

黄芪对培养的搏动大鼠心肌细胞感染 Coxsackie B-2 病毒的影响

杨英珍 郭 棋 金佩英

浦寿月 程娟如 金月仙

(上海市心血管病研究所, 上海)

陈 灏 珠

(上海医科大学附属中山医院, 上海)

龚祖坝 沈菊英

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

提 要

黄芪对 Coxsackie B-2 病毒感染培养的大鼠心肌细胞所致心肌酶-乳酸脱氢酶、谷草转氨酶的释放、搏动停止、细胞病变、细胞毒性及超微结构改变等均有明显保护作用。尤其在感染后1—9小时给药保护作用完全。给药后病毒滴度仍能测得, 但明显低于病毒对照组。本结果可作为进一步防治急性病毒性心肌炎提供线索。

近年来国内病毒性心肌炎的发病率激增, 而临床上尚缺乏有效防治药物。虽曾报道胸腺素^[1], 免疫核糖核酸^[2]、 α -干扰素^[3]等对治疗病毒性心肌炎有一定疗效, 在感染 Coxsackie B-2 病毒的搏动大鼠培养心肌细胞模型中, 也证实了 α -干扰素的保护作用^[4]。中药黄芪有抗病毒作用^[5], 对干扰素系统有激活作用, 又在淋巴细胞中可诱生 γ -干扰素^[6]。为此, 我们对黄芪在搏动大鼠培养的心肌细胞感染 Coxsackie B-2 病毒的影响进行了心肌酶释放、搏动%、形态学改变包括超微结构改变、细胞毒性及病毒滴度等方面的研究, 作为进一步防治急性病毒性心肌炎提供线索。

本文系中国科学院科研基金资助课题。

文中 LDH 及 SGOT 测定, 同时取得刘泽民, 吴其俭同志协助。中药黄芪注射液由华山医院中药制剂室姜志铭同志协助供应, 特此致谢。

本稿1986年元月9日收到。

材料与方 法

出生14天的 Sprague-Dawley 大鼠心脏, 用 0.1% 胰蛋白酶溶液分次消化细胞, 细胞制备同前文^[7]。生长液用 20% 小牛血清、1% 谷氨酰胺 (200mM)、双抗的 MEM Eagles 液。Coxsackie B-2 病毒 (ATCC VR29) 在 Hep-2 细胞 (人喉癌细胞) 中传代三次, 在大鼠心肌细胞中用 Reed 法测 50% 组织感染率同前^[8]。黄芪注射液 (4 g/2 ml, 840308) 系由黄芪生药经酒精脱水二次之水溶液, 由上海医科大学附属华山医院中草药制剂室供给。

1. 心肌酶测定及形态学改变 细胞悬液分装为 4×10^6 /8ml/瓶细胞的生长液, 37°C 孵育 18 小时后, 感染组 6 瓶, 各加 1 ml 100 个 50% 组织感染率 (TCID-50) 的 Coxsackie B-2 病毒, 非感染组 6 瓶, 各加 1 ml 生长液。37°C 孵育 1 小时后, 感染组及非感染组各取 3 瓶加黄芪 1.5 g/瓶作为黄芪对照及感染加黄芪组, 最后仍加生长液至每瓶总量 8 ml。经孵育 2, 3 及 5 天后, 4 组各取一瓶将上清液作乳酸脱氢酶 (LDH) 及谷草转氨酶 (SGOT) 测定。一组感染 50 个 TCID-50 Coxsackie B-2 病毒的心肌细胞, 在感染第 5 天测 SGOT。LDH 以 α -p 碘硝基氯化四氮唑 (INT) 为底物之酶法测定 (按 General Diagnostics 药箱方法)^[9], SGOT 用 Gilford Diagnostics 药箱, 在 SBA 300 自动分析仪 (Corning Co) 检测, 同时记录各瓶的细胞搏动及细胞病变 (CPE)。CPE 表示方法同前^[7]。

2. 细胞毒性测定 ^{51}Cr ($\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$, 9.4mc/ml, 中国北京原子能研究所供给) 细胞标记及测定方法同前^[7]。细胞贴壁 18 小时后, 病毒对照组及病毒+黄芪组各加 100 个 TCID-50 Coxsackie B-2 病毒 0.05ml, 其他各孔加 0.05ml 生长液, 病毒吸附 1 小时后, 黄芪对照及病毒+黄芪组各孔加 0.15ml 内含 30mg 黄芪之生长液, 其他各孔加生长液至总量达 0.2ml/孔。各组 4 孔。

3. TCID-50 测定 4×10^6 心肌细胞感染 20~100 个不同量 TCID-50 Coxsackie B-2 病毒前 18 小时至感染后 48 小时加黄芪, 在感染后 2~5 天各组上清液及细胞悬液 (收集上清液后加等量生长液冻融三次), 在传代猴肾细胞 (MEK₃, 澳大利亚引进) 上测 TCID-50。

4. 透射电镜检查 细胞分组同心肌酶的测定, 但细胞先孵育 48 小时后接种病毒, 病毒量为 50 个 TCID-50, 光镜及电镜检查方法同以往报道^[8]。

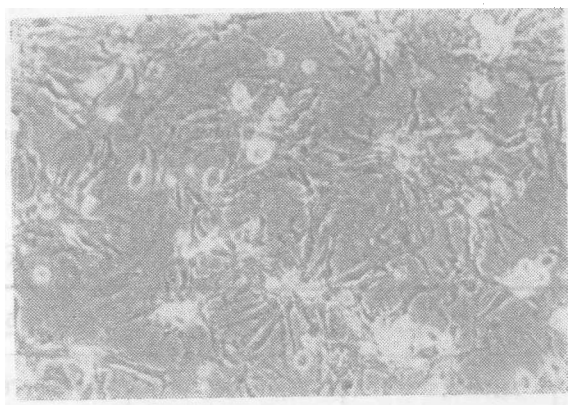
结 果

1. 心肌酶、搏动%及 CPE (见表 1): 在感染病毒后 2, 3 及 5 天, 病毒对照组培养液中 LDH 及 SGOT 值均明显高于细胞对照, 黄芪对照及病毒+黄芪组 ($p < 0.01$)。后三组间, 在感染后第 2, 3 天 LDH 无明显区别 ($p > 0.05$), 而在第 5 天病毒+黄芪组则

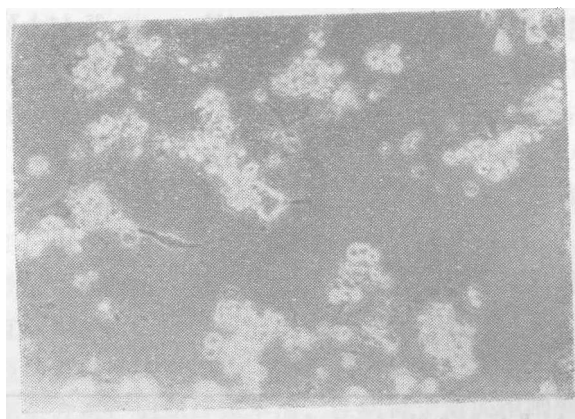
高于细胞对照及黄芪对照组 ($p < 0.05$), 在感染后第 3~5 天, 黄芪对照组、病毒+黄芪组 SGOT 低于细胞对照组 ($p < 0.05$), 前二组间无明显区别 ($p > 0.05$)。感染后 2 天, 病毒对照组搏动%已明显下降, 出现 CPE, 感染后 3 及 5 日均无搏动, CPE 自 2+ 至 3+ (见图 1)。其他三组在整个试验过程中均 100% 以 80~100 次/分规则地搏动, 且无 CPE。共 8 次实验。

2. 细胞毒性: 病毒接种后 72 及 96 小时, 病毒+黄芪组细胞毒性明显低于病毒对照组, p 值分别 < 0.05 及 0.01 (见表 2)。共 4 次实验。

3. 感染病毒后不同时期加黄芪的影响: 表 3 显示感染病毒后 1~9 小时加黄芪, 不论细胞搏动%, SGOT 值及 CPE, 对心肌细胞均有明显保护作用, 而在感染 12~18 小时后加黄芪则保护作用不完全, 感染后 24~48 小时加黄芪或黄芪处理后 18 小时洗涤细胞再感染病毒则无保护作用。共 7 次实验。



A 正常大鼠心肌细胞
 $20 \times 2.5 \times 4 \times (200 \times)$



B 感染 Coxsackie B₂
病毒后 5 天的大鼠心肌
细胞
 $20 \times 2.5 \times 4 \times (200 \times)$



C 感染 Coxsackie B₂ 病毒 1 小时后加黄芪培养 5 天的大鼠心肌细胞 20×2.5×4× (200×)

图 1 培养的大鼠搏动心肌细胞的细胞病变 200× A、未感染 B、感染 100 个 TCID₅₀ Coxsackie B-2 病毒 C、感染加用黄芪 (相差伴绿色滤片)
Fig 1. Cytopathic effect of rat beating heart cells in culture. 200× (A) Uninfected, (B) Infected with 100 TCID₅₀ Coxsackie B-2 virus, (C) Infected, AM-treated (phase with green filter)

表 1. 黄芪对搏动大鼠心肌细胞感染 Coxsackie B-2 病毒后心肌酶(LDH, SGOT), 搏动%, 及细胞病变(CPE)的保护作用 X±SD

Table 1. Protective effect of Astragalus Membranaceus (AM) on cardiac enzymes (LDH, SGOT), beating %, and cytopathic effect (CPE) in Coxsackie B-2 virus infected rat heart cells in culture.

Parameter	Group	X ± SD		
		2 d	3 d	5 d
LDH (U/L)	A	28.5 ± 8.8	25.6 ± 6.4	29.5 ± 8.8
	B	28.3 ± 10	25.1 ± 5.3	29.3 ± 5.9
	C	33.0 ± 7	26.6 ± 6	32.4 ± 6.6***
	D	45.5 ± 8.5*	44.5 ± 9.3*	50.5 ± 9.8*
SGOT (U/L)	A	30.6 ± 5.3	33.1 ± 6.3**	35.4 ± 4.7**
	B	26.5 ± 4	27.6 ± 4.3	27.9 ± 4.4
	C	26.7 ± 3.3***	27.4 ± 4.8***	30.3 ± 6.7***
	D	38.8 ± 10.7*	49.1 ± 9*	61.2 ± 11.6*
Beating %	A	100	100	100
	B	100	100	100
	C	100	100	100
	D	36.7 ± 26.6	0	0
CPE	A	-	-	-
	B	-	-	-
	C	-	-	-
	D	1+	2+	3+

* Group D vs Group A, B, C P < 0.01
 ** Group A vs Group B, C P < 0.05
 *** Group C vs Group B P > 0.05
 **** Group C vs Group A, B P < 0.05
 § experiments

表2. 黄芪对搏动大鼠心肌细胞感染 Coxsackie B-2 病毒后细胞毒性, 搏动%及CPE $\bar{X} \pm SD$

Table 2. Protective effect of Astragalus Membranaceus (AM) on cytotoxicity, beating %, and cytopathic effect (CPE) in coxsackie B-2 virus infected rat heart cells in culture. $\bar{X} \pm SD$

Time after virus	Group	Cytotoxicity (%)	Beating (%)	CPE
48h	A*	0	100	-
	B	7.4±5.2	100	-
	C	6.5±4.7	100	-
	D	11.2±14	100	1+
72h	A	0	100	-
	B	-0.6±6.5	100	-
	C	-3.1±8.2	51.7±2.9	-
	D	36.4±11.6**	100	2+ - 3+
96h	A	0	100	-
	B	4+5	100	-
	C	4+9.5	100	-
	D	43.3±16.8**	6.7±11.6	3+

* as spontaneous isotope release

** C vs A, B P<0.01

*** C vs A, B P<0.05

4 experiments

4. 黄芪对心肌细胞感染病毒的 TCID-50 影响: 在接种病毒后 1 小时加黄芪, 随孵育时间的延长, 在细胞内病毒增殖自 1.7 增至 3.0 (lg TCID-50), 上清液自 0 至 1.5 (lg TCID-50) 均明显低于病毒对照组 (表 4)。表 5 显示在接种病毒前 18 小时加黄芪, 在接种后第 5 天, 病毒滴度与病毒对照组相似。如接种病毒量少, 在接种后 1~18 小时加黄芪均无病毒滴度测得。接种病毒量大则在同时期加用同量黄芪, 虽细胞仍搏动, 光镜检查无细胞病变, 但在 MEK₃ 细胞上仍能测得病毒滴度。

5. 透射电镜改变: 前文^[8]述及病毒感染后 2 天有细胞核畸变, 线粒体肿胀, 闰盘呈不同程度介离, 肌原纤维纵向排列有紊乱折裂。感染后 4 天, 细胞搏动停止, 心肌超微结构明显病变, 感染第 6 天, 细胞内出现晶格状排列的病毒颗粒, 有纤维状包涵体, 闰盘结构完全介离, 肌原纤维不清。在病毒+黄芪组则感染后第 2 天闰盘介离现象基本消失, 细胞核稍有内褶, 糖原颗粒也很丰富, 线粒体嵴密集, 呈同心圆状态, 肌原纤维仍然整齐, 感染后第 6 天, 未能检测到病毒颗粒及纤维状包涵体, 肌原纤维仍然完整, 线粒体略为膨胀, 但仍能保持完整, 糖原颗粒明显增加 (详另文报道)。

表 3. 搏动大鼠心肌细胞感染 Coxsackie B-2 病毒后不同时期给予黄芪在感染 5 天后细胞搏动, SGOT 及 CPE 改变 $\bar{X} \pm SD$

Table 3. Protective Effect of Astragalus Membranaceus (AM) on Rat Beating Heart Cell Cultures at Intervals From 1 hr to 48 hr After 5 Days' Challenge. $\bar{X} \pm SD$

Group	Beat Rate/min	Beating %	SGOT	CPE
Uninfected Control	100 120	100	33.8 ± 7.1*	-
Infected Control	0	0	61.2 ± 11.6**	3+
AM-Control	100~120	100	26.6 ± 8***	-
1 hr	100~120	100	25.4 ± 7.7	-
3 hr	100~120	100	25.1 ± 8.1	-
6 hr	100~120	100	26.6 ± 6.9	-
9 hr	100~120	100	27.9 ± 6.2	-
12 hr	0~120	97.7 ± 3.5	32.6 ± 6.8	- ~ ±
15 hr	0~120	94 ± 7	34.0 ± 6.5	± ~ 1+
18 hr	0~120	74.3 ± 26.8	36.6 ± 9.9	± ~ 2+
24 hr	0~100	12.9 ± 17.8	40.1 ± 11	1+ ~ 3+
48 hr	0	0	43.4 ± 13	2+ ~ 3+
-18 hr	0	0	53.8 ± 5.6	3+

- * Uninfected vs group 12 hr, 15 hr, 18 hr $P > 0.05$
 - ** Group Infected vs Group Uninfected, Group 1 hr—9 hr $P < 0.01$
 - *** Group AM Control vs Group 1 hr—9 hr $P > 0.05$, Group AM Control vs Group Uninfected, Group 12 hr—48 hr $P < 0.01$
- 7 experiments

表 4. 黄芪对 Coxsackie B-2 病毒*的灭活作用

Table 4. Inactive Effect of Astragalus Membranaceus (AM) on Coxsackie B₂ virus*

MEK ₃ Cells	2d		3d		5d	
	CoxB ₂	CoxB ₂ + AM	CoxB ₂	CoxB ₂ + AM	CoxB ₂	CoxB ₂ + AM
Cell pallets	5.5**	1.7	6.4	2.5	5.0	3.0
Supernatants	3.0	-	3.1	0.75	2.4	1.5

* 100 TCID₅₀

** 1g TCID₅₀

表5. 大鼠搏动心肌细胞感染不同剂量Coxsackie B-2 病毒前18小时及后1—48小时给予黄芪的病毒TCID₅₀(感染后培养5天)

Table 5. TCID₅₀ of cultured rat beating heart cells treated with Astragalus Membranaceus (AM) at intervals from 18 hr Prior to, to 48 hr challenge (incubation for 5 days)

Group	20 TCID-50		Beating (%)	50 TCID-50		Beating (%)	100 TCID-50		Beating (%)
	C*	S**		C	S		C	S	
Uninfected	-	-	100	-	-	100	-	-	100
Infected	4.5***	2.75	60	6.1	2.25	0	6.3	3.5	0
- 18 hr	4.25	2.75	60	6.1	2.0	0			
1 hr	-	-	100	1.5	-	100	2.4	1.5	100
3 hr	-	-	100	3.5	-	100	2.5	1.63	100
6 hr	-	-	100	3.5	-	100	3.3	1.75	100
9 hr	-	-	100	3.5	-	100	4.25	1.75	100
12 hr	-	-	100	3.75	-	100	4.1	2.4	100
15 hr	-	-	100	3.75	0.25	95	3.75	2.4	90
18 hr	-	-	100	4.25	0.5	90	4.4	2.5	5
24 hr	1.25	-	100	4.25	0.75	5	5.0	3.25	0
48 hr	1.5	1.5	90	4.75	1.5	0	5.6	3.25	0

* Cell Pellets ** Supernatants
*** Ig TCID-50

讨 论

在培养的大鼠搏动心肌细胞感染 Coxsackie B-2 病毒前18小时到感染后 16.5 小时给予人白细胞干扰素有明显抗病毒及保护心肌细胞的作用, 在接种后18~24小时给予, 则保护作用不完全, 在接种48小时后给予则无保护作用^[4]。在小鼠感染 Coxsackie B-3 病毒后, 不论在接种前12~48小时或接种后24小时腹腔内注射单剂 Poly I:C(干扰素诱生剂)对心肌炎的发生都有明显保护作用^[10], 而在病毒感染后 48 小时给予则无保护作用。本文结果显示以黄芪处理细胞后洗涤, 未能保护心肌细胞免受病毒感染的损害, 与上述结果有所不同; 而在感染后不同时期给予黄芪则仍有保护作用, 这一点与上述有相同点, 虽在感染后加黄芪的时间上保护作用有所不一, 此与所给黄芪量、病毒感染量都有一定关系, 因在实验中如减少黄芪量小于 $1.5g/4 \times 10^6$ 细胞, 则虽在接种病毒后 1 小时给予, 保护作用也不完全, 黄芪量大于 $1.5g/4 \times 10^6$ 细胞, 则保护作用与 $1.5g/4 \times 10^6$ 细胞相似。病毒量减少, 每 4×10^6 细胞加 1.0g 黄芪, 也有明显保护作用, 但观察时间要延长, 如在观察期间不换液, 培养液将过酸而影响搏动。有报道^[11]在细胞外液保持干扰素浓度则细胞能保留抗病毒状态, 一旦培养液中去除了干扰素, 则细胞恢复对病毒的敏感状态。黄芪处理心肌细胞后洗涤, 对 Coxsackie B-2 病毒感染的细胞不能起保护作用, 提示一定

浓度的黄芪在培养的心肌细胞中有抗病毒作用,与上述干扰素的作用情况有所类似,至于是否黄芪所含有的一种抗病毒物质有干扰素因素存在,尚待证实。

心肌细胞加黄芪后,不论接种病毒与否,SGOT均低于正常对照组,可能黄芪有抑制RNA合成^[12],使SGOT合成及释放受到影响所致,此尚待进一步研究。

病毒性心肌炎的病因,既有细胞免疫的作用^[13],又有病毒的直接作用。Woodruff^[14]指出病毒所致心肌损害中,病毒是由中和抗体及吞噬细胞的协同作用所清除。本实验的结果显示虽在感染后加黄芪的时间上对心肌细胞感染Coxsackie B-2病毒的保护作用似乎逊于 α -干扰素^[4],但目前干扰素来源紧张,价格高昂,而黄芪来源充沛,在祖国医学中已有丰富应用经验,有预防感冒^[14],促进流感病毒感染后抗体生成及激活巨噬细胞吞噬功能^[15],明显增加NK细胞活性^[16]。本实验感染心肌细胞的病毒量较大,所以很快出现细胞病变,在人体中情况有所不同,感染后病变少有在二、三天内心肌完全坏死,常有先后参差,代偿功能亦强,因此进一步从临床角度研究黄芪对病毒性心肌炎的防治很有必要。

参 考 文 献

- [1] 陈曙霞等, 1984, 上海第二医学院学报 4(2):101.
- [2] 郑义等, 1983, 上海医学 6(1):12.
- [3] 胡婉英等, 1984, 上海免疫学杂志 4(2):78.
- [4] 杨英珍等, 1985, 中国药理学报 6(2):102.
- [5] 侯云德等, 1984, 中西医结合杂志 4(7):420.
- [6] 侯云德等, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志 1(2):137.
- [7] 杨英珍等, 1985, 上海医学 8(3):163.
- [8] 杨英珍等, 1985, 中华医学杂志 65(9):524.
- [9] Babson, A. L. et al., 1985, *Clin Chem Acta* 12:210.
- [10] Norris, D. et, 1973, *Pro Soc Exp Biol Med* 142:133.
- [11] Stewart, W. E., I; 1979, *Mechanisms of antiviral actions of interferon* In: *The Interferon System*. New York: Springer-Verlag, 169-220.
- [12] 侯云德等, 1980, 中医杂志 21(3):67.
- [13] Huber, S. A. et al., 1983, *Infect Immunity* 39(3):1419.
- [14] Woodruff, J. F., 1980, *Am. J. Pathol* 120(2):427.
- [15] 张兴权等, 1984, 中华微生物学和免疫学杂志 4(2):94.
- [16] 金建平, 1983, 中华微生物学和免疫学杂志 3(5):293.

EFFECT OF ASTRAGALUS MEMBRANACEUS (AM) ON COXSACKIE B-2 VIRUS INFECTED RAT BEATING HEART CELLS IN CULTURE

Yang Ying-zhen

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhong-shan Hospital, Shanghai
Medical University, Shanghai)

Jun Zu-xun,

(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

The protective effect of Astragalus Membranaceus(AM) on Coxsackie B-2 virus infected newborn rat heart cell cultures was observed. The cardiac enzymes-lactic acid dehydrogenase (LDH) and glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) in infected group were much higher than in those groups of uninfected, AM control, and AM treated 1 hr after inoculation with 100 TCID₅₀ Coxsackie B-2 virus for 2—5 days ($p < 0.01$). The beating percentage began to decrease in infected group at the 2nd day and no beating was shown 3—5 days after virus challenge. Meanwhile the CPE appeared rapidly from 1+—3+ at the same interval. In contrast, the beating was 100% and no CPE was shown in the other 3 groups throughout. The cytotoxicity of ⁵¹Cr-labeled heart cells treated with AM 1 hr after virus challenge was lower than that of infected cultures at 72 hr ($p < 0.05$) and 96 hr ($p < 0.01$) after infection. A significant protective effect was provided when AM was treated among 1—9 hr after virus inoculation. The protection was incomplete if AM was treated 12—18 hr after infection, and no protection was seen if treated with AM 18 hr before or 24—48 hr after virus challenge. Virus titers detected in the cultures treated with AM 1 hr after infection were much lower than that in the infected cultures—either in cells or in supernatants through 2—5 days. In addition, the virus titer was similar between infected and infected-AM treated cultures in case AM was treated 18 hr before virus inoculation. The ultrastructural alterations of the myocardial cells including mitochondria, intercalated discs and myofibers also showed nice protective effect in infected-AM treated group through 2—5 days after virus challenge. These results could provide the favourable factors for acute, Coxsackievirus myocarditis prophylaxis and therapy,