

DOI:10.13350/j.cjpb.220504

• 论著 •

木犀草素调控 AMPK/NLRP3 轴介导的细胞焦亡 对病毒性心肌炎的保护作用^{*}

张晓蕾¹, 张凯^{2*}, 秦永亭¹, 王士珍¹, 陈培¹

(1. 江苏护理职业学院, 江苏淮安 223005; 2. 南华大学附属第二医院重症医学科)

【摘要】 目的 探讨木犀草素调控 AMP 活化激酶(AMPK)/NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)轴介导的细胞焦亡途径对病毒性心肌炎(VM)小鼠的保护作用。 **方法** 将 300 只 BALB/c 雄性小鼠随机分为对照组、CVB3 病毒组(0.1 mL 1×10^{-5} CVB3)、木犀草素低剂量组(5 mg/kg 木犀草素)、木犀草素高剂量组(20 mg/kg 木犀草素)、AMPK 激活剂组(200 mg/kg AICAR)和木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组(20 mg/kg 木犀草素+20 mg/kg Compound C)。除对照组外,各组小鼠均用 0.1 mL 1×10^{-5} CVB3 处理,并按照要求饲养。采用试剂盒法检测小鼠心肌匀浆中 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平;HE 染色观测小鼠心肌组织病理变化,并参照 rezkalla 法对小鼠心肌病理学进行评分;采用 TUNEL 试剂盒检测心肌组织凋亡情况;采用 Western blot 法检测心肌组织 Bax、Bcl-2、p-AMPK、AMPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 水平。

结果 与对照组相比,CVB3 病毒组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6、病理积分、心肌凋亡率、Bax 蛋白及 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白水平均显著升高(均 $P < 0.05$, Bcl-2 蛋白和 p-AMPK/AMPK 水平显著降低(均 $P < 0.05$; 与 CVB3 病毒组相比,木犀草素低剂量组、木犀草素高剂量组、AMPK 激活剂组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6、病理积分、心肌凋亡率、Bax 蛋白及 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白水平均显著降低(均 $P < 0.05$, Bcl-2 蛋白和 p-AMPK/AMPK 水平显著升高(均 $P < 0.05$; 与木犀草素高剂量组相比,木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6、病理积分、心肌凋亡率、Bax 蛋白和 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白均显著升高(均 $P < 0.05$, Bcl-2 蛋白和 p-AMPK/AMPK 水平显著降低(均 $P < 0.05$)。 **结论** 木犀草素通过激活 AMPK/NLRP3 介导的细胞焦亡发挥对 VM 小鼠心肌的保护作用,为 VM 的临床治疗提供了参考依据。

【关键词】 木犀草素;AMP 活化激酶/NOD 样受体蛋白;细胞焦亡

【中图分类号】 R542.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)05-0514-06

[Journal of Pathogen Biology. 2022 May;17(5):514-519.]

Protective effect of luteolin on viral myocarditis by regulating AMPK/NLRP3 axis-mediated pyroptosis

ZHANG Xiao-lei, ZHANG Kai, QIN Yong-ting, WANG Shi-zhen, CHEN Pei (1. Jiangsu Vocational College of Nursing, Huaian 223005, Jiangsu, China; 2Department of Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of University of South China) ***

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of luteolin on AMP-activated kinase (AMPK)/NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) axis-mediated pyroptosis pathway in mice with viral myocarditis (VM). **Methods** Three-hundred BALB/c male mice were randomly separated into control group, CVB3 virus group (0.1 mL 1×10^{-5} CVB3), low-dose luteolin group (5 mg/kg luteolin), high-dose luteolin group (20 mg/kg luteolin), AMPK activator group (200 mg/kg AICAR), and high dose luteolin + AMPK inhibitor group (20 mg/kg luteolin + 20 mg/kg Compound C), except the control group, all were treated with 0.1 mL 1×10^{-5} CVB3, and each group was raised as required. The kit method was performed to measure the levels of LDH, CK-MB, IL-1 β and IL-6 in myocardial homogenate; HE staining was performed to observe the pathological changes of mouse myocardium, and the pathology of mouse myocardium was scored according to the rezkalla method; TUNEL kit was performed to measure myocardial tissue apoptosis; Western blot was performed to measure the levels of Bax, Bcl-2, p-AMPK, AMPK, NLRP3, ASC and Caspase-1 in myocardial tissue. **Results** Compared with the control group, LDH (8.02 ± 1.01 vs 66.53 ± 8.30), CK-MB (130.51 ± 16.31 vs 358.24 ± 44.78) and IL-1 in myocardial homogenate of mice in CVB3 virus group (30.50 ± 3.88 vs 135.27 ± 19.84), IL-6 (55.27 ± 3.87 vs 341.53 ± 42.66), pathological score (0 vs 3.42 ± 0.41), myocardial apoptosis rate (4.87 ± 0.66 vs 23.71 ± 2.86), Bax protein (0.35 ± 0.04 vs 1.77 ± 0.21), NLRP3 (0.24 ± 0.03 vs 1.32 ± 0.21), ASC (0.70 ± 0.08 vs 2.41 ± 0.30), caspase-

* **【基金项目】** 淮安市自然科学研究计划项目(No. HAB201844; HAB202134)。

** **【通讯作者】** 张凯, E-mail: zhangkai0306@yeah.net

【作者简介】 张晓蕾(1987-)女,江苏泗阳人,硕士研究生,讲师,主要从事动脉粥样硬化方面研究。E-mail: zxl223005@163.com

1 (0.40 ± 0.05 vs 2.57 ± 0.32) protein levels were significantly increased (all $P < 0.05$), The levels of Bcl-2 protein (2.03 ± 0.24 vs 0.34 ± 0.04) and p-ampk/AMPK (0.94 ± 0.12 vs 0.12 ± 0.04) decreased significantly (all $P < 0.05$); Compared with CVB3 virus group, LDH (66.53 ± 8.30 vs 58.72 ± 7.34 , 38.54 ± 4.81 , 41.02 ± 5.13), CK-MB (358.24 ± 44.78 vs 299.46 ± 37.33 , 195.76 ± 24.40 , 224.38 ± 27.96) and IL-1 in myocardial homogenate of mice in luteolin low-dose group, luteolin high-dose group and AMPK activator group β (135.27 ± 19.84 vs 100.57 ± 12.50 , 72.69 ± 9.02 , 81.06 ± 10.12), IL-6 (341.53 ± 42.66 vs 299.74 ± 37.46 , 201.91 ± 25.38 , 223.40 ± 27.87), pathological score (3.42 ± 0.41 vs 2.03 ± 0.23 , 1.37 ± 0.16 , 1.52 ± 0.18), myocardial apoptosis rate (23.71 ± 2.86 vs 18.79 ± 2.33 , 13.50 ± 1.63 , 14.06 ± 1.71) The levels of Bax protein (1.77 ± 0.21 vs 1.06 ± 0.13 , 0.70 ± 0.08 , 0.74 ± 0.09), NLRP3 (1.32 ± 0.21 vs 1.01 ± 0.12 , 0.72 ± 0.09 , 0.74 ± 0.09), ASC (2.41 ± 0.30 vs 2.01 ± 0.24 , 1.60 ± 0.21 , 1.64 ± 0.21), caspase-1 (2.57 ± 0.32 vs 1.83 ± 0.23 , 1.24 ± 0.15 , 1.42 ± 0.17) decreased significantly (all $P < 0.05$), Bcl-2 protein (0.34 ± 0.04 vs 0.72 ± 0.09 , 1.50 ± 0.15 , 1.42 ± 0.17) and p-ampk/AMPK level (0.12 ± 0.04 vs 0.31 ± 0.04 , 0.54 ± 0.06 , 0.46 ± 0.05) increased significantly (all $P < 0.05$); Compared with luteolin high-dose group, luteolin high-dose + AMPK inhibitor group had LDH (38.54 ± 4.81 vs 41.02 ± 5.13), CK-MB (195.76 ± 24.40 vs 224.38 ± 27.96) and IL-1 in myocardial homogenate β (72.69 ± 9.02 vs 81.06 ± 10.12), IL-6 (201.91 ± 25.38 vs 223.40 ± 27.87), pathological score (1.37 ± 0.16 vs 1.52 ± 0.18), myocardial apoptosis rate (13.50 ± 1.63 vs 14.06 ± 1.71), Bax protein (0.70 ± 0.08 vs 0.74 ± 0.09), NLRP3 (0.72 ± 0.09 vs 0.74 ± 0.09), ASC (1.60 ± 0.21 vs 1.64 ± 0.21), caspase-1 (1.24 ± 0.15 vs 1.42 ± 0.17) protein were significantly increased (all $P < 0.05$), The levels of Bcl-2 protein (1.50 ± 0.15 vs 1.42 ± 0.17) and p-ampk / AMPK (0.54 ± 0.06 vs 0.46 ± 0.05) decreased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** Luteolin can protect the myocardium of VM mice by activating AMPK / NLRP3 mediated cell death, which provides a reference basis for the clinical treatment of VM.

【Key words】 luteolin; AMP-activated kinase/NOD-like receptor protein; pyroptosis

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VM)是因病毒侵犯心脏所致的心肌炎症性改变,主要临床症状有心悸、呼吸困难,可引发心率失常、心衰等^[1]。多种病毒均可引发 VM,以柯萨奇病毒 B3(CVB3)尤为常见。关于 VM 的发生机制仍不明确,主要涉及免疫、氧化应激损伤等,均会引起心肌细胞的异常凋亡^[2]。细胞焦亡是机体内的免疫反应,在抗病毒方面发挥关键作用,可引起细胞程序性死亡,与细胞凋亡有千丝万缕的关系。研究显示,细胞焦亡途径在 CVB3 导致的 VM 中起一定作用^[3]。NLRP3 炎症小体是细胞焦亡的重要途径,抑制 AMP 活化激酶(AMPK)可通过激活 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)启动细胞焦亡^[4],且 AMPK 途径在心肌损伤中发挥作用^[5]。木犀草素是天然黄酮类化合物,具有消炎、抗肿瘤、抗病毒等药理活性,在自然界广泛存在。周梦琪等^[6]报道清肺排毒汤可有效缓解新冠肺炎患者肺部炎症症状,降低炎症风暴,方中木犀草素发挥重要作用;木犀草素可防治慢性阻塞性肺疾病炎症反应^[7]。基于木犀草素的抗炎、抗病毒能力,本研究以 CVB3 构建小鼠 VM 模型,基于 AMPK/NLRP3 介导的细胞焦亡途径探讨木犀草素对 CVB3 诱导的心肌炎小鼠的保护作用。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物及毒株 4 周龄雄性 BALB/c 小鼠 [SCXK(湘)2019-0004]购自湖南斯莱克景达实验动物

有限公司;CVB3 病毒由昆明动物病毒所提供。

1.2 主要试剂 AMPK 激活剂 AICAR(S1802)和 AMPK 抑制剂 Compound C(S7306)购自美国 selleck 公司;木犀草素(B20888)购自上海源叶公司;肌酸激酶同工酶(CK-MB)(ml037723)试剂盒,白介素 1 β (IL-1 β)试剂盒(ml301814)和白介素 6(IL-6)试剂盒(ml002293-J)购自上海酶联公司;BCA 试剂盒(P0012),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(C0017),HE 染色试剂盒(C0105S)和 TUNEL 试剂盒(显色法, C1091)购自上海碧云天公司;蛋白提取试剂盒(89842)购自赛默飞世尔公司;兔抗鼠 Bax (GTX109683), Bcl-2 (GTX100064), p-AMPK (GTX52341), AMPK (GTX60403), NLRP3 (GTX133569), Caspase-1 (GTX101322), GAPDH (GTX100118), ASC (ab283684)及羊抗兔二抗 (ab6721)购于美国 abcam 公司。

2 方法

2.1 CVB3 病毒扩增及动物试验 体外培养 HeLa 细胞,取对数期细胞培养于 6 孔板中,加入 CVB3 病毒液培养 2 d,2 000 r/min 离心 10 min,取上清,病毒悬液经梯度稀释法稀释为 $10^{-10} \sim 10^{-1}$ 噬菌斑形成单位后,加病毒悬液至相应细胞孔,72 h 后检测细胞病变,以 50%细胞病变为标准,计算半数组织培养感染量。将 300 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、CVB3 病毒组、木犀草素低剂量组、木犀草素高剂量组、AMPK 激活剂组、木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组,每组 50

只。除对照组外,其余各组小鼠腹腔注射 0.1 mL 半数感染量浓度(1×10^{-5}) CVB3 病毒液,诱导小鼠 VM 模型^[8],对照组注射等体积的 DMEM 培养基。木犀草素低、高剂量组分别灌胃 5 mg/kg 和 20 mg/kg 木犀草素^[9];AMPK 激活剂组腹腔一次注射 200 mg/kg AICAR^[10];木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组灌胃 20 mg/kg 木犀草素并腹腔一次注射 20 mg/kg Compound C^[11],木犀草素 1 次/d,连续 21 d。

2.2 ELISA 法检测小鼠心肌匀浆中 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平 每组选 10 只小鼠,小鼠处死后取心脏,生理盐水清洗血污,取适量心室组织,破碎匀浆后消化,采用 BCA 试剂盒作蛋白定量,采用 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 试剂盒检测小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平。

2.3 小鼠心肌组织病理学观察 取部分心脏组织,10%甲醛固定心脏标本,石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察小鼠心肌组织病理变化。参照 rezkalla 法对小鼠心肌病理学进行评分,每张切片取 5 个视野,无病变为 0 分, $\leq 25\%$ 为 1 分, $> 25\%$ 但 $\leq 50\%$ 为 2 分, $\geq 50\%$ 但 $\leq 75\%$ 为 3 分, $\geq 75\%$ 为 4 分。

2.4 心肌组织凋亡观察 取 2.3 中的石蜡切片,采用 TUNEL 试剂盒检测心肌细胞凋亡情况,计数凋亡细胞数与总细胞数,计算心肌凋亡指数。心肌凋亡指数=(凋亡细胞数/总细胞数) $\times 100\%$ 。

2.5 Western blot 法检测心肌组织 Bax/Bcl-2/AMPK/NLRP3 水平 取一定量小鼠心肌组织,提取总蛋白,经 BCA 试剂盒蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳分离并将蛋白转移到 PVDF 膜上,室温封闭(脱脂牛奶,2 h);分别加入 1:1 000 稀释的兔抗鼠 Bax、Bcl-2、p-AMPK、AMPK、ASC、NLRP3,以 GAPDH(1:5 000)为内参,孵育 24 h,冲洗;加入山羊抗兔二抗(1:5 000),孵育 2 h,冲洗;加入 ECL 显色液显色,分析 Bax、Bcl-2、p-AMPK、AMPK、ASC、NLRP3 蛋白表达量。

2.6 统计学分析 以 SPSS 22.0 软件对实验数据进行统计学分析。计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较进行单因素方差分析,进一步两组间比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料以 *n* 描述,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1 木犀草素对小鼠一般情况的影响

对照组小鼠体重稳定增长,皮毛顺滑,饮水量饮水量正常。其余各组小鼠接种病毒液后自第 3 d 始,毛发晦淡、饮水饮食降低,体重减轻,死亡增多。与 CVB3 病毒组相比,木犀草素低、高剂量组及 AMPK

激活剂组死亡率均显著降低(均 $P < 0.05$);木犀草素高剂量组与木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组相比死亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 6 组小鼠给药期间死亡情况($n=50$)

组别 Group	死亡只数 Number of deaths	死亡率 % Mortality
对照组	0	0.00
CVB3 病毒组	10	20.00 ^a
木犀草素低剂量组	3	6.00 ^b
木犀草素高剂量组	3	6.00 ^b
AMPK 激活剂组	4	8.00 ^b
木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组	4	8.00 ^b
χ^2		14.674
<i>P</i>		0.012

注:a 与对照组相比, $P < 0.05$;b 与 CVB3 病毒组相比, $P < 0.05$ 。

Note:a compared with the control group, $P < 0.05$;B compared with CVB3 virus group, $P < 0.05$.

2 木犀草素对小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平的影响

与对照组相比, CVB3 病毒组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高(均 $P < 0.05$);与 CVB3 病毒组相比,木犀草素低、高剂量组及 AMPK 激活剂组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平显著降低(均 $P < 0.05$);与木犀草素高剂量组相比,木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高(均 $P < 0.05$)(表 2)。

表 2 6 组小鼠心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	LDH(U/L)	CK-MB(U/L)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
对照组	8.02 $\pm$ 1.01	130.51 $\pm$ 16.31	30.50 $\pm$ 3.88	55.27 $\pm$ 3.87
CVB3 病毒组	66.53 $\pm$ 8.30 ^a	358.24 $\pm$ 44.78 ^a	135.27 $\pm$ 19.84 ^a	341.53 $\pm$ 42.66 ^a
木犀草素低剂量组	58.72 $\pm$ 7.34 ^b	299.46 $\pm$ 37.33 ^b	100.57 $\pm$ 12.50 ^b	299.74 $\pm$ 37.46 ^b
木犀草素高剂量组	38.54 $\pm$ 4.81 ^b	195.76 $\pm$ 24.40 ^b	72.69 $\pm$ 9.02 ^b	201.91 $\pm$ 25.38 ^b
AMPK 激活剂组	41.02 $\pm$ 5.13 ^b	224.38 $\pm$ 27.96 ^b	81.06 $\pm$ 10.12 ^b	223.40 $\pm$ 27.87 ^b
木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组	43.28 $\pm$ 5.42 ^c	245.79 $\pm$ 29.79 ^c	88.67 $\pm$ 10.99 ^c	252.73 $\pm$ 31.44 ^c
<i>F</i>	121.274	64.166	81.703	104.494
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:a 与对照组相比, $P < 0.05$;b 与 CVB3 病毒组相比, $P < 0.05$;c 与木犀草素高剂量组相比, $P < 0.05$ 。

Note:a compared with the control group, $P < 0.05$;B compared with CVB3 virus group, $P < 0.05$;C compared with the high dose group of luteolin, $P < 0.05$.

3 木犀草素对小鼠心肌病理学的影响

对照组小鼠心肌结构完整,心肌纤维排列整齐,未见炎性浸润,细胞无坏死;CVB3 病毒组细胞肿胀,心肌纤维断裂紊乱,可见炎性细胞浸润,存在细胞坏死,有新生血管,与对照组相比病理积分显著升高($P < 0.05$);木犀草素低、高剂量组及 AMPK 激活剂组较

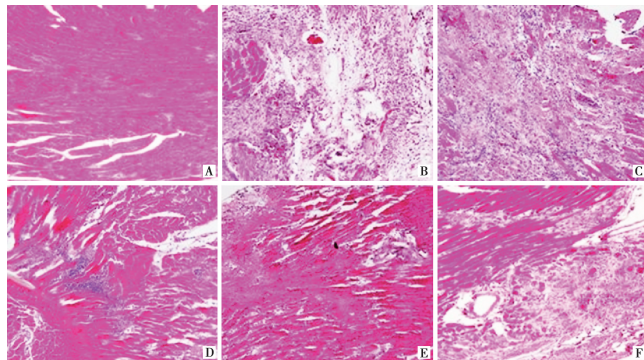
CVB3 病毒组心肌损伤减轻,病理积分显著降低($P < 0.05$);与木犀草素高剂量组相比,木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组心肌损伤加重,病理积分升高($P < 0.05$)(图 1,表 3)。

表 3 6 组小鼠心肌病理积分比较($n=10, \bar{x} \pm s$)
Table 3 Comparison of myocardial pathological scores of 6 groups of mice

组别 Group	心肌病理积分 Myocardial pathology score
对照组	0
CVB3 病毒组	3.42 ± 0.41^a
木犀草素低剂量组	2.03 ± 0.23^b
木犀草素高剂量组	1.37 ± 0.16^b
AMPK 激活剂组	1.52 ± 0.18^b
木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组	1.84 ± 0.22^c
F	224.244
P	< 0.001

注:a 与对照组相比, $P < 0.05$;b 与 CVB3 病毒组相比, $P < 0.05$;c 与木犀草素高剂量组相比, $P < 0.05$ 。

Note:a compared with the control group, $P < 0.05$;B compared with CVB3 virus group, $P < 0.05$;C compared with the high dose group of luteolin, $P < 0.05$ 。



A 对照组 B CVB3 病毒组 C 木犀草素低剂量组 D 木犀草素高剂量组 E AMPK 激活剂组 F 木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组

图 1 6 组小鼠心肌组织病理学变化(HE 染色,100X)

A Control group B CVB3 virus group C Luteolin low dose group D luteolin high dose group E AMPK activator Group F Luteolin high dose + AMPK inhibitor group

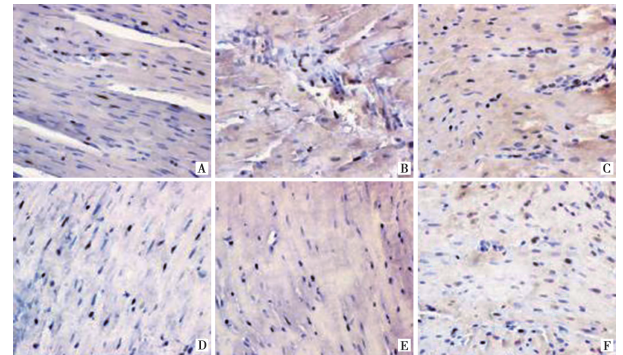
Fig. 1 Histopathological changes of myocardium in 6 groups of mice (HE staining,100X)

4 木犀草素对小鼠心肌凋亡的影响

与对照组相比, CVB3 病毒组小鼠心肌凋亡率和 Bax 蛋白表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达显著减少($P < 0.05$);与 CVB3 病毒组相比,木犀草素低、高剂量组及 AMPK 激活剂组小鼠心肌凋亡率和 Bax 蛋白表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$);与木犀草素高剂量组相比,木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组小鼠心肌凋亡率和 Bax 蛋白水平均显著升高(均 $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著降低($P < 0.05$)(图 2,图 3,表 4)。

5 木犀草素对小鼠心肌焦亡的影响

与对照组相比, CVB3 病毒组小鼠心肌组织 p-MAPK/MAPK 水平显著降低($P < 0.05$, NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白水平显著升高(均 $P < 0.05$);与 CVB3 病毒组相比,木犀草素低、高剂量组及 AMPK 激活剂组小鼠心肌组织 p-MAPK/MAPK 水平显著升高(均 $P < 0.05$, NLRP3、ASC 及 Caspase-1 蛋白水平显著降低(均 $P < 0.05$);与木犀草素高剂量组相比,木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组小鼠心肌组织 p-MAPK/MAPK 水平显著降低($P < 0.05$), NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白水平显著升高(均 $P < 0.05$)(图 4,表 5)。

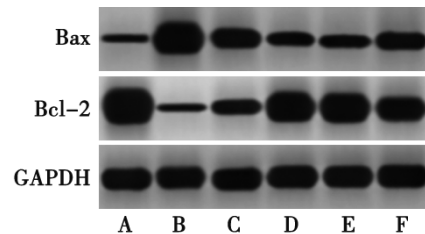


A 对照组 B CVB3 病毒组 C 木犀草素低剂量组 D 木犀草素高剂量组 E AMPK 激活剂组 F 木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组

图 2 6 组小鼠心肌凋亡 TUNEL 图

A Control group B CVB3 virus group C Luteolin low dose group D Luteolin high dose group E AMPK activator Group F Luteolin high dose + AMPK inhibitor group

Fig. 2 TUNEL diagram of myocardial apoptosis in 6 groups of mice



A 对照组 B CVB3 病毒组 C 木犀草素低剂量组 D 木犀草素高剂量组 E AMPK 激活剂组 F 木犀草素高剂量 + AMPK 抑制剂组

图 3 6 组小鼠 Bax、Bcl-2 蛋白水平

A Control group B CVB3 virus group C Luteolin low dose group D Luteolin high dose group E AMPK activator Group F Luteolin high dose + AMPK inhibitor group

Fig. 3 Bax and bcl-2 protein levels in 6 groups of mice

讨 论

VM 是引起患者心律失常、心源性休克、猝死的常见原因之一,但关于 VM 的发生机制仍不明确,也亟待寻找 VM 的特效治疗药物。本研究通过 CVB3 病毒液构建 VM 模型小鼠,实验小鼠自接种病毒液后 3d

毛发开始晦淡、饮水饮食降低,体重减轻,死亡率增加。组织病理学观察心肌细胞肿胀,心肌纤维断裂紊乱,可见炎性细胞浸润,存在细胞坏死,心肌匀浆中 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高。LDH 可反映心肌细胞毒性,CK-MB 是心肌损伤的敏感指标,IL-1 β 、IL-6 是炎性指标。炎症反应及心肌损伤的发生表明构建的 VM 模型符合标准。

表 4 6 组小鼠心肌凋亡率比较($n=10, \bar{x} \pm s$)
Table 4 Comparison of myocardial apoptosis rate in 6 groups of mice

组别 Group	凋亡率(%) Apoptosis rate (%)	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
对照组	4.87 $\pm$ 0.66	0.35 $\pm$ 0.04	2.03 $\pm$ 0.24
CVB3 病毒组	23.71 $\pm$ 2.86 ^a	1.77 $\pm$ 0.21 ^a	0.34 $\pm$ 0.04 ^a
木犀草素低剂量组	18.79 $\pm$ 2.33 ^b	1.06 $\pm$ 0.13 ^b	0.72 $\pm$ 0.09 ^b
木犀草素高剂量组	13.50 $\pm$ 1.63 ^b	0.70 $\pm$ 0.08 ^b	1.50 $\pm$ 0.15 ^b
AMPK 激活剂组	14.06 $\pm$ 1.71 ^b	0.74 $\pm$ 0.09 ^b	1.42 $\pm$ 0.17 ^b
木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组	18.06 $\pm$ 2.23 ^c	0.84 $\pm$ 0.10 ^c	1.24 $\pm$ 0.15 ^c
F	99.448	158.934	152.845
P2	<0.001	<0.001	<0.001

注:a 与对照组相比, $P<0.05$;b 与 CVB3 病毒组相比, $P<0.05$;c 与木犀草素高剂量组相比, $P<0.05$ 。

Note:a compared with the control group, $P<0.05$;B compared with CVB3 virus group, $P<0.05$;C compared with the high dose group of luteolin, $P<0.05$.

表 5 6 组小鼠 p-MAPK/MAPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of p-MAPK / MAPK, NLRP3, ASC and caspase-1 levels in 6 groups of mice

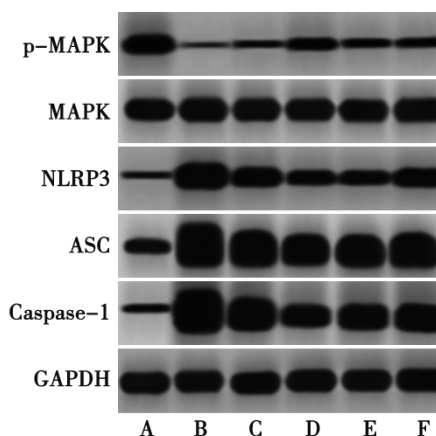
组别 Group	p-MAPK/ MAPK	NLRP3/ GAPDH	ASC/ GAPDH	Caspase-1/ GAPDH
对照组	0.94 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.03	0.70 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.05
CVB3 病毒组	0.12 $\pm$ 0.04 ^a	1.32 $\pm$ 0.21 ^a	2.41 $\pm$ 0.30 ^a	2.57 $\pm$ 0.32 ^a
木犀草素低剂量组	0.31 $\pm$ 0.04 ^b	1.01 $\pm$ 0.12 ^b	2.01 $\pm$ 0.24 ^b	1.83 $\pm$ 0.23 ^b
木犀草素高剂量组	0.54 $\pm$ 0.06 ^b	0.72 $\pm$ 0.09 ^b	1.60 $\pm$ 0.21 ^b	1.24 $\pm$ 0.15 ^b
AMPK 激活剂组	0.46 $\pm$ 0.05 ^b	0.74 $\pm$ 0.09 ^b	1.64 $\pm$ 0.21 ^b	1.34 $\pm$ 0.16 ^b
木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组	0.41 $\pm$ 0.05 ^c	0.87 $\pm$ 0.11 ^c	1.75 $\pm$ 0.19 ^c	1.52 $\pm$ 0.19 ^c
F	172.824	87.753	66.634	126.730
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:a 与对照组相比, $P<0.05$;b 与 CVB3 病毒组相比, $P<0.05$;c 与木犀草素高剂量组相比, $P<0.05$ 。

Note:a compared with the control group, $P<0.05$;B compared with CVB3 virus group, $P<0.05$;C compared with the high dose group of luteolin, $P<0.05$.

木犀草素具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、调节免疫等诸多活性。木犀草素可抗 CVB3 病毒^[12]、H1N1 流感病毒^[13]等多种病毒。王颖等^[14]分析认为木犀草素能下调 PI3K/AKT 通路抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖、迁移。木犀草素可下调 TLR/MyD88/NF- κ B 炎症通过抑制急性痛风性关节炎大鼠关节损伤,发挥抗炎作用^[15]。孔艺等^[16]基于网络药理学分析认为痰热清注射液可治疗新冠病毒肺炎,方中木犀草素与新冠病毒 SARS-CoV-23CL 水解酶有高亲和力。研究显示,木犀草素可抗 H9c2 心肌细胞损伤^[17]。基于木犀草素在心肌损伤、抗炎、抗病毒中的作用,猜测木犀草素对

CVB3 所致 VM 小鼠有缓解症状、保护心肌的作用。本研究中 5 mg/kg、20 mg/kg 木犀草素处理 CVB3 所致 VM 小鼠的心肌细胞肿胀,心肌纤维断裂紊乱,炎性细胞浸润,心肌细胞坏死等症状明显减轻,心肌损伤评分降低,心肌细胞凋亡率降低,且 Bax 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,心肌匀浆 LDH、CK-MB、IL-1 β 、IL-6 水平均降低。提示木犀草素可降低 CVB3 所致的心肌损伤,即木犀草素具有降低病毒载量的作用,但具体机制仍需进一步探讨。



A 对照组 B CVB3 病毒组 C 木犀草素低剂量组 D 木犀草素高剂量组 E AMPK 激活剂组 F 木犀草素高剂量+AMPK 抑制剂组

图 4 小鼠 p-MAPK/MAPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 Western blot 检测

A Control group B CVB3 virus group C Luteolin low dose group D Luteolin high dose group E AMPK activator Group F Luteolin high dose + AMPK inhibitor group

Fig. 4 小鼠 p-MAPK/MAPK、NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白印迹检测

细胞焦亡是细胞的程序性死亡,属于炎症性坏死,细胞胀大至内容物流出激活炎症反应,属自身免疫,在抗病毒感染中发挥重要作用^[18]。NLRP3、ASC、Caspase-1 共同构成 NLRP3 炎症小体,是细胞焦亡的关键,NLRP3 通过识别外界危险信号被激活,并通过 ASC 募集 Caspase-1,促进 IL-1 β 等释放和细胞焦亡^[19]。AMPK 活化可调节线粒体功能、氧化应激、自噬、凋亡等途径,在心肌损伤中起保护作用^[20]。AMPK 活性抑制可通过激活 NLRP3 炎症小体发挥促焦亡作用,Qiu 等^[21]研究显示,青藤碱可通过 AMPK 途径抑制 NLRP3 炎症小体发挥缺血性脑卒中神经保护作用,且此保护作用可被 AMPK 抑制剂 Compound C 阻断。本研究中 AMPK 激活剂组与木犀草素发挥同向作用,此时 NLRP3、ASC、Caspase-1 水平下降,细胞焦亡、凋亡能力均降低,因此推测 AMPK/NLRP3 途径是木犀草素发挥心肌保护作用中的重要环节。为验证这一观点,在木犀草素基础上添加 AMPK 抑制剂,此时木犀草素对 CVB3 诱导的 VM 小鼠心肌保护

作用被逆转,细胞焦亡能力上升,提示木犀草素可通过促进 AMPK 表达抑制 NLRP3 激活对 VM 小鼠发挥心肌保护作用。

综上所述,木犀草素可通过激活 AMPK/NLRP3 轴活化发挥对 VM 小鼠的心肌保护作用,增添了临床药物选择库。但木犀草素是一个多功能多靶点药物,其作用机制仍待进一步探讨。

【参考文献】

- [1] Goetzke CC, Althof N, Neumaier HL, et al. Mitigated viral myocarditis in A/J mice by the immunoproteasome inhibitor ONX 0914 depends on inhibition of systemic inflammatory responses in Cocksackievirus B3 infection[J]. Basic Res Cardiol, 2021,116(1):7.
- [2] Zhang XM, Li YC, Chen P, et al. MG-132 attenuates cardiac deterioration of viral myocarditis via AMPK pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2020(126):110091.
- [3] 史家宁, 黄怡可, 秦颖, 等. B 组柯萨奇病毒诱导的细胞焦亡在心肌损伤中的作用[J]. 国际免疫学杂志, 2018, 41(3):256-259.
- [4] El-Rous MA, Saber S, Raafat EM, et al. Dapagliflozin, an SGLT2 inhibitor, ameliorates acetic acid-induced colitis in rats by targeting NF- κ B/AMPK/NLRP3 axis [J]. Inflammopharmacology, 2021, 29(4):1169-1185
- [5] Zhang Y, Ling Y, Yang L, et al. Liraglutide relieves myocardial damage by promoting autophagy via AMPK-mTOR signaling pathway in Zucker diabetic fatty rat[J]. Mol Cell Endocrinol, 2017(448):98.
- [6] 周梦琪, 杨璐平, 马浩洁, 等. 清肺排毒汤干预新冠肺炎细胞因子风暴机制的网络药理学研究[J]. 海南医学院学报, 2020, 26(10):721-729.
- [7] 李远航. 木犀草素防治 COPD 的效果及抗炎机制[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(8):1216-1218.
- [8] 娄序笙, 胡京红, 葛东宇, 等. 金银花对病毒性心肌炎小鼠的保护作用及其机制[J]. 中医药学报, 2017, 45(1):37-41.
- [9] 刘方圆, 樊迪, 杨政, 等. 木犀草素对小鼠急性心肌梗死后心肌细胞缺血损伤的保护作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21

- (4):411-415.
- [10] 张翼. AICAR 和 Compound C 减轻内毒素血症肝脏损伤的作用与机制[D]. 南昌:南昌大学医学院, 2013.
- [11] 周俊, 林文静, 林森, 等. AMPK 通过抑制炎症反应减轻小鼠肾脏缺血再灌注后纤维化[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(6):450-456.
- [12] 何丽娜, 何素冰, 杨军. 木犀草素体外抗柯萨奇 B3 病毒的作用[J]. 中国现代应用药学, 2000, 17(5):362-365.
- [13] 邓东沅. 木犀草素对流感病毒 H1N1 感染 A549 细胞的作用及免疫调节机制的研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [14] 王颖, 洪铭岩, 陈梅, 等. 木犀草素对宫颈癌细胞增殖与迁移能力影响机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(17):1357-1362.
- [15] 沈瑞明, 马丽辉, 郑颜萍. 木犀草素通过 TLR/MyD88/NF- κ B 通路参与急性痛风性关节炎大鼠的抗炎作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2020, 45(2):115-122.
- [16] 孔艺, 吴红卫, 陈永, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的机制[J]. 中草药, 2020, 51(7):1785-1794.
- [17] 史有阳, 杨瑞, 张洋, 等. 木犀草素通过 MIEF1 抗 H9c2 心肌细胞损伤的机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(5):820-825.
- [18] Song Y, Wu X, Xu YH, et al. HPV E7 inhibits cell pyroptosis by promoting TRIM21-mediated degradation and ubiquitination of the IFI16 inflammasome[J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(15):2924-2937.
- [19] Naji A, Muzembo BA, Yagyu KI, et al. Endocytosis of indium-tin-oxide nanoparticles by macrophages provokes pyroptosis requiring NLRP3-ASC-Caspase1 axis that can be prevented by mesenchymal stem cells[J]. Sci Rep, 2016(6):26162.
- [20] Su Q, Lv XW, Xu YL, et al. Exosomal LINC00174 derived from vascular endothelial cells attenuates myocardial Ischemia-Reperfusion injury via p53-mediated autophagy and apoptosis [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021(23):1304-1322.
- [21] Qiu J, Wang M, Zhang J, et al. The neuroprotection of Sinomenine against ischemic stroke in mice by suppressing NLRP3 inflammasome via AMPK signaling [J]. Int Immunopharmacol, 2016(40):492-500.

【收稿日期】 2022-02-18 【修回日期】 2022-05-06

(上接 513 页)

- [25] Payne M, Champaque S, Lowe C, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel compared to direct MALDI-TOF MS identification for rapid identification of pathogens[J]. J Med Microbiol, 2018, 67(9):1253-1256.
- [26] Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF MS) in clinical microbiology[J]. J Microbiol Methods, 2017, 138:20-29.
- [27] Bernard KA, Pecheco AL. In vitro activity of 22 antimicrobial agents against Corynebacterium and Microbacterium species referred to the Canadian National Microbiology Laboratory[J]. Clin Microbiol Newsl, 2015, 37:187-198.
- [28] Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, et al. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):138:1104-1106.
- [29] 林宇岚, 陈守涛, 甘龙杰, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪鉴定临床分离菌的应用评估[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(44):3607-3612.

- [30] Khot PD, Bird BA, Durrant RJ, et al. Identification of Nocardia species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(10):3366-3369.
- [31] Toyokawa M, Kimura K, Nishi I, et al. Reliable and reproducible method for rapid identification of Nocardia species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Rinsho Biseibutshu Hinsoku Shindan Kenkyukai Shi, 2013, 24(1):1-8.
- [32] Verroken A, Janssens M, Berhin C, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of Nocardia species[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11):4015-4021.
- [33] 王鹏, 隗明, 杨春霞, 等. VITEK MALDI-TOF MS 技术在临床分离诺卡菌快速鉴定中的简易流程优化[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(11):989-995.

【收稿日期】 2022-01-11 【修回日期】 2022-03-19