

抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方新制剂 对病毒性心肌炎小鼠血清 TNF- α , IL-6 的影响

马会霞^{1,2}, 徐静¹, 李洁¹, 姚荣妹¹, 陈超逸¹, 包巨太^{1*}
(1. 河北联合大学, 河北 唐山 063000; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

〔摘要〕 目的:探讨抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方新制剂(K-CoxB-JN)对病毒性心肌炎小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)的影响及其机制。方法:用 CVB3 感染 Balb/c 小鼠造成病毒性心肌炎模型,随机分为 5 组:K-CoxB-JN 复方新制剂低、中、高剂量组(0.2, 0.4, 0.8 g·kg⁻¹),利巴韦林组(0.075 g·kg⁻¹),模型组,并设正常组,鼠腹腔接种病毒 2 h 后开始灌胃,连续灌胃 14 d。观察小鼠一般状态、记录死亡数,计算小鼠生存率;取血测定血清 TNF- α , IL-6 水平;取心脏,计算心脏指数,HE 染色,计算病理积分。结果:与正常组比较,模型组小鼠血清 TNF- α , IL-6 水平、心脏指数、心脏病理积分均升高($P < 0.05$),生存率降低($P < 0.05$);与模型组比较, K-CoxB-JN 各组小鼠心脏指数, TNF- α , IL-6 水平、心脏病理积分均降低($P < 0.05$),生存率升高($P < 0.05$)。结论:调节 TNF- α , IL-6 水平可能是 K-CoxB-JN 治疗病毒性心肌炎作用机制之一。

〔关键词〕 K-CoxB-JN 复方新制剂; 病毒性心肌炎; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-6
〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903 (2014) 05-0137-04
〔doi〕 10.11653/syfy2014050137
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1415.013.html>
〔网络出版时间〕 2013-12-18 14:15

Effect of New Formulation of K-CoxB-JN Compound on TNF- α and IL-6 in Mice with Coxsackie B3 Viral Myocarditis

MA Hui-xia^{1,2}, XU Jing¹, LI Jie¹, YAO Rong-mei¹, CHEN Chao-yi¹, BAO Ju-tai^{1*}
(1. Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To investigate the effect and its mechanisms of the new formulation of K-CoxB-JN compound on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukine (IL)-6 in mice with coxsackie B3 viral myocarditis. **Method:** The mice were injected with CVB3 to establish the experimental model of viral myocarditis, then randomly divided into 5 groups: The new formulation of K-CoxB-JN compound low, middle, high dose group (0.2, 0.4, 0.8 g·kg⁻¹), ribavirin group (0.075 g·kg⁻¹), the model group. and set up the normal group, two houres later mice were gavaged for 14 days. The general state of the mice were observed, deaths were recorded and calculated the survival rate of mice; the content of TNF- α , IL-6 were tested. Took heart and calculated the cardiac index, HE staining, calculated the pathological integral. **Result:** Compared with the normal group, the model group mice cardiac index, TNF- α and IL-6 level, the pathological integral were increased ($P < 0.05$), the survival rate were decreased ($P < 0.05$), Compared with the model group, the new formulation of K-CoxB-JN compound group mice cardiac index, TNF- α and IL-6 level, the pathological integral were decreased ($P < 0.05$), the survival rate were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Regulation of TNF- α , IL-6 level may be one of the

〔收稿日期〕 20130926(012)
〔基金项目〕 国家科技重大专项“重大新药创制”课题(2009ZX09103-442);河北省科技厅项目(101Z6426P);河北省中医药管理局项目
〔第一作者〕 马会霞,博士,副教授,从事中医药研究,Tel:0315-3725094,E-mail:mahuixia107@163.com
〔通讯作者〕 * 包巨太,教授,主任医师,硕士生导师,从事中医药防治心脏病研究,Tel:0315-3725030,E-mail:baojutai@sohu.com

mechanisms of the new formulation of K-CoxB-JN compound in the treatment of viral myocarditis.

[**Key words**] the new formulation of K-CoxB-JN compound; viral myocarditis; TNF- α ; IL-6

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是由于病毒侵犯心脏引起的以心脏炎性病变为主要表现的疾病,近年该发病率呈上升趋势,病毒侵入是诱发 VMC 的一个主要原因,其中以柯萨奇病毒 B 组病毒最为重要。病毒引起心肌细胞病理改变及机制的探讨一直是该领域的研究热点,对其发病机制目前的认识主要存在两个方面:一是病毒复制对心肌组织的直接损伤;二是病毒感染由此引起的自身免疫反应损害心肌^[1]。抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方新制剂(K-CoxB-JN)是我课题组研制的一种针对柯萨奇 B3 病毒(CVB3)的中药制剂,前期进行了大量的体内外实验研究,证明 K-CoxB-JN 对 VMC 的治疗具有较好的疗效^[2-4],但该药的作用机制目前还不清楚。本实验通过观察 K-CoxB-JN 对病毒性心肌炎小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)水平的影响,探讨其治疗病毒性心肌炎可能的作用机制。

1 材料

1.1 病毒和细胞 柯萨奇 B3 型(CVB3), Nancy 株,引自中国中医科学院中药研究所 ABSL-2 生物安全实验室,病毒经 Hep-2 细胞传代、增殖、活化、冻融 3 次并测得其半数组织感染率(TCID₅₀)为 10^{-7.5}。

1.2 药物 K-CoxB-JN 由西洋参、黄芪、丹皮、麦冬、北五味子、莱菔子、王不留行按 30:30:20:15:15:6:4 组成,由承德颈复康药业有限公司负责中试后提供,每粒含 0.4 g,相当生药量 4 g;利巴韦林(四川百利药业有限责任公司,国药准字 H51023508)。

1.3 动物 BALB/c 雄性小鼠,体重(18~20) g 193 只,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2009-0004。

1.4 仪器 生物安全柜(Thermo, scientific);高压灭菌器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);DK-600B 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);半自动生化分析仪(Rayto, RT-9000);MP200A 型电子天平(上海第二天平仪器厂)。

1.5 试剂 TNF- α 试剂盒, IL-6 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号)。

2 方法

2.1 病毒性心肌炎小鼠模型的制备 BALB/c 小

鼠 78 只适应性喂养 7 d,随机分为 6 组,每组 13 只。随机取出 1 组做为空白对照,ip 生理盐水 0.2 mL/只,其余 5 组分别 ip 密度为 1 $\times$ 10⁻⁶, 1 $\times$ 10⁻⁷, 1 $\times$ 10⁻⁸, 1 $\times$ 10⁻⁹, 1 $\times$ 10⁻¹⁰/mL 的 CVB3 病毒液 0.2 mL/只,观察小鼠一般状态,记录 14 d 死亡数,按 Reed-Muench 法计算半数致死量(LD₅₀)为 1 $\times$ 10^{-6.46}。第 14 天处死小鼠,取心脏置于多聚甲醛中固定脱水,石蜡包埋切片,HE 染色,普通光学显微镜下观察,发现病毒感染后心肌组织有炎细胞浸润,并可见散在点状坏死,说明模型制备成功。

2.2 模型的建立与分组 115 只 BALB/c 小鼠适应性喂养 7 d,随机抽取 10 只作为正常对照组,ip 生理盐水 0.2 mL/只,其余小鼠 ip 密度为 1 $\times$ 10⁻⁶ 的 CVB₃ 病毒 0.2 mL/只,之后随机分 5 组,每组 21 只,即模型组、K-CoxB-JN 低、中、高剂量组,利巴韦林组。

2.3 给药方法 小鼠 ip 接种病毒 2 h 后开始 ig 给药, K-CoxB-JN 低、中、高剂量(0.2, 0.4, 0.8 g $\cdot$ kg⁻¹, 按生药折算相当临床用量 0.5, 1, 2 倍),利巴韦林(0.075 g $\cdot$ kg⁻¹),每组给予相应的容积为 20 mL $\cdot$ kg⁻¹ 的药物,模型对照组和正常对照组给予容积为 20 mL $\cdot$ kg⁻¹ 的水,各组均每日给药 1 次,连续 14 d。

2.4 检测指标

2.4.1 小鼠一般情况 每天观察小鼠精神状态、摄食、皮毛及活动情况等,记录各组小鼠死亡数,计算存活率。

2.4.2 心脏指数 实验第 14 天小鼠称重、标号,将小鼠取血后迅速开胸取出心脏,用滤纸吸干表面血液后称重,称重并计算心脏指数(心重/体重)。

2.4.3 血清 TNF- α , IL-6 水平 病毒感染第 14 天,小鼠摘眼球取血,于 4 $^{\circ}$ C, 3 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,取上清,ELISA 法分别检测血清中 TNF- α , IL-6 水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.4.4 心肌组织病理学观察 心脏称重后取部分心肌组织放入 10% 甲醛中固定,送病理科,石蜡包埋、切片、HE 染色,置光学显微镜下观察心肌组织病理变化。计算病理积分,无病变计 0 分,病变面积 <25% 计 1 分,病变面积 25%~50% 计 2 分,病变面积 50%~75% 计 3 分,病变面积 >75% 计 4 分^[5]。

2.5 统计学处理 实验数据经 Excel 表建库整理

后,用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 正常对照组小鼠活动、摄食等一般状况良好,皮毛光滑;模型组出现活动减少,摄食下降,皮毛无光泽,蜷缩等症状,其余给药组状态稍好,但与模型组无明显差异性,说明 CVB₃ 感染小鼠成功。

3.2 对小鼠存活率和心脏指数的影响 各给药组小鼠的存活率明显高于模型组,其中正常组的存活率最高,中剂量组次之;与正常组比较,模型组心脏指数明显增加;各给药组与模型组相比,心脏指数均有显著降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 K-Cox B-JN 对病毒性心肌炎小鼠存活率和心脏指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	存活率 /%	心脏指数 /g·kg ⁻¹
正常	-	100	4.086 ± 0.080 ²⁾
模型	-	42.85	5.169 ± 0.187 ¹⁾
K-CoxB-JN	0.2	52.38	4.685 ± 0.086 ^{1,2)}
	0.4	76.19	4.507 ± 0.104 ^{1,2)}
	0.8	57.14	4.821 ± 0.104 ^{1,2)}
利巴韦林	0.075	66.67	4.569 ± 0.081 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.3 对小鼠血清 TNF- α ,IL-6 水平的影响 给药 14 d 模型组小鼠血清中 TNF- α ,IL-6 水平明显高于正常对照组 $P < 0.05$,各给药组高于正常组 $P < 0.05$,低于模型组 $P < 0.05$,各给药组均能降低小鼠血清 TNF- α ,IL-6 水平,中剂量组作用最明显,利巴韦林次之,见表 2。

表 2 K-Cox B-JN 对病毒性心肌炎小鼠血清 TNF- α ,IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-6
正常	-	76.16 ± 13.45 ²⁾	6.96 ± 2.35 ²⁾
模型	-	187.54 ± 47.84 ¹⁾	22.47 ± 4.13 ¹⁾
K-CoxB-JN	0.2	164.53 ± 38.14 ^{1,2)}	18.39 ± 4.28 ^{1,2)}
	0.4	130.75 ± 31.66 ^{1,2)}	14.05 ± 4.62 ^{1,2)}
	0.8	156.18 ± 40.00 ^{1,2)}	17.48 ± 3.74 ^{1,2)}
利巴韦林	0.075	138.24 ± 30.37 ^{1,2)}	15.66 ± 3.11 ^{1,2)}

3.4 对小鼠心肌组织病理积分的影响 各给药组小鼠心脏病理积分明显低于模型对照组 $P < 0.05$,

表明 K-CoxB-JN 复方新制剂对病毒性心肌炎小鼠的病理损伤有良好的保护作用,见表 3。

表 3 K-Cox B-JN 对病毒性心肌炎小鼠心肌组织病理积分的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	病理积分/分
正常	-	0 ²⁾
模型	-	3.4 ± 0.4 ¹⁾
K-CoxB-JN	0.2	1.6 ± 0.2 ^{1,2)}
	0.4	0.9 ± 0.5 ^{1,2)}
	0.8	2.5 ± 0.6 ^{1,2)}
利巴韦林	0.075	1.5 ± 0.3 ^{1,2)}

4 讨论

病毒性心肌炎属中医“温病”学范畴,根据临床表现的特点又可按“心悸”、“怔忡”、“虚劳”等内科疾病辨证论治。K-CoxB-JN 由西洋参、黄芪、丹皮、麦冬、五味子、莱菔子、王不留行等中药组成,具有益气养阴、活血通络、清热解毒、行气除满之功^[6]。BALB/c 小鼠 ip CVB3 建立的 VMC 模型,其病理改变十分接近人类 VMC 的病理改变,已成为目前最成熟的 VMC 动物模型之一,该法具有稳定,重复性好等优点,因此该模型被广泛用于 VM 的动物实验研究,该小鼠模型的建立可为研究 VMC 的发生、发展机制,筛选治疗药物奠定基础^[7-8]。

人体内 Th 细胞存在 Th1,Th2 两类亚群,在生理情况下二者数量与功能保持动态平衡,维持机体免疫功能的正常发挥。当机体接触抗原后 Th1 细胞分泌 IL-2,IFN- γ 和 TNF- β ,介导细胞免疫应答;Th2 细胞分泌 IL-4,IL-6,IL-10 和 IL-13 等,促进抗体的产生,介导体液免疫反应。Th1 应答能增强宿主对病毒的免疫性和防御功能,Th2 应答则与感染的进展、持续性和慢性化有关,二者之间存在反馈调节作用,以保持免疫平衡状态^[9]。TNF- α 是机体炎症反应与免疫系统重要调节因子,TNF- α 高表达会引起免疫病理损伤,诱导病毒在宿主细胞内复制,促进心肌细胞坏死和炎性细胞浸润,使心肌炎性反应加重^[10]。IL-6 是一种糖蛋白,在通常情况下,正常人血清中含有的微量 IL-6,在病毒的急性期特别是病毒血症期,由于病毒成分的刺激和诱导,造成单核巨噬细胞为主的免疫活性细胞产生大量 IL-6,并释放到血循环中,可导致血清中 IL-6 含量明显升高^[11]。研究证实,TNF- α 直接参与了病毒性心肌炎的病变过程^[12],抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊总皂苷可抑制被 CVB3 感染的心肌细胞中 TNF- α 的分

泌,减轻心肌的免疫炎性反应,起到保护心肌细胞的作用^[13]。IL-18,IL-6 及 TNF- α 的变化可能与病毒性心肌炎有关,可作为病情评估和预后判断的观察指标^[14]。

本实验研究结果表明,病毒性心肌炎可导致 Th1/Th2 失衡,促进炎症的进展,TNF- α 和 IL-6 参与了病毒性心肌炎的发病过程。K-CoxB-JN 能抑制 TNF- α 和 IL-6 的表达,降低心脏病理积分,改善机体免疫功能,对病毒性心肌炎发挥治疗作用。调节 TNF- α ,IL-6 水平可能是 K-CoxB-JN 治疗病毒性心肌炎作用机制之一,但其分子水平的作用机制尚需进一步探讨。

[参考文献]

[1] 吴巾红. STAT3 在 小 鼠 病 毒 性 心 肌 炎 发 病 中 的 研 究 [D]. 重 庆 :重 庆 医 科 大 学 ,2008.

[2] 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.

[3] 徐静,马会霞,李洁,等. 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方新制剂对 CVB3 感染小鼠的治疗作用[J]. 时珍国医国药,2013,24(6):1341.

[4] 徐静,马会霞,郑彩慧,等. 抗柯萨奇 B 病毒性心肌炎胶囊复方新制剂抗 CVB3 作用[J]. 时珍国医国药,2013,24(5):1076.

[5] 李芳,易岂建. 黄芩对病毒性心肌炎小鼠心脏柯萨奇病毒和腺病毒受体表达的影响[J]. 临床心血管病杂志,2007,23(3):195.

[6] 邢纪萍,包巨太,李志田,等. 抗柯萨奇 B 中药胶囊治疗病毒性心肌炎的临床疗效评价[J]. 中国临床药理学与治疗学,2003,8(6):701.

[7] 李岳春,杨占秋. 柯萨奇病毒 B3 致病毒性心肌炎动物模型的建立[J]. 温州医学院学报,2007,37(5):481.

[8] Fairweather D, Rose N R. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice;a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity [J]. Methods, 2007, 41(1):118.

[9] 许洪霞,史默怡,王婷婷,等. 羚桂龙牡颗粒对病毒性心肌炎小鼠血清 IFN- γ 、IL-4 水平的影响[J]. 中国中医药科技,2011,18(4):298.

[10] 陈炜炜,陈超群,蒋功达. 参麦注射液治疗病毒性心肌炎的临床疗效及其对血清 TNF- α 、IL-6 的影响研究[J]. 现代实用医学,2012,24(5):511.

[11] 王仲华,周荣靓,方永祥,等. 病毒性心肌炎血清 IL-18、IL-6、TNF- α 水平的变化及意义研究[J]. 实用心脑血管病杂志,2010,18(11):1563.

[12] 周欣,刘春梅,胡安娜,等. 黄芩甲苷对病毒性心肌炎小鼠 TLR4、NF- κ B 及 TNF- α 表达的影响[J]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(13):3659.

[13] 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.

[14] 譙娟. 80 例病毒性心肌炎血清 IL-18、IL-6 及 TNF- α 水平检测结果分析[J]. 内蒙古中医药,2011,30(23):81.

[责任编辑 聂淑琴]

天津中医药大学期刊编辑部 2014 年征订启事

《天津中医药》月刊,每期 8 元,年定价 96 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-83 电子邮件:zhongyiyao@vip.126.com, xuebaobj@126.com,网 址:http://www.tjzhongyiyao.com,地 址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。

《天津中医药大学学报》双月刊,每期 6 元,年定价 36 元,联系电话:022-59596310,联系人:张震之。邮局订阅:邮发代号 6-153,电子邮件:xuebaobj@vip.126.com, xuebaotxd@126.com,网 址:http://www.tjzhongyiyao.com,地 址:天津市南开区鞍山西道 312 号,邮政编码:300193。