

五参二连颗粒对病毒性心肌炎小鼠免疫调节机制的研究

曹永^{1,2}, 郝林³, 韩丛辉³, 张培影^{3*}

(1. 南京中医药大学第一临床学院, 南京 210029; 2. 徐州市中医院, 江苏 徐州 221009;
3. 徐州市中心医院, 江苏 徐州 221009)

[摘要] **目的:**研究五参二连颗粒对病毒性心肌炎(VMC)小鼠心肌保护作用及免疫调节机制的研究。**方法:**用柯萨奇B3型病毒(CoxB3)建立BALB/c小鼠VMC模型。将60只BALB/c小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物利巴韦林组(1 mg·kg⁻¹)及五参二连低、中、高剂量组(4, 12, 20 mg·kg⁻¹)。造模后第0, 1, 2, 3, 4, 5天, 用药组分别给与相应药物灌胃给药并观察动物一般情况。连续给药5 d, 在末次给药2 h后终止实验, 称重, 并根据检测要求做标本采集。对所取标本进行心肌酶指标检测、脏器指数检测及自然杀伤细胞(NK)杀伤实验。**结果:**模型组小鼠第2天后开始精神萎靡, 活动减少, 毛粗糙, 体温下降。第5天后处死, 心脏晦暗, 纹理不清, 心脏表面出现白色点状条索状病变。病理学HE染色, 心肌组织有大量的炎性细胞浸润, 可广泛弥漫, 也可呈局灶性, 并可有坏死灶。同时模型组的肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白、肌红蛋白与正常对照组比较 $P < 0.05$, 表明造模成功。利巴韦林组, 五参二连颗粒高、中剂量组的肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白均有下降, 与模型对照组比较 $P < 0.05$ 。利巴韦林组及五参二连颗粒高、中剂量组脾指数和胸腺指数有升高, 与模型对照组比较 $P < 0.05$ 。利巴韦林及五参二连颗粒高、中剂量组NK杀伤作用与正常对照组和模型对照组比较 $P < 0.05$ 。**结论:**五参二连颗粒可以减轻CoxB₃造成的心肌损伤, 并激发机体的免疫调节机制, 对心肌细胞有一定保护作用。

[关键词] 五参二连颗粒; 病毒性心肌炎; 免疫调节

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0142-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190142

Immune Regulation Mechanism of Wushen Erlian Granules in Mice with Viral Myocarditis

CAO Yong^{1,2}, HAO Lin³, HAN Cong-hui³, ZHANG Pei-ying^{3*}

(1. First Clinical Medical College, Nanjing University of Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Xuzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou 221009, China;
3. Xuzhou City Central Hospital, Xuzhou 221009, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of protection and immune regulation of Wushen Erlian granules in mice with viral myocarditis myocardial. **Method:** BALB/c mice with viral myocarditis model was established by Coxsackie B3 virus (CoxB3). The BALB/c mice were randomized into the normal group, model group, positive control ribavirin group (1 mg·kg⁻¹) and Wushen Erlian granule low-dose group, middle-dose group, high-dose group (4, 12, 20 mg·kg⁻¹). After modeling, corresponding drugs were respectively given to each mice in all groups at d0, d1, d2, d3, d4, d5 for 5 days. Weighing and specimen collection according to the testing requirements were carried out. Myocardial enzyme indexes detection, viscera index detection and natural killer cells (NK) killing experiment were performed. **Result:** After second days, mice in model group appeared apathetic, reduced action, rough, hypothermia. After fifth days, mice were killed and the heart was dark, texture was not clear, the heart surface appeared white spot funicular lesions. Pathological HE staining indicated

[收稿日期] 20140422(013)

[基金项目] 江苏省康源中医药科技创新基金(HZ1018KY)

[第一作者] 曹永, 博士研究生, 副主任医师, E-mail: caoyongtcm@163.com

[通讯作者] * 张培影, 博士, 教授, 主任中医师, 博士研究生导师, 从事中西医结合心血管病研究, Tel: 0516-83956001

inflammatory cell and necrotic lesions of myocardial tissue. At the same time, Compared with normal group, creatine kinase isoenzyme, troponin and myoglobin of model animals were increased significantly ($P < 0.05$), which showed the model was effective. Compared with model group, creatine kinase isoenzyme and troponin in ribavirin group, high dose group and middle dose group of Wushen Erlian granule were declined, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Spleen index and thymus index in ribavirin group, high dose group and middle dose group of Wushen Erlian granule were increased ($P < 0.05$). The test result of killing effect of NK showed ribavirin, high dose and middle dose of Wushen Erlian granule group compared with model group and normal group were significant different ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wushen Erlian granules can alleviate myocardial injury caused by CoxB₃ and stimulate immune regulation mechanism of the body, with has certain protective effect on myocardial cells.

[**Key words**] Wushen Erlian granules; viral myocarditis; immunomodulatory

病毒性心肌炎(VMC)是病毒感染使全身多系统受累,其中尤其以侵犯心脏为突出表现的一组临床综合征^[1]。现代医学研究认为,VMC有以下两种主要机制病毒直接作用和免疫反应^[2]。但是到目前为止,在临床方面国内外尚缺乏有效的治疗方案与药物。其治疗主要针对病毒感染和心肌炎症。而中医中药在诊治方面具有一定的优势^[3],因此积极从中医药方面探求治疗急性 VMC 新的理论和治疗方法具有重要的实际意义^[4]。

1 材料

1.1 动物、细胞及病毒 16~18 g 雄性 BALB/c 小鼠 60 只,4~8 周龄,购于山东大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(鲁)20090001。Hep-2 细胞、Yac-1 细胞由本实验室保存。柯萨奇 B3 型病毒(CoxB₃)由本实验室保存。

1.2 药物与试剂 五参二连颗粒(10 g/包)由徐州市中心医院提供(中华人民共和国国家知识产权局专利号 CN1273110A,苏药制字 Z04001452)。全方由人参 20 g,丹参 120 g,三七参 20 g,玄参 80 g,苦参 60 g,黄连 40 g,连翘 60 g,莲子 60 g,茯苓 100 g,酸枣仁 100 g,柏子仁 50 g,炙甘草 30 g,玉竹 30 g,陈皮 60 g,琥珀 20 g 共 15 味药组成,生药购于江苏省医药公司,在徐州市药品检验所进行质量检验,鉴定为合格饮片。制法:按照苏药制字 Z04001452 文件生产。质量控制:整粒后分装前进行质量检查,具体参考《中国药典》2010 年版附录颗粒剂部分。同时以 TCL 法鉴别处方中丹参,黄连,用 HPLC 方法测定水溶性丹参素,作为含量测定方法^[5]。利巴韦林颗粒(四川百利药业有限责任公司,批号 120702)。RPMI-1640 培养基(Gibco 产品)。胎牛血清(山东银香伟业生物工程有限公司,批号 090102)。小鼠心肌肌红蛋白、肌钙蛋白、肌酸激酶同工酶 ELISA 检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号分

别为 M06138796, Q17138797, R21138795)。

1.3 仪器 恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂),生物安全柜(济南鑫贝西公司),贺立氏台式低温离心机(德国贺立氏公司)-80℃冰箱(美国 FORMA 公司),-20℃冰箱(中国青岛得贝公司),显微镜(日本奥林巴斯公司),二氧化碳培养箱(日本三洋公司),超净工作台(苏州净化仪器厂),无菌 24 孔细胞培养板(嘉兴龙川生物科技有限公司),拜耳 1200 生化仪(德国拜耳公司),全自动荧光免疫分析仪(美国 VIDAS)。

2 方法

2.1 细胞培养及病毒扩增 ①细胞的复苏,常规方法复苏传代 Yac-1 细胞及 Hep-2 细胞。②病毒扩增,Hep-2 细胞长成 70% 单层时,接种 CoxB₃ 病毒 100 μL/瓶。待细胞病变达 90% 时,于 -40℃ 冻融 3 次,8 000 × g 离心 10 min,分装后留样测半数组织培养感染剂量(TCID₅₀),其余上清冻存于 -80℃ 冰箱备用。③滴定 TCID₅₀,将病毒液用 2% 小牛血清的培养液作连续 10 倍的稀释,从 10⁻¹~10⁻¹²,然后依次接种到长满单层 Hep-2 细胞的 96 孔微量培养板中,每一稀释度纵向重复 3 孔,每孔接种 100 μL。④平行设正常细胞对照,并逐日观察并记录结果,连续观察 4 d,计算 TCID₅₀。计算公式如下:距离比 = (高于 50% 的百分数 - 50%) / (高于 50% 的百分数 - 低于 50% 的百分数)。TCID₅₀ = Antilog [Log (大于 50% 的阳性百分比的最高稀释度) + 距离比例 × log 稀释度间距]。由以上公式计算得到 CoxB₃ TCID₅₀ 为 10^{-9.88}。

2.2 动物分组 将 60 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、阳性药物对照组(利巴韦林组)、五参二连颗粒高、中、低剂量组,每组 10 只,于 ABSL-2 实验室饲养。

2.3 VMC 造模与给药 雄性 BALB/c 小鼠,4~8

周龄,按文献^[6]建立动物模型,每只小鼠 ip 接种 10^2 TCID₅₀,CVB3 Nancy 标准株病毒液 $100 \mu\text{L}$ ^[7]。造模结束后,常规饮食。造模成功后,阳性药物利巴韦林组($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 10$)、五参二连颗粒高、中、低剂量组($20, 12, 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n = 10$)按照动物与人剂量换算分别 ig 给药。正常组(10 只 ip $100 \mu\text{L}$ 维持液含 2% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基)及模型组($n = 10$)ig 同体积的蒸馏水,每天 1 次,连续给药 5 d,在末次给药 2 h 后处死,进行相关检测。

2.4 标本采集及检测 在末次给药 2 h 后终止实验,称重,并根据检测要求做标本采集。①心肌酶指标检测,将动物在乙醚麻醉下眼动脉丛取血,自凝后 $4\ 000 \times g$ 离心 5 min,取上清液,进行 ELISA 检测,检测血清中小鼠心肌肌红蛋白、心肌肌钙蛋白、心肌肌酸激酶同工酶浓度。②脏器指数检测,于生物安全柜中解剖小鼠取心脏、脾脏、胸腺称重后用于计算各脏器指数。③NK 杀伤试验,正常对照组、模型组、试验药物组、利巴韦林组脾脏研磨后取淋巴细胞检测 NK 杀伤活性。

$$\text{脏器指数} = \frac{\text{脏器质量}}{\text{小鼠体重}} \times 100\%$$

$$\text{NK 细胞杀伤活性} = \frac{\text{反应孔吸光度 } A - \text{自然释放孔 } A}{\text{最大释放孔 } A - \text{自然释放孔 } A} \times 100\%$$

2.5 统计方法 所有数据采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 t 检验,组间比较采用方差分析。多组比较采用单因素方差分析或非参数检验,计数资料比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般表现 模型组小鼠第 2 天后开始精神萎靡,活动减少,毛粗糙,体温下降,体重从感染后第 2 天一般开始下降,随后持续下降;第 5 天后处死,心脏晦暗,纹理不清,心脏表面出现白色点状条索状病变。病理学 HE 染色,心肌组织有大量的炎性细胞

浸润,可广泛弥漫,也可呈局灶性,并可有坏死灶。模型组小鼠的肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白、肌红蛋白均有显著升高,与正常对照组比较 $P < 0.05$,具有显著性差异,表明造模成功。

3.2 心肌酶 模型组肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白、肌红蛋白均有显著升高,与正常对照组比较 $P < 0.05$,表明造模成功。利巴韦林组与模型组比较,肌酸激酶同工酶和肌钙蛋白均有显著下降($P < 0.05$),表明利巴韦林对于治疗小鼠实验性心肌炎有疗效。相对模型对照组,五参二连颗粒高、中剂量组的肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白均有下降,其中高、中剂量组与模型对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 五参二连颗粒对 VMC 小鼠心肌酶的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肌酸激酶 同工酶 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	肌钙蛋白 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	肌红蛋白 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	57 ± 18	14 ± 12	43 ± 3
模型	-	$635 \pm 267^{1)}$	$100 \pm 30^{1)}$	$50 \pm 3^{1)}$
五参二连	4	$340 \pm 131^{2)}$	$47 \pm 22^{2)}$	$47 \pm 4^{2)}$
	12	$384 \pm 160^{2)}$	$49 \pm 28^{2)}$	$41 \pm 4^{2)}$
	20	554 ± 236	68 ± 23	43 ± 6
利巴韦林	1	$127 \pm 28^{2)}$	$38 \pm 15^{2)}$	$47 \pm 5^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.3 小鼠脏器指数 模型组胸腺指数下降,且用药后利巴韦林组及五参二连颗粒低、中剂量组升高($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 NK 杀伤活性 五参二连颗粒高、中剂量组及利巴韦林组与正常组和模型对照组比较 $P < 0.05$,表明利巴韦林及五参二连颗粒高、中剂量组均能提高 NK 细胞杀伤能力。五参二连颗粒高、中剂量与利巴韦林组比较提高 NK 杀伤能力无显著性差异。见表 2。

表 2 五参二连颗粒对 VMC 小鼠脏器指数及 NK 杀伤活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	心脏指数/%	脾脏指数/%	胸腺指数/%	NK 杀伤活性/%
正常	-	0.59 ± 0.05	0.59 ± 0.10	0.61 ± 0.11	14.07 ± 4.14
模型	-	0.65 ± 0.11	0.56 ± 0.06	$0.28 \pm 0.08^{1)}$	14.37 ± 5.28
五参二连	4	0.69 ± 0.09	0.58 ± 0.12	$0.57 \pm 0.08^{2)}$	15.99 ± 3.98
	12	0.65 ± 0.08	$0.49 \pm 0.05^{2)}$	$0.46 \pm 0.10^{2)}$	$21.02 \pm 7.24^{2)}$
	20	0.71 ± 0.12	0.55 ± 0.07	0.29 ± 0.08	$21.90 \pm 7.06^{2)}$
利巴韦林	1	0.57 ± 0.06	0.58 ± 0.11	$0.60 \pm 0.11^{2)}$	$19.64 \pm 3.86^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

近年来 VMC 及病毒感染的有关心肌病的发病率有逐渐增高的趋势,且 VMC 自身具有极高的危害性,其严重威胁着人们的健康。给家庭和社会带来巨大经济压力和负担,因此,如何治疗及改善 VMC 病人的临床症状,已经成为很多医生研究的问题^[2]。

现代医学常用治疗药物:改善心肌代谢类药物,氧自由基清除剂。其他如卡托普利具有独特的分子结构,对 VMC 尤其是轻型病毒性心肌炎治疗有明显疗效。维生素 E 发挥保护心脏的作用也与其抗病毒作用和恢复心功能有关。有学者^[8]认为 γ -干扰素通过抑制病毒的复制,治疗病毒性引起的心肌炎有效。由于目前抗病毒药物的疗效不显著,所以学术界建议对病毒性心肌炎采用中西医结合疗法,提高机体免疫力,使机体能防御或减轻病毒导致的机体损害。大量研究表明多种中药对病毒性心肌炎有良好的治疗作用,对其作用机制的研究也比较全面,中成药已成为治疗病毒性心肌炎的重要药物^[9-11]。

本课题中五参二连颗粒是结合中医理论及现代医学设计出来,针对病毒性心肌炎专治的一个复方合剂。方中人参补气,玄参、玉竹滋阴生津养液,壮水之主以制阳光,使虚火无以扰神,为君药。黄连、连翘、苦参专入心经,除心中之烦,茯苓、酸枣仁、柏子仁、莲子心入心肝之经,养肝补血,宁心安神,丹参、三七、琥珀粉活血补血为臣药。陈皮健脾燥湿,调气疏肝,为佐药。炙甘草和中缓急,调和诸药,为使药。诸药合用,益气养阴,清热解毒。本研究从实验方面入手,研究五参二连颗粒的疗效及可能作用机制。

在本次实验中,建立 CoxB3 小鼠病毒性心肌炎模型,于接种病毒后第 0,1,2,3,4,5 天各组动物灌胃给药治疗并观察动物一般情况。连续给药 5 d、在末次给药 2 h 后终止实验,称重、并根据检测要求做标本采集。对所取标本进行心肌酶指标检测、脏器指数检测及 NK 杀伤实验。结果显示,模型动物(接种病毒造模)的肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白、肌红蛋白均有显著升高,与正常对照组比较 $P < 0.05$,具有显著性差异,表明造模成功。利巴韦林组,五参二连颗粒高、中剂量组的肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白均有下降,与模型对照组比较有显著性差异。用药后利巴韦林组及五参二连颗粒高、中剂量组见脾指数和

胸腺指数有升高迹象,表明受试药物具有明显调节体内免疫作用。NK 杀伤作用的检测结果表明利巴韦林及五参二连颗粒高中剂量均能提高 NK 细胞杀伤能力。综上所述,五参二连颗粒可以减轻 CoxB3 造成的心肌损伤,并激发机体的免疫调节机制,对心肌细胞有一定保护作用。

[参考文献]

- [1] Kuhl U, Schulthesis H P. Viral myocarditis: diagnosis, aetiology and management [J]. *Drugs*, 2009, 69 (10):1287.
- [2] Westerman D, Savvatis K, Schultheiss H P. Immunomodulation and matrix metalloproteinases in viral myocarditis. [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48 (3):468.
- [3] Zhang Z C, Yang Y Z, Li S J, et al. Effect of astragaloside on myocardial fibrosis in viral myocardial mice [J]. *New Drugs Clin Rem*, 2003, 18(5):10.
- [4] Liu Z L, Liu J P, Kwong J S. Herbal medicines for viral myocarditis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, 28(8):CD003711.
- [5] 黄玮,魏莉本.五参二连颗粒的质量标准[J].*中国药师*,2011,14(4):485.
- [6] Rose N R, Herskowitz A, Neumann D A. Autoimmunity in myocarditis: models and mechanisms [J]. *Clin Immunol Immunopathol*, 1993, 68(2):95.
- [7] 李岳春,任江华,曹茂银,等.制备小鼠病毒性心肌炎模型最适柯萨奇病毒 B₃ 浓度的实验研究[J].*浙江医学*,2007,29(11):1166.
- [8] Kallellis-Opara A, Dorner A, Poller W C. Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy [J]. *Clin Res Cardiol*, 2007, 96 (7):469.
- [9] 姚荣妹,郭姗姗,马会霞,等.抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊总皂苷体外抗 CVB₃ 及对细胞活性的观察 [J]. *中华中医药杂志*,2013,28(7):2104.
- [10] Yip A Y, Loo W T, Chow L W. Fructus schisandrae containing compound in modulating human lymphatic system- a phase I minimization clinical trial [J]. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61(9):588.
- [11] 包巨太,徐静,马会霞,等.抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方新制剂体外抗柯萨奇 B₃ 病毒作用[J].*中医杂志*,2013,54(11):953.

[责任编辑 聂淑琴]