

参白注射液对病毒性心肌炎模型大鼠 α -MHC 基因表达的影响

张明雪¹ 傅松滨² 曹洪欣³

摘要 目的:探讨参白注射液调节病毒性心肌炎心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 基因表达的作用机制。方法:无菌分离、切取新生 1~3 天 Wistar 大鼠的心室肌,制备和培养心肌细胞,建立病毒性心肌炎(VMC)感染模型——体外培养大鼠心肌细胞感染柯萨奇 B3(CVB3)病毒,通过免疫组化实验,检测参白注射液对 α -MHC 基因表达的影响。结果:正常组 α -MHC 基因表达可见明显阳性信号,病毒感染组蛋白阳性信号表达减少,病毒感染加参白注射液组能明显上调 α -MHC 基因的表达含量。结论:参白注射液通过减轻自身免疫损伤,使具有 ATP 酶活性的 MHC 表型发生变化的几率减少,从而上调 α -MHC 的表达,进而增强心肌收缩力。

主题词 心肌炎/遗传学 心肌炎/中医药疗法 @ 参白注射液

Effect of Shenbai Injectio on Gene Expression of α -MHC in Viral Myocarditis Model Rats

Zhang Mingxue¹, Fu Songbin², Cao Hongxin³

(1. Affiliated Hospital of Liaoning TCM College, Shenyang 110032; 2. Harbin Medical University; 3. China Academy of TCM)

Objective: To study on mechanisms of Shenbai Injectio in regulating myocardial myosin heavy chain(α -MHC)gene expression in viral myocarditis. **Methods:** The ventricular muscle of nascent Wistar rats aged 1-3 days was separated and taken aseptically for preparation and culture of myocadial cells to establish viral myocarditis infection model——in vitro cultured myocardial cells of the rat infected Cocksackie virus B3(CVB3). And the effect of Shenbai Injection on α -MHC gene expression was detected with immunohistochemical methods. **Results:** The obvious positive sign of α -MHC gene expression could be seen in the normal group, and it decreased in the virus infection group, and it was significantly up-regulated in the virus infection plus Shenbai Injectio group. **Conclusion:** Shenbai injectio can relieve autoimmune injury to reduce the probability of changes of MHC phenotype with ATPase activity, so as to up-regulate expression of α -MHC and strength myocardial contractility.

Key Words Myocarditis/genetics Myocarditis/TCM therapy @ Shenbai Injectio

心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 用来观测病毒损伤时心肌细胞收缩蛋白的表达水平。有研究结果显示,心肌细胞收缩能量来源于水解肌凝蛋白(myosin)的 ATP 酶活性,柯萨奇 B3(CVB3)病毒感染,可增加细胞膜能量的消耗,减少细胞内水解肌凝蛋白的 ATP 酶活性,心肌细胞收缩速度将随着 ATP 酶活性的降低而减慢。而肌凝蛋白的 ATP 酶活性改变的机制,可能与肌凝蛋白重链发生改变有关。心肌细胞的肌凝蛋白重链由 α -MHC、 β -MHC 组成,在正常情况下,肌凝蛋白的重链主要是由 α -MHC 组成,在心肌细胞产生收缩力方面, α -MHC 为主的水解肌凝蛋白作用远比 β -MHC 为主的水解肌凝蛋白强^[1]。有研究结果显示,当病毒感染心肌细胞和心肌细胞受到免疫损伤时,其收缩蛋白分子基因的表达发生了改变,在 MHC 方面由 α -MHC 表达为主转变成以 β -MHC 表达为主,即肌凝蛋白的重链 α -MHC 水平降低,而 β -MHC 水平升高,使得翻

译出的 β -MHC 蛋白的 ATP 酶活性明显较 α -MHC 蛋白的 ATP 酶活性低,水解 ATP 释放能量少,使得肌小节收缩减慢,即收缩力下降,因此表现出心肌细胞收缩力下降^[2]。

本研究观察了参白注射液对病毒性心肌炎(VMC)感染模型——体外培养大鼠肌细胞感染 CVB3 病毒心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 表达的影响,通过分析其表达水平,旨在探讨参白注射液的作用机制,为临床治疗 VMC 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物:新生 1~3 天 Wistar 清洁级大鼠(哈尔滨医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK20020002;饲养环境:室温(24±2)℃;相对湿度:(50±10)%,雌雄共用。

1.2 药物:参白注射液含黄芪、人参、麦冬、甘草、白茅根等药物。由黑龙江中医药大学药学院提取,黑龙江中医药大学附属医院药厂制备。

参白注射液制备及工艺流程:取饮片 2250g 加水煎煮 3 次,第 1 次加 10 倍量水,煎煮 1 小时;第 2 次加 8 倍量水,煎煮 1 小时;第 3 次加 8 倍量水,煎煮 1 小时;合并煎液,滤过,滤液浓缩至 2250ml,加乙醇使含

基金项目:国家自然科学基金课题(30070940)

1 辽宁中医学院附属医院中医内科教研室,辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号(110032)

2 哈尔滨医科大学

3 中国中医研究院

收稿日期:2004-10-25;修回日期:2004-11-30

乙醇量达 80%，NaOH 调 pH 值为 8.0，静置 72 小时，滤过，55℃减压回收乙醇至无醇味的浸膏，用蒸馏水稀释至 2250ml，搅拌均匀，静置 12 小时，吸取上清液，加 5g 活性炭，搅匀，100℃加热 30 分钟，放冷至室温，4℃冷藏 24 小时，滤过。

1.3 试剂：心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 购自 Santa cruz 公司。

1.4 仪器：倒置相差显微镜 (Olympus)，5%CO₂ 孵箱 (Sanyo)，Beckman 微型高速冷冻离心机 (Beckman)，电子显微镜 (日本 JEOL 公司)，振荡培养箱 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)，水浴振荡器 (哈尔滨市东联电子技术开发有限公司)，隔水式电热恒温培养箱 (上海市跃进医疗器械一厂)。

1.5 病毒：CVB3 毒株由哈尔滨医科大学微生物教研室钟照华教授惠赠。

2 方法

2.1 心肌细胞的制备和培养^[3-5]：切取大鼠心室肌，Hank 液反复冲洗 3 遍，去除心内残留血液，将其剪为 1~2mm³ 碎块，用 0.25%胰蛋白酶消化溶液在 37℃水浴箱中震荡消化 50~60 分钟，待组织自然沉降后，加上适量 10%胎牛血清中止消化，1000r/min 离心 10 分钟，吸去上清液，加入 10%胎牛血清将细胞沉淀混匀，制成 $(1\sim3)\times10^6/\text{mm}^3$ 的细胞悬液，分装于 4 个 24 孔培养板中 (孔内放 25mm 圆形盖玻片)，于 CO₂ 培养箱中孵育。将细胞分为 3 组。1 组为正常组；2 组为病毒感染组；3 组为病毒感染加参白注射液组。

2.2 细胞感染模型的建立^[6-7]：培养 72 小时后，在已呈规律同步搏动的 2、3 组各孔细胞中，分别加入含 CVB3 的 1640 生长液 1ml，吸附 1.5 小时后，1、2 组分别加入 10%胎牛血清 1ml；3 组加以 1:16 的 10%胎牛血清稀释的参白注射液 1ml，继续培养 24 小时后，吸出各培养孔中的液体，用 Hank 液冲洗各组玻片，再用 1%中性甲醛固定，晾干，留做免疫组化实验。

2.3 免疫组化检测样本制备：用 3%H₂O₂ 孵育长有细胞的玻片 5~10 分钟，消除内源性过氧化氢酶活性。然后蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟。滴加正常山羊血清工作液，室温孵育 10~15 分钟，倾去，勿洗。再滴加 1:100 比例稀释的一抗，4℃过夜。再用 PBS 冲洗，5 分钟重复 3 次。滴加生物素化二抗工作液，室温或 37℃孵育 10~15 分钟。再用 PBS 冲洗，5 分钟重复 3 次。滴加辣根酶标记链霉素卵白素工作液，室温或 37℃孵育 10~15 分钟。再用 PBS 冲洗，5 分钟重复 3 次。DAB 显色。自来水冲洗，苏木素复染，树脂封片。光镜下观察结果。

2.4 统计学方法：运用计算机软件彩色病理图像分析系统，随机选取 10 个视野，通过灰度调节区分视野内阳性信号面积，然后计算阳性目标总面积与统计场总面积比值，取平均值采用 *t* 检验进行统计学处理。

3 结果

3.1 判定标准：大部分胞浆呈弥漫性棕褐色者为强阳性表达 (+++)；部分胞浆着色程度减弱，呈淡棕黄色为弱阳性表达 (+)；着色程度及面积介于两者之间的为阳性表达 (++)；散在极少量的细胞着色且颜色浅淡者为阴性表达 (-)，着色程度及面积介于弱阳性 (+) 及阴性 (-) 之间为极弱阳性表达 (±)。

3.2 免疫组化检测结果：附表示，正常组心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 阳性信号表达多，被染成棕褐色，细胞形态正常。病毒感染组呈极弱阳性表达 (±)，形态异常，核固缩偏于一侧，细胞变形，且蛋白含量显著下降，与正常组相比差异具有显著性 ($P<0.01$)。表明 CVB3 病毒攻击造模导致大鼠心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 表达受到抑制。经中药治疗后，造模损伤所致心肌肌凝蛋白重链 α -MHC 的低表达有所提高，呈 (++)~(+++) 表达，与病毒感染组比较，差异具有显著性 ($P<0.01$)，提示益气养阴法能上调被 CVB3 病毒攻击的心肌细胞肌凝蛋白重链 α -MHC 的表达。

附表 免疫组化检测肌凝蛋白重链 α -MHC 基因表达结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	视野数	α -MHC
正常组	10	0.109±0.018
病毒感染组	10	0.0624±0.013*
病毒感染加参白注射液组	10	0.083±0.009 [△]

与正常组比较，* $P<0.01$ ；与病毒感染组比较， $\Delta P<0.01$

4 讨论

病毒性心肌炎的发生多由于素体虚弱，感受温热或湿热之邪，伤及中、上二焦，而出现脾胃运化失常和邪袭肺卫的病理改变。急性期患者，多以感受温热之邪为主，温热之邪易耗气伤津，对机体气阴的损害较重，易致气阴两虚，形成了本病发生的主要病理基础。参白注射液的组成，体现了“方从法出，法随证(病)立”，扶助正气、培本益阴是治疗本病的关键，故本方以黄芪、人参为主药，黄芪，味甘微温，入脾肺经，重用补脾胃而建立中气，护卫固表；配以麦冬，甘微苦微寒质润，生津以养阴，养阴以治心阳之热，且可补助心气，与人参相用，使气从津生，阴从阳化。正如《本草汇言》曰：“麦冬，清心润肺之药也，主心气不足，惊悸怔忡。”现代药理研究表明，麦冬能增加心脏冠脉流量，增强心肌收缩力，调节机体免疫功能；白茅根清泄湿热，利尿，导湿热从小便而出，利尿强心，调整心律。诸药合用共收益气养

阴、清热利湿之功。

肌小节是心肌收缩的基本单位,主要由粗、细肌丝两部分组成。粗肌丝主要为肌凝蛋白(myosin)和肌凝蛋白结合蛋白C(MyBPC),前者包括两条肌凝蛋白重链(MHC,相对分子质量230000)和两对轻链——必需/碱性轻链(MELC,MLC-1;相对分子质量20000)及调节磷酸化轻链(MRLC,MCL-2;相对分子质量270000)。细肌丝包括肌动蛋白(actin)、 α -原肌凝蛋白(α -Tm)和肌钙蛋白复合体(TnT,TnC,TnI)^[8]。肌凝蛋白的作用是将ATP释放的化学能转化为机械做功,引起肌肉收缩。它们分布在心肌与骨骼肌内,通过调节钙流变化CK和CK-MB,其诊断特异性不如肌钙蛋白,临床价值较小。

除了作为生化指标外,用放射性核素In标记单克隆抗肌凝蛋白抗体显像也可发现心肌炎时心肌损伤坏死情况,并能定位。该方法与病理检查相对照,其敏感性较高,但心肌病、心肌梗死等显像也可呈阳性^[9]。

本实验中观察到正常组心肌肌凝蛋白重链 α -MHC阳性信号表达多,被染成棕褐色,细胞形态正常;病毒感染组呈极弱阳性表达(±),形态异常,核固缩偏于一侧,细胞变形,且蛋白含量显著下降,说明CVB3病毒攻击造模所致的大鼠心肌细胞肌凝蛋白重

链 α -MHC表达受到抑制。造模损伤所致的心肌肌凝蛋白重链 α -MHC低表达,经中药治疗后有所提高,提示参白注射液能上调CVB3病毒攻击的心肌细胞肌凝蛋白重链 α -MHC的表达。其可能的机制是参白注射液通过减轻自身免疫损伤,使具有ATP酶活性的MHC表型发生变化的几率减少,从而能上调心肌肌凝蛋白重链 α -MHC的表达,增强心肌收缩力。

参考文献

- 1 万朝敏,彭文珍,高云钦,等.柯萨奇B3病毒对小鼠离体心肌细胞力学和收缩蛋白分子的影响.中华儿科杂志,1998,36(9):531~533.
- 2 万朝敏,邓建军,王正荣,等.病毒性心肌炎细胞模型的建立以及细胞力学的特性.生物物理学报,2000,16(2):352~357.
- 3 宋智钢,刘维永.成熟心肌细胞培养技术及其应用进展.临床心血管病杂志,2001,17(8):383~384.
- 4 段海峰,钱令嘉.心肌细胞分裂和增殖的研究进展.细胞生物学杂志,2001,23(3):155~158.
- 5 孙红.体外培养心肌细胞的纯化方法及其应用.细胞生物学杂志,1988,10(2):85~87.
- 6 朱理安,关瑞锦,胡锡袁,病毒性心肌炎细胞感染模型的建立.福建医科大学学报,2000,34(3):224~227.
- 7 程志清,刘强.用血清药理学方法观察清心饮对培养大鼠心肌细胞感染柯萨奇B3病毒的影响.中医杂志,1999,40(1):47~49.
- 8 邹玉宝,宋雷,王继征.家族性肥厚型心肌病的分子遗传学研究进展.中国分子心脏病学杂志,2001,71(1):11~18.
- 9 杨英珍主编.病毒性心脏病.上海:上海科学技术出版社,2001:27~42,63~64,76~77.

全国第七届中医治则治法暨 肝胆病中医治疗学术研讨会通知

由中国中医研究院基础理论研究所和《中国中医基础医学杂志》共同主办的“全国第七届中医治则治法暨肝胆病中医治疗学术研讨会”定于2005年10月中旬在贵州省贵阳市召开。到会者可获继续教育学分11分。

1. 征文内容:中医治则治法的现代研究进展;中医治疗肝胆病的指导思想、治则与治法研究、新理论、新进展研究;肝胆病的中医古代文献研究、临证经验与心得、中医药现代实验研究;治疗肝胆病的中药合理应用与不良反应研究、中药药理和毒理研究、中药化学与中药制剂研究;肝胆病的中医食疗与养生康复研究、新药介绍和保肝食品的研究进展;与肝胆病相关的胃、肠、胰、肾疾患的中医药研究。2. 相关费用:(1)参会并发表论著者会议费650元;(2)仅发表论著者,交版面费300元;(3)仅参会不发表论著者,交会议费500元;(4)审稿费:30元。征文要求:论文2500字左右并附500字摘要,用Word格式打印,软盘随打印稿一起寄出,也可电子邮件寄至:xiaojin0808@sina.com。请写明单位、作者姓名及邮编。已在全国性学术会议上交流或已在刊物上公开发表的论文不再受理。会议采用的论文将收集在会议论文集,并推荐在《中国中医基础医学杂志》优先发表。

截稿日期:2005年8月30日。论文与相关费用请寄:北京市东直门内南小街16号,中国中医研究院基础理论研究所 金香兰收,邮编:100700。联系电话:010-64014411转2542。传真:010-64013896。联系人:金香兰、王左原、李海玉。

中华中医药学会外科学术年会 暨换届改选工作会议通知

中华中医药学会外科分会拟于2005年10月在江苏省南京市召开“中华中医药学会外科学术年会暨换届改选工作会议”。届时将特邀全国名老中医外科专家作专题讲座,并选举产生第三届外科分会委员会。参会代表将授予继续教育I类学分6分。征文如下:

1. 征文内容:中医外科面临的机遇、挑战和对策;外科疾病中医、中西医结合研究的发展方向、思路与方法探讨;中医外科临床经验总结和实验研究;中医外科常见病种的诊断、治疗和操作规范;中医外科理论与文献研究的进展;外科疾病辨证论治规律及中药作用机理的研究;中医外科有效方药及新药的研究;名老中医、

民族及特色疗法等经验总结;外科疾病的中医临床护理;中医外科专科建设经验总结;中医外科临床教学、研究生培养的经验与体会。2. 征文要求:论文资料务求真实可靠,并加盖单位公章;2. 字迹清楚,标点规范,引文准确,简明扼要,以2000字左右为宜,邮寄论文应附软盘,最好以电子邮件发送。来稿经评审合格者编入论文专辑,参会代表颁发论文证书。评选出的优秀论文将推荐《中华中西医临床杂志》发表。

征文请于2005年8月30日前寄至北京东城区海运仓5号北京中医药大学东直门医院裴晓华或李曰庆收。邮编:100700,电话:010-84013207或010-84013175。电子邮件:pxh@vip.sina.com或liyueqing46@sina.com

《黄帝内经》纪录片征订启事

《黄帝内经》是一部全面记录中华民族生息繁衍、医学发展的经典巨著。《黄帝内经》纪录片以故事化的方式,全面系统地介绍了《黄帝内经》的全部内容。医史篇8张碟160元;医理篇11张碟198元;养生篇11张碟198元。内容丰富、生动、形象,它记录了中国历史上与养生有关的孔子、孙思邈、陶弘景等名家名医;记录了针灸、推拿、艾灸等诊疗技术;记录了祖国各地的风土民情和水、酒、茶、饮食、起居与人体健康的历史故事。

电话:(010)64014411-3041,13911381299,联系人:浦战兵,地址:北京市东城区东直门内南小街16号中医杂志社海林音像书店,邮编:100700

《中医杂志》邮购启事

《中医杂志》现有如下各期,欢迎邮购。1996年6、7、10、11期,每期3.50元;1997年2~6、8~12期,每期3.50元;1998年3~11期,每期1.00元;1999年3~12期,每期4.00元;2000年2~12期,每期5.80元;2001年2~12期,每期6.50元;2002年1~12期,每期6.80元;2003年1~12期,每期6.80元;2004年1、2、4~12期,每期6.80元。1998、1999年合订本每本85元,2000年合订本每本85元,2001年合订本每本95元,2002年、2003年合订本每本105元,2004年合订本每本115元。以上杂志均免费邮寄,如欲挂号邮寄,请每件另加3元挂号费。欲购者请通过邮局汇款至北京市东直门内南小街16号中医杂志社邮购部,邮编:100700,请在汇款附言中注明购买何年、何期、数量及电话。联系电话:(010)64014411-3042或3036