维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)03－0231－04

卡托普利对小鼠病毒性心肌炎心肌离子泵功能和钠钙代谢影响

陈建斌, 刘 琼, 饶邦复, 常 静

(重庆医科大学临床学院肾内科 重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨病毒性心肌炎心肌离子泵功能及钠钙含量变化,并用卡托普利进行干预。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 感染加卡托普利治疗组(ICG)及对照组(CG)。在不同病程分别测定心肌 Na^+, K^+－ATPase、Ca^{2+}－ATPase 活性、心肌钠钙含量及组织病理变化。结果:与 CG 比较,IG 心肌 Na^+, K^+－ATPase、Ca^{2+}－ATPase 活性明显下降($P<0.01$),钠钙含量显著升高($P<0.01$),并早于心肌结构变化。ICG 上述各项指标较 IG 显著改善($P<0.05$),心肌炎症、坏死也明显减轻($P<0.05$)。结论:心肌离子泵功能下降,反常性 Ca^{2+} 超载可能是造成病毒感染后心肌继发性损伤的重要因素;卡托普利能明显保护病毒性心肌炎心肌离子泵功能,降低心肌钠钙含量,改善心肌组织结构,促进预后。

【关键词】病毒性心肌炎;离子泵;钠;钙;卡托普利

【中国图书分类法分类号】R542.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2000－11－20

The effects of captopril on myocardial ionic pump functions and sodium and calcium concentrations in mice with viral myocarditis

CHEN Jian－bin, et al

(Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: To explore the changes of myocardial ionic pump functions and sodium and calcium concentrations in mice with viral myocarditis, and to observe the intervention effects of captopril on them. ***Methods***: The male Balb/c mice were randomly divided into three groups: infected coxsackie B_3 virus (CVB_3) group (IG), infected CVB_3 and treated with captopril group (ICG) and control group (CG). The activities of myocardial Na^+, K^+－ATPase and Ca^{2+}－ATPase, the concentrations of myocardial sodium and cation as well as the myocardial pathologic changes were investigated in different periods. ***Results***: As compared to CG, the activities of myocardial Na^+, K^+－ATPase and Ca^{2+}－ATPase of IG declined ($P<0.01$), the concentrations of myocardial sodium and calcium of IG increased ($P<0.01$), and these changes were observed prior to myocardial histologic abnormalities. All of these changes were obviously improved in ICG ($P<0.05$), the myocytes necrosis and the myocytes inflammatory cells infiltration were reduced ($P<0.05$). *Conclusion*: The inhibition of ionic pump functions and Ca^{2+} overload in Captopril can protect myocardial ionic pump functions, reduce concentrations of myocardial sodium and calcium, ameliorate the myocardial histologic structure and improve the prognosis in viral myocarditis.

【Key word】 Viral myocarditis; Ionic pump; Sodium; Calcium; Captopril

心肌 Ca^{2+} 超载是许多心血管疾病的重要致病因子。有研究显示病毒感染后心肌胞膜 Ca^{2+} 通透性增加[1];卡托普利能减少缺氧复氧心肌 Ca^{2+} 内流,减轻细胞损伤[2]。而病毒性心肌炎(VMC)心肌是否存在离子泵功能障碍和 Ca^{2+} 超载,以及卡托普利能否改善 VMC 心肌离子泵功能、减轻心肌

作者介绍:陈建斌(1965－),男,副主任医师,博士。主要研究方向:心脏疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

Ca^{2+}超载尚无相关文献报道。本文通过复制小鼠 VMC 模型，观察急性期心肌 Na^+，K^+－ATPase、Ca^{2+}－ATPase 活性，心肌钠钙含量及组织结构的动态变化，并用卡托普利进行干预治疗。旨从新的途径探讨 VMC 发病机制，为临床患者治疗提供相关实验佐证。

1 材料与方法

1.1 实验小鼠分组

6～8 周龄雄性 Balb/c 小鼠 70 只，体重(20±2)g。随机分为柯萨奇 B_3 病毒(CVB_3)感染组(IG)、CVB_3 感染加卡托普利治疗组(ICG)及对照组(CG)。IG 及 ICG 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 只设 30 天(10 只)一个时相点作总体对照。

1.2 病毒接种与治疗

IG 及 ICG 组小鼠腹腔接种(ip)含 CVB_3 的 MEM Eagle 液($TCID_{50}10^7$)0.1ml，CG 每只小鼠 ip 无 CVB_3 的 MEM Eagle 液 0.1ml。从接种病毒即日起，IG 每只小鼠 ip 生理盐水 0.1ml，每天 1 次；ICG 每只小鼠 ip1% 卡托普利注射液(50mg/kg)，每天 1 次。IG 及 ICG 小鼠治疗直至各时相点结束。

1.3 心肌标本制作

弃用实验过程中死亡小鼠。IG、ICG 及 CG 各时相点结束时处死所有存活小鼠。取心脏，除去大血管及心外膜，去净各心腔血液后置于 0.25mol/L 蔗糖－0.01mol/L 咪唑盐酸介质液(4℃，pH7.4)充分洗涤。取心尖心肌约 20mg 置 4℃ Dhalla 液(经离子交换树酯处理的 0.3mol/L 蔗糖－0.05mol/L 组氨酸，pH7.4)洗涤 5min×3 次，拈干称重，液态保存，供钠、钙含量测定；取适量心肌 10% 甲醛固定，石蜡包埋，供光镜检查；其余心肌加入预冷(4℃)匀浆液(0.25mol/L 蔗糖－0.1mol/L 磷酸盐－0.001mol/L 依地酸二钠，pH7.4)，冰浴中制成 5% 匀浆，离心(4℃，4000r×10min)，上清液－20℃保存，供离子泵功能测定。

1.4 心肌炎症及坏死面积半定量分析 参照 Rezkalla 法[3]。每张切片在 200 放大倍数随机取 5 个视野，分别测炎症(I)、坏死(N)面积占整个视野百分比。无炎症、坏死记 0 分，<25% 计 1 分，25%～50% 计 2 分，50%～75% 计 3 分，>75% 计 4 分。

1.5 心肌 Na^+，K^+－ATPase、Ca^{2+}－ATPase 活性测定 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.6 心肌钠、钙测定 采用原子吸收分光光度法。

1.7 数据处理及统计学分析 计算资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，采用 t 检验。计数资料用百分数表示，采用 χ^2 检验。$P<0.05$ 有显著性差异，$P<0.01$ 有极显著性差异。

2 结 果

2.1 病毒性心肌炎小鼠一般情况

小鼠接种 CVB_3 第 3 天开始出现症状，表现为松毛、懒动、食欲下降，重者拒食。第 5 天后上述症状加重，部分小鼠死亡，第 7～14 天为死亡高峰。各时相点结束时各组小鼠存活率情况：IG 第 14 天 46%(5/11)，第 30 天 39%(5/13)；ICG 第 14 天 73%(8/11)，第 30 天 69%(9/13)；CG 无死亡。ICG 第 14 天、30 天存活率均高于同期 IG ($P<0.05$)。

2.2 心肌组织病理变化

肉眼观察感染 CVB_3 小鼠部分心脏扩大、心肌张力差、心外膜心肌有白色点状、条纹状及斑块状病灶。光镜下小鼠接种 CVB_3 第 3 天心肌结构基本正常，偶见肌纤维蜡样变，无坏死及炎性细胞浸润。第 14 天大量心肌变性、坏死，炎性细胞浸润，成纤维细胞增生。第 30 天心肌变性、坏死及炎性细胞浸润减少，胶原纤维增多。半定量分析 IG 第 30 天心肌坏死、炎症面积均较第 14 天小($P<0.01$)。第 14 天及 30 天 ICG 心肌坏死及炎症面积均较同期 IG 小($P<0.05$)(表 1)。

表 1 病毒性心肌炎小鼠心肌炎症及坏死病变半定量分析结果($\bar{x}\pm s$)

组别	时间(天)	鼠数(只)	炎症	坏死
IG	14	5	2.5±0.4	2.7±0.6
	30	5	1.4±1.1▲▲	1.6±0.5▲▲
ICG	14	8	1.4±0.6**	1.6±1.0**
	30	9	0.6±0.4**	0.7±0.4**

注：IG 第 30 天与第 14 天比较 ▲▲$P<0.01$；同病程 ICG 与 IG 比较 **$P<0.01$。

IG：病毒感染组；ICG：病毒感染加卡托普利治疗组。

2.3 心肌 Na^+，K^+－ATPase 及 Ca^{2+}－ATPase 活性变化

与 CG 比较，IG 心肌 Na^+，K^+－ATPase、Ca^{2+}－ATPase 活性第 3 天就明显降低，第 14 天进一步下降，第 30 天有所恢复，均存在显著性差异($P<0.01$)。ICG 心肌 Na^+，K^+－ATPase、Ca^{2+}－ATPase 活性均高于同期 IG 相应值($P<0.05$)表 2。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 病毒性心肌炎小鼠心肌 Na^+,K^+ - ATPase 及 Ca^{2+} - ATPase 活性变化

($\bar{x} \pm s$, μM·Pi/mg·prot·h)

组 别	时间(d)	鼠数(只)	Na^+,K^+ - ATPase	Ca^{2+} - ATPase
CG	30	10	26.13±3.41	6.89±0.79
IG	3	6	20.36±2.25★★	4.73±0.22★★
	14	5	10.53±2.23★★△△	2.76±0.45★★△△
	30	5	16.33±1.37★★▲	3.87±0.71★★▲
ICG	3	6	21.73±1.11★	5.85±0.28★*
	14	8	13.05±3.85★★*	3.71±0.57★★*
	30	9	20.35±1.21★★*	5.85±0.39★**

注:IG、ICG 与 CG 比较★ $P<0.05$, ★★$P<0.01$;IG 第 14 天与第 3 天比较 △△ $P<0.01$;IG 第 30 天与第 14 天比较 ▲ $P<0.05$;同病程 ICG 与 IG 比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$。

CG:对照组;IG:病毒感染组;ICG:病毒感染加卡托普利治疗组。

表 3 病毒性心肌炎小鼠心肌钠钙测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	钠(mg/g 心肌干重)			钙(μg/g 心肌干重)		
	3d	14d	30d	3d	14d	30d
CG	-	-	3.48±0.38 ($n=10$)	-	-	3.92±0.28 ($n=10$)
IG	4.91±0.82★★ ($n=6$)	8.07±0.82★★△△ ($n=5$)	5.54±0.40★★▲▲ ($n=5$)	9.20±0.65★★ ($n=6$)	13.10±1.09★★△△ ($n=5$)	10.98±0.85★★▲▲ ($n=5$)
ICG	4.09±0.26* ($n=6$)	6.25±0.22★★** ($n=8$)	4.14±0.42** ($n=9$)	5.15±0.30★** ($n=6$)	6.25±0.22★★** ($n=8$)	4.57±0.49** ($n=9$)

注:IG,ICG 与 CG 比较 ★ $P<0.05$, ★★ $P<0.01$;IG 第 14 天与第 3 天比较 △△ $P<0.01$;IG 第 30 天与第 14 天比较 ▲▲ $P<0.01$;同病程 ICG 与 IG 比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$。

CG:对照组;IG:病毒感染组;ICG:病毒感染加卡托普利治疗组。

2.4 心肌钠钙测定结果

IG 第 3 天心肌钠钙含量就明显升高,第 14 天进一步加剧,第 30 天较第 14 天下降,与 CG 比较均有显著性差异($P<0.05$)。ICG 心肌钠、钙含量均较 IG 同期相应值低($P<0.05$)(表 3)。病毒感染后心肌钙上升幅度明显大于钠上升幅度。IG 第 3 天钙钠含量分别为 CG 相应值的 2.35 倍和 1.42 倍,第 14 天分别为 3.34 倍及 2.33 倍。并且钙含量下降速度明显落后于钠含量下降速度,第 30 天二者分别为 CG 相应值的 2.82 倍及 1.6 倍。

3 讨 论

心肌离子泵主要存在于膜性结构中,其功能的顺利完成有赖于本身分子结构的完整、脂膜微环境稳定及充足的能量供给。本实验显示 CVB_3 感染早期(第 3 天)心肌 Na^+,K^+ - ATPase、Ca^{2+} - ATPase 活性就明显降低,在急性期随病程进展进一步降低,后期虽有所恢复但仍明显低于健康鼠。提示病毒感染后心肌离子泵功能下降,部分是不可逆性损伤。病毒吸附、复制可直接导致细胞膜、细胞器膜破坏;病毒感染后心肌内外产生大量氧自由基(OFR),OFR 除与膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化损伤外,还可攻击离子泵、竞争离子泵上 ATP 结合位点[4];线粒体结构破坏、功能下降,ATP 生成减少等均可导致离子泵功能下降。

心肌胞膜 Na^+,K^+ - ATPase 活性下降,胞内 Na^+ 不能外排。病毒吸附穿入可使心肌膜电导性及渗透性增加,膜 L 型慢通道改变,大量胞外 Na^+ 顺离子梯度进入胞内。胞内 Na^+ 潴留,心肌水肿,导致细胞电兴奋性及电传导性障碍、线粒体功能下降、细胞酶蛋白分子空间结构改变和心肌舒缩功能下

维普资讯 http://www.cqvip.com

降。胞内 Na^+ 浓度升高，可激活 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交换系统[5]，VMC 机体产生的抗腺苷酸转位酶抗体与胞膜 Ca^{2+} 通道发生交叉反应致通透性增加[6]，OFR 可在心肌胞膜形成病理性 Ca^{2+} 通道[7]等。这些因素促成心肌 Ca^{2+} 内流增加，胞内 Ca^{2+} 超载。Ca^{2+} 超载的直接或间接后果：①促使 OFR 产生；②与磷酸根结合形成磷酸钙沉积于线粒体内膜，干扰 ATP 生成；③激活蛋白激酶、磷酯酶，心肌结构破坏；④引起心肌过度收缩，膜、润盘撕裂，膜通透性增加，大量酶及蛋白质外溢，终致细胞死亡。

本实验病毒感染后卡托普利治疗组(ICG)与病毒感染组(IG)比较：心肌 Na^+，$K^+ -$ ATPase、$Ca^{2+} -$ ATPase 活性升高，钠钙含量降低，细胞死亡减少，炎症反应减轻，小鼠生存率提高。这些疗效的取得可能与卡托普利能消除 OFR[8]，抑制心肌胞膜病理性 Ca^{2+} 通道和 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交换系统形成[2,9]，刺激前列腺素合成[10]，降低心肌血管紧张素 II 浓度[11]，增加心肌血供，调节免疫反应[12]等多种药理作用有关。

小鼠感染 CVB_3 早期(第 3 天)心肌 Na^+，$K^+ -$ ATPase、$Ca^{2+} -$ ATPase 活性就明显降低，钠钙含量即显著升高，而此时光镜下心肌结构基本正常。提示病毒感染后心肌生化异常早于形态学改变；离子泵功能障碍，Na^+、Ca^{2+} 超载可能是造成继发性心肌损伤、心功能下降的重要原因；给予纠正生化异常的措施能明显减少心肌损伤、改善心功能、促进预后。对于临床 VMC 患者如无禁忌症可考虑早期给予卡托普利治疗。

参 考 文 献

[1] Tominaga M, Maturni A, Horie M, et al. Activation of Ca－permeable cation channels by myocaditis－associated antibody in guina pig ventricular myocytes[J]. Clin Invest, 1993; 94(9): 231－233.

[2] Wang J, Zhang PJ, Zhang L, et al. Effects of captopril and enalaprilat on intracellula Ca^{2+}, Na^+ contents and in hypoxic and reoxygenated cardiomyocytes[J]. Acta Pharmacol Sinica, 1997; 18 (2): 140.

[3] Rezkalla S, Kloner RA, Khaib GM, et al. Effect of metoprolol in acute coxsackie virus B_3 murine myocarditis[J]. Am Coll Cardiol 1998; 12(4): 412－414.

[4] Xu KY, Zweier Tl, Beck LC. Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} －ATPase function by direct attack on the ATP binding site[J]. Circ Res, 1997; 80: 76－79.

[5] Corderio JM, Holotett SE, Ferrier GR. Stimulated ischemia and reperfusion in isolated guina pig ventricular myocytes[J]. Cardiovasc Res, 1994; 28(2): 1794－1796.

[6] Kuhl U, Melznr B, Schafer B, et al. The Ca^{2+} －Channels as cardiac autoantigen[J]. Eur Heart J, 1991; 12(D): 99－101.

[7] Piper HM, Siegmumd B, Ladilov YU, et al. Calcium and sodium control in hypoxic－reoxygenated cardiomyocytes [J]. Basic Res Cardiol, 1993; 88: 471－474.

[8] Suzuki H, Matsumari A, Matoba Y, et al. Enhanced expression of superoxide dimutase messenger RNA in viral myocarditis, an SH－dependent reduction of its expression and myocardial injury[J]. Clin Invest, 1993; 91: 2727－2729.

[9] Chan PH. Role of oxidants in ischemia brain damage[J]. Stroke, 1996; 27: 1124－1127.

[10] Dusing R, Scherhag R, Landsberg O, et al. The converting enzyme hibitor captopril stimulates prostaglandin synthesis by isolated rat aorta[J]. Eur Pharmacol, 1983; 91: 501－504.

[11] Tan LB, Jalil JE, Janick JS, et al. Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II [J]. Circ Res, 1991; 69: 115－118.

[12] Tarkowski A, Carlsten H, Herlitz H, et al. Differential effect of captopril and enalapril, two angiotensin converting enzyme inhibitor, on immune reactivity in experimental lupus disease [J]. Agents Actions, 1990; 3: 96－98.