

小檗碱通过 Toll 样受体 4/核因子 κ B 信号通路对小鼠病毒性心肌炎发挥保护作用

李忠,张培华

(南阳理工学院张仲景国医学院,河南省南阳市 473004)

[关键词] 小檗碱; 病毒性心肌炎; Toll 样受体 4; 核因子 κ B; 肿瘤坏死因子 α

[摘要] 目的 探讨小檗碱对病毒性心肌炎小鼠的保护作用,并研究其对 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的影响。方法 将 40 只 BALB/c 小鼠按数字随机法均分为正常组、模型组、小檗碱低剂量组与高剂量组。除正常组外,其余组小鼠腹腔注射嗜心性柯萨奇病毒 B3,建立病毒性心肌炎模型。小檗碱低剂量组与高剂量组分别腹腔注射小檗碱 50 mg/kg 与 100 mg/kg。苏木素-伊红染色观察心肌组织病理学变化;用酶联免疫吸附测定试剂盒检测血清肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白(cTnT)和 TNF- α 水平;免疫印迹法和实时荧光定量 PCR 分别检测心肌组织中 TLR4 与 NF- κ B 的蛋白表达和 mRNA 表达。结果 与模型组相比,小檗碱治疗组心肌组织的炎性细胞浸润与心肌细胞坏死程度显著减轻,血清 CK-MB、cTnT 和 TNF- α 水平明显降低,心肌组织 TLR4 与 NF- κ B 的蛋白表达和 mRNA 表达显著下调。结论 小檗碱可通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路,从而对病毒性心肌炎小鼠的心肌组织具有保护作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Protective effect of berberine on viral myocarditis via Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signal pathway in mice

LI Zhong, ZHANG Pei-Hua

(Zhang Zhongjing College of Traditional Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang, Henan 473004, China)

[KEY WORDS] Berberine; Viral myocarditis; Toll-like receptor 4; Nuclear factor- κ B; Tumor necrosis factor α

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effects of berberine on viral myocarditis in mice; To study the effects of berberine on Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and tumor necrosis factor α (TNF- α). **Methods** According to random number table, 40 BALB/c mice were divided into four groups: normal group, model group, low dose berberine treatment group and high dose berberin treatment group. Except the normal group, the mice of other groups were injected intraperitoneally with addicted concentric Coxsackie virus B3 to establish viral myocarditis model. Low dose berberine treatment group and high dose berberin treatment group were injected intraperitoneally with 50 mg/kg and 100 mg/kg respectively. The pathological changes of myocardial tissue were observed by HE staining. The serum levels of creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), cardiac troponin T (cTnT) and TNF- α were determined by enzyme-linked immunosorbent assay kits. Western blot and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect the protein expression and mRNA expression of TLR4 and NF- κ B in cardiac tissue. **Results** Compared with the model group, inflammatory cell infiltration and cell necrosis degree in myocardial tissues were significantly decreased, and the serum levels of CK-MB, cTnT and TNF- α were significantly reduced in the berberine treatment group. At the same time, the protein expression and mRNA expression of TLR4 and NF- κ B were significantly down-regulated in myocardial tissue in the berberine treatment group. **Conclusion** Berberine can regulate the TLR4/NF- κ B signal pathway, so as to protect the myocardial tissue of mice with viral myocarditis.

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是病毒感染引起的心肌局灶性或弥散性炎症病变,是小儿心血

管系统中最常见的疾病,临床表现差异较大,多数患儿临床症状较轻,部分进展为慢性心肌炎^[1]。约有

[收稿日期] 2016-08-19

[修回日期] 2016-11-08

[基金项目] 河南省科技攻关项目(152102310025)

[作者简介] 李忠,硕士,副教授,研究方向为中医内科,E-mail 为 lizhong7011@sina.com。

10%~15%患者由于病情延误,病毒通过直接损伤或病理性免疫反应损伤导致心肌细胞坏死,心肌间质大量胶原异常沉积,进而发生心肌重构,发展为扩张型心肌病^[2]。目前已发现超过 24 种病毒能引起病毒性心肌炎,如肠道病毒、腺病毒和人疱疹病毒 6 等,其中以肠道病毒中的柯萨奇 B 组病毒最常见^[3]。

小檗碱(berberine)是季铵型异喹啉类生物碱,又名黄连素,临床上具有多种药理作用,如抗痢疾、抗传染性原虫、降血糖、降血压、调节血脂、抗肿瘤以及抗心律失常等^[4-5]。研究发现小檗碱具有抑制氧化低密度脂蛋白对血管内皮的毒性作用,通过提高内皮细胞内皮型一氧化氮合酶的表达,促进一氧化氮的合成,进而抑制内皮细胞凋亡^[6]。报道指出小檗碱通过抑制核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路,减少炎症因子白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 的释放,从而抑制血管损伤后的炎症反应^[7]。本实验观察小檗碱对嗜心性柯萨奇病毒感染小鼠后,对 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、NF- κ B 和 TNF- α 因子的影响,以探究小檗碱治疗病毒性心肌炎可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 BALB/c 小鼠 40 只, SPF (specific pathogen free) 级, 4 周龄, 体重 18 ± 2 g, 饲养于 25 ± 2 °C, 昼夜各半, 正常饮水进食, 进行适应性饲养 1 周。

1.2 实验试剂

嗜心性柯萨奇病毒 B3 (Coxsackie virus B3, CVB3) (Nancy 株), 由北京大学医学部病原微生物教研室惠赠; 肌酸激酶同工酶 (creatinase isoenzyme MB, CK-MB) 抗体免疫抑制法试剂盒购自美国贝克曼库尔特公司; 心肌肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT)、TNF- α 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海恪敏生物科技有限公司; TLR4 与 NF- κ B 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.3 CBV3 病毒扩增与培养

参照文献^[8]的方法, 在 HeLa 细胞上传代扩增, 待全部发生病变后, 将细胞反复冻融 3 次, $3\ 000$ r/min, 离心 30 min, 取上清液, 置于 -80 °C 冰箱备用。测得其半数组织培养感染剂量 (tissue culture infectious dose 50, TCID₅₀) 是 10^{-3} /L。

1.4 病毒性心肌炎模型的建立

参照文献^[9]方法。将 40 只 BALB/c 小鼠按数字随机法均分为 4 组: 正常组、模型组、小檗碱低剂量组与高剂量组。除正常组外, 其余各组小鼠均腹腔注射 0.1 mL 含 100 TCID₅₀ CVB3 的病毒悬液, 每天 1 次, 连续 3 天。给药方法: 小檗碱低剂量组、高剂量组分别腹腔注射小檗碱 50、100 mg/kg, 每日 1 次, 共给药 14 天; 模型组腹腔注射等量生理盐水。

1.5 标本采集

给药完毕后, 摘眼球取血, 离心, 取上清液备用。将小鼠断颈处死, 迅速分离出心脏, 一部分置于液氮保存备用, 另一部分浸入 10% 中性甲醛进行固定, 制作石蜡切片。

1.6 心肌组织苏木素-伊红染色

苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色操作如下: 将心脏组织的石蜡切片浸入二甲苯溶液 30 min, 依次浸入梯度乙醇 (100%、95%、85%、75%) 各 5 min, 蒸馏水洗涤, 苏木素浸染 10 min, 1% 盐酸酒精分化, 蒸馏水洗涤, 0.5% 伊红溶液浸染 3 min, 再次将切片浸入梯度乙醇 (75%、85%、95%、100%) 各 2 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 置于显微镜下观察。

1.7 血清 CK-MB、cTnT、TNF- α 水平测定

血清 CK-MB 采用 CK-MB 抗体免疫抑制法试剂盒及贝克曼 CX-9 全自动生化分析仪进行检测。血清 cTnT 和 TNF- α 采用相应 ELISA 试剂盒检测, 按照说明书进行操作。

1.8 免疫印迹法

将心肌组织剪碎, 在冰上匀浆, 加入裂解液裂解 30 min, 4 °C $12\ 000$ r/min 离心 5 min, 取上清液进行蛋白定量; 调整蛋白量后, 取等量裂解产物, 加入上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳后转移至 PVDF 膜上, 加入脱脂牛奶中室温封闭 2 h, 加入一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤, 加入相应二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤, 化学发光法显色。成像扫描分析系统保存图像。

1.9 实时荧光定量 PCR

往心肌组织中加入裂解液, 按照 Trizol 说明书提取总 RNA, 以逆转录酶催化合成 cDNA, 以 cDNA 为模板在聚合酶催化下进行 PCR 反应。TLR4 引物: 上游 5'-GCCGTTGGTGTATCTTTGA-3', 下游 5'-AGTTGCCGTTTCTTGTTTC-3'; NF- κ B 引物: 上游 5'-GAACGATAACCTTTGCAGGC-3', 下游 5'-TTTCGAT-TCCGCTATGTGTG-3'; GAPDH 引物: 上游 5'-CG-GAGTCAACGGATTGCTCGTAT-3', 下游 5'-AGCCT-TCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'; 95 °C 10 min 预变

性,95 °C 10 s,60 °C 45 s,共 35 个循环。实验结果在荧光定量操作系统中进行分析对比,目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.10 统计学分析

实验结果采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组均数间两两比较采用 Bonferroni 校正的 *t* 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 CK-MB、cTnT 和 TNF- α 水平的变化

模型组小鼠血清 CK-MB、cTnT 和 TNF- α 水平显著升高;与模型组相比,小檗碱低、高剂量组小鼠血清 CK-MB、cTnT 和 TNF- α 水平明显下降(表 1)。

2.2 心肌组织病理学观察

HE 染色后于光学显微镜下观察,结果显示,正

常组小鼠心肌组织没有炎性细胞浸润与心肌细胞坏死;模型组小鼠心肌组织可见明显炎性细胞浸润,心肌细胞坏死,心肌纤维样变性;小檗碱低剂量组小鼠心肌细胞少见炎性细胞浸润,偶有心肌细胞坏死;小檗碱高剂量组小鼠心肌细胞偶见炎性细胞浸润,未见心肌细胞坏死(图 1)。

表 1. 各组小鼠血清 CK-MB、cTnT 和 TNF- α 水平的变化 ($n=10$)

Table 1. Changes of serum levels of CK-MB, cTnT and TNF- α in each group of mice ($n=10$)

分 组	CK-MB(U/L)	cTnT(μ g/L)	TNF- α (ng/L)
正常组	20.14 \pm 4.62	0.08 \pm 0.02	18.76 \pm 3.75
模型组	69.43 \pm 12.42 ^a	0.72 \pm 0.31 ^a	67.25 \pm 6.43 ^a
小檗碱低剂量组	31.26 \pm 11.48 ^{ab}	0.43 \pm 0.21 ^{ab}	32.75 \pm 4.18 ^{ab}
小檗碱高剂量组	17.47 \pm 12.43 ^b	0.31 \pm 0.14 ^{ab}	23.47 \pm 3.16 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与正常组相比;b 为 $P<0.05$,与模型组相比。

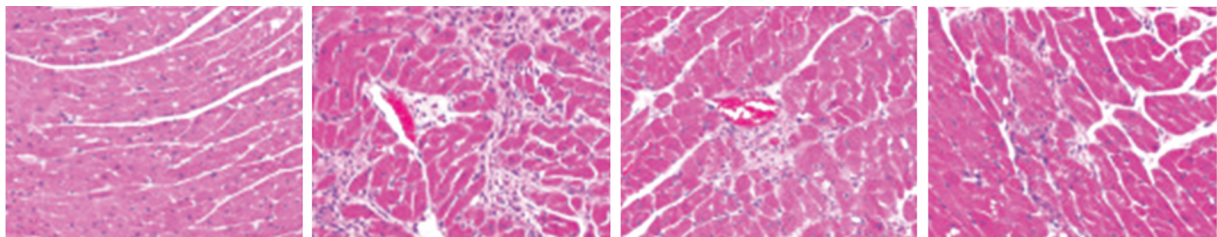


图 1. 各组小鼠心肌组织病理学变化 ($\times 200$) 从左到右依次为正常组、模型组、小檗碱低剂量组、小檗碱高剂量组。

Figure 1. Pathological changes of myocardial tissue in each group of mice ($\times 200$)

2.3 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 表达变化

模型组小鼠心肌组织 TLR4、NF- κ B 的 mRNA 表达显著高于正常组;与模型组相比,小檗碱低、高剂量组小鼠心肌组织中 TLR4、NF- κ B 的 mRNA 表达明显下调(图 2)。

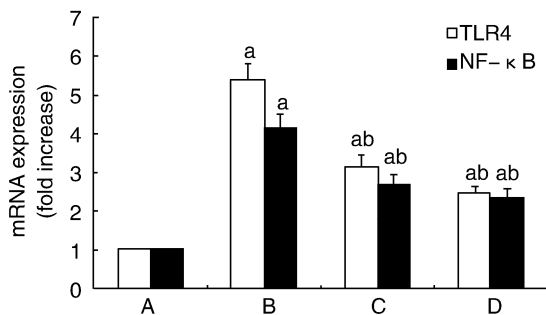


图 2. 心肌组织 TLR4 和 NF- κ B 的 mRNA 表达变化 ($n=10$)

A 为正常组,B 为模型组,C 为小檗碱低剂量组,D 为小檗碱高剂量组。a 为 $P<0.05$,与正常组相比;b 为 $P<0.05$,与模型组相比。

Figure 2. The mRNA expressions of TLR4 and NF- κ B in myocardial tissue ($n=10$)

2.4 TLR4 和 NF- κ B 的蛋白表达变化

模型组小鼠心肌组织 TLR4、NF- κ B 的蛋白表达显著高于正常组;与模型组相比,小檗碱低、高剂量组小鼠心肌组织 TLR4、NF- κ B 的蛋白表达明显下调(图 3)。

3 讨论

心肌炎的主要病理特征是心肌组织炎性细胞的浸润和心肌细胞坏死,病毒对心肌细胞的直接损伤与继发性的细胞或体液免疫反应,是对心肌细胞损伤的重要病理因素,由于发病机制尚未清晰,病毒性心肌炎暂无疗效明确的特效药。本实验结果显示,小檗碱能够减少病毒性心肌炎小鼠的心肌炎性细胞浸润与心肌细胞坏死,提示小檗碱具有改善病毒性心肌炎的心肌损伤的作用。

TLR4 是 TLR 家族中的重要成员,能够识别细胞外和内含体中的病原相关分子,识别外来微生物并作出的一系列反应,在天然免疫中发挥重要的作用,并在

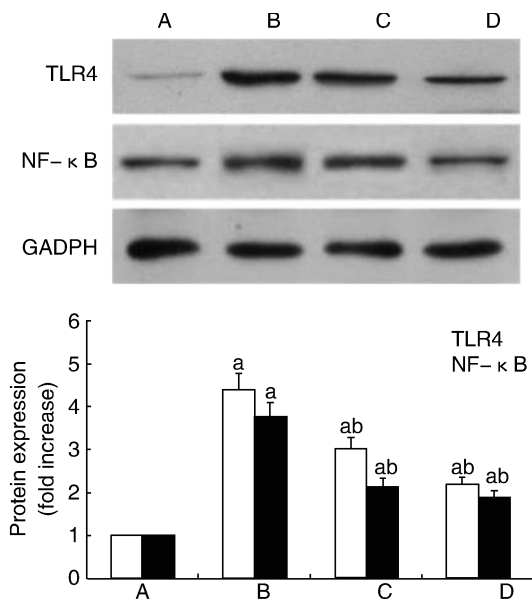


图 3. 心肌组织 TLR4 和 NF- κ B 的蛋白表达变化 ($n=10$)

A 为正常组, B 为模型组, C 为小檗碱低剂量组, D 为小檗碱高剂量组。a 为 $P<0.05$, 与正常组相比; b 为 $P<0.05$, 与模型组相比。

Figure 3. The protein expressions of TLR4 and NF- κ B in myocardial tissue ($n=10$)

天然免疫与后天免疫的联系中发挥桥梁的作用。TLR4 广泛表达于各种免疫细胞, 在人体免疫中发挥重要作用。研究发现, TLR4 在与配体结合后, 经由髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation protein 88, MyD88) 依赖的信号通路和非 MyD88 依赖的信号通路产生级联反应, 激活 NF- κ B, 被激活的 NF- κ B 进入细胞核中, 进而调控一系列细胞因子和炎症介质的表达, 如 TNF- α 、IL-1 等的表达^[10-11]。NF- κ B 是调节基因转录的关键因子之一, 主要与机体防御和炎症反应的基因调控有关, 激活后进入胞核, 进一步活化刺激其他炎性因子的产生, 激发针对病毒的炎性反应, 而激活的炎性因子进一步活化 TLR4/NF- κ B 通路, 致使炎性细胞进一步浸润^[12]; 有研究发现 NF- κ B 可能与心肌细胞的凋亡有关^[13]。报道指出黄芪多糖通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路对脂多糖诱导的乳鼠心肌细胞具有保护作用^[14]。此外, 近年研究发现高血压心脏病、冠心病以及心力衰竭患者血清 TNF- α 水平均显著升高, 推测 TNF- α 可能在心肌组织损害中发挥重要的作用^[15]。

本实验中, 小檗碱可能通过抑制 TLR4 表达, 阻止 NF- κ B 的活化, 有效地降低了炎性因子 TNF- α 的血清水平, 从而对病毒性心肌炎心肌组织发挥保护作用。提示小檗碱可能是通过调控 TLR4 的表达, 进而调节免疫反应, 抑制下游的细胞因子以及炎症

因子等的表达, 从而到达机体防御的作用, 因此对病毒性心肌炎小鼠模型具有心肌保护的作用。在后续的实验中, 本课题组将在本实验的基础上进一步深入研究小檗碱的作用机制。

[参考文献]

- [1] Cheng Z, Li-Sha G, Yue-Chun L. Autonomic nervous system in viral myocarditis: pathophysiology and therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(4): 485-498.
- [2] Huber SA. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: etiology and pathogenesis [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(4): 408-426.
- [3] Feldman AM, McNamara D. Myocarditis [J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(19): 1388-398.
- [4] Shirwaikar A, Shirwaikar A, Rajendran K, et al. In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(9): 1906-910.
- [5] Pazhang Y, Ahmadian S, Mahmoudian M, et al. Berberine-induced apoptosis via decreasing the survivin protein in K562 cell line [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1577-583.
- [6] Wang C, Li J, Lv X, et al. Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat and streptozotocin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 620(1-3): 131-137.
- [7] 贾燕璐, 李建军. 小檗碱的抗动脉粥样硬化作用及其机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(4): 364-368.
- [8] Yang F, Wu WF, Yan YL, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of Coxsackie virus B3-induced viral myocarditis reduces myocardium inflammation [J]. *Virology*, 2011, 8(1): 17.
- [9] 张晓梅. Nrf2 在病毒性心肌炎小鼠中的作用及葛根素干预的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013; 5.
- [10] Cheng Y, Wang D, Wang B, et al. HMGB1 translocation and release mediate cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice through a TLR4/MyD88-dependent signaling pathway [J]. *Mol Biol Cell*, 2017, 28(1): 201-209.
- [11] Xie Q, Zhang S, Chen C, et al. Protective effect of 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione, isolated from *Averrhoa carambola* L., against palmitic acid-induced inflammation and apoptosis in Min6 cells by inhibiting the TLR4-MyD88-NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(5): 1705-715.
- [12] Feng Y, Cui Y, Gao JL, et al. Resveratrol attenuates neuronal autophagy and inflammatory injury by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 921-930.
- [13] Pelzer T, Schumann M, Neumann M, et al. 17 beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268(1): 192-200.
- [14] 孙雪芳, 王洪新, 梁灵君, 等. 黄芪多糖通过 TLR4/NF- κ B 信号通路抑制脂多糖诱导的大鼠心肌细胞肥大 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2): 208-212.
- [15] Mann DL. Recent insights into the role of tumor necrosis factor the failing heart [J]. *Heart Fail Rev*, 2001, 6(2): 72-80.

(此文编辑 曾学清)