

疏风解毒胶囊对小鼠病毒性心肌炎模型的影响

张亚平, 陶振刚, 宋振举*, 童朝阳

复旦大学附属中山医院 急诊科, 上海 200032

摘要: 目的 探讨疏风解毒胶囊对病毒性心肌炎 (VMC) 小鼠心肌组织形态和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、淀粉样蛋白 A (SAA) 水平的影响。方法 Balb/c 小鼠随机分为对照组, 模型组, 疏风解毒胶囊 0.1、0.2、0.5 g/kg 组和利巴韦林 0.1 g/kg 组, 除对照组外 ip 柯萨奇病毒 B₃ (CVB₃) 建立 VMC 模型, 造模 2 h 后给药, 连续给药 7 d, 第 4、8 天各处死一半小鼠, 取心肌组织 HE 染色观察病理变化, 眼眶取血测定血清 TNF- α 、SAA 水平。结果 与对照组比较, 模型组出现心肌炎症及坏死, 血清 TNF- α 、SAA 水平明显升高 ($P < 0.05$); 疏风解毒胶囊 0.2、0.5 g/kg 组与模型组比较, 心肌组织病理变化明显减轻; 血清 TNF- α 、SAA 水平明显降低 ($P < 0.05$)。结论 疏风解毒胶囊缓解 VMC 小鼠心肌病理形态损伤、抑制炎症, 发挥明显的抗病毒作用。

关键词: 疏风解毒胶囊; 病毒性心肌炎; 肿瘤坏死因子- α ; 淀粉样蛋白 A; 抗病毒; 柯萨奇病毒 B₃

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)01-0110-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.017

Effects of Shufengjiedu Capsule on model of viral myocarditis in mice

ZHANG Ya-ping, TAO Zhen-gang, SONG Zhen-ju, TONG Chao-yang

Department of Emergency, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Shufengjiedu Capsule on the modality of myocardial tissue and levels of serum TNF- α and SAA in mice with viral myocarditis. **Methods** BALB/C mice were randomly divided into normal control group, virus group, Shufengjiedu Capsule 0.1, 0.2, 0.5 g/kg/d groups, and ribavirin 0.1 g/kg/d group. The mouse model of viral myocarditis was established by ip injection of CVB3, and after 2 h of modeling, the animals were continuously administered for 7 d. Half of the mice were killed on days 4 and 8, the myocardium tissue was HE stained to observe the pathological changes and blood samples were taken for measurement of serum TNF- α and SAA contents. **Results** Compared with the control group, the pathological changes of myocardium were significantly decreased in high-dose Shufengjiedu Capsule group, and the serum TNF- α and SAA contents were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Shufengjiedu Capsule has antiviral effect and could alleviate the inflammation on mice with viral myocarditis.

Key words: Shufengjiedu Capsule; viral myocarditis; TNF- α ; SAA; antiviral; Coxsackie virus B3

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 已成为我国当前最常见的心肌炎, 发病率逐年上升, 37% 可能演变为扩心病, 死亡率达 12.5%^[1], 迄今仍缺乏特效的治疗方法。柯萨奇病毒 B (coxsackie virus B, CVB) 属小 RNA 病毒科肠道病毒属, 共分 6 型, 是 VMC 的主要病原体。血清学和流行病学研究资料显示, 25%~50% 急性心包炎、36%~65% 急性心肌炎患者有近期或复发的 CVB 感染^[2-4]。疏风解毒胶囊是中药复方, 具有疏风清热、解毒利咽之功, 主治上呼吸道感染属风热证, 症见发热、恶风、咽痛、头痛、鼻塞、流涕、

咳嗽等^[5-6]。其处方系湖南湘西老中医向楚贤的祖传秘方, 对于多种病毒有明显的抑制效果^[7]。本研究旨在探讨疏风解毒胶囊对 VMC 小鼠心肌组织形态和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、淀粉样蛋白 A (SAA) 水平的影响, 为临床治疗 VMC 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

近交系 Balb/c 小鼠 240 只, 4~6 周龄, 体质量 16~18 g, 购于复旦大学医学院实验动物中心, 生产许可证 SCXK (沪) 2014-0004。

收稿日期: 2015-10-11

作者简介: 张亚平 (1977—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为急诊危重病。Tel: 13681972502 E-mail: janzzy@163.com

*通信作者 宋振举, 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为急诊危重病。Tel: 13816607453 E-mail: song.zhenju@zs-hospital.sh.cn

1.2 病毒

CVB₃m, 复旦大学附属中山医院心病毒实验中心提供, 经感染 HeLa 细胞传代。

1.3 药物及主要试剂

疏风解毒胶囊 (批号 130601), 安徽济人药业有限公司, 0.52 g/粒, 1 粒胶囊溶于 50 mL 水, 配成 0.01 g/mL 溶液; 利巴韦林注射液, 每支 0.1 g/10 mL, 批号 20140502, 辰欣药业股份有限公司; TNF- α 、SAA ELISA Kit, 上海奥普生物工程公司。

1.4 仪器

Image Master VDS 图像分析系统, 美国 Pharmacia Bioech。

2 方法

2.1 小鼠 VMC 模型的制备及分组给药

含 100 TCID₅₀ CVB₃m 的 Eagle's 液 0.2 mL 腹腔攻击小鼠, 每 3~4 天攻击 1 次, 连续 1 周 (经预试验确定, 小鼠出现心肌炎典型心肌病变的最适剂量为 1×10^4 /mL CVB₃m 液, ip 给予小鼠 0.2 mL), 复制 VMC 模型。

取 Balb/c 小鼠 240 只, 随机分为 6 组: 对照组, 模型组, 疏风解毒胶囊低、中、高剂量 (0.1、0.2、0.5 g/kg) 组, 利巴韦林 (0.1 g/kg) 组。对照组 ip Eagle's 液 0.2 mL, 其余各组 ip 1×10^4 /mL CVB₃m 液 0.2 mL。接种病毒 2 h 后开始给药, 疏风解毒胶囊组 ig 药物溶液, 利巴韦林组 ip 注射液, 对照组、模型组 ig 等体积的生理盐水, 每天给药 1 次, 连续给药 7 d。

2.2 HE 染色观察心肌组织形态学变化

病毒攻击第 4、8 天, 脱颈椎处死小鼠, 无菌剖取心脏, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察心肌病理变化。Image Master VDS 图像分析系统测量病理指标, 计算心肌病变评分, 即每张切片取 5 个视野, 计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野面积之比, 无病变计 0 分, <25% 计 1 分, 25%~50% 计 2 分, 50%~75% 计 3 分, >75% 计 4 分。

2.3 血清 TNF- α 、SAA 水平检测

于第 4、8 天眼眶取血, 4 000 r/min 低温离心, 分离血清, 采用 Elisa-Kit 测定血清 TNF- α 、SAA 水平。

2.4 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 单因素方差分析, 组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠心肌组织的病理变化

病毒感染后第 4 天, 模型组和给药组心肌病理切片均出现数量不等的小炎症灶与点状坏死, 给药组相对较轻; 第 8 天, 模型组心肌组织炎症及坏死较第 4 天时加重, 出现片状炎症及坏死灶, 疏风解毒胶囊组和利巴韦林组病理改变仍以点状炎症及坏死灶为主, 病变程度相对较轻; 对照组未见类似病理学改变。不同剂量的疏风解毒胶囊心肌病变评分和模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 与利巴韦林组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。结果见图 1 和表 1。

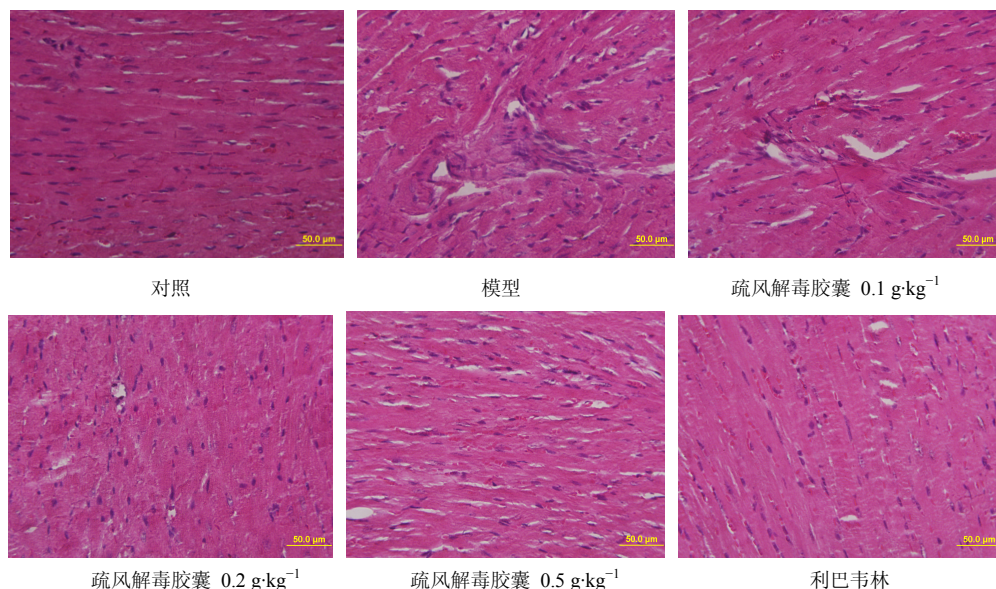


图 1 第 8 天心肌组织病理变化

Fig. 1 pathological changes of cardiac muscle tissue on day 8

3.2 对血清 TNF-α、SAA 水平的影响

与对照组比较,模型组与给药组第 4、8 天血清 TNF-α、SAA 水平显著升高 ($P < 0.05$);疏风解毒

胶囊 0.2、0.5 g/kg 剂量组与模型组比较,血清 TNF-α、SAA 水平显著降低 ($P < 0.05$),与利巴韦林组比较,差异不显著 ($P > 0.05$),结果见表 2。

表 1 模型组、疏风解毒胶囊组、利巴韦林组小鼠感染后第 4、8 天心肌组织病变程度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison on degree of cardiac muscle tissue in infected mice of virus group, Shufengjiedu Capsule group, and ribavirin group on days 4 and 8 after infection ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | 第 4 天 | | 第 8 天 | |
|--------|--------------------------|-------|------------------------|-------|------------------------|
| | | 样本数 | 评分 | 样本数 | 评分 |
| 模型 | | 19 | 2.76±0.62 | 18 | 3.05±0.53 |
| 疏风解毒胶囊 | 0.1 | 20 | 1.90±0.35 [△] | 19 | 2.16±0.56 [△] |
| | 0.2 | 20 | 1.85±0.43 [△] | 20 | 2.05±0.41 [△] |
| | 0.5 | 20 | 1.78±0.36 [△] | 20 | 2.10±0.53 [△] |
| 利巴韦林 | 0.1 | 19 | 1.82±0.60 [△] | 19 | 2.22±0.52 [△] |

与模型组比较: [△] $P < 0.05$

[△] $P < 0.05$ vs model group

表 2 各组小鼠血清 TNF-α、SAA 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Serum TNF-α and SAA levels of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量/(g·kg ⁻¹) | 第 4 天 | | | 第 8 天 | | |
|--------|--------------------------|-------|------------------------------|---------------------------|-------|------------------------------|---------------------------|
| | | 样本数 | TNF-α/(pg·mL ⁻¹) | SAA/(mg·L ⁻¹) | 样本数 | TNF-α/(pg·mL ⁻¹) | SAA/(mg·L ⁻¹) |
| 对照 | | 20 | 5.67±0.35 | 0.11±0.01 | 20 | 5.71±0.32 | 0.12±0.01 |
| 模型 | | 19 | 22.76±3.62* | 2.77±0.42* | 18 | 33.05±2.53* | 4.16±0.33* |
| 疏风解毒胶囊 | 0.1 | 20 | 20.90±2.35* | 2.12±0.23* | 19 | 32.16±2.56* | 3.16±0.44* |
| | 0.2 | 20 | 13.85±1.32* [△] | 1.25±0.13* [△] | 20 | 13.91±1.45* [△] | 2.01±0.21* [△] |
| | 0.5 | 20 | 12.88±1.36* [△] | 1.23±0.20* [△] | 20 | 12.50±1.63* [△] | 2.05±0.23* [△] |
| 利巴韦林 | 0.1 | 19 | 11.62±1.52* | 1.02±0.21* | 19 | 12.24±2.02* | 1.92±0.31* |

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

心肌炎是心肌发生的局限或弥漫性炎症,最常见的病因是肠道病毒感染,其中又以 CVB 为主。其发病机制尚未完全阐明,目前多认为是病毒直接损伤和免疫反应所致。中医学一般认为 VMC 是外感六淫之邪侵犯心脏、耗伤气阴或以气阴两虚之体,复感六淫之邪而发病,在“心悸”“怔忡”“虚劳”等证中有类似症状的记载。对 VMC 发病机制研究的最新进展表明,氧自由基、超氧化物歧化酶(SOD)及相关因素、心肌细胞凋亡、一氧化氮(NO)、一氧化氮合成酶(NOS)均参与了 VMC 的发病^[4]。疏风解毒胶囊方中虎杖苦微涩、微寒,功能祛风、除湿、解表、攻诸肿毒、止咽喉疼痛,为君药。连翘性凉味苦,功能清热、解毒、消肿,具有升浮宣散之力,能透肌解表、清热祛风,为治疗风热的要药;板蓝根味苦性寒,功能清热解毒,二药共为臣药。柴胡性味苦凉,功具解表和里;败酱草味辛苦,

微寒,功能清热、解毒、善除结热;马鞭草性味凉苦,功能清热解毒,能治外感发热、喉痹;芦根味甘寒,能清降肺胃,生津止渴,治喉痛,四药共为佐药。甘草调和诸药为使药。诸药配伍能直达上焦肺卫,祛风清热,解毒散结,切合风热证风热袭表、肺卫失宣、热毒结聚之病机,达到迅速退热的功效^[8-9]。疏风解毒胶囊中剂量作用与利巴韦林作用相当,说明该药能抑制病毒繁殖或是保护心肌免受病毒攻击,从而使疾病早期由病毒直接损伤心肌介导的炎症缓解。

TNF-α 是由激活的巨噬细胞或单核细胞等产生的一种具有多种生物学效应的细胞因子。研究发现 TNF-α 参与了多种病理过程,与许多疾病的发病有关^[10]。近年来的研究表明,在 VMC 中 TNF-α 表达明显升高,可能在 VMC 的心脏损伤和发病机制中起作用^[11-12]。实验表明, TNF-α 在 VMC 的免疫反应和发病机制中起重要作用。Calabrese 等^[11]用 RT-PCR 和免疫组化方法研究了 38 例心肌炎和 8 例

正常人心肌活检组织中 TNF- α 的表达, 结果表明 TNF- α 在 VMC 发病机制中起重要作用, 且与心功能不全的严重程度有关。本实验可以观察到疏风解毒胶囊中、高剂量组抑制了 TNF- α 的表达, 改善心肌损伤症状。

SAA 是由同一簇基因编码的一组多形性急性时相蛋白, 存在于各种哺乳动物和禽类中。许多急性和慢性炎症反应时, 血浆 SAA 水平明显升高, 其合成主要受白细胞介素 (IL-1)、IL-6、TNF- α 和糖皮质激素的调控^[13], 是一个非常敏感的急性时相蛋白^[14]。本实验可以观察到疏风解毒胶囊中、高剂量组对于 SAA 表达明显的抑制作用, 但是具体的作用通路及靶点有待于进一步研究。本实验提示在 VMC 早期应用疏风解毒胶囊, 可抑制病毒、保护心肌, 改善预后。

参考文献

- [1] 杨英珍. 病毒性心肌炎 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000.
- [2] 解立颖. 柯萨奇病毒性心肌炎研究进展 [J]. 心血管病学进展, 1994, 15(5): 293-296.
- [3] 金 奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [4] Sato S, Tsutsumi R, Burke A, *et al.* Persistence of replicating coxsackievirus B3 in the athymic murine heart is associated with development of myocarditis lessons [J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(11): 2911-2924.
- [5] 李 文. 疏风解毒胶囊治疗小儿急性上呼吸道感染的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(9): 1140-1143.
- [6] 胡 蓉, 王丽华, 张珺珺, 等. 疏风解毒胶囊治疗急性咽炎风热证的临床观察 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(5): 460-462.
- [7] 刘 颖, 崔晓兰, 时 瀚, 等. 疏风解毒胶囊防治流感体内药效学实验研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(1): 35-36.
- [8] 薛明明, 高静琰, 陈东旭, 等. 疏风解毒胶囊对 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导大鼠急性肝损伤保护作用 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1348-1353.
- [9] 郭 倩, 田成旺, 朱月信, 等. HPLC 法同时测定疏风解毒胶囊中 7 种活性成分 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1174-1177.
- [10] Meldrum D R. Tumor necrosis factor in the heart [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(43): 577-595.
- [11] Calabrese F, Carturan E, Chimenti C, *et al.* Overexpression of tumor necrosis factor (TNF- α) and TNF- α receptor I in human viral myocarditis: clinicopathologic correlations [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(9): 1108-1118.
- [12] Kim J M, Lim B K, Ho S H, *et al.* TNFR-FC fusion protein expressed by *in vivo* electroporation improves survival rates and myocardial injury in cox2 sackievirus induced murine myocarditis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(3): 765-771.
- [13] Jensen L E, Whitehead A S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response [J]. *Biol Chem J*, 1998, 334(4): 489-503.
- [14] Parnham M J, Culic O, Erakovic V, *et al.* Modulation of neutrophil and inflammation markers in chronic obstructive pulmonary disease by short term azithromycin treatment [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 517(1): 132-143.