

小柴胡汤君臣药及其配伍提取物 对感染 CVB_{3m} 心肌细胞的血清药理学研究

谢彬, 王雪峰*, 闫丽娟, 岳志军

(辽宁中医药大学附属医院儿科, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 探讨小柴胡汤(XCT)君臣药及其配伍提取物对感染 CVB_{3m} 心肌细胞的抗病毒与保护作用, 并试阐述机制。方法: 制取 3 种提取物的含药血清, 并测定体外对 CVB_{3m} 毒力的影响。培养鼠心肌细胞建立心肌炎模型, 从 3 个方面检测: 应用 MTT 法检测含药血清对心肌细胞的保护率; 检测各孔上清液中乳酸脱氢酶(LDH)及天冬氨酸氨基转移酶(AST)的释放量; RT-PCR 法检测感染 CVB_{3m} 的心肌细胞中 CVB_{3m} 的含量。结果: 黄芩提取物含药血清对 CVB_{3m} 有直接灭活的作用。3 个方面检测结果均显示: 含药血清组与空白血清组比较, 有显著性差异($P < 0.01$), 黄芩组和配伍组分别与柴胡组比较, 均有显著性差异($P < 0.01$), 配伍组与黄芩组比较, 无显著性差异。结论: 黄芩提取物有直接灭活病毒的作用, 黄芩和配伍提取物具有明显的抑制病毒复制和对病毒感染后细胞的保护作用, 等量配伍提取物没有表现出作用增强的优势。

[关键词] 病毒性心肌炎; 小柴胡汤; 配伍; 柯萨奇 B_{3m}

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0129-03

Serum Pharmacology of Xiaochaihutang Jun and Chen Herbs and Their Compatibility Extract on Myocardial Cells Infected CVB_{3m}

XIE Bin, WANG Xue-feng*, YAN Li-juan, YUE Zhi-jun

(Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore Xiaochai hutang(XCT's) jun and chen herbs and their compatibility extracts antivirus and the protective function by infected CVB_{3m} and to elaborate the therapeutic mechanism. **Method:** We prepared herb-contained serum of the extracts from *Bupleurum*, *Scutellaria* and their compatibility, and measured effects on virulence CVB_{3m} *in vitro*. We cultured the myocardial cells of suckling mice and established the viral myocarditis mAel. From three aspects tested: the protection rate of the myocardial cell after infected CVB_{3m} by MTT methA; the release of LDH and AST in the supernatant of each hole; and CVB_{3m} content of containing serum on myocardial cells infected CVB_{3m} by RT-PCR. **Result:** *Scutellaria* herb-contained serum might have affect on directly kill CVB_{3m} *in vitro*. Three results were: a significant difference though containing serum group compared with the blank serum($P < 0.01$); *Scutellaria* group and the compatibility group were compared with the *Bupleurum* group, there were significant differences($P < 0.01$); Compatibility group compared with the *Skullcap* group was no significant difference. **Conclusion:** *Scutellaria* extract might have affect on directly kill CVB_{3m} *in vitro*. *Scutellaria* and the compatibility extracts inhibited the virus replication and protected cells infected virus. Equivalent compatibility extract did not show the advantage of the enhanced role.

[Key words] viral myocarditis; Xiaochaihutang; compatibility; coxsackie B_{3m}

[收稿日期] 20101207(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371832)

[第一作者] 谢彬, 博士, 主治医师, 从事中医儿科学研究, Tel: 024-86291480, E-mail: xb_color@163.com

[通讯作者] * 王雪峰, 博士, 从事中西医结合儿科学研究, Tel: 024-86291175, E-mail: lnzywxf@163.com

柯萨奇病毒 B 组 (CVB) 是病毒性心肌炎 (VM) 的主要病原^[1]。目前认为病毒的直接作用及其引发的心肌组织的自身免疫损伤是 VM 的主要病理机制,国内外尚无疗效确切的治疗药物。以往研究表明小柴胡汤及其分解剂在体外具有保护细胞和直接灭活 CVB_{3m} 的作用,尤其是以柴胡、黄芩组成的分解 1 号的作用效果最好^[2],二者分别为 XCT 的君、臣药。作者旨在探讨君臣药及其配伍抗病毒和保护细胞的不同作用,为中药药效靶点和方剂配伍规律提供依据。

1 材料

1.1 药物 XCT 君臣药及其配伍提取物由辽宁中医药大学临床药理基地制备。

1.2 病毒 CVB_{3m} (Nancy 株) 由上海中山医院杨英珍教授惠赠。在 Hep-2 细胞上连传 3 代,测半数组织感染量 (TCID₅₀) 为 $10^{-5.43}$ 。

1.3 动物 SD 大鼠, (180 ± 20) g, 雌雄各半; SD 大鼠出生 3 ~ 5 d, 均购自辽宁中医药大学动物中心, 合格证号 辽实动字第 (2000) 042 号。

1.4 仪器及试剂 美国 Nuair-4950E 生物安全柜, 德国 LECIA 倒置荧光显微镜, 日本 SONY 三洋超低温冰箱, Bio-RAD 型酶标仪, 美国 Beckman DU-600 型蛋白核酸分析仪, 德国 HERAEUS 低温高速离心机, EPS 型电泳仪, GIS 型凝胶图像分析仪 (上海天能), 美国 PE-9600 PCR 仪。DMEM 培养液 (美国 Gibco 公司批号 NVG0295), 胎牛血清。MTT (美国华美试剂公司, 批号 M2128-250 mg); 胰蛋白酶 (联星生物 1:250, 批号 27250018-10 g); TRIZOL (invitrogen GIBCO 公司); RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司, 批号 BK2701)。CVB_{3m}, GAPDH 引物序列如下: GAPDH: 上游 5'-GACATCAAGAAGGTGGTGAAGC-3', 下游 5'-TGGAATTGTGA GGGAG ATGC-3' 扩增片段计 336bp; CVB_{3m} 上游 5'-GTGGAAGACGCGATAACA-3', 下游 5'-CATTGTAGTGATGCTTTG-3' 扩增片段计 828 bp。

2 方法

2.1 含药血清制备 SD 大鼠按随机表分成 4 组: 正常组、柴胡组、黄芩组、配伍组, 每组 6 只。正常组每日给予生理盐水灌胃, 其余 3 组分别以 0.15 g · mL⁻¹ 药物灌胃, 每日灌胃 2 次, 连续 3 d。于末次灌胃后 1 h 腹主动脉取血, 离心、灭活、过滤, 置 -70 °C 备用。

2.2 含药血清体外对 CVB_{3m} 毒力的影响 将各组血清与 200 TCID₅₀ 的 CVB_{3m} 病毒液等量混合, 同时正常细胞组以培养液稀释, 置 37 °C 2 h。测定各组的病毒滴度及 TCID₅₀, 计算。

抑制病毒指数 = |空白血清对照组 log TCID₅₀ - 含药血清组 log TCID₅₀|

2.3 含药血清对感染 CVB_{3m} 心肌细胞的保护作用

2.3.1 分组、造模及给药方法 依据文献^[3] 取出生 3 ~ 5 d 大白鼠, 在无菌条件下, 取心室肌剪成碎块, 移入内置磁力棒的离心管中, 加入 0.1% 胰蛋白酶溶液, 放于恒温震荡器中消化, 沉淀制成细胞悬液, 分装于 96 孔细胞培养板, 每孔中接种 2×10^4 / mL 200 μL。培养 24 h 后, 将各孔随机分成柴胡组、黄芩组、配伍组、空白血清组、正常细胞组, 建立体外 VM 模型^[4], 除正常细胞组外, 均加入 100 μL/孔含 100 TCID₅₀ CVB_{3m} 的维持液, 孵育 1 h 后弃上清, 再加正常或不同含药血清的维持液 200 μL/孔, 置于培养箱中培养。

2.3.2 MTT 法测定各组血清对心肌细胞的保护率

按上述方法培养 2 d。结束前 4 h 每孔加入 5 g · L⁻¹ MTT 10 μL, 结束后每孔加入 0.04 mmol · L⁻¹ 盐酸异丙醇溶液, 振荡 5 min, 570 nm 波长, 测定吸光度 (A), 计算。

药物保护率 = $(A_{\text{感染含药血清}} - A_{\text{空白血清对照}}) / (A_{\text{正常细胞对照}} - A_{\text{空白血清组}}) \times 100\%$

2.3.3 心肌酶的检测 感染 CVB_{3m} 后 5 d 在细胞培养液中吸取上清液, 做 LDH 及 AST 的检测。

2.3.4 RT-PCR 法检测含药血清对 CVB_{3m} 病毒复制的影响 感染 CVB_{3m} 心肌细胞培养 5 d 后, 按照试剂盒说明书操作, 以凝胶分析系统拍摄分析。

2.3.5 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件应用 T 检验进行统计分析, P < 0.05 具有显著性差异。

3 结果

3.1 各组血清对 CVB_{3m} 毒力的影响 含药血清在体外与病毒液作用后, 病毒滴度均下降, 但从抑制病毒指数来分析, 只有黄芩组 TD₀ 时抑病毒指数 > 2, 提示有明显的直接灭活病毒作用; 而柴胡组和配伍组的抑病毒指数均 < 2。

3.2 MTT 法测定各组血清对心肌细胞的保护率 3 组含药血清 A 均明显高于空白血清组, 分别与空白血清比较, 具有显著性差异 (P < 0.01)。黄芩组和配伍组 A 明显高于柴胡组, 并具有显著性差异 (P < 0.01),

而黄芩组与配伍组并无显著性差异,见表1。

表1 3组含药血清对心肌细胞的保护率($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·mL ⁻¹	保护率/%
柴胡	0.15	74.0 ± 5.1 ¹⁾
黄芩	0.15	90.7 ± 5.6 ¹⁾
配伍	0.15	85.3 ± 5.4 ¹⁾
空白血清	-	54.8 ± 6.4

注:与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.3 各组血清对细胞感染 CVB_{3m} 后培养液中心肌酶的影响 感染 CVB_{3m} 后第5天,空白血清组各孔细胞培养液心肌酶迅速上升,与空白血清组比较,具有显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$);黄芩组、配伍组与柴胡组比较,具有显著性差异 ($P < 0.01$),而黄芩组与配伍组比较,无显著性差异,见表2。

表2 含药血清对心肌细胞感染 CVB_{3m} 后培养液中 LDH, AST 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·mL ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
柴胡	0.15	57.0 ± 5.9 ¹⁾	127.3 ± 9.5 ¹⁾
黄芩	0.15	34.7 ± 5.8 ¹⁾	88.0 ± 9.8 ¹⁾
配伍	0.15	40.3 ± 6.3 ¹⁾	98.7 ± 9.5 ¹⁾
空白血清	-	78.4 ± 9.1 ¹⁾	153.7 ± 8.5 ¹⁾
正常细胞	-	25.1 ± 8.8	65.0 ± 7.8

3.4 RT-PCR 法检测含药血清对 CVB_{3m} 病毒复制的影响 正常细胞组未检测到 CVB_{3m} 病毒 RNA, 而含药血清组均显著低于空白血清组,提示含药血清组均有抑制病毒复制作用,黄芩组和配伍组的 CVB_{3m} 含量明显低于柴胡组 ($P < 0.01$),而配伍组与黄芩组比较,无显著性差异,见图1。

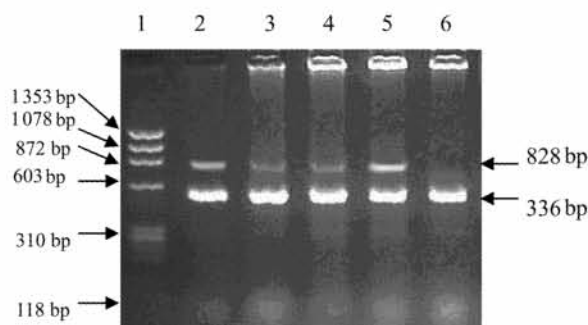


图1 心肌细胞中感染 CVB_{3m} RNA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

1. Maker; 2. 柴胡组; 3. 黄芩组;
4. 配伍组; 5. 空白血清组; 6. 正常细胞组

4 讨论

VM 可属中医学“心悸”、“怔忡”等范畴,病因病

机早在《内经》中就有记载。XCT 源于《伤寒论》,柴胡味苦性平,透泄与清解少阳郁热为君药;黄芩味苦性寒,清泄少阳邪热为臣药。二者配伍,一疏半表之邪,一清半里之热,使枢机和畅。文献[5]记载柴胡配黄芩“和解少阳。行手足少阳,以黄芩为佐”。在《伤寒论》96条中的XCT中,立和解少阳为法。单以柴胡或黄芩无法具备该功效。

本实验观察了XCT君臣药及其配伍提取物含药血清对感染 CVB_{3m} 心肌细胞的保护作用,并试阐明机制。采用现代工艺的提取方法制备了柴胡、黄芩及其等量配伍提取物,成功地培养了大白鼠的心肌细胞,细胞形态变化及搏动规律基本与文献的观察结果相符^[6]。在心肌细胞培养中, CVB_{3m} 引起的心肌损伤主要表现为细胞减少、团缩、破碎等, LDH、AST 释放量增加。含药血清能够显著减少感染 CVB_{3m} 后心肌细胞 LDH、AST 的释放,抑制细胞中 CVB_{3m} RNA 的复制,从而减轻病毒对心肌细胞的直接损伤,表明XCT君臣药及其配伍提取物在体内外均具有抑制病毒复制和细胞保护作用,这可能是治疗 VM 的机制之一。

本实验初步发现, XCT 中的君臣药具有不同的作用,柴胡能保护心肌细胞而未发现抑制病毒增殖作用;黄芩和配伍既能抑制病毒增殖,又能改善心肌损伤;而等量配伍没表现出作用增强的优势。为了进一步研究药物疗效,我们将进行君臣药的其他配伍比例研究,以探求抗病毒与保护细胞的作用的最佳配伍比例。

[参考文献]

- [1] Huber S A, Lodge P A. Coxsackievirus B-3 myocarditis in Balb/C mice evidence for autoimmunity to myocyte antigens[J]. Am J Pathol, 1984, 116(1): 21.
- [2] 王雪峰, 刘芳, 王永梅, 等. 小柴胡汤分解剂抑制 CVB_{3m} 作用及对细胞活性影响[J]. 中华临床与实验病毒学杂志, 2001, 15(13): 280.
- [3] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 622.
- [4] 杨英珍. 病毒性心肌病[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 350.
- [5] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 785.
- [6] Goshima K, Masuda A, Matsui Y, et al. Beating of multinucleated giant myocardial cells in culture[J]. Exp Cell Res, 1979, 120(2): 285.

[责任编辑 邹晓翠]