

## 蒲公英总黄酮对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡的影响

李建红\*

(开封市回族医院, 河南 开封 475000)

**[摘要]** 目的:研究蒲公英总黄酮(total flavones from taraxaci herba,TF)对病毒性心肌炎小鼠心肌的保护作用。方法:100只雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、模型组、利巴韦林组、蒲公英总黄酮低、中、高(25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>)剂量组。模型组和给药组小鼠腹腔接种 CVB3 病毒,观察蒲公英总黄酮对模型鼠的生存率的影响,于接种第 1,3,7,9,14 天处死部分小鼠取材,TUNEL 法观察神经元凋亡细胞数,免疫组织化学法检测半胱氨酸蛋白酶-8(caspase-8)蛋白阳性细胞数。结果:模型组细胞凋亡率[7 d(73.3±2.4)%;14 d(16.3±0.1)%]明显高于对照组[7 d(1.1±0.7)%;14 d(1.3±0.3)%]。各时间点治疗组上述指标较模型组显著改善,其中利巴韦林组[7 d(18.9±2.7)%;14 d(8.7±1.6)%],蒲公英总黄酮中、高剂量组分别为[7 d(31.2±2.3)%;14 d(18.3±1.2)%;7 d(21.7±3.1)%;14 d(13.1±1.4)%]。病毒接种后数天,模型组 caspase-8 阳性细胞表达明显增加,7 d 达最高峰(27.2±1.17)%,然后有所下降,14 d 为(9.2±1.17)%,明显高于对照组 7 d(1.8±0.2)%;14 d(2.1±0.2)%。各时间点治疗组上述指标较模型组显著改善,其中利巴韦林组[7 d(10.12±1.15)%;14 d(2.12±1.15)%];蒲公英总黄酮中、高剂量组分别为[7 d(18.3±2.7)%;14 d(4.3±2.7)%,7 d(13.2±2.7)%;14 d(3.2±2.7)%]。结论:蒲公英总黄酮能有效的抑制病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡。

**[关键词]** 蒲公英总黄酮;病毒性心肌炎;细胞凋亡;半胱氨酸蛋白酶-8

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0215-04

## Effects of Total Flavones from Taraxaci Herba on Ardiomyocyte Apoptosis in Mice with Viral Myocarditis

LI Jian-hong\*

(The Hui Nationality Hospital of Kaifeng, Kaifeng 475000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protection effects of total flavones from Taraxaci Herba(TF) on rats

**[收稿日期]** 20101121003

**[通讯作者]** \* 李建红,本科,博士,主管药师,从事医院药学研究,Tel:13569519195,0378-5951740,E-mail:1020312422@qq.com

中相当于阴痒、带下病范畴,中医学认为其发生机制主要系脾虚生湿,湿热下注,湿蕴生虫或外阴不洁,邪毒内侵,虫蚀阴中所致,治以清热解毒,除湿止痒为原则。净得康喷雾剂集中使用了白花蛇舌草、鬼画符、大叶桉叶、苦参等药物,从而共奏清热解毒、燥湿杀虫、止痒之功。实验结果也表明,净得康喷雾剂对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌等阴道感染常见的细菌具有不同程度的抑制作用,对大鼠细菌性阴道炎、霉菌性阴道炎也有明显的抑制作用;并能明显抑制磷酸组织胺所致豚鼠搔痒反应;对巴豆油诱发小鼠耳廓肿胀也有明显的抑制作用。

### [参考文献]

- [1] 陈奇,孙建宁,林志彬,等. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:259,378.
- [2] 林彩,李英,唐先哲,等. 诺氟沙星栓对大鼠细菌性阴道炎动物模型疗效观察[J]. 中国抗生素杂志,1997,22(1):71.
- [3] 刘文. 大鼠阴道炎模型建立及妇炎平清洗剂治疗作用的研究[J]. 贵阳中医学院学报,1996,18(4):59.
- [4] 姚树汉,刘元,罗斌. 清毒灵搽剂的药理作用[J]. 广西中医药,1998,21(5):47.

[责任编辑 聂淑琴]

with viral myocarditis. **Method:** Fifty male BAIB/c mice were randomly divided into control group, model group, ribavirin group, TF low dose group ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), medium dose group ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and high dose group ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The mice in model group and therapy group were inoculated with CVB3. At 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 9<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> d, a part of the mice were killed, ardiomyocyte apoptosis was detected by the immunohistochemical technique and caspase-8 expression was detected by TUNEL staining method. **Result:** As compared with control group [(7<sup>th</sup> d ( $1.1 \pm 0.7$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $1.3 \pm 0.3$ )%)], the level of ardiomyocyte apoptosis in model group [7<sup>th</sup> d ( $73.3 \pm 2.4$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $16.3 \pm 0.1$ )%] showed elevation. These indexes were obviously improved in treatment group, ribavirin group was [7<sup>th</sup> d ( $18.9 \pm 2.7$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $8.7 \pm 1.6$ )%] and those in TF medium, high dose groups were [(7<sup>th</sup> d ( $31.2 \pm 2.3$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $18.3 \pm 1.2$ )%, 7<sup>th</sup> d ( $21.7 \pm 3.1$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $13.1 \pm 1.4$ )%] accordingly. The positive cell expression in model group was increased significantly after inoculation it reached the peak at 7<sup>th</sup> d ( $27.2 \pm 1.17$ )%, and then declined, it was ( $9.2 \pm 1.17$ )% on the 14<sup>th</sup> d, which showed significantly elevation compared with control group [7<sup>th</sup> d ( $1.8 \pm 0.2$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $2.1 \pm 0.2$ )%], All of these indexes were obviously improved in treatment groups; ribavirin group was [7<sup>th</sup> d ( $10.12 \pm 1.15$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $2.12 \pm 1.15$ )%] and those in TF medium and high dose groups were [7<sup>th</sup> d ( $18.3 \pm 2.7$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $4.3 \pm 2.7$ )%], [7<sup>th</sup> d ( $13.2 \pm 2.7$ )% ; 14<sup>th</sup> d ( $3.2 \pm 2.7$ )%] respectively. **Conclusion:** TFD has a protective effect on ardiomyocyte in mice with viral myocarditis.

[**Key words**] total flavones from Taraxaci Herba; viral myocarditis; apoptosis; caspase-8

近年来病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)的发病率呈上升趋势,已成为临床的常见病和多发病。VMC的发病主要与病毒直接损伤心肌细胞、免疫损伤及生化机制有关<sup>[1]</sup>。目前对该病的治疗仍缺乏有效手段。蒲公英含有丰富的黄酮,具有较强的清除自由基、抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化、细胞保护作用,以及抗菌、消炎、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[2]</sup>,本文旨在通过观察蒲公英总黄酮对病毒性心肌炎小鼠的保护作用及机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 蒲公英总黄酮(TF) 自制,精密称取干燥粉碎过 40 目菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. Mazz 1 000 g, 75% 乙醇提取 3 次,固液比 30:1,提取液浓缩过 D101 树脂,70% 乙醇洗脱,浓缩冷冻干燥得总黄酮,高效液相色谱仪(岛津)检测纯度为 91.3%,以无菌 0.9% 氯化钠溶液配制成不同浓度。

**1.2 病毒** CVB<sub>3</sub>Nancy 株和 Hela 细胞株均由郑州大学提供, CVB<sub>3</sub>Nancy 株在 Hela 细胞中传代,冻融离心 3 次,上清液分装, Hela 细胞测 50% 组织感染率(TCID<sub>50</sub>)为  $10^{-6}$ 。

**1.3 动物** Balb/c 雄性小鼠, 3~4 周龄, 体重(13~20)g, 由郑州大学动物实验中心提供, 动物许可证号豫动字 P0010003。

**1.4 试剂与仪器** 兔多抗 caspase-8 (批号

20071007)、原位末端标记(Tunel)检测试剂盒(批号 20081021):武汉博士德生物工程有限公司;奥林巴斯荧光显微镜、显微镜:奥林巴斯公司。

## 2 方法

**2.1 半数有效率(ED<sub>50</sub>)的测定** 140 只雄性 BALB/c 小鼠随机分成蒲公英总黄酮(5, 25, 50, 75, 95, 115  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )剂量组和模型组, 每组 20 只, 各组 ip 含 CVB<sub>3</sub>Nancy 病毒  $1 \times 10^{-6}/\text{mL}$  的 MEM Eagle 液 0.1 mL/只, 接种 CVB<sub>3</sub> 2 h 后蒲公英总黄酮组按照 0.01  $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$  剂量 ig, 其余则每日给予相应剂量的生理盐水 ig, 2 次/d, 给药 14 d 后处死, 无菌取心脏, 左心室中、下 1/3 心室肌, 置 5.4% 甲醛固定 24 h。常规梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、连续冠状切片, HE 染色, 观察心肌病理变化并计算各组小鼠 14 d 生存率。

**2.2 分组及给药方法** 240 只雄性 BALB/c 小鼠, 随机分为正常对照组、模型组、利巴韦林组 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 蒲公英总黄酮低 ( $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、中 ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、高 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组, 每组 40 只。除正常对照组, 其余各组腹腔 ip 含  $1 \times 10^{-6}$  TCID<sub>50</sub>  $\cdot \text{mL}^{-1}$  MEM Eagle 液 0.1 mL; 对照组 ip 不含 CVB<sub>3</sub> 的 MEM Eagles 液 0.1 mL<sup>[3]</sup>, 给药 14 d。病毒接种后第 1, 3, 7, 9, 14 天除正常对照组, 各组随机抽取 6 只小鼠, 正常对照组第 14 天作为总体对照, 无菌取心脏, 置 5.4% 甲醛固定 24 h。常规梯度乙醇脱水、透明、浸

蜡、包埋、连续冠状切片,备用。

**2.3 心肌病理组织学检查** 光镜观察 14 d 后处死小鼠心肌病理变化,按 Rezkalla 的方法计算心肌病理组织学积分,即每张切片随机取 6 个高倍视野,计算每个视野中整个心肌切片面积之比:无病变计 0 分,病变面积 < 25%,计 1 分,25% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 75% 计 3 分, > 75% 计 4 分<sup>[4]</sup>。

**2.4 原位末端标记(TUNEL)染色** 用 TUNEL 方法检测给药 7 d, 14 d 后处死小鼠心肌凋亡细胞的 DNA 片段,在荧光显微镜下计数凋亡细胞,每张切片随机选取 5 个视野(×400 倍),记数凋亡阳性细胞,棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡的细胞,以凋亡指数(apoptosis index, AI)反映各组心肌凋亡情况。

AI = 视野内凋亡细胞个数/视野内所有心肌细胞个数 × 100%

**2.5 caspase-8 蛋白的检测** 采用免疫组化法检测给药 1, 3, 7, 9, 14 d 后处死小鼠心脏组织切片。心肌细胞质黄色或棕黄色为阳性细胞,在高倍镜下(×400),取每张切片中梗死灶区域相互不重叠 4 个视野,采用 Meta Morph 图像分析系统,记录 caspase-8 蛋白积分吸光度(A)。

**2.6 统计学方法** 用 SPSS13.0 统计软件进行数据的统计学处理,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析, *P* < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 半数有效率 ED<sub>50</sub>的测定** 由表 1 可知,伴随蒲公英总黄酮剂量的加大,小鼠死亡率减少,均可以显著减少心肌组织坏死(*P* < 0.05, *P* < 0.01),对数剂量-概率单位回归法得回归方程  $Y = 0.87 + 0.683X$  (*r* = 0.998),有剂量-效应关系,其 ED<sub>50</sub> = 57 mg·kg<sup>-1</sup>。

表 1 蒲公英总黄酮对 CVB<sub>3</sub> 病毒感染小鼠生存率及心肌坏死程度的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	生存率 /%	心肌组织坏死 积分/分
模型	-	22.1	1.89 ± 0.61
蒲公英总黄酮	5	39.7	1.21 ± 0.54
	25	57.0	0.84 ± 0.68
	50	76.1	0.61 ± 0.49 <sup>1)</sup>
	75	83.7	0.24 ± 0.41 <sup>1)</sup>
	95	92.0	0.19 ± 0.37 <sup>2)</sup>
	115	100	0.18 ± 0.42 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01(表 2 ~ 4 同)。

**3.2 CVB<sub>3</sub> 对小鼠累积死亡率的影响** 模型组小

鼠于感染第 3 天开始发病,行动迟缓,毛色灰暗,感染后第 3 天开始死亡,第 7 天进入死亡高峰,药物治疗组死亡时间推迟到第 7 天,并出现体质量减轻,尾部缺血、坏死等外周组织缺血、缺氧症状和体征,而正常对照组无 1 例死亡。第 9 天开始,死亡数下降,症状不断改善,第 14 天各组小鼠均无死亡,药物治疗组小鼠与模型组比较外周组织缺血明显改善,死亡率明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01),呈剂量效应关系。见表 2。

表 2 蒲公英总黄酮对各组小鼠染毒第 14 天存活率的影响(*n* = 40)

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	存活数 /只	存活率 /%
正常对照	-	40	100 <sup>2)</sup>
模型	-	8	20
利巴韦林	50	37	92.5 <sup>2)</sup>
蒲公英总黄酮	25	24	60
	50	32	80 <sup>1)</sup>
	100	36	90 <sup>2)</sup>

**3.3 蒲公英提取物对病毒性心肌炎心肌细胞凋亡的影响** 病毒感染第 7 天模型组细胞凋亡率与对照组相比,明显增多(*P* < 0.05),这可能与小鼠感染病毒后,免疫介导细胞溶解有关。药物治疗组的小鼠细胞凋亡率与模型组的比较,均明显下降(*P* < 0.05, *P* < 0.01),说明治疗药物对病毒性心肌炎心肌细胞凋亡具有抑制作用,并存在着一定的量效关系。从第 7 天开始,细胞凋亡率开始下降,病毒开始从体内清除,大多数动物康复。但由于病毒不存在的情况下,炎症过程还可持续数周、数月,因此第 14 天,模型组小鼠的凋亡率较高,相对于药物治疗组,药物治疗组细胞凋亡率明显下降,这可能与黄酮的药效有一定的联系。见表 3。

表 3 蒲公英提取物对病毒性心肌炎心肌细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	凋亡指数/%	
		7 d	14 d
正常对照	-	1.1 ± 0.7 <sup>2)</sup>	1.3 ± 0.3 <sup>1)</sup>
模型	-	73.3 ± 2.4	16.3 ± 0.1
利巴韦林	50	18.9 ± 2.7 <sup>2)</sup>	8.7 ± 1.6 <sup>1)</sup>
蒲公英总黄酮	25	43.2 ± 2.1	27.3 ± 0.6
	50	31.2 ± 2.3 <sup>1)</sup>	18.3 ± 1.2 <sup>1)</sup>
	100	21.7 ± 3.1 <sup>2)</sup>	13.1 ± 1.4 <sup>2)</sup>

**3.4 蒲公英提取物对病毒性心肌炎心肌 caspase-8**

的影响 模型组阳性细胞表达与对照组比较,数量明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),第 7 天阳性表达达到最高峰,此时可能与病毒急性感染期有关,相对于不同剂量的药物治疗组,药物治疗组阳性细胞表达明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),说明蒲公英提取物对病毒性心肌炎均具有显著的抑制作用,能明显抑

制 caspase-8 表达,且存在着一定的量效关系。从第 7 天开始,各组阳性表达开始下降,这可能与病毒感染慢性期有关,药物组的阳性表达相对于模型组下降更加明显( $P < 0.05, P < 0.01$ ),这与蒲公英黄酮的药效有一定的联系。见表 4。

表 4 蒲公英总黄酮对病毒性心肌炎心肌 caspase-8 的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	caspase-8 阳性表达率/%				
		1 d	3 d	7 d	9 d	14 d
正常对照	-	1.6 ± 0.1 <sup>1)</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>1)</sup>	1.8 ± 0.2 <sup>2)</sup>	1.9 ± 0.1 <sup>1)</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>2)</sup>
模型	-	4.7 ± 1.21	13.7 ± 1.37	27.2 ± 1.17	13.4 ± 1.36	9.2 ± 1.17
利巴韦林	50	2.12 ± 1.13 <sup>1)</sup>	4.39 ± 1.54 <sup>1)</sup>	10.12 ± 1.15 <sup>2)</sup>	7.12 ± 1.64 <sup>2)</sup>	2.12 ± 1.15 <sup>1)</sup>
蒲公英总黄酮	25	3.9 ± 1.31	9.7 ± 1.51	24.1 ± 2.1	10.6 ± 1.51	6.1 ± 2.1
	50	2.34 ± 1.23	7.21 ± 1.31	18.3 ± 2.7 <sup>1)</sup>	9.3 ± 1.35 <sup>1)</sup>	4.3 ± 2.7 <sup>1)</sup>
	100	2.36 ± 1.65 <sup>1)</sup>	5.69 ± 1.94 <sup>1)</sup>	13.2 ± 2.7 <sup>2)</sup>	8.3 ± 1.37 <sup>2)</sup>	3.2 ± 2.7 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

细胞凋亡是细胞自杀过程,是保证细胞正常生长和维持稳态的重要条件,其目的是去除各种异常、受损和癌变的细胞,是对各种应激如生长因子缺乏、细胞因子释放、DNA 损伤、细胞周期功能异常、癌基因激活等的正常反应。病毒感染后所致心肌细胞凋亡是引起心肌细胞丢失,最终导致心功能障碍的重要机制。本研究中,正常对照组中有少量的凋亡细胞,治疗组的凋亡阳性细胞数较对照组增多,但较模型组减少,且高剂量组减少最为明显,提示蒲公英提取物均能够抑制细胞凋亡,达到保护心肌细胞的作用。

细胞凋亡的发生是一个主动过程,它依赖于大分子物质合成,caspase 家族被认为是细胞凋亡不可逆的进入最后实施阶段的关键分子,其中 caspase-8 是研究较多的 caspase 蛋白酶,属上游起始 caspase,在死亡受体介导的细胞凋亡过程中扮演着重要角色,本研究表明,模型组 caspase-8 大量的表达,通过不同剂量蒲公英提取物治疗,不同剂量治疗组

caspase-8 阳性细胞数均明显减少,表明蒲公英提取物对病毒性心肌炎促凋亡基因表达产生了积极的抑制作用,对心肌细胞损伤产生保护作用。

综上所述,蒲公英提取物能减少病毒性心肌炎心肌细胞凋亡,这可能与抑制 caspase-8 蛋白的表达有关。

#### [参考文献]

[1] 高玉峰,李素婷,段一娜,等.生黄合剂对病毒性心肌炎小鼠血清 IL-2 及 IL-10 的影响[J].时珍国医国药,2007,18(2):424.

[2] 陈景耀,龚祝南,宰学明,等.蒲公英提取物黄酮类物质成分及其抗氧化活性的初步研究[J].中国野生植物资源,2001,20(3):22.

[3] 顾坚,黄星.丹参注射液对病毒性心肌炎小鼠心肌 HSP70 与 SOD 的影响[J].医药导报,2006,25(5):418.

[4] 王佐.苦瓜蛋白对柯萨奇 3 型病毒感染大鼠心肌细胞的保护作用[D].长沙:中南大学,2003

[责任编辑 聂淑琴]