维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号：0253-3626(2002)01-0016-03

# 病毒性心肌炎心肌线粒体结构功能变化及大剂量维生素C干预作用

陈建斌，饶邦复，常　静，廖晓岗
（重庆医科大学临床学院内科 重庆 400016）

【摘　要】目的：探讨病毒性心肌炎(VMC)小鼠心肌线粒体结构和功能，并用大剂量维生素C进行干预。方法：雄性Balb/c小鼠随机分为柯萨奇$B_3$病毒（$CVB_3$）感染组（IG）、$CVB_3$感染加大剂量维生素C治疗组（IVG）和对照组（CG）。采用电镜和形态计量学方法观察心肌线粒体形态、数量和膜磷脂定位，用酶细胞化学法分析心肌线粒体细胞色素氧化酶（CCO）和琥珀酸脱氢酶（SDH）活性。结果：IG小鼠心肌线粒体大量破坏，CCO和SDH活性降低，膜磷脂严重缺失、定位改变（$P$ <0.05~0.01）。不同时相点IVG上述各项指标均较IG显著改善（$P$ <0.05~0.01）。结论：VMC心肌线粒体结构严重破坏、功能明显下降，大剂量维生素C能有效保护心肌线粒体结构和功能。

【关键词】病毒性心肌炎；线粒体；维生素C
【中国图书分类法分类号】R542.2　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2001-08-29

## The effects of high dosage vitamin C on myocardial mitochondrial structure and function in mice with viral myocarditis

*CHEN Jianbin, et al*
*(Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)*

【Abstract】 *Objective*: To explore the changes of myocardial mitochondrial structure and function in mice with viral myocarditis,and to observe the interventional effects of high dosage vitamin C. *Methods*: The male Balb/c mice were randomly divided into three groups:coxsackie $B_3$ virus($CVB_3$) infection group(IG), $CVB_3$ infection group with high dosage vitamine C treatment (IVG) and control group(CG). The morphology, membrane phospholipid, as well as activities of cytochrome oxidase(CCO) and succinate dehydrogenase(SDH) of myocardial mitochondria were studied by using transmission electron microscope,morphometry and enzyme cytochemical method respectivly. *Results:* As compared to CG, a large number of mitochondria of IG was damaged, the activities of CCO and SDH of mitochondria declined,the apparent mitochondrial membrane phospholipid deletion and localization change were observed ( $P$ < 0.05 ~0.01). All of these were improved significantly in IVG ($P$<0.05 ~0.01). *Conclusion*: The myocardial mitochondrial structure was damaged apparently and its funtions declined obviously in viral myocarditis.High dosage vitamin C can have effects against myocardial mitochondrial structure damage and function decline.

【Key words】 Viral myocarditis; Mitochondria; Vitamin C

心脏是动力器官，心肌舒缩功能的顺利完成有赖于充足的ATP供给。线粒体是心肌的主要产能细胞器，其结构和功能状态直接决定ATP的生成量。新近研究发现，病毒性心肌炎(VMC)心肌细胞存在能量转移和利用障碍[1]。但是否同时存在能量生成障碍，国内外研究甚少。本实验动态观察小鼠急性VMC心肌线粒体结构和酶活性变化，探讨VMC心肌是否存在能量生成障碍,并用大剂量维生素C干预治疗，旨在为VMC发病机制和防治措施研究提供一点新的启示。

## 1　材料与方法

### 1.1　动物分组与心肌炎模型制作

6－8周龄近交系雄性Balb/c小鼠70只，体重18－20克。随机分为柯萨奇$B_3$病毒（$CVB_3$）感染组(IG)、$CVB_3$感染加大剂量维生素C治疗组（IVG）和对照组（CG）。IG和IVG均分设感染后第3天（6只）、14天（11只）及30天（13只）三个时相点，CG（10只）只设30天一个时相点作总体对照。IG和IVG每只小鼠腹腔接种含$CVB_3$的MEM Eagle液0.1ml($TCID_{50}$ $10^5$)，CG每只小鼠腹腔接种不含$CVB_3$的MEM Eagle

作者介绍：陈建斌（1965-　），男，副教授，博士，
主要研究方向：心肌疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com



液0.1ml。从接种病毒即日起，IG每只小鼠腹腔注射0.1ml生理盐水，每天一次；IVG每只小鼠腹腔注射2%维生素C注射液（150mg/kg），每天一次；至各时相点结束。弃用实验过程中死亡小鼠。各时相点结束时处死存活小鼠，速取心肌组织，根据不同检测指标制作相应标本。

1.2 指标检测

1.2.1 心肌线粒体结构和立体定量 心肌标本经4%戊二醛固定，常规电镜制片，H-600型透射电镜观察。每例心肌标本均在$2\times10^4$倍随机拍摄20张，采用计点法对线粒体立体计量[2]。求取线粒体体密度（Vv）、面数密度（$N_A$），平均周长(cm)及平均面积（Am）。

1.2.2 心肌线粒体膜磷脂超微结构定位[3]

心肌标本（约40μm厚）经2%戊二醛固定12h、置三合固定液（0.1mmol/L 硝酸铅和0.1mmol/L 铁氰化钾等比混合液）40min（15℃），1%锇酸固定2h（4℃）。电镜超薄切片不经铅铀染色，H-600型透射电镜观察。固定$2\times10^4$倍，每例心肌标本随机拍摄10张。计数线粒体总数，并按线粒体内外膜及嵴膜完全定位和大部分定位，小部分定位和完全缺失分别计算相应线粒体所占百分比。

1.2.3 心肌线粒体CCO、SDH酶活性测定

分别采用Seligman法[4]和Ogawa法[5]对心肌线粒体CCO和SDH酶细胞化学染色。电镜切片不经铅染色。每例心肌标本在$2\times10^4$倍随机拍摄10张。TECBLAS-6803图像分析系统测定每张照片CCO和SDH酶反应产物平均灰度。

1.3 统计学分析

计量资料用$\bar{x}\pm s$表示，采用$t$检验。计数资料用百分比表示，采用$\chi^2$检验。$P<0.05$差异有显著意义，$P<0.01$差异有非常显著意义。

## 2 结 果

2.1 病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体结构和形态明显改变

小鼠接种$CVB_3$第3天，部分线粒体轻度肿胀，少数线粒体体积缩小、嵴浓缩，无破坏、溶解，线粒体增生；$N_A$增多，Cm和Am扩大，Vv增加。第14天肌丝大量破坏区，线粒体也主要表现为破坏、溶解，而部分线粒体高度肿胀区域，肌丝受压，溶解、破坏不明显；$N_A$减少、Cm和Am进一步扩大，Vv进一步增加；心肌内大量脂滴聚积。第30天心肌线粒体肿胀减轻，破坏减少，大量髓样结构形成，区域性增生。IG第3天、14天及30天心肌线粒体形态计量各参数与CG比较差异均有显著性（$P<0.05$~0.01）；各时相点IVG心肌线粒体形态计量各参数与IG比较差异均有显著性（$P<0.05$~0.01）（表1）。

2.2 病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体膜磷脂缺失、定位改变

IG心肌线粒体膜磷脂定位第3天与CG比较无明显改变（$P>0.05$）；第14天线粒体膜磷脂定位明显变化：部分线粒体磷脂失去嵴膜、内外膜定位，在线粒体基质散在分布或聚集呈团块，部分线粒体嵴模糊、磷脂减少，膜磷脂完全和大部分定位线粒体百分比下降、小部分定位和完全缺失百分比增加（$P<0.01$）；第30天与第14天比较，心肌线粒体膜磷脂定位无明显改善（$P>0.05$）。第14天和30天，IVG心肌线粒体膜磷脂定位均好于同期IG（$P<0.05$~0.01）(表2)。

2.3 病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体酶活性降低

酶活性与反应产物平均灰度呈反比。IG第3天心肌线粒体CCO及SDH反应产物平均灰度即明显升高、第14天进一步升高，第30天较第14天降低，与CG比较均存在显著性差异（$P<0.01$）。IVG心肌线粒体CCO及SDH反应产物平均灰度均低于同时相点IG（$P<0.05$~0.01）(表3)。

表1 病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体形态变化

| 组 别 | 时间（d） | 鼠数 | NA (n/μm²) | Cm(μm) | Am(μm²) | Vv(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组(CG) | 30 | 5 | 0.73 ± 0.04 | 2.68 ± 0.54 | 0.51 ± 0.02 | 38.78 ± 4.57 |
| 感染组(IG) | 3 | 5 | 0.81 ± 0.05* | 3.43 ± 0.66* | 0.58 ± 0.03* | 43.36 ± 7.75* |
| | 14 | 5 | 0.55 ± 0.04** | 4.97 ± 0.87** | 0.72 ± 0.05** | 48.64 ± 11.8** |
| | 30 | 5 | 0.61 ± 0.04** | 3.99 ± 0.12** | 0.65 ± 0.08** | 39.41 ± 6.62 |
| 治疗组(IVG) | 3 | 5 | 0.81 ± 0.07 | 2.98 ± 0.46 | 0.55 ± 0.04 | 41.35 ± 4.16 |
| | 14 | 5 | 0.68 ± 0.03▲▲ | 4.02 ± 0.39▲ | 0.65 ± 0.04▲ | 43.41 ± 7.6▲ |
| | 30 | 5 | 0.69 ± 0.05▲ | 3.45 ± 0.87▲ | 0.59 ± 0.02▲ | 40.37 ± 8.09 |

注：NA 面数密度，Cm 平均周长，Am 平均截面积，Vv体密度。不同时相点IG与CG比较：
*$P<0.05$, **$P<0.01$; 同时相点IVG与IG比较：▲$P<0.05$,▲▲$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com



表2 病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体膜磷脂定位变化

| 组 别 | 时间(d) | 鼠数 | 完全和大部分定位(%) | 小部分定位和完全缺失(%) |
|---|---|---|---|---|
| 对照组(CG) | 30 | 5 | 92.7 | 7.3 |
| 感染组(IG) | 3 | 5 | 89.7 | 10.3 |
| | 14 | 5 | 45.3** | 54.7** |
| | 30 | 5 | 52.7** | 47.3** |
| 治疗组(IVG) | 3 | 5 | 91.0 | 9.0 |
| | 14 | 5 | 67.6 ▲▲ | 32.4 ▲▲ |
| | 30 | 5 | 71.7 ▲▲ | 28.3 ▲▲ |

注：不同时相点IG与CG比较：**$P < 0.01$；
同时相点IVG与IG比较：▲▲$P < 0.01$

表3 病毒性心肌炎小鼠心肌线粒体CCO和SDH反应产物平均灰度变化

| 组 别 | 时间(d) | 鼠数 | CCO | SDH |
|---|---|---|---|---|
| 对照组(CG) | 30 | 5 | 43.06 ± 3.84 | 28.64 ± 1.47 |
| 感染组(IG) | 3 | 5 | 61.27 ± 2.71** | 40.83 ± 2.17** |
| | 14 | 5 | 109.23 ± 8.81** | 87.28 ± 5.93** |
| | 30 | 5 | 67.87 ± 3.45** | 65.81 ± 3.21** |
| 治疗组(IVG) | 3 | 5 | 55.36 ± 3.98▲ | 34.36 ± 1.91▲ |
| | 14 | 5 | 74.81 ± 2.44▲▲ | 54.31 ± 4.07▲▲ |
| | 30 | 5 | 60.27 ± 4.37▲ | 49.46 ± 1.64▲▲ |

注：不同时相点IG与CG比较：**$P < 0.01$；
同时相点IVG与IG比较：*$P < 0.05$ ▲▲$P < 0.01$

## 3 讨 论

小鼠接种$CVB_3$第3天心肌线粒体轻度肿胀、增生；第14天大量线粒体破坏、高度肿胀；第30天线粒体肿胀减轻，区域性增生，大量髓样结构形成；部分区域线粒体和肌丝病变不同步。线粒体是膜性细胞器，磷脂是膜的重要组成成分。磷脂组成、结构及功能直接影响线粒体内环境、膜上功能蛋白质构象和活性。Halliwell等指出，膜磷脂损伤是细胞结构变化的最初表现形式[6]。Robinson等用Triton处理线粒体膜磷脂后，CCO活性消失，加入心磷脂CCO活性部分或完全恢复[7]。Chien等认为细胞不可逆损伤的关键环节是膜磷脂的丢失[8]。$CVB_3$感染第14天，膜磷脂完全和大部分定位线粒体百分比下降，部分线粒体嵴模糊、磷脂减少。第30天虽然心肌线粒体肿胀明显减轻，但膜磷脂定位与第14天比较无明显改善，提示线粒体膜磷脂缺失和定位改变是不可逆性损伤。实验发现部分肿胀、破坏不严重的线粒体膜磷脂也发生了严重缺失、定位改变，提示VMC心肌线粒体实际病变比常规电镜观察严重。心肌线粒体膜磷脂缺失、定位改变势必影响其功能。

CCO、SDH位于线粒体内膜，为线粒体标志酶。SDH是三羧酸循环的关键酶，催化琥珀酸脱氢；CCO是线粒体两条重要呼吸链的关键酶，参与氧化磷酸化。$CVB_3$感染第3天，心肌线粒体CCO及SDH活性就明显降低，而此时线粒体结构无明显破坏，膜磷脂定位良好，提示$CVB_3$感染后心肌线粒体CCO、SDH活性降低发生早，它可能是VMC心肌细胞早期生化改变之一。第14天心肌线粒体SDH、CCO活性进一步降低，心肌内大量脂滴聚积，与此时心肌线粒体大量破坏、高度肿胀，膜磷脂大量缺失、定位改变相符。第30天心肌线粒体SDH、CCO活性较第14天有所恢复，但与对照组比较仍存在显著性差异，可能与线粒体数量减少，膜磷脂缺失、定位改变和酶蛋白分子结构变化为不可逆性损伤有关。

线粒体是心肌产能中枢，而其酶活性则是产能的关键因素。本实验结果提示：$CVB_3$感染后心肌线粒体CCO、SDH活性下降早于线粒体结构明显改变、线粒体结构改变（肿胀、破坏、膜磷脂缺失与定位改变）导致CCO、SDH活性进一步降低；VMC急性期后部分线粒体CCO、SDH活性持续低下。线粒体结构破坏、活性下降导致ATP生成减少，前者既可能参与了VMC急性期心功能不全的发生，又可能是VMC急性期后心功能恢复不全，甚至发展成扩张型心肌病的重要因素。

维生素C能提供电子，故可作为自由基清除剂[9]。心肌体外培养发现在培养基中加入维生素C，培养基脂质过氧化反应终产物丙二醛含量降低，病毒滴度下降，心肌活力增强，死亡减少[10]。维生素C抗氧自由基能力与剂量正相关，大剂量维生素C抗氧自由基能力超过超氧化物歧化酶[11]。本实验大剂量维生素C（150mg/kg）治疗组（IVG）与感染组（IG）比较：心肌线粒体肿胀减轻，破坏减少，膜磷脂定位改善，线粒体CCO、SDH活性增强。提示VMC早期予以大剂量维生素C治疗能有效保护线粒体结构功能。

（下转第22页）

维普资讯 http://www.cqvip.com



DC结合，从而可促进DC分泌IL-12，而IL-12又可刺激T细胞的增殖，通过DC与T细胞的相互作用，就使得免疫反应得到进一步增强。借助细胞因子诱生的CML-DC，可刺激PBMC为CTL细胞。通过对其杀伤自身靶细胞（CML细胞）的能力的观察，证明经诱导14天的DC细胞刺激的CTL对自身CML细胞有明显的杀伤活性，同时也能对其它肿瘤细胞（HL-60）起作用，但效果不如前者。而诱导7天的CML-DC作用不明显，可能是因为7天的DC还未成熟的缘故。

在培养上清中检测出较高水平的IL-12，证实CML-DC可分泌IL-12。随后，将这种CML-DC刺激经自身CML细胞作用的PBMC细胞，于刺激72h后可检测到IFN-γ。IFN-γ的分泌可能与CML-DC诱导的对靶细胞的杀伤作用有关。因为IFN-γ能增强CTL和NK细胞杀伤靶细胞的能力。同时分泌的IFN-γ又能明显增加抗原提呈细胞表达MHC'类抗原，增强抗原提呈细胞与T细胞的相互作用。进而增强T细胞辅助抗体产生和辅助细胞毒T细胞产生的能力。通过相互作用，进一步扩大免疫应答。

以上的实验结果证明，急变期CML的细胞在细胞因子的诱导能生成DC。更重要的是，用这种DC可诱导出特异性杀伤自身CML细胞的CTL细胞，为白血病的免疫治疗提供了理论依据。

## 参 考 文 献


[1] 朱学军，楼国良，张明徽，等. 人急性早幼粒细胞白血病细胞诱导分化生成树突状细胞的体外研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，1998; 3:247-252.

[2] Choudhury A, Gajewski JL, Liang JC, et al. Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemia cellular cytotoxicity against philadelphia chromosome positive chromic myelogenous leukemia. Blood[J]. 1997; 89:1133-1139.

[3] 王黎明，陈姗姗，刘艳荣，等. 慢性髓性白血病来源的树突状细胞的功能研究[J]. 中国实验血液学杂志，2000;8:161-165.

[4] Frigu B, Chariance LD ,Payes J,et al. A convenient enzymelinked immunosorbent assay for testing wheather monoclonal antibodies recognize the same antigentic site[J]. J Immunol Method, 1983; 60:351-358.

[5] Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, et al. Dendritic cell derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autolegous, antileukemic T cell response[J]. Blood, 1999; 93:780-786.


（上接第18页）

## 参 考 文 献


[1] Witzenbicher B,Christman C,Schulze K,et al.Disturbance of the myocardial energy metabolism in A.SW/snj mice after viral infection (Coxsackie virus $B_3$)[J]. J Am Coll Cardiol.1991;17:264A.

[2] 郑富强. 细胞形态立体计量学[M]. 北京：人民卫生出版社，1990;157.

[3] 邵英杰、陈念祖，马爱群，等. 磷脂在大鼠心肌线粒体上的超微结构定位方法[J]. 解剖学杂志. 1992;15(1):36-37.

[4] Seligman AM,Karnovsky MJ,Wasserkrug HL,et al. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine(DAB) [J].J Cell Biol.1968;38:1-13.

[5] Ogawa K, Saito T, Mayabara H. The site of femicyianide reduction by reductase with mitochondria as studied by electron microscopy[J]. J Histochem Cytochem.1968;16(1):49-54.

[6] Halliwell B,chirico S.Lipid peroxidation:its mechanism, measurement,and significance[J].Am Clin Nutr,1993;57(s):715-719.

[7] Robinson NC.Specificity and binding affinity of phospholipids to the high affinity cardiolipin sities of beef heart cytochrome oxidase[J].Biochemistry.1982;21:184-192.

[8] Chien KR.Accelerated phospholipid degraration and associated membrance dysfunction in irreversible ischemic liver cell injury[J].J Biochem,1978;253: 4809-4816.

[9] Prasad K.Effect of oxygen free radical on cardiovascular function at organ and cellular levels[J].Am Heart J ,1989;117:1196-1198.

[10] 张福明，张淑琴，王相峰. 维生素C、E对病毒感染细胞活性的影响[J]. 营养学报，1996;18(4):489-491.

[11] Rose RC.Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals:a radiation model[J].Biophys Res Commun,1990;169(2):430-433.