芪芍五味子颗粒对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡和氧化应激状态的影响

刘奉琴[1]，王玉林[1]，朱晓新[2]，靳有朋[1]，王青青[1]，宋　嘉[1]

（1. 山东大学附属省立医院儿科，济南　250021；
2. 中国中医研究院中药研究所，北京　100091）

摘要：目的：研究病毒性心肌炎（viral myocarditis，VM）模型小鼠心肌细胞凋亡和氧化应激状态及中药芪芍五味子颗粒对其的影响。方法：BALB/c小鼠接种柯萨奇B3病毒（coxsackie virus B3，CVB3），建立病毒性心肌炎动物模型，随机分为病毒对照组、芪芍五味子颗粒中药治疗组及VitC和病毒唑联用治疗组。各组于实验第3，7，14，21天分批处死，取心脏用流式细胞仪检测心肌细胞凋亡和坏死率，并作组织病理学和电镜检查，同时分别用黄嘌呤氧化酶法和硫巴比妥酸法测血清超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性及丙二醛（maleic dialdehyde，MDA）含量。结果：VM小鼠心肌细胞凋亡率和坏死率均显著增加，凋亡高峰在CVB3感染后第7天，坏死高峰在第14天，与组织形态学观察一致，与病毒对照组比较，中药治疗组小鼠心肌细胞凋亡率和坏死率显著降低（$P<0.05$），小鼠心肌炎症性病理变化明显减轻；病毒对照组小鼠处于氧化应激状态，中药组小鼠在第14，21天血清SOD活性明显高于病毒对照组，MDA含量明显低于病毒对照组（$P<0.05$）。结论：芪芍五味子颗粒能减轻CVB3感染小鼠心肌病理损害程度，调整其氧化应激状态，降低心肌细胞凋亡率和坏死率，对VM有良好的防治作用。

关键词：儿科学；病毒性心肌炎；中药；细胞凋亡；氧化应激
中图分类号：R725.4　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2010)06-1147-6

Qishaowuweizi compound's regulating effect on cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress of viral myocarditis model mice

LIU Fengqin[1], WANG Yulin[1], ZHU Xiaoxin[2], JIN Youpeng[1], WANG Qingqing[1], SONG Jia[1]

(1. *Paediatric Department, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan* 250021, *China*;
2. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing* 100091, *China*)

Abstract: Objective: To investigate cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress in viral myocarditis (VM) model mice and treatment effect of Qishaowuweizi compound. Methods: Male BALB/c mice were infected intraperitoneally with coxsackie virus B3 (CVB3) to prepare VM model and randomly divided into normal control group, virus control group, Qishaowuweizi compound treatment group and ribavirin plus VitC treatment group. Mice were sacrificed on experiment day 3, 7, 14 and 21 postinoculation (p. i.). Cardiomyocyte apoptosis and necrosis were detected by flowcytometry (FCM). Histomorphologic changes were observed under light microscope and electron microscope. Besides, research was done on serum superoxide dismutase (SOD) activity by xanthine oxydase method and maleic dialdehyde (MDA) by thiobarbituric acid (TBA) method. Results: In virus control group, cardiomyocyte apoptosis and necrosis both increased compared with normal control group ($P<0.05$). The apoptosis peak appeared on day 7 p. i. and the necrosis peak on day 14 p. i., consistent with histomorphologic observation. While compared with virus control group, cardiomyocyte

基金项目：国家自然科学基金（30672710）；高等学校博士学科点专项科研基金（20060422047）；山东省自然科学基金（Y2003C02）
作者简介：刘奉琴（1978—），女，主治医师，主要研究方向：儿科心血管疾病. E-mail：zimoli001@mail.sdu.edu.cn

apoptosis and necrosis were lower in Qishaowuweizi compound treatment group; the pathologic changes were meliorated. Mice of virus control group were in oxidative stress condition. In Qishaowuweizi compound treatment group, the serum SOD was more active and the value of MDA was less than virus control group on day 14 p. i. and 21 p. i ($P<0.05$). Conclusion: Qishaowuweizi compound could meliorate cardiac pathologic changes of VM mice, regulate their oxidative stress condition and reduce cardiomyocyte apoptosis and necrosis, having predictably favorable effect in treating VM.

Key words: pediatrics; viral myocarditis; traditional Chinese medicine; apoptosis; oxidative stress

0 引言

柯萨奇病毒感染可引起青少年急慢性心肌炎，占所有病例的5%～50%，并可导致转化为扩张性心肌病[1]，严重影响青少年健康。细胞凋亡参与心肌炎的发病过程[2]。当细胞内氧化还原状态被打破，处于“氧化应激”状态时，可能引起细胞凋亡，活性氧产生增多是凋亡的前兆[3]。目前，天然药物在心血管疾病的治疗中已经占据了一定位置。研究通过对VM小鼠心肌细胞凋亡和坏死率及血清SOD活性和MDA含量的检测，探讨VM与细胞凋亡和氧化应激因素的关系，进而阐明中药芪芍五味子颗粒治疗病毒性心肌炎的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和实验动物

CVB3 Nancy株由山东省医学科学院病毒室提供，在Hela细胞上传代冻融3次，并测得半数细胞感染率（tissue culture infective dose$_{50}$，TCID$_{50}$）为10^9/mL，6～8周龄健康雄性BALB/c小鼠［（20±2）g，SPF级］，由山东大学实验动物中心提供，合格证号：SCXK（鲁）20030004.

1.1.2 药物、试剂与主要仪器

黄芪、赤芍、五味子由中国中医研究院中药研究所提供并制药；VitC（1 g/支），上海禾丰制药有限公司生产；病毒唑（100 mg/支），山东鲁抗辰欣药业有限公司生产；SOD活性和MDA含量测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供；Annexin V-FITC apoptosis detection kit购自晶美生物工程有限公司；流式细胞仪为美国BECKMAN COULTER公司Epics XL-4，分析软件System II version 3.0；电镜为日本JEOL公司JEM-1200E型。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及干预治疗

小鼠随机分组：正常对照组（A组40只）、病毒对照组（B组50只）、中药治疗组（C组50只）、VitC和病毒唑联用组（D组50只）。正常对照组腹腔接种1640培养液0.15 mL，其他组腹腔接种CVB3病毒液0.15 mL. 中药由黄芪、赤芍、五味子按比例制作中药干粉，根据人与小鼠的标准公斤体重剂量折算方法[4]换算得小鼠每日用量为5.4 g/kg，用小鼠消毒饮用水制成相应浓度的均匀混悬液，0.1 mL中药液等容灌胃，A，B 2组用同体积的生理盐水灌胃。D组小鼠每日用药：VitC 1.5 g/kg灌胃，病毒唑0.1 g/kg肌注。病毒接种1 h后开始用药，每日1次，连用14 d.

1.2.2 标本采集

接种病毒后第3，7，14天每组随机处死10只小鼠。第21天，B组处死剩余9只小鼠，其他组处死10只小鼠，摘眼球取血离心制备血清，－20℃分装冻存备用。无菌取心脏，称重，沿左室中线剖开，部分用10%中性甲醛固定，待做光镜检查，部分剪为0.5 mm^{3}组织碎块，用少许4℃预冷磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）冲洗，待做流式细胞仪检查。每组随机取2只小鼠心肌，

标本直径1～2 mm，3%戊二醛固定，待做电镜检查。

1.2.3 病理学检查和超微结构检查

小鼠心肌标本常规石蜡包埋，连续切片3张（片厚4 μm），光镜下观察HE染色心肌病理变化，并计算心肌病变积分：即每张切片随机取5个高倍视野，计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野面积之比，无病变计0分，病变面积＜25%计1分，25%～50%计2分，50%～75%计3分，＞75%计4分。小鼠心肌电镜标本包埋、染色、切片在山东大学医学院电镜教研室完成。

1.2.4 小鼠心肌细胞凋亡和坏死率检查

提取心肌细胞单细胞悬液，操作按试剂盒说明。流式细胞仪光源为488 nm的氩离子激光发射器，硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）受激发后发出绿色荧光，聚酰亚胺（polyimide，PI）发红色荧光，每份标本收集10 000个细胞，计算软件自动分析结果。

1.2.5 SOD和MDA检测

SOD检测采用黄嘌呤氧化酶法，MDA检测采用硫巴比妥酸（thibabituric acid，TBA）法，具体操作按试剂盒说明。

1.3 统计学处理

计量资料结果以 $\bar{X}\pm S$ 表示，组间均数比较采用单因素方差分析和最小显著差法（least significant difference，LSD）检验，以 $P<0.05$ 为有显著性差异。全部资料用SPSS 10.0统计软件分析。

2 结果

2.1 小鼠心肌组织病理学检查结果

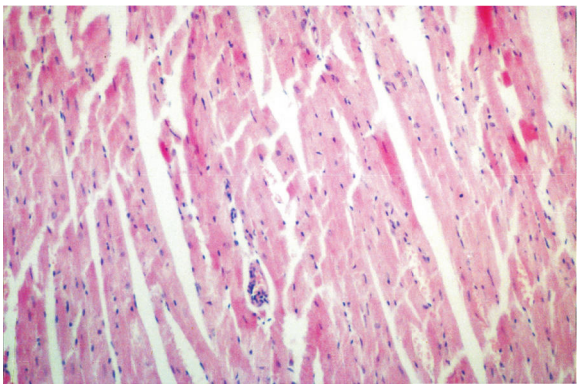
光镜下见VM小鼠第3天心肌结构基本正常，无坏死及炎性细胞浸润；第7天可见小血管炎；第14天大量心肌变性、坏死，炎性细胞浸润，呈现典型的病毒性心肌炎改变；第21天肌纤维钙化或溶解吸收，纤维细胞增生，呈恢复性改变（如表1、图1和图2所示）。中药治疗组心肌病变较病毒对照组均明显减轻，C组第21天心肌结构基本恢复正常（如表1、图3所示）。D组第21天仍可见点状坏死灶及少许淋巴细胞浸润，间质细胞增生。

表1 病理积分（$\bar{X}\pm S$）

Tab.1 Pathological scores of every group（$\bar{X}\pm S$）

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
A	0	0	0	0
B	0.30±0.48	1.40±0.28	2.24±0.44	1.70±0.46
C	0.10±0.32	0.38±0.29*	1.38±0.26*	0.88±0.36*
D	0.30±0.48	1.02±0.35	1.88±0.44*	1.56±0.44*

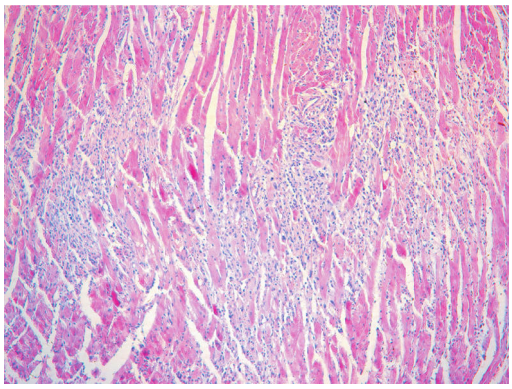
注：各组小鼠除第21天B组 $n=9$，其余 $n=10$；*为 $P<0.05$ vs B组



注：小鼠心肌中可见小血管炎散在分布

图1 病毒对照组小鼠第7天心肌病理改变（HE，×100）

Fig.1 Light microscope photos of Group B on day 7 p.i.（HE，×100）



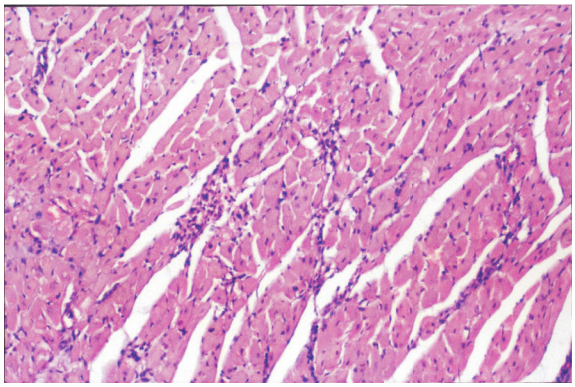
注：大量炎性细胞浸润，心肌变性、坏死病变广泛

图2 病毒对照组小鼠第14天心肌病理改变（HE，×100）

Fig.2 Light microscope photos of Group B on day 14 p.i.（HE，×100）

2.2 电镜检查结果

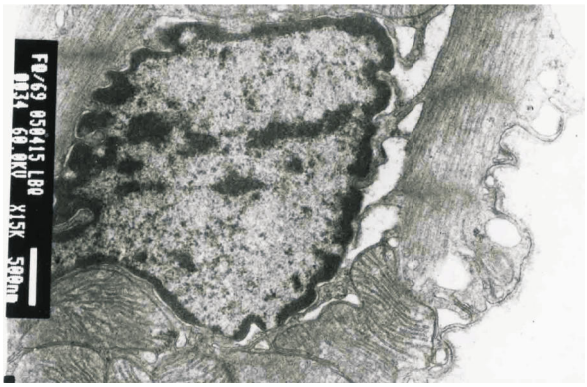
CVB3 感染第 3 天可见心肌线粒体肿胀。第 7 天心肌细胞线粒体肿胀，大小不一，嵴结构不清；部分肌丝排列紊乱，肌节长短不一；部分核固缩，染色质浓缩边聚呈现凋亡改变（如图 4 所示）。第 14 天肌原纤维排列极度紊乱、稀疏，肌丝断裂，闰盘紊乱，结构不清；胞核周围线粒体数目减少，线粒体变性肿胀，双层膜间隙变窄，嵴分解减少和消失；核膜变得有突起。第 21 天部分心肌细胞恢复正常，线粒体嵴清晰整齐。各药物治疗组心肌超微结构改变均较病毒对照组轻，中药治疗组小鼠心肌第 14 天基本恢复正常，肌丝排列整齐，线粒体沿肌节分布，胞膜下线粒体恢复正常。



注：病变范围明显小于病毒对照组

图 3 中药治疗组小鼠第 14 天心肌病理改变（HE，×100）

Fig. 3 Light microscope photos of Group C on day 14 p. i.（HE，×100）



注：可见核固缩，染色质浓缩边聚呈现凋亡改变

图 4 病毒对照组小鼠第 7 天心肌超微结构改变（电镜，×15 000）

Fig. 4 Ultra-structure changes of Group B on day 7 p. i.（electron microscope，×15 000）

2.3 小鼠心肌细胞凋亡率和坏死率

正常小鼠心肌细胞存在极微量的凋亡细胞，但不存在坏死。CVB3 感染各组小鼠心肌细胞凋亡和坏死率均显著高于正常对照小鼠。实验中心肌细胞凋亡高峰在第 7 天，坏死高峰出现在实验第 14 天，结果与组织形态学观察一致。中药治疗组小鼠心肌细胞凋亡和坏死率在各时间点均显著低于病毒对照组（$P<0.05$）。VitC 与病毒唑联用对心肌细胞凋亡影响较小，对心肌细胞坏死有一定的保护作用（如表 2、表 3 所示）。

2.4 各组小鼠不同时期 SOD 活性及 MDA 值比较

VM 小鼠血清 SOD 活性在感染后第 3，7 天无明显改变，以后逐渐下降，第 14 天最低。C 组小鼠在第 7 天 SOD 活性略高于正常对照组小鼠，实验第 14 天各用药组小鼠血清 SOD 活性均高于同期病毒对照小鼠（$P<0.05$）。中药治疗各组小鼠血清 SOD 活性第 21 天基本恢复正常（如表 4 所示）。

表 2 心肌细胞凋亡率（$\bar{X}\pm S$）

Tab. 2 Apoptosis rate of cardiomyocytes（$\bar{X}\pm S$）

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
A	0.976±0.313	—	—	—
B	3.683±0.461	6.426±0.689	4.212±0.411	2.539±0.358
C	1.744±0.281*	3.509±0.403*	2.713±0.320*	1.328±0.324*
D	3.606±0.391	6.007±0.328	4.025±0.25	2.015±0.528

注：各组小鼠除第 21 天 B 组 $n=9$，其余 $n=10$；*为 $P<0.05$ vs B 组

表 3 心肌细胞坏死率（$\bar{X}\pm S$）

Tab. 3 Necrosis rate of cardiomyocytes（$\bar{X}\pm S$）

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
A	0	—	—	—
B	0.193±0.088	1.625±0.328	3.890±0.608	1.103±0.322
C	0.170±0.046	1.079±0.297*	1.577±0.285*	0.528±0.193*
D	0.191±0.062	1.562±0.269	3.005±0.278*	0.703±0.301*

注：各组小鼠除第 21 天 B 组 $n=9$，其余 $n=10$；*为 $P<0.05$ vs B 组

表 4 各组小鼠血清 SOD 活性比较（$\bar{X}\pm S$，U/mL）

Tab. 4 SOD activity in the serum（$\bar{X}\pm S$，U/mL）

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
A	224.53±22.38	225.57±26.57	223.50±21.22	225.26±21.72
B	214.18±50.63	205.34±20.21	163.14±32.96△	134.94±37.33△
C	220.79±24.10	234.70±27.60*	203.03±14.09*	212.52±18.87
D	211.42±20.00	217.05±22.27	198.55±21.51*	205.94±29.00

注：各组小鼠除第 21 天病毒对照组 $n=9$，其余 $n=10$；*为 $P<0.05$ vs B 组；△为 $P<0.05$ vs A 组

CVB3 感染小鼠第 7 天血清 MDA 值升高，第 14 天最高，第 21 天略有降低，但仍显著高于正常（$P<0.05$）。中药治疗组小鼠第 7，14，21 天血清 MDA 值均低于同期病毒对照小鼠，小鼠在第 21 天血清 MDA 值基本恢复正常（$P<0.05$）（如表 5 所示）。

表 5 各组小鼠血清 MDA 值比较（$\bar{X}\pm S$，c/nmol·mL^{-1}）

Tab. 5 MDA level in the serum（$\bar{X}\pm S$，c/nmol·mL^{-1}）

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
A	12.61±1.49	12.28±1.46	11.50±1.22	12.26±1.72
B	13.17±1.33	22.69±7.08△	26.23±2.67△	24.31±3.43△
C	12.58±1.22	15.70±5.41*	19.53±5.23*	16.81±3.39
D	12.50±1.57	16.08±3.74*	22.72±3.67	19.18±5.50*

注：各组小鼠除第 21 天 B 组 $n=9$，其余 $n=10$；*为 $P<0.05$ vs B 组；△为 $P<0.05$ vs A 组

3 讨论与结论

多项研究证实：CVB 可直接诱导细胞凋亡和坏死，细胞凋亡的概念被引入了病毒性心肌炎的发病机制中[5~6]。通过凋亡清除病毒感染细胞是宿主牺牲个别细胞限制病毒繁殖扩散、清除外物的防御机制，但对于像心肌细胞这样高度分化的终末细胞，其凋亡却会引起恶化后果。VM 中的细胞凋亡可能有 2 种方式：一种是散在心肌细胞凋亡，可使心肌数目减少，功能丧失；另一种是血管内皮细胞凋亡，引起血管腔及管壁通透性改变，导致心肌供血异常而引起心肌损伤。凋亡在 VM 向扩张性心肌病（dilated cardiomyopathy，DCM）的转化中也起重要作用。实验中运用流式细胞仪定量检出实验第 3 天 VM 小鼠心肌细胞凋亡率增高，实验第 7 天达到高峰，同时电镜也观察到了心肌细胞核染色质浓缩、边集的凋亡改变。芪芍五味子颗粒治疗组小鼠心肌细胞凋亡率低于病毒对照组小鼠，病理损伤和电镜观察超微结构改变轻于病毒对照组小鼠，说明芪芍五味子颗粒可能通过调节心肌细胞凋亡减轻炎性反应保护心肌。

有研究报道，VM 病人处于氧化应激状态，氧自由基参与了 VM 发病机制[7]。实验通过检测在生物体内 O^{2-} 的产生与消除的动态平衡中起重要作用的酶 SOD 和脂质过氧化反应的中间产物 MDA 反映 VM 小鼠体内氧化还原反应水平。结果显示：病毒对照组小鼠第 14，21 天血清 SOD 明显下降，MDA 含量升高，氧自由基产生增多，VM 小鼠急性期体内氧化还原反应的平衡被打破，有利于氧化，即所谓的“氧化应激”状态。病毒感染后心肌离子泵功能下降，腺苷酸酶活性降低，导致心肌细胞 Ca^{2+} 超载，干扰心肌能量代谢，激活蛋白激酶、磷脂酶，诱导氧自由基产生，它们在体内可引发脂质过氧化反应，导致生物膜（细胞膜、线粒体膜等）结构异常及功能障碍。与同期病毒对照组比较，中药治疗组小鼠血清 SOD 活性提高，MDA 含量降低，心肌细胞死亡率减少，显示了芪芍五味子颗粒良好的抗氧化作用。

氧化应激是心血管疾病中凋亡的主要诱导因素之一，活性氧产生增多是凋亡的前兆[3]。研究报道 DEN-2 病毒感染后，SOD 预先治疗可以保护细胞对抗病毒诱导的凋亡，说明抗氧化剂的应用在对抗病毒诱导凋亡方面起了重要作用[8]。可以推测病毒感染引起细胞凋亡非单一直接途径，关于心肌细胞凋亡和氧化应激在 VM 中的关系值得探讨。研究报道“氧化应激”和 *Bcl*-2 基因家族（*Bcl*-2 genes family）可能通过调节心肌细胞凋亡数量参与 VM 致病过程，氧化应激以降低的血清谷胱甘肽水平为指数，与实验性病毒性心肌炎心肌凋亡一致[9]。

实验中药治疗降低心肌细胞凋亡率和死亡率，调整小鼠氧化应激状态，均对保护心肌起重要作用。但是实验中病毒对照组小鼠细胞凋亡和氧化应激两者高峰错过，可能与取材时间点和疗程的时间选择有关。

通过抑制心肌细胞凋亡阻止心肌细胞丢失，甚至在一定程度上保存心肌细胞的功能，这为多种心脏疾病的治疗提供了一个新思路。目前，天然药物在心血管疾病的治疗中已经占据了一定位置。中医学认为病毒性心肌炎病位在心，气阴两虚贯穿病毒性心肌炎病程，治疗以补虚为主，采用益气养阴之法以固其本，并佐以清热凉血化瘀、正气得固、邪自外除。黄芪为重要的补气药，现代药理研究已知其具有调节免疫、抗病毒、抑制细胞凋亡、抗氧化作用，其中的成分黄芪甲苷在降低细胞内钙超载、

提高氧自由基清除能力方面扮演着重要角色[10]。赤芍为我国传统活血化瘀药物，现代药理研究表明，其具有抗肠道病毒等多种病毒及心功能保护效果[11]，五味子及其多种成分对氧自由基引起的损伤有明显保护作用[11]。中草药是我国独有的资源优势，依据中医理论和现代药理研究结果，精选黄芪、赤芍和五味子组方芪芍五味子颗粒，三药可在抗病毒、抑制心肌细胞凋亡、调整氧化应激方面起协同作用。实验显示，芪芍五味子颗粒保护病毒性心肌炎小鼠心肌的作用与其调节心肌细胞凋亡和调整氧化应激有关，确切机制和应用价值还需要进一步研究。

[参考文献] (References)

[1] MAISCH B, RIŚTIC A D, HUFNAGEL G, et al. Pathophysiology of viral myocarditis: the role of humoral immune response[J]. Cardiovasc. Pathol., 2002, 11(2): 112～122.

[2] KAWANO H, OKADA R, KAWANO Y, et al. Apoptosis in acute and chronic myocarditis[J]. Jpn Heart J., 1994, 35(6): 745～750.

[3] TAN S, SAGARA Y, LIU Y, et al. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death[J]. J. Cell Biol., 1998, 141(6): 1423～1432.

[4] 徐叔云，卞如濂，陈修. 药理实验方法学 (3 版)[M]. 北京：人民卫生出版社，2002.
XU S Y, BIAN R L, CHEN X. Methodology of pharmacology experiment (3rd Edition)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. (in Chinese)

[5] SARASTE A, AROLA A, VUORINEN T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis[J]. Cardiovasc. Pathol., 2003, 12(5): 255～262.

[6] KYTÖ V, SARASTE A, FOHLMAN J, et al. Cardiomyocyte apoptosis after antiviral WIN 54954 treatment in murine coxsackievirus B3 myocarditis[J]. Scand. Cardiovasc. J., 2002, 36(3): 187～192.

[7] XIE B, ZHOU J F, LU Q, et al. Oxidative stress in patients with acute coxsackie virus myocarditis[J]. Biomed Environ. Sci., 2002, 15(1): 48～57.

[8] JAN J T, CHEN B H, MA S H, et al. Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved[J]. J. Virol., 2000, 74(18): 8680～8691.

[9] KYTÖ V, LAPATTO R, LAKKISTO P, et al. Glutathione depletion and cardiomyocyte apoptosis in viral myocarditis[J]. Eur. J. Clin. Invest., 2004, 34(3): 167～175.

[10] MENG D, CHEN X J, BIAN Y Y, et al. Effect of astragalosides on intracellular calcium overload in cultured cardiac myocytes of neonatal rats[J]. Am. J. Chin. Med., 2005, 33(1): 11～20.

[11] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2000.
SHEN Y J. Pharmacology of traditional Chinese medicine[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000. (in Chinese)