

40-44

第11卷第1期
1996年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

15953(7)

Vol. 11 No. 1
Mar. 1996

药物对病毒感染培养心肌细胞 Ca^{2+} 内流 及 CVB₃-RNA 复制的影响*

郭 棋 彭天庆 杨英珍

(上海医科大学中山医院, 上海市心血管病研究所卫生部病毒性心脏病重点实验室, 上海 200032)

顾全保 赵剑星

R542.210.5

(中国科学院上海细胞生物学研究所, 上海 20031)

R965.1

A

提要 应用放射性同位素 $^{45}Ca^{2+}$ 示踪技术及光敏生物素标记 cDNA 探针杂交方法, 观察了维拉帕米、黄芪、地塞米松等药物对感染柯萨奇 B₃ 病毒(CVB₃)的大鼠培养心肌细胞 Ca^{2+} 内流及细胞中 CVB₃-RNA 复制的作用。结果发现: 在病毒感染 48h, 上述三药均可显著减少感染细胞及正常对照的心肌 Ca^{2+} 内流($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$); 若在病毒感染后即加入上述药物, 经 48h 培养后, 黄芪组细胞中的 CVB₃-RNA 含量显著少于病毒对照组($P < 0.001$), 维拉帕米则显著增加($P < 0.01$), 而地塞米松对其无影响。提示黄芪与地塞米松具有一种与维拉帕米相似的减少病毒感染心肌 Ca^{2+} 内流的作用, 有可能减轻感染细胞的继发性 Ca^{2+} 损伤; 但三种药物对感染细胞中病毒核酸的复制有不同作用, 可作为临床治疗病毒性心肌炎时的参考。

关键词 病毒性心肌炎, 柯萨奇 B₃ 病毒, 维拉帕米, 黄芪, 地塞米松, CVB₃-RNA, 钙内流

目前国内病毒性心肌炎的发病率有所增加, 但临床上尚缺乏有效的治疗药物。已知该病的发病与病毒本身对心肌的直接损伤及其引起的免疫反应有关^[1,2]。柯萨奇 B 组病毒(CVB)是最常见的病原。近来的研究证实, 病毒感染可导致心肌的 Ca^{2+} 内流增加, 而使心肌细胞出现 Ca^{2+} 超负荷^[3-5], 这种继发性的 Ca^{2+} 损伤无疑将进一步加重心肌病变。故近来有学者认为这种现象也是心肌炎和扩张性心肌病的发病机理之一^[4,5]。

维拉帕米是一种经典的钙拮抗剂, 据报道它可减轻病毒致敏的免疫因素对心肌细胞的损伤^[6]; 而中药黄芪与激素类药物地塞米松, 在我们以往的研究中表明对 CVB₃ 感染心肌具有一定的保护作用^[7,8]。本研究旨在观察这些药物对 CVB₃ 感染培养心肌细胞的 Ca^{2+} 内流及其对细胞中 CVB₃-RNA 复制的影响, 以探讨它们的临床应用价值。

材料与amp;方法

1 材料

1.1 病毒: Coxsackie B₃ 病毒(CVB₃), Nancy 株, 在培养心肌细胞上测定其 50% 组织感染率即 TCID₅₀ 为

本文于 1995 年 3 月 11 日收到, 6 月 12 日修回

• 国家自然科学基金资助课题(39170359)

10^{-4}

1.2 细胞: 新生的 Sprague-Dawley 大鼠(上海医科大学实验动物部提供), 取其心室肌用 0.1% 胰蛋白酶分次消化细胞^[7], 所得的细胞悬液经纯化培养, 分装于 24 孔组织培养板, 每孔 1 ml 生长液含 5×10^{-5} 细胞, 生长液用含 20% 小牛血清的液, 置 37℃ 培养。18 h 后, 将已呈规律搏动的各孔细胞分为两组: 病毒感染组和正常对照组, 弃上清后, 在前组细胞中加入 0.5 ml 含 100 TCID₅₀ CVB₃ 的生长液, 后组仅加生长液。37℃ 温育 1 h, 各组弃上清并加 1 ml/孔生长液, 置 37℃ 培养观察。

1.3 药物: 维拉帕米 5mg/(2ml·支), 常州制药厂产品; 黄芪注射液, 含生药 4g/(2ml·支)、本院药剂科供; 地塞米松 5mg/(ml·支), 上海信谊药厂产品。

1.4 CVB₃-cDNA 探针: 将克隆有 CVB₃ 全长 cDNA 质粒 pSPT18 简称 pCVB₃-R1(由德国 Max Planck 生化所 Kandolf 教授惠赠) 转化大肠杆菌 DH5a, 进行质粒扩增, 超离心回收和纯化, 限制性内切酶 EcoR I 酶切后, 低熔点凝胶电泳分离得到 2.6 kb 长的 DNA 片段(位于 CVB₃ 全长 cDNA 的 5' 端)。然后经缺口翻译标记地高辛, 具体步骤参见试剂盒说明书(德国 Boehringer Mannheim 公司)。

2 药物处理与细胞 Ca^{2+} 内流测定

2.1 药物处理对正常心肌细胞 Ca^{2+} 内流的作用: 将上述正常对照组培养 48 h 后, 先用无 Ca^{2+} -Ringer 液洗涤细胞三次。实验分组为: 正常对照、维拉帕米、黄芪、地塞米松共四组, 正常组只加 $[\text{Ca}^{2+}]_0$ 为 50 μmol/L 的含 1 μCi/ml ⁴⁵Ca²⁺ (1m Ci/0.1 ml, DO POUT 产品) 的标记液每孔 250 μL, 在后三组中分别加入含维拉帕米 10^{-6} mol/L、黄芪 0.2 mg/ml、地塞米松 30 μg/ml 的 Ca^{2+} 标记液; 置 37℃ 温育, 分别在 1、5、10 min 取出吸去 ⁴⁵Ca²⁺ 液, 采用冷镧法即含 1 mmol/L 镧离子的 7% 山梨醇(冰浴) 快速洗涤三次, 每孔加 0.5 ml 5% SDS 置室温 2 h, 混匀后每孔取 200 μl 样品进行液闪计数(BECKMAN LS 6200)。按 Lowry 法测定各组的每孔蛋白平均含量。结果按下式计算:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ 内流量} = \frac{\text{cpm 数} \times [\text{Ca}^{2+}]_0 \text{ (nmol/L)}}{\text{总 cpm} \times \text{蛋白量 (mg)}}$$

2.2 药物处理对病毒感染心肌细胞 Ca^{2+} 内流的作用: 将上面病毒感染组培养 48 h 后, 分为: 病毒对照、CVB₃ + 维拉帕米、CVB₃ + 黄芪、CVB₃ + 地塞米松共四组, 依上法洗涤细胞, 加入各药物(剂量同上), ⁴⁵Ca²⁺ 液标记各组细胞; 亦在 1、5、10 min 时取出, 然后洗涤、计数方法同上。

3 RNA-cDNA 斑点杂交及其阳性信号的定量扫描 在 2.2 中的病毒感染之后上述各药(剂量、分组同上), 经 48 h 培养, 各组检测标本取相同含量的总 RNA(5 μg), 分别在尼龙膜(购自德国 Boehringer Mannheim 公司) 上进行点样。杂交前处理、杂交(杂交时间为 24 h) 及显色(显色时间统一为 3 h) 主要参照试剂盒说明书(德国 Boehringer Mannheim 公司)。在岛津 CS-910 扫描仪上对阳性杂交信号逐个进行扫描, 并经计算机整合出其反射峰面积(μm²)。详细方法参考文献^[9]。

结 果

1 Ca^{2+} 流入心肌细胞的时间曲线

1.1 药物对正常心肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响 从图 1 可见, 维拉帕米、黄芪、地塞米松与 ⁴⁵Ca²⁺ 标记液一起加入正常心肌细胞后, 在各时间点上(1、5、10min) 的细胞 Ca^{2+} 内流显著少于正常对照($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且各组细胞的 Ca^{2+} 流入均与流入时间有依赖关系。

1.2 药物对病毒感染的心肌细胞 Ca^{2+} 内流影响 在 CVB₃ 感染心肌细胞后经 48h 培养, 细胞的 Ca^{2+} 内流显著增加($P < 0.01$); 而维拉帕米、黄芪、地塞米松与 ⁴⁵Ca²⁺ 标记液一起加入细胞后, 测定 Ca^{2+} 流入的各时间点, 均较病毒对照的细胞 Ca^{2+} 内流显著减少($P < 0.01$)。见图 2。说明上述三种药均可通过抑制感染细胞过高的 Ca^{2+} 内流, 来维持细胞的性状及功能。

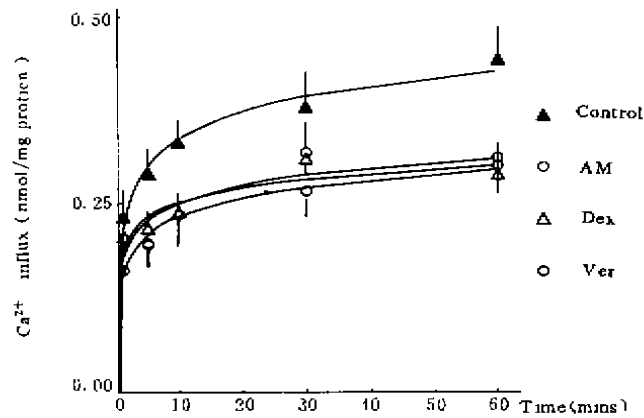


图1 药物对培养心肌细胞 Ca^{2+} 内流的抑制效应

*: $P < 0.05$ vs 正常对照组. ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=4$) Ver: 维拉帕米组 AM: 黄芪组 Dex: 地塞米松组

Fig 1 Inhibitive effect of drugs on Ca^{2+} influx of cultured rat heart cells

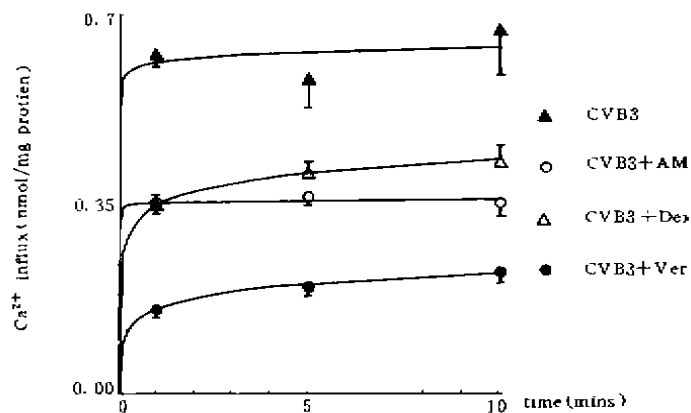


图2 药物对病毒感染48h的心肌细胞 Ca^{2+} 内流的抑制效应

*: $P < 0.05$ vs CVB3组. ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=3$)

Fig 2 Inhibitive effect of drugs on Ca^{2+} influx of cultured rat heart cells infected with CVB3 for 48h

2 药物对感染心肌细胞 CVB₃-RNA 复制的作用

2.1 CVB₃-cDNA 探针斑点杂交特异性 病毒对照组及病毒+各药物组之标本细胞总 RNA 与 cDNA 探针杂交后均有阳性信号出现, 各药物对照组和正常对照组标本细胞总 RNA 杂交后未发现任何阳性信号。同时 CVB₃-cDNA 探针与质粒 pPST 18DNA 杂交无阳性信号发现。可见此探针有较高的特异性。

2.2 杂交信号扫描结果 阳性杂交信号经反射扫描后得到的反射峰面积反映被检测之 CVB₃-RNA 的相对含量。结果表明在心肌细胞总 RNA 含量相同(5 μg)的情况下, CVB₃+黄

芪组阳性杂交信号反射峰面积 ($548 \pm 291 \mu\text{m}^2$) 小于病毒对照组 ($2929 \pm 1354 \mu\text{m}^2$, $P < 0.001$); 维拉帕米则显著增加 ($6840 \pm 3193 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$); 而地塞米松对其无影响。可见黄芪在培养心肌细胞中能有效地抑制 CVB₃-RNA 的复制, 而维拉帕米则起相反作用。参见图 3。

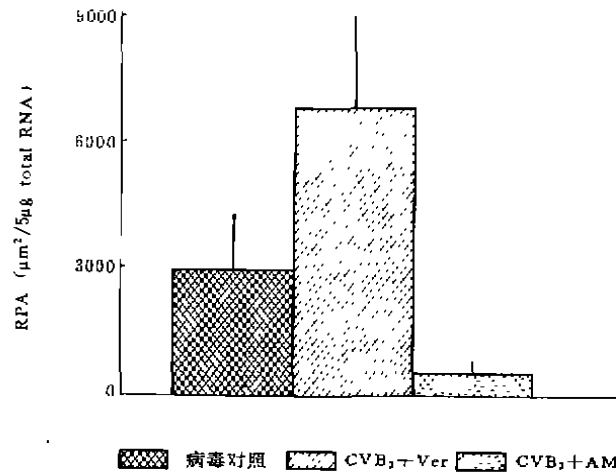


图 3. 药物对感染 48h 的心肌细胞 CVB₃-RNA 复制的作用

*: $P < 0.01$ CVB₃ + Ver vs 病毒对照 ** : $P < 0.001$ CVB₃ + AM 组, vs 病毒对照 RPA: 反射峰扫描面积 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n_1 = 12$, CVB₃ 组及 CVB₃ + AM 组, $n_2 = 8$ CVB₃ + Ver 组)

Fig 3 Effect of drugs on CVB₃-RNA replication of cultured rat heart cells infected with CVB3 for 48 hs

讨 论

病毒感染引起心肌病变而致心肌炎主要通过两条途径: 病毒直接侵犯心肌及其引发的免疫因素对心肌的损伤^[1,2]。二者均可导致心肌细胞 Ca^{2+} 内流的增加^[3-6], 其结果易引起心肌中 Ca^{2+} 超负荷, 而进一步加重心肌细胞的病变, 并产生多种异常的心肌动作电位^[10], 这表明在感染细胞的病变过程中钙起一定作用。本研究在无免疫因素参与的培养细胞感染模型上取得的结果显示: 维拉帕米、黄芪、地塞米松均可显著减少病毒感染 48h 的细胞 Ca^{2+} 内流。提示感染早期的细胞膜尚具完整性, Ca^{2+} 通道功能尚存; 早期使用某些药物(如钙拮抗剂等), 可能改善感染细胞的 Ca^{2+} 平衡, 从而减轻 Ca^{2+} 的继发性损伤。

病毒核酸在感染心肌细胞中的持续存在, 是导致本病迁延不愈及引发心肌病的重要原因^[2]。本文结果提示: (1) 黄芪既可抑制感染细胞中的病毒核酸复制, 又能减轻细胞的 Ca^{2+} 损伤, 且来源充足, 又无毒副反应, 显示了其在治疗病毒性心肌炎时的良好应用价值; (2) 由于地塞米松既不增加感染细胞中的 CVB-RNA 复制, 又可明显改善细胞的 Ca^{2+} 平衡, 故本研究支持在急性病毒性心肌炎早期, 加用短程较大剂量激素, 以使其安度难关这一论点; (3) 由于证实维拉帕米具有促进感染细胞中病毒核酸复制的作用, 无疑会进一步加重心肌病变, 故在治疗本病所致心律失常时宜慎重。

参 考 文 献

- 1 Lawrence HC. Studies of virus-induced myocardial injury in mice; value of the scid mutation on different genetic backgrounds and combined with other mutations. *Lab Animal Sci*, 1993;43(2):133
- 2 Huber S. Editorial: Viral myocarditis—A tale of two diseases. *Laboratory Investigation*, 1992;66(1):1
- 3 郭 棋, 杨英珍, 顾全保等. 病毒感染对培养心肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响. *中华医学杂志*, 1993;73:562
- 4 Tomimaga M, Matsumori A, Hone M, *et al*. Activation of Ca-permeable cation channels by myocarditis-associated antibody in guinea pig ventricular myocytes. *J Clin Invest*, 1993,91:1231
- 5 Weisman HF, Weisfeldt ML. Toward an understanding of the molecular basis of cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 1987;10:1135
- 6 Kuhl U, Melzner B, Schafer B, *et al*. The Ca-channel as cardiac autoantigen. *Eur Heart J*, 1991;12(suppl 1D):99
- 7 Rui T, Yang YZ, Zhou TS, *et al*. Effect of *Astragalus membranaceus* on electrophysiological activities of acute experimental coxsackie B-3 viral myocarditis in mice. *Chin Med Sci J*, 1993;8:203
- 8 Yalg YZ, Yuan WL, Guo Q, *et al*. Effect of dexamethasone on coxsackievirus B2-infected rat beating heart cells in culture. *Eur Heart J*, 1991;12(suppl D):39
- 9 彭天庆, 徐 岩, 杨英珍. cDNA 探针检测柯萨奇 B3 病毒 RNA. *中华医学检验杂志*, 1994;17(1):29

Effect of Drugs on Ca^{2+} Influx and CVB3-RNA Replication in Cultured Rat Heart Cells Infected with CVB3

Guo Qi Peng Tianqing Yang Yingzhen

(Zhong Shan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

Gu Quanbao, Zhao Jianxing

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031)

The effect of Verapamil (Ver), *Astragalus membranaceus* (AM), Dexamethasone (Dex) on Ca^{2+} influx across the myocardial plasma membrane and coxsackie virus B₃ (CVB₃)-RNA replication in cultured neonatal rat heart cells infected with CVB₃ was investigated. It was found that the Ca^{2+} influx could be decreased significantly ($p < 0.01$) by Ver, AM, Dex after infection for 48h. In addition, the amounts of CVB₃-RNA in cultured heart cells infected with CVB₃ and treated with AM for 48h simultaneously were significantly decreased as compared with the heart cells infected with CVB₃ only ($p < 0.001$), and it was significantly higher in myocytes infected with CVB₃ and treated with Ver than in myocytes only infected with CVB₃ ($p < 0.01$). These results demonstrated that the above three drugs could exert the effect of decreasing the secondary damages caused by Ca^{2+} influx, but their effects on replication of CVB₃-RNA in myocardium were quite different; AM inhibited replication of CVB₃-RNA, Ver enhanced CVB₃-RNA replication, while Dex did not affect the CVB₃-RNA replication. The results suggest that AM is the best choice in treating patients with acute viral myocarditis.

Key words Coxsackie virus B₃, Viral myocarditis, Ca^{2+} influx, Verapamil, *Astragalus membranaceus*, Dexamethasone