

- [2] Kang G Z, Pan X M, Li B, *et al.* Study on the pharmacology of cholelithiasis prevented and cured with Composite Xiong-dan Capsule [J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 1996, 3(5): 20-21.
- [3] Jin Z N, Shun D Z, Liang C Y, *et al.* Effects of bear bile injection on blood lipid [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(4): 216-218.
- [4] Takagi K. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1969, 19: 418.
- [5] Zhang S R, Shao J Y, Yu Y W, *et al.* The Protective effects of furazolidone and some commonly used antiulcer drugs on several gastric ulcer models in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1984, 19(1): 5-11.
- [6] Wang B X, Liu A J, Cheng X J, *et al.* Antiulcer action of the polysaccharides isolated from pilose antler [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1985, 20(5): 321-325.
- [7] Shay H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat [J]. *Gastroenterology*, 1945, 5: 43-61.
- [8] Li Y K. *Methodology in Pharmacological Experiment on Chinese Materia Medica* (中药药理实验方法学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [9] Robera A. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypotonic NaCl, and thermal injury [J]. *Gastroenterology*, 1979, 77: 433-443.
- [10] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
- [11] Miller T A. Prostaglandin E₂ prevents alterations in gastric mucosal DNA, RNA and protein induced by alcohol [J]. *Gastroenterology*, 1980, 78: 1223.

苦瓜素对小鼠柯萨奇 B₃病毒性心肌炎的治疗作用

李双杰¹, 王 佐¹, 张召才², 陈瑞珍², 杨英珍², 陈灏珠², 葛均波²

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001; 2. 复旦大学附属中山医院 上海市心血管病研究所, 上海 200032)

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 是常见的获得性心肌疾病之一, 近年来发病率逐年上升, 成为青少年猝死的重要原因, 严重危害人类健康, 但目前尚无有效的抗病毒药物治疗。苦瓜为葫芦科属植物苦瓜 *Momordica charantia* L. 的果实, 已有数百年的药食两用史。最近国内外学者从苦瓜果肉、种仁中分离纯化出多种有效成分, 发现有明显的抗病毒、抗肿瘤、调节免疫等多种功效, 具有很高的药用价值^[1]。笔者从苦瓜果肉中分离纯化一种相对分子质量为 2.8×10^4 的蛋白质有效成分, 称之为苦瓜素 (momordicin), 在体外有明显的抗亲心性柯萨奇 B₃ 病毒 (coxsackievirus B₃, CVB₃) 的作用^[2], 本实验观察苦瓜素治疗实验性小鼠 CVB₃ 病毒性心肌炎的疗效。

1 材料与方法

1.1 实验动物: 4 周龄、雄性、纯种 BALB/C 小鼠, 体重 10~12 g, 复旦大学动物实验部提供, 饲养于 SPF 级环境中。

1.2 病毒: CVB₃ (Nancy 株) 在 HeLa 细胞中传代, 冻融离心 3 次, 上清液分装, 在 HeLa 细胞上测 50% 组织感染率 (TCID₅₀) 为 1×10^{-7} 。-70 °C 保存备用。

1.3 苦瓜素: 选择湖南省衡阳市郊区廖家湾村种植的新鲜成熟苦瓜, 去籽压汁, 乙醇分级沉淀, 凝胶滤过色谱分离, 离子交换色谱分离, 低温真空干燥制备^[2], 采用高效液相色谱法进行质量控制。苦瓜素纯度 $\geq 95\%$ 为合格。用生理盐水配制成 3% 溶液, 0.22 μm 过滤器滤过除菌, 4 °C 保存备用。

1.4 模型制备及给药: 80 只小鼠分别 ip 含 1×10^5 TCID₅₀ CVB₃ 的 PRMI-1640 液 0.1 mL 建立心肌炎实验模型。随机分为 4 组, 每组 20 只。苦瓜素高、中、低剂量 (60、20、5 mg/kg) 组, 在接种病毒 30 min 后, ip 给药, 每日 1 次, 共 7 d; 模型组, 在接种病毒 30 min 后, ip 生理盐水 0.1 mL, 每日 1 次, 共 7 d。

1.5 生存率测定: 各组取 15 只小鼠连续观察 14 d, 每日清点小鼠生存数, 计算病毒感染后 14 d (急性期) 小鼠生存率。

1.6 心肌病毒滴度测定: 感染后第 8 天各组取 5 只小鼠, 处死后无菌取出心脏, 取心房与右心室部分, 置无菌 PBS 液 1 mL 内, 捣碎。1 500 r/min, 离心 5 min, 取上清液于 -20 °C 冻存备用。按病毒的细胞致病变效应实验 (微量试验法) 于单层 HeLa 细胞上测定其组织培养半数感染量 (TCID₅₀)。

1.7 心肌组织中 CVB₃ RNA 定量检测: 取 1.6 项

收稿日期: 2004-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30070934); 湖南省中医药科研项目 (96050)

作者简介: 李双杰 (1961—), 男, 苗族, 湖南省绥宁人, 副教授, 博士后, 研究生导师, 主要从事病毒性心肌疾病基础与临床研究及抗病毒中草药开发。Tel: (0734) 8279057 E-mail: lesjie62@hotmail.com

小鼠左心室肌约 30 mg, 提取总 RNA (试剂为 Qia-gen 产品), 紫外分光光度计测定总 RNA 水平, 1.4% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度。逆转录聚合酶链反应 (Promega 产品) 按操作流程进行, CVB₃ 引物参照文献^[3]由 Gibco/BRL 合成, 内对照引物 Murine Mmyogene primer 由万腊香博士惠赠。取 5 μ L PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5 ml/L 溴化乙啶) 分析, 以 1 kb DNA marker 为相对分子质量标准, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE, 电泳后, 紫外灯下观察摄影, 激光光密度扫描仪在室温下扫描底片上 CVB₃ 带及 Mmyogene 带, 直接读出各峰面积的积分相对值。两者比值为 CVB₃ RNA 含量。

1.8 心肌病理组织学检查: 感染病毒后第 15 天, 各组小鼠处死后, 无菌取左心室中、下 1/3 心室肌, 10% 中性甲醛液固定, 石蜡包埋、切片, 苏木素-伊红 (HE) 常规染色, 光镜下观察病理变化, 按 Rezkalla 方法^[4]计算心肌病理组织学积分: 每张切片随机取 5 个高倍视野, 计算每个视野中病变占整个心肌切片面积之比, 无病变计 0 分, 病变面积 < 25%, 计 1 分, 25%~50% 计 2 分, 51%~75% 计 3 分, >75% 计 4 分。

1.9 血清肌钙蛋白-T 测定: 小鼠处死前摘眼球取血, 离心得血清, -20 $^{\circ}$ C 保存, 按试剂 (Boehringer Mannheim Diagnostics, Mannheim, 德国) 说明书进行测定。

1.10 统计学处理: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 生存率的比较用 Kaplan-meier survival test, 多组均数比较用方差分析及 q 检验, 率的比较用 Fisher's exact test, 全部资料用 SPSS10.0 软件处理。

2 结果

2.1 生存率: 苦瓜素高剂量组没有动物死亡, 生存率为 100%, 中、低剂量组于病毒感染后第 5 天开始出现死亡, 其中中剂量组死亡 2 只, 生存率为 86.7%, 低剂量组死亡 5 只, 生存率为 66.7%, 而模型组于第 4 天开始出现死亡, 共死亡 10 只, 生存率为 33.3%, 苦瓜素各组与模型组比较, 差异非常显著 ($P < 0.01$)。

2.2 心肌病毒滴度: 感染后第 8 天, 苦瓜素治疗组心肌组织中病毒滴度明显低于模型组, 高、中剂量组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 但低剂量组差异不显著 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.3 心肌组织中 CVB₃ RNA 水平: 苦瓜素各剂量组 CVB₃ RNA 水平较模型组均有降低, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 心肌病理组织学变化: 心肌病理组织学半定量分析显示苦瓜素各剂量组心肌组织炎性浸润积分及坏死积分均较模型组低, 差异显著 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.5 血清肌钙蛋白-T 测定: 苦瓜素各剂量组血清肌钙蛋白-T 水平均明显低于模型组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 苦瓜素对 CVB₃ 病毒性心肌炎小鼠各项指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of momordicin on indexes of CVB₃ myocarditis mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg $\cdot$ kg ⁻¹)	心肌病毒滴度 (lgTCID ₅₀ , n=5)	心肌 CVB ₃ RNA 水平 (n=5)	心肌组织病理学变化 (积分)		肌钙蛋白-T (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)
				细胞浸润	坏死	
苦瓜素	60	1.18 $\pm$ 0.47 *	0.26 $\pm$ 0.38 *	0.46 $\pm$ 0.40 (n=15) *	0.22 $\pm$ 0.41 (n=15) **	0.96 $\pm$ 0.35 (n=15) *
	20	1.43 $\pm$ 0.69 *	0.39 $\pm$ 0.44 *	1.11 $\pm$ 1.08 (n=13) *	0.62 $\pm$ 0.80 (n=13) *	1.17 $\pm$ 0.61 (n=13) *
	5	2.15 $\pm$ 0.56	0.97 $\pm$ 0.36 *	1.00 $\pm$ 0.54 (n=10) *	0.63 $\pm$ 0.59 (n=10) *	1.94 $\pm$ 0.51 (n=10) *
模型	—	2.91 $\pm$ 0.50	1.47 $\pm$ 0.30	2.24 $\pm$ 0.52 (n=5)	1.64 $\pm$ 0.63 (n=5)	2.26 $\pm$ 0.69 (n=5)

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

目前研究发现, 病毒在心肌组织中的持续感染是导致心肌炎迁延不愈, 形成慢性心肌炎, 甚至扩张性心肌病的重要因素^[5], 因此彻底清除心肌内感染的病毒, 是治疗病毒性心肌炎, 改善其预后的关键措施。但目前尚无有确切疗效的抗病毒药物。近年来发现许多中草药具有明显的抗病毒作用, 从中草药中发掘抗病毒有效成分, 成为研究病毒性心肌炎治疗药物的重要途径。

苦瓜为民间常用中草药, 性寒、味苦, 入心、肝、

肺经, 有消暑涤热、明目解毒等功效, 用于热病烦渴喜饮、中暑、痢疾、赤眼疼痛、痈肿丹毒、恶疮等症。从苦瓜子中分离一种相对分子质量为 3.0×10^4 的蛋白质, 对 HIV-I 型病毒感染和复制有明显抑制作用, 称苦瓜抗 HIV 病毒蛋白质 (momordica anti-HIV protein of 30kDa, MAP₃₀)^[6], MAP₃₀ 可抑制感染 T 淋巴细胞、单核细胞的 HIV-I 病毒 DNA 复制而对未感染病毒的细胞无毒性^[7], 对单纯疱疹病毒也有显著的抑制其 RNA 复制的作用, 效果优于无环鸟苷 (ACV), 且对 ACV 耐药的单纯疱疹病毒株

亦有作用^[8]。笔者从苦瓜果肉中提取的苦瓜素为水溶性蛋白质,体外实验显示出良好的抗 CVB₃ 效果^[2]。本实验结果显示,苦瓜素可明显降低 CVB₃ 感染小鼠的死亡率,提高其生存率,减轻心肌组织的病变程度,并且通过抑制 CVB₃ RNA 复制,在病毒复制的分子水平具有明显的抗病毒作用,使急性期心肌组织病毒滴度明显降低。苦瓜素组血清肌钙蛋白-T 明显低于模型组,表明苦瓜素治疗组小鼠心肌损伤程度明显减轻。结果提示苦瓜素可能成为一种有效的抗 CVB₃ 感染的药物,对 BALB/C 小鼠 CVB₃ 心肌炎具有肯定的抗病毒及保护心肌的作用,但其抗病毒的具体机制是直接抑制 CVB₃ 病毒复制,还是通过增强机体的免疫功能而起抗病毒作用,有待进一步研究。

References:

- [1] NG T B, Chang W Y, Yeung H W. Proteins with abortifacient, ribosome inactivation, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from Cucurbitaceae plants [J]. *Gen Pharmacol*, 1992, 23: 579-584.
- [2] Li S J, Zhang B L, Den H, *et al.* The study of anti-coxsackieviral B₃ infection in HaLa with momordicin *in vitro* [J]. *Bull Hunan Med Univ* (湖南医科大学学报), 1999, 6(24): 246-247.
- [3] Li S J, Den H, Wang Z, *et al.* The establish of method for detection of coxsackievirus B₃ RNA by quantitative differential reverse transcription and polymerase chain reaction [J]. *J Hengyang Med Coll—Health Sciences* (衡阳医学院学报·医学版), 2000, 28(2): 128-130.
- [4] Rezkalla S, Kloner R A, Khatib G, *et al.* Beneficial effects of captopril in acute coxsackievirus B₃ murine myocarditis [J]. *Circulation*, 1990, 81: 1039-1040.
- [5] Liu P P, Mason J W. Advances in the understanding of myocarditis [J]. *Circulation*, 2001, 104: 1076-1082.
- [6] Lee H S, Huang P L, Nara P L, *et al.* MAP₃₀: A new inhibitor of HIV-I infection and replication [J]. *FEBS Lett*, 1990, 272: 12-16.
- [7] Lee H S, Huang P Z, Huang P L, *et al.* Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type I by anti-HIV plant proteins MAP₃₀ and GAP₃₁ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8818-8822.
- [8] Bourinbaier A S, Lee S. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP₃₀ and GAP₃₁ against herpes simplex viral infection *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 219: 923-927.

糖肾平对糖尿病小鼠基因表达的调控作用

任 敏¹, 王 兴², 徐 思², 郝晓锋¹

(1. 康弘药业集团·成都法玛基因科技有限公司, 四川 成都 610036; 2. 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

中药药理研究是目前中药现代化研究的瓶颈之一。由于中药是群体化合物,相对西药复杂化,具有多效性、多途径、多靶点的特点,对其中不同成分功能效果的解读是一个极其浩大的工程,利用目前的研究手段无法解决这一问题。基因芯片具有高通量,同时检测成千上万个基因表达的水平,将其运用于中药药理的研究日益得到关注,本实验即利用该技术探讨中药糖肾平对糖尿病小鼠肝脏和肾脏两个重要代谢器官基因表达水平的调控情况及相关信息研究。

1 材料

1.1 动物:清洁级 C57BL/6J 小鼠,四周龄,雄性(北京大学医学实验中心提供),30 只,单笼喂养,室温 18℃~25℃,相对湿度 50%~80%,自由摄食饮水,普通饲料,造模用高脂高糖饲料(美国 CH-IRON)提供。

1.2 药品与试剂:糖肾平胶囊(主要由大黄、水蛭、女贞子等组成,成都康弘制药有限公司生产,批号

031106)。水饱和苯酚(美国 Sigma)。8-羟基喹啉、1,4-二硫苏糖醇(上海生工试剂厂)。cDNA Synthesis System (Roche) 转录试剂盒(美国 Ambion 公司)。Biotin-14-CTP(美国 life technology 公司)。M03 基因芯片(美国 Mergen 公司)。

1.3 仪器:血糖仪与血糖试纸(美国惠好公司),MICRO—4 型杂交仪(英国 HYBAID 公司),418T 型芯片扫描仪(美国 AFFYMETRIX 公司)。

2 方法

2.1 I 型糖尿病动物模型的建立:将 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组,每组 10 只,正常对照组给予正常饲料,模型组给予高脂高糖饲料,药物组给予高脂高糖饲料及糖肾平。动物实验开始初采尾静脉血测定血糖,各组用相应饲料喂养 12 周,禁食 12 h 后采尾静脉血测定血糖,根据以往实验的结果,药物组加糖肾平浸膏粉 0.8 g/kg(人日服剂量的 20 倍),ig 给药,每日 1 次,给药 15 d,末次用药后,3 组动物按相