

# 黄芪甲苷对病毒性心肌炎小鼠 TLR4、NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$ 表达的影响

周欣 刘春梅 胡安娜 杜自强 王利利 武怡 孟令建 路明

**【摘要】** 目的 探讨黄芪甲苷对病毒性心肌炎小鼠 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA、核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) mRNA 表达及血清肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ ) 的影响。方法 将 80 只雄性 BALB/c 小鼠随机分为柯萨奇病毒感染组 (感染组, 30 只)、黄芪甲苷治疗组 (治疗组, 30 只) 和正常对照组 (对照组, 20 只)。感染组和治疗组小鼠腹腔注射柯萨奇病毒 B3 (CVB3), 建立病毒性心肌炎模型。治疗组于注射病毒后 30 min 开始灌服黄芪甲苷, 每日 1 次  $\times$  7 d; 感染组以生理盐水灌胃; 对照组用不含病毒的 Eagle 液腹腔注射、生理盐水灌胃。各组分别在 7 d、14 d 各随机抽取 8 只小鼠处死, HE 染色后检测心肌病理积分、逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测心肌中 TLR4 mRNA 和 NF- $\kappa$ B mRNA 的表达, ELLSA 法检测血清 TNF- $\alpha$  的含量。结果 感染组心肌病理积分、TLR4 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA 表达及血清 TNF- $\alpha$  的含量较对照组明显增加 ( $P < 0.01$ ), 治疗组心肌病理积分、TLR4 mRNA、NF- $\kappa$ B mRNA 表达及血清 TNF- $\alpha$  的含量较感染组明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论 黄芪甲苷可以通过调节 TLR4、NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  在病毒性心肌炎中的表达, 减轻心肌损伤。

**【关键词】** 心肌炎; NF- $\kappa$ B; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 黄芪甲苷

**Effect of astragaloside on expression of TLR4, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in mice with viral myocarditis** ZHOU Xin, LIU Chun-mei, HU An-na, DU Zi-qiang, WANG Li-li, WU Yi, MENG Ling-jian, LU Ming. Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China

Corresponding author: LU Ming, Email: xzmclm@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect of astragaloside on expression of TLR-4, NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in mice with viral myocarditis. **Methods** Eighty male BALB/c mice were randomly divided into three groups including the Coxsackie-virus B3 (CVB3) infected group ( $n = 30$ ), the CVB3 infected and astragaloside-treated group ( $n = 30$ ) and control group ( $n = 20$ ). The first two groups were intraperitoneally inoculated with CVB3 to induce myocarditis, control group with virus-free Eagle's medium instead. Astragaloside orally administered everyday in astragaloside-treated group from 30 minutes after injecting virus for 7 days. Control group and myocarditis group were used normal saline instead. In the end of first and the second week, 8 mice from each group to select randomly were killed to examine the myocardial pathologic score by HE staining, expression of TLR4 mRNA, NF- $\kappa$ B mRNA by RT-PCR and serum TNF- $\alpha$  volume by ELLSA. **Results** Significant up-regulation of TLR4 mRNA, NF- $\kappa$ B mRNA expression levels, myocardial pathologic score, and serum TNF- $\alpha$  volume were observed in mice of the CVB3 infected group in comparison with control group ( $P < 0.01$ ). TLR4 mRNA, NF- $\kappa$ B mRNA expression levels, myocardial pathologic score, and serum TNF- $\alpha$  volume were remarkably decreased in astragaloside-treated group compared with CVB3 infected group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Astragaloside may exerts some beneficial effect by regulating the expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , which contribute to reduce the myocardial injury.

**【Key words】** Myocarditis; NF-kappa B; Tumor necrosis factor-alpha; Astragaloside

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 是由嗜心病毒感染所致的心肌及间质局灶或弥漫性炎症, 其发病机制尚不完全明了<sup>[1]</sup>, 一般认为与病毒直接损伤以及机体的免疫反应有关。心肌细胞膜上的 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor, TLR4) 能识别病毒或病毒损伤后的

心肌细胞成分, 并可进一步激活核转录因子 NF- $\kappa$ B, 从而引起一系列的炎症应答, 包括炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等) 释放、细胞黏附分子产生和炎症细胞募集等, 促成炎症的发生和发展<sup>[2]</sup>。黄芪甲苷为黄芪有效成分皂苷类的单体成分<sup>[3]</sup>, 大量的临床实践和动物实验研究证明其对病毒性心肌炎有明显的治疗作用<sup>[4]</sup>, 但其作用机制尚未完全阐明。本实验观察黄芪甲苷对柯萨奇病毒感染小鼠 TLR4、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  表达的影

响,以探索黄芪甲苷治疗病毒性心肌炎的机制。

## 材料与方 法

### 一、材料

CVB3 Nancy 标准株由山东省医学科学院微生物研究室提供,病毒原液效价为  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml; BALB/c 小鼠购自徐州医学院动物中心,雄性,4 周龄,体重 14~16 g,共 80 只;许可证编号:SCXK[苏(2010-003)]。

黄芪甲苷由国家生物制品检验研究所(NICBPB)提供,为纯白色干粉剂,批号 0781-9706,用助溶剂羧甲基纤维素钠(CMC)(河北茂源化工有限公司生产,产品型号:PM7,溶解于饮用水,配制成 300 mg/L 浓度溶液备用)制成均匀混悬液,浓度为 10 mg/ml,Trizol 试剂盒和逆转录试剂盒(天跟公司),引物购自爱博斯公司。引物核苷酸序列:β-actin 正义链:5'-GTGGCCGC-CCTAGGCACCA-3';反义链:5'-CTCTTTGATGTCAG-CACGATTC-3';TLR4 正义链:5'-GCCGTTGGTG-TATCTTTGA-3';反义链:5'-AGTTGCCGTTTCTTGTC-3',产物为 275 bp;NF-κB 正义链:5'-GAACGATAAC-CTTTCAGGC-3';反义链:5'-TTTCGATTCCGCTATGT-GTG-3',产物为 130 bp。

动物心肌炎模型的制备及动物分组:80 只 BALB/c 小鼠随机分为三组:正常对照组(对照组, $n=20$ )、CVB3 感染组(感染组, $n=30$ )、黄芪甲苷治疗组(治疗组, $n=30$ )。对照组每只腹腔注射不含病毒的 Eagle 液 0.1 ml。后两组腹腔接种 CVB3 浓度  $10^{-5}$  即  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml,病毒接种日为 0 d。于接种病毒后 30 min 治疗组灌服黄芪甲苷 0.1 ml(按每只给药),每日 1 次,共 7 d,对照组及感染组给生理盐水。

### 二、留取标本

分别于接种后第 7、14 天每组随机抽取 8 只小鼠,经眼球采血后处死并取小鼠心脏。将血离心后分装血清于  $-80$  °C 冻存,将心脏沿左心室长轴一分为二,一部分用 10% 甲醛固定待病理组织学检测,余下心肌组织放入  $-80$  °C 保存用于 RT-PCR 检测。

### 三、检测项目

1. 动物心肌炎症积分的测定:10% 甲醛固定,石蜡包埋,组织切片,HE 染色后做组织病理学检查,光镜下观察心肌的病理改变。计分方法即每张切片随机取 5 个视野,计算每个视野区域炎症细胞浸润及坏死区域面积与整个视野的面积之比:无病变计 0 分, <25% 计 1 分,25%~50% 计 2 分,51%~75% 计 3 分, >75% 计 4 分。

2. 血清 TNF-α 检测:采用 ELISA 检测,试剂盒由

武汉博士德生物工程有限公司提供,操作按说明书进行。

3. RT-PCR 检测心肌组织中 TLR4、NF-κB mRNA 的表达:冻存的心肌组织匀浆,样品按 Trizol 试剂盒和逆转录试剂盒说明书进行操作。琼脂糖凝胶电泳:凝胶成像系统检测 PCR 产物与 β-actin 的比值。

### 四、统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用方差分析, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 结 果

1. 心肌病理光镜观察结果(图 1):感染组(图 1A)心外膜充血,心肌周围出现炎症细胞浸润,以淋巴细胞和单核细胞为主,邻近心肌细胞玻璃样或空泡,肌纤维肿胀、断裂;同时存在钙化灶;治疗组(图 1B)小鼠心肌组织病理改变较心肌炎组减轻。对照组(图 1C)心肌细胞结构正常,心肌纤维排列整齐,横纹清晰,间质无水肿。炎症病理积分见表 1。

表 1 动物心肌病理积分( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	7 d	14 d
对照组	8	0	0
感染组	8	1.72 ± 0.78 <sup>a</sup>	2.10 ± 1.04 <sup>a</sup>
治疗组	8	1.27 ± 0.65 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.70 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与感染组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

2. 各组小鼠 7 d、14 d 血清 TNF-α 含量:对照组与感染组比较血清 TNF-α 含量有统计学差异( $P < 0.01$ );治疗组血清 TNF-α 含量较显著降低( $P < 0.05$ )。结果见表 2。

表 2 各组不同时期 TNF-α 含量的比较(ng/L, $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	7 d	14 d
对照组	8	27.49 ± 15.95	25.91 ± 19.02
感染组	8	127.75 ± 65.97 <sup>a</sup>	93.69 ± 53.9 <sup>a</sup>
治疗组	8	61.51 ± 21.27 <sup>b</sup>	41.61 ± 25.94 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与感染组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

3. 心肌组织中 TLR4、NF-κB mRNA 的表达结果(图 2,3):TLR4、NF-κB mRNA 表达的半定量 R 值( $R = \text{TLR4 或 NF-}\kappa\text{B 面密度值}/\beta\text{-actin 面密度值}$ )见表 3,4。从电泳结果及半定量 R 值可以看出,对照组小鼠只表达少量 TLR4、NF-κB mRNA;接种病毒 7 d 后 TLR4、NF-κB mRNA 表达明显高于对照组;14 d 时的表达量较 7 d 时明显增加,治疗组 TLR4、NF-κB mRNA 的表达较感染组减少。

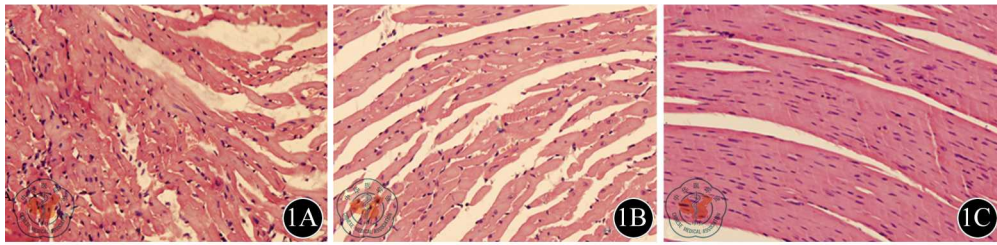
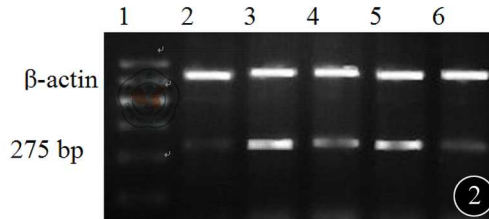
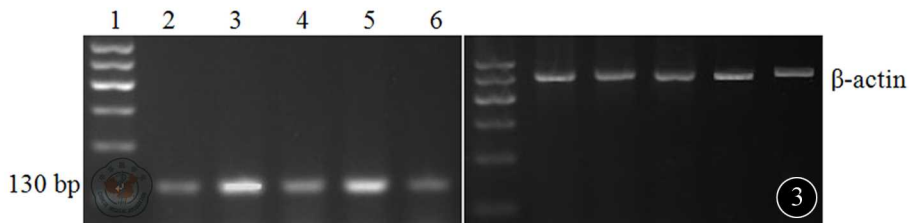


图1 心肌病理切片(HE ×400)。1A: 感染组; 1B: 治疗组; 1C: 对照组



1: Marker 600; 2: 对照组; 3: 14 d感染组; 4: 14 d治疗组; 5: 7 d感染组; 6: 7 d治疗组

图2 不同时期小鼠心肌TLR4 mRNA的RT-PCR产物电泳图



1: Marker 600; 2: 对照组; 3: 14 d感染组; 4: 14 d治疗组; 5: 7 d感染组; 6: 7 d治疗组

图3 不同时期小鼠心肌NF-κB mRNA的RT-PCR产物电泳图

表3 各组不同时期心肌组织中 TLR4 mRNA 的 R 值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	7 d	14 d
对照组	8	0.34 ± 0.12	0.36 ± 0.11
感染组	8	0.99 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.22 <sup>a</sup>
治疗组	8	0.46 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.21 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与感染组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

表4 各组不同时期心肌组织中 NF-κB mRNA 的 R 值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	7 d	14 d
对照组	8	0.60 ± 0.09	0.57 ± 0.15
感染组	8	1.07 ± 0.15 <sup>a</sup>	1.25 ± 0.19 <sup>a</sup>
治疗组	8	0.83 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.93 ± 0.10 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与感染组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

TLR 是天然免疫针对病原微生物的一类识别受体,可使外来微生物迅速被天然免疫系统识别,并作出一系列反应,在天然免疫中发挥重要作用,也是联系天然免疫与后天免疫的桥梁和纽带,TLR4 是其重要成员,属 I 型跨膜受体,由胞外区、跨膜段和胞内区三部分组成。既往对 TLR4 的研究大多集中在 TLR4 对细菌感染的作用,近年来 TLR4 在抗病毒免疫中的作用也

日益受到重视。现在的研究发现,TLR4 能识别多种病毒抗原,通过跨膜结构将病原相关分子刺激信号转入细胞内,经 MyD88 依赖的信号通路和非 MyD88 依赖的信号通路产生复杂的级联信号反应,诱导 NF-κB 等转录因子活化<sup>[5]</sup>,被激活的 NF-κB 进入细胞核内,调控众多细胞因子、炎症介质基因的表达,特别是 TNF-α、IL-1 等原发性促炎介质基因表达的增加<sup>[6-8]</sup>,导致相应炎症介质的合成增加与瀑链式释放,趋化和激活中性粒细胞,活化淋巴细胞,激发针对病毒的炎症反应,反过来,促炎介质又进一步激活 NF-κB,形成正反馈的级联放大效应,最终导致不可逆的心肌损伤,其中 TNF-α 的过度分泌,可以直接损伤心肌细胞,也可以导致免疫调节网络功能失常,形成自身免疫反应。在本实验中,VMC 小鼠在接种病毒后第 7、14 天,心肌组织 TLR4、NF-κB mRNA 表达较对照组增加,且表达水平急性期逐渐升高,第 14 天达到高峰,这与同期小鼠心肌病理积分演变过程一致,与此同时,接种病毒后第 7、14 天血清 TNF-α 均高于对照组,高峰在接种后第 7 天,进一步证明 TLR 4、NF-κB 及 TNF-α 直接参与了病毒性心肌炎的病变过程,与文献报道的结果相似。

病毒性心肌炎尚无特效治疗,黄芪为补气中药,具有扶正固本、补中益气等多种作用。朱红俊等<sup>[9]</sup>发现



黄芪能抑制细胞中复制,并有钙拮抗作用,能减少病毒感染引起的心肌钙离子内流量, TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 参与病毒性心肌炎的心肌损伤,黄芪甲苷可完全抑制 TNF- $\alpha$  诱导 NF- $\kappa$ B 的核转位以及与 DNA 的绑定<sup>[10]</sup>, 本实验显示黄芪甲苷治疗组 TLR4、NF- $\kappa$ B 水平较感染组下降,表明黄芪甲苷能抑制 CVB3 感染小鼠心肌组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B 的表达。黄芪甲苷治疗组血清 TNF- $\alpha$  含量较感染组下降,表明黄芪甲苷能降低血清 TNF- $\alpha$  含量。黄芪甲苷治疗组心肌炎症损伤较感染组减轻,由此说明黄芪甲苷减轻急性病毒性心肌炎心脏的病理损伤,机制之一可能与黄芪甲苷调节炎症因子 TLR4、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  的表达有关。

### 参 考 文 献

- [1] 陈志坚,廖玉华,唐省三,等. BALB/c 小鼠巨细胞病毒性心肌炎模型的特征. 中国病理生理杂志, 2008, 24:466-469.
- [2] Hayashi K, Imanishi N, Kashiwayama Y, et al. Inhibitory effect of cinnamaldehyde, derived from Cinnamomi cortex, on the growth of influenza A/PR/8 virus in vitro and in vivo. Antiviral Res, 2007, 74:1-8.
- [3] Hu JY, Han J, Chu ZG, et al. Astragaloside IV attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte damage in rats by upregulating superoxide dis-

- mutase-1 levels. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36:351-357.
- [4] 李双杰,张召才,酥瑞珍. 黄芪甲苷治疗 BALB/C 小鼠 LWB3 病毒性心肌炎疗效研究. 中华实用中西医杂志, 2004, 17:681-683.
- [5] Zhang HY, Kang J, Han WJ, et al. The expression and significance of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B mRNA in mouse lymph node of experimental autoimmune myositis. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2012, 28:272-275.
- [6] Marsland BJ, Nembrini C, Grün K, et al. TLR ligands act directly upon T cells to restore proliferation in the absence of protein kinase C-theta signaling and promote autoimmune myocarditis. J Immunol, 2007, 178:3466-3473.
- [7] Kramer M, Schulte BM, Toonen LW, et al. Echovirus infection causes rapid loss-of-function and cell death in human dendritic cells. Cell Microbiol, 2007, 9:1507-1518.
- [8] Fairweather D, Rose NR. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity. Methods, 2007, 41:118-122.
- [9] 朱红俊,陆佳. 黄芪治疗病毒性心肌炎药理研究进展. 中国中医急症, 2007, 16:95-96.
- [10] 杨富国,刘革新,董果雄,等. 黄芪甲苷对缺氧/复氧损伤人脐静脉内皮细胞与中性粒细胞黏附能力及细胞核转录因子  $\kappa$ B 表达的影响. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12:2843-2846.

(收稿日期:2012-03-15)

(本文编辑:吴莹)

周欣,刘春梅,胡安娜,等. 黄芪甲苷对病毒性心肌炎小鼠 TLR4、NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  表达的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012, 6(13): 3659-3662.

中 华 中 医 药 学 会