

论著 · 实验研究

黄芪甲甙对急性病毒性心肌炎小鼠 IGF-1 及相关蛋白表达的作用研究

何春枝¹ 李双杰²

(1. 武汉市普爱医院儿科,湖北 武汉 430034; 2. 湖南省儿童医院感染科,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 探讨黄芪甲甙在治疗病毒性心肌炎过程中对胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及相关蛋白的影响。方法 65只4周龄 Balb/C 小鼠随机分为正常对照、黄芪对照、病毒对照及黄芪小剂量、黄芪大剂量等5组。后3组腹腔接种柯萨基 B 组病毒(CVB₃)病毒。黄芪小剂量、黄芪大剂量每日分别给予0.07、0.6 mg/kg 黄芪甲甙液灌胃1次。15 d后采血、取心肌组织,用酶标免疫吸附测定法(ELISA)测血浆中 IGF-1 的表达,用免疫组织化学法检测心肌组织中 IGF-1 及相关蛋白的蛋白表达,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测心肌组织 IGF-1 基因表达。结果 感染 CVB₃ 病毒后小鼠心肌组织 IGF-1 及相关蛋白明显升高,大剂量黄芪甲甙干预可调节小鼠 IGF-1 及相关蛋白的表达;小剂量黄芪甲甙则无明显效果。结论 大剂量黄芪甲甙对急性病毒性心肌炎小鼠心肌组织的保护作用可能是通过影响 IGF-1 及相关蛋白表达的途径来实现。 [中国当代儿科杂志,2011,13(9):751-754]

[关键词] 病毒性心肌炎;黄芪甲甙;胰岛素样生长因子-1;小鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)09-0751-04

Effects of astragaloside on IGF-1 and associated protein expression in mice with acute viral myocarditis

HE Chun-Zhi, LI Shuang-Jie. Department of Pediatrics, Wuhan Pu'ai Hospital, Wuhan 430034, China (Li S-J, Email: lesjie62@vip.sina.com)

Abstract: Objective To study the effects of astragaloside on the expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and associated proteins in mice with viral myocarditis. **Methods** Sixty-five 4-week-old BALB/C mice were randomly divided into 5 groups: normal control, astragaloside control, untreated myocarditis, low-dose and high-dose astragaloside-treated myocarditis. The BALB/C mice in the later three groups were intraperitoneally injected with CVB₃. The low-dose and high-dose astragaloside-treated myocarditis groups were given astragaloside of 0.07 and 0.6 mg/kg · d, respectively by intragastric administration. Fifteen days later, the samples of blood and muscular tissues were obtained. The expression of IGF-1 in plasma was measured using ELISA. The levels of IGF-1 and associated proteins in muscular tissues were measured by immunohistochemistry. The expression of IGF-1 mRNA in muscular tissues was examined by RT-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The expression of IGF-1 and associated proteins increased significantly in mice infected with CVB₃. High-dose astragaloside treatment reduced the expression of IGF-1 and associated proteins, but low-dose astragaloside did not. **Conclusions** High-dose astragaloside may reduce the expression of IGF-1 and associated proteins in mice with acute viral myocarditis, possibly thus providing protective effects on muscular tissues.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (9):751-754]

Key words: Viral myocarditis; Astragaloside; Insulin-like growth factor-1; Mice

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是指由各种亲心性病毒感染引起的心肌细胞坏死或变性,可累及心包和心内膜,小儿尤其常见,近年来其发病率有升高的趋势^[1],严重危害机体健康。黄芪甲甙是黄芪有效成份皂甙的单体成份,它可抑制病毒复制,保护心肌细胞和调节免疫功能,广泛用于病毒性

心肌炎的治疗^[2],但具体作用机制尚不十分明确。有研究表明胰岛素样生长因子-1(IGF-1)等干细胞调控因子对成年心肌组织中存在的多能心肌干细胞有动员并促其增殖、分化作用,可补充、修复衰老或在病理状态下死亡的心肌细胞^[3]。而黄芪甲甙在治疗病毒性心肌炎过程中,是否通过影响 IGF-1

[收稿日期]2011-01-07;[修回日期]2011-03-18
[作者简介]何春枝,女,硕士,主治医师。
[通信作者]李双杰,教授。

及 IGF-1 受体(IGF-1R)、IGF 结合蛋白 3(IGFBP3)等相关蛋白表达来发挥作用尚未见报道。本研究希望通过观察这一过程中 IGF-1 及相关蛋白的动态变化,从而探索黄芪甲甙对心肌保护与治疗作用的机制,为进一步使用中医药治疗 VMC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

65 只 4 周龄雄性近系纯种 SPF 级 Balb/C 小鼠,体重 12 ~ 16 g(由复旦大学动物实验部提供),随机分为正常对照、黄芪对照、病毒对照及黄芪小剂量、黄芪大剂量等 5 组。其中正常对照组 10 只,仅实验当日腹腔接种 0.1 mL 不含病毒的 Eagle's 细胞培养液,每日以配制黄芪甲甙的羟甲基纤维素钠溶液灌胃 1 次;黄芪对照组 10 只,实验当日腹腔接种 0.1mL Eagle's 细胞培养液,每日以 9% 黄芪甲甙液(0.6 mg/kg · d)灌胃 1 次;病毒对照组 15 只,实验当日腹腔接种 0.1 mL 内含 1×10^2 TCID₅₀ CVB₃ 病毒,每日以羟甲基纤维素钠液灌胃 1 次;黄芪小、大剂量组各 15 只,实验当日腹腔接种同剂量病毒,每天分别以 1%、9% 黄芪甲甙液(具体剂量分别为每日 0.07、0.6 mg/kg)灌胃 1 次。每日观察小鼠毛色、饮食、活动情况,记录死亡小鼠数。实验第 15 天取小鼠常规消毒、麻醉后摘眼球采血置于无菌试管中,每管血液加入肝素 12.5 U 抗凝,4℃ 离心(3000 rpm × 15 min)分离血浆后置 -70℃ 保存以备 ELISA 检测用。同时无菌取小鼠心脏,一部分置于 10% 中性甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋、切片,作革兰染色及免疫组化染色,一部分置于 -70℃ 保存以用于 RT-PCR 检测。

1.2 方法

1.2.1 血浆 IGF-1 检测 小鼠血浆 IGF-1 ELISA 试剂盒由美国 R&D Systems 提供,操作按说明书进行,仪器为芬兰 Labsystems 产 DENLEY DRAGON 牌 Wellscan MK2 型酶标仪。

1.2.2 心肌组织免疫组织化学染色 小鼠心肌石蜡切片作免疫组织化学染色,底物采用 DAB 显色,DAB 试剂购于武汉博士德公司,IGF-1 一抗购于 Santa Cruz Biotechnology 公司,工作浓度 1:25,IGF-1R 一抗购于武汉博士德公司,工作浓度 1:50,IGFBP3 一抗购于 DSL 公司,工作浓度 1:50,二抗(即用型)均购于上海嘉晟公司。阴性对照组以等量 PBS 液代替一抗,流程按试剂盒操作。IGF-1 及 IGFBP3 以细胞胞浆中、IGF-1R 以胞膜上棕黄色颗

粒样着色为阳性。每片随机选 3 个高倍视野,用 LEICA Qwin V3 图文分析系统对其灰度值进行检测,数据作统计学处理。

1.2.3 心肌组织 RT-PCR 半定量检测 用 Trizol 试剂提取心肌细胞总 RNA,RT-PCR 试剂盒系 Invitrogen 公司产品。IGF-1 引物序列:5'-CTGGTG-GATGCTCTTCAGTTCG-3' 和 5'-TCCTTCTCCTTTG-CAGCTTCG-3',预期扩增产物长 280 bp。小鼠 beta-actin 内参引物序列:5'-ATATCGCTGCGCTG-GTCGTC-3' 和 5'-AGGATGGCGTGAGGGAGAGC-3',扩增产物长 517 bp,引物由上海申能博彩公司合成。PCR 反应时序:(1)94℃,2 min;(2)96℃,15 s;(3)56℃,30 s;(4)70℃,1 min;(2)~(4)共 35 个循环,(5)70℃,8 min。同时设空白对照组。产物各取 10 μL 进行凝胶电泳(EB 显色),拍照后用 Labworks 分析系统对结果进行比较,计算目标基因及内参基因吸光度比值。

1.3 统计学分析

用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较用方差分析,两两比较用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物存活情况

实验过程中正常对照组及黄芪对照组无小鼠死亡,黄芪大剂量组死亡 2 只,病毒对照组及黄芪小剂量组分别死亡 5 只。

2.2 心肌组织病理学检查

正常对照及黄芪对照组小鼠心脏外观及大小无异常。其他组小鼠感染 CVB₃ 后心脏大体解剖可见心外膜下心肌均出现白色点状、片状或条索状病变,黄芪大剂量组病变较病毒对照及黄芪小剂量组减轻。革兰染色可见正常对照及黄芪对照组小鼠心肌细胞排列整齐,间质无炎性细胞浸润,其他组小鼠心肌组织有不同程度的心肌细胞肿胀,细胞横纹不清,排列紊乱,胞质染色嗜酸性增强,均质化,胞核出现核固缩及核碎裂,嗜碱性增强,周围出现大量炎性细胞浸润,间质内可见胶原纤维。

2.3 小鼠血浆 IGF-1 检测

各组小鼠血清 IGF-1 表达的差异有统计学意义($F = 14.8, P < 0.01$),其中正常对照及黄芪对照组小鼠血浆 IGF-1 浓度无明显差异,病毒对照组和黄芪小剂量组 IGF-1 浓度较正常对照组和黄芪对照组

明显增高,黄芪大剂量组较病毒对照组及黄芪小剂量组低,但仍高于正常对照及黄芪对照组,病毒对照组及黄芪小剂量组间差异无统计学意义。见图1。

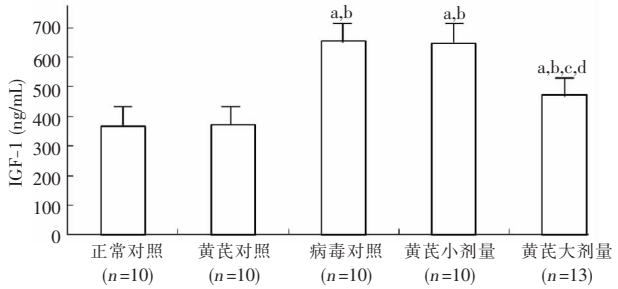


图1 各组小鼠血浆 IGF-1 水平比较 a:与正常对照组比较, $P<0.05$; b:与黄芪对照组比较, $P<0.05$; c:与病毒对照组比较, $P<0.05$; d:与黄芪小剂量组比较, $P<0.05$

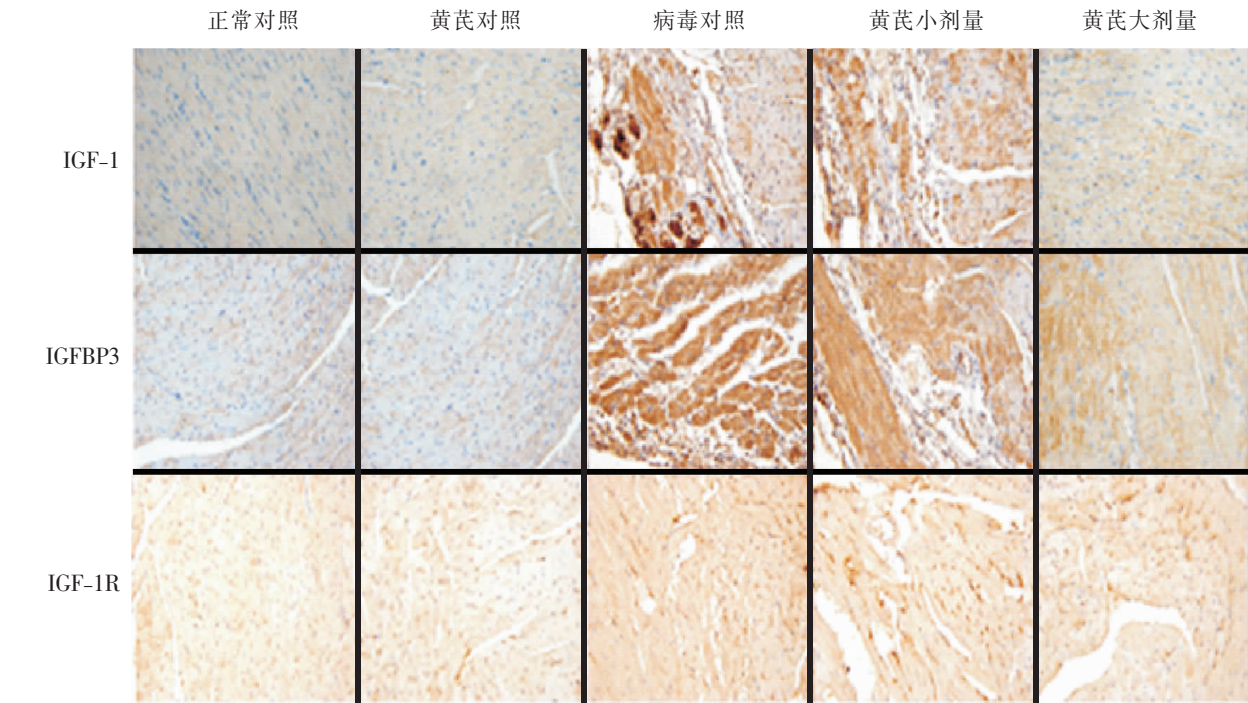


图2 各组小鼠心肌组织 IGF-1、IGFBP3、IGF-1R 免疫组化图(DAB×400) 正常对照组:小鼠心肌细胞有 IGF-1、IGFBP3、IGF-1R 表达;黄芪对照组:小鼠心肌细胞内 IGF-1 及相关蛋白表达与正常对照比较无明显变化;病毒对照组:感染 CVB3 病毒小鼠心肌细胞内 IGF-1 及相关蛋白表达增高;黄芪小剂量组:CMV 小鼠心肌细胞内 IGF-1 及相关蛋白表达仍高,与正常对照比较无明显变化;黄芪大剂量组:CMV 小鼠心肌细胞内 IGF-1 及相关蛋白表达降低。细胞浆中/胞膜上棕黄色颗粒样着色为阳性表达。

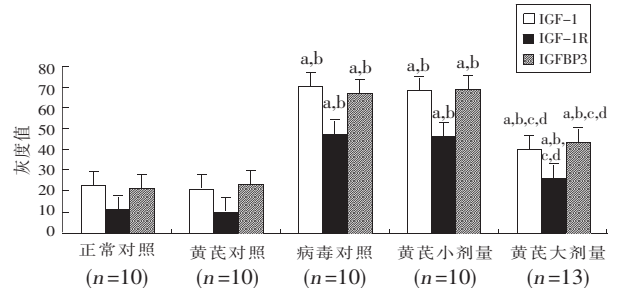


图3 各组小鼠心肌组织 IGF-1、IGF-1R、IGFBP3 蛋白水平比较 a:与正常对照组比较, $P<0.05$; b:与黄芪对照组比较, $P<0.05$; c:与病毒对照组比较, $P<0.05$; d:与黄芪小剂量组比较, $P<0.05$

2.4 心肌组织 IGF-1、IGF-1R 和 IGFBP3 表达

免疫组化检查发现,各组小鼠心肌组织 IGF-1、IGF-1R、IGFBP3 的表达差异有统计学意义(F 分别为 13.81、8.73 和 19.22,均 $P<0.05$)。正常对照组及黄芪对照组心肌细胞胞浆内及胞膜上有散在棕黄色颗粒样物质沉着,IGF-1 和 IGFBP-3 表达在胞浆中,IGF-1R 表达在胞膜上(图2),正常对照组及黄芪对照组间三者的表达差异无统计学意义;病毒对照与黄芪小剂量组阳性表达明显增多,病灶周围尤甚,二者之间 IGF-1、IGF-1R 和 IGFBP3 阳性表达差异无统计学意义;黄芪大剂量组阳性表达较病毒对照及黄芪小量组减少,但仍高于正常对照及黄芪对照组($P<0.05$)。见图3。

2.5 小鼠心肌 IGF-1 mRNA 表达

RT-PCR 结果显示正常对照组 IGF-1 mRNA 表达为 23.4 ± 4.2 ,黄芪对照组为 22.4 ± 5.1 ,病毒对照组为 82.2 ± 12.3 ,黄芪小剂量组为 79.4 ± 11.3 ,黄芪大剂量组为 43.7 ± 7.2 。5 组之间 IGF-1 mRNA 表达差异有统计学意义($F=11.27, P<0.05$)。其中正常对照组与黄芪对照组比较差异无统计学意义;病毒对照组及黄芪小剂量组则明显高于正常对照组和黄芪对照组($P<0.05$),但是二者之间差异无统计学意义;黄芪大剂量组较病毒对照组及黄芪

小剂量组降低,但仍高于正常对照组及黄芪对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图4。

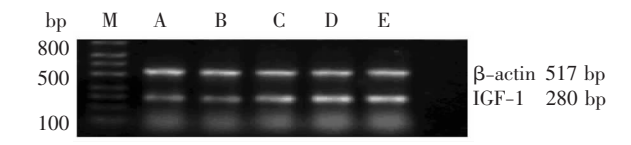


图4 各组小鼠心肌 IGF-1 mRNA 表达的琼脂糖凝胶电泳图 M: Marker; A:正常对照组;B:黄芪对照组;C:黄芪大剂量组;D:黄芪小剂量组;E:病毒对照组

3 讨论

VMC 的传统治疗以抗病毒药物、大剂量维生素 C 及对症治疗为主,其目的是保护心肌细胞,抑制异常免疫,减少心肌细胞凋亡,从而改善心功能。本课题组前期的研究已经证实黄芪对 VMC 有良好的治疗作用,它能降低心肌中病毒 RNA 滴度;减轻心肌炎性细胞浸润和缩小坏死面积;并能清除氧自由基、抑制心肌细胞凋亡、抗纤维化、抗心律失常及缩短心室晚电位的时限^[3]。本研究发现,小鼠感染 CVB₃ 后,心肌组织出现炎性病变、坏死,IGF-1 及 IGF-1R、IGFBP3 等相关蛋白的表达增高,大剂量黄芪甲甙干预后,心肌病变程度减轻,IGF-1 及其相关蛋白的表达亦减少,证实大剂量黄芪甲甙对 VMC 有良好的治疗作用,其治疗机制可能与干预 IGF-1 及相关蛋白表达有关。而大剂量黄芪甲甙的干预对正常小鼠 IGF-1 表达无明显影响,提示黄芪甲甙对机体平衡状态下的 IGF-1 无影响。

IGF-1 作为一种高效生长因子,对各种组织细胞都有明显的促生长发育作用^[4-5]。在心力衰竭的心肌细胞周围其表达升高,植入自体间充质干细胞可促进大鼠衰竭心肌 IGF-1 表达,利于心肌细胞生长和增殖^[6-7],但过高浓度的 IGF-1 表达却可能与高血压患者心肌重构的发生有关^[8]。IGF-1 的释放受生长激素释放激素-生长激素-IGF-1-IGFBPs 轴的调控,其发挥作用可以受体内细胞因子、体液中 pH 值及炎症介质等多种因素影响^[9],IGFBP 通过调控 IGF 与受体的结合而发挥抑制细胞增殖,刺激细胞分化作用^[10]。有学者发现,心肌梗塞患者急性期因生长激素系统激活,可出现血 IGF-1 水平下降^[11],其值低于 131 ng/mL 时,发生心源性死亡的风险比此界值以上者提高 1 倍,血 IGF-1 可作为心源性死亡的唯一独立预测因子^[12]。正常小鼠机体内环境处于平衡状态,但小鼠感染 CVB₃ 病毒后,炎症及其引起的免疫反应使这种平衡被打破,心肌组

织出现不同程度的炎性病变,坏死,血液及心肌组织中 IGF-1 和 IGF-1R、IGFBP3 等相关蛋白表达增高,本研究在心肌免疫组织化学染色切片上观察到一种现象:在坏死的心肌组织周围,IGF-1 及相关蛋白的染色加深,从正常组织到病变组织,染色有逐渐加深的趋势。大剂量黄芪甲甙干预组病变程度轻且 IGF-1 及相关蛋白表达明显低于小剂量组和病毒对照组,由此推测黄芪甲甙对 VMC 的保护作用有可能是通过调节 IGF-1 和 IGF-1R、IGFBP3 等相关蛋白的表达这一途径来实现的,通过这一途径可能减少心肌重构,促进正常心肌细胞的再生,但其具体机制还有待于进一步的研究。鉴于 IGF-1 表达增高可能促进心肌重构发生^[8],其降低又可能导致心源性死亡风险增加^[12],因此,如何干预其内在的生长激素释放激素-生长激素-IGF-1-IGFBPs 轴的调控机制,维持内环境的平衡,使 IGF-1 水平维持在一个正常的稳定状态,将成为一个新的研究热点。

[参 考 文 献]

- [1] Esfandiarei M, Suarez A, Amaral A, Si X, Rahmani M, Dedhar S, et al. Novel role for integrin-links in modulation of coxsackievirus B3 replication and virus-induced cardiomyocyte injury[J]. Circ Res, 2006, 99(4): 354-361.
- [2] 草药国家九五攻关全国协作组. 急性病毒性心肌炎的药物治疗观察[J]. 中华心血管病学杂志,1997,17(7):413-415.
- [3] 李双杰,张召才,陈瑞珍,杨英珍,陈灏珠,葛俊波. 病毒性心脏病细胞凋亡与纤维化的研究[J]. 临床心血管病杂志,2005,21(1):36-38.
- [4] Leroith D, Yakar S. Mechanisms of disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007, 3(3): 302-310.
- [5] 朱玉芳,潘革. GH-IGF-1 轴与儿童生长发育[J]. 医学综述, 2008,14(3):321-323.
- [6] Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-1 and VEGF[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 363(3): 674-679.
- [7] 陶泽伟,李隆贵,耿召华,宋明宝,郑嘉荣,于世勇,等. 自体间充质干细胞植入促进大鼠衰竭心肌生长因子表达、改善心室重构和心功能[J]. 中华心血管杂志,2009,37(6):495-498.
- [8] Herio T, Kamide K, Takiuchi S, Yoshii M, Miwa Y, Matayoshi T, et al. Association of insulin-like growth factor-1 receptor gene polymorphisms with left ventricular mass and geometry in essential hypertension[J]. J Human Hypertens, 2010, 24(5): 320-326.
- [9] Bright GM, Mendoza JR, Rosenfeld RG. Recombinant human insulin-like growth factor-1 treatment; ready for primetime[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2009, 38(3): 625-638.
- [10] 王海兵,来茂德. 胰岛素样生长因子结合蛋白与胰岛素抵抗的关系[J]. 国际遗传学杂志,2009,32(3):199-202.
- [11] 李秋生. 胰岛素样生长因子-1 与急性心肌梗死近期预后关系的研究[J]. 实用医学杂志,2010,26(9):1548-1550.
- [12] Yamaguchi H, Komamura K, Choraku M, Hirono A, Takamori N, Tamura K, et al. Impact of serum insulin-like growth factor-1 on early prognosis in acute myocardial infarction[J]. Intern Med, 2008, 47(9): 819-825.

(本文编辑:王庆红)