

# 肾上腺皮质激素对柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒感染小鼠心肌的保护作用

王述昀<sup>1</sup>, 牟道玉<sup>2</sup>, 宋军华<sup>1</sup>, 邵东风<sup>1</sup>, 马沛然<sup>3</sup>

(山东大学医学院 1. 病理生理学教研室, 2. 生物医学工程研究所,  
山东省济南市 250012; 3. 山东省立医院儿科, 山东省济南市 250021)

[关键词] 病理学与病理生理学; 肾上腺皮质激素对心肌炎小鼠心肌的保护作用; 空斑形成单位法; 肾上腺皮质激素; 柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒; 心肌病理积分; 病毒滴度; 肌钙蛋白 I

[摘要] 目的 探讨肾上腺皮质激素对柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒感染小鼠心肌损害的治疗作用。方法 将 200 只 4 周龄 Balb/c 小鼠随机分为正常对照组、病毒对照组和病毒感染后早期激素治疗组、中期激素治疗组及晚期激素治疗组, 每组 40 只。在病毒感染后不同时期计算心肌病理积分, 空斑形成单位法测定心肌细胞病毒滴度, 化学发光法检测血清肌钙蛋白 I 水平。结果 病毒感染后 7~10 天, 柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒感染各组小鼠心肌病理积分均显著高于正常对照组, 而各感染组之间无显著性差异。病毒感染后 14 天, 中期激素治疗组小鼠心肌病理积分显著低于其他病毒感染组, 30 天后中期激素治疗组小鼠心肌已完全正常, 而其他各组小鼠心肌仍有病变。病毒感染后早期激素治疗组心肌病毒滴度显著高于其他各组, 且消失慢。病毒性心肌炎小鼠血清肌钙蛋白 I 水平显著升高, 并与病理变化呈直线正相关。结论 肾上腺皮质激素可以明显减轻病毒性心肌炎时心肌的病理损害, 对心肌细胞有保护作用, 尤以病毒感染中期使用激素治疗疗效最好。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Protection of Cardiomyocytes in Murine Viral Myocarditis with Adrenocorticoids Therapy

WANG Shu Yun<sup>1</sup>, MOU Dao Yu<sup>2</sup>, SONG Jun Hua<sup>1</sup>, SHAO Dong Feng<sup>1</sup>, and MA Pei Ran<sup>3</sup>

(1. Department of Pathophysiology, 2. Institute of Biomedical Engineering, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012; 3. Department of Pediatrics, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021; China)

[KEY WORDS] Adrenocorticoid; Coxsackievirus B<sub>3</sub>; Myocardial Histopathological Score; Virus Titer; Cardiac Troponin I; Plaque-Forming Unit; Balb/c Mice

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate the effect of adrenocorticoids on viral myocarditis. **Methods** Two hundreds male 4 week-old Balb/c mice were divided into five groups randomly, including normal control group, infected control group, group of infected mice with adrenocorticoids treatment at early stage, group of infected mice with adrenocorticoids treatment at middle stage, group of infected mice with adrenocorticoids treatment at late stage. Normal control group mice were inoculated intraperitoneally with Eagle's medium 0.1 mL. Infected group were inoculated intraperitoneally of 10<sup>7.5</sup> TCID<sub>50</sub> Coxsackievirus B<sub>3</sub> at a dose of 0.1 mL per mouse. Five mice of each group were sacrificed on 3, 7, 10, 14, 21, 30, 40 and 50 days post-inoculation. Pathologic examination and ultrastructure of heart, virus titer in heart by plaque-forming assay, serum cardiac troponin I with chemiluminescence immunoassay were examined. **Results** The myocardial histopathological score of mice in each infected group on day 7 to 10 after infection were significantly higher than that in normal control group, but no significant difference in each infected group. On day 14 after infection, the myocardial histopathological score of mice with adrenocorticoids treatment at middle stage were significantly lower than that in other infected groups, and no myocardial lesions were noted 30 days later post-infection while cardiac lesions could be noted in other infected groups. Virus titer in group of infected mice with adrenocorticoids treatment at early stage was significantly higher than that of in other infected group. Cardiac troponin I values were significantly greater in infected group than that in normal control group. There was a positive correlation between the level of cardiac troponin I and the change of myocardial histopathological score. Cardiac troponin I values was much lower after adrenocorticoids therapy, especially in group of infected mice with adrenocorticoids treatment at middle stage. **Conclusions** Adrenocorticoids therapy ameliorated the severity of myocardial lesions in viral myocarditis, especially used in middle stage of the disease. Adrenocorticoids therapy reduced the inflammatory infiltration in myocardium, inhibited autoimmune response. Adrenocorticoids therapy reduced the level of serum cardiac troponin I in viral myocarditis.

[收稿日期] 2004-06-03 [修回日期] 2004-11-19

[基金项目] 山东省科委(1999BB1DBA1)资助

[作者简介] 王述昀, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌疾病及微血管通透性增高发生机制, 现在第一军医大学全军休克微循环重点实验室从事博士后研究工作, E-mail 为 wangsy@sdu.edu.cn. 牟道玉, 硕士研究生, 副研究员, 研究方向为医学图像分析。宋军华, 硕士研究生, 研究方向为心肌疾病发病机制。

自 Cummins 等<sup>[1]</sup>首次报道通过外周血心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTn I) 浓度诊断心肌梗死以来, cTn I 已被公认为是反映心肌损伤程度高敏感、高特异的血清学指标, 我国小儿病毒性心肌炎诊断标准中也将其列为主要指标<sup>[2]</sup>。病毒性心肌炎时细胞免疫反应是造成心肌损害的主要原因, 免疫抑制治疗应为有效方法, 因而肾上腺皮质激素(以下简称激素)治疗心肌炎时 cTn I 的变化对其疗效判断有重要参考价值。本文将 4 周龄 Balb/c 雄性小鼠腹腔接种柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒(coxsackievirus B<sub>3</sub>, CVB<sub>3</sub>)制成心肌炎模型, 在病毒接种后不同阶段使用激素治疗, 观察心肌组织病理学改变, 计算心肌病理积分, 测定心肌病毒滴度, 同时检测 cTn I, 并与心肌病理改变进行对照研究, 探讨激素对心肌的治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型制备及分组

200 只 4 周龄 Balb/c 健康雄性小鼠, 体重 15~18 g, 二级实验动物, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 层流架内饲养。随机等分为 5 组, 每组 40 只, 分别为: 正常对照组; 病毒对照组; 早期激素治疗组, 接种病毒后 3 天开始喂服泼尼松; 中期激素治疗组, 接种病毒后 10 天开始喂服泼尼松; 晚期激素治疗组, 病毒感染后 18 天开始喂服泼尼松。柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒 Nancy 标准株由山东省医学科学院病毒室提供, 在 HeLa 细胞上传代, 冻融 3 次并测得半数组织感染率(50% tissue culture infection dose, TCID<sub>50</sub>)为 10<sup>7.5</sup>/mL。正常对照组每只小鼠腹腔接种 0.1 mL 不含病毒的 Eagle's 液, 其他各组每只小鼠腹腔接种 0.1 mL 10<sup>7.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 的 CVB<sub>3</sub> 病毒液。正常对照组和病毒对照组给予生理盐水 0.2 mL 灌胃, 各激素治疗组给予泼尼松 1 mg/kg 灌胃, 均持续给药 10 天。

### 1.2 标本采集

接种病毒后 3、7、10、14、21、30、40 及 50 天每组分别处死 5 只, 无菌条件下取心脏, 称重。一半用于病毒滴度测定, 一半用 4% 多聚甲醛固定, 进行常规石蜡包埋、切片, 片厚 5 μm, 常规 HE 染色, 光镜观察, 并参照 Rezkalla 等<sup>[3]</sup>方法计算心肌病理组织学积分, 即每张切片随机取 5 个高倍视野, 计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野的面积之比: 无病变计 0 分, 病变面积 < 25% 计 1 分, 病变面积 25%~50% 计 2 分, 病变面积 > 50%~75% 计 3 分, 病变面积 > 75% 计 4 分。

### 1.3 病毒滴定测定

采用国际通用的空斑形成单位(plaque-forming unit, PFU)法, 对心肌组织病毒分离和病毒毒力进行精确定量测定。病毒滴度以每克心肌组织中空斑形成数目的对数值表示。

### 1.4 肌钙蛋白 I 检测

采用化学发光免疫法, 应用全自动化学发光系统自动检测。

### 1.5 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, *t* 检验分析; 部分指标行直线相关分析, 以  $P < 0.05$  为显著性界限。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠心肌病理积分

小鼠感染病毒后第 3 天陆续出现松毛、懒动、进食减少或拒食, 心肌出现不同程度的病理改变; 正常对照组小鼠心肌均为正常心肌表现, 无病理改变。病毒感染 7 天、10 天时, 各感染组心肌病理积分已显著高于正常对照组, 但各感染组之间心肌病理积分无显著性差异。感染 14 天时, 中期激素治疗组心肌病理积分明显低于其他各组( $P < 0.05$ ), 早期激素治疗组亦较病毒对照组病理损害轻; 14 天后, 中期激素治疗组心肌病变恢复显著快于其他各组, 30 天后心肌完全恢复正常(表 1, Table 1)。

表 1. 柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒感染小鼠不同时期病理积分

Table 1. The myocardial histopathological score of mice in each group at different stages ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

分 组	3 天	7 天	10 天	14 天	21 天	30 天	> 30 天
正常对照组	0	0	0	0	0	0	0
病毒对照组	0.30 ± 0.46	1.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.50 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.43 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.45
早期激素治疗组	0.30 ± 0.46	1.33 ± 0.47 <sup>a</sup>	2.00 ± 0.82 <sup>a</sup>	2.67 ± 0.47 <sup>abd</sup>	1.80 ± 0.40 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.63 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.40
中期激素治疗组	0.30 ± 0.46	1.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.50 <sup>a</sup>	1.80 ± 0.49 <sup>abd</sup>	0.60 ± 0.49 <sup>bcd</sup>	0 <sup>bcd</sup>	0
晚期激素治疗组	0.30 ± 0.46	1.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.67 ± 0.47 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.40 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.30

a:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与病毒对照组比较; c:  $P < 0.05$ , 与早期激素治疗组比较; d:  $P < 0.05$ , 与晚期激素治疗组比较。

2.2 病毒滴度

CVB<sub>3</sub> 感染后 3 天心肌已可分离出病毒, 7 天时达高峰, 10 天后开始下降, 21 天大部分感染小鼠心肌病毒分离转为阴性。早期激素治疗组在 14 天时, 病毒滴度显著高于其他各组 ( $P < 0.05$ ; 表 2,

Table2)。

将心肌病毒滴度与心肌病理积分进行相关分析发现, 7 天内二者呈正相关( $r = 0.64, P < 0.05$ )。而 10 天后两者无相关性, 从而说明病毒性心肌炎早期, 病毒的复制是心肌病理损害的重要原因。

表 2. 柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒感染小鼠心肌中病毒滴度

Table 2. The virus titer in cardiomyocytes of CVB<sub>3</sub> infected mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

分 组	3 天	7 天	10 天	14 天	21 天
病毒对照组	1.20 ± 0.43	7.10 ± 0.56	3.40 ± 0.72	1.30 ± 0.84	0
早期激素治疗组	1.20 ± 0.43	7.80 ± 0.63	3.90 ± 0.85	2.70 ± 0.69 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.32
中期激素治疗组	1.20 ± 0.43	7.10 ± 0.56	3.40 ± 0.72	1.20 ± 0.73	0
晚期激素治疗组	1.20 ± 0.43	7.10 ± 0.56	3.40 ± 0.72	1.30 ± 0.84	0

a:  $P < 0.05$ , 与其他各组 14 天时比较。

2.3 血清肌钙蛋白 I 水平

CVB<sub>3</sub> 感染 3 天, 心肌炎小鼠血清 cTn I 即已增高, 与正常对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 随后逐渐增高, 14 天达高峰, 21 天时仍高于正常对照组, 30 天后恢复正常。应用激素治疗后 cTn I 水平下降, 10 ~ 14 天时早期激素治疗组低于病毒对照组, 但 21

天时仍高于正常对照组, 而中期激素治疗组 cTn I 已恢复正常, 晚期激素治疗组与病毒对照组无显著性差别。

相关分析发现, CVB<sub>3</sub> 感染小鼠血清 cTn I 含量与心肌病理积分存在直线相关关系 ( $r = 0.70, P < 0.05$ )。

表 3. 柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒感染小鼠血清肌钙蛋白 I 水平

Table 3. Serum cTn I level of murine CVB<sub>3</sub> myocarditis ( $\bar{x} \pm s, n = 5, \mu\text{g/L}$ )

分 组	3 天	7 天	10 天	14 天	21 天	30 天
正常对照组	0.020 ± 0.013	0.020 ± 0.011	0.019 ± 0.014	0.022 ± 0.012	0.020 ± 0.014	0.018 ± 0.013
病毒对照组	0.060 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.090 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.180 ± 0.062 <sup>a</sup>	0.370 ± 0.095 <sup>a</sup>	0.100 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.030 ± 0.016
早期激素治疗组	0.060 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.080 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.100 ± 0.049 <sup>ab</sup>	0.220 ± 0.081 <sup>ab</sup>	0.070 ± 0.018 <sup>a</sup>	0.020 ± 0.015
中期激素治疗组	0.060 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.090 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.180 ± 0.062 <sup>a</sup>	0.210 ± 0.084 <sup>ab</sup>	0.030 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.020 ± 0.011
晚期激素治疗组	0.060 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.090 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.180 ± 0.062 <sup>a</sup>	0.370 ± 0.095 <sup>a</sup>	0.090 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.020 ± 0.016

a:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较; b:  $P < 0.05$ , 与病毒对照组比较。

3 讨论

许多研究证明有两种作用机制参与了 CVB<sub>3</sub> 所致的病毒性心肌炎<sup>[4-9]</sup>, 一是病毒的直接损害作用, 另一重要作用机制为免疫机制, 包括病毒诱导的免疫和自身免疫反应, 并且 CVB<sub>3</sub> 诱导的免疫病理反应是心肌进行性损伤的重要原因。

本研究发现, CVB<sub>3</sub> 感染小鼠第 3 天心肌出现轻微病理改变, 7~ 14 天心肌病变进行性加重, 21 天后病情开始恢复; 高峰期在感染病毒后 10~ 21 天, 而此时心肌细胞的病毒滴度已明显降低, 从而说明病毒对心肌细胞的直接杀伤作用仅占次要地位, 感染

后的免疫反应导致的心肌进行性损害占主要地位。

由于免疫反应尤其是细胞免疫反应是导致心肌损害的主要机制, 因而免疫抑制剂及免疫调节剂可通过调节免疫反应而保护心肌<sup>[10]</sup>。本研究发现病毒对照组在感染早期(7 天内) 血管周围及心肌间质细胞有少量单核细胞浸润, 产生炎症反应。早期激素治疗组心肌细胞炎症反应较轻, 心肌细胞以嗜酸性变为主, 心肌内病毒含量两者均呈较高水平, 但无显著性差异。感染 10~ 14 天, 病毒对照组心肌病变进一步加重, 但心肌病毒滴度却明显降低, 早期激素治疗组病毒滴度仍保持较高水平。中期激素治疗组

在用药 4 天后病情即得到控制,及时阻止了细胞免疫反应对心肌细胞的大量破坏作用,使心肌细胞免于进一步坏死。病毒感染 14~21 天后中期激素治疗组对阻止心肌病变加重,促进炎症吸收,保护心肌的优势显示出来,尤其是改善心肌病理变化的远期效果更为显著,这是由于肾上腺皮质激素具有强大的抗炎作用,其能降低血管壁的通透性,减少渗出,从而减轻心肌细胞水肿及间质水肿;激素能抑制抗原抗体作用,稳定溶酶体膜,下调原癌基因 *c-fos* 的表达水平<sup>[11]</sup>,保护心肌细胞,维持改善微循环,加强心肌收缩力,减少病毒感染时心肌细胞钙离子内流所致钙超负荷对心肌细胞的损伤,在修复受伤的组织时激素具有抑制肉芽生成,减少胶原沉积、心肌纤维化及瘢痕形成的作用。

肌钙蛋白 I (cTn I) 是肌钙蛋白抑制亚基的心肌亚型,绝大部分与心肌结构蛋白结合,仅 3% 左右在心肌细胞胞浆内游离,当心肌损伤时,游离状态的 cTn I 快速释放进入血循环中,使血清 cTn I 水平 3~6 h 内即升高,随着心肌纤维的不断崩解破坏, cTn I 不断释出, 24 h 达高峰, 5~10 天后降至正常<sup>[12]</sup>。因此 cTn I 具有灵敏度高、特异性强及诊断窗口期长等特点,是目前诊断心肌损伤的确定生物化学标志物。本研究发现, CVB<sub>3</sub> 感染小鼠后 3 天血清中即表达 cTn I, 并较正常对照组显著为高,随着心肌病变的逐渐加重, cTn I 水平也不断升高, 14 天达高峰, 21 天时 cTn I 水平仍高于正常对照组小鼠, 30 天时恢复正常,与病理形态学改变基本一致。从而说明血清 cTn I 可确切反映心肌炎小鼠心肌损伤的程度,是诊断心肌炎及判断病情的可靠而灵敏的指标。本研究还发现使用激素后的小鼠血清 cTn I 均有不同程度的下降,其中中期激素治疗组小鼠在感染病毒 14 天时血清 cTn I 水平明显低于病毒对照组, 21 天时恢复正常,较早期激素治疗组恢复快。分析原因可能早期应用激素,抑制了抗病毒抗体的生成,使病毒在心肌内生存时间延长,故对心肌造成持续伤害,使病情恢复减慢,但其 cTn I 水平低于病毒对照组,故

对病情控制仍有一定的疗效。晚期激素治疗组因治疗时间已过发病高峰期,故应用后 cTn I 水平与病毒对照组相比虽有降低但改变不明显。

通过对小鼠心肌炎模型心肌组织形态学的观察及 cTn I 的检测,说明病毒性心肌炎可以应用激素,中期应用激素治疗 CVB<sub>3</sub> 心肌炎小鼠可明显抑制 T 细胞介导的自身免疫反应对心肌造成的损害,阻止炎症细胞浸润心脏,降低血清 cTn I 水平,保护心肌细胞,控制心肌炎病情发展,改善预后。

#### [参考文献]

- [1] Cummins B, Acukland M, Cummins P. Cardiac-specific troponin I, radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J*, 1987, **113** (6): 1 333-344
- [2] 吴铁吉. 病毒性心肌炎诊断标准 (修订草案). *中华儿科杂志*, 2000, **38** (2): 75
- [3] Rezkalla S, Kloner RA, Khatib G, Smith F, Khatib R. Effect of metoprolol on the acute phase of Coxsackievirus B<sub>3</sub> murine myocarditis. *J Am Coll Cardiol*, 1988, **12** (8): 412-414
- [4] Gauntt C, Huber S. Coxsackievirus experimental heart disease. *Front Biosci*, 2003, **8** (1): 23-35
- [5] Luppi P, Rudert W, Licata A, Riboni S, Betters D, Cotrufo M, Frati G, Condorelli G, Trucco M. Expansion of specific alphabeta(+) T-cell subsets in the myocardium of patients with myocarditis and idiopathic dilated cardiomyopathy associated with Coxsackievirus B infection. *Hum Immunol*, 2003, **64** (2): 194-210
- [6] Caforio AL, Mahon NJ, Tona F, McKenna WJ. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance. *Eur J Heart Fail*, 2002, **4** (4): 411-417
- [7] 王佐,李双杰,杨永宗. 苦瓜蛋白对柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒性心肌炎小鼠半胱天冬酶 3 活性及凋亡的抑制作用. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 107-110
- [8] 王佐,李双杰,杨永宗. 苦瓜蛋白对 Balb/c 小鼠柯萨奇 B<sub>3</sub> 病毒性心肌炎核因子  $\kappa$ B 的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 479-482
- [9] Kishimoto C, Kurokawa M, Ochiai H. Antibody-mediated immune enhancement in coxsackievirus B<sub>3</sub> myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (9): 1 227-238
- [10] Maisch B, Sconiar U, Hengstenberg. Immunosuppressive treatment in autoreactive myocarditis-results from a controlled trial. *Postgrad Med J*, 1994, **70** (Suppl iv): s29-s34
- [11] 王述昀,马沛然,汪翼,王玉林,韩秀珍. 肾上腺皮质激素对病毒性心肌炎小鼠 *c-fos* 基因表达的影响. *中华儿科杂志*, 2002, **40** (10): 614-615
- [12] Hetland Dickstaink. Cardiac troponin I and T in patients with suspected acute coronary syndrome: a comparative study in a routine setting. *Clin Chem*, 1998, **44** (7): 1 430-436

(此文编辑 文玉珊)