

## 苦瓜蛋白对柯萨奇 B3 病毒性心肌炎小鼠 半胱天冬酶 3 活性及凋亡的抑制作用

王 佐<sup>1</sup>, 李双杰<sup>2</sup>, 杨永宗<sup>3</sup>

(1. 中南大学湘雅医学院病理生理学系, 湖南省长沙市 410078;

2. 南华大学附属第一医院儿科; 3. 南华大学医学院心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理生理学; 苦瓜蛋白对柯萨奇 3 型病毒性心肌炎的治疗作用机制; DNA 片断原位末端标记法; 半胱天冬酶 3; 心肌细胞凋亡; 柯萨奇 3 型病毒; 病毒性心肌炎小鼠模型; 苦瓜蛋白

[摘要] 为研究苦瓜蛋白对凋亡的关键酶半胱天冬酶 3 及凋亡的调节作用, 用已经建立起来的方法从苦瓜果肉中提取苦瓜蛋白。将 BALB/C 小鼠分为 4 组: 病毒对照组、正常对照组、药物对照组和药物治疗组, 分别在第 0 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天各处死 5 只小鼠, 第 21 天全部处死动物, 心肌组织半胱天冬酶 3 活性测定按照 CAL-BIOCHEM 公司的试剂说明书进行, 并稍加改正, 凋亡鉴定按照 Oncogene 公司的 TdT-DNA 裂解片断末端原位标记试剂说明书进行。结果发现, 病毒对照组第 7 天开始出现半胱天冬酶 3 活性( $0.63 \pm 0.21$  pmol/min,  $n=5$ ), 第 14 天的活性( $10.9 \pm 1.5$  pmol/min,  $n=5$ )显著高于第 7 天, 第 21 天的活性( $12.6 \pm 1.3$  pmol/min,  $n=5$ )又高于第 14 天。④药物治疗组, 只有一个第 21 天的标本有半胱天冬酶 3 活性( $0.41$  pmol/min), 其它两组均未检测到此酶的活性。④DNA 裂解片断末端原位标记法发现, 病毒对照组在第 7 天心肌中有少数细胞凋亡, 第 14 天、第 21 天凋亡细胞明显增多, 在非病变区域可发现单个凋亡的心肌细胞。治疗组未发现凋亡细胞, 其它两组也未发现凋亡细胞。结果提示, CVB3 病毒性心肌炎中发现有明显的凋亡现象, 凋亡和半胱天冬酶 3 发现于第 7 天, 且随着时间增加而逐渐加重(增强); 苦瓜蛋白可显著抑制半胱天冬酶 3 和凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Inhibitory Effects of Momordicin on the Activity of Caspase 3 and Apoptosis of Myocardium in BALB/C Mice with Coxsackievirus B3 Myocarditis

WANG Zuo<sup>1</sup>, LI Shuang-Jie<sup>2</sup>, and YANG Yong-Zong<sup>3</sup>

(1. Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College of Central South University, Changsha 410078; 2. The First Affiliated Hospital of Nanhua University; 3. Institute of Cardiovascular Disease, Medical College of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Coxsackievirus B3; Myocarditis; Viral; Caspase 3; Cardiac Muscle Cell Apoptosis; Momordicin; BALB/C Mice

[ABSTRACT] **Aim** To measurement the inhibitory effect of Momordicin on the activity of caspase-3 and apoptosis of myocardium in BALB/C mice with coxsackievirus B3 myocarditis. **Method** Momordicin was purified from Momordica charantia L by our previous reported methods. Four group animals were used in this experiment, such as disease group (DG), normal group (NG), Momordicin group (MG), and Momordicin therapy group (MTG). Five animals were killed at the 3rd, the 7th, and the 14th days in each group, and all were killed at the 21st day. According to the method of Calbiochem Company, the activity of caspase-3 from the heart of BALB/C mice was measured, and apoptosis was measured by terminal transferase mediated DNA nick end labeling assay (TUNEL, the method provided by Oncogene Company). **Results** The activity of caspase-3 were measurable at the 7th day in the DG ( $0.63 \pm 0.21$  pmol/min,  $n=5$ ). The activity of caspase-3 at the 14th day ( $10.9 \pm 1.5$  pmol/min,  $n=5$ ) and the 21st day ( $12.6 \pm 1.3$  pmol/min,  $n=5$ ) are higher than the 7th day, and the activity of the 21st was higher than 14th day ( $P < 0.05$ ). ④Only a animal has the activity of caspase-3 at the 21st day ( $0.41$  pmol/min) in the HTG, no caspase-3 activity were detected in the animals of MG and NG. ④Only a few apoptotic cells were found at the 7th day in the DG, and more apoptotic cells were found among cardiac muscles at 14th and 21th days. Single apoptotic cardiomyocytes were also found at the outside of the pathological change areas, and no apoptotic cells were found in the animals of NG, MG, and MTG. **Conclusions** Distinct apoptosis were found in CVB3 viral myocarditis; the activities of caspase-3 and apoptosis were found at the 7th day, and higher after the 7th day, single apoptotic cardiomyocytes were also found. The high dose Momordicin has distinct inhibitory effect on the activity of caspase-3 and apoptosis.

[收稿日期] 2003-01-06 [修回日期] 2003-03-19

[基金项目] 国家自然科学基金(30070934)资助

[作者简介] 王佐,男,1964年出生,湖南省衡阳县人,生物化学副教授,博士研究生。李双杰,男,1962年出生,湖南省邵阳市人,博士后,儿科科学副教授。杨永宗,男,1937年出生,福建省仙游县人,病理生理学教授,博士研究生导师,本文通讯作者。

柯萨奇病毒(coxsackievirus, CV)是引起病毒性心肌炎的主要病毒,其致病机制主要在于病毒和宿主之间的相互作用<sup>[1]</sup>。然而,至今为止,对 CVB3 病毒致急、慢性心肌炎的机制仍不是很清楚<sup>[2]</sup>。文献[3]报道,苦瓜蛋白对 CVB3 病毒性心肌炎有很好的治疗作用,高剂量苦瓜蛋白[25 mg/(kg·d)]可以维持感染 CVB3 病毒的 BALB/C 小鼠保持 100% 的生存率。病理切片结果发现,经苦瓜蛋白治疗后,心肌大部分没有病变,即使少数有病变,但相对于疾病对照组而言,程度也很轻。凋亡是不同于坏死的一种重要的病理现象,随着研究的深入,越来越多的证据支持 CVB3 病毒性心肌炎中存在凋亡现象<sup>[4,6]</sup>,故研究苦瓜蛋白对凋亡途径中的关键酶和对凋亡本身的调节作用,有助于弄清苦瓜蛋白治疗病毒性心肌炎的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

BALB/C 小鼠由复旦大学实验动物部 SPF 级实验室提供,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,分子质量为 28 kD,半胱天冬酶 3 ELISA 测定试剂盒系 CAL-BIOCHEM 公司产品, DNA 片段末端标记凋亡检测试剂盒为 Oncogene 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 动物分组及处理

动物分为 4 组: 正常对照组注射 0.1 mL 病毒稀释液; ④病毒对照组注射 0.1 mL  $10^{-5}$  CVB3 病毒 + 0.1 mL 生理盐水; ④药物对照组注射 0.1 mL、剂量为 25 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白; 药物治疗组注射 0.1 mL  $10^{-5}$  CVB3 病毒 + 0.1 mL、剂量为 25 mg/(kg·d) 苦瓜蛋白。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℃ 冰箱中保存备用。病毒活性定量和苦瓜蛋白浓度定量方法参考文献[3]进行。

### 1.3 半胱天冬酶 3 活性测定

按照 CALBIOCHEM 公司的试剂说明书测定半胱天冬酶 3 活性。分为 5 组: 阳性对照组为半胱天冬酶 3 标准液 15  $\mu$ L, 分析缓冲液 75  $\mu$ L, 底物 10  $\mu$ L, 反应总体积 100  $\mu$ L; ④阴性对照组为半胱天冬酶 3 标准液 15  $\mu$ L, 分析缓冲液 55  $\mu$ L, 底物 10  $\mu$ L, 半胱天冬酶 3 抑制剂 20  $\mu$ L; ④样品对照组为分析缓冲液 80  $\mu$ L, 疾病组织样品 20  $\mu$ L; 空白对照组为分析缓冲

液 90  $\mu$ L, 底物 10  $\mu$ L; 待测样品组为分析缓冲液 70  $\mu$ L, 底物 10  $\mu$ L, 疾病组织样品 20  $\mu$ L。分别于第 3、7、14 和第 21 天进行测定,每次测 5 个动物心肌组织。首先测得转换因子(转换因子 = 50  $\mu$ mol/L 波长 405 nm 吸光度的平均值),然后依据转换因子计算活性,活性(pmol/min) = 斜率( $\Delta A/\text{min}$ )  $\times$  转换因子  $\times$  分析体积( $\mu$ L)。

### 1.4 DNA 裂解片段原位末端标记

根据 Oncogene 公司试剂盒的说明书进行操作。其大致过程如下,心肌切片先在柠檬酸盐溶液中加热活化,然后用蛋白酶 K 消化以暴露 DNA,在末端转移酶介导下,用连接碱性磷酸盐的 dUTP 对 DNA 裂解部分进行标记,然后再用免疫组织化学方法显色,并以 DNA 酶 1(1 kU/L, 37℃ 下 30 min) 处理正常心肌组织作为阳性对照。

## 2 结果

### 2.1 半胱天冬酶 3 活性测定结果

测得转换因子为 490.20  $\mu$ mol/L,测得半胱天冬酶 3 活性如表 1 所示(Table 1)。可见正常对照组、药物对照组和药物治疗组均未检测到半胱天冬酶 3 的活性,病毒对照组从第 7 天开始检测到半胱天冬酶 3 活性,在第 7 天后半胱天冬酶 3 活性急剧增加,第 14 天和第 21 天的半胱天冬酶 3 活性明显高于第 7 天( $P < 0.01$ ),第 14 天后半胱天冬酶 3 的活性增加幅度明显减慢,但两者之间仍然有显著差别( $P < 0.05$ )。

表 1. 各组动物半胱天冬酶 3 活性(pmol/min)测定结果

Table 1. The activity of caspase 3 in each group animal

分 组	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天
正常对照	0	0	0	0
药物对照	0	0	0	0
病毒对照	0	0.63 $\pm$ 0.21	10.9 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	12.6 $\pm$ 1.3 <sup>ab</sup>
药物治疗	0	0	0	0

a:  $P < 0.05$ , 与第 14 天比较; b:  $P < 0.01$ , 与第 7 天比较。

### 2.2 DNA 裂解片段原位末端标记法结果

原位末端标记免疫组织化学检测发现,通过与 HE 染色病理切片比较,病毒对照组心肌病变严重者的动物在第 7 天开始出现轻微的凋亡(图 1, Figure 1),第 14 天和第 21 天逐渐加重(图 2, Figure 2),正常对照组、药物对照组和药物治疗组未见任何凋亡细胞出现,早期凋亡细胞主要集中在心肌靠近外膜的

部分(图 2), 后期凋亡细胞主要集中在坏死区域, 非坏死区域也发现单个心肌细胞凋亡。药物治疗组未见凋亡细胞(图 3, Figure 3)。



图 1. 病毒对照组第 7 天心肌横切面(100×) DNA 裂解片断原位末端标记法显色, 可见在心肌外膜部分有少量细胞凋亡。

Figure 1. The result of TUNEL analysis at the 7th day of the disease group

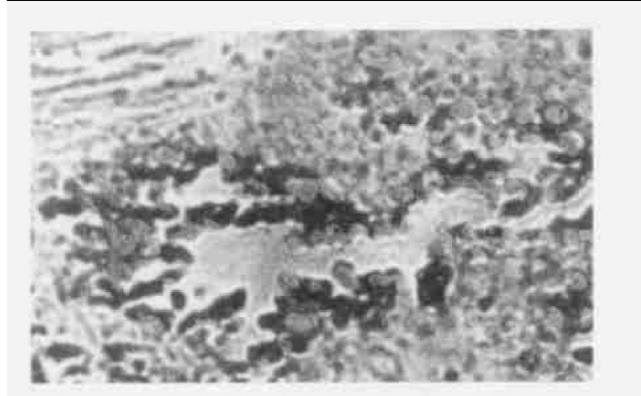


图 2. 病毒对照组第 14 天心肌横切面(100×) DNA 裂解片断原位末端标记法显色, 在心肌细胞坏死区域和靠近坏死区域可见大量的凋亡细胞, 非病变区域, 可见散在的单个细胞凋亡。

Figure 2. The result of TUNEL analysis at the 14th day of the disease group

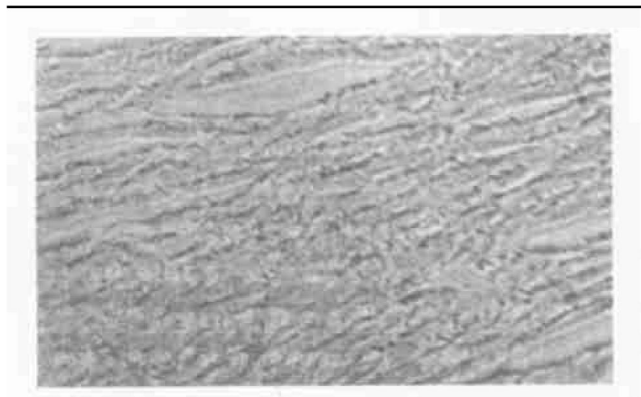


图 3. 药物治疗组第 14 天心肌横切面(100×) DNA 裂解片断原位末端标记法显色, 心肌细胞形态正常, 未见凋亡细胞。

Figure 3. The result of TUNEL analysis at the 14th day of the Momordicin therapy group

### 3 讨论

自从发现线虫(*Caenorhabditis elegans*)的 CED 蛋白与哺乳动物的白细胞介素 1 $\beta$  转换酶(ICE)有相似作用以来<sup>[7]</sup>, 已经有 13 种半胱天冬酶家族成员先后被发现或克隆<sup>[8]</sup>。半胱天冬酶(caspase)受到了越来越多的学者的重视, 其主要分为启动型和执行型, 前者接受死亡信号、启动凋亡或激活下游的分子, 后者则降解细胞骨架、蛋白质、核酸等。半胱天冬酶 3 位于天冬氨酰酶传导通路的下游, 属于执行型半胱天冬酶, 其可以直接剪切 PARP, 引起 DNA 的降解。Enari 等<sup>[9]</sup>在小鼠淋巴细胞中发现了半胱天冬酶激活型脱氧核糖酶(caspase activated deoxyribonuclease, CAD)及其抑制物 ICAD。CAD 含 343 个氨基酸, 平时以休眠状态稳定结合 ICAD。半胱天冬酶 3 剪切 ICAD 后, 释放出 CAD, 后者进入细胞核内降解 DNA。因此半胱天冬酶 3 的活性是反映凋亡与否的一个较为准确的分子指标。

病毒性心肌炎与细胞凋亡之间的关系现在已经引起越来越多学者的关注, 病毒与凋亡之间的关系较为复杂, 一些病毒可以诱使细胞凋亡, 而一些病毒(如腺病毒)可以抑制凋亡<sup>[10]</sup>。病毒诱使凋亡主要通过两种方式, 一种方式是当细胞受病毒感染后, 病毒自身通过感染诱发细胞和体液免疫反应产生细胞因子, 通过细胞因子再诱导凋亡, 另外一种方式是机体本身为防御病毒, 通过 T 淋巴细胞识别及诱发病毒感染细胞凋亡。

由于所使用病毒的种类、体内或体外实验、所用动物材料的种类以及组织的类型, 关于病毒性心肌炎心肌细胞是否凋亡的争论长达 6~7 年<sup>[11]</sup>, Henke 等<sup>[12]</sup>、Huber 等<sup>[13]</sup>和 Gebhard 等<sup>[14]</sup>最先在实验性小鼠 CVB3 病毒性心肌炎模型上发现心肌组织中有凋亡的细胞, 且凋亡细胞可在炎症区域内外发现, 但未说明是哪种细胞凋亡, Yamada 等<sup>[15]</sup>发现凋亡的细胞主要是浸润的单核细胞, Kyto 等<sup>[16]</sup>最近对 4 到 8 周的雄性 A/J 鼠腹腔注射 CVB3 病毒后, 第 7 天就发现单个凋亡的心肌细胞, 使用肌球蛋白抗体和荧光免疫组织化学技术, 证实凋亡的心肌细胞核位于肌原纤维的包围之中。Olivetti 等<sup>[16]</sup>在扩张性心肌病病人心肌组织发现凋亡的细胞, Seki 等<sup>[17]</sup>在扩张性心肌病的病人中发现凋亡的心肌细胞, 9 个扩张性心肌病人中有 3 个病人发现了凋亡, 4 个心肌炎病人中全都发现了凋亡。在扩张性心肌病病人中, DNA 裂解片断末端原位标记阳性核广泛分布于心肌细胞中, 而在心肌炎病人中, 这些阳性核主要见于间质细胞,

少数见于心肌细胞中。Peng 等<sup>[18]</sup>对小鼠 CVB3 病毒性心肌炎模型的基因表达谱进行了研究,发现感染后的第 4 天和第 7 天,有 42 个基因表达上调和下调,其中抑制凋亡的 Bag-1 基因下调。

对病毒性心肌炎小鼠模型研究得较为深入的是 Gebhard 等<sup>[14]</sup>和 Henke 等<sup>[20]</sup>, Gebhard 使用酵母双杂交系统证明, CVB3 外膜蛋白 VP2 与前凋亡蛋白 Siva 之间的相互作用,在 CD27/CD70 转导凋亡途径中起重要作用。CD27 是肿瘤坏死因子超家族成员。CD27 与 CD70 结合后,通过与 TRAF2 和 TRAF5 之间的相互作用而触发核因子  $\kappa$ B 信号通路<sup>[18]</sup>。CD27 也参与凋亡<sup>[19]</sup>。CD27 蛋白没有死亡结构域,而 Siva 有一个死亡结构域样的结构域, Siva 在体外就可以与 CD27 结合。研究发现, CVB3 病毒性心肌炎小鼠的心肌和胰腺组织都有类似 Siva 的成分 (muSiva) 表达<sup>[20]</sup>,通过这种新的机制,凋亡参与到柯萨奇病毒的致病过程。进一步的研究表明, VP2 的第 165 位的天冬氨酸为 CVB3 的致病性所必不可少,如果把它换成天冬酰胺,则失去体内致凋亡能力。既降低受感染 BALB/C 鼠 Siva 蛋白的表达,又降低病毒在感染动物体内的传播能力。而在最先受感染的胰腺组织,病毒结合到胰腺上去并不受影响。Siva 蛋白与 VP2 结合的核心位于第 118 位至第 136 位氨基酸之间。

本文发现,在 CVB3 病毒性心肌炎 BALB/C 小鼠模型上,凋亡的关键酶半胱天冬酶 3 和凋亡本身均在第 7 天被检测到,且均随时间的延长而增加(加强),两者变化呈正相关关系,并证实 25 mg/(kg·d) 的苦瓜蛋白能显著抑制半胱天冬酶 3 的活性及凋亡的发生。

#### [参考文献]

- [1] Chow LH, Gauntt CJ, McManus BM. Differential effects of myocarditic variants of coxsackievirus B3 in inbred mice. A pathologic characterization of heart tissue damage. *Lab Invest*, 1991, **64** (1): 55-64
- [2] Bowles NE, Towbin JA. Molecular aspects of myocarditis. *Curr Opin Cardiol*, 1998, **13** (3): 179-184
- [3] 王佐, 李双杰, 杨永宗. 苦瓜蛋白对 BALB/C 小鼠柯萨奇 B3 病毒性心

- 肌炎核因子  $\kappa$ B 的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 479-482
- [4] Yamamoto H, Kishimoto T, Minamoto S. NF- $\kappa$ B activation in CD27 signaling: involvement of TNF receptor-associated factors in its signaling and identification of functional region of CD27. *J Immunol*, 1998, **161** (9): 4 753-759
- [5] Alter P, Jobmann M, Meyer E, Pankuweit S, Maisch B. Apoptosis in myocarditis and dilated cardiomyopathy: does enterovirus genome persistence protect from apoptosis from apoptosis? An endomyocardial biopsy study. *Cardiovasc Pathol*, 2001, **10** (5): 229-234
- [6] Kyto V, Saraste A, Fohlman J, Ilback NG, Harvala H, Vuorinen T, Hyypia T. Cardiomyocyte Apoptosis after antiviral WIN 54954 treatment in murine coxsackievirus B3 myocarditis. *Scand Cardiovasc J*, 2002, **36** (3): 187-192
- [7] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspase: enemies within. *Science*, 1998, **281**: 1 312-316
- [8] Miura M, Zhu H, Rotell R, Hartwig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta converting enzyme, an mammalian homolog of the C. elegans cell death gene cec-3. *Cell*, 1993, **75** (4): 653-650
- [9] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, **391**: 43-52
- [10] Razvi ES, Welsh RM. Apoptosis in viral infection. *Adv Virus Res*, 1995, **45**: 1-60
- [11] Andreka P, Nadhazy Z, Muzes G, Bisshopric NH. Molecular regulation of myocardial apoptosis. *Orv Hetil*, 2001, **142** (32): 1 717-724
- [12] Henke A, Huber S, Stelzner A, Whitton JL. The role of CD8+ T lymphocytes in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol*, 1995, **69** (11): 6 720-728
- [13] Huber S, Mortensen A, Moulton G. Modulation of cytokine expression by CD4 + T cells during coxsackievirus B3 infections of BALB/C mice initiated by cells expressing the gamma delta + T-cell receptor. *J Virol*, 1996, **70** (5): 3 039-044
- [14] Gebhard JR, Perry CM, Harkins S, Lane T, Mena I, Asensio VC, Campbell IL, Whitton JL. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: Perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. *Am J Pathol*, 1998, **153** (2): 417-428
- [15] Yamada T, Matsumori A, Wang WZ, Ohashi N, Shiota K, Sasayama S. Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *Heart Vessels*, 1999, **14** (1): 29-37
- [16] Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*, 1997, **336** (16): 1 131-141
- [17] Seki Y, Kai H, Kai M, Muraishi A, Adachi K, Imaizumi T. Myocardial DNA strand breaks are detected in biopsy tissues from patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol*, 1998, **21** (8): 591-596
- [18] Peng T, Sadusky T, Li Y, Coulton GR, Zhang H, Archard LC. Altered expression of Bag-1 in coxsackievirus B3 infected mouse heart. *Cardiovasc Res*, 2001, **50** (1): 46-55
- [19] Prasad KV, Ao Z, Yoon Y, Wu MX, Rizk M, Jacquot S, Schlossman SF. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor family, induces apoptosis and binds to Siva, a proapoptotic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (12): 6 346-351
- [20] Henke A, Launhardt H, Klement K, Stelzner A, Zell R, Munder T. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases, Interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. *J Virol*, 2000, **74** (9): 4 284-290

(此文编辑 胡必利)