

[文章编号] 1007-3949(2008)16-03-0205-04

•实验研究•

黄芪甲甙对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的抗氧化作用

罗永姣¹, 李双杰², 刘红英¹

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖南省儿童医院, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理学与病理生理学; Balb/c 小鼠; 黄芪甲甙; 柯萨奇 B3 病毒; 心肌炎; 氧自由基; 抗氧化

[摘要] 目的 观察黄芪甲甙对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的抗氧化作用。方法 Balb/c 小鼠 50 只随机分 5 组(每组 10 只), 空白对照组腹腔注射不含病毒的 Eagle's 培养基 0.1 mL, 在腹腔注射病毒培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7d; 病毒性心肌炎对照组小鼠每只腹腔注射 0.1 mL 内含 1×10^2 TCID₅₀ 柯萨奇 B3 病毒的 Eagle's 培养基, 在腹腔注射含病毒的 Eagle's 培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7d; 黄芪甲甙低、中、高剂量干预组在腹腔注射病毒 30 min 后, 用黄芪甲甙剂量分别为 0.07、0.2、0.6 g/(kg·d) 0.1 mL 灌胃, 共 7d。观察小鼠生存数; 心肌病变积分; 心肌谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活力及逆转录聚合酶链反应检测铜锌超氧化物歧化酶-mRNA 水平表达。结果 (1) 与空白对照组比较, 病毒性心肌炎对照组小鼠的生存数明显下降, 心肌病变积分明显升高 (3.23 ± 0.83 , $P < 0.01$); 与病毒性心肌炎对照组比较, 黄芪甲甙高剂量干预组可明显提高小鼠的生存数 ($P < 0.01$), 心肌病变积分明显下降 (1.86 ± 0.59 比 3.23 ± 0.83 , $P < 0.01$); (2) 与病毒性心肌炎对照组比较, 黄芪甲甙高剂量干预组心肌组织谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活力呈增高趋势, 心肌组织谷胱甘肽过氧化物酶 (39.73 ± 8.02 比 9.99 ± 2.71 , $P < 0.05$)、过氧化氢酶 (6.35 ± 2.33 比 1.36 ± 0.87 , $P < 0.05$)、超氧化物歧化酶 (65.71 ± 4.93 比 40.15 ± 6.03 , $P < 0.01$) 活力明显增强, 铜-锌超氧化物歧化酶-mRNA 水平表达明显增高 (0.43 ± 0.11 比 0.32 ± 0.01 , $P < 0.01$)。但黄芪甲甙低、中剂量干预组, 虽然也在一定程度使心肌组织谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活力及逆转录聚合酶链反应检测铜-锌超氧化物歧化酶-mRNA 表达水平增加, 有一定的量效关系, 但与病毒性心肌炎对照组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 黄芪甲甙通过增加心肌抗氧化酶活力, 对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎具有明显的保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Protective Effect of Astragaloside on Viral Myocarditis in Mice with CVB3

LUO Yong-Jiao, LI Shuang-Jie, and LIU Hong-Ying

(The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Pediatrics; Balb/c Mice; Astragaloside; CVB3 Viral; Myocarditis; Oxygen Radical; Antioxidate

[ABSTRACT] Aim To study protective effect and the anti-oxidize mechanism of Astragaloside on viral myocarditis in mice with CVB3. Methods Fifty Balb/c mice were randomized into five groups ($n = 10$): normal control group, given 0.1 mL of EMEM by intraperitoneal injection, were treated with saline 0.1 mL with gavage after 30 minutes of injection for 1 week; viral myocarditis Control group, inoculated intraperitoneally with 0.1 mL of 1×10^2 TCID₅₀ CVB3 diluted in Eagle's minimal essential medium (EMEM) solution were given saline 0.1 mL with gavage after 30 minutes of injection for 1 week; Astragaloside low-dose intervention group, middle-dose intervention group and high-dose intervention group, inoculated intraperitoneally with 0.1 mL of 1×10^2 TCID₅₀ CVB3 diluted in Eagle's minimal essential medium (EMEM) were treated with 1%, 3% and 9% astragaloside [0.07, 0.2 and 0.6 g/(kg·d), respectively] 0.1 mL solution after 30 minutes of injection, respectively with gavage for 1 week.

Survival number, score of pathological changes, GSH-PX, CAT, SOD and CuZn-SOD-mRNA of myocardium were detected.

Results The survival number was significantly improved in Balb/c mice treated with high dose astragaloside group than that in viral myocarditis control group ($P < 0.01$). Heart function was better in high-dose intervention group than in the viral myocarditis control group, the activity of GSH-PX, CAT, SOD and CuZnSOD-mRNA levels was enhanced and heart function was improved in group high dose astragaloside group than in viral myocarditis control group ($P < 0.01$).

Conclusion The results showed that astragaloside can provide protection against viral myocarditis. This protective effect of astragaloside may be related to the maintenance of the antioxidant status of the heart in improving myocardial antioxidant enzymes activity.

[收稿日期] 2007-11-09 [修回日期] 2008-02-05

[作者简介] 罗永姣, 硕士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为心肌疾病基础与临床, 联系电话为 0734-8279057 或 15074715829, E-mail 为 999saly@163.com。通讯作者李双杰, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为心肌疾病基础与临床, 联系电话为 13037316658, E-mail 为 Lesjie62@vip.sina.com。刘红英, 学士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为心肌疾病基础与临床, 联系电话为 0734-8279057。

黄芪作为临床治疗心肌炎与心力衰竭的主要药物, 大量研究表明, 黄芪注射液对病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 有良好治疗作用^[1], 而黄芪甲甙为黄芪有效成分皂甙类的单体成分, 动物实验发现其对 BALB/c 小鼠柯萨奇 B3 病毒 (coxsackievirus

B3, CVB3) 性心肌炎有明显治疗作用^[2], 但其作用机制尚未完全阐明。近些年来, 发现黄芪有较强的抗氧化活性。黄芪注射液不仅能有效地清除体内氧自由基, 还能阻止氧自由基的链反应, 从而调控机体自由基的平衡, 达到保护心脏的作用^[3]。因此, 作者在建立 VMC 小鼠模型基础上, 观察黄芪甲甙对小鼠 CVB3 病毒性心肌炎的抗氧化作用, 以探索黄芪甲甙对病毒性心肌炎新的治疗作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

纯种 Balb/c 小鼠, 4 周龄, 雄性, SPF 级, 体重 12 ~ 16 g, 由复旦大学动物实验科学部提供, 并饲养于复旦大学动物实验科学部 SPF 级环境中。

1.2 病毒

CVB3, Nancy 株, 由复旦大学附属中山医院卫生部病毒性心脏病重点实验室提供, 在 HeLa 细胞中传代, 冻融离心 3 次, 上清液分装, 并在 HeLa 细胞测 50% 组织感染率 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀) 为 10⁷, -70℃ 保存备用, 实验用量为 1 × 10² TCID₅₀。

1.3 药物

黄芪甲甙 (批号: 0781-9706) 由国家药物和生物制品检定研究所提供, 为纯白色干粉剂, 不溶于水, 用助溶剂羧甲基纤维素钠制成均匀混悬液, 浓度分别为 1.0%、3.0% 和 9.0%。

1.4 动物分组及干预方法

50 只 Balb/c 小鼠, 随机分为 5 组, 每组 10 只: 空白对照组腹腔无菌注射不含病毒的 Eagle's 培养基 0.1 mL, 在腹腔注射病毒培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7 d; 病毒性心肌炎对照组小鼠每只腹腔注射 0.1 mL 内含 1 × 10² TCID₅₀ CVB3 的 Eagle's 培养基; 在腹腔注射病毒培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7 d; 黄芪甲甙低、中、高剂量干预组在腹腔注射病毒 30 min 后, 分别以 1.0%、3.0% 和 9.0% 黄芪甲甙分别为 0.07、0.2 和 0.6 g/(kg·d) 0.1 mL 灌胃 7 d。以上各组治疗时间固定。14 d 后处死全部小鼠并取其心脏。心脏组织分为两部分, 一部分用于心肌抗氧化酶活性及铜-锌超氧化物歧化酶-mRNA (Cu-Zn-SOD mRNA) 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测; 另一部分用 10% 中性甲醛固定后, 石蜡包埋, 切片, 供病理学检查。

1.5 病理学检查

截取左室游离壁约 1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm 大

小的心肌组织石蜡包埋, 切片, 常规苏木素伊红 (HE) 染色, 光镜下观察心肌病理变化, 并根据 Kishimoto 方法^[4] 计算心肌病变 (炎症浸润及坏死) 积分, 即每张切片取 5 个高倍视野, 计算每个视野中炎症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, < 25% 计 1 分, 25% ~ 50% 计 2 分, 50% ~ 75% 计 3 分, > 75% 计 4 分。

1.6 生存情况

每天观察小鼠生存数。

1.7 心肌总超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶活性检测

心肌超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathion peroxidase, GSH-PX)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒: 南京建成生物工程研究所生产。考马斯亮兰法蛋白测定: 将置于 -20℃ 上部心肌组织取出, 冷生理盐水中洗去血迹, 滤纸吸干, 称重, 置于 1.5 mL EP 管中, 研磨棒研磨, 按重量体积比加生理盐水制备成 10% 组织匀浆, 2 kr/分, 离心 10 min, 取组织匀浆上清再用生理盐水按 1:9 稀释成 1% 组织匀浆。按试剂盒操作表操作。蛋白含量 (g/L) = 测定管吸光度/标准管吸光度 × 标准管浓度 (g/L)。

1.7.1 小鼠心肌谷胱甘肽过氧化物酶活力测定

规定为每 mg 蛋白质, 每分钟扣除非酶反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。公式: 酶活力 = (非酶管 OD 值 - 酶管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 空白管 OD 值) × 标准管浓度 (20 μmol/L) × 稀释倍数 (5) ÷ 反应时间 ÷ 待测标本蛋白含量。

1.7.2 心肌总超氧化物歧化酶活力测定

每 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位。公式: 组织匀浆中 SOD 活力 (U/mg) = (对照组吸光度 - 测定管吸光度) / 对照组吸光度 ÷ 50% × 反应液总体积 / 取样量 ÷ 组织蛋白含量。

1.7.3 过氧化氢酶活性检测

每 mg 组织蛋白每分钟分解 1 μmol/L 的 H₂O₂ 的量为一个活力单位。公式: 组织匀浆中 CAT 活力 (U/mg) = (对照组吸光度 - 测定管吸光度) × 271 × 1.0 mL ÷ 60 s ÷ 取样量 ÷ 组织蛋白含量。

1.8 逆转录聚合酶链反应方法检测心肌铜-锌超氧化物歧化酶基因表达

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司产品) 抽提心肌组织总 RNA, 获得的 RNA 按照 Fermentas 逆转录试剂盒说明书进行合成 cDNA。按 PCR 试剂盒 (In-

vi trogen 公司产品) 说明进行 DNA 扩增, Cu-Zn-SOD 引物序列: 5'- TTC GAG CAG AAG GCA AGC GGT CAA-3' 和 5'- AAT CCC AAT CAC ACC ACA AGC CAA-3', 扩增产物长度为 396 bp; 内参照基因 β -actin 引物序列: 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3' 和 5'- CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT-3', 扩增产物长度为 138 bp。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 然后 96 °C 50 s \rightarrow 62 °C 30 s \rightarrow 70 °C 50 s 进行 31 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。产物分析: 取 6 μ L 反应产物在 1.5% 的溴乙锭琼脂糖凝胶上电泳; 紫外分析仪下观察、拍照和 Labwork 软件进行条带扫描半定量分析。测出目的基因及内参照的积分吸光度(A) 值, 并计算二者的比值, 为 mRNA 相对表达量。

1.9 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 生存曲线检验 Kaplan-Meier 法检验。多组均数比较用方差分析、两两比较用 LSD 法检验, 显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。全部资料用 SPSS10.0 统计软件进行统计处理。

2 结果

2.1 各组小鼠生存数

正常对照组、高剂量干预组小鼠无死亡, 生存 10 只。心肌炎对照组生存 6 只。低剂量干预组小鼠生存 6 只。中剂量干预组小鼠生存 7 只。经 Kaplan-Meier 检验表明, 高剂量干预组小鼠死亡数与心

肌炎对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 而低、中剂量干预组与心肌炎对照组比较, 小鼠死亡数差异无显著性, 提示黄芪甲甙能明显提高 CVB3 病毒性心肌炎小鼠的生存数。高剂量干预组零死亡。

2.2 心肌病理组织学变化

HE 染色发现, 正常对照组小鼠心肌未见任何病理改变, 感染小鼠中, 心肌炎性细胞浸润及坏死在心肌炎对照组小鼠最为严重, 心肌病变积分为 3.23 ± 0.83 , 经不同剂量黄芪甲甙干预一周后, 低、中剂量干预组心肌病变程度改善不明显, 心肌病变积分分别为 2.89 ± 0.83 、 2.66 ± 0.74 与心肌炎对照组比较, 心肌病变积分差异均无显著性 ($P > 0.05$), 而高剂量干预组心肌病变明显减轻, 心肌病变积分为 1.86 ± 0.59 与心肌炎对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.01$; 图 1), 提示黄芪甲甙可减轻心肌病理改变。

2.3 心肌组织中总超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶活性结果

正常心肌组织中 T-SOD、GSH-PX、CAT 活力较强, 心肌炎对照组心肌组织中 T-SOD、GSH-PX、CAT 活力与空白对照组比较明显下降 ($P < 0.05$)。黄芪甲甙干预治疗心肌 T-SOD、GSH-PX、CAT 活力渐增高, 但黄芪甲甙低、中剂量干预组, 与心肌炎对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 而黄芪甲甙高剂量干预组与心肌炎对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$; 表 1)。



图 1. 各组小鼠心肌病理组织学检查 (HE $\times 100$) A 为正常对照组, B 为心肌炎对照组, C 为低剂量干预组, D 为中剂量干预组, E 为高剂量干预组。

2.4 铜锌超氧化物歧化酶的基因水平

正常小鼠心肌细胞表达较高的 Cu-Zn-SOD, 病毒感染后, 心肌组织中 Cu-Zn-SOD 表达与正常对照组比较明显减少, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。黄芪甲甙干预后, 低剂量组、中剂量组心肌细胞 Cu-Zn-SOD 表达有所加强, 但与正常对照组比较, 仍明显降低 ($P < 0.05$)。而黄芪甲甙高剂量干预组心肌表达 Cu-Zn-SOD 与正常对照组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1, 图 2)。

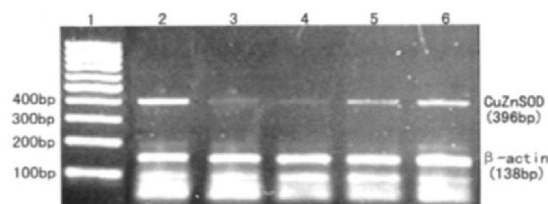


图 2. 心肌组织铜锌超氧化物歧化酶 mRNA 表达 1 为 Mark, 2 为正常对照组, 3 为心肌炎对照组, 4 为低剂量干预组, 5 为中剂量干预组, 6 为高剂量干预组。

3 讨论

正常心肌代谢可产生高活性物质,即所谓活性氧: $\cdot\text{O}^{-2}$ (超氧化物阴离子自由基)、 $\cdot\text{HO}$ (羟氧自由基)、 H_2O_2 等。在正常情况下体内存在清除自由基

和抑制自由基反应的酶系统,如 SOD、GSH-PX 和 CAT 等,使之维持自由基产生和清除的动态平衡,防止自由基损伤^[5]。近年来国内外的研究表明许多心

表 1. 黄芪甲甙对心肌总超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶的影响

分 组	T-SOD	GSH-PX	CAT	CuZnSOD-mRNA
正常对照组	68.07 ± 7.95	43.00 ± 6.76	7.50 ± 1.40	0.62 ± 0.18
心肌炎对照组	40.15 ± 6.03 ^a	9.99 ± 2.71 ^a	1.36 ± 0.87 ^a	0.21 ± 0.05 ^a
低剂量干预组	44.82 ± 2.71	11.57 ± 3.39	1.82 ± 1.12	0.23 ± 0.12 ^a
中剂量干预组	45.08 ± 2.80	12.20 ± 3.43	2.81 ± 0.95	0.48 ± 0.19 ^{ac}
高剂量干预组	65.71 ± 4.93 ^b	39.73 ± 8.02 ^b	6.35 ± 2.33 ^c	0.59 ± 0.22 ^c

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.05$, 与心肌炎对照组比较。

血管疾病与氧自由基引起的氧化应激有关,内源性、生理性抗氧化剂和细胞保护剂,对心血管疾病的预防和治疗具有重大意^[6]。当机体感染病毒或细菌时,中性粒细胞在吞噬微生物时耗量增加,产生大量超氧阴离子自由基。心肌缺血、缺氧时,能量代谢障碍,ATP 降解为次黄嘌呤,并在组织中堆积,同时黄嘌呤脱氢酶(D 型) 转化黄嘌呤氧化酶(O 型),催化次黄嘌呤和黄嘌呤代谢,产生氧自由基,另外免疫反应过程中产生的抗体复合物、补体等可促进吞噬细胞产生超氧阴离子自由基,因此可能导致细胞内活性氧增多,引起心肌细胞核酸断裂、多糖聚解、不饱和脂肪酸过氧化而损伤心肌^[7]。最近研究发现病毒性心肌炎患者红细胞 SOD 急性期降低,血中脂质过氧化物增高。而恢复期前者升高,后者降低,使用抗氧化剂治疗有一定效果^[8]。

本实验每只小鼠腹腔注射 0.1 mL 内含 1×10^2 TCID₅₀ CVB3 的 Eagle's 培养基制成 VMC 动物模型,14 d 后处死并检测心肌的抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-PX 活性明显下降,得出上述同样的结论,进一步证实了氧化损伤在 VMC 发病机制中的重要作用。进一步试验研究表明,VMC 除了影响抗氧化酶的活性外,对 Cu-Zn-SOD 的基因转录和蛋白表达有明显的抑制作用。因此,Cu-Zn-SOD 在 VMC 引起的心肌氧化损伤中亦起着重要的作用。其具体的分子机制有待进一步研究。

黄芪是我国传统中药之一,参与机体的多种代谢,具有广泛的药理作用近些年来,发现黄芪有较强的抗氧化活性。大鼠冠脉结扎再灌注模型上,黄芪明显降低心肌组织中丙二醛含量并显著提高 SOD 和 GSH-PX 活性,维持心肌细胞氧化和抗氧化平衡,

阻断脂质过氧化连锁反应,干预氧自由基的产生并增强清除氧自由基的能力,从而达到保护心脏的作用^[3]。本实验选择黄芪甲甙为研究对象,对 VMC 小鼠应用不同剂量的黄芪甲甙进行干预治疗。结果显示,不同剂量的黄芪甲甙均有抗氧化作用,它们使心肌细胞 CAT、SOD 和 GSH-PX 的活性增强,但仅高剂量的黄芪甲甙与病毒性心肌炎组比较差异有显著性。而且,黄芪甲甙干预治疗后,小鼠生存数升高,心肌病变明显减轻。所以黄芪甲甙对 VMC 有明显的抑制作用,且呈剂量依赖性。这种抑制作用与其抗氧化特性密切相关。

由此可见,对于 VMC 黄芪甲甙通过其抗氧化能力,从而保护心肌细胞免受损伤。从而为临床治疗各种类型心肌病开拓了新的治疗理论和方法,为黄芪甲甙在临床的应用提供了新的依据。

[参考文献]

- [1] 王俊伏. 黄芪注射液治疗病毒性心肌炎 20 例[J]. 实用儿科临床杂志, 2004, 19 (11): 945-947.
- [2] 李双杰, 张召才, 陈瑞珍. 黄芪甲甙治疗 BALB/C 小鼠 CVB3 病毒性心肌炎疗效研究[J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 17 (5): 681-683.
- [3] 钟东. 阿霉素心脏毒性防治研究进展[J]. 医学文选, 2002, 21 (6): 899-902.
- [4] Kishimoto C, Kawamata H, Sakai S. Enhanced production of macrophage inflammatory protein (MIP-2) by in vitro and in vivo infections with encephalomyocarditis virus and modulation of myocarditis with an antibody against MIP-2 [J]. J Virol, 2001, 75 (3): 1294-300.
- [5] 谭小进, 陶辉宇, 李丽. 果王素对大鼠阿霉素心肌损伤的保护作用及抗氧化机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (1): 25-28.
- [6] 杨俊娟, 程宇彤, 张钧华. 胆红素和氧自由基与心血管疾病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (8): 728-730.
- [7] 彭健豪, 张连峰. 病毒性心肌炎发病机制[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 19 (1): 245-247.
- [8] Si X, McManus BM, Zhang J, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin proteasome pathway [J]. J Virol, 2005, 79 (13): 8014-019.

(此文编辑 李小玲)