

黄芪对培养的大鼠搏动心肌细胞感染柯萨奇 B₂ 病毒后保护作用的超微观察

沈莉英 龚祖坝

(中国科学院上海生物化学研究所)

杨英珍 郭 棋 金佩英 杨学义 浦寿月 陈灏珠

(上海市心血管研究所, 上海医科大学附属中山医院)

前文^[1]已经报道应用电子显微镜观察到培养的新生大鼠搏动心肌细胞感染柯萨奇 B₂ 病毒后, 细胞超微结构有明显病变, 而中药黄芪对柯萨奇 B₂ 病毒感染培养的大鼠心肌细胞所致心肌酶-乳酸脱氢酶及谷草转氨酶的释放, 细胞搏动的停止等均有保护作用(待发表资料)。本文就超微结构改变, 倒置相差显微镜下细胞搏动情况及细胞病变, 报道了黄芪对培养的大鼠搏动心肌细胞感染柯萨奇 B₂ 病毒的保护作用, 从而为临床防治急性病毒性心肌炎提供一定依据。

材 料 和 方 法

1. 心肌细胞及病毒 出生1—4天的 Sprague-Dawley 大鼠心脏, 用 0.1% 胰蛋白酶(Difco 1:250) 溶液分次消化细胞。细胞制备见前文^[2]。生长液用 20% 小牛血清, 1% 谷氨酰胺(200 mM), 双抗(青霉素 200 μ/ml, 链霉素 100 μg/ml) 之 MEM Eagle's 液。柯萨奇(Coxsackie) B₂ 病毒(ATCC VR29) 及 50% 组织感染率(TCID₅₀) 滴定同前^[1]。黄芪注射液(4g/2ml, 840308), 由上海医科大学附属华山医院中草药制剂室供给。

2. 倒置相差显微镜检查 消化所得细胞悬液分种同前^[1]。每瓶含 4 × 10⁶ 细胞加生长液至每瓶总量 8 ml。在 37℃ 培育 48 小时后弃液, 感染组 6 瓶各加 1 ml 内含 50 个 TCID₅₀ 的柯萨奇 B₂ 病毒的生长液, 非感染(细胞对照)组 6 瓶, 各瓶单加 1 ml 生长液。再置 37℃ 培育 1 小时后, 感染组及非感染组各取 3 瓶加黄芪 1.5 g/瓶, 作为黄芪对照及感染加黄芪组, 最后仍

加生长液至每瓶总量 8 ml。每天在倒置显微镜下观察搏动情况及细胞病变。

3. 电子显微镜检查 上述 4 组(细胞对照、黄芪对照、感染及感染加黄芪组) 在感染病毒后培养二、四、六天, 各取 1 瓶以无钙、镁离子的 Hank's 液洗涤二次, 立即用 2.5% 戊二醛 0.1M pH 7.2 磷酸缓冲液固定 3—4 小时, 然后用不锈钢匙将贴壁细胞自培养瓶壁括下, 3000rpm 离心 20 分钟, 置 4℃。电镜制样方法同前^[1]。在日立 H-300 电子显微镜下观察。

结 果

1. 细胞搏动及细胞病变 接种病毒后第二天, 在倒置显微镜下可观察到感染组细胞仍在搏动, 但较缓慢而不规则, 细胞病变不明显。感染第四天, 心肌细胞停止搏动, 出现细胞变圆、成堆、团缩等病变。同时类内皮细胞也停止生长, 但无明显细胞异常。病毒感染第六天, 感染组细胞病变更趋明显, 但细胞对照、黄芪对照及感染加黄芪各组细胞则仍以每分钟 80~100 次规则而有力地搏动, 未观察到和感染组类似的细胞病变。共进行实验 4 次。

2. 超微结构改变 培养的大鼠搏动心肌细胞, 在感染柯萨奇 B₂ 病毒后, 产生一系列细胞超微结构病变, 并随病毒感染时间的延长而加剧。在病毒感染二天后就出现细胞核畸

本文由中国科学院科研基金资助。
中药黄芪注射液由华山医院中草药制剂室龚志铭同志协助供应, 特此致谢。

变, 线粒体肿胀, 闰盘呈现不同程度的介离等现象(图1)。在病变后期(四天时)细胞搏动趋于停止时, 肌原纤维紊乱, 局部似有断裂。病毒感染六天后, 在细胞内出现呈晶格状排列的病毒颗粒, 并能观察到在病毒感染的细胞内出现一种特征性的内含体(图2), 说明子代病毒已经大量复制增殖, 此时在倒置相差显微镜下, 心肌细胞病变严重, 搏动停止, 濒于死亡。感染加黄芪组, 二天后取样观察与感染组对照相比, 闰盘介离现象基本消失, 细胞核稍有内褶, 糖原颗粒丰富, 线粒体嵴密集, 呈正常心肌细胞线粒体偶见的同心圆排列状态, 肌原纤维仍然保持整齐; 四天后细胞核未见有明显病变, 肌原纤维也保持整齐排列(图3), 这一结果和细胞在倒置显微镜下的宏观结果基本吻合, 即细胞在黄芪保护下, 仍能按正常频率搏动; 六天后在电子显微镜下经仔细观察未能检测到病毒颗粒及纤维状内含体, 肌原纤维也仍然完整。无论在病毒感染后二、四或六天, 在黄芪存在下, 细胞内糖原颗粒明显增加。黄芪对照组在加入黄芪后二到六天, 与未加黄芪的细胞对照组相比, 细胞核、线粒体、闰盘、肌原纤维等各类细胞器形态正常, 未发现用药物后对细胞器形态改变的副作用, 也观察到糖原颗粒明显增加(图4)。

讨 论

上述电子显微镜观察结果说明黄芪对感染柯萨奇B₂病毒后的培养大鼠搏动心肌细胞确具有肯定的保护作用。这一结果与黄芪对柯萨奇B₂病毒感染培养的大鼠心肌细胞所致心肌酶——乳酸脱氢酶、谷草转氨酶的释放、细胞的搏动及细胞病变等保护作用相一致。关于黄芪保护作用的机制, 目前尚难作出结论, 还需

作进一步生化及药理试验。根据本文实验结果, 在未加黄芪的感染组中, 病毒感染六天后, 较易观察到大量病毒颗粒和内含体的存在, 但未能在感染加黄芪组细胞中找到病毒颗粒和内含体, 说明黄芪的化学成份中可能存在某种抗病毒或干扰病毒复制增殖周期的活性成份^[3]。侯氏等报道, 黄芪对于干扰素系统有激活作用, 在淋巴细胞中可诱生 γ 干扰素^[4]。实验也证明人白细胞干扰素对病毒感染的心肌细胞具有保护作用^[5]。小鼠感染柯萨奇B₂病毒后, 腹腔内注射单剂 polyI:C(干扰素诱生剂)对心肌炎的发生也有明显保护作用^[6]。本实验中黄芪在培养的心肌细胞中有抗病毒作用, 似与干扰素作用有所类同, 但其间关系尚不明确。此外, 细胞经黄芪处理后, 细胞质内糖原颗粒均比未加黄芪时丰富, 而糖原颗粒是细胞的能量来源, 因此有可能黄芪有加强细胞的代谢及补偿能力, 从而在整体上使细胞抗病毒的能力增加。

鉴于近年来国内病毒性心肌炎的发病率有所增高, 但尚缺乏有效的药物治疗方法, 故上述研究结果, 可为临床防治病毒性心肌炎在理论上提供一定依据。

参 考 文 献

- [1] 杨英珍等, 1985, 中华医学杂志, 65(9): 524—526。
- [2] 杨英珍等, 1985, 上海医学, 8(3): 163—167。
- [3] 侯云德等, 1984, 中西医结合杂志, 4(7): 420—424。
- [4] 侯云德等, 1981, 中华微生物学和免疫学杂志, 1(2): 137—139。
- [5] 杨英珍等, 1985, 中国药理学报, 6(2): 102—106。
- [6] Norris D., et al., 1973, *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142: 133—136。