益气活血中药复方对 CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞 actin、Cx43 表达及 GJIC 功能的影响

张明雪[1]　何　伟[2]　顾　平[1]　车红花[1]

摘要　目的　观察益气活血中药复方对柯萨奇病毒 B 组 3 型(Coxsackie virus B 3, CVB3)病毒性心肌炎心肌细胞间缝隙连接结构及通讯功能的影响。**方法**　以免疫组化法检测正常组、病毒组、益气活血中药复方组心肌细胞肌动蛋白(actin)及连接蛋白(connexin 43, Cx 43)表达;,并以激光扫描共聚焦显微镜法检测各组心肌细胞荧光漂白恢复率。**结果**　益气活血中药复方能上调 CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞 actin 及 Cx43 表达,能显著改善细胞间缝隙连接通讯(GJIC)功能。**结论**　益气活血中药复方具有对抗 CVB3 致心肌细胞骨架蛋白损伤,修复 CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞间缝隙连接通道结构,改善 CVB3 攻击后心肌细胞 GJIC 功能的作用。

关键词　病毒性心肌炎;心肌细胞;心肌细胞肌动蛋白;连接蛋白;细胞间缝隙连接通讯;激光扫描共聚焦显微镜

Effects of Chinese Herbal Compound for Supplementing Qi and Activating Blood Circulation on Actin, Cx43 Expressions and Gap Junctional Intercellular Communication Functions of Myocardial Cells in Patients with Coxsackie Virus B 3 Viral Myocarditis ZHANG Ming-xue, HE Wei, GU Ping, et al *First Affiliated Hospital, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032)*

ABSTRACT　Objective　To observe the effect of Chinese herbal compound for supplementing qi and activating blood circulation (CHC) on the gap junctional intercellular communication (GJIC) function of myocardial cells in patients with Coxsackie virus B 3 (CVB3) viral myocarditis. **Methods**　Expressions of actin and connexin43 (Cx43) in myocardial cells of patients arranged in three groups (the normal control group, the viral infected group and the CHC treated group) were detected by immunohistochemical method; the fluorescence photobleaching recovery rate of cells was detected by laser scanning confocal microscope. **Results**　As compared with the viral infected group, the expressions of actin and Cx43 were increased and the GJIC function was improved in the CHC treated group. **Conclusion**　CHC could antagonize viral injury on skeleton protein, and repair the structure of gap junction channel to improve the GJIC function of myocardial cells after being attacked by CVB3.

KEYWORDS　viral myocarditis; myocardial cells; actin; connexin 43; gap junctional intercellular communication; laser scanning confocal microscope

细胞间缝隙连接通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是以细胞间缝隙连接结构为基础的细胞间物质、能量及信息交换方式,是多细胞生物最普遍的通讯方式,对细胞的增殖分化、新陈代谢等生理功能的调节,乃至对整个机体的生长发育及代谢平衡起关键作用[1,2],所以,针对缝隙连接通讯功能研究成为临床各系统疾病发病机制及药物治疗机制探讨的热点内容。在缝隙连接通讯的研究手段中,基于激光扫描共聚焦显微镜的荧光漂白恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)具有高分辨率、高灵敏度、实时定量检测等优点。通过高强度激光脉冲淬灭细胞内某一区域荧光标记物,观察相邻细胞内荧光物质通过缝隙连接通讯结构扩散至淬灭区域的速率及程度,即荧光恢复率大小,从而达到检测 GJIC 功能的目的。本实验以免疫组化方法检测各组心肌细胞肌动蛋白(actin)及细胞间缝隙连接蛋白 43 (Cx43)表达,同时,选用对细胞无毒性作用的 6-碳氧

基金项目:1. 国家自然科学基金面上项目(No. 30873399); 2. 教育部博士点基金(No. 20070162002); 3. 辽宁省高等学校优秀人才支持计划

作者单位:1. 辽宁中医药大学附属医院(沈阳 110032); 2. 中国中医科学院临床基础研究所

通讯作者:张明雪,Tel:024-82318256, E-mail:zhmx6228@163.com

万方数据

荧光素醋酸盐(6-carboxy fluorescein diacetate, 6-CFDA)作为荧光探针染料，以 FRAP 技术观测各组心肌细胞荧光恢复率，试图揭示益气活血中药复方具有减轻心肌细胞损伤，修复并改善 CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞间缝隙连接结构和通讯功能的作用。

材料与方法

1 动物 新生 2 ~ 3 天 Wistar 乳鼠，20 只，由辽宁中医药大学实验动物中心提供。

2 病毒株 CVB3m 嗜心肌毒株，哈尔滨医科大学微生物实验室提供。

3 药物 益气活血中药复方由黄芪、白参、丹参、郁金、麦冬等药组成，制成含生药浓度为 1 g/ mL 的注射液(沈阳药科大学药学院制备)。

4 试剂及仪器 改良的 Eagle 培养基(Dulbeccos Modified Eagle Medium, DMEM;GIBCO 公司，美国)、特级胎牛血清(灏洋生物制品科技有限公司，天津)、6-碳氧荧光素醋酸盐(Sigma 公司，美国)、D-PBS With Ca^{2+}、Mg^{2+}(江苏省海门市碧云天生物技术研究所提供)、Rabbit anti-actin、链霉亲和素-生物素复合物法(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组化试剂盒、抗原修复液、DAB 显色试剂盒，均为武汉博士德生物工程有限公司产品。

NUAIRE425-400 生物安全柜(NUAIRE 公司，美国)、NUAIRE-4950E 二氧化碳培养箱(NUAIRE 公司，美国)、LEITZDMIL 倒置荧光显微镜(LEICA 公司，德国)、35 mm 激光扫描共聚焦显微镜专用培养皿(Corning 公司，美国)、TCS SP2 AOBS 激光扫描共聚焦显微镜(LEICA 公司，德国)、SHA-B 水浴恒温振荡器(江苏省金坛市神科仪器厂产品)。

5 实验方法

5.1 乳鼠心肌细胞的分离、培养及 CVB3 病毒性心肌炎模型的建立。

5.1.1 乳鼠心肌细胞的分离和培养 剪取乳鼠心室肌，用预冷 HBSS 液冲洗 3 次，剪为 1 mm^3 碎块，加入 0.25% 胰蛋白酶，37 ℃水浴震荡消化 50 ~ 60 min，加适量 10% 胎牛血清中止消化，1 000 r/ min，离心 10 min，弃上清液，加入 8 mL HBSS 液洗涤细胞，1 000 r/ min，离心 10 min，弃上清液，加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液混匀细胞沉淀，过 200 目滤网，经 60 mm 培养皿纯化 1.5 h 后，分为正常对照组、中药组及 CVB3 病毒感染组，于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育。

5.1.2 CVB3 病毒性心肌炎模型的建立 当心肌细胞生长达 70% ~ 80% 时，加入适量含 CVB3 的 DMEM 维持液，吸附 2 h 后弃去，加入含 2% 胎牛血清的 DMEM 维持液，继续培养 48 h 后，光镜下观察各组细胞生长状态，可见约 50% 心肌细胞形态圆缩，溶解，坏死，部分细胞呈空泡样改变，边界不清，表明 CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞感染模型建立成功。

5.2 SABC 法检测 actin 及 Cx43 蛋白表达 取爬片生长的正常组、病毒组、益气活血中药复方干预组心肌细胞，吸弃各孔培养液，PBS 冲洗后，4% 多聚甲醛室温固定 30 min;用 3% H_2O_2 孵育 5 min。PBS 冲洗 3 次，每次 5 min;滴加正常山羊血清封闭液，室温孵育 20 min，倾去;滴加兔抗大鼠一抗(1∶100)，37 ℃湿盒温育 2 h;PBS 冲洗 3 次，每次 5 min;滴加生物素化羊抗兔二抗，37 ℃湿盒孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次，每次 5 min;滴加 SABC 复合物，37 ℃湿盒孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次，每次 5 min;DAB 显色 15 min，蒸馏水冲洗，苏木素复染 15 s，蒸馏水冲洗，梯度脱水，中性树脂封片，镜下观察拍照，同时以 PBS 代替一抗，作为阴性对照，消除非特异染色造成的假阳性结果。染色结果判定标准为大部分胞浆或胞膜呈弥漫性棕褐色为强阳性表达(+++);部分胞浆或胞膜呈淡棕黄色，程度减弱为弱阳性表达(+);着色程度及面积介于两者之间的为阳性表达(++);散在极少量的细胞呈淡棕黄色者为阴性表达(-)，着色程度及面积介于弱阳性(+)及阴性(-)之间为极弱阳性表达(±)。每组随机选取 10 个视野，结果采用北航图像中心分析系统进行图像分析，通过计算灰度调节区分视野内阳性信号面积，然后计算阳性目标平均光密度。

5.3 激光扫描共聚焦显微镜检测心肌细胞 GJIC 功能

5.3.1 6-CFDA 荧光探针负载 将 25 mg 6-CFDA 溶于 12.5 mL 无水二甲基亚砜中，制备成 2 mg/ mL 的储备液冻存于 -20℃冰箱中，临用时以含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 配成 10 μg/ mL 的应用液，取单层贴壁生长达 70% ~ 80% 的正常组、病毒组、中药干预组心肌细胞，以预温的 PBS 漂洗 2 次，加入浓度为 10 μg/ mL 的 6-CFDA 500 μL，于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育 30 min，取出后 PBS 漂洗掉细胞外多余的6-CFDA，保证背景无荧光干扰，加入适量含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 PBS 后，上机检测。

5.3.2 FRAP 目标细胞的选择与检测 本实验选取 3 种细胞:(1)与周围其他细胞紧密连接，需用激光去淬灭的心肌细胞，即用于研究缝隙连接通讯的目的漂白细胞;(2)孤立于其他细胞，即不存在缝隙连接

万方数据

通讯的单个心肌细胞，也需用激光去淬灭，作为实验对照；(3)与周围其他细胞紧密连接，但不需激光淬灭的心肌细胞，即未漂白细胞，由于其自身有荧光光漂白现象，故用于其他细胞的背景校正。采用共聚焦显微镜自带的 FRAP 软件程序进行检测，在确定预选细胞后，开始预扫描，并进行淬灭，完成后监测 3 种细胞 4 min，观察荧光恢复情况。根据公式：荧光漂白恢复率(%) = (淬灭后最高荧光强度 - 淬灭时荧光强度) /(淬灭前荧光强度 - 淬灭时荧光强度) × 100%，计算荧光漂白恢复率。

6　统计学方法　结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 进行单因素方差分析。

结　　果

1　3 组 actin 及 Cx43 蛋白表达结果比较(表 1)　actin 检测结果显示，正常组心肌细胞 actin 呈强阳性表达(+++)，可见棕褐色阳性信号呈均匀的网络状染色。而病毒组 actin 呈弱阳性(+)表达，与正常组阳性目标平均光密度比较，差异有统计学意义($P < 0.05$)。中药治疗组 actin 呈阳性(++)表达，与病毒组阳性目标平均光密度比较，差异亦有统计学意义($P < 0.01$)，表明益气活血中药复方能增加 actin 表达。Cx 43 检测结果发现，正常组心肌细胞呈强阳性表达(+++)，表明正常心肌细胞间存在缝隙连接蛋白表达。而病毒组 Cx43 呈极弱阳性(±)表达，与正常组阳性目标平均光密度比较，差异有统计学意义($P < 0.01$)。中药治疗组 Cx43 呈阳性(++)表达，与病毒组阳性目标平均光密度比较，差异亦有统计学意义($P < 0.05$)，表明益气活血中药复方可上调 Cx43 蛋白表达。

表 1　3 组actin 及 Cx43 表达结果比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	actin	Cx43
正常	10	0.0039 ± 0.0012	0.0013 ± 0.0006
病毒	10	0.0014 ± 0.0005*	0.0004 ± 0.0001**
中药	10	0.0028 ± 0.0007△△	0.0009 ± 0.0001△

注：与正常组比较，*$P < 0.05$，**$P < 0.001$；与病毒组比较，△$P < 0.05$，△△$P < 0.01$

2　3 组心肌细胞 GJIC 功能结果比较(表 2)　正常组心肌细胞漂白后，荧光迅速淬灭，而随着时间的延长，漂白区荧光恢复明显，恢复率较高，表明正常心肌细胞 GJIC 功能良好。而孤立心肌细胞漂白后基本未发现荧光强度的改变，临近漂白目的细胞的背景校正细胞荧光强度呈现下降趋势，说明有荧光染料经细胞间缝隙连接转移至漂白细胞。病毒组心肌细胞漂白后荧光恢复率显著低于正常组心肌细胞，差异有统计学意义($P < 0.05$)，提示 CVB3 感染后破坏细胞间缝隙连接结构，导致细胞间通讯功能降低。中药干预组漂白后荧光恢复率明显升高，与病毒组比较，差异亦有统计学意义($P < 0.01$)，表明益气活血中药复方具有拮抗 CVB3 攻击后心肌细胞间缝隙连接结构损伤的功能。

表 2　益气活血中药复方对 CVB3 心肌细胞 FRAP 后荧光恢复率的影响　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	荧光恢复率(%)
正常	10	65.4 ± 5.8
病毒	10	32.5 ± 6.9*
中药	10	51.3 ± 7.1△

注：与正常组比较，*$P < 0.05$；与病毒组比较，△$P < 0.01$

讨　　论

由于 actin 是真核细胞中含量最为丰富的蛋白质，参与细胞的基本功能活动，在机体内呈成分性表达，且 actin 本身为高度保守的蛋白质，因此，常被用作各种相关研究的内源性参照物。而实验研究证实，多种心脏病发病过程均伴有 actin 的含量增加、降低或缺失。从本实验各组心肌细胞 actin 表达情况来看，病毒组呈弱阳性表达，明显区别于正常组的强阳性表达结果，表明 CVB3 感染后，心肌细胞骨架微丝肌动蛋白的表达量明显降低，其机制可能为柯萨奇病毒蛋白酶 2A 直接切割心肌细胞骨架蛋白，导致心肌细胞不能形成稳定的形态结构，光镜下可见细胞变小、变圆，胞膜皱缩。由于微丝肌动蛋白是心肌的主要收缩蛋白，是心肌细胞搏动的物质结构基础，其在细胞质内参与解聚(去组装)和再聚合(组装)过程，并调控细胞功能的发挥。故其遭到破坏、溶解或空间结构重构后，致使心肌功能下降，使心肌细胞不再呈现搏动特征。而中药治疗组 actin 呈阳性表达，表明益气活血中药复方能对抗 CVB3 致心肌细胞骨架蛋白损伤，通过益气活血中药复方组成药物的现代药理学研究分析，其治疗机制可能与抑制 CVB3 病毒复制，阻断其进一步造成心肌损害，抑制蛋白酶表达，减轻炎症反应及细胞坏死等作用密切相关。

通过 actin 蛋白表达结果可以看出，益气活血中药复方具有减轻 CVB3 感染后心肌细胞结构损伤的作用，为了验证这种保护心肌细胞结构的作用也同样会对心肌细胞间缝隙连接结构具有同样抗损伤作用，我们在参与心血管系统缝隙连接通道表达的主要 Cx 蛋白，如 Cx37、Cx40、Cx43、Cx45、Cx46 中，选取了哺乳动物心室肌细胞间最主要的连接蛋白 Cx43[3]，进行了免疫组化检测。检测结果发现，正常组呈强阳性表达，表明正常单层贴壁生长的心肌细胞间存在缝隙连

万方数据

接结构，这可能是培养心肌细胞维持成片搏动的主要原因之一。病毒组呈极弱阳性表达，与正常组比较，差异有统计学意义，提示病毒感染后，Cx43 蛋白表达受到明显抑制，其机制可能为 CVB3 侵袭后，导致多种细胞因子的产生、分泌和释放，它们促发机体免疫与炎症反应，直接或间接损伤心肌细胞结构和功能，造成心肌细胞膜皱缩、细胞坏死和溶解等，使正常的细胞间缝隙连接结构难以维持。此外，病毒损伤心肌细胞后，也可能导致 Cx43 蛋白合成障碍，或影响其转运至心包膜表面并形成缝隙连接，使心肌细胞间通讯功能丧失，阻碍心肌细胞间正常的物质交换和电兴奋信号传导，导致心肌不能同步收缩及搏动。而经益气活血中药复方干预后，心肌细胞 Cx43 蛋白表达明显上调，提示益气活血中药复方具有改善细胞间缝隙连接结构，增强 GJIC 的作用，进一步证实本方具有较好的抗心律失常作用。由于细胞间缝隙连接结构是 GJIC 功能的基础，因此，我们在免疫组化法测定 Cx43 蛋白表达情况的基础上，进一步采用以激光扫描共聚焦显微镜为检测手段的荧光漂白恢复技术，来反映各组心肌细胞的 GJIC 功能状态。荧光漂白恢复技术的主要原理是：以荧光标记活体细胞中各类分子，通过强激光照射预选目的细胞，使细胞内荧光标记物淬灭而被漂白，由于漂白过程是不可逆的，只有通过细胞间缝隙连接，相邻细胞内荧光标记物才可进入被漂白细胞而得到荧光恢复，通过荧光漂白细胞荧光强度恢复程度和速度，来揭示 GJIC 功能正常与否，因此，FRAP 技术可以研究细胞之间是否存在缝隙连接结构，并且可以对细胞间的信号通讯进行直观的观察[4]。用于 FRAP 的荧光标记物有多种，这些探针均能与待测目标分子结合，且自身能够发生荧光淬灭，如荧光蛋白、6-CFDA、5, 6-CFDA、FITC 等。其中 6-CFDA 对细胞无毒性，具有较强的膜通透性，其本身不发荧光，当进入细胞后，被多种非特异性酯酶水解为 6-碳氧荧光素(6-CF)，这时带电荷的 6-CF 不具备膜通透性，只能通过细胞间连接通道才能在相邻细胞间相互交换和扩散，经 488nm 激光激发后可发出黄绿色荧光[5,6]。

通过 FRAP 检测各组心肌 GJIC 功能发现，正常组心肌细胞荧光漂白恢复率较高，表明正常心肌 GJIC 功能良好。而病毒组心肌细胞漂白后荧光恢复率显著低于正常组心肌细胞，中药干预组漂白后荧光恢复率明显升高。由于 GJIC 功能受细胞间连接蛋白(Cx) mRNA 表达、Cx 合成、转运、装配及其自身的稳定性、磷酸化等因素影响[7]，而我们在采用免疫组化方法检测心肌细胞间缝隙连接蛋白 Cx43 表达时发现，益气活血中药复方能上调经 CVB3 攻击后心肌细胞 Cx43 蛋白的表达，这与 FRAP 实验检测 GJIC 功能结果相应，即缝隙连接蛋白与缝隙连接通讯功能关系密切。由此推测，益气活血中药复方改善 CVB3 病毒性心肌炎心肌细胞 GJIC 功能的重要机制之一是上调 Cx43 蛋白表达，拮抗 CVB3 攻击后心肌细胞间缝隙连接结构损伤，稳定细胞间缝隙连接结构作用。

参 考 文 献

[1] 周逢海，宋波，金锡御，等. 荧光光漂白恢复技术在检测膀胱平滑肌细胞间通讯功能中的应用[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24):2208.
Zhou FH, Song B, Jin XY. et al. Application of fluorescence recovery after photobleaching in the detection of gap junctional intercellular communication in bladder smooth muscle[J]. Acta Acad Med Militaris Tertiae, 2003, 25(24):2208.

[2] 祁琨，邓芙蓉，郭新彪. 纳米二氧化钛颗粒对人肺成纤维细胞缝隙连接通讯的影响[J]. 北京大学学报(医学版)，2009，41(3):297-298.
Qi K, Deng FR, Guo XB. Effects of nanoscale titanium dioxide on intercellular gap junction communication in human lung fibroblasts[J]. J Peking Univ (Health Sci), 2009, 41(3):297-298.

[3] Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart function[J]. Bio Essays, 1996, 18(9):719-730.

[4] Drake MJ, Harvey IJ, Gillespie JI. Autonomous activity in the isolated guinea pig bladder[J]. Exp Physiol, 2003, 88(1): 19-30.

[5] 周逢海，王养民，宋波，等. 18β-GA 对逼尿肌不稳定缝隙连接介导细胞间通讯功能影响[J]. 中华实验外科杂志，2006，23(3): 369.
Zhou FH, Wang YM, Song B, et al. Effect of GJIC in mediated cells in destructor instability by 18β-GA[J]. Chin J Exp Surg, 2006, 23(3): 369.

[6] 丁砺蠡，方强，封建立，等. 膀胱 Cajal 间质细胞对膀胱逼尿肌细胞兴奋调控的结构和功能特征的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(12):1120.
Ding LL, Fang Q, Feng JL, et al. Interstitial cells of Cajal regulates excitability of detrusor myocytes: structure evidence[J]. Acta Acad Med Militaris Tertiae, 2008, 30(12):1120.

[7] Christ GJ, Day NS, Day M, et al. Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity *in vivo*[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284(5):1241-1248.

(收稿:2009-11-23 修回:2010-05-20)

万方数据