

REFERENCES

- [1] XIAO J H, ZHOU J, DING L L, et al. Dualistic actions of *Angelica naphtha* on rat uteruses and screening of its active components [J]. J Huazhong Univ Sci Technol(Health)(华中科技大学学报: 医学版), 2003, 32(6): 589-596.
- [2] LIU L N, MEI Q B, CHENG J F, et al. Study on anti-dysmenorrhea effect of essential oil from *Angelica sinensis* Diels [J]. Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2002, 18(2): 77-79.
- [3] WANG X R, QIU M F, XIE G X, et al. Effect of essential oil from *Angelica sinensis* on level of nitric oxide and calcium ion in uterine tissue of mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2006, 17(5): 723-724.
- [4] 陶静仪, 阮于平, 梅其炳, 等. 当归成分藁本内酯平喘作用的实验研究[J]. 药学学报, 1984, 19(8): 561-565.
- [5] 李健蕊, 柳钟勋, 左增艳. 当归内酯对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(5): 13-14.
- [6] 冯景奇, 柳钟勋. 当归多糖及当归内酯对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14(4): 279-282.
- [7] 冯景奇, 柳钟勋. 当归内酯拮抗环孢菌素 A、氢化可的松及抗肿瘤药物的免疫抑制作用[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(1): 22-24.
- [8] XIAO J H, DING L L, ZHOU J, et al. Effects of A3 site from *Angelica naphtha* on myocardial physiological properties and action potentials [J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2003, 19(9): 1066-1069.
- [9] LI M, SUN H, LI Y, et al. Comparison of *Angelica sinensis* Diels. from different habitats on the platelet aggregation and clotting time [J]. China J Basic Med Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志), 2003, 9(2): 47-50.
- [10] WANG Q J, PAN Z W, YUE P, et al. Effects of total flavones from *Herba Epimedii* on experimental myocardial ischemia and hemorheology of animals [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2007, 38(7): 1039-1042.
- [11] WANG Z W, HONG T, YANG Z. Protective effect of anxin on pituitrin-induced myocardial ischemic injury [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2007, 18(1): 81-82.
- [12] ZHOU Q, LU D X, FU Y M, et al. Glycine protection against the myocardial ischemic injury in mice [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2002, 18(4): 360-362.
- [13] 王淑仙. 小红参、茜草和丹参提取物对小鼠心肌、脑 ATP 含量的影响[J]. 中草药, 1986, 17(2): 19-21.
- [14] GALANG N, SASAKI H, MAULIK N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy [J]. Toxicology, 2000, 148(2/3): 111-118.
- [15] KIM J K, PEDRAM A, RAZANDI M, et al. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms [J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6760-6767.
- [16] CASTEDO E, SEGOVIA J, ESCUDERO C, et al. Ischemia-reperfusion injury during experimental heart transplantation: evaluation of trimetazidine's cytoprotective effect [J]. Rev Esp Cordial, 2005, 58(8): 941-950.
- [17] MAENPAA C J, SHAMES B D, VANWHY S K, et al. Oxidant-mediated apoptosis in proximal tubular epithelial cells following ATP depletion and recovery [J]. Free Radical Biol Med, 2008, 44(4): 518-526.
- [18] 谢赞, 陈寿权, 李章平. 中药对心肌损伤保护作用的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(10): 980-981.
- [19] 高滢. 心肌缺血再灌注损伤的中药保护研究[J]. 天津药学, 2007, 19(4): 60-63.

收稿日期: 2015-05-19

氧化苦参碱对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡及相关因子的影响

陈碧涛^{1,2}, 朱荣金¹, 杨红宇³, 朱颜鑫¹, 牟秋菊¹, 赵兵兵¹, 沈祥春³, 江滢^{1,3*} (1. 贵州医科大学微生物学教研室, 贵阳 550004; 2. 贵州省清镇市第一人民医院综合科, 贵州 清镇 551400; 3. 贵州医科大学实验动物中心, 贵阳 550004)

摘要: 目的 探讨氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡及其凋亡相关因子蛋白表达的影响。方法 42 只 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(NC)、病毒性心肌炎模型组(VM)、OMT 高剂量组(OMT-H, 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 中剂量组(OMT-M, 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 低剂量组(OMT-L, 6.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 极低剂量组(OMT-EL, 3.125 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、利巴韦林对照组(RB, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。病毒性心肌炎小鼠由柯萨奇病毒 B3 型腹腔注射感染所致, 各治疗组从末次给予病毒 24 h 后开始, 腹腔注射, 每日 1 次。于治疗第 12 天, 每组处死小鼠 6 只, 留取心肌标本。TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况, 免疫印迹法和免疫组织化学法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况。结果 OMT 治疗显著降低了病毒性心肌炎小鼠凋亡心肌细胞的数量, 与病毒性心肌炎模型组比较, OMT-L 组效果最佳($P < 0.01$)。与病毒性心肌炎模型组小鼠比较, OMT 治疗组的小鼠心肌组织中 Bax 蛋白表达降低, 而 Bcl-2 蛋白表达没有明显改变。结论 氧化苦参碱可减少病毒性心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡, 该作用与下调 Bax 蛋白表达有关。

关键词: 氧化苦参碱; 病毒性心肌炎; 柯萨奇病毒 B3 型; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)02-0162-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.007

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合 SY 字[2012]3085 号); 贵阳医学院 2014 年高等学校大学生创新创业训练计划项目(201410660002)

作者简介: 陈碧涛, 女, 博士, 教授 Tel: (0851)86908928 E-mail: 2816837108@qq.com *通信作者: 江滢, 女, 博士, 教授 Tel: (0851)86908928 E-mail: jiangyan3313@sina.com

Effect of OMT on Apoptosis and Its Protein Bcl-2 and Bax of Myocardium in Mice with Viral Myocarditis

CHEN Bitao^{1,2}, ZHU Rongjin¹, YANG Hongyu³, ZHU Yanxin¹, MOU Qiuju¹, ZHAO Bingbing¹, SHEN Xiangchun³, JIANG Yan^{1,3*} (1.Department of Microbiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2.The General Department, The Qingzhen First People's Hospital, Qingzhen 551400, China; 3.The Laboratory Animal Center of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of oxymatrine(OMT) on apoptosis and its protein Bcl-2 and Bax of myocardium in mice with viral myocarditis. **METHODS** BALB/c mice were used and inoculated intraperitoneally with CVB3. Twenty-four hours after the last inoculation with CVB3, the infected mice were intraperitoneally injected with OMT or ribavirin. The mice were divided into normal control group(NC), viral myocarditis model group(VM), OMT high, middle, low and extreme low group(OMT-H, OMT-M, OMT-L, OMT-EL. The dose were 25, 12.5, 6.25, 3.125 mg·kg⁻¹·d⁻¹, respectively.)and ribavirin group(RB, 100 mg·kg⁻¹·day⁻¹). Six mice from each group were sacrificed and their myocardial tissues were obtained after 12 d. The myocardial cells apoptosis were detected through TUNEL assay, and the protein expression of Bcl-2 and Bax were detected using western blot and immunohistochemical method. **RESULTS** OMT induced myocardial cells apoptosis in viral myocarditis mice, compared with VM, the effect of OMT-L was remarkable ($P<0.01$). The protein expression of Bax was decreased in OMT treatment groups, but the protein expression of Bcl-2 was unchanged after OMT treatment. **CONCLUSION** OMT may reduce myocardial cells apoptosis in viral myocarditis mice, and it is related to regulating Bax protein *in vivo*.

KEY WORDS: oxymatrine(OMT); viral myocarditis; coxsackievirus B3(CVB3); apoptosis

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)又名苦参素,是从豆科植物苦参或平科植物广豆根中分离出来的生物碱。氧化苦参碱具有利尿、抗病原体、免疫作用等广泛的药理作用^[1-2]。在前期研究工作中观察了 OMT 在体外对柯萨奇病毒 B3 型(coxsackievirus B3, CVB3)增殖的影响,发现 OMT 在体外具有抑制 CVB3 增殖的作用;而且用 OMT 治疗 CVB3 所致的病毒性心肌炎小鼠,观察到 OMT 的治疗可以提高小鼠生存率,并且对实验小鼠的血清心功能酶学、心肌组织病毒载量、心肌病理变化均有影响。本研究主要就 OMT 对 CVB3 感染导致的心肌细胞凋亡,以及心肌组织中与细胞凋亡相关的 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况的影响进行了观察。

1 材料

1.1 动物

4~6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,♀,合格证号:SYXK(黔)2012-001,购自贵州省实验动物工程中心,生产许可证号:SCXK(黔)2012-001。

1.2 试剂

氧化苦参碱(中国药品生物检定所,批号:110780-201007,纯度:99.0%);利巴韦林注射液(贵州光正制药有限公司,规格:0.1 g·mL⁻¹,批号:130510);细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:20140505);兔抗鼠 BAX 多克隆抗体(批号:13CM400A)、兔抗鼠 BCL2 多克隆抗体(批号:196841)和辣根过氧化物酶标记羊抗兔

IgG 抗体(批号:BST09E04A)均购自武汉博士德生物工程有限公司;DAB 显色试剂盒(上海基因科技有限公司,批号:2014121601);蛋白质预染 Marker(北京索莱宝公司)。SDS-PAGE 电泳相关试剂和 ECL 发光液(批号:14142A2)购自 BIO-RAD 公司。

2 方法

2.1 病毒性心肌炎小鼠模型的制备和分组

将小鼠随机分为 7 组,每组 6 只,除正常对照组外,其余小鼠均腹腔接种 0.1 mL 100×TCID₅₀ CVB3 4 次,每次间隔 5 d,于末次接种后 24 h 开始治疗。分组为正常对照组(NC)、病毒性心肌炎模型组(VM)、OMT 高剂量组(OMT-H, 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 中剂量组(OMT-M, 12.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 低剂量组(OMT-L, 6.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、OMT 极低剂量组(OMT-EL, 3.125 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、利巴韦林对照组(RB, 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹),腹腔注射给药,每天 1 次。

2.2 标本的留取

在治疗第 12 天,摘眼球放血每组处死 6 只小鼠,留取的标本一部分用 40 g·L⁻¹ 甲醛固定,石蜡包埋,制备组织切片,用于免疫组织化学和 TUNEL 检测;另一部分提取组织总蛋白质后,行免疫印迹法检测。

2.3 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

取各组的心肌组织切片,按照试剂盒方法进行的操作,最后在光学显微镜下观察,随机选取 5 个高倍镜(400×)视野,分别计数凋亡细胞数和细

胞总数, 计算凋亡指数, 凋亡指数(apoptotic index, AI)=凋亡细胞数/心肌细胞总数×100%。

2.4 免疫印迹法半定量观察 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况

心肌组织匀浆提取总蛋白质, 上样量为 20 μg, SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜封闭, 一抗 4 °C 过夜, 二抗孵育洗膜后, 将膜与 ECL 发光液充分接触。1 min 后, 将膜移至带曝光系统的凝胶成像仪进行扫描, 记录实验结果, 用 QuantityOne 软件分析曝光条带, Bcl-2 和 Bax 条带的灰度值与相应的 β-actin 条带灰度值的比值进行半定量分析。

2.5 免疫组织化学法观察 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况

按 SP 法行免疫组化染色, 光学显微镜下观察结果。应用 Image-Pro Plus 图像分析软件测定阳性产物平均吸光度值(A)。

2.6 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所得数据均采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TUNEL 法原位检测心肌细胞凋亡

用 TUNEL 法检测病毒性心肌炎模型组小鼠心肌细胞凋亡, 发现凋亡细胞的胞核呈棕色颗粒状, 多分布在心内膜、心外膜下及炎症灶周围。正常对照组小鼠仅有少量凋亡的细胞, 病毒性心肌炎模型组小鼠心肌细胞较正常对照组明显增加 ($P < 0.01$), 各 OMT 治疗组的 AI 均有降低, 其中 OMT-L 组与 VM 组相比降低显著 ($P < 0.01$)。结果见图 1 和表 1。

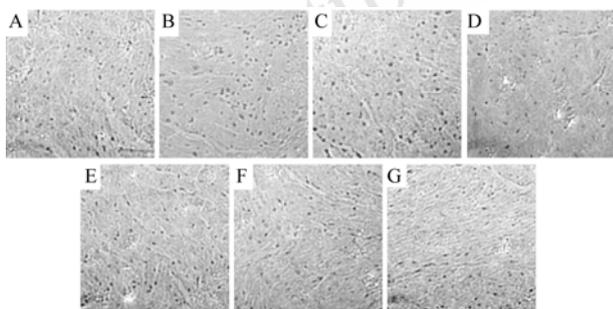


图 1 OMT 对病毒性心肌炎所致细胞凋亡的影响(400×) A-NC; B-VM; C-RB; D-OMT-H; E-OMT-M; F-OMT-L; G-OMT-EL。

Fig. 1 The effect of OMT on myocardial cells apoptosis in viral myocarditis mice(400×)

A-NC; B-VM; C-RB; D-OMT-H; E-OMT-M; F-OMT-L; G-OMT-EL.

表 1 OMT 对病毒性心肌炎所致细胞凋亡的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of OMT on myocardial cells apoptosis in viral myocarditis mice($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	AI
NC	1.913±0.001 8
VM	33.51±0.017 8 ¹⁾
RB	21.73±0.017 5 ²⁾
OMT-H	30.52±0.003 6 ³⁾
OMT-M	22.62±0.012 1 ²⁾
OMT-L	12.98±0.009 2 ²⁾
OMT-EL	17.34±0.026 4 ²⁾

注: 与 NC 比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与 VM 比较, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with NC, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with VM, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$.

3.2 心肌组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况

3.2.1 免疫印迹法检测结果 与 VM 组比较, 各 OMT 治疗组的 Bax 蛋白表达减少, 其中以 OMT-L 组差异最为显著 ($P < 0.01$); Bcl-2 蛋白表达差异不具有统计学意义。结果见图 2。

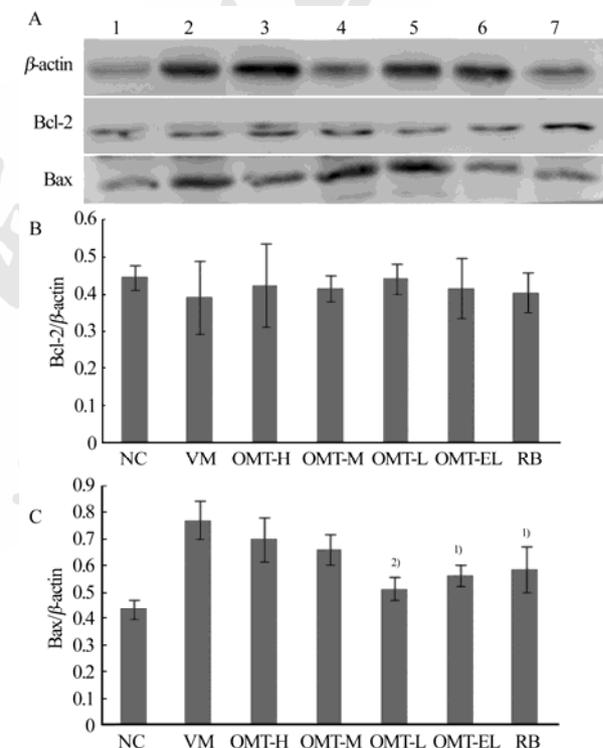


图 2 免疫印迹法检测各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白质表达情况

A-免疫印迹法杂交条带; B-Bcl-2/β-actin 灰度比值; C-Bax/β-actin 灰度比值; 1-NC; 2-VM; 3-OMT-H; 4-OMT-M; 5-OMT-L; 6-OMT-EL; 7-RB; 与 VM 组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 The protein expression of Bcl-2 and Bax through western blotting

A-the band graph; B-Bcl-2/β-actin; C-Bax/β-actin; 1-NC; 2-VM; 3-OMT-H; 4-OMT-M; 5-OMT-L; 6-OMT-EL; 7-RB; compared with VM, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.2.2 免疫组织化学法检测结果 免疫组化染色

显示, Bax 主要分布在细胞浆和胞膜上, 着色为棕黄色; Bcl-2 广泛分布在细胞浆, 免疫组化染色为

棕黄色。平均光密度值分析结果与免疫印迹结果一致, OMT 的介入可使 Bax 蛋白表达减少, Bcl-2 蛋白表达无明显变化, 结果见图 3~4。

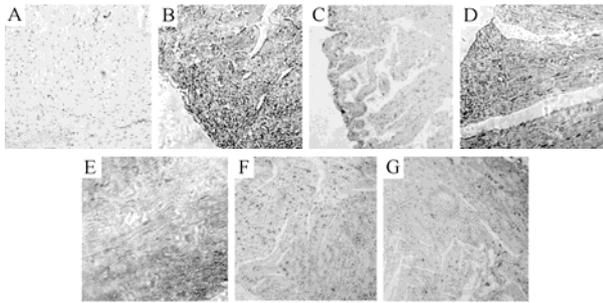


图 3 免疫组织化学法检测 Bax 蛋白质在心肌组织中的表达 A-NC; B-VM; C-RB; D-OMT-H; E-OMT-M; F-OMT-L; G-OMT-EL。

Fig. 3 The protein expression of Bax in myocardial tissue by immunohistochemistry

A-NC; B-VM; C-RB; D-OMT-H; E-OMT-M; F-OMT-L; G-OMT-EL.

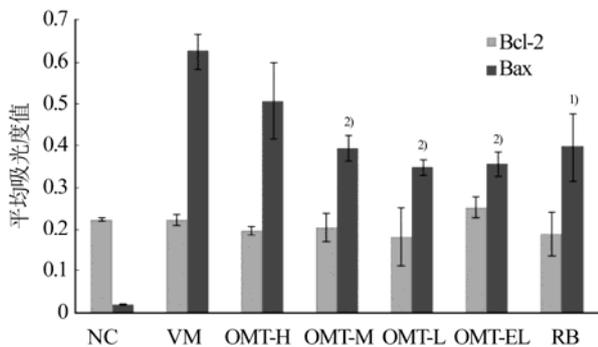


图 4 Bcl-2 和 Bax 蛋白质在心肌组织中的表达与 VM 组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Fig. 4 The protein expression of Bcl-2 and Bax in myocardial tissue

Compared with VM, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

4 讨论

苦参当中含有大量的生物碱, 其中含量最高的是苦参碱和氧化苦参碱。国内外大量的研究表明, 苦参碱类化合物有抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗病毒、免疫抑制、保肝利胆、抗寄生虫等多方面的药理作用^[3-4]。近年来, 随着对 OMT 研究的不断深入, 其在心血管方面和抗病毒方面的作用也逐渐被人们重视。Sun 等发现^[5], OMT 通过降低大鼠 L 型 Ca²⁺通道蛋白 $\alpha 1c$ mRNA 表达抑制心肌细胞凋亡, 从而减轻心肌缺血性损伤。文献报道^[6-7], OMT 对醛固酮诱导原代培养心肌细胞凋亡或脓毒症大鼠心肌细胞凋亡具有显著的保护作用。本实验亦证实了氧化苦参碱对 CVB3 所致的病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡具有保护作用,

该作用以 6.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量效果最佳。

位于线粒体外膜上的 Bcl-2 基因家族是细胞凋亡的重要调节因子, Bax 是促凋亡因子, Bcl-2 与 Bax 协同作用才能维持细胞生存, 其表达强度决定细胞命运, Bax 占优势时致细胞凋亡, Bcl-2 占优势时阻止细胞凋亡, 因此检测 Bcl-2 与 Bax 的表达情况可以推断细胞凋亡的变化情况^[8]。本实验应用氧化苦参碱治疗病毒性心肌炎小鼠, OMT 治疗组小鼠心肌组织 Bax 蛋白的表达较病毒性心肌炎模型组均有降低, 以 6.25 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量组降低最为显著; 而对 Bcl-2 蛋白的表达无明显影响。由此, OMT 的介入使得 Bcl-2/Bax 的比值升高, 有助于保护心肌细胞。

文献^[9-10]亦有报道, 氧化苦参碱具有在体内外抗柯萨奇病毒、治疗病毒性心肌炎的作用, 本研究进一步证实氧化苦参碱可以减少病毒性心肌炎小鼠心肌细胞的凋亡, 该作用与氧化苦参碱下调促凋亡因子 Bax 蛋白有关。

REFERENCES

- [1] 吴琴, 高云. 氧化苦参碱药理作用的分子机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6): 759-762.
- [2] 薛士梅. 苦参碱的药理研究和临床应用及检测方法研究进展[J]. 天津药学, 2014, 26(1): 70-74.
- [3] LI X, CHU W, LIU J, et al. Antiarrhythmic properties of long-term treatment with matrine in arrhythmic rat induced by coronary ligation [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(9): 1521-1526.
- [4] FENG G L. Progress in therapeutic effect of matrine on bitter ginseng vegetable dish [J]. Dis Monit Control, 2010, 4(4): 210-211.
- [5] SUN H L, LI L, SHANG L, et al. Cardioprotective and underlying mechanisms of oxymatrine against ischemic myocardial injuries of rats [J]. Phytother Res, 2008, 22(7): 985-989.
- [6] XIAO T T, WANG Y Y, ZHANG Y, et al. Similar to spironolactone, oxymatrine is protective in aldosterone-induced cardiomyocyte injury via inhibition of calpain and apoptosis-inducing factor signaling [J]. Plos One, 2014, 9(2): e88856.
- [7] 王秀玉, 张鸣号, 邵群慧, 等. 氧化苦参碱对脓毒症大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 宁夏医学杂志, 2014, 36(4): 294-297.
- [8] VENTÉO L, BOURLET T, RENOIS F, et al. Enterovirus-related activation of the cardiomyocyte mitochondrial apoptotic pathway in patients with acute myocarditis [J]. Eur Heart J, 2010, 31(6): 728-736.
- [9] 刘晶星, 陈福祥, 陆德源, 等. 苦参总碱抗柯萨奇 B 病毒作用机理的研究[J]. 上海第二医科大学学报, 1996, 3(16): 183-185.
- [10] 方艳妮, 郭春艳, 汪翼. 氧化苦参碱对慢性病毒性心肌炎小鼠心肌的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(1): 25-27.

收稿日期: 2015-07-27