维普资讯 http://www.cqvip.com

第16卷1期 中国病毒学 16(1): 85-87
2001年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2001

大黄在体内抗柯萨奇病毒 B_3 的实验研究*

申元英[1], 杨占秋[2**], 刘建军[2], 肖红[2], 郭广松[3]

(1. 云南大理医学院微生物教研室, 云南大理 671000;
2. 武汉大学医学院病毒研究所, 湖北武汉 430071;
3 武汉大学医学院附属第二临床医院病理科, 湖北武汉 430071)

Study of *Rheum officinale* Against Coxsackievirus B_3 *in vivo*

SHEN Yuan-ying[1], YANG Zhan-qiu[2**], LIU Jian-jun[2], *et al*

(1. *Department of Microbiology, DaLi Medical college, Dali* 671000, *China*;
2. *Virus Research Institute, Medical college, Wuhan University, Wuhan* 430071, *China*)

Abstract: In order to search a effective therapy for viral myocarditis, antivial activity of *Rheum officinale* on Coxsackieivirus B_3 (CVB_3) was evaluated in BALB/C mice. After being determined optium scheme with orthogonal design, mice infected with CVB_3 were treated with *Rheum officinale*, ribavirin and 0.9% NaCl. The survival rates of the mice were 35%, 5% and 5%; Median survival time were 23, 11 and 10.5 days; Infectious viral titers were $10^{-3.2}$, $10^{-4.7}$ and $10^{-4.7}$ $TCID_{50}$/0.1 mL repectively, The lesions of cardiac tissues lightened in mice treated with *Rheum offinicale*. These results showed that *Rheum officinale* was effective in treatment of CVB_3 infected mice. The study provided scientific basis for further research and widen antiviral spectrum of *Rheum officinale*.

Key words: *Rheum officinale*; Coxsackievirus B_3; Viral myocarditis; BALB/C mice

关键词:大黄;柯萨奇病毒 B_3;病毒性心肌炎;BALB/C 鼠
中图分类号:R373 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2001)01-0085-03

柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CV)属小核糖核酸病毒科肠道病毒属,根据其对乳鼠的致病能力不同分为A、B两组,A组病毒能够引起乳鼠广泛性肌炎及坏死,B组病毒可致局灶性肌炎。研究表明,CVB是病毒性心肌炎的主要病因[1,2]。为寻找一种有效的抗 CVB_3 治疗药物,笔者通过体外实验发现大黄注射液有抗柯萨奇病毒作用[3],并根据中药大黄五脏皆治的理论,本研究进一步利用 CVB_3 病毒性心肌炎小鼠模型观察了该药的抗病毒作用。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 细胞 Hep-2细胞由武汉大学典型培养物保藏中心提供。细胞生长液为RPMI-1640,加10%新生牛血清、100 u/L 青霉素、100 μg/mL 链霉素,细胞维持液除为含2%新生小牛血清外,其它成分同细胞生长液。

1.2 病毒 CVB_3 Nancy 株为武汉大学医学院病毒

收稿日期:1999-09-20,修回日期:1999-12-06。
* 基金项目:湖北省教委项目(98A051)
作者简介:申元英(1963-),女、云南省籍,副教授,硕士,从事医学微生物与免疫学的教学与科研工作。
** 通讯作者简介:杨占秋(1952-),男、湖北省籍,教授,从事医学病毒学研究工作. For correspondence.

维普资讯 http://www.cqvip.com

研究所保存。病毒经 Hep-2 细胞活化增殖，CPE 达75%以上(+++～++++ Ⅲ)时收获，滴定其滴度为 10^6 $TCID_{50}$/0.1 mL。

1.3 药物 大黄注射液由湖北中医学院陈科力教授提供，1 mL 含量为 1 mg，经鉴定其主要成分为蒽醌类。

1.4 动物 4 周龄雄性 BALB/C 鼠，体重 18±2 g，购于湖北省实验动物中心，合格证号为：19－006。

1.5 大黄注射液对小鼠的急性毒性实验 72只雄性 BALB/C 鼠随机分 6 组，每组 12 只，按 1 700、2 500、3 500、5 000、7 000、10 500 mg·(kg·d)$^{-1}$腹腔注射，用药 3 d，连续观察 10 d，记录小鼠死亡情况，计算其 LD_{50}为 7769.36 mg·(kg·d)$^{-1}$。

1.6 致病模型的建立 4周龄雄性 BALB/C 鼠 30 只，感染部位常规消毒后，腹腔注射 10^5 $TCID_{50}$/0.1 mL CVB_3 0.1 mL，每天观察小鼠发病及死亡情况，并记录。

1.7 药物剂量和疗程的确定 采用 L9(3^4)正交设计，按 180、300、500 mg·(kg·d)$^{-1}$(分别是其 LD50 的 1/40、1/30、1/15)对 CVB_3 感染后 1 d、4 d、7 d 小鼠进行治疗，治疗 3 d、5 d、7 d 观察小鼠的发病及死亡情况，计算各组小鼠的存活率及中位存活时间，并对结果进行方差分析，选定最佳剂量为 300mg·(kg·d)$^{-1}$，疗程 3 d。

1.8 体内抗病毒实验设计 86只雄性 BALB/C 鼠随机分 3 组，每组 24 只，分别为 300 mg·(kg·d)$^{-1}$ 大黄治疗组，10 mg·(kg·d)$^{-1}$ 病毒唑治疗组和 0.9%氯化钠组，于病毒感染 24 小时后开始治疗，另设正常动物对照 14 只，各组动物均观察 30 d 后处死。

1.9 标本的收集和处理 各治疗组动物于感染后第 5 天第10天处死 2 只小鼠，摘眼球取血分离血清，处死动物并无菌取心、肝、脾、肾等脏器，1/3 用于组织病理学检查；1/3 用于感染性病毒分离；1/3 用于病毒核酸检测。

1.10 组织中感染性病毒的分离、滴定 按常规方法进行。

1.11 病毒核酸检测 治疗组小鼠血清、心、肝、脾、肾等组织提取 RNA，根据文献[4]设计引物，进行 cDNA 合成及 PCR 扩增，产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、紫外透射反射仪上观察。通过与标准分子量对照，在 300 bp 出现橙色条带者为阳性。

2 结果与讨论

2.1 小鼠感染 CVB_3 的致病特征

雄性 BALB/C 鼠感染 CVB_3 第 3 天时出现耸毛、倦缩、活动减少，体重减轻，第 4 天出现全身轻度紫绀，第 6 d 开始约一半小鼠(14/30)出现渐进性后肢麻痹，耳廓和尾部缺血、坏死、结痂，出现规律性死亡。经大黄注射液治疗后小鼠上述症状明显减轻，亦无耳廓、尾部缺血、坏死等外周组织缺血、缺氧症状和体征，小鼠死亡时间明显推迟，死亡率下降。病毒唑治疗组和 0.9%氯化钠组小鼠发病情况与上述致病模型组小鼠相似，其死亡率和中位生存期无明显差异，而空白对照组小鼠均未出现上述病毒性心肌炎症状，亦无小鼠死亡，结果见表 1。

表 1 大黄治疗后 CVB_3 感染小鼠存活率和中位存活时间

Table 1 The survival rate and median survival time of CVB3-induced myocarditis mice treated with *Rheum officinale* injection

组别 Groups	治疗动物数 No. treatment	存活数(率) No. survival	中位生存时间(天) Medium survival time (days)
大黄 *Rheum officinale*	20	7(35)	23
病毒唑 Ribavirin	20	1(5)*	11**
0.9%氯化钠 0.9% NaCL	20	1(5)*	10.5**
正常对照 Normal control	10	10(100)	30

大黄组 vs 病毒唑组：* χ^2 = 13.70 P<0.01，** μ = 5.41 P<0.001，*Rheum officinale* vs ribavirin

大黄组 vs 0.9%氯化钠组：* χ_2 = 13.70 P<0.01，** μ = 5.41 P<0.01；

Rheum officinale vs 0.9% NaCl

2.2 大黄治疗鼠组织中病毒滴度及核酸的消长

研究发现大黄治疗组小鼠心、脾、肾等组织中病毒滴度均低于病毒唑治疗组和 0.9% 氯化钠组，CVB_3 感染后第 5 天的小鼠脏器中病毒滴度略高于感染第 10 天后的小鼠脏器，三个治疗组小鼠肝组织中 CVB_3 分离均为阴。CVB_3 感染 5 d 和 10 d 的小鼠心、脾、肾组织中 CVB-RNA 检测均为阳性，肝组织均为阴性，大黄组小鼠血清于第 5 天为阳性，第 10 天为阴性，而病毒唑组和 0.9% 氯化钠组第 5 天和第 10 天均为阳性。结果见表 2。

本实验采用 CVB_3 致 BALB/C 鼠病毒性心肌炎的发病模型，应用正交设计，选大黄注射液剂量为

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2　大黄治疗 CVB3 感染鼠组织中病毒滴度

Table 2　Effects of Rheum officinale injection on CVB_3 titers in tissues of CVB_3-induced myocarditis mice

组别 Groups	组织中病毒滴度(log $TCID_{50}$/0.1 mL) virus titerw in tissues($TCID_{50}$/0.1 mL)							
	心 Heart		肝 Liver		脾 Spleen		肾 Kidney	
	第 5 天 5th day	第 10 天 10th day	第 5 天 5th day	第 10 天 10th day	第 5 天 5th day	第 10 天 10th day	第 5 天 5th day	第 10 天 10th day
大黄 Rheum officinale	3.2	2.7	—	—	2.5	2.8	2.7	1.2
病毒唑 Ribavirin	4.7	4.3	—	—	3.6	2.8	3.4	2.8
0.9%氯化钠 0.9% NaCl	4.7	4.2	—	—	3.3	3.2	3.2	2.7

$300mg\cdot(kg\cdot d)^{-1}$对感染 CVB_3 的雄性 BALB/C 鼠进行治疗,结果发现:(1)大黄治疗组小鼠发病症状减轻,死亡率下降,平均生存天数延长;(2)大黄能抑制心、脾、肾等脏器中病毒增殖,使这些脏器中感染性病毒滴度下降;(3)大黄能加快血液中 CVB_3 的清除;(4)大黄治疗组心肌组织病理损伤减轻(另文介绍),说明大黄在动物体内有抗 CVB_3 作用。同时本实验结果亦说明,病毒唑治疗病毒性心肌炎无效。大黄的药用价值日益受到国内外学者的重视,大黄抗疱疹病毒已在体外、体内得以证实[5,6],而大黄抗 CVB 作用尚未见报道,本文通过体内研究表明,该药有抗 CVB_3 作用,这也说明该药具有广谱抗病毒作用。有文献报道大黄具有抑制炎症介质释放,调节机体免疫功能的作用[7]。而文献报道 CVB 所致的心肌炎早期为病毒直接损伤作用,晚期是免疫病理损伤所致[8],因此,本研究有待进一步证实大黄治疗病毒性心肌炎的作用机制。

参考文献

[1] Sato S, Tsutsumi R, Burke A *et al*. Persistence of replication coxsackievirus B_3 in the athymic murine heart is associated with development of myocarditis lesion[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 2911－2921.

[2] Androletti L, Hober D, Bocquart P *et al*. Experimental CVB_3 induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection[J]. J Med Virol, 1997, 52: 206－214.

[3] 申元英,杨占秋,刘建军,等.大黄提取液抗柯萨奇病毒 B_3 的实验研究[J]. 北京中医药大学学报,1999;22(5):65－66.

[4] 宋键萍,刘建军,杨占秋,等.RT-PCR 检测 CVB-RNA 方法的建立[J]. 湖北医科大学学报,1998,19(4):292－294.

[5] 罗军,陈安慎,杨占秋,等.中药大黄抗单纯疱疹病毒的实验研究[J] 中华传染病杂志,1991;9:160－163.

[6] 罗军,刘振安,肖红,等.大黄在体内抗单纯疱疹病毒作用的实验研究[J] 中华传染病杂志,1998,16(4):241－242.

[7] 胡伟新,刘志红,黎磊石.炎症因子对人肾小球系膜细胞生长的影响及大黄素的抑制作用[J].中国实验临床免疫学杂志,1994,6(2):20－24.

[8] Gauntt CJ, Higdon AL, Arizpe HM *et al*. Epitopes shares between coxsackievivas B_3 (CVB_3) and normal heart tissue contribute to CVB_3-induced murine myocarditis [J]. Clin Immunol & Immunopathol, 1993, 69(2): 129－134.