

· 实验研究 ·

芪红胶囊对柯萨奇病毒引起细胞凋亡的影响

宋晓东¹ 王 仑² 嵇 波³ 辛 颖¹ 刘玉清¹ 惠汝太¹

摘要 目的 探讨柯萨奇病毒是否能够引起心肌细胞凋亡,以及芪红胶囊对凋亡发生是否有抑制作用。方法 将培养细胞分为4组:病毒感染对照组、芪红胶囊加病毒组、芪红胶囊对照组和正常细胞对照组。应用原位末端标记法(TUNEL)、Hoechst33258染色和Annexin-V/PI染色观察各组细胞凋亡发生情况;并通过流式细胞仪分析各组细胞的凋亡发生率;应用RT-PCR方法观察与凋亡相关细胞因子的表达改变。结果 病毒感染对照组细胞经Hoechst33258染色发现病毒感染后的细胞核出现强亮度的蓝色荧光,可观察到凋亡细胞的典型变化;Annexin-V/PI染色可见HeLa细胞膜呈强绿色荧光,细胞核显强红色荧光;通过流式细胞仪检测PI染色的细胞DNA,发现病毒感染组出现明显凋亡峰;芪红胶囊加病毒组凋亡发生率明显下降,正常对照组细胞未发生凋亡;同时芪红胶囊能够调节与凋亡相关细胞因子的表达。结论 芪红胶囊能够抑制柯萨奇病毒引起的细胞凋亡。

关键词 柯萨奇病毒;细胞凋亡;芪红胶囊

Effect of Qihong Capsule in Inhibiting Cell Apoptosis Induced by Coxsackie Virus B SONG Xiao-dong, WANG Lun, JI Bo, et al *Chinese-Germany Lab, Fuwai Hospital of Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing (100037)*

Abstract Objective To investigate whether the cell apoptosis could be induced by Coxsackie virus B (Cox B) and Qihong capsule (QHC) has the inhibition on the cell apoptosis. **Methods** Cultured cells were divided into 4 groups, the Cox B infected group, the QHC treated and the Cox B infected group, the QHC control group and the normal control group. The cells apoptosis was determined by TUNEL labeled in situ, Hoechst 33258 staining and Annexin-V/PI staining, the apoptotic incidence was assayed by flow cytometry, and the change in expression of apoptotic related cytokines was measured with RT-PCR. **Results** The Cox B infected cell nucleus displayed strong blue fluorescence by Hoechst 33258 staining, and typical change of apoptotic cells could be detected. HeLa cell membrane showed strong green fluorescence and nucleus showed strong red fluorescence by Annexin-V/PI staining. Flow cytometric observation on DNA of PI stained cells showed obviously an apoptotic peak in the Cox B infected group. QHC could decrease the apoptosis incidence, while there was no cell apoptosis occurred in the normal control group. Besides, QHC could regulate the expression of apoptotic related cytokines. **Conclusion** QHC has effect in inhibiting cell apoptosis induced by Cox B.

Key words Coxsackie virus B; cell apoptosis; Qihong capsule

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是心血管系统的常见病和多发病,也是扩张型心肌病、心力衰竭和猝死的主要诱因^[1]。芪红胶囊是我课题组开发出的一种针对病毒性心肌炎的中药复方制剂。柯萨奇病毒

(Coxsackie virus B, CVB)引起的细胞病理改变及机制的探讨一直是病毒学领域的研究热点^[2]。目前认为,病毒性心肌炎急性期,心肌组织内的凋亡细胞主要是浸润于心肌组织局部的炎症细胞^[3]。对于体外培养的心肌细胞是否存在凋亡众说纷纭,至今未有定论,只能将细胞受到病毒攻击后的死亡称之为细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)^[4]。本研究通过不同方法对体外情况下病毒感染心肌细胞的死亡形式进行研究,旨在揭示病毒感染细胞死亡的真实原因,并将阐明芪红胶囊是否存在抑制细胞发生凋亡的作用。

基金项目:十五攻关项目——心血管相关基因的研究(No. 2002DA711A05)

作者单位:1. 中国医学科学院阜外心血管病医院中德实验室(北京100037);2. 北京军区总医院干部病房;3. 中国中医研究院西苑医院心血管内科

通讯作者:惠汝太, Tel:010-68333902; E-mail: huirutai@sglab.org

材料与方法

1 实验材料

1.1 药物与药物配制方法 芪红胶囊为阜外心血管病医院中德实验室主持开发的中药 2 类新药,药味包括及比例为:红景天:黄芪:苦参=2:2:1,每粒胶囊(0.45 g)制剂相当于生药量 5.8 g,批号:030902。黄芪及红景天采用水煎醇沉工艺,苦参采用乙醇回流提取工艺。质控指标主要参考每粒胶囊含黄芪甲苷(C41H68O14)不得少于 0.25 mg。因药物中含有脂溶性成分,故首先使用 DMSO 将药物配制成为浓度为 10% 的母液,之后再加入 0.9% 生理盐水进行稀释(作用于细胞的 DMSO 浓度 < 1%),最后以 0.22 μm 滤器过滤,作为无菌化处理。

1.2 病毒株 HeLa 细胞株和 Vero 细胞为我室保存;CVB₃(Nancy 株)由武汉医科大学病毒室提供;心肌细胞为原代培养,采用 SD 乳鼠(1~3 日),购自中国医学科学院实验动物中心(Grade II,合格证号 SCXK11-00-0006)。

1.3 实验试剂 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司),原位细胞死亡检测试剂盒(美国 Roche),浓缩型 DAB 试剂盒(中山生物公司),Hoechst33258 荧光染色剂(中国中医研究院),DMEM、蛋白酶 K、RNA 酶、RT-PCR 酶(华美生物工程有限公司)、引物(赛百胜公司)等。

1.4 实验仪器 激光扫描共聚焦显微镜(德国 LEICA 公司);流式细胞仪(EPICS XL,美国 Coulter 公司);荧光显微镜(日本 Olympus 公司);CO₂ 孵箱(美国 Nopco 公司)、离心机(德国 Hermle 公司)等。

2 实验方法

2.1 原代乳鼠心肌细胞培养 配制 0.08% 的胰酶、10% FBS-DMEM 培养基;75% 酒精消毒乳鼠 5~10 s;沿肋骨方向剪开胸腔,摘出心脏,剔除结缔组织和血块,将心脏剪成沙粒大小,加入 8 ml 孵育过的胰酶;37℃ 消化 8 min,重复若干次,以滤网过滤细胞悬液,离心后用培养基重悬,于孵箱中静置 90~120 min 进行差速贴壁;之后收集上清计数,接种于新的培养瓶,加入 5'-溴脱氧尿苷 0.1 mmol/L,继续培养。

2.2 CVB 病毒繁殖与滴度测定 将病毒作连续 10 倍稀释,接种于 96 孔板 Vero 细胞;孵箱培养,使病毒和细胞充分接触 30 min~1 h 后,弃病毒液,加入细胞培养液,重新放回孵箱;每日在倒置显微镜下观察 CPE,以最高稀释度不再出现 CPE 时为终点,连续观察若干天;利用已经记录好的数据以 Reed-Muench 法

计算 50% 组织培养感染量(TCID₅₀)^[1]。

2.3 Annexin V-FITC/PI 染色 将 HeLa 细胞接种于 6 孔板,调整盖玻片上的细胞数为 5×10^5 ;培养 24 h 后分组为正常细胞对照组(正常对照)、100TCID₅₀ 病毒感染对照组(病毒组)、芪红胶囊药物(终浓度:10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)对照组(芪红组)和 100TCID₅₀ 病毒加芪红胶囊(终浓度:10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)实验组(病毒加芪红组);样本数均为 6。继续培养 12~18 h 后,弃上清,用冷 PBS 洗 3 次;依次加入 Binding Buffer 和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 Annexin-V (Annexin-V-FITC),避光室温反应 15 min 后加入 2.5 μl PI;应用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)检测细胞凋亡状况^[5]。

2.4 Hoechst33258 荧光单染观察染色质凝聚 细胞分组及药物、病毒浓度同上,培养 48 h 后消化细胞离心,PBS 冲洗 2 次,加入 Hoechst33258(终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)于 37℃ 孵箱染色 30 min;之后涂片,荧光显微镜观察染色质凝聚情况并摄像^[2]。

2.5 原位末端标记法(TUNEL) 细胞分组及药物、病毒浓度同前,各组间形态出现明显差异(约在 18~24 h 后),以 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min;弃液并加入 0.3% H₂O₂ 甲醇溶液,室温放置 30 min;PBS 洗 3 次,加入 0.1% TRION x-100,冰浴 2 min;之后依次加入 TUNEL 反应混合液(37℃ 孵浴 60 min)、转化型 POD(37℃ 孵浴 30 min);DAB 显影液,最后脱水封片^[6]。

2.6 流式细胞仪分析细胞凋亡发生率 细胞分组及药物、病毒浓度同前,24 h 后消化细胞,70% 乙醇固定过夜;加入 RNase A 于 37℃ 温育 30 min;PI 暗染 30 min,用流式细胞仪进行细胞凋亡分析^[3]。

2.7 RT-PCR 分析芪红胶囊对凋亡相关细胞因子的表达情况 细胞分组及药物、病毒浓度同前,24 h 后消化细胞,以 TRIzol 提取细胞总 RNA,设计引物及 PCR 反应条件,扩增凋亡相关条带^[7]。

2.8 统计学方法 应用 SPSS 10.0 软件包,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。CVB 滴度测定及凋亡相关实验均为重复 3 次。

结 果

1 细胞培养及病毒滴定 心肌细胞培养应用 α -actin 免疫组化进行纯度鉴定,结果为 >96%;HeLa 细胞和 Vero 细胞培养状态正常。应用 Reed-Muench 法计算病毒滴度结果为:100TCID₅₀ 病毒浓度为 $10^{-8.3}$ 。

2 Annexin V-FITC/PI 染色结果 正常细胞未

被染色,显微镜下病毒感染对照组的 HeLa 细胞经 Annexin V-FITC/PI 染色后可观察到早期凋亡及晚期凋亡现象;病毒加芪红组细胞的镜下观察结果与正常对照组细胞相似,均未观察到明显的凋亡改变(见图 1)。

3 Hoechst33258 染色结果 利用 Hoechst33258 对各组细胞进行染色,能够观察到病毒感染对照组细胞核出现明亮蓝色荧光;而正常对照组细胞和病毒加芪红组只有灰暗蓝色,没有明亮的发光点(见图 2)。

4 凋亡 TUNEL 分析 TUNEL 是将外源性核苷酸掺入到凋亡细胞中,在末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的催化下,使其与凋亡细胞因内源性核酸酶的激活产生的单股或双股 DNA 断链 3' 末端核苷酸相结合,并通过一定的显示系统使之显示出来。酶底物显色以后,可直接用光镜观察被染的细胞。结果显示病毒对照组出现明显凋亡染色,而其他 3 组变化不明显(见图 3)。

5 流式细胞术(FCM)检测结果 凋亡的标准特征之一是基因组 DNA 以核小体为单位发生断裂,除

用常规的琼脂糖凝胶电泳检测外,也可用凋亡细胞核 PI 标记后的流式细胞计量术来定量分析。PI 是一种阳离子染料,膜膜完整的细胞可对其拒染,只对凋亡的细胞着色,使细胞核呈现红色荧光。实验结果发现,病毒对照组细胞能够观察到非常明显的凋亡峰,病毒加芪红组存在部分细胞凋亡,而正常细胞对照组、芪红胶囊对照组几乎没有发生凋亡(见图 4, 表 1)。

6 芪红胶囊对凋亡相关基因表达影响的 RT-PCR 检测结果 用 Photoshop 6.0 分析各基因灰度值,发现各组管家基因 GAPDH 条带亮度基本一致,不存在统计学差异 ($P > 0.05$); bcl-2 和 bax 基因在病毒表 1 芪红胶囊对 CVB₃ 引起细胞凋亡的抑制作用 (% , $\bar{x} \pm s$)

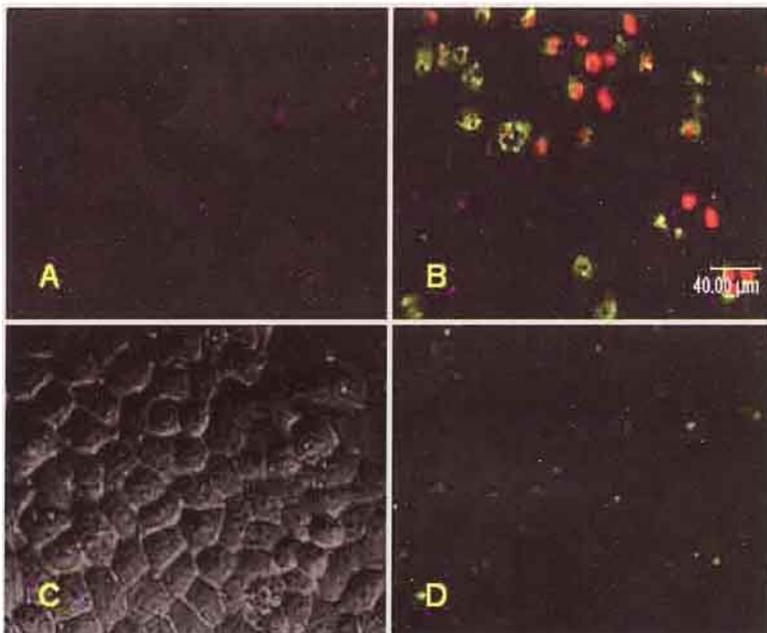
| 组别 | n | 凋亡率 | G ₀ 期 + G ₁ 期 | G ₂ 期 + S 期 |
|-------|---|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 病毒 | 6 | 66.31 ± 6.12 | 18.47 ± 1.94 | 15.22 ± 2.54 |
| 病毒加芪红 | 6 | 6.15 ± 4.27* [△] | 51.14 ± 5.23* [△] | 42.71 ± 6.36* [△] |
| 芪红 | 6 | 0.93 ± 0.16 [△] | 65.67 ± 4.19 [△] | 34.21 ± 3.08 [△] |
| 正常对照 | 6 | 0.74 ± 0.21 [△] | 67.18 ± 8.27 [△] | 32.32 ± 3.72 [△] |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与病毒组比较,[△] $P < 0.01$

表 2 通过 RT-PCR 条带灰度扫描分析芪红胶囊对凋亡相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

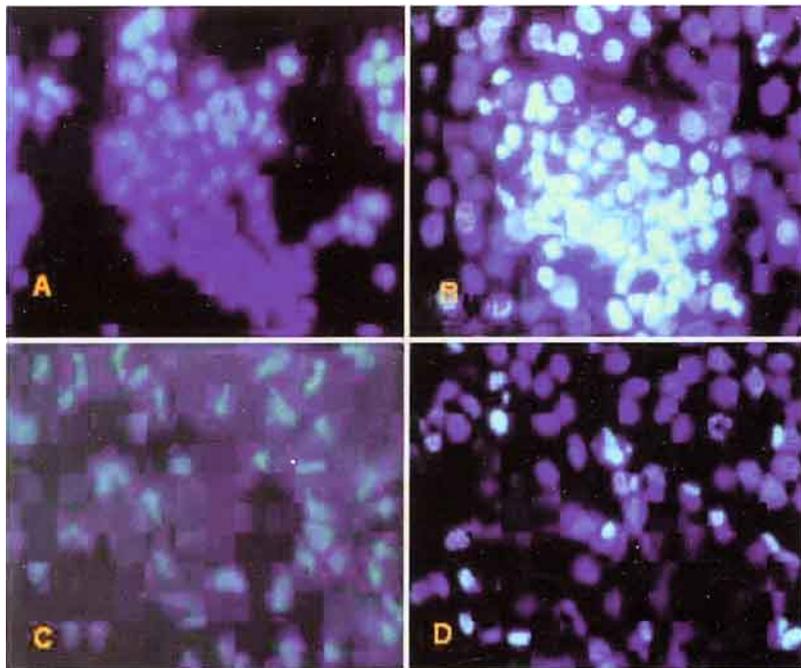
| 组别 | n | GAPDH | bcl-2 | bax | P53 |
|-------|---|--------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 病毒 | 6 | 55.52 ± 2.31 | 63.78 ± 7.15 | 49.16 ± 3.21 | 9.67 ± 2.10 |
| 病毒加芪红 | 6 | 58.47 ± 1.69 | 77.14 ± 8.92 [△] | 34.71 ± 2.58 [△] | 14.95 ± 1.68* [△] |
| 芪红 | 6 | 58.94 ± 3.61 | 73.35 ± 6.12 [△] | 34.72 ± 3.47 [△] | 29.16 ± 3.27 [△] |
| 正常对照 | 6 | 57.72 ± 4.25 | 72.65 ± 7.42 [△] | 30.08 ± 2.64 [△] | 34.26 ± 2.79 [△] |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与病毒组比较,[△] $P < 0.01$



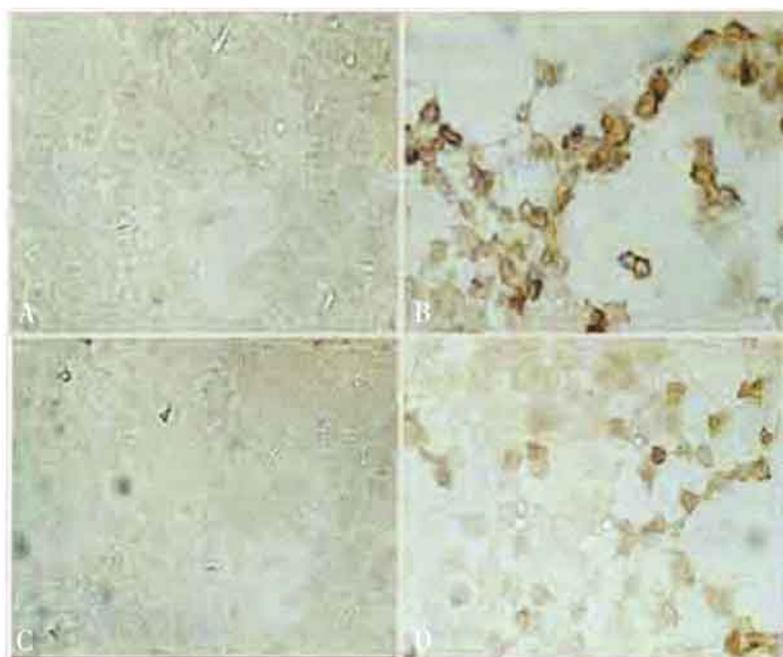
注:A:正常对照组;B:病毒组;C:芪红组;D:病毒加芪红组;各组细胞培养 2 天以后使用 Annexin V/PI 染色,在倒置显微镜(x200)下,观察到病毒组细胞核与细胞膜分别呈现红色和绿色荧光,提示存在凋亡;其他 3 组细胞无明显凋亡改变

图 1 通过 Annexin V/PI 染色观察芪红胶囊对病毒引起细胞凋亡的抑制作用



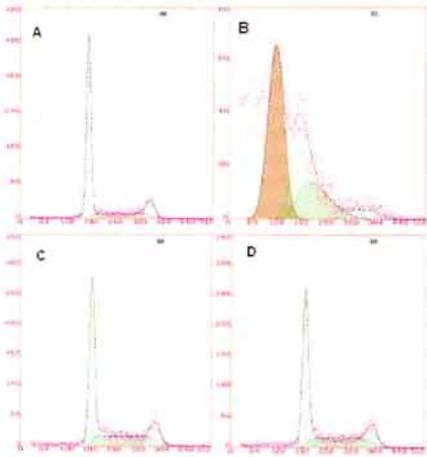
注:A:正常对照组;B:病毒组;C:芪红组;D:病毒加芪红组;各组细胞培养 2 天以后使用 Hoechst 33258 染色,在倒置显微镜($\times 200$)下,病毒组细胞核呈强蓝色荧光,提示存在凋亡;正常对照组、芪红组细胞变化不明显;病毒加芪红组细胞偶见凋亡

图 2 采用 Hoechst 33258 染色观察芪红胶囊对病毒引起细胞凋亡的抑制作用



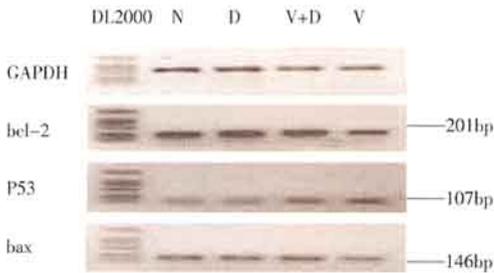
注:A:正常对照组;B:病毒组;C:芪红组;D:病毒加芪红组;各组细胞培养 2 天以后使用 TUNEL 染色,在倒置显微镜($\times 200$)下,观察到病毒组细胞染色阳性,提示存在凋亡;正常对照组、芪红组细胞变化不明显;病毒加芪红组部分细胞染色阳性

图 3 采用 TUNEL 观察芪红胶囊对病毒引起细胞凋亡的抑制作用



注:A. 正常对照组,细胞凋亡率为 0.74%; B. 病毒组,细胞凋亡率为 66.31%; C. 芪红组,细胞凋亡率为 0.93%; D. 病毒加芪红组,细胞凋亡率为 6.15%

图 4 采用流式细胞仪观察芪红胶囊对病毒引起细胞凋亡的抑制作用



注:GAPDH 基因在各组中的表达没有差异,病毒组(V)的 bax/bcl-2 比例明显高于正常对照组(N),芪红组(D)、病毒加芪红组(V+D)与正常对照组比较差异不明显

图 5 采用 RT-PCR 观察芪红胶囊对凋亡相关基因表达的影响

加芪红、芪红及正常对照组 3 组中也不存在统计学差异 ($P > 0.05$),但是病毒对照组的 bax/bcl-2 比值明显高于其他 3 组,这一结果提示芪红胶囊确实具有抑制细胞发生凋亡的作用(图 5,表 2)。

讨 论

目前,对于病毒性疾病的研究方兴未艾;随着对病毒攻击宿主细胞机理的认识不断加深,研究者提出了许多设想,以期改善宿主细胞受到病毒攻击时所产生的损害。其中包括:免疫调节、宿主细胞内基因表达调控、抗病毒开发等^[8]。但是有一个重要的问题必需解释:每种不同的病毒究竟是通过何种途径导致细胞死

亡,简单地概括为细胞病变效应的提法并不十分恰当^[9]。分子生物学发展为解决这个问题提供了很好的方法。

通过本实验,尤其是 TUNEL 原位标记、Hoechst33258 染色和 Annexin-V /PI 染色充分证明:柯萨奇病毒感染细胞以后存在明显的凋亡现象;此外通过流式细胞仪分析细胞凋亡发生率,定量地确认出凋亡在病毒侵袭细胞中的重要作用。以上实验明确了在 CVB 感染细胞以后,死亡细胞多数属于凋亡,而不是坏死。这个结论与现在部分文献所认为的观点相一致^[1]。

与以上实验同步进行的芪红胶囊加病毒组的实验观察结果显示:芪红胶囊具有明显的抑制凋亡发生的作用,其中 RT-PCR 结果提示芪红胶囊能够逆转病毒感染所导致的 bax/bcl-2 比值改变,这一结果从分子水平对芪红胶囊为什么能够抑制凋亡发生提供了可信的解释。基于以上实验结果,我们将对芪红胶囊深入的作用机理做进一步的探讨。

参 考 文 献

- Bennett MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 2002; 87:480—487.
- Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82(11): 1111—1129.
- Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death; learning from the past for the future. *Circulation* 1999; 99(8):1091—1100.
- Gougeon ML, Montagnier L. Apoptosis in AIDS. *Science* 1993; 260(5112):1269—1270.
- Maclellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1997; 81(2):137—144.
- Rhonna M Gurevich, Shareef Mustapha, Lorrie A, et al. Molecular mechanisms of apoptosis in heart failure. *Heart Failure Rev* 1999; 4:157—163.
- Li BY, Qiao GF, Zhou H, et al. Cytosolic-Ca²⁺ and coxsackievirus B₃-induced apoptosis in cultured cardiomyocytes of rats. *Acta Pharmacol Sin* 1999; 20(5):395—399.
- Colston JT, Chandrasekar B, Freeman GL. Expression of apoptosis-related proteins in experimental Coxsackievirus myocarditis. *Cardiovascular Res* 1998; 38(1):158—168.
- Takehiko Yamada, Akira Matsumori, Wang WZ, et al. Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *Heart Vessels* 1999; 14:29—37.

(收稿:2004-09-03 修回:2005-03-22)