

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2009)17-02-0122-03

## 小鼠柯萨奇 B3病毒性心肌炎心脏炎症细胞因子基因和蛋白表达及黄芪甲甙干预研究

罗永姣<sup>1</sup>, 刘红英<sup>1</sup>, 李双杰<sup>2</sup>

(1. 南华大学附属第一医院儿科, 湖南省衡阳市 421001;

2. 湖南省儿童医院感染科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] Balb/c小鼠; 黄芪甲甙; 柯萨奇 B3病毒; 心肌炎; 细胞因子; 基因表达

[摘要] 目的 探讨黄芪甲甙对小鼠柯萨奇 B3病毒性心肌炎心脏炎症细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 mRNA 表达和蛋白质产生的影响。方法 Balb/c 小鼠 50 只随机分为 5 组, 空白对照组, 腹腔无菌注射不含病毒的 Eagle's 培养基 0.1 mL, 在腹腔注射病毒培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7 d 病毒性心肌炎对照组, 小鼠每只腹腔注射 0.1 mL 内含  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> 柯萨奇 B3 病毒的 Eagle's 培养基, 在腹腔注射含病毒的 Eagle's 培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7 d 黄芪甲甙低、中、高剂量干预组, 在腹腔注射病毒 30 min 后, 用黄芪甲甙剂量分别为 0.07、0.2 和 0.6 mg/(kg·d) 0.1 mL 灌胃, 共 7 d。14 d 后处死全部小鼠并取其心脏。心脏组织一半用于逆转录聚合酶链反应法测定心脏细胞因子 mRNA 表达, 另一半用 Western blot 测定细胞因子蛋白质生成量。结果 空白对照组上述细胞因子均无明显表达, 心肌炎对照组肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 mRNA 和蛋白产生均显著高于空白对照组; 同心肌炎对照组比较, 高剂量黄芪甲甙组的肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 mRNA 和蛋白生成均显著下降, 而白细胞介素 10 mRNA 和蛋白明显升高。结论 黄芪甲甙明显降低小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎心脏的致炎症细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$  和白细胞介素 6 而升高炎症保护因子白细胞介素 10。

[中图分类号] R72

[文献标识码] A

## Expression of Inflammatory Cytokines in Viral Myocarditis in Mice with CVB3 and Effect of Astragaloside

LUO Yong-Jiao, Liu Hong-Ying and LI Shuang-Jie

(The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Balb/c mice, Astragaloside, CVB3 Virus, Myocarditis, Cytokines, Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of astragaloside on mRNA expression and protein production of inflammatory cytokines including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 in Viral Myocarditis in Mice with CVB3. **Methods** Fifty Balb/c mice were randomized into five groups ( $n=10$ ): normal control group given 0.1 mL of EMEM by intraperitoneal injection, were treated with saline 0.1 mL with gavage after 30 minutes of injection for 1 week; viral myocarditis control group inoculated intraperitoneally with 0.1 mL of  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> CVB3 diluted in Eagle's minimal essential medium (EMEM) solution were given saline 0.1 mL with gavage after 30 minutes of injection for 1 week; astragaloside low-dose intervention group, middle-dose intervention group and high-dose intervention group inoculated intraperitoneally with 0.1 mL of  $1 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> CVB3 diluted in EMEM were treated with 1%, 3%, 9% astragaloside [0.07, 0.2 and 0.6 mg/(kg·d)], respectively) 0.1 mL solution after 30 minutes of injection, respectively with gavage for 1 week. After fourteen days, the mice were sacrificed and their hearts were taken and cut into two equal parts, one was used to determine mRNA expression of cardiac cytokines by RT-PCR and another was used to measure protein production of cytokines by Western blot. **Results** No expression of inflammatory cytokines mentioned above was found in normal control group. In viral myocarditis control group, both of these cytokines markedly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with viral myocarditis control group, the high-dose astragaloside group displayed significant reduction of mRNA expression and protein production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6, and marked increase of IL-10 mRNA expression and protein production ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Astragaloside markedly reduced pro-inflammatory cytokines and increased inflammation preventing cytokine. The mechanism needs to be elucidated.

[收稿日期] 2008-11-10

[修回日期] 2009-02-05

[作者简介] 罗永姣, 硕士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为心肌疾病基础与临床, 联系电话为 0734-8279057, E-mail 为 999sah@163.com。刘红英, 学士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为心肌疾病基础与临床, 联系电话为 0734-8279057。通讯作者李双杰, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌疾病基础与临床, E-mail 为 Lesjie62@vip.sina.com。

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 是儿科临床常见疾病, 目前认为细胞因子在诱导和发生心肌炎免疫病理过程中起重要作用<sup>[1-11]</sup>。黄芪为临床治疗心肌炎与心力衰竭的主要药物, 黄芪注射液对 VMC 有良好治疗作用, 具有抑制病毒复制、调节免疫、抗心肌细胞凋亡和减轻心肌病理改变等疗效<sup>[1-2]</sup>。黄芪甲甙 (astragaloside) 作为黄芪皂甙中一种有代表性的单体有效成分, 经动物实验发现, 对 Balb/c 小鼠柯萨奇 B3 病毒 (coxsackievirus B3, CVB3) 性心肌炎有明显治疗作用<sup>[3-4]</sup>, 但其作用机制尚未阐明。本研究在建立 Balb/c 小鼠 CVB3 性心肌炎模型的基础上, 观察黄芪甲甙对心脏炎症细胞因子表达及蛋白产生的影响, 以探索黄芪甲甙新的治疗作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和病毒

纯种 Balb/c 小鼠, 4 周龄, 雄性, SPF 级, 体重为 12~16 g 由复旦大学动物实验科学部提供, 并饲养于复旦大学动物实验科学部 SPF 级环境中。

CVB3 Nancy 株, 由复旦大学附属中山医院卫生部病毒性心脏病重点实验室提供, 在 HeLa 细胞中传代, 冻融离心 3 次, 上清液分装, 并在 HeLa 细胞测 50% 组织感染率 (TCID<sub>50</sub>) 为 10<sup>7</sup>, -70℃ 保存备用, 实验用量为 1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>。

### 1.2 药物

黄芪甲甙 (批号为 0781-9706) 由国家药物和生物制品检定研究所 (NCPBP) 提供, 为纯白色干粉剂, 不溶于水, 用助溶剂羧甲基纤维素钠制成均匀混悬液, 浓度分别为 1%、3% 和 9%。

### 1.3 动物分组及干预方法

50 只 Balb/c 小鼠, 随机分 5 组, 每组 10 只: 空白对照组腹腔无菌注射不含病毒的 Eagle's 培养基 0.1 mL, 在腹腔注射病毒培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7 d 病毒性心肌炎对照组每只腹腔注射 0.1 mL 内含 1×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> CVB3 的 Eagle's 培养基; 在腹腔注射病毒培养基 30 min 后, 以生理盐水 0.1 mL 灌胃, 共 7 d 黄芪甲甙低、中、高剂量干预组在腹腔注射病毒 30 min 后, 分别以 1%、3% 和 9% 黄芪甲甙 [分别为 0.07、0.2 和 0.6 mg/(kg·d)] 0.1 mL 灌胃 7 d。14 d 后处死全部小鼠并取其心脏。冻存于 -70℃ 冰箱中, 一半用 RT-PCR 法分析各细胞因子 mRNA 表达; 另一半用 Western blot 分析蛋白质生成。

### 1.4 心肌总 RNA 抽提和半定量逆转录聚合酶链反应法检测细胞因子表达

取心肌 10 mg 剪碎, 应用 Trizol 1 000 μL 匀浆、抽提组织总 RNA, 紫外光检测样品吸光度 A, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 为 1.8~2.0。应用 RT-PCR 法 (RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司) 检测细胞因子 mRNA 的表达。反应条件为: 94℃ 变性 40 s → 退火 40 s 72℃ 延伸 60 s。反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (90 V, 40 min), 紫外灯下观察结果并摄片, 用 GSD8000 密度扫描分析仪 (英国 UVP 公司), 进行图像分析, 吸光面积积分比值表示 DNA 含量, 以各细胞因子与 GAPDH 扩增条带的吸光面积积分比值来评定各细胞因子 mRNA 表达水平。

### 1.5 心肌组织细胞因子蛋白表达

50 mmol/L TrisHCl 匀浆心肌组织提取蛋白, 以牛血清白蛋白作标准曲线, Bradford 法测定蛋白浓度, 通过调整蛋白溶液体积使其蛋白浓度一致 (5 g/L)。15% 分离胶, 5% 浓缩胶 SDS-PAGE 凝胶 4℃ 100 V 恒压电泳, 蛋白上样量 30 μg/孔。转膜后 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入适当稀释于 2.5% 脱脂奶粉中的一抗 [大鼠抗小鼠 IL-1β (Serotec)、山羊抗小鼠 IL-6、IL-10 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNF-α), 0.2 mg/L] 4℃ 孵育过夜。TBS 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记相应二抗 (1:10 000) 37℃ 孵育 1 h。TBS 洗涤后应用化学发光法显色, 用 GSD8000 密度扫描分析系统 (英国 UVP 公司) 进行图像分析, 以各细胞因子与 β-actin 扩增条带的吸光面积积分比值来评定各细胞因子蛋白表达水平。

### 1.6 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, SPSS 11.0 软件处理, 采用 *t* 检验、方差分析, *P* < 0.05 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠生存数

空白对照组、高剂量干预组无小鼠死亡, 心肌炎对照组和低剂量干预组生存 6 只, 中剂量干预组生存 7 只。经 Kaplan-Meier 检验, 高剂量干预组小鼠死亡数与心肌炎对照组比较, 差异有显著性 (*P* < 0.05), 而低、中剂量干预组与心肌炎对照组比较, 小鼠死亡数差异无显著性。

### 2.2 肿瘤坏死因子 α、白细胞介素 1β、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 的基因及蛋白质表达

在病毒性心肌炎组中, 每种细胞因子 mRNA 的

表达都显著增加 ( $P < 0.01$ )。同病毒性心肌炎组比较, 高剂量黄芪甲甙干预组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 的表达都显著下降 ( $P < 0.01$ ), 而 IL-10 的 mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.01$ , 表 1)。Western blot 检测得到的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 蛋白质的产生量与上述 mRNA 的表达量相一致, 而且以相似的方式进行调节 (表 2)。

表 1 黄芪甲甙对心肌炎症细胞因子 mRNA 表达的影响

分 组	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10
空白对照组	0.08 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.05	0.07 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.03
心肌炎对照组	0.35 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
黄芪甲甙				
低剂量组	0.32 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.06	0.40 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.04
中剂量组	0.30 $\pm$ 0.06	0.32 $\pm$ 0.05	0.38 $\pm$ 0.06	0.36 $\pm$ 0.05
高剂量组	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.53 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$  与空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$  与心肌炎对照组。

表 2 黄芪甲甙对心肌炎症细胞因子蛋白表达的影响

分 组	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-10
空白对照组	0.06 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01
心肌炎对照组	0.37 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
黄芪甲甙				
低剂量组	0.28 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.06	0.53 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.01
中剂量组	0.26 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.13	0.53 $\pm$ 0.02
高剂量组	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.70 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$  与空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$  与心肌炎对照组。

### 3 讨论

细胞因子是一类重要的免疫活性介质, 近来, 细胞因子被认为在 VMC 的发病中占有主导地位<sup>[5,6]</sup>。TNF- $\alpha$  或 IL-1 等细胞因子可使某些对 CVB3 慢性心肌炎具有抵抗能力的小鼠, 在感染 CVB3 病毒后产生慢性心肌炎<sup>[7]</sup>。另外, 非嗜心性 CVB3 病毒与 IL-1 或 IL-2 一起给予小鼠时, 也可使小鼠产生明显的心肌炎。表明 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-2 等细胞因子可提高机体对慢性病毒性心肌炎的易感性, 而慢性心肌炎往往是扩张性心脏病的前奏。其次细胞因子直接作用于心肌细胞致心功能损害<sup>[8]</sup>。TNF- $\alpha$  水平在 VMC 的急性期和亚急性期明显升高, 与正常对照组和 VMC 的恢复期组相比, 差异有统计学意义, 证实 TNF- $\alpha$  直接参与了 VMC 的心肌细胞炎症性损伤的病理生理过程, 在 VMC 的早期诊断及预后判断中具有重要意义<sup>[9]</sup>。IL-6 是介于 17~24 ku 的单核细胞因子, 与心血管疾病的关系密切<sup>[10]</sup>。在病毒感染的急性期, 特别是病毒血症期, 血清中 IL-6 含量升高。

作为机体的保护机制之一, 血清中 IL-6 的水平适度升高对机体病毒的清除起重要作用, 但在 CVB 感染亚急性期, 当炎症刺激过强或持续时间过长时, 过高水平的 IL-6 则明显表现出其两面性作用, 参与心肌免疫损伤的过程<sup>[11,12]</sup>。本研究表明小鼠 CVB3 病毒性心肌炎心脏炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 基因表达和蛋白产量都增加。

有研究证明 IL-10<sup>[13]</sup> 具有广泛的抑制促炎细胞因子的作用, 实验研究亦证实了 IL-10 对 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8 等致炎性细胞因子的产生起抑制作用。因此 IL-10 是维持细胞因子网络平衡的重要调节机制。本研究结果发现小鼠 CVB3 病毒性心肌炎抗炎细胞因子 IL-10 的基因表达和蛋白产量都增加, 与文献报道一致。

黄芪甲甙为一种黄芪皂甙类单体成分, 为黄芪制剂中的主要有效成分经动物实验发现, 对 Balb/c 小鼠 CVB3 心肌炎有明显治疗作用, 但其作用机制尚未完全阐明。本研究表明 CVB3 心肌炎后, 降低促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 基因表达和蛋白产生, 而增加抗炎因子 IL-10 基因表达和蛋白产生从而起到治疗病毒性心肌炎的作用。

### [参考文献]

- [1] 李昭, 朱华. 细胞因子在病毒性心肌炎中的作用 [J]. 内蒙古医学院学报, 2007, (4): 309-312
- [2] 朱红俊, 陆佳. 黄芪治疗病毒性心肌炎药理研究进展 [J]. 中国中医急症, 2007, 16 (1): 95-96
- [3] 李双杰, 张召才, 陈瑞珍. 黄芪甲甙治疗 BALB/C 小鼠 CVB3 病毒性心肌炎疗效研究 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 17 (5): 681-683
- [4] 罗永姣, 刘红英, 李双杰. 黄芪甲甙对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的抗氧化作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (3): 205-208
- [5] Takeda N. Cardiomypathy: molecular and immunological aspects (Review) [J]. Int J Mol Med, 2003, 11 (1): 13-16
- [6] Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment [J]. Circulation, 2006, 113 (6): 876-890
- [7] 宿瑞俊. 病毒性心肌炎与细胞因子的关系 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2003, 3 (2): 119-124
- [8] 李艳, 周文平, 栾斌. 急性病毒性心肌炎患儿血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素 6 水平变化的意义 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 13 (22): 984-985
- [9] 胡波, 许珏, 洪国强. 病毒性心肌炎肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白介素-2 及白介素-1 $\beta$  的检测及其意义 [J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27 (5): 96-98
- [10] 史君, 李春跃, 杨桂花. 白细胞介素-6 与心血管疾病 [J]. 内蒙古医学院学报, 2004, 26 (1): 66-69
- [11] 刘亚黎, 尾内善四郎. 白细胞介素 6 在病毒性心肌炎发病中的作用 [J]. 中华儿科杂志, 1999, 37 (2): 101-103
- [12] 刘雪玲, 王焱, 虞勇. 动态检测细胞因子水平在病毒性心肌炎各期的临床价值 [J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10 (7): 50-52
- [13] 云伟, 于艳秋, 卢晓梅. 小鼠心肌梗死后肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素 6 和白细胞介素 10 表达变化及心肌病理改变 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (4): 245-247

(此文编辑 李小玲)