心肌损害,又存在明显的骨骼肌坏死及炎症⁽⁶⁾,本实验采用抗 cTnI 单抗检测血清中 cTnI 含量,因其不与骨骼肌肌钙蛋白 I 交叉⁽³⁾,故具有较高的特异性,从而避免了由骨骼肌损害引起的干扰。模型组血清 cTnI 含量显著高于对照组,显示其心肌损害较为严重;实验中 AS 及 AI 组 cTnI 值均低于模型组,综合心肌坏死及炎症的病理积分结果,认为黄芪总皂甙和黄芪注射液对 VMC 小鼠心肌损害具有不同程度的保护作用;进而提示黄芪总皂甙是黄芪治疗 VMC 的有效成分之一。

VMC 发病机制尚未完全阐明,一般认为包括病毒直接损害心肌以及细胞毒和自身免疫反应对心肌的损害。有研究表明:在上述因素作用下,心肌细胞钙通道活化, Ca^{2+} 内流增加,细胞内游离钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)升高,从而导致细胞内钙超载,这也被认为是 VMC 心肌损害的发病机制之一⁽⁷⁻⁹⁾。心肌 SERCA(即肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶)是将胞浆内游离钙主动转运至肌浆网内贮存的一种钙调节蛋白,对调节 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 非常重要⁽⁵⁾。本实验观察到模型组小鼠心肌 SERCA 活力明显低于对照组,这将导致 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的持续升高,乃至细胞内钙的超载,提示 SERCA 活力降低可能是引起 VMC 心肌损害的一个重要因素。增强 SERCA 活力

有利于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的回降和细胞内钙超载的减轻。实验中 AS 及 AI 组小鼠 SERCA 活力较模型组为高,提示改善 VMC 小鼠心肌 SERCA 的活力,可能是黄芪及黄芪总皂甙保护感染病毒小鼠心肌免受损害的作用机制之一。

参 考 文 献

1. 陆 曙,张寄南.黄芪的心血管药理研究进展.中草药 1998;29(1):59—68.
2. 潘 飞,冯毓秀,陈四保,等.黄芪类药用植物皂甙类成分分析.中国中药杂志 1995;20(7):391—393.
3. 张寄南,杨国平,苏恩本,等.血清肌钙蛋白 I 诊断急性心肌梗塞的研究.中华心血管病杂志 1997;25(5):379—382.
4. Yamamoto N, Shibamori M, Ogura M, et al. Effects of Intranasal Administration of Recombinant Murine Interferon- γ on Murine Acute Myocarditis Caused by Encephalomyocarditis Virus. Circulation 1998;97:1017—1023.
5. 祝宝华,张寄南,马文珠,等.肌浆网钙泵测定及其在高血压心肌中的变化.南京医科大学学报 1998;18(5):390—392.
6. 林久治,王慧瑛,孙国贤,等.小鼠柯萨奇 B4 病毒感染的病理观察.中华病理学杂志 1986;15(2):110—113.
7. 郭 棋,杨英珍,顾全保,等.病毒感染对培养心肌细胞钙离子内流的影响.中华医学杂志 1993;73(9):562—563.
8. 垣尾匡史,松森昭.ウイルス性心筋炎と自己免疫.日本临床 1997;55(6):1498—1504.
9. Felzen B, Shilkut M, Less H, et al. Fas (CD5/Apo-1)-mediated damage to ventricular myocytes induced by cytotoxic T lymphocytes from perforin-Deficient mince. Circ Res 1998;82:438—450.

(收稿:1999-02-26 修回:1999-08-02)

欢迎订阅 2000 年《中草药》杂志

《中草药》杂志是由国家药品监督管理局主管,中草药信息中心站和国家药品监督管理局天津药物研究院主办的国家级期刊,月刊,国内外公开发行人。本刊创刊于 1970 年 1 月,1992 年荣获国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署组织的全国优秀科技期刊评比一等奖;1997 年荣获第二届全国优秀科技期刊评比二等奖;1991 年荣获国家医药管理局医药情况成果一等奖;1990 年、1993 年、1995 年和 1997 年连续 4 次荣获天津市优秀期刊奖。经天津市自然科学期刊评估委员会评估,本刊分别被评为天津市 1995 年度、1997 年度一级期刊。北京高校图书馆期刊工作研究会、北京大学图书馆 1992 年在我国首次调研编制的《中文核心期刊要目总览》(北京大学出版社出版)中,本刊被确认为全国中文核心期刊,1996 年再次被确认。1997 年中国科技论文统计源期刊(共 1214 种)被引次数,本刊为 711 次,排名为全国科技期刊的第 14 位;1997 年中国科学引文数据库的统计数据表明,在被引频次最高的中国科技期刊的前 500 名排行表中,本刊名列第 16 位,在生命科学和医药卫生类期刊中名列第 4 位。1998 年我国有 89 种期刊入选“CA 千种表”,本刊排名为 797 名,为我国入选期刊的第 52 名。从 1999 年第 1 期开始,本刊加入 ChinaInfo 网络服务系统,网址: <http://www.ChinaInfo.gov.cn/periodical>,欢迎作者与读者查阅。本刊主要报道中草药化学成分;药剂工艺、生药炮制、产品质量、检验方法;药理实验和临床观察;药用动物的饲养、药用植物的栽培、药物资源调查等方面的研究论文,并辟有综述、短文、新药开发纵谈、新产品、企业介绍、学术动态和信息等栏目。科研论文附英文摘要或以英文刊登。为了增加信息量,与国际接轨,本刊从 2000 年第 1 期起改为大 16 开本,每期 80 页,定价 12.80 元。国内邮发代号:6—77,国外代号:M221,请到当地邮局订阅。编辑部地址:天津市南开区鞍山西道 308 号,邮编:300193;电话:(022)27474913。