

[文章编号] 1007-3949(2002)10-06-0479-04

• 实验研究 •

苦瓜蛋白对 BALB/C 小鼠柯萨奇 B3 病毒性 心肌炎核因子 κ B 的调节作用

王 佐¹, 李双杰², 杨永宗³(1. 中南大学基础医学院, 湖南省长沙市 410078; 南华大学 2. 附属第一医院,
3. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)[主题词] 苦瓜蛋白; 心肌炎, 病毒性; 核因子 κ B; 心血管疾病模型/小鼠

[摘要] 为探讨苦瓜蛋白对 BALB/C 小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的治疗作用机制, 以核因子 κ B 为对象, 来观察苦瓜蛋白的调节作用。从苦瓜果肉中提取苦瓜蛋白后, 将动物分为 5 组: 病毒对照组、正常对照组、药物对照组、高剂量治疗组、低剂量治疗组, 分别在实验的第 0 d、3 d、7 d、14 d 和第 21 d 处死动物, 提取核蛋白, 在用 BCA 方法进行蛋白定量后作凝胶滞留分析(EMSA), 测定核因子 κ B 的活性, 并进行比较分析。结果发现, 病毒对照组在第 21 天时仍然有一定量的核因子 κ B 活化, 且其活化程度明显高于正常对照组; ④高、低剂量的苦瓜蛋白对核因子 κ B 表现出不同程度的抑制作用, 其中高剂量组核因子 κ B 几乎看不到活化, 低剂量组比病毒对照组核因子 κ B 活化程度明显降低; ④正常对照组和药物对照组核因子 κ B 只有低水平活化。结果提示, 苦瓜蛋白对病毒性心肌炎的治疗作用可能与其降低核因子 κ B 的活性有关。

[中图分类号] R961

[文献标识码] A

Regulation Effect of Momordicin to Nuclear Factor Kappa B Level of CVB3 Viral Myocarditis BALB/C Model

WANG Zuo¹, LI Shuang Jie², YANG Yong-Zong³

(1. The Basic Medical College of Zhongnan University; 2. The First Appendent Hospital of Nanhua University; 3. Cardiovascular Disease Research Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[MeSH] Momordicin; Viral Myocarditis; Nuclear Factor Kappa B; Cardiovascular Disease Model/mice

[ABSTRACT] **Aim** Our previous result showed that at the concentration of 25 mg/(kg·d), Momordicin has a distinct therapeutic effect on coxsackievirus B3 (CVB3) viral myocarditis. Because nuclear factor kappa B (NF- κ B) is Key factor in immunity and inflammatory reaction, we measure the regulation effect of Momordicin to the level of NF- κ B. **Method** To purified Momordicin from Momordica as our previous report, 5 groups of animal are used in this experiment: control of virus group (VC group); control of normal group (NC group); control of Momordicin group (MC group); low dose Momordicin therapeutic group (LM group); high dose monordicin therapeutic group (HM group). Animals were killed at 0 d, 3 d, 7 d, 14 d and 21 d, and purified nucleus protein, protein quantified by BCA method, then measuring the activity of EMSA and assys the result. **Result** The activity of NF- κ B are still measuerable in the DC group at 21 d, and it's activity is higher than the NC group; there are different degree of inhibition effect in HM and LM groups to NF- κ B activity, and nerely no NF- κ B was appeared in the HM and MC groups; there are low level NF- κ B acitivity were found in the NC group. **Conclusion** The curing effect of momordicin to viral myocarditis may related to it's inhibitory effect to NF- κ B activity.

柯萨奇 B3 型病毒(coxsackievirus B3, CVB3)是引起心肌炎的主要病毒, 而核因子 κ B 可被病毒、炎性介质等激活而从胞浆进入细胞核中, 调控炎症和免疫反应^[1], 调控细胞的增殖和凋亡相关基因^[2]的表达。因此认为, 核因子 κ B 是多种疾病的共同信号通路^[3], 研究核因子 κ B 与疾病发生及发展的关系是

一个十分诱人的课题。目前, 心肌炎与核因子 κ B 之间的关系尚不清楚。因此研究核因子 κ B 在 BALB/C 小鼠 CVB3 病毒性心肌炎的发生和发展过程中的活化情况, 明确两者之间的关系, 为病毒性心肌炎的治疗寻找新的、有价值的药物作用靶点, 研究苦瓜蛋白治疗病毒性心肌炎的机制, 同时从中草药中开发出新的、高效的抗病毒性心肌炎药物, 为充分利用我国的中草药优势, 促进我国自己的医药事业的发展, 都具有十分重要的意义。

[收稿日期] 2002-10-28 [修回日期] 2002-11-28

[基金项目] 国家自然科学基金(30070934)资助。

[作者简介] 王佐, 男, 1964 年 11 月出生, 湖南省衡阳县人, 生物化学副教授, 在读博士研究生。李双杰, 男, 1962 年 9 月出生, 湖南省邵阳市人, 博士后, 儿科学副教授。杨永宗, 男, 1937 年 10 月出生, 福建省仙游县人, 病理生理学教授, 博士研究生导师, 此文通信作者。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/C 小鼠由复旦大学实验动物部提供, 苦瓜蛋白由南华大学心血管病研究所研制, 色谱纯, 经 SDS-PAGE 电泳为一条带, 相对分子质量为 28 kDa。核蛋白提取、蛋白定量、EMSA、放射自显影都在中国科学院上海细胞生物研究所细胞与分子生物研究室完成, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, NP-40、HEPES、PMSF 购自北京利科, EDTA、DTT 购自上海生工, pepstatin、leupeptin、aprotinin 由张劲松博士惠赠, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 苦瓜蛋白剂量选择与动物分组

先在 HeP2 细胞上测定病毒的 TCID₅₀, 以 10³ TCID₅₀ 病毒为 1, 依次倍比稀释。苦瓜蛋白是从果肉提取的, 其毒性很低, 在 BALB/C 小鼠上的毒性实验证明, 其半致死量(LD₅₀)为 450 mg/(kg·d), 50 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白就已经没有毒性, 故使用 25 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白作高剂量治疗。所有试剂均从腹腔注射, 病毒只注射一次, 其余试剂从第 0 天开始注射到第 6 天, 所有动物在第 21 天处死, 取出心脏, 立即放入液氮中, 再转移到 -70℃ 冰箱中保存以备用。动物实验分为 5 组。正常对照组(normal control group, NC group): 0.1 mL 病毒稀释液; ④病毒对照组(virus control group, VC group): 0.1 mL 10⁻⁵ CVB3 病毒 + 0.1 mL 生理盐水; ④药物对照组(control of Momordicin group, MC group): 0.1 mL 25 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白 + 0.1 mL 病毒稀释液; 高剂量治疗组(high dose therapeutic group, HM group): 0.1 mL 10⁻⁵ CVB3 病毒 + 0.1 mL 25 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白; 低剂量治疗组(low dose Momordicin therapeutic group, LM group): 0.1 mL 10⁻⁵ CVB3 病毒 + 0.1 mL 1.79 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白。

1.3 心肌组织病变的显微结构分析

将小鼠心脏取出后分作三部分: 靠近心尖部分留作分子生物学分析; 靠近心房部分留作病毒检测、蛋白和酶分析等; 取心脏中间部分留作病理切片用。做病理切片的心肌部分先在 10% 的福尔马林中固定 24 h, 然后在 30% 的乙醇中保存, 按常规操作, 经脱水、包埋、切片、染色、封片、镜检。

1.4 核蛋白提取

参照 Zhang 等^[4] 和 Francois 等^[5] 方法稍加改正提取核蛋白。步骤如下: 称取 100 mg 心肌, 用冷 PBS 洗几次, 以洗去黏附在心肌上的血细胞, 然后放入 1.5 mL 的 EP 管中, 加入 0.5 mL A 液[配制如下: 10 mmol/L HEPES-KOH(pH7.9) + 1.5 mmol/L MgCl₂·6H₂O + 10 mmol/L KCl + 0.5 mmol/L DTT, 临用前加 1

mmol/L PMSF 和 10 mg/L Leupeptin、Aprotonin), 用眼科剪充分剪碎, 然后再用塑料棒匀浆 5 min, 4 000 r/min, 4℃ 离心 5 min, 去上清, -80℃ 放置 5 min。④再用 400 μL A 液重新悬浮, 吹打几次, 冰上放置 2 min。④加 6% 的 NP-40 至终浓度为 0.6%, 涡旋 4 min。台盼兰检验细胞破碎情况。5 000 r/min 离心 5 min, 上清转移到另一新的 EP 管中, 留作其它用途, 核沉淀物重新在 100 μL 冷 C 液[配制如下: 20 mmol/L HEPES-KOH(pH 7.9) + 0.42 mol/L NaCl + 1.5 mmol/L MgCl₂·6H₂O + 0.2 mmol/L EDTA + 25% (v/v) 甘油 + 0.5 mmol/L DTT, 临用前加 1 mmol/L PMSF 和 10 mg/L Leupeptin、Aprotonin] 中悬浮。4℃, 剧烈摇动 45 min。④15 kr/min 离心 10 min, 收集上清, 标记, -70℃ 保存。上述操作尽可能在冰上或 4℃ 下的低温中进行, 以尽量减少核蛋白的降解。

1.5 蛋白浓度检测

使用 Pierce Chemical 公司的 BCA 试剂盒检测。

1.6 凝胶滞留分析(Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSA)

核因子 κB 结合位点(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; Santa Cruz Biotechnology 公司合成), 并与其互补链退火, 退火条件是: 在 10 mmol/L Tris-HCl + 50 mmol/L NaCl + 10 mmol/L MgCl₂ + 1 mmol/L DTT 溶液条件下 90℃ 10 min → 65℃ 10 min → 37℃ 30 min。然后在 T4 多聚核苷激酶(Promega 公司)作用下用 γ-³²P-ATP(Amersham Pharmacia Biotech 公司)标记, 核蛋白与 DNA 结合反应在室温下进行, 反应 20 min, 反应体积 20 μL, 反应包含 5 μg 核蛋白, 10 m Tris-HCl (pH 7.5), 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5% 甘油, 1 mmol/L DTT, 1 μg poly(dI-dC) 作非竞争性抑制剂, 40 μg 牛血清白蛋白, 然后在 DNA-核蛋白聚合物加 2 μL 上样缓冲液(配制如下: 50 mmol/L Tris + 0.38 mol/L 甘氨酸 + 2 mmol/L EDTA + 20 mmol/L 溴酚兰)在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(恒压 200 V, 电泳时使用循环冷却, 温度控制在 4℃)约 2~3 h, 然后剥胶、保鲜膜包好, 干胶控制在 2 h 并充分抽干, 以防止蛋白条带扩散, -70℃ 放射自显影过夜再洗片分析结果。

1.7 竞争性抑制实验

按照文献[4]介绍的方法进行。实验分 4 组:³²P 标记核因子 κB 寡聚核苷酸探针组; 非标记 AP1 寡聚核苷酸探针组; 低剂量(2 μg/L) 非标记核因子 κB 寡聚核苷酸探针组; 高剂量(50 μg/L) 非标记寡聚核苷酸探针组。

2 结果

2.1 苦瓜蛋白对实验病毒性心肌炎的治疗作用

病毒对照组可见大量的炎性细胞浸润和部分心肌组织坏死, 呈现典型的病毒性心肌炎改变(图 1, Figure 1); 而苦瓜蛋白治疗组炎性细胞浸润及心肌细胞坏死均少见(图 2, Figure 2)。提示苦瓜蛋白对病毒性心肌炎的良好治疗作用。

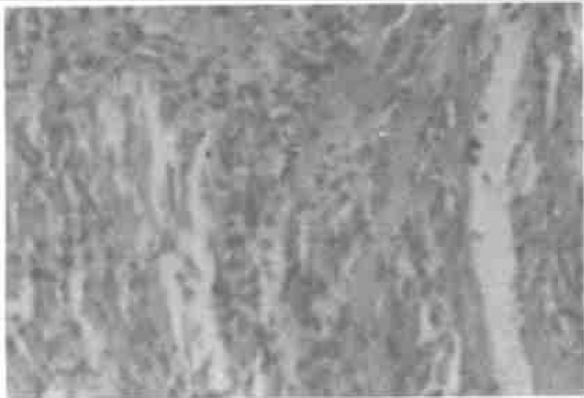


图 1. 病毒对照组心肌(10×20)HE 染色图. 注射病毒浓度为 10^5 病毒, 14 d 后可见大量的炎性细胞浸润和部分心肌坏死。

Figure 1. Myocardium at 14 d of the disease control group stained with HE (10×20). A lot of inflammatory cells infiltration and necrotic myocardocyte can be seen.

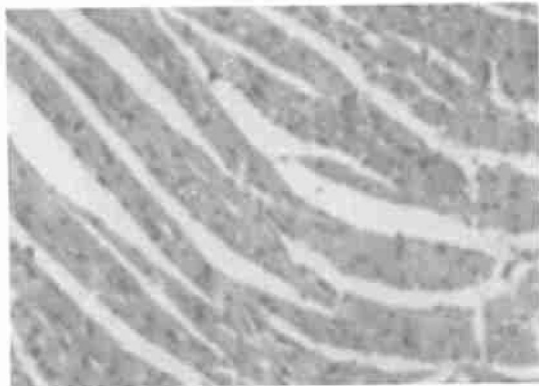


图 2. 高剂量[25 mg/(kg. d)] 苦瓜蛋白治疗组(10×20). 炎性细胞浸润和心肌坏死少见。

Figure 2. Myocardium at 14 d of the high dose Momordicin therapeutic group stained with HE (10×20). Less inflammatory cells infiltration and necrotic myocardocyte can be seen.

2.2 核因子 κ B 在病毒性心肌炎不同时间点的活性变化

正常对照组只有小量的核因子 κ B 活化, 病毒对照组在第 0、3、7、14 和第 21 天 5 个不同时间点核因子 κ B 的活化程度均高于正常对照组(图 3, Figure 3)。且其第 0 天(6 h) 的活性明显高于其它各时间点, 第 3、7、14 和第 21 天之间相差不明显。图像灰度分析结果表明, 第 7、21 天比第 3、14 天的活性

稍高出一些, 而且以第 7 天的活性最高。

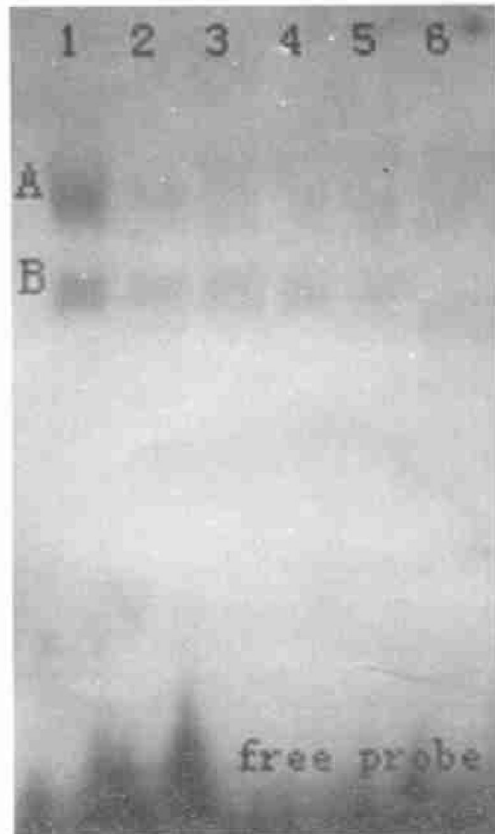


图 3. 病毒对照组的 EMSA 分析图. 第 1 到 6 道分别是: 第 0 天、第 3 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天和正常对照组。

Figure 3. EMSA Photo of the disease control group at different day. From 1st to 6th line was zero day, the 3rd day, the 7th day, the 14th day, the 21st day and normal control group, respectively.

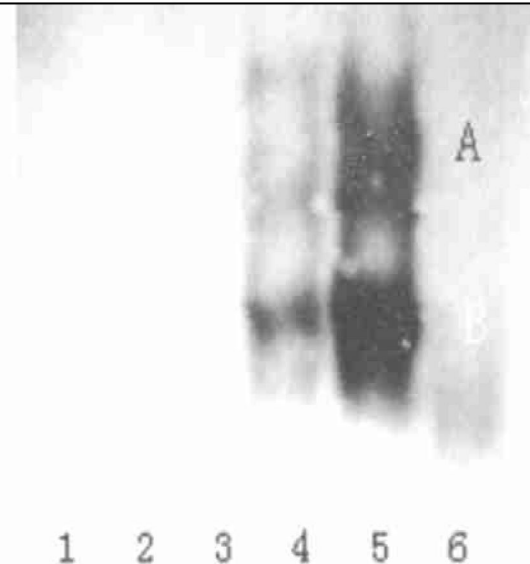


图 4. 苦瓜蛋白对核因子 κ B 抑制作用的 EMSA 图. 第 1 至第 6 道分别是: 药物对照组(1)、阴性对照组(2)、高剂量治疗组(3)、低剂量治疗组(4)、病毒对照组(5)、正常对照组(6)。

Figure 4. EMSA photo which show the inhibition effect of Momordicin to the activity of NF κ B. From 1st line to 6th line is the MC group, the negative group, the HM group, the LM group, the VC group, and the NC group, respectively.

2.3 苦瓜蛋白对核因子 κ B 活化的抑制作用

高、低剂量的苦瓜蛋白对核因子 κ B 有不同程度的抑制作用(图 4, Figure 4),表现出剂量效应。在高剂量治疗组,核因子 κ B 几乎看不到活化,低剂量组比病毒对照组核因子 κ B 活化程度明显降低;正常对照组有少量的核因子 κ B 活化,药物对照组核因子 κ B 几乎不活化,因此更说明了苦瓜蛋白确实具有较强的抑制核因子 κ B 活化的作用。

从图 3 和图 4 中至少可以看出有两种类型的核因子 κ B 被活化,如标记所示,“A”主要是 P65-P50 的异二聚体,“B”主要是 P50-P50 同二聚体。

2.4 苦瓜蛋白抑制核因子 κ B 活化的特异性分析

核因子 κ B 的竞争抑制结果见图 5 (Figure 5),可见所获得的结果是特异的。非标记的核因子 κ B 寡聚核苷酸探针在低剂量(2 μ g/L)时已经表现出对核因子 κ B 的竞争性抑制作用,而其在高剂量(50 μ g/L)时则完全把核因子 κ B 上的位点竞争掉,相反,同样浓度(50 μ g/L)的非标记 AP1 寡聚核苷酸探针竞争作用较弱。



图 5. 核因子 κ B 的竞争抑制图。1: 非标记 AP1 寡聚核苷酸探针组(50 μ g/L); 2: 32 P 标记核因子 κ B 寡聚核苷酸探针组; 3: 2 μ g/L 非标记的核因子 κ B 寡聚核苷酸探针组; 4: 50 μ g/L 非标记的核因子 κ B 寡聚核苷酸探针组。

Figure 5. Competition inhibition photo of NF- κ B. 1: none labeled AP1 oligonucleotide (50 μ g/L); 2: the NF- κ B oligonucleotide labeled with 32 P; 3: 2 μ g/L none labeled oligonucleotide of NF- κ B; 4: 50 μ g/L none labeled oligonucleotide of NF- κ B.

3 讨论

采用柯萨奇 B3 型病毒(CVB3)敏感动物 BALB/C 小鼠,从腹腔注射病毒,是制造 CVB3 病毒性心肌炎模型的经典方法^[5,6]。炎性细胞浸润和心肌细胞

坏死是病毒性心肌炎,特别是急性病毒性心肌炎最具特征性的病理生理变化。众多的细胞因子参与其中。核因子 κ B 是近年来研究得较多得核因子,它在调节免疫和炎性反应中发挥很大的作用。病毒性心肌炎是指嗜心性病毒感染引起的,以心肌非特异性间质性炎症为主的病变,目前把心肌炎和核因子 κ B 联系在一起的文献很少,而有关病毒性心肌炎过程中有关核因子 κ B 活性变化还未见报道。

苦瓜(Momordica charantia L)为葫芦科植物苦瓜果实,性味苦寒,有清暑涤热、明目解毒等功效。用于热病烦渴喜饮、中暑、痢疾、赤眼疼痛、痈肿丹毒、恶疮等症^[7]。最近国内外学者从苦瓜果肉、种仁中分离纯化出多种成分,发现有明显的抗病毒、抗肿瘤、调节免疫等多种生物活性^[8],具有很高的药用价值。苦瓜蛋白(Momordicin)是我们利用离心、超滤、盐析及现代色谱技术从苦瓜果肉中分离的一种蛋白质,其相对分子质量约 28 kDa,我们在细胞和动物水平上分别证实了它的抗 CVB3 病毒作用和对急性 CVB3 型病毒性心肌炎的治疗作用^[9,10]。

我们首先发现 CVB3 病毒致病病毒性心肌炎过程中核因子 κ B 表现出持续活化;苦瓜蛋白通过抑制核因子 κ B 的活化而起到明显的治疗病毒性肌炎的作用。我们据此推测核因子 κ B 可能与 CVB3 病毒性心肌炎及其继发性病变相关联,并可能成为病毒性心脏病治疗的一个潜在的、有价值的靶点。

[参考文献]

- Caamano J, Hunter CA. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev*, 2002, **15** (3): 414-429
- 孙强明. 病毒与细胞凋亡. 国外医学病毒学分册, 2001, **8** (3): 78-81
- Bottex-Gauthier C, Pollet S, Favier A, et al. The Rel/NF- κ B transcription factors: complex role in cell regulation. *Pathol Biol (Paris)*, 2002, **50** (3): 204-211
- Zhang JS, Feng WG, Li CL, et al. NF- κ B regulates the LPS-induced expression of interleukin 12 p40 in murine peritoneal macrophages: roles of PKC, PKA, ERK, p38 MAPK, and proteasome. *Cell Immunol*, 2000, **204**: 38-45
- Matsumori A, Kawai C, Sawada S, Yamamoto K. Experimental coxsackievirus B3 perimyocarditis in the right ventricle in BALB/c mice: a one-year follow-up study. *Jpn Circ J*, 1980, **44** (10): 842-847
- Matsumori A, Kawai C. Coxsackie virus B3 perimyocarditis in BALB/c mice: experimental model of chronic perimyocarditis in the right ventricle. *J Pathol*, 1980, **131** (2): 97-106
- 江苏新医学院编. 中药大词典(上册). 上海:上海科学出版社, 1986; 1 281-282
- Francois Deryckere, Frank Gammon. A One-hour miniperparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *BioTechniques*, 1994, **16** (3): 405
- 王佐, 李双杰, 杨永宗. 苦瓜蛋白的分离纯化及其体外抗 CoXB3 型病毒作用的研究. 南华大学学报(医学版), 2002, **30** (1): 1-3
- 李双杰, 张宝林, 邓晖, 等. 苦瓜蛋白体外抗柯萨奇 B3 病毒感染. 湖南医科大学学报, 1999, **24** (6): 583-584

(此文编辑 胡必利)