

隐丹参酮对病毒性心肌炎小鼠体内炎症反应的抑制作用

金佳丽

浙江省诸暨市人民医院心血管内科

DOI:10.12238/bmtr.v7i5.16529

[摘要] 目的：探究隐丹参酮对柯萨奇病毒B3(Coxsackievirus B3, CVB3)诱导的病毒性心肌炎(Viral Myocarditis, VMC)小鼠的保护作用及其潜在分子机制。方法：采用腹腔注射CVB3病毒的方式构建VMC小鼠模型。将实验小鼠随机分为三组：对照组、病毒性心肌炎模型组(VMC组)和隐丹参酮治疗组。检测各组小鼠血清中肌钙蛋白I(cTnI)和B型利钠肽(BNP)表达水平；通过酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达水平；通过Western blot实验检测心肌组织中IL-1 β 、TNF- α 表达水平以及核因子 κ B(NF- κ B)信号通路中关键蛋白的磷酸化水平。结果：与VMC组相比,隐丹参酮治疗组小鼠血清中cTnI和BNP水平显著降低。ELISA实验结果表明,隐丹参酮能够显著降低血清中IL-1 β 、TNF- α 的释放。Western blot结果表明,隐丹参酮能够显著降低心肌组织中IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平,并显著抑制NF- κ B蛋白磷酸化。结论：隐丹参酮对CVB3诱导的病毒性心肌炎具有显著保护作用,其机制可能与抑制NF- κ B信号通路的活化,进而减轻心肌组织的炎症反应有关。

[关键词] 隐丹参酮；病毒性心肌炎；炎症反应

中图分类号：S432.4+1 **文献标识码：**A

Effect of Cryptotanshinone on the Inflammatory Response in Mice with Viral Myocarditis

Jiali Jin

Department of Cardiology, Zhuji People's Hospital of Zhejiang Province

[Abstract] Objective: To investigate the protective effect of cryptotanshinone against Coxsackievirus B3 (CVB3)-induced viral myocarditis (VMC) and its underlying molecular mechanism. Methods: A VMC mouse model was established via intraperitoneal injection of CVB3. The experimental mice were randomly divided into three groups: the control group, the VMC model group, and the cryptotanshinone treatment group. Serum levels of cardiac troponin I (cTnI) and B-type natriuretic peptide (BNP) were measured. The expression levels of the inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression levels of IL-1 β and TNF- α in myocardial tissue, as well as the phosphorylation levels of key proteins in the nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway, were determined by Western blot analysis. Results: Compared with the VMC group, serum levels of cTnI and BNP were significantly reduced in the cryptotanshinone treatment group. ELISA results demonstrated that cryptotanshinone significantly decreased the release of IL-1 β and TNF- α into the serum. Western blot results indicated that cryptotanshinone markedly reduced the protein expression levels of IL-1 β and TNF- α in myocardial tissue and significantly inhibited the phosphorylation of NF- κ B protein. Conclusion: Cryptotanshinone exerts a significant protective effect against CVB3-induced viral myocarditis. The mechanism may be related to the suppression of NF- κ B signaling pathway activation, thereby alleviating the inflammatory response in myocardial tissue.

[Key words] Cryptotanshinone; Viral Myocarditis; Inflammatory Response

前言

病毒性心肌炎(Viral Myocarditis, VMC)是由病毒感染引起

的心肌局灶性或弥漫性炎症反应性疾病,其主要致病病毒为柯萨奇病毒B3(CVB3),该病毒属于小RNA病毒科肠道病毒属^[1]。据报

道, CVB3感染导致约50%的急性心肌炎及25%的扩张型心肌病(DCM)病例。其发病机制复杂, 涉及病毒直接致心肌细胞损伤、免疫反应异常以及炎症因子介导的继发性损害。目前, 临床上尚无特异性治疗药物, 主要以支持治疗和抗炎、抗病毒治疗为主^[2]。因此, 寻找新的安全有效的干预手段具有重要意义。

隐丹参酮(Cryptotanshinone)是从传统中药丹参(*Salvia miltiorrhiza*)中提取的一种脂溶性二萜醌类活性成分, 已被广泛报道具有多种药理作用, 包括抗菌、抗炎、抗氧化、抗纤维化及抗肿瘤等生物学活性^[3]。近年来研究发现, 隐丹参酮可通过调控JAK/STAT、NF- κ B、NLRP3炎症小体等多种信号通路发挥抗炎作用, 在肺损伤、肝炎、脑缺血等炎症相关疾病模型中显示出良好的保护效应。

基于其显著的抗炎特性, 本研究旨在探讨隐丹参酮是否对CVB3诱导的病毒性心肌炎小鼠具有心脏保护作用。通过建立VMC动物模型, 并给予隐丹参酮干预, 检测心肌损伤标志物及系统性与局部炎症反应水平的变化, 进一步分析其对NF- κ B信号通路的影响, 以期阐明其潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选取6至8周龄、体重18~22g的雄性BALB/c小鼠30只, 随机分为三组(每组n=10): 空白对照组、病毒性心肌炎模型组(VMC组)和隐丹参酮治疗组。采用腹腔注射柯萨奇病毒B3(CVB3)的方法建立病毒性心肌炎小鼠模型。隐丹参酮治疗组在造模成功后, 每日给予隐丹参酮50mg/kg腹腔注射治疗, 连续7天。对照组小鼠注射等量生理盐水。

1.2 cTnI和BNP检测

处死正常组、心肌炎组和隐丹参酮治疗组小鼠前摘除眼球取血, 将全血在室温下放置1小时, 待全血自然凝固并析出血清后, 4℃、2000转离心10分钟, 离心完成后吸取黄色上清液, 将血清存放于-80℃长期保存。按照检测试剂盒中的实验步骤对肌钙蛋白I(cTnI)和B型利钠肽(BNP)进行检测。

1.3 ELISA检测

参照上述方法收集各组小鼠血清, 严格按照IL-1 β 和TNF- α ELISA试剂盒说明书的步骤, 检测血清中炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量。

1.4 Western Blot检测

将蛋白裂解液和心脏组织按一定比例混合后置于匀浆机中搅碎。然后用超声细胞破碎仪粉碎细胞。接着放入离心机中以12000转/分离心30min。离心结束后吸取上清并对蛋白浓度进行测定。用10%分离胶对所配得的蛋白体系进行电泳, 并在300mA恒定电流的条件下转膜1.5h, 使用脱脂奶粉封闭2h, 之后添加I抗IL-1 β (1:1000)、TNF- α (1:1000)、p-NF-KB(1:1000)、NF-KB(1:1000)和GAPDH(1:5000), 置于4℃冰箱内孵育过夜。第二天将孵育盒取出, 用TBS-Tween洗涤三遍, 每遍10min。接着孵育II抗2h, 并再次用TBS-Tween洗涤三遍, 采用曝光机对各蛋白条带进行显影, 同时对灰度值展开分析。IL-1 β 、TNF- α 蛋白的参照选

择GAPDH蛋白。p-NF-KB蛋白的参照选择NF-KB蛋白。

1.5 统计学分析

实验数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间两两比较采用Bonferroni校正的t检验。以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 隐丹参酮降低VMC小鼠血清cTnI和BNP水平

VMC组小鼠血清cTnI和BNP水平较对照组显著升高(P<0.05), 而隐丹参酮治疗组小鼠血清cTnI和BNP水平较VMC组显著降低(P<0.05), 见图1。

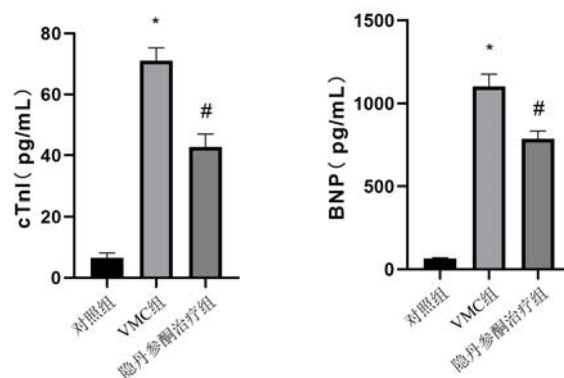


图1 三组小鼠血清cTnI和BNP表达水平

*与对照组相比, P<0.05; #与VMC组相比, P<0.05

2.2 隐丹参酮降低VMC小鼠血清炎症因子水平

ELISA实验结果表明, VMC组小鼠血清IL-1 β 、TNF- α 水平较对照组显著升高(P<0.05), 而隐丹参酮治疗组小鼠血清IL-1 β 、TNF- α 水平较VMC组显著降低(P<0.05), 见图2。

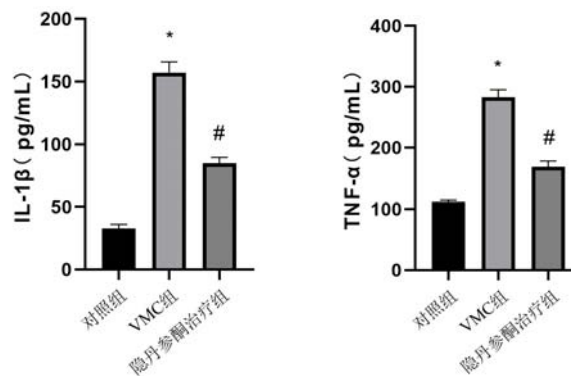


图2 三组小鼠血清炎症因子IL-1 β 、TNF- α 表达水平

*与对照组相比, P<0.05; #与VMC组相比, P<0.05

2.3 隐丹参酮降低VMC小鼠心肌组织中炎症因子表达水平

Western blot结果表明, VMC组小鼠心肌组织中IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平较对照组显著升高, 而隐丹参酮治疗组小鼠心肌组织中IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平较VMC组显著降低, 见图3。

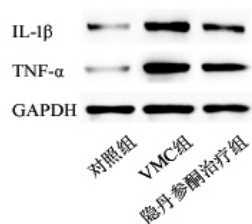


图3 三组小鼠心肌组织IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平

2.4 隐丹参酮抑制NF- κ B信号通路

Western blot结果表明,VMC组小鼠心肌组织中NF- κ B蛋白磷酸化水平较对照组显著升高,而隐丹参酮治疗组小鼠心肌组织中NF- κ B磷酸化水平较VMC组显著降低,见图4。

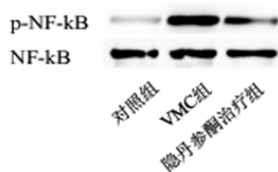


图4 三组小鼠心肌组织NF- κ B蛋白磷酸化水平

3 讨论

目前认为VMC的发病过程大致可分为三个阶段^[4]。第一阶段主要是由病毒感染直接损伤心肌细胞,造成部分心肌细胞死亡,主要表现为心肌细胞的凋亡和坏死。同时,病毒感染可引起机体固有免疫反应的激活,导致各种炎症因子表达水平的上调,如肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素1(IL-1)、白细胞介素6(IL-6)等。心肌损伤的严重程度以及固有免疫反应持续的时间和强度决定了VMC的发展进程。第二阶段主要是由于前一阶段病毒导致的心肌细胞损伤和坏死而继发患者免疫调节异常。即被病毒感染损伤的心肌细胞引起机体自身免疫反应,大量炎症细胞被激活,对自身正常心肌细胞造成进一步损害。因此,寻找更多能够有效缓解全身和心肌炎症反应程度的药物可改善VMC患者的临床症状和远期预后。

随着近年来对传统中药研究的不断深入,大量中药成分被证实可有效改善患者的临床症状。隐丹参酮是中药丹参中提取出来的一种脂溶性萘醌类衍生物,具有多种药理作用,包括抗炎、抗肿瘤等作用^[5]。张树柳等人的研究结果表明隐丹参酮可通过抑制Rac1/AKT/NF- κ B信号通路改善脓毒症大鼠肠损伤^[6]。张兆林等人的研究结果表明可能通过抑制TLR4/NF- κ B/JNK信号通路减轻LPS诱导的MLE-12细胞炎症损伤作用^[7]。王重阳等人的研究结果表明隐丹参酮可通过调控TWEAK/Fn14和TGF- β 1/Smads信号通路改善OVA诱导的小鼠气道炎症^[8]。在本研究中,课题组给予VMC小鼠隐丹参酮治疗,研究发现隐丹参酮可以降低

VMC小鼠血清中cTnI和BNP水平,从而减少CVB3引起的心肌损伤。ELISA实验结果表明给予隐丹参酮治疗后VMC小鼠血清炎症因子水平IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著降低,从而减少CVB3引起的全身炎症反应。Western blot结果表明给予隐丹参酮治疗后VMC小鼠心肌组织中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 表达水平显著降低,进一步的研究发现小鼠心肌组织中NF- κ B蛋白磷酸化水平显著降低。由此可见,隐丹参酮对VMC具有显著的治疗作用。

综上所述,隐丹参酮可减少CVB3引起的心肌组织损伤,下调血清和心肌组织中炎症因子IL-1 β 、TNF- α 表达,同时抑制心肌组织NF- κ B蛋白的磷酸化。隐丹参酮可能通过调控NF- κ B信号通路抑制VMC小鼠体内的炎症反应。该研究结果可为病毒性心肌炎临床治疗药物的研发提供实验依据。

[资金资助]

诸暨市医药卫生科技计划项目:2021YW021。

[参考文献]

- [1]Fung G,Luo H,Qiu Y,et al.Myocarditis[J].Circulation research.2016,118:496-514.
- [2]Rose NR. Viral myocarditis[J].Current opinion in rheumatology.2016,28:383-9.
- [3]Wu YH, Wu YR, Li B, et al. Cryptotanshinone: A review of its pharmacology activities and molecular mechanisms[J]. Fito terapia,2020,145:104633.
- [4]Yue-Chun L.Recent Advances in Management of Myocarditis[J].Current pharmaceutical design.2016,22:405-7.
- [5]Li H,Gao C,Liu C,et al.A review of the biological activity and pharmacology of cryptotanshinone,an important active constituent in Danshen[J].Biomed Pharmacother, 2021,137:111332.
- [6]张树柳,刘瑞瑞,陈玉刚,等.隐丹参酮调节Rac1/AKT/NF- κ B信号通路对脓毒症大鼠肠损伤的影响[J].河北医学,2024,30(10):1597-1603.
- [7]张兆林,赵慧真,王国明,等.隐丹参酮通过TLR4/NF- κ B/JNK信号通路减轻脂多糖对肺泡上皮细胞炎症损伤的作用研究[J].临床肺科杂志,2024,29(4):518-524.
- [8]王重阳,姜京植,李俊峰,等.隐丹参酮通过TWEAK/Fn14和TGF- β 1/Smads信号通路缓解OVA诱导哮喘小鼠气道炎症[J].中国药理学通报,2019,35(8):1149-1154.

作者简介:

金佳丽(1987--)女,汉族,诸暨人,本科,副主任医师,心血管内科。