

柴胡提取物对 CVB_{3m} 感染小鼠心肌细胞 凋亡相关基因表达的影响

王雪峰¹ 周 丽² 南春红³ 王怀良¹

摘要 目的 探讨柴胡提取物调节心肌细胞凋亡的作用机制。**方法** 以柯萨奇病毒嗜心肌株(CVB_{3m})腹腔注射诱导 BALB/c 小鼠病毒性心肌炎模型,将实验小鼠分为正常对照组、模型组、柴胡提取物组,柴胡提取物组每天予 0.2ml/10g 的浓度为 2mg/ml 的柴胡提取物灌胃,正常对照组、模型组予以等量生理盐水灌胃,于造模后第 10 天处死,采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,采用免疫组化、RT-PCR 法检测各组小鼠心肌中 Fas、Bcl-2、Caspase3 表达。**结果** 正常组小鼠心肌未检测到凋亡的心肌细胞,Fas、Bcl-2、Caspase3 均有不同程度表达,模型组可见大量心肌细胞凋亡,且 Fas、Bcl-2、Caspase3 表达均强于对照组($P<0.01$),柴胡提取物组心肌细胞凋亡明显减少,与模型组比较差异显著($P<0.01$),Fas、Caspase3 表达明显降低,Bcl-2 表达轻度升高。**结论** 柴胡提取物可以抑制病毒性心肌炎时心肌细胞凋亡,明显下调 Fas 及 Caspase3 表达,轻度上调 Bcl-2 表达。

关键词 柴胡提取物;心肌炎;细胞凋亡;柯萨奇 B₃ 病毒

Effect of Radix Bupleuri Extract on Cardiomyocyte Apoptosis Related Genes Expression in Mouse Infected with Cocksackie Virus B_{3m} WANG Xue-feng, ZHOU Li, NAN Chun-hong, et al *Department of Clinical Pharmacology, China Medical University, Shenyang (110032)*

Abstract Objective To explore the mechanism of Radix Bupleuri (RB) extract in regulating cardiomyocyte apoptosis. **Methods** The BALB/c mouse inoculated with the cardiomyocytophilic strain Cocksackie virus B_{3m} (CVB_{3m}) by peritoneal injection was adopted as viral myocarditis model. The experimental mice were divided into the normal control (A), the model (B) and the RB (C) groups. Mice in Group C were given 0.2 ml/10g of RB extract, 2 mg/ml in concentration by gastrogavage once daily, while equal volume of normal saline was given by gastrogavage to mice in Group A and B. All the mice were sacrificed on the 10 th day after modeling. The cardiomyocyte apoptosis was detected by TDT/Dutp nick end labelling (TUNEL). The expression of Fas Bcl-2, and Caspase3 protein in myocardium was determined by immunohistochemistry and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The apoptotic cell was not found in Group A, but Fas, Bcl-2 and Caspase3 were expressed in different degree. In Group B, a lot of apoptotic cells could be seen, with expression of Fas, Bcl-2 and Caspase3 stronger than those in Group A ($P<0.01$). Compared with Group B, the apoptotic cardiomyocyte in Group C was significantly reduced ($P<0.01$), with the expression of Fas and Caspase3 significantly lowered but expression of Bcl-2 increased slightly. **Conclusion** RB extract could inhibit the cardiomyocyte apoptosis in animal with viral myocarditis, obviously down-regulate the expression of Fas and Caspase3, and slightly up-regulate Bcl-2 expression.

Key words Radix Bupleuri extract; myocarditis; cell apoptosis; Cocksackie virus B₃

基金项目:国家自然科学基金(No. 30371832),省教育厅攻关计划(No. 20212264)资助

作者单位:1. 中国医科大学临床药理教研室(沈阳 110032);2. 辽宁中医学院 2001 级研究生;3. 辽宁中医学院附属医院

通讯作者:王雪峰,博士, Tel: 024 - 86213842, E-mail: lnzywxf@tom.com

细胞凋亡是病毒性心肌炎造成心肌损伤的原因之一,也是导致慢性心肌炎及扩张性心脏病的主要原因之一^[1]。细胞凋亡是在自身基因调控下进行的一种主动死亡,其发生受多种基因表达的调控。在哺乳类细胞中,凋亡相关基因 Fas、Bcl-2 及 Caspase 家族被认为与细胞凋亡关系密切^[2]。柴胡具有明显的调节免疫和保护心肌细胞的作用^[3],本研究对病毒性心肌炎心肌

细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响,作了初步探讨。

材料与方法

1 动物与毒株 SPF 级 BALB/c 小鼠,雄性,4~5 周龄,体重 14~16g,中国医科大学实验动物中心提供;CVB_{3m}(Nancy 株)由首都儿科研究所提供,-80℃ 保存,经 HeLa 细胞增殖,TCID₅₀为 10⁻³。

2 仪器 计算机图像分析仪、三高 CMISA 系列(由北京航空航天大学图像中心、北京中山生物技术有限公司联合生产)、蛋白核酸分析仪(美国 Beckman DU-600)、PCR 仪(美国 PE-9600)、低温高速离心机(德国 Biofuge 28RS)、电泳仪(上海天能 EPS-300)、天能凝胶系统、日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪、C-R3A 色谱数据处理机、SIL-6A 进样器。

3 药物 柴胡提取物由辽宁中医学院药理学系提供。具体制备方法:取柴胡,粉成粗粉,加乙醇 8 倍量,回流提取两次,每次 2h,合并乙醇提取液,减压回收乙醇,浸膏加水 1 倍量,搅拌,过滤,滤液加正丁醇萃取两次,合并正丁醇减压回收正丁醇,浸膏减压烘干,即得。

4 试剂 免疫组化及凋亡检测试剂盒为武汉博士德生物有限公司产品,TRIZOL 总 RNA 提取试剂为 GIBCO 公司产品,RT-PCR 试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品。

5 心肌炎模型的制备、分组 将小鼠随机分为 3 组,正常对照组、模型组、柴胡提取物组各 15 只,按照文献^[4]方法造模,造模后 2h 开始灌胃给药,对照组与模型组每天均给予 0.2ml/10g 的生理盐水 1 次,柴胡提取物组每天给予 0.2ml/10g 的浓度为 2mg/ml 的柴胡提取物混悬液 1 次。造模第 10 天处死所有小鼠,取其心脏,半数冻存于 -80℃ 冰箱,待做逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及冰冻切片;半数用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,并沿左心室轴线每隔 1mm 连续切取数张 5μm 厚的切片,分别做常规 HE 染色、免疫组化、TUNEL 法检测。

6 免疫组化 将石蜡切片脱蜡至逐渐水化,用 3%过氧化氢孵育 5min,进行热抗原修复,采用山羊血清封闭,室温孵育 30min,依次加入一抗、二抗及酶标进行反应,最后以 DAB 进行显色、复染,封片。光镜下观察。

7 RT-PCR 采用 Trizol(购自 Invitrogen 公司)提取总 RNA,按 BcaBEST 逆转录及 PCR 说明进行 RT-PCR^[5]。以 PCR Marker 作为标准分子量参照进

行产物鉴定及定性分析。

8 凋亡心肌细胞测定 采用 TUNEL 法^[6]原位检测心肌细胞凋亡,每一标本取 3 个不同部位的切片各 2 张,按末端脱氧核苷酸转移酶(TdT 酶)介导的带荧光的 dUTP 缺口末端标记法标记凋亡细胞核。

9 计算机图像分析 将 TUNEL 与免疫组化切片于光镜下 200 倍放大,采用三高 CMISA 软件分析阳性结果,每张切片随机选择 10 个视野,测定视野中阳性细胞面积占所有细胞面积的百分比及阳性信号平均灰度,计算:免疫组化阳性信号指数(positive expression index, PEI):PEI = 阳性信号面积 × 阳性信号平均灰度 / 测定面积 × 100%。细胞凋亡指数(apoptotic index, AI):AI = 阳性信号面积 × 阳性信号平均灰度 / 测定面积 × 100%。

10 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件包进行统计分析,采用方差分析及 *t* 检验。

结 果

1 各组小鼠心肌组织病理变化 模型组小鼠可见心肌组织中有大量的炎性细胞浸润、局灶性坏死和肌纤维排列紊乱断裂等明显心肌炎病理改变,死亡 9 只;对照组无 1 只死亡,且所有小鼠心肌中未见炎性细胞浸润及心肌细胞坏死等心肌炎病理改变;柴胡提取物组死亡 1 只,与模型组比较,心肌病理改变明显减轻,炎性细胞浸润及心肌坏死减少。

2 各组小鼠心肌细胞凋亡比较 模型组及柴胡提取物组小鼠均有心肌细胞凋亡(见图 1),而对照组小鼠未见到凋亡细胞(凋亡细胞核呈棕黄色,正常细胞核呈淡蓝色)。凋亡的心肌细胞多出现在炎症灶周围,还可见到浸润的淋巴细胞凋亡。柴胡提取物组小鼠心肌细胞凋亡明显少于模型组,见表 1。

3 各组小鼠心肌中 Fas、Bcl-2、Caspase3 蛋白表达比较 见表 1。Fas 蛋白阳性染色细胞多分布于炎症灶周围的心肌细胞、少量浸润细胞及血管内皮细胞, bcl-2 阳性染色细胞主要分布于炎症灶周围的心肌细胞及少量血管平滑肌细胞。Caspase3 阳性染色细胞多分布于炎症灶周围的心肌细胞、浸润细胞、胞外也可见到阳性信号(图 2,3,4)。正常组小鼠心肌可见少量 Fas、Bcl-2 及 Caspase3 蛋白表达。模型组 Fas、Bcl-2、Caspase3 表达较正常组均明显增强,但以 Fas 上调更为显著。柴胡提取物干预后 Fas 表达明显低于模型组, Bcl-2 表达轻度上调, Caspase3 也有一定程度上调。

4 RT-PCR 检测小鼠心脏中 Fas、Bcl-2 mRNA 表

达 对照组小鼠心肌组织中 Fas mRNA 的检出率 30% (6/20), 由图 5 可见, 其扩增条带极不清晰, 模型组小鼠心肌 Fas mRNA 的检出率为 90% (18/20), 与对照组比较差异显著, 其扩增条带清晰明亮, 柴胡提取物组 Fas mRNA 的检出率为 55% (11/20), 其扩增条带隐约可见, 强度介于对照组与模型组之间; 而 Bcl-2 mRNA 的各组检出率均超过 50%, 扩增条带以柴胡提取物组最清晰, 对照组最模糊, 模型组介于二者之间 (见图 6)。

表 1 各组小鼠心肌细胞凋亡指数及 Fas、Bcl-2 及 Caspase3 蛋白表达比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	AI	Fas	Bcl-2	Caspase3
对照	6	0	1.03 ± 0.26	3.10 ± 0.44	0.56 ± 0.29
模型	6	4.64 ± 0.69 *	16.53 ± 1.41 *	18.48 ± 0.83 *	9.90 ± 0.32 *
柴胡提取物	6	2.04 ± 0.76 * △△	8.76 ± 1.05 * △△	19.51 ± 0.46 * △	5.26 ± 0.32 * △

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

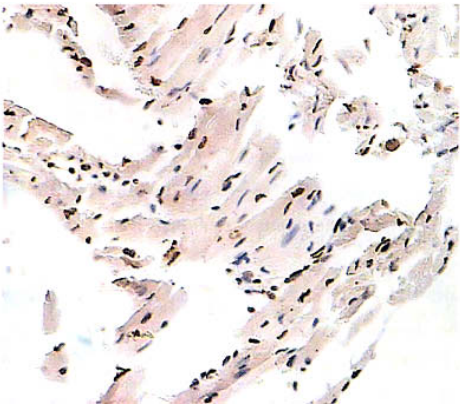


图 1 CVB₃m VM 小鼠心肌凋亡细胞, DAB×200

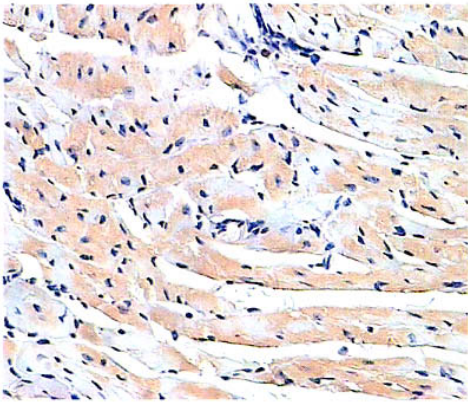


图 2 CVB₃m VM 小鼠心肌 Fas 阳性细胞, DAB×200

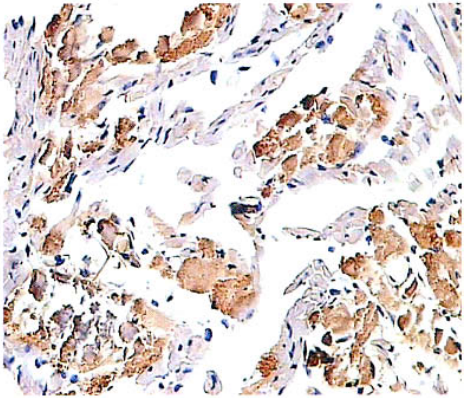


图 3 CVB₃m VM 小鼠心肌 Bcl-2 阳性细胞, DAB×200

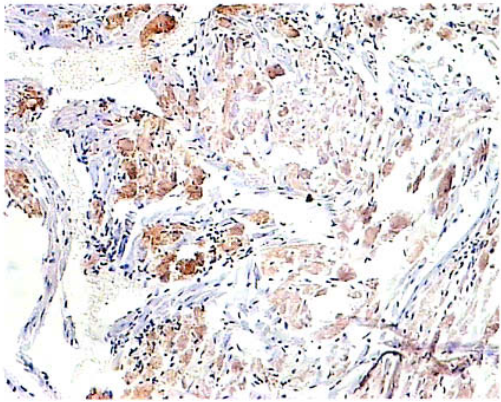
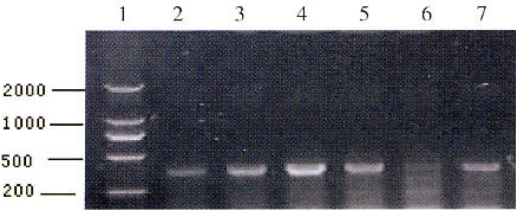
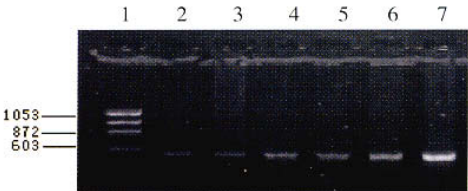


图 4 CVB₃m VM 小鼠心肌 Caspase3 阳性细胞, DAB×200



注: 1.Marker; 2、3. 柴胡提取物组; 4、5. 模型组; 6、7. 对照组

图 5 各组小鼠心肌中 Fas mRNA 表达



注: 1.Marker; 2、3. 对照组; 4、5. 模型组; 6、7. 柴胡提取物组

图 6 各组小鼠心肌中 Bcl-2 mRNA 表达

讨 论

细胞凋亡是病毒性心肌炎心肌损伤的机制之一, 与心肌炎向心肌病发展密切相关。实验表明病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡与病变程度一致^[7]。柴胡提取

物有抗炎、抗纤维化的作用。本研究首次探讨柴胡提取物抑制病毒性心肌炎心肌细胞凋亡及调节凋亡相关蛋白 Fas、Bcl-2、Caspase3 表达的作用,证实了柴胡提取物可通过减少 Fas、Caspase3 表达,增强 Bcl-2 表达,减少心肌细胞凋亡,减轻心肌损伤,预防心肌纤维化及扩张性心肌病的发生。

Fas/APO-1 属于 TNFR/NGFR 家族成员,主要表达于成熟的淋巴细胞及心脏等。Fas 可以通过 Fas/FasL 结合,启动结合于细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic lymphocytes, CTL)的靶细胞的 Fas 死亡信号而致靶细胞凋亡;而 Caspase3 是 Fas 介导凋亡信号传导途径下游的 1 个关键效应组分。体外实验已经证实,CTL 可以通过 Fas/FasL 路径导致心肌细胞凋亡^[8]。癌基因 Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的效应,可阻断 Fas 基因诱导的细胞凋亡,其产物主要定位于细胞质膜。另外,Caspase3 的活化不仅参与了 Fas/FasL 途径介导的细胞凋亡过程,在其他凋亡途径中也有重要作用^[9]。本研究显示病毒性心肌炎小鼠不仅心肌细胞凋亡增加,且心肌中 Fas 蛋白及 mRNA 表达明显增加,提示凋亡基因 Fas 的蛋白表达升高及心肌细胞凋亡在病毒性心肌炎心肌病变中有重要作用;Caspase3 蛋白表达也明显增加,说明 Caspase3 在 CVB_{3m} 病毒性心肌炎心肌细胞凋亡过程中有一定作用,但增加的 Caspase3 是否以活化的酶形式存在,以及其在 Fas 介导凋亡信号传导途径中的作用时相还有待于进一步研究。病毒性心肌炎小鼠心肌细胞 bcl-2 的表达也有增加,这可能与 CVB_{3m} 感染有关,CVB_{3m} 病毒可能通过促进 Bcl-2 的表达,延迟心肌细胞凋亡为病毒的存在及复制提供条件;另外由于 Bcl-2 并不是单独起作用,而是与同家族中其他一些凋亡相关基因协同作用,其表达增强也可能与 Bcl-2 家族的其他成员表达的改变相关;这有待于进一步对 Bcl-2 家族其他基因的研究。也有可能是病毒感染后,心肌细胞大量凋亡,机体自身的一种保护作用。柴胡提取物干预后明显下调 Fas 蛋白及 mRNA 表达及 Caspase3 蛋白表达,轻度上调 Bcl-2 表达,减少心肌细胞凋亡,显示了柴胡提取物对病毒性心肌炎心肌细胞凋亡及凋亡相关基因的表达有一定作用。

本研究结果显示,柴胡提取物可以通过抑制病毒性心肌炎时心肌细胞凋亡、明显下调 Fas 及 Caspase3 表达,上调 Bcl-2 表达从而减轻心肌损伤,保护心肌。同时可以看出,柴胡提取物对于 Fas 介导的细胞凋亡途径有一定调节作用,但其是否能够影响 Caspase3 的

活化及作用于细胞凋亡的信号传导还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- Huber SA. T cells expressing the gamma delta T cell receptor induced apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2000; 45(3):579—587.
- 彭黎明,王曾礼主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社,2000:112—125.
Peng LM, Wang ZL, editors. Theoretical and clinical issues of apoptosis. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 112—125.
- 郑虎占,董泽宏,余靖主编. 中药现代研究与应用. 北京:学苑出版社,1998:3699—3702.
Zheng HZ, Dong ZH, She J, editors. Modern research and application of Chinese medicine. Beijing: Academy Press, 1998: 3699—3702.
- 王雪峰,王永梅,魏克伦,等. 克隆测序鉴定克萨奇病毒 B_{3m} 诱导的 BALB/c 小鼠急性心肌炎模型. *中华儿科杂志* 2001;39(12):753.
Wang XF, Wang YM, Wei KL, et al. Identify CVB_{3m}-induced murine viral myocarditis model by clonal sequencing. *Chin J Pediatrics* 2001;39(12):753.
- Tanaka M, Ito H, Adachi S, et al. Hypoxia induced apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 426—433.
- Bardales RH, Hailey LS, Xie SS, et al. In situ apoptosis assay for the detection of early acute myocardial infarction. *Am J Pathol* 1996;149(3):821—29.
- 韩波,马沛然,刘芳,等. 细胞凋亡和 Fas/FasL 基因在小鼠病毒性心肌炎发病中的作用. *中华儿科杂志* 2000; 38(7):403—408.
Han B, Ma PR, Liu F, et al. The role of apoptosis and Fas/FasL in the occurrence of murine viral myocarditis. *Chin J Pediatrics* 2000; 38(7):403—408.
- Felzen B, Shilkrot M, Less H, et al. Fas (CD95/APO-1)-mediated damage to ventricular myocytes induced by cytotoxic T lymphocytes from perforin-deficient mice: a major role for inositol 1,4,5-trisphosphate. *Circ Res* 1998; 82(4):438—450.
- 熊世勤,朱锡华. Caspase 家族与 Fas/APO-1 介导凋亡的信号传导. *免疫学杂志* 1999;15(3):212—216.
Xiong SQ, Zhu XH. Caspase family and the apoptosis signal transference mediated by Fas/APO-1. *Immunol J* 1999;15(3): 212—216.

(收稿:2004-06-14 修回:2005-07-05)