

论著 · 实验研究

川芎嗪对柯萨奇 B3 病毒感染乳鼠心肌细胞的 保护作用及信号转导机制研究

钱招昕¹, 黄寒², 林晓娟²

(1. 中南大学湘雅医院急诊科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省人民医院儿科, 湖南 长沙 410005)

[摘要] 目的 临床显示川芎嗪对病毒性心肌炎有治疗作用, 但机制不明, 该研究拟探讨川芎嗪对病毒感染的心肌细胞的作用及信号转导机制。方法 利用培养的 Sprague-Dawley 乳鼠心肌细胞, 分为空白对照组(心肌细胞正常培养)、阴性对照组(心肌细胞加入川芎嗪至终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 后培养)、病毒感染组[心肌细胞感染柯萨奇病毒 B3(CVB3)]、川芎嗪干预组(心肌细胞感染病毒后加入终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 川芎嗪干预)。观察心肌细胞搏动频率及培养液中乳酸脱氢酶(LDH)活性。采用 Western blot 测定 NF- κ B 蛋白表达变化, MTT 法检测心肌细胞活性。结果 病毒感染组与川芎嗪干预组比较, 心肌细胞搏动频率明显降低(32.0 ± 3.6 次/min vs 84.3 ± 3.5 次/min, $P < 0.01$), 细胞病变加重, LDH 活性显著升高($P < 0.05$)。川芎嗪干预组细胞 NF- κ B 蛋白表达明显低于病毒感染组($P < 0.01$), 存活率明显高于病毒感染组[(86.7 ± 2.7)% vs (35.3 ± 3.4)%, $P < 0.01$]。结论 在病毒性心肌炎时川芎嗪可以抑制 NF- κ B 的表达, 起到保护心肌细胞的作用。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11(8):687-690]

[关键词] 心肌炎; 柯萨奇 B3 病毒; 核转录因子- κ B; 川芎嗪; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)08-0687-04

Protective effects of tetramethylpyrazine on rat myocardial cells infected by Coxsackie virus B3 and its signal transduction mechanism

QIAN Zhao-Xin, HUANG Han, LIN Xiao-Juan. Department of Emergency, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Qian Z-X, Email: qianzhx@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the protective effects of tetramethylpyrazine (TMPZ) on rat myocardial cells infected by Coxsackie virus B3 (CVB3) and its signal transduction mechanism. **Methods** The cultured myocardial cells of neonatal Sprague-Dawley rats were randomly treated with CVB3, CVB3 + TMPZ (100 $\mu\text{mol/L}$), TMPZ (100 $\mu\text{mol/L}$) (negative control) or DMEM (blank control). After treatment, the beating rate of myocardial cells and the LDH activity in the culture fluid were measured. Cell viability was ascertained with MTT assay. Western blot was used to study the expression of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) protein in myocardial cells. **Results** The beating rate of myocardial cells in the untreated CVB3 infection group was significantly lower than that in the TMPZ-treated CVB3 infection group (32.0 ± 3.6 bpm vs 84.3 ± 3.5 bpm, $P < 0.01$). The LDH activity and NF- κ B expression in the TMPZ-treated CVB3 infection group was significantly reduced when compared with untreated CVB3 infection group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Cell viability 7 days after CVB3 infection in the TMPZ-treated group was higher than that in the untreated CVB3 infection group [(86.7 ± 2.7)% vs (35.3 ± 3.4)%; $P < 0.01$]. **Conclusions** TMPZ can provide protective effects on rat myocardial cells infected by CVB3, possibly by an inhibition of the activity of NF- κ B in myocardial cells.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(8):687-690]

Key words: Myocarditis; Coxsackie virus B3; Nuclear factor kappa-B; Tetramethylpyrazine; Rats

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是常见的小儿心脏急症, 其中暴发型心肌炎致死率一直居高不下, 其发病机制至今尚未完全阐明。病毒的直接损伤作用和免疫机制(包括病毒诱导的免疫和自身免疫反应)参与了 VMC 的致病^[1]。NF- κ B 是调节基因转录的关键因子之一, 参与许多基因特别是与机体防御功能和炎性反应有关的早期应答基因的调控^[2]。川芎嗪是中药川芎的主要生物碱, 其化学结构是 3, 5, 6-四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine, TMPZ), 治疗病毒性心肌炎具有一定的效果^[3], 但具体机制尚不十分清楚。本研究采用体外培养的胎鼠原代心肌细胞, 通过观察 NF- κ B 在川芎嗪干预后

[收稿日期] 2009-04-07; [修回日期] 2009-05-16
[作者简介] 钱招昕, 男, 博士, 主治医师。主攻方向: 心血管急症。

感染病毒心肌细胞中的表达,探讨川芎嗪对 VMC 的保护作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

嗜心性柯萨奇病毒 B3 Nancy 株 (myocarditic coxsackievirus B3, CVB3) 购自上海实验动物研究中心病毒室; 出生 3~5 d 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠购自中南大学湘雅医学院实验动物中心, 雌雄不拘。

1.2 主要试剂

川芎嗪 (上海邦宇生物技术公司); DMSO (美国 Amresco 公司); NF- κ B 抗体 (Calbiochem 公司); DMEM (美国 GIBCO 公司); 噻唑蓝 [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基氯唑溴盐, MTT] (Sigma 公司); 小牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司)。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 心肌细胞的分离培养 取出生 3~5 d 的 SD 大鼠心室部分剪成小块, 将其转入装有 0.1% 胰酶消化液中 37℃ 分次消化 (每次 10 min) 3 次。收集每次消化后的上清 800 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用含有 20% 胎牛血清的 DMEM 液悬起沉淀。按需要调整细胞数。采用差速贴壁法纯化。用台盼蓝染色观察细胞成活率。将成活的心肌细胞放入培养液于 37℃, 5% CO₂ 进行培养。24 h 后心肌细胞贴壁并开始搏动, 72 h 后细胞伪足展开。

1.3.2 心肌细胞感染模型的建立 将 CVB3 株接种在心肌细胞上测 50% 组织感染率 (50% tissue culture infective dose, TCID₅₀), 选择 100 TCID₅₀ 作为实验接种浓度。将心肌细胞在培养的第 3 天加入 100 TCID₅₀ CVB3 病毒液 100 μ L, 并于培养第 7 天用细胞变性效果法 (cell cytopathic effect, CPE) 观察细胞病变。

1.3.3 实验分组 分为空白对照组 (心肌细胞加等量的 DMEM 液正常培养)、阴性对照组 (心肌细胞加入川芎嗪至终浓度 100 μ mol/L 后正常培养)、CVB3 病毒感染组 (心肌细胞感染 CVB3 病毒)、TMPZ 组 (心肌细胞感染病毒后加入终浓度 100 μ mol/L 川芎嗪干预)。始终遵循各组细胞培养条件换液培养至 7 d。

1.3.4 心肌蛋白制备 将 4 组细胞用 0.02% EDTA 悬起, 离心弃上清。将细胞沉淀用 PBS 冲洗 2 次后加入细胞裂解液, 冰上孵育 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清得到蛋白。用 BioRad 试剂盒测

定蛋白浓度。

1.3.5 免疫印迹 (Western blot) 法测定 NF- κ B 蛋白含量 取等量的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 将其转移到硝酸纤维素膜上。用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 (4℃, 12 h)。PBST 洗膜 3 次后加入一抗 (NF- κ B 抗体), 37℃ 孵育 2 h。PBST 冲洗。加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温下孵育 40 min, PBS 冲洗。ECL 显色曝光, 胶片显影。测吸光度值 (A)。

1.3.6 心肌酶活性测定 4 组细胞分别在感染病毒后第 1, 3, 5 天取培养上清液用全自动生化分析仪检测心肌细胞乳酸脱氢酶 (LDH)。

1.3.7 MTT 法检测细胞活性 将在培养瓶中培养了 3 d 的原代心肌细胞用 0.02% 的 EDTA 悬起, 按每孔 10⁶ 个细胞接种于 96 孔板。每排 8 个孔, 每一排为一组分组。同上述方法对每一组行不同处理, 继续培养 7 d。随后, 每孔加 MTT (5 mg/dL) 20 μ L, 孵育 4 h, 终止培养, 弃培养液。每孔加入 150 μ L 二甲亚砷, 振荡 10 min, 结晶溶解。在 A = 490 nm 时测值。反复测 3 次取均值。每孔 A 值减空白孔 A 值为测试孔值。

1.4 统计学分析

资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析 *F* 检验, 多组间两两比较采用 LSD 法检验和重复测量的方差分析, *P* < 0.05 为差异有显著性。使用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 各组心肌细胞细胞搏动的变化

病毒感染组心肌细胞搏动每分钟 (32.0 $\pm$ 3.6)/次, 与川芎嗪干预组的 (84.3 $\pm$ 3.5)/次相比, 差异有显著性 (*t* = 35.265, *P* < 0.01), 表现为搏动频率减慢、搏动幅度减弱、节律不齐, 有部分停搏, 部分细胞搏动幅度强弱不等; 空白对照组心肌细胞每分钟 (98.2 $\pm$ 3.7)/次和阴性对照组每分钟 (96.9 $\pm$ 4.1)/次, 搏动频率相对恒定, 节律规则, 两组间差异无显著性 (*P* > 0.05); 川芎嗪干预组心肌细胞每分钟搏动频率低于空白对照组和阴性对照组, 差异均有非常显著性 (*t* = 3.919, *P* < 0.01; *t* = 3.772, *P* < 0.01)。

2.2 NF- κ B 在心肌细胞中表达变化

Western blot 检测结果显示在病毒感染组 NF- κ B 表达显著高于空白对照组 (*t* = 29.166, *P* < 0.01); 川芎嗪干预组较病毒感染组的 NF- κ B 表达显著降低 (*t* = 23.792, *P* < 0.01); 川芎嗪对正常心肌细胞

NF- κ B 表达无明显影响($t = 2.496, P > 0.05$), 见图 1, 图 2。

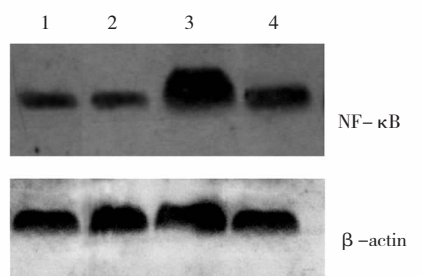


图 1 免疫印迹法检测川芎嗪对 NF- κ B 蛋白表达的影响($n = 6$) 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: 病毒感染组; 4: 川芎嗪干预组

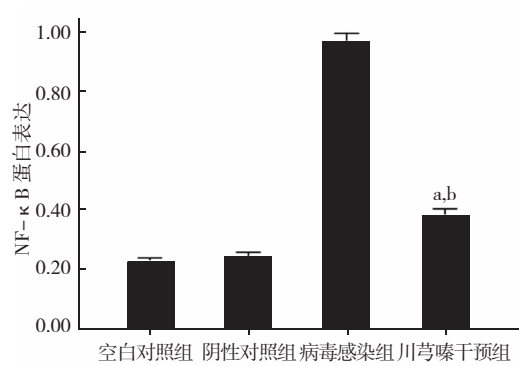


图 2 川芎嗪对心肌细胞 NF- κ B 蛋白表达的影响($n = 6$) a: 与病毒感染组比较, $P < 0.01$; b: 与阴性对照组比较, $P < 0.01$

2.3 川芎嗪对病毒感染后心肌细胞乳酸脱氢酶的影响

病毒感染组 LDH 明显升高, 川芎嗪干预组 LDH 也明显升高, 但较病毒感染组显著为低($t = 3.246, P < 0.05$, 图 3)。加入川芎嗪的阴性对照组 LDH 活性与空白对照组之间差异无显著性($P > 0.05$)。

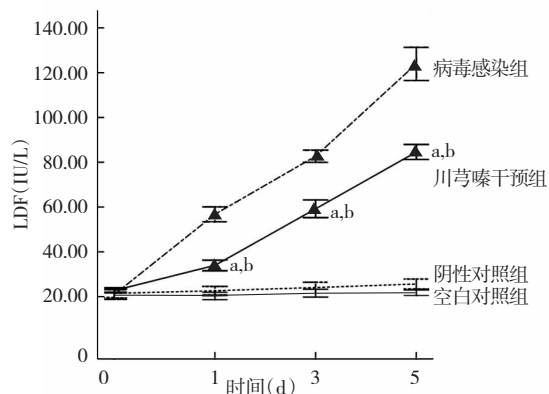


图 3 各组心肌细胞悬液中 LDH 活性的变化($n = 6$) a: 与病毒感染组比较, $P < 0.05$; b: 与阴性对照组比较, $P < 0.05$

2.4 川芎嗪对心肌细胞的保护作用

川芎嗪作用于病毒感染的细胞 7 d 时, 100 mg/L 川芎嗪干预组细胞存活率为 $(86.71 \pm 2.68)\%$, 显著高于病毒组 $(35.27 \pm 3.37)\%$, ($t = 26.718, P < 0.01$)。空白对照组和阴性对照组细胞存活率均高于病毒组($t = 31.658, P < 0.01$; $t = 33.761, P < 0.01$)。培养液中加入川芎嗪对心肌细胞活性无显著影响[$(97.68 \pm 0.67)\%$ vs $(99.55 \pm 0.52)\%$, $t = 1.586, P > 0.05$], 见图 4。

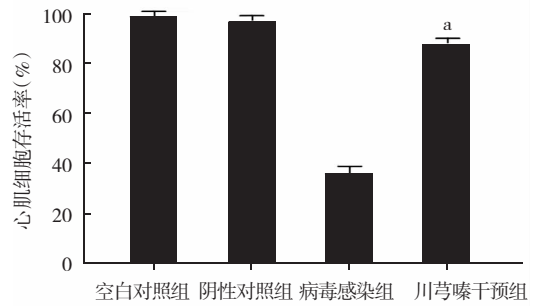


图 4 培养 7 d 后各组细胞存活率($n = 8$) a: 与病毒感染组比较, $P < 0.01$

3 讨论

VMC 是临床上较为常见的小儿心脏急症, 近年来 VMC 的发病呈上升趋势, 其中暴发型心肌炎患儿病情凶险, 预后不佳, 一直缺少特效的治疗方法。CVB3 是引起心肌炎的主要病毒^[4], VMC 的发病机制目前一般认为与病毒对心肌的直接损伤和免疫反应对心肌的损伤有关^[5,6]; 有研究证实 VMC 患儿急性期、迁延期的细胞免疫、体液免疫均处于增强状态, 支持免疫反应是 VMC 心肌损伤的机制之一^[7]。而 NF- 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, 调控细胞的增殖和凋亡相关基因的表达^[8,9]。NF- κ B 信号转导通路属于受调蛋白水解酶依赖的受体信号转导通路, 在 NF- κ B 激活后, 可诱导表达 ICAM-1、iNOS、TNF- α 和 IL-1 等^[10,11], 进而造成心肌的炎症反应、损伤、凋亡和坏死^[12]。研究 NF- κ B 在 VMC 中的激活, 减少 VMC 促炎基因表达, 减轻心肌组织损伤和炎症反应或许能从深层次探讨 VMC 的发病机制, 对改善 VMC 预后有重要意义。

川芎嗪作为中药川芎的有效成分已经广泛用于临床治疗, 具有扩张冠状动脉, 降低冠脉阻力, 增加冠脉血流量, 促进动脉微循环, 改善心肌供血及明显的心肌保护作用^[13]。新近研究显示川芎嗪有明显

的抑炎作用^[14],但参与其中的信号传导机制尚不清楚。

本实验发现川芎嗪可降低 LDH 产生,并且提高 CVB3 感染心肌细胞的存活率,改善其搏动功能,提示川芎嗪对 CVB3 感染的心肌细胞可起到肯定的保护作用。同时应用免疫印迹法检测心肌细胞中的 NF- κ B 表达的结果发现,川芎嗪降低了 CVB3 感染心肌细胞中 NF- κ B 的表达,提示川芎嗪可能通过下调 CVB3 感染后心肌细胞中 NF- κ B 表达而抑制 NF- κ B 信号传导通路,进而抑制病毒感染继发的炎症反应起到保护心肌细胞的作用。此外,本实验亦证明川芎嗪不影响正常细胞中 NF- κ B 的表达,且对正常心肌细胞生理活性无明显影响,具有较高的安全性。

根据以上实验结果,我们认为川芎嗪可以抑制 CVB3 感染后心肌细胞的 NF- κ B 信号转导通路,而且川芎嗪通过该机制抑制病毒的对心肌细胞的继发炎症损伤,但不影响正常心肌细胞的功能。然而,由于本实验是在离体培养乳鼠心肌细胞中进行的,因此有关川芎嗪对 VMC 的作用及机制尚需整体动物模型的进一步研究和更多的临床资料加以证实和评价。

[参 考 文 献]

[1] Yun SH, Shin JO, Lim BK, Kim KL, Gil CO, Kim DK, et al. Change in the cells that express connective tissue growth factor in acute Cocksackievirus-induced myocardial fibrosis in mouse [J]. *Virus Res*, 2007, 126(1):62-68.

[2] Moss BL, Gross S, Gammon ST, Vinjamoori A, Worms DP. Identification of a ligand-induced transient refractory period in nuclear factor-kappa B signaling[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(13):8687-8698.

[3] 倪昭海. 参麦合川芎嗪注射液治疗小儿急性病毒性心肌炎

床观察[J]. *中国中医急症*, 2005, 15(4):333-334.

[4] 蔡小芳,麦根荣,徐之良. 小儿扩张型心肌病与病毒性心肌炎的临床研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2004, 6(4):325-327.

[5] Esfandiarei M, Boroomand S, Suarez A, Si X, Rahmani M, McManus BM. Cocksackievirus B3 activates nuclear factor kappa B transcription factor via a phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B-dependent pathway to improve host cell viability[J]. *Cell Microbiol*, 2007, (10):2358-2371.

[6] Guarner J, Bhatnagar J, Shieh WJ, Nolte KB, Klein D, Gookin MS, et al. Histopathologic, immunohistochemical, and polymerase chain reaction assays in the study of cases with fatal sporadic myocarditis[J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(9):1412-1419.

[7] 许波,郝芳之,张纪芸. 病毒性心肌炎患儿免疫状况的研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2001, 3(5):497-500.

[8] Stathopoulos GT, Sherrill TP, Han W, Sadikot RT, Yull FE, Blackwell TS, et al. Host nuclear factor-kappa B activation potentiates lung cancer metastasis[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(3):364-371.

[9] Li Q, Guo Y, Tan W, Ou Q, Wu WJ, Sturza D, et al. Cardio-protection afforded by inducible nitric oxide synthase gene therapy is mediated by cyclooxygenase-2 via a nuclear factor-kappa B dependent pathway[J]. *Circulation*, 2007, 116(14):1577-1584.

[10] Lin YC, Shun CT, Wu MS, Chen CC. A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappa B[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(23):7165-7173.

[11] Ishinaga H, Jono H, Lim JH, Komatsu K, XU X, Lee J, et al. Synergistic induction of nuclear factor-kappa B by transforming growth factor-beta and tumour necrosis factor-alpha is mediated by protein kinase A-dependent RelA acetylation [J]. *Biochem J*, 2009, 417(2):583-591.

[12] Huang YL, Kou JP, Ma L, Song JX, BY Yu. Possible mechanism of the anti-inflammatory activity of ruscogenin: role of intercellular adhesion molecule-1 and nuclear factor-kappa B[J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 108(2):198-205.

[13] 许国忠,许锦发. 川芎嗪对心肌保护的临床研究和电镜改变[J]. *中华麻醉学杂志*, 1994, 14(6):445-447.

[14] 刘伟,陈丽,胡耀儒. 川芎嗪对体外循环下炎症反应和心肌缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *山西医科大学学报*, 2008, 39(1):70-74.

(本文编辑:吉耕中)