

# 黄芪总黄酮通过抑制内质网应激对小鼠病毒性心肌炎保护作用的实验研究\*

牛晓峰<sup>1</sup> 赵雅君<sup>1</sup> 陶谢鑫<sup>1</sup> 黄侠<sup>1</sup> 柴花<sup>1</sup> 赵明<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探讨黄芪总黄酮对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞内质网应激凋亡的作用。方法:将 60 只雄性 Balb/c 小鼠均分为病毒性心肌炎组、正常组及黄芪总黄酮组。病毒性心肌炎组与黄芪总黄酮组腹腔内无菌注射含  $0.1 \text{ ml } 10^{-9} 50\text{TCIDCVB3}$ , 正常组不注射 CVB3 病毒。黄芪总黄酮组小鼠每日腹腔注射  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芪总黄酮  $0.2 \text{ ml}$ , 观察小鼠的一般情况, 7 d 时行血流动力学检查后处死取心脏标本, 用 TUNEL 法检测各组小鼠心肌细胞凋亡情况, RT-PCR 检测各组小鼠心肌细胞内质网伴侣蛋白 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达水平。结果:①与正常组相比, 病毒性心肌炎组小鼠血流动力学指标明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与病毒性心肌炎组小鼠相比, 黄芪总黄酮组小鼠血流动力学指标有显著改善 ( $P < 0.05$ )。②TUNEL 染色显示, 与正常组相比, 病毒性心肌炎组小鼠心肌细胞凋亡明显增多 ( $P < 0.05$ ); 与病毒性心肌炎组小鼠相比, 黄芪总黄酮组小鼠心肌细胞凋亡显著减少 ( $P < 0.05$ )。③与正常组相比, 病毒性心肌炎组小鼠内质网伴侣蛋白 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达水平均明显升高 (均  $P < 0.05$ ), 且其变化趋势与心肌细胞凋亡数相似; 与病毒性心肌炎组小鼠相比, 黄芪总黄酮组小鼠内质网伴侣蛋白 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达水平明显下降 (均  $P < 0.05$ )。结论:黄芪总黄酮对病毒性心肌炎心力衰竭小鼠内质网应激介导的心肌细胞凋亡有保护作用, 这可能是黄芪总黄酮改善病毒性心肌炎心力衰竭小鼠血流动力学的作用机制之一。

**[关键词]** 病毒性心肌炎; 黄芪总黄酮; 内质网应激; 凋亡

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2015.02.005

**[中图分类号]** R331.3 **[文献标志码]** A

## The protective effects of total flavonoids of astragalus on inhibition of endoplasmic reticulum stress in murine model with coxsackie virus B3-induced acute viral myocarditis

NIU Xiaofeng ZHAO Yajun TAO Xiexin HUANG Xia CHAI Hua ZHAO Ming

(The Inner-mongolia National University Affiliated Hospital, Tongliao, Inner-mongolia, 028000, China)

Corresponding author: ZHAO Ming, E-mail: langzhe73@163.com

**Abstract Objective:** To study the effects of total flavonoids of astragalus (TFA) on cardiac myocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in murine model with coxsackie virus B3-induced acute viral myocarditis. **Method:** Sixty Balb/c mice were divided into viral myocarditis group, normal control group and TFA group ( $n = 20$ ). Mice in viral group and TFA group intraperitoneally injected with  $0.1 \text{ ml } 10^{-9} 50\text{TCIDCVB3}$ . TFA group peritoneally injected with  $0.2 \text{ ml TFA } (20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1})$  everyday. After 7 days, hemodynamic examination was carried out, heart specimens were collected. The myocardial apoptosis was determined by TUNEL, the expression levels of GRP78 and GRP94 mRNA were detected by RT-PCR. **Result:** ① Compared with normal control group, the indicators of hemodynamics in viral myocarditis group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ); compared with viral myocarditis group, the hemodynamics in TFA group was significantly improved ( $P < 0.05$ ). ② TUNEL staining showed that myocardial apoptosis in viral myocarditis group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), while significantly reduced in TFA group ( $P < 0.05$ ). ③ Compared with normal control group, the expression levels of GRP78 and GRP94 mRNA in viral myocarditis group were significantly higher ( $P < 0.01$ ), and the tendency was similar to the change of cell apoptosis. The levels of expression GRP78 and GRP94 mRNA in TFA group was significantly decreased compared with viral myocarditis group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** TFA could protect myocardial apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress in mice with viral myocarditis.

**Key words** viral myocarditis; total flavonoids of astragalus; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

\* 基金项目: 内蒙古自治区科技厅资助项目 (No: 2011BS1101)

<sup>1</sup> 内蒙古民族大学附属医院心内科 (内蒙古通辽, 028000)

通信作者: 赵明, E-mail: langzhe73@163.com

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是由病毒感染引起的心肌实质或间质的局限性或弥漫性病变<sup>[1]</sup>。VMC致使心肌收缩力功能下降引起心力衰竭是VMC患者死亡的重要原因<sup>[2]</sup>。细胞凋亡可能是心力衰竭发病机制的一个重要环节。凋亡的产生机制复杂,内质网应激反应介导的细胞凋亡是一条新的信号转导通路<sup>[3]</sup>。中药黄芪具有显著的益气强心作用,在临床上除了用于治疗冠心病心绞痛外,还能够治疗高血压、低血压、VMC、肾炎、脑梗塞、心律失常等<sup>[4]</sup>。黄芪总黄酮是从豆科类植物黄芪中分离出来的有效活性成份,具有清除多种自由基的功效,并且对自由基所致细胞膜蛋白质以及DNA损伤有保护作用<sup>[5]</sup>。本研究小组前期实验发现,黄芪总黄酮可以改善VMC小鼠血流动力学,并增加VMCBALB/c小鼠心室肌细胞L-钙电流(L-Ica)的幅值,但作用机制尚未完全阐明<sup>[6]</sup>。本研究通过观察黄芪总黄酮对VMC心力衰竭小鼠心肌细胞凋亡状况及内质网伴侣蛋白GRP78和GRP94表达的作用,进一步明确黄芪总黄酮改善VMC心力衰竭小鼠血流动力学作用的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物:新生BALB/c小鼠,二级动物,由吉林大学基础医学院实验动物中心提供。柯莎奇B3病毒(B\_3 Cocksackie Virus, CVB3)(Nancy株)购自吉林大学农牧学院实验动物中心病毒室,病毒原液效价为10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>/L。Super M-MLV反转录酶购自BioTeke, RNA simple Total RNA Kit购自TIANGEN, RNase固相清除剂购自天恩泽,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。In Situ Cell Death Detection Kit购自罗氏, DAB显色液购自Solarbio, Triton X-100购自碧云天。

### 1.2 VMC BALB/c小鼠模型的制备

选清洁级BALB/c雄性小鼠60只,随机分为正常组、VMC组及黄芪总黄酮组,每组各20只。VMC组与黄芪总黄酮组腹腔内无菌注射含0.1 ml 10<sup>-9</sup> 50TCID<sub>50</sub> CVB3, 正常组不注射CVB3病毒。黄芪总黄酮组小鼠每日腹腔注射0.2 ml 黄芪总黄酮(20 mg·L<sup>-1</sup>),从注射病毒起每日观察小鼠的一般状态,主要观察小鼠的反应,详细记录小鼠饮食、毛色、活动和排泄情况。

### 1.3 血流动力学指标的监测

注射病毒第7天,将小鼠用3%戊巴比妥钠15 mg/kg麻醉后仰卧位固定于恒温操作台上,于颈部正中取切口,然后钝性分离右侧颈总动脉,结扎远心端,牵拉阻断近心端,应用30 G注射针头在远心端穿刺动脉,插入右颈总动脉、升主动脉,逆行插入左心室内,通过1.4F微导管经压力换能器连

接BL-420多道生理记录仪测量各组小鼠左心室压(left ventricular pressure, LVP)及左心室内压最大变速率(dp/dt)变化。

### 1.4 病理取材及TUNEL检测心肌细胞凋亡

进行血流动力学指标的监测后,各组分别随机取15只或剩余小鼠,脱颈椎处死后,立即沿腹中线剪开,在无菌状态下将小鼠左肋剪开,暴露心脏,用眼科剪子将心脏取出,取1/3心脏组织:①透化:滴加0.1% Triton X-100(0.1%柠檬酸钠盐配置)200 μl,室温放置8 min;②PBS漂洗,3×5 min;③封闭:滴加3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μl,室温放置15 min;④滴加TUNEL反应液50 μl;⑤保湿、避光、37℃孵育60 min;⑥滴加Converter-POD 50 μl;⑦保湿、37℃孵育30 min;⑧DAB显色:加DAB底物50 μl,待颜色刚刚变深时迅速置于水中终止反应;⑨苏木素复染:滴加苏木素直至覆盖玻片,浸入1%盐酸乙醇中分化3 s,立即浸入自来水中,流水反蓝20 min,将切片架置于75%、85%、95%的乙醇中,每个停留2 min,依次取出切片,擦干周围液体,胶头滴管滴加半滴中性树胶,盖上盖玻片,室温晾干;⑩显微镜下观察染色效果,400×镜下拍照。

### 1.5 RT-PCR检测心肌细胞内GRP78和GRP94的mRNA表达

总RNA提取:利用总RNA提取试剂盒(天根)提取样本总RNA。反转录:将得到的RNA样本进行反转录,具体用量如下:正常组样本上样量2.8 μl, VMC组样本上样量3.4 μl;正常组ddH<sub>2</sub>O使用量7.7 μl, VMC组ddH<sub>2</sub>O使用量7.1 μl。对实验所得的RNA样本进行反转录以得到对应的cDNA。PCR检测:首先将引物稀释至10 μmol/L,引物信息:GRP78-F(5'3') CAGCCAACTGTAA-CAATCAA, GRP78-R(5'3') CTGTCACTCG-GAGAATACCA; GRP94-F(5'3') TGAAGGCA-CAAGCATACCA, GRP94-R(5'3') GACCGAAGT-GTTGCCGTTT; β-actin F(5'3') CTGTGCCCATC-TACGAGGGCTAT; β-actin R(5'3') TTTGATGT-CACGCACGATTTCC。在PCR管中加入如下反应体系:cDNA模板1 μl,上下游引物各1 μl, 2×Taq PCR Master-mix 10 μl 用ddH<sub>2</sub>O补足至20 μl。扩增条件为:94℃变性5 min后,进行24~32个循环:94℃变性1 min, 61.5℃复性1 min, 72℃延伸1 min。最后72℃延伸10 min结束反应,置于4℃5 min。电泳分析琼脂糖凝胶的配制:PCR产物电泳用1.5%的凝胶,将混合的凝胶液置于微波炉中加热至沸腾,使胶完全融化,放置室温冷却,将凝好的胶及制胶板放入电泳槽中,使电泳缓冲液刚刚浸过胶面,进行点样,然后接通电泳仪电泳,电泳过后利用凝胶成像系统对得到的凝胶进行拍照。

## 1.6 统计学处理

两组均数比较用配对  $t$  检验分析,采用统计软件 SPSS15.0 对数据进行检验,判断均数差异的显著性。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般情况及心脏血流动力学改变

正常组小鼠活动正常,全部存活;VMC 组小鼠在注射 CVB3 后出现竖毛、蜷缩、不喜进食、活动减少等体征,注射 CVB3 后 3 d 起,开始出现死亡,至 5~7 d 病死率达到高峰。黄芪总黄酮组无死亡。VMC 组病变严重,外观心肌呈淡黄色,质地较软,呈松弛扩张状态,与正常组小鼠相比心脏扩大。

HE 染色结果:正常组小鼠心肌纤维排列整齐,结构清晰,细胞核呈圆形或椭圆形,位于细胞中央,未见心肌纤维变性坏死等病理性改变。VMC 组病理改变明显,可见心肌纤维排列紊乱,心肌细胞坏死和间质炎性细胞浸润,间质明显水肿。黄芪总黄酮组小鼠心肌也出现一定程度的病理变化,较 VMC 组病变程度轻、病变范围小,心肌纤维排列尚可,结构清晰,心肌纤维间隔略增宽,间质轻度水肿,偶见淋巴细胞浸润。见图 1。

各组血流动力学参数见表 1。

表 1 小鼠心脏的血流动力学参数变化

| 组别               | Table 1 Hemodynamic indicators $\bar{x} \pm s$ |                                   |                                  |
|------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                  | LVP/<br>( $P \cdot kPa^{-1}$ )                 | +dp/dt/<br>( $kPa \cdot s^{-1}$ ) | -dp/dt<br>( $kPa \cdot s^{-1}$ ) |
| 正常组(15 只)        | 14.1±2.7                                       | 315±31                            | -262±29                          |
| VMC 组(15 只)      | 8.7±1.4 <sup>1)</sup>                          | 251±26 <sup>1)</sup>              | -193±25 <sup>1)</sup>            |
| 黄芪总黄酮组<br>(15 只) | 10.91±1.9 <sup>2)</sup>                        | 284±28 <sup>2)</sup>              | -234±30 <sup>2)</sup>            |

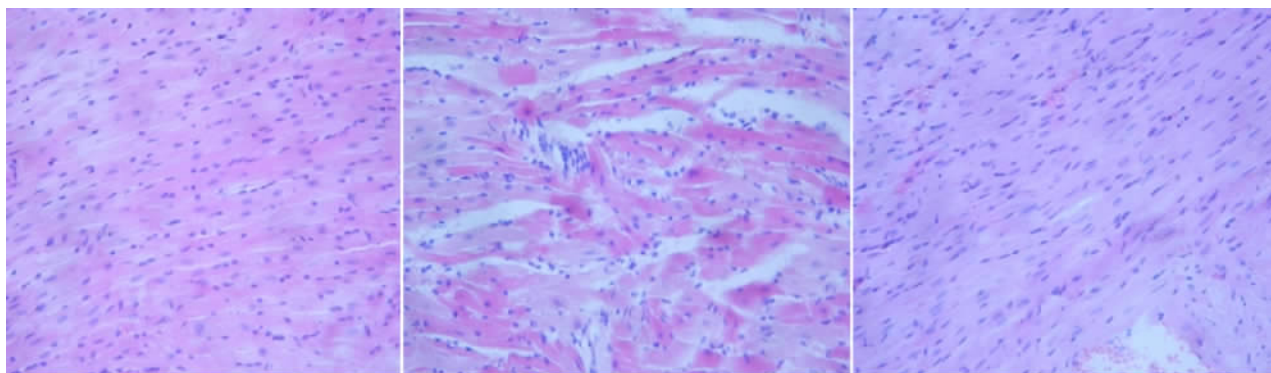
与正常组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 VMC 组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 2.2 心肌细胞凋亡情况

TUNEL 法检测结果显示,正常组小鼠仅有少量凋亡细胞( $AI = 4.47 \pm 1.41$ ),VMC 组小鼠心肌细胞凋亡明显, $AI$  为  $35.31 \pm 7.1$  ( $P < 0.01$ );黄芪总黄酮组小鼠心肌凋亡细胞  $AI$  为  $15.24 \pm 4.05$ ,较 VMC 组明显减少( $P < 0.01$ )。见图 2。

### 2.3 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达

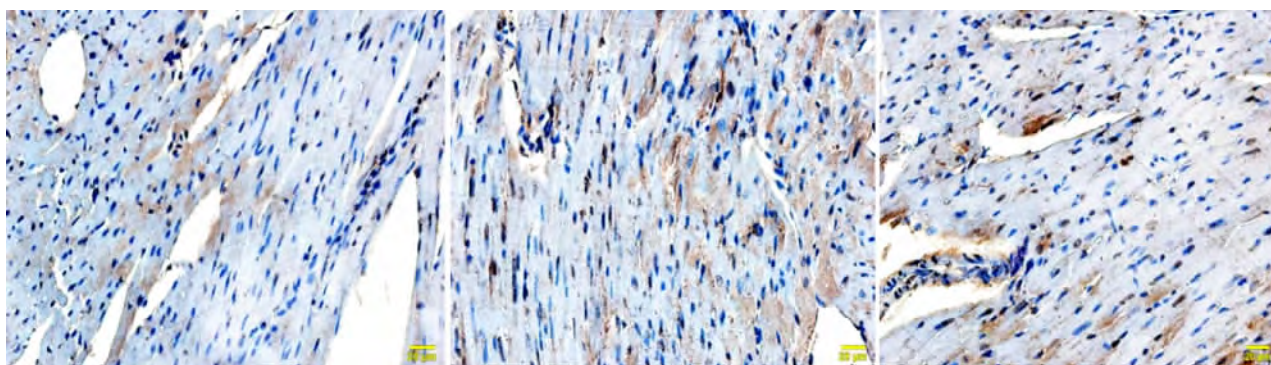
与正常组比较,VMC 组心肌细胞内质网伴侣蛋白 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达明显增高,与细胞凋亡的变化趋势基本一致( $P < 0.05$ )。与 VMC 组比较,黄芪总黄酮组 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达显著下降( $P < 0.05$ )。见表 2、3。



从左至右依次为正常组、VMC 组和黄芪总黄酮组。

图 1 各组小鼠心肌 HE 染色结果( $\times 400$ )

Figure 1 HE staining( $\times 400$ )



从左至右依次为正常组、VMC 组和黄芪总黄酮组。

图 2 心肌凋亡细胞( $\times 400$ )

Figure 2 Myocardial apoptosis( $\times 400$ )

表2 各组小鼠心肌细胞内质网伴侣蛋白 GRP78 的 mRNA 表达

Table 2 Expression of GRP78 mRNA

 $\bar{x} \pm s$ 

| 组别          | GRP78                              | $\beta$ -actin | 比值   | 相对表达量 |
|-------------|------------------------------------|----------------|------|-------|
| 正常组(15只)    | 5 236.1 $\pm$ 427.0                | 30 973         | 0.17 | 1.00  |
| VMC组(15只)   | 19 168.0 $\pm$ 895.0 <sup>1)</sup> | 31 174         | 0.61 | 3.64  |
| 黄芪总黄酮组(15只) | 7 861.5 $\pm$ 631.0 <sup>2)</sup>  | 30 555         | 0.26 | 1.52  |

与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 VMC 组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

表3 各组小鼠心肌细胞内质网伴侣蛋白 GRP94 的 mRNA 表达

Table 3 Expression of GRP94 mRNA

 $\bar{x} \pm s$ 

| 组别          | GRP94                              | $\beta$ -actin | 比值   | 相对表达量 |
|-------------|------------------------------------|----------------|------|-------|
| 正常组(15只)    | 4 876.1 $\pm$ 391.0                | 30 973         | 0.16 | 1.00  |
| VMC组(15只)   | 18 977.0 $\pm$ 916.0 <sup>1)</sup> | 31 174         | 0.61 | 3.87  |
| 黄芪总黄酮组(15只) | 7 411.0 $\pm$ 583.0 <sup>2)</sup>  | 30 555         | 0.24 | 1.54  |

与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 VMC 组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

大量证据表明,在多种心脏疾病中,心肌细胞凋亡可以引发心力衰竭。因此了解心肌细胞凋亡过程及凋亡信号途径,并阻断凋亡的信号途径,可以增强细胞抵御凋亡能力,就能够减少心肌细胞凋亡,从而延缓心力衰竭的进程。凋亡的产生机制复杂,近年发现 VMC 介导的细胞凋亡是一条新的细胞凋亡信号转导通路。内质网在心肌等肌细胞内称肌浆网,主要参与膜蛋白和分泌蛋白修饰和折叠<sup>[9]</sup>。内质网对外界环境变化较敏感,各种应激反应引起的代谢异常、蛋白质糖基化抑制、二硫键形成障碍等原因均可引起蛋白错误折叠以及未折叠蛋白在内质网腔内聚集,破坏内质网稳态,引发内质网应激。内质网应激发生后,内质网通过上调分子伴侣蛋白 GRP78 及 GRP94 表达抑制蛋白质合成,加速错误折叠和未折叠蛋白质降解等方式缓解内质网应激反应。然而持续或较严重的内质网应激反应触发凋亡信号,诱导 CHOP、caspase-12、JNK 等促凋亡因子的表达及活化,导致细胞凋亡<sup>[10]</sup>。研究文献报道,内质网应激反应可能对于诱导 VMC 的心肌细胞凋亡有一定作用<sup>[11]</sup>。

中药黄芪具有显著的益气强心作用。现代药理研究分析,黄芪的化学成份主要含有皂甙类、黄酮类、多糖类以及氨基酸类等。黄酮的不同化学成份具有不同的药理活性。黄芪总黄酮是从蒙古黄芪中分离的主要活性成分,主要含有 6 种单体化合物,经光谱分析分别鉴定为 B-谷甾醇、芒柄花素、毛蕊异黄酮、B-谷甾醇-3-O-B-D-葡萄糖苷、芒柄花素-7-O-B-D-吡喃葡萄糖苷和毛蕊异黄酮-7-O-B-D-吡喃葡萄糖苷。经计算,这 6 种化合物在黄芪总黄酮分离出的单体化合物中重量组合比例为 23 : 11 : 12 : 3 : 22 : 29<sup>[12]</sup>。本研究发现,黄芪总黄酮可以明显减少 VMC 心力衰竭小鼠心肌细胞凋亡,并使

VMC 心力衰竭小鼠内质网伴侣蛋白 GRP78 和 GRP94 的 mRNA 表达水明显降低。上述实验结果提示黄芪总黄酮抑制内质网应激介导的心肌细胞凋亡可能是黄芪总黄酮改善 VMC 小鼠血流动力学的原因之一。

### 参考文献

- [1] 孙景辉,翟淑波. 病毒性心肌炎发病机制的研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(7): 607—612.
- [2] 刘玉清,李佳,张禅那,等. 病毒性心肌炎细胞感染模型的建立及实验研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2002, 8(2): 25—29.
- [3] 王红英,曹雪滨. 心力衰竭与心肌细胞凋亡的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(18): 2727—2729.
- [4] 沈明志,刘佳妮,翟雅莉,等. 衣霉素诱导大鼠心肌细胞内质网应激凋亡模型的构建[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(5): 1079—1083.
- [5] 陈鹏,杨成明,曾春雨,等. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6): 1069—1074.
- [6] 陈国辉,黄文凤. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1482—1485.
- [7] 张冬青,汪德清. 黄芪总黄酮生物活性作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 253—256.
- [8] 刘冠男,陈国权,赵明. 黄芪总黄酮对病毒性心肌炎小鼠心脏血流动力学及心肌细胞钙电流的作用[J]. 中国心血管杂志, 2008, 13(6): 431—433.
- [9] 刘蜜. 内质网应激与心血管疾病[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(4): 305—309.
- [10] 路晓庆,边云飞,李茂莲,等.  $\beta$ 受体阻滞剂对乳鼠心肌细胞内质网应激致凋亡途径的影响[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(6): 641—644.
- [11] 刘唐威,王秋雁,伍伟锋. 内质网伴侣蛋白在小鼠病毒性心肌炎心肌细胞的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 广西医科大学学报, 2005, 22(2): 157—159.
- [12] 汪德清,田亚平,向兰. 黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(1): 13—15.

(收稿日期:2014-07-23)