

## 铬对增强心肌细胞抗病毒作用的研究

董杰德

(山东医科大学微生物学教研室, 济南250012)

张爱萍

(山东省地方病研究所, 济南250012)

### 提 要

本文研究了Coxsackie B<sub>2</sub>病毒(COX B<sub>2</sub>V)对人及鼠心肌细胞的感染性以及三氯化铬对心肌细胞生长与对病毒感染性的影响。实验结果证明人心肌细胞对COX B<sub>2</sub>V感染的敏感性比鼠心肌细胞高。三氯化铬能促进人与鼠心肌细胞的生长, 促进鼠心肌细胞的搏动及搏动频率加快, 并随着培养时间的增加, 细胞生长代谢旺盛, 细胞培养液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量升高。用含铬培养液培养的人心肌细胞对病毒感染的敏感性有所降低, 人心肌细胞培养液中LDH的含量随病毒对细胞损伤的程度而升高。

**关键词:** 心肌细胞培养 三氯化铬(CrCl<sub>3</sub>) Coxsackie B<sub>2</sub>病毒 乳酸脱氢酶

病毒感染及某些微量元素与心肌病损伤的关系越来越被人们重视。据报道引起心肌病损的病毒已达20余种, 其中最多见的是COX B组病毒。而且人类90%的疾病与微量元素有关<sup>[1]</sup>。

据研究人体中铬的水平与心血管的发病率及病死率呈负相关<sup>[2]</sup>。

心肌受累, 可引起某些酶的代谢异常。因此, 血液中某些酶的检测是诊断心肌病的重要参考依据<sup>[3]</sup>。yang等(1985年)的研究证明COX B<sub>2</sub>V在培养的鼠心肌细胞上具有感染性<sup>[4]</sup>。Kandolf等报道了COX B<sub>2</sub>V能在体外培养的心肌细胞中复制, 并发现人成纤维细胞干扰素能抑制病毒在心肌细胞中的复制<sup>[5]</sup>。

本文旨在观察大鼠与人心肌细胞对COX B<sub>2</sub>V感染的敏感性及铬对心肌细胞的生长与对病毒感染的影响, 以探讨心肌病损与病毒及铬的关系。

## 材 料 和 方 法

**一、心肌细胞培养:** 在无菌操作技术条件下, 取用水囊引产的3—6个月胎儿心室或出生24

本文于1990年1月31日收到8月1日修回

感谢仇素、曹英宗离教授对本工作的指导。

—48 小时的 Wistar 大白鼠心室, 按文献〔6〕制备成心室肌细胞进行培养。培养液用 Eagle (Nissui (1)) 加 20% 小牛血清和适量青、链霉素。

### 二、铬对心肌细胞生长的影响:

1. 氯化铬使用浓度选择: 用双蒸水配成 1mg/ml 的贮备液, 经抽滤后于 4℃ 冰箱内保存备用。在培养的人胚肾细胞上选择出对细胞无毒性的最高浓度为 3.12 $\mu$ g/ml, 但用于人或鼠心肌细胞的适宜浓度为 0.01—1 $\mu$ g/ml。

2. 铬对心肌细胞生长、形态及搏动的实验观察: 取人胚心室肌制备细胞悬液, 细胞计数 (分装 17.41 $\times 10^5$  个细胞/瓶/18cm<sup>2</sup>), 用无铬及含铬 0.5 $\mu$ g/ml 的培养液分组培养。在光镜下逐日观察细胞的生长及形态的变化, 并测定细胞培养液中 pH 的变化。

制备鼠心肌细胞悬液, 计数分装 (15—17 个细胞/瓶) 用无铬培养液培养的为 A 组, 用含铬 0.05 $\mu$ g/ml 培养液培养的为 B 组, 经 24 小时培养后, 光镜下将每组细胞随机固定 30—50 个细胞群落, 做上标记, 逐日观察并记录细胞搏动群落占总观察群落的百分比, 每个搏动群落的搏动频率 (次/分)。(1) A 组培养 48 小时后, 再分成三组: A' 组仍换用无铬培养液, B' 组换含铬 0.5 $\mu$ g/ml 的培养液, C' 组换含铬 0.05 $\mu$ g/ml 的培养液。(2) A' 组培养 14 天时再分成 A''、B''、C'' 组, 其培养液分别与 A'、B'、C' 组相同。并继续观察、记录上述指标。

### 三、COX B<sub>2</sub> V 对心肌细胞感染性及铬对其感染性的影响:

1. 于培养的人心肌细胞上进行病毒传代, 将感染病毒的细胞全部病变后, 经三次反复冻融, 于含铬及无铬培养液分别培养 8 天的人心肌细胞上滴定出病毒感染后的 TCID<sub>50</sub>。

2. 用上述同样方法滴定出病毒感染鼠心肌细胞的 TCID<sub>50</sub>。在感染病毒的同时, 各组随机选 30—50 个细胞群落, 光镜下观察搏动细胞群落的百分比及其搏动频率。

四、铬对病毒感染性的影响: 铬对游离病毒的灭活作用, 用含铬 0.5 及 0.05 $\mu$ g/ml 的 Hanks 液分别与等量的含 100、10、1TCID<sub>50</sub>/0.1ml 病毒悬液混合, 对照组用无铬 Hanks 液与上述等量病毒悬液混合, 同在 36℃ 的温箱作用 1 小时后, 取出再分别感染培养 2 周的人及鼠心肌细胞, 光镜下逐日观察细胞的变化。

### 五、细胞培养液中 LDH 的含量测定:

1. 病毒感染人心肌细胞后, 逐日观察细胞病变, 并测定细胞培养液中 LDH 的含量。

2. 分别测定用不同培养液培养鼠心肌细胞时, 细胞培养液中 LDH 的含量。

将以上两种细胞的各种培养液, 每隔 12 小时用 2,4-二硝基苯显色法〔7〕测定一次 LDH 的含量 (每次从每瓶中取出 0.3ml 细胞培养液后, 再补充等量的新鲜培养液, 以保持培养液总量为 5ml/瓶, 每组每次测定 3—5 瓶。)

## 结 果

### 一、铬对心肌细胞生长的影响:

铬有促进人心肌细胞生长的作用, 无铬培养液培养的细胞组与含铬组细胞形态基本一致。但含铬组细胞胞浆更清亮, 细胞培养液的 pH 下降较快。当两组细胞同时换液后, pH 由 7.4 降至 6.4 时, 含铬组需 2—3 天, 无铬组则需 3—4 天。含铬组长成密集单层需 14—15 天, 无铬组则需 15—17 天。

铬对鼠心肌细胞生长的影响与人的相似, 而对鼠心肌细胞搏动影响较大, 见表 1、图 1 与图 2。

从表1可看出,在鼠心肌细胞培养的各个时期,当由无铬培养液换成含铬培养液时,均可使未搏动的细胞群落向搏动的细胞群落转变,使已搏动的细胞群落的搏动频率加快。

表1 铬对不同生长时期鼠心肌细胞搏动百分比的影响

Tab 1 The effect of  $\text{CrCl}_3$  on pulsating percent of RMC colony in different growth period

加 $\text{CrCl}_3$ 时间	再培养时间(天)	组别	$\text{CrCl}_3$ $\mu\text{g/ml}$	总群落	搏动群落	%	P值
细胞接种时	6	A	0	30	3	10	A与B $<0.01$
		B	0.05	40	12	30	
培养48小时	8	A'	0	38	11	30.58	A'与B' $>0.05$
		B'	0.5	34	12	35.29	A'与C' $<0.01$
		C'	0.05	49	26	51.01	B'与C' $<0.01$
培养14天	8	A''	0	29	6	20.69	A''与B'' $<0.01$
		B''	0.5	29	14	48.29	A''与C'' $<0.01$
		C''	0.05	24	12	50.00	B''与C'' $>0.05$

从图版II看出,当将培养8天的鼠心肌细胞的一半换用含铬 $0.05\mu\text{g/ml}$ 的培养液继续培养至16—32天时,有铬组细胞搏动群落的百分比明显高于无铬组( $P<0.05$ )。

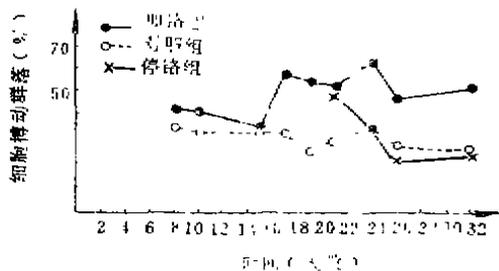


图1 铬对鼠心肌细胞群落搏动百分比的影响

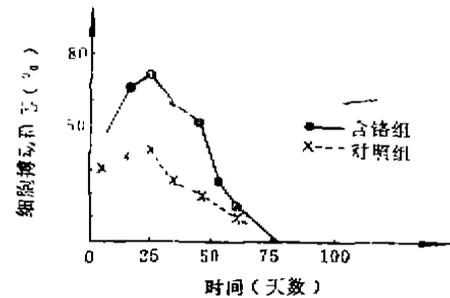
Fig 1. The effect of  $\text{CrCl}_3$  on the pulsating percent of RMC colony

图2 铬对鼠心肌细胞搏动持续时间的影响

Fig 2. The effect of  $\text{CrCl}_3$  on RMC pulsating for sustained time

当细胞生长到19天时,又将含铬组的一半换用无铬培养液继续培养时,停铬组的细胞搏动群落的百分比逐渐下降,至第24天降至与对照组同样水平。

图版II 2表明:随细胞培养时间的延长,两组细胞的搏动群落百分比均增高,至第25天左右两组均达到高峰,含铬组为 $69.82\pm 12.16$ ,对照组为 $38.255\pm 9.54$ ,两组差异显著( $P<0.01$ )。此后两组细胞搏动群落的百分比均逐渐下降。在细胞培养的第11—57天中,含铬组细胞搏动的百分比始终高于对照组( $P<0.05$ )。对照组培养至第58天停止搏动,有铬组则培养至第75天才停止搏动。

铬对鼠心肌细胞搏动频率的影响也比较明显,随培养时间的延长,两组细胞群落搏动频率均加快,当培养至19天左右,含铬组细胞搏动频率为 $134.2\pm 66.43$ 次/分,对照组为 $57.25\pm 42.02$ 次/分( $P<0.01$ )。当培养到24—25天时,其搏动频率均达

到高峰,此后逐渐下降,但有铬组始终高于对照组。

两组搏动节律均整齐,偶见节律不齐,但无显著差异。

## 二、COXB<sub>2</sub>V对心肌细胞感染性的实验观察:

实验结果表明:人心肌细胞对病毒感染的敏感性比鼠心肌细胞高,病毒感染人心肌细胞的TCID<sub>50</sub>为 $10^{-10.6}$ ,鼠为 $10^{-3}$ 。而用含铬 $0.5\mu\text{g/ml}$ 的培养液培养的人心肌细胞TCID<sub>50</sub>为 $10^{-8.6}$ ,用含铬 $0.05\mu\text{g/ml}$ 的培养液培养的鼠心肌细胞为 $10^{-2}$ 。以上也说明同一种细胞用含铬培养液培养后,细胞对病毒感染的敏感性降低。

经不同培养液培养8天后的鼠心肌细胞再感染病毒4天的结果见表2,其中A组与C组细胞形态及自发性收缩搏动均正常;B组细胞病变达“3+”,搏动停止;D组细胞病变“1+”,细胞搏动群落为21%,搏动频率缓慢,平均9次/分,节律不齐。由此也说明铬培养的鼠心肌细胞对病毒感染的敏感性降低。

表2 铬对鼠心肌细胞感染病毒敏感性的影响

Tab 2. The effect of CrCl<sub>3</sub> on sensitivity of virus infection to RMC

组别	培养液中含铬剂量	感染COX B <sub>2</sub> V TCD <sub>50</sub> /0.1ml	细胞搏动群落%	平均搏动频率/分	细胞形态
A	0	0	60	119	正常
B	0	100	0	0	CPE3+
C	0.05 $\mu\text{g/ml}$	0	62	126	正常
D	0.05 $\mu\text{g/ml}$	100	21	9	CPE1+

注。“1+—25%的细胞病变(CPE)”,“3+”—75%的细胞出现病变。

## 三、铬对病毒的灭活作用:

表3说明不同浓度的铬在细胞与不同滴度的病毒互相作用后,均不影响病毒的感染性,这说明铬对病毒无直接灭活作用。

## 四、细胞培养液中LDH的含量:

图3表明人心肌培养液中LDH的含量:实验分四组,A、B组是无铬培养液培养的细胞,C、D组是用含铬 $0.5\mu\text{g/ml}$ 培养液培养的细胞。

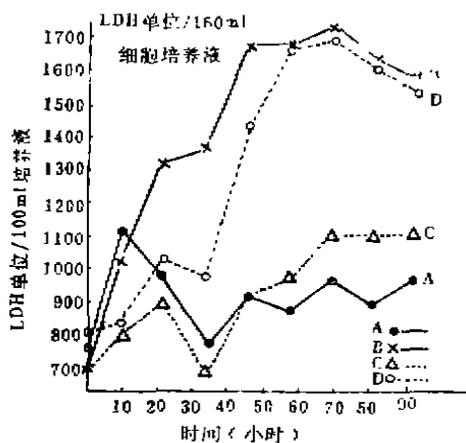


图3 病毒感染人心肌细胞后培养液中LDH的变化

Fig.3 The change of LDH level in HMC cell culture medium after virus infection

1. A、C组细胞正常(照片1),细胞培养液中LDH的含量,感染前后无显著差异,两组之比也无显著差异。2. 感染病毒34小时后,B组细胞CPE达29,LDH的含量为 $1355 \pm 172.99$ ,与感染病毒前 $698.33 \pm 28.43$ 相比, $P < 0.01$ 。而D组细胞仅极个别区域出现CPE,LDH的含量为 $906.66 \pm 23.09$ ,与感染前 $811.66 \pm 137.50$ 相比, $P > 0.05$ 。3. B组与D组相比,B组高于D组( $P < 0.01$ )。4. 随着培养时间的延长,B、D组病毒对细胞损伤加重,感染46小时后,细胞中的CPE达3—4+,细胞基本都变成圆形(照片2),

表3 铬对 COX B<sub>2</sub>V 感染心肌细胞的影响Tab 3. The effect of CrCl<sub>3</sub> on infectivity of COX B<sub>2</sub>V to myocardial cells

细胞	人心肌细胞				鼠心肌细胞			
病毒滴度 TCID <sub>50</sub> /0.1ml	100	10	/	0	100	10	1	0
铬浓度 0.5μg/ml	4+	4+	4+	-	4+	4+	4+	-
0.05μg/ml	4+	4+	4+	-	4+	4+	4+	-

注。“-”一细胞正常，“4+”一细胞全部病变

58小时以后，两组细胞培养中 LDH 的含量基本一致。

鼠肌细胞培养液中 LDH 的含量见表4。此表说明在细胞生长的早期，铬对 LDH 的含量无明显的影响，但细胞培养到118小时后，含铬组细胞培养液中 LDH 的含量明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

表4 两组鼠心肌细胞培养液中 LDH 的含量比较

Tab 4 The comparison of LDH activity between two RMC medium groups

培养时间 (小时)	对照组		含铬组		P
	n=3	$\bar{x} \pm SD$ U/L	n=3	$\bar{x} \pm SD$ μ/L	
34		398.33 ± 20.81		388.33 ± 52.52	>0.05
58		384.33 ± 37.44		407.00 ± 83.05	>0.05
82		436.67 ± 64.07		543.33 ± 133.17	>0.05
106		335.00 ± 35.36		416.67 ± 28.87	>0.05
118		302.50 ± 53.03		678.33 ± 70.06	<0.01
142		420.00 ± 42.43		795.00 ± 82.61	<0.01

在病毒性心肌炎与克山病的研究中，直接由病变组织分离出病毒的较少，Bowles 等用 COX B V 探针检测 50 例经病理学证实为心肌炎或扩张性心肌病变的病人心肌活检组织，发现 28 例 COX B V 特异性 RNA 杂交阳性，22 例非病毒性心肌病均为阴性。Muir 等指出 COX B V 可在人心肌诱导持续性感染，导致心肌损伤的机理不清<sup>[6]</sup>。本实验结果在人心肌细胞上病毒 TCID<sub>50</sub> 为  $10^{-10.66}$ ，人胚肾细胞为  $10^{-7}$ ，鼠心肌细胞为  $10^{-8}$ ，由此看出人心肌细胞对 COX B<sub>2</sub>V 的感染是非常敏感的。光镜下观察到病毒对细胞的损伤严重，由细胞变圆到破损，细胞内的酶漏出，自出现病变开始，细胞培养液中 LDH 的含量就明显高于对照组，随着病变的加重升高更明显。此项实验观察了 COX B<sub>2</sub>V 对心肌细胞损伤的指标，为临床诊治病毒性心肌炎提供了理论依据，同时建立了病毒感染体外细胞的模型，为探讨病毒持续感染导致心肌损伤的机理及筛选治疗病毒性心肌病的药物提了研究手段。

三价铬是人体必需微量元素，具有重要的生理作用。美国人以精白面粉为主要热能来源，招致人群普遍缺铬，成为冠心病发病率及死亡率较高的原因<sup>[9]</sup>。动物实验证明，缺铬可使糖耐量异常，进入心肌的多种氨基酸速率减慢，生长发育停止，角膜混浊，死亡率增高。补铬后生长加快，寿命延长，死亡率降低。营养不良的婴儿接受单一剂量 (250μg) 铬治疗后，生长发育加速，体重增加，体质改善<sup>[12]</sup>。本实验证明铬培养的心

肌细胞生长快, 代谢旺盛, 搏动群落增多, 搏动频率加快。铬对病毒虽没有灭活作用, 但铬培养液培养的心肌细胞在病毒感染初期, 病毒对细胞损伤较轻, LDH 释放量较少, 从而说明铬对心肌细胞有一定的保护作用。这对于心肌病的防治有一定的参考意义。

### 参 考 文 献

- (1) 李鸿升, 1989, 医学信息, P33。
- (2) 孔祥瑞, 1982, 必需微量元素的营养, 生理及临床意义, 安徽科学技术出版社, pp30。
- (3) 黄宗勳, 1986, 实用心血管病诊治手册, 人民卫生出版社, pp45。
- (4) Yang, Y. Z., et al, 1985, *J virological methed*, 12: 217—224
- (5) Reinhard, K. D., et al., 1985, *J Mol cell cardiol* 17: 161—181.
- (6) Jacobson SL, 1977, *Cell struet Function* 2: 1—9.
- (7) 崔福生, 1982, 医学生化检验手册, 天津科学技术出版社, pp207。
- (8) 宋关福, 微生物学分册, 1: 36。
- (9) Schroeder, H. A., 1973, *The Trace Element and Man*, Devin Adair Co.

## Exprimental Study on the Anti-Viral Effect of Myocardial Cell Enhanced by Chromium Chloride

Long Jie-de

(Dept. of Microbiology, Shandong Medical University, Jinan 250012)

Zhang Ai ping

(Institute of Endemic Diseases, Shandong, Jinan 250012)

In this paper, we studied the infectivity of Coxsackie B<sub>1</sub> Virus (Cox B<sub>1</sub> V) on human and rat myocardial cells (HMC and RMC) and the effect of chromium chloride (CrCl<sub>3</sub>) on growth heart cells and infectivity of the virus.

Results indicated that HMC is more sensitive to the virus than RMC. CrCl<sub>3</sub> could promote the growth and pulsation of HMC and RMC.

LDH studies of the culture cells revealed that,

1. In cultured RMC treated with CrCl<sub>3</sub>, lactodehydrogenase (LDH) increased with the time of incubation.

2. Sensitivity of the cultured cells treated with CrCl<sub>3</sub> to Cox B<sub>1</sub>V decreased.

3. In cultured HMC, LDH increased with the degree of CPE.

**Key words,** Myocardial cell culture Chromium trichloride (CrCl<sub>3</sub>) Coxsackie B<sub>1</sub> virus Lactodehydrogenase (LDH)