

地塞米松对培养大鼠搏动心肌细胞 感染 Coxsackie B-2 病毒的作用

杨英珍、郭 棋、金佩英、严国昌、潘柏申、浦寿月、陈灏珠

(上海市心血管病研究所、上海医科大学附属中山医院, 上海 200032, 中国)

沈菊英、彭宝珍、龚祖坝 (中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031, 中国)

Effect of dexamethasone on Coxsackie B-2 virus-infected rat beating heart cells in culture

YANG Ying-Zhen, GUO Qi, JIN Pei-Ying, YAN Guo-Chang, PAN Bai-Shen,
PU Shou-Yue, CHEN Hao-Zhu

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhong-shan Hospital, Shanghai Medical University,
Shanghai 200032, China)

SHEN Ju-Ying, PANG Bao-Zhen, GONG Zu-Xun

(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT The effects of dexamethasone (Dex) on cultured rat beating heart cells infected with 100 TCID₅₀ Coxsackie virus B-2 (CB₂V) were observed. The beating % began to decrease in the infected group 2 or 3 d post-challenge. Meanwhile, the cytopathic effect (CPE) appeared rapidly from 1+ to 3+. In the infected and Dex-treated group 1 h after inoculation, the beating % and CPE in the whole flask were significantly higher and less, respectively, than that in the group infected ($P < 0.05$) at the same intervals. At 5 d after challenge, the beating % in the whole flask was significantly higher than that in the infected group. The cardiac enzyme-aspartate aminotransferase (AST) in the infected group was higher than that in the infected and Dex-treated group ($P < 0.01$) through 3-5 d post-challenge.

Moreover, the AST levels in these 2 groups were also higher than that in the uninfected group. Dex control group at the

same intervals ($P < 0.01$).

Ultrastructural findings were parallel to the results of CPE through 1-5 d post-challenge in these 4 groups. It is suggested that the protective effect of Dex on cultured beating heart cells infected with CB₂V occurred in the early stages after infection. It is surmised that steroids can probably save the lives of patients with severe myocarditis if the conventional therapy for protecting the myocardium and improving immunity were administered together.

KEY WORDS dexamethasone; cultured rat myocardial cells; Coxsackie B viruses; viral cytopathogenic effect; aspartate aminotransferase; electron microscopy

提要 Coxsackie B-2 病毒感染培养搏动心肌细胞加地塞米松后 d 2-3 能使感染心肌细胞搏动%增多, 细胞病变及超微结构损害减轻, AST 释放减少, 病毒滴度降低, 在感染加药后 d 5, 除 AST 释放较低外, 其他保护作用基本消失。提示重症病毒性心肌炎患者宜在发病早期应用较大剂量肾上腺皮质激素, 结合一般支持疗法, 可能有挽救生命的意义。

Received 1988 Mar 11 Accepted 1988 Dec 12

关键词 地塞米松; 培养大鼠心肌细胞; 柯萨奇病毒 B, 病毒致细胞病变作用; 天冬氨酸氨基转移酶; 电子显微镜检查

小鼠感染 Cocksackie B 病毒(CBV)后予以肾上腺皮质激素(简称激素), 可使心肌内病毒复制增速, 心肌病变加剧⁽¹⁻³⁾。但在临床重症病毒性心肌炎患者中, 仍常使用激素, 疗效不一⁽⁴⁻⁶⁾。激素在培养心肌细胞的病毒性心肌炎模型中尚未见文献报道。本文旨在培养的搏动大鼠心肌细胞中感染 CBV-2 型(CB₂V)后加用地塞米松, 自心肌细胞搏动%, 细胞病变(CPE)、心肌酶的释放、病毒滴度及超微结构改变等角度, 了解激素在心肌细胞感染病毒后不同时期中的变化, 以探索某些急性病毒性心肌炎患者早期使用激素后能挽救生命的机理。

MATERIALS AND METHODS

出生 1-4 d 的 Sprague-Dawley 大鼠心脏, 用 0.1% 胰蛋白酶溶液分次消化细胞, 细胞制备同前文⁽⁷⁾。生长液用含 20% 小牛血清的 MEM Eagle's 液。CB₂V (ATCC VR-29) 在 Hep-2 细胞(人喉癌细胞)中传代 3 次, 在大鼠心肌细胞中测 50% 组织感染率(TCID-50), 地塞米松 5 mg/ml(上海信谊药厂)。

心肌细胞酶测定及形态学改变 分离到的细胞悬液贴壁 2 h 以去除部分内皮细胞后, 将未贴壁的心肌细胞分装为 2.5×10^6 /(4 ml·瓶)·37℃ 孵育 24 h 后, 心肌细胞以 80-100 bpm 规则地搏动, 弃上清液。感染组 8 瓶, 各加 2 ml 内含 100 个 TCID-50 的 CB₂V 生长液; 非感染组 8 瓶, 各加 2 ml 生长液。37℃ 孵育 1 h 后, 各瓶弃液, 感染及非感染组各取 4 瓶加地塞米松 125 μg(25 μl) 作为地塞米松对照及感染加地塞米松组。最后仍加生长液至每瓶总量达 4 ml。孵育 1, 2, 3 及 5 d 后, 4 组各取 1 瓶, 上清液作天冬氨酸氨基转移酶(AST)测定, AST 药箱购自 Gilford Diagnostics。同时记录各组的细胞搏动情况及细胞病变(CPE)。细胞

搏动%指整瓶贴壁细胞所有视野中同步搏动细胞的%。CPE 表示方法同前⁽⁸⁾。共 7 次实验, 每次 4 组, d 1, 2, 3, 5, 各 1 瓶共 16 瓶细胞, 即每组 d 1, 2, 3, 5 各 7 瓶细胞统计。

病毒滴度测定 上述 7 次实验中任取 1 次, 4 组细胞在分组后 d 1, 2, 3, 5, 各取 1 瓶分别在观察形态改变后取上清及细胞悬液(收集上清液后加等量(4 ml)生长液, 冻融 3 次), 在 Hep-2 细胞上测 TCID-50。

超微结构观察 各组细胞在上述时期观察形态改变后, 弃液, 用 2.5% 戊二醛固定细胞作电镜观察。电镜制备同前⁽⁸⁾。

RESULTS

细胞搏动%, CPE 及 AST 以感染天为 d 0。d 1 时, 各组心肌细胞的搏动良好, 无 CPE。d 2-3 时, 感染组搏动%明显下降, CPE 日趋加重, 感染+地塞米松组搏动%多于前组 ($P < 0.05$), CPE 亦较前组为轻。d 5 时, 感染+地塞米松组的细胞搏动%虽稍多于感染组, 但差异不显著 ($P > 0.05$), 两组 CPE 亦相似。其他两组则在整个观察期间心肌细胞均 100% 搏动, 且无 CPE (Fig 1, Plate 2)。

d 1 时, 感染+地塞米松组及地塞米松对照组的 AST 均高于其他两组 ($P < 0.01$); d 2 时, 各组间无明显差异; 而 d 3, d 5 时, 感染组 AST 高于感染+地塞米松组 ($P < 0.01$), 但此两组又均高于非感染及地塞米松对照组 ($P < 0.01$), 后两组间无明显差异 ($P > 0.05$, Tab 1)。

病毒滴度的改变 在 d 1-3 时, 不论在上清液或细胞悬液中, 感染组的病毒滴度均高于感染+地塞米松组, 但在 d 5 时, 则两组的病毒滴度均相似 (Tab 2)。

超微结构改变 经过较大量的电镜照片分析比较后, 可以发现非感染及地塞米松对照两组在整个实验过程中, 心肌细胞超微结构均属正常 (Fig 2-A, Plate 3)。心肌细胞感染 CB₂V 2 d 后出现细胞核局部畸变、部分线粒体膨胀、

Tab 1. Effect of dexamethasone on aspartate aminotransferase (AST), beating % and cytopathic effect in Coxsackie virus B-2 infected rat heart cells in culture. n=7, $\bar{X} \pm SD$. *** $P < 0.01$ B, D vs A, C, C vs D; †† $P < 0.01$ C, D vs A, B. ‡‡ $P < 0.05$ C vs D. § $P > 0.05$ A vs B, D vs C. † $P > 0.05$ vs C.

Parameter	Group	d 1	d 2	d 3	d 5
AST (U/L)	A, Uninfected Control	44±9	43±12 [†]	42±14 [§]	43±9
	B, Dex Control	53±13 ^{***}	49±11 [†]	43±12	40±10
	C, Infected Control	45±10	51±15	64±16 ^{***†††}	69±10 ^{***}
	D, Infected, Dex-treated	52±12 ^{***}	48±9 [†]	55±10 ^{†††}	57±16 ^{†††}
Beating (%)	A	100	100	100	100
	B	100	100	100	100
	C	100	74±16 ^{‡‡}	35±20 ^{†††}	7.9±8
	D	100	94±4 [§]	62±20 ^{†††}	19±18 [§]
Cytopathic effect	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
	C	-	± - + +	+ + - + + +	+ + + - + + + +
	D	-	± - +	± - + +	+ + + - + + + +

Cytopathic effect: - no lesion, ± lesions involving less than 25% of the myocytes, + lesions involving 25% of the myocytes, ++ lesions involving 50% of the myocytes, +++ lesions involving 75% of the myocytes, ++++ nearly 100% of myocytes.

Tab 2. Inhibitory effect of dexamethasone (Dex) on Coxsackie virus B-2 (CB₂V)*.

Hep-2 cells	Cell pellet	Supernatant
1 d CB ₂ V	12 [†]	7
CB ₂ V + Dex	9.25	5.5
2 d CB ₂ V	10.75	6.5
CB ₂ V + Dex	8	5.5
3 d CB ₂ V	10.25	5.75
CB ₂ V + Dex	8.5	5.25
5 d CB ₂ V	6.5	4.75
CB ₂ V + Dex	6.5	4.75

*100 TCID-50 †ig TCID-50.

闰盘不同程度解离,感染后 d 3, 细胞核明显畸变, 有时可观察到肌原纤维的 Z 线排列不很规则, 亦不够清晰, 多数线粒体内嵴结构模糊 (Fig 2-B)。感染后 d 5, 肌原纤维少见, 部分呈断裂状, Z 线不清楚, 线粒体结构模糊, 不见内嵴和外膜 (Fig 2-C)。感染 + 地塞米松组在感染 d 3 后肌原纤维排列整齐, Z 线清晰, 细胞核结构及外形基本正常 (Fig 2-D), 但个别细胞亦有细胞核畸变, 闰盘局部解离等改变, 在 d 5 时肌原纤维出现断裂, Z 线不清晰, 核膜

模糊等改变 (Fig 2-E), 与感染组相似。

DISCUSSION

我院在 19 例重症急性病毒性心肌炎患者中, 发现激素治疗开始时间距感染 < 10 d 者, 症状好转快, 死亡少, 随访中无后遗症。> 30 d 者, 病情未见好转, 死亡率高, 提示在感染早期应用激素较晚期应用为佳, 且能挽救生命 (未发表资料)。本实验结果与上述临床结果有所符合。地塞米松的生物半衰期为 36-72 h⁽⁹⁾。为此, 我们在感染天加入前述剂量地塞米松后, 于实验 d 1、d 2 或 d 3, 不换液而又加一剂地塞米松; 或感染当天不加地塞米松, 而在实验 d 1、d 2 或 d 3 才加一剂地塞米松, 在实验 d 5 时, CPE 及搏动 % 均分别轻于及高于在感染天投一剂地塞米松组, 尤以实验 d 2 或 d 3 增加一剂作用为最显著, 甚至在感染 d 6 后细胞的搏动仍良好, 这与地塞米松的生物活性有关。因此时该药的作用仍继续存在。如感染后 d 1~2 才开始每日或隔日投药, 则仍可有作用, 但作用较差; 而感染后 d 3 用药, 因该时很多心肌

细胞已死亡,也无法发挥药物的作用。此项补充实验更支持临床用药宜在早期,并每日给药效疗为佳。实验中曾观察到所用地塞米松剂量 $>125 \mu\text{g}/(2.5 \times 10^6 \text{ 细胞} \cdot 4 \text{ ml})$, 尤其是 $400 \mu\text{g}/(2.5 \times 10^6 \text{ 细胞} \cdot 4 \text{ ml})$ 时,在光镜下对感染 d 2-3 的心肌细胞仍有相似保护作用,但心肌细胞浆内出现空泡。在地塞米松对照组中也有同样毒性反应。小于此剂量,则对感染早期的心肌细胞保护作用较差。又本文中用地塞米松 1 d, 不论在感染或非感染心肌细胞中,AST 均高于非感染及感染组,其机理不明,但投药后 2 d 此作用即消失。单加地塞米松的心肌细胞在整个观察期间,超微结构也无明显改变,对整个实验无明显影响,因此本文采用此剂量级观察,虽然此剂量级范围较窄,但在机体中,与培养细胞不尽相同,人类心肌代偿功能庞大,临床上用大剂量激素很少见到明显毒性反应。因此,如病情严重时,及早每日使用较大剂量激素,使之安度难关,以后则给予适当治疗,按患者自身抵抗力及免疫功能情况,可能恢复或死亡,由此可解释急性心肌炎患者用激素疗效不一致的原因。

实验结果支持在急性病毒性心肌炎早期,除采用一般支持疗法外,同时加用短程较大剂

量激素,有可能挽救生命这一论点。

REFERENCES

- 1 Lerner AM. Virus myopericarditis. *Ann Intern Med* 1968; 69 : 1068
- 2 Rytel MW, Kilbourne ED. Differing susceptibility of adolescent and adult mice to non-lethal infection with coxsackievirus B₃. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 137 : 443
- 3 Tomioka N, Kishimoto C, Matsumori A, Kawai C. Effects of prednisolone on acute viral myocarditis in mice. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7 : 868
- 4 Sainani GS, Krompotic E, Slodki SJ. Adult heart disease due to the Coxsackie virus B infection. *Medicine* 1968; 47 : 133
- 5 Lerner AM. Coxsackie virus cardiomyopathy. *J Infect Dis* 1969; 120 : 496
- 6 Voigt GC. Steroid therapy in viral myocarditis. *Am Heart J* 1968; 75 : 575
- 7 Yang YZ, Dyke JW. Coxsackie B₃ virus infection in rat beating heart cell culture. *J Virol Methods* 1985; 12 : 217
- 8 Yang YZ, Guo Q, Jin PY, et al. Ultrastructural alterations of the myocardial cells in rat beating heart cell culture infected with Coxsackie B₃ virus. *Natl Med J China* 1985; 85 : 524
- 9 Rose LI, Saccar C. Choosing corticosteroid preparations. *Am Fam Physician* 1978; 17 : 198

First China-Japan Joint Meeting on Pharmacology

"Education and research"

1989 Sep 4-6

Shanghai

Please contact Professor W H Lee, c/o Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China.