

- Clin Chim Acta, 2019, 495: 646-651.
- [13] 王美玲, 董玉婷, 叶晓峰, 等. 双氢睾酮对大鼠原代卵泡颗粒细胞抗苗勒管激素表达的影响[J]. 解剖学报, 2020, 51(3): 367-372.
- [14] 沈浩玥, 韩乐, 包文秀, 等. 线粒体异常与卵巢储备功能减退的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(8): 1161-1165.
- [15] Zhang J, Liu Y, Yao W, et al. Initiation of follicular atresia: gene networks during early atresia in pig ovaries [J]. Reproduction, 2018, 156(1): 23-33.
- [16] Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(3): 195-203.
- Zhang J, Li L, Peng Y, et al. Surface chemistry induces mitochondria-mediated apoptosis of breast cancer cells via PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018, 1865(1): 172-185.
- Chen Q, Xu H, Xu A, et al. Inhibition of Bcl-2 sensitizes mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in ischemia-damaged mitochondria [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118834.
- Liu H, Wang J, Tao Y, et al. Curcumol inhibits colorectal cancer proliferation by targeting miR-21 and modulated PTEN/PI3K/Akt pathways [J]. Life Sci, 2019, 221: 354-361.

基于 SIRT3/AMPK 通路探讨齐墩果酸对病毒性心肌炎小鼠炎症及纤维化损伤的影响

杨丽霞, 徐丹桂, 陈琦, 黎明*

(三峡大学第三临床医学院·国药葛洲坝中心医院儿科, 湖北 宜昌 443000)

摘要: 目的 探究齐墩果酸对病毒性心肌炎 (VMC) 小鼠炎症及纤维化损伤的影响。方法 采用腹腔注射柯萨奇 B3 病毒 (CVB3) 构建 VMC 小鼠模型, 并随机分为模型组、齐墩果酸组、SIRT3 抑制剂 (3-TYP) 组、齐墩果酸+3-TYP 组, 每组 15 只; 另取 15 只小鼠作为正常组, 各组给予相应药物处理 7 d。采用超声心动图检测心功能, ELISA 法检测血清心肌损伤标志物 [肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌钙蛋白 (cTnI)]、炎症因子 [白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)] 水平, 流式细胞术检测外周血辅助性 T 细胞 17 (Th17) / 调节性 T 细胞 (Treg) 比例以评价免疫功能, HE、Masson 及 TUNEL 染色观察心肌组织炎症、纤维化、凋亡等病理损伤, 免疫荧光法、免疫组化法分别检测心肌组织 SIRT3、转化生长因子- β (TGF- β) 阳性表达, 蛋白印迹法检测 SIRT3/AMPK 通路及下游相关蛋白表达。结果 与正常组比较, 模型组小鼠饮食减少, 委靡、耸毛、弓背蜷缩行为增多, 出现死亡, 心肌细胞病理损伤严重, 心率、左心室射血分数、心肌组织 SIRT3 阳性表达、SIRT3、p-AMPK/AMPK 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径、血清 CK-MB、cTnI、IL-1 β 、IL-6 水平、外周血 Th17/Treg 比例、心肌胶原容积分数、心肌细胞凋亡率、TGF- β 阳性表达、p-NF- κ B/NF- κ B、Bax、TGF- β 、p-Smad3/Smad3、 α -SMA、FN 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 齐墩果酸可缓解小鼠 VMC 病理症状, 上调 SIRT3/AMPK 通路相关蛋白表达 ($P<0.05$), 下调其介导的炎症、凋亡、纤维化反应 ($P<0.05$), 而 3-TYP 可逆转齐墩果酸的上述作用 ($P<0.05$)。结论 齐墩果酸可能通过激活 SIRT3/AMPK 通路, 抑制 CVB3 感染引起的 VMC 小鼠心肌组织炎症、凋亡及纤维化反应, 从而改善 VMC 小鼠心功能。

关键词: 齐墩果酸; 病毒性心肌炎; 心肌损伤; 炎症; 凋亡; 纤维化; SIRT3/AMPK 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)07-2389-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.045

收稿日期: 2023-02-22

基金项目: 湖北省卫生计生委中医药、中西医结合科研指导性项目 (鄂卫生计生通〔2017〕20 号-7)

作者简介: 杨丽霞 (1987—), 女, 主治医师, 从事小儿心血管疾病研究。Tel: 15926957506, E-mail: yangliax649@163.com

*通信作者: 黎明 (1980—), 女, 硕士, 副主任医师, 从事小儿心血管疾病研究。Tel: 13872452564, E-mail: 2814908325@qq.com

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 是由肠道病毒, 特别是柯萨奇病毒 B3 (Coxsackievirus B3, CVB3) 感染引起的心肌实质性病变^[1], 一方面可直接破坏心肌细胞, 持续凋亡的心肌细胞是导致胞外基质沉积及纤维化转变的关键因素之一; 另一方面 CVB3 攻击机体免疫系统, 引起大量释放的免疫炎性因子, 也是直接导致心肌细胞损伤及纤维化发展的关键原因^[2]。沉默信息调节因子 (silent information regulator, SIRT) 家族中的 1~7 均可在细菌感染过程中转位至细胞核, 参与细菌对宿主细胞的感染^[3], 且 SIRT3 活化可调控相关基因转录, 在心肌损伤过程中发挥抗炎、抗凋亡等保护作用^[4]。另外, 活化的 SIRT3 也可反过来促进腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 磷酸化活化, 抑制纤维化转导通路如转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) /Smad3 通路活化来发挥抗心、肾、肝等器官纤维化损伤^[5], 提示 SIRT3/AMPK 通路也可能是 VMC 心脏炎性及纤维化损伤的潜在调控通路。

齐墩果酸是熊果酸的同分异构体, 为五环三萜酸类化合物, 具有抗病毒、抗炎、抗感染等多种药理活性^[6], 可在自身免疫性心肌炎、心脏移植排异反应等过程发挥心脏保护作用^[7], 且对肝、肾、肺等器官纤维化损伤有改善活性^[8], 但是否对 CVB3 感染引起的心肌炎症及纤维化损伤有缓解作用尚未见报道。本研究建立小鼠 VMC 模型, 从 SIRT3/AMPK 通路介导的抗炎及抗纤维化方面进行探究, 以期为相关治疗及齐墩果酸的开发利用提供可靠资料。

1 材料

1.1 动物和病毒 BALB/c 小鼠, 雄性, 清洁级, 4~6 周龄, 体质量 16~18 g, 购自海南药物研究所有限责任公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (琼) 2020-0007]。研究经医院伦理委员会批准 (伦理号 2022 伦审 034 号), 符合 3R 原则。CVB3 悬液 (批号 SL30171, 由中国科学院武汉病毒研究所提供)。

1.2 试剂与药物 齐墩果酸对照品 (纯度 99.9%, 批号 SND-456, 滁州仕诺达生物科技有限公司)。SIRT3 抑制剂 (3-TYP) (批号 6013-01-2, 上海西格生物科技有限公司); 肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、肌钙蛋白 (cTnI)、白细胞介素-1β (IL-1β)、白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 试剂盒、山羊抗兔二抗 (批号 SND-M192、E04400、YK-10490、ZC-37988、SN-25917, 上海苗彩生物科技有限公司); FITC 标记的 CD4 (FITC⁺ CD4)、PE 标记的叉头框蛋白 P3 (PE⁺ Foxp3)、PE 标记的白细胞介素-17 (PE⁺ IL-17) 抗体、蛋白提取试剂盒 (批号 JG-M192、JG-K1117、JG-K1902、JG-H5027, 上海将来实业股份有限公司); HE、Masson、TUNEL 染色试剂盒 (批号 YT8310、YT8007、YT6013, 北京伊塔生物科技有限公司); SIRT3、AMPK、磷酸化 AMPK (p-AMPK)、核因子-κB (NF-κB)、磷酸化 NF-κB (p-NF-κB)、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白 (Bax)、TGF-β、Smad3、磷酸化 Smad3 (p-Smad3)、α-平滑肌肌动蛋白 (α-

SMA)、纤维连接蛋白 (FN)、β-肌动蛋白 (β-actin) 一抗 (批号 ab215715、ab264041、ab239882、ab182733、ab40854、ab25903、ab208182、ab2413、ab80167、ab90172、ab93144、ab80113, 英国 Abcam 公司)。

1.3 仪器 DU8-M6 型彩色多普勒超声仪 (徐州市瑞华电子科技有限公司); M200 型酶标仪、CHEMUNEX 型流式细胞仪、ZLDF-KY5 型显微镜 (江苏万科科教仪器有限公司); MAGICL6000 型化学发光仪 (北京华兴科仪科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 参照文献 [9] 报道, 小鼠腹腔接种 200 μL 100 TCID₅₀ 的 CVB3 病毒液, 1 周后随机分成模型组、齐墩果酸组 (20 mg/kg)^[10]、3-TYP 组 (5 mg/kg)^[11]、齐墩果酸+3-TYP 组, 每组随机选 3 只, 取心肌组织行 HE 染色, 若存在大量炎性细胞或坏死性细胞, 表明 VMC 模型制备成功^[9]。各组均取 15 只小鼠进行后续实验; 另取 15 只腹腔注射等体积生理盐水, 作为正常组。

齐墩果酸组小鼠灌胃 20 mg/kg 齐墩果酸^[10], 同时腹腔注射 5 mg/kg 生理盐水; 3-TYP 组小鼠灌胃 20 mg/kg 生理盐水, 同时腹腔注射 5 mg/kg 3-TYP^[11]; 齐墩果酸+3-TYP 组小鼠灌胃 20 mg/kg 齐墩果酸, 同时腹腔注射 5 mg/kg 3-TYP; 正常组和模型组小鼠灌胃并腹腔注射生理盐水, 每天给药 1 次, 连续 7 d。给药期间, 观察大鼠死亡、饮食活动状况。

2.2 心功能指标检测 给药结束后, 采用超声心动图检测小鼠心率、左心室射血分数、左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径变化。

2.3 血清心肌损伤标志物 (CK-MB、cTnI)、炎症因子 (IL-1β、IL-6) 水平检测 小鼠麻醉后取腹主动脉血 3 mL, 分离血清, 采用 ELISA 试剂盒检测 CK-MB、cTnI、IL-1β、IL-6 水平。

2.4 免疫功能检测 取小鼠腹主动脉血 3 mL, 制备单细胞悬液, 依次滴加 FITC⁺ CD4、PE⁺ Foxp3、PE⁺ IL-17 抗体孵育, 采用流式细胞仪检测 CD4⁺ IL17⁺、CD4⁺ Foxp3 细胞比例, 评价 Th17/Treg 免疫功能平衡状态。

2.5 HE、Masson、TUNEL 染色观察心肌组织炎症、纤维化、凋亡 断头处死小鼠, 解剖取完整心脏, 分成两部分, 一部分置于 -80 ℃ 保存, 另一部分制成 20 μm 冰冻切片。取部分同一部位切片, 按 HE、Masson、TUNEL 染色液说明书方法染色, 于光镜下观察拍照。Masson 及 TUNEL 染色切片采用 Image pro plus 6.0 软件检测心肌胶原容积分数 [容积分数 = (蓝染的胶原纤维面积/切片总面积) × 100%] 及心肌细胞凋亡率 [凋亡率 = (棕色染色的心肌细胞/总细胞) × 100%]。

2.6 免疫荧光法检测心肌组织 SIRT3 阳性表达 取同一部位小鼠心脏冰冻切片, 经水化、透化、抗原修复处理后滴加 SIRT3 (1:500) 一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 滴加 TRITC 标记的山羊抗兔二抗 (1:200) 孵育 1 h, DAPI 核染显色,

荧光显微镜观察、拍照，通过Image J软件定量分析阳性染色的平均光密度值。

2.7 免疫组化法检测心肌组织TGF-β阳性表达 取同部位小鼠心脏冰冻切片，经水化、透化、抗原修复处理后滴加TGF-β（1:200）一抗，室温避光孵育4 h，滴加辣根过氧化酶标记的二抗（1:500），室温孵育1 h，DAB显色，苏木精复染后于显微镜下观察拍照，通过Image J软件定量分析阳性表达的平均光密度值。

2.8 蛋白印迹法检测SIRT3/AMPK通路及下游相关蛋白表达 取小鼠冰冻心肌组织约200 mg，4℃解冻后机械粉碎得匀浆液，蛋白提取试剂盒提取胞浆及胞核中蛋白，BCA法测定蛋白浓度，取80 μg进行电泳，转膜，加入兔源SIRT3（1:650）、AMPK（1:720）、p-AMPK（1:720）、NF-κB（1:500）、p-NF-κB（1:500）、Bax（1:900）、TGF-β（1:930）、Smad3（1:970）、p-Smad3（1:970）、α-SMA（1:1100）、FN（1:1500）、β-actin内参（1:2500）一抗，4℃孵育过夜，山羊抗兔二抗（1:2000）室温孵育2.5 h，增强化学发光法显色及化学发光仪显影曝光，通过Image J软件分析蛋白相对表达。

2.9 统计学分析 通过SPSS 24.0软件进行处理，计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用SNK-q检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学

意义。

3 结果

3.1 齐墩果酸对VMC小鼠死亡及行为活动的影响 正常组小鼠饮食、精神及行为活动正常，无死亡；模型组、齐墩果酸+3-TYP组小鼠饮食减少，萎靡、耸毛、弓背蜷缩行为增加，死亡5只，解剖后心脏呈白色点状病变；齐墩果酸组小鼠无死亡，饮食较模型组增加，且随着给药时间延长萎靡及蜷缩行为减少甚至消失；3-TYP组小鼠有8只死亡，解剖心脏呈条索状病变，饮食减少，毛发稀疏，蜷缩不动行为增多。

3.2 齐墩果酸对VMC小鼠心功能的影响 与正常组比较，模型组小鼠心率、左心室射血分数降低($P<0.05$)，左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径升高($P<0.05$)。与模型组比较，齐墩果酸组小鼠心率、左心室射血分数升高($P<0.05$)，左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径降低($P<0.05$)；3-TYP组小鼠心率、左心室射血分数降低($P<0.05$)，左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径有升高趋势，但差异无统计学意义($P>0.05$)。与齐墩果酸组比较，齐墩果酸+3-TYP组小鼠心率、左心室射血分数降低($P<0.05$)，左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径升高($P<0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠心率、左心室射血分数、左心室收缩末期内径、左心室舒张末期内径比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	心率/(次·min ⁻¹)	左心室射血分数/%	左心室收缩末期内径/mm	左心室舒张末期内径/mm
正常组	15	406.28±19.07	61.27±2.15	1.35±0.18	2.78±0.33
模型组	10	249.71±11.56 [*]	39.45±1.07 [*]	2.84±0.31 [*]	4.07±0.57 [*]
齐墩果酸组	15	368.35±20.21 [#]	50.08±2.27 [#]	2.07±0.25 [#]	3.38±0.45 [#]
3-TYP组	7	181.02±8.33 ^{#Δ}	27.24±1.05 ^{#Δ}	3.23±0.46 ^Δ	4.41±0.63 ^Δ
齐墩果酸+3-TYP组	10	251.69±10.67 ^Δ	40.96±1.16 ^Δ	2.81±0.33 ^Δ	4.08±0.54 ^Δ

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与齐墩果酸组比较，^Δ $P<0.05$ 。

3.3 齐墩果酸对VMC小鼠心肌损伤标志物、炎症因子水平的影响 与正常组比较，模型组小鼠血清CK-MB、cTnI、IL-1β、IL-6水平升高($P<0.05$)。与模型组比较，齐墩果酸组小鼠血清CK-MB、cTnI、IL-1β、IL-6水平降低

($P<0.05$)；3-TYP组小鼠血清CK-MB、cTnI、IL-1β、IL-6水平升高($P<0.05$)。与齐墩果酸组比较，齐墩果酸+3-TYP组小鼠血清CK-MB、cTnI、IL-1β、IL-6水平升高($P<0.05$)。见表2。

表2 各组小鼠心肌损伤标志物、炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	CK-MB/(U·L ⁻¹)	cTnI/(μg·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)
正常组	15	38.32±4.92	0.71±0.08	34.79±2.04	13.35±2.04
模型组	10	133.41±11.43 [*]	2.73±0.37 [*]	130.23±16.27 [*]	36.77±4.05 [*]
齐墩果酸组	15	66.12±6.08 [#]	1.18±0.19 [#]	59.64±5.69 [#]	19.46±2.81 [#]
3-TYP组	7	225.01±22.37 ^{#Δ}	3.65±0.51 ^{#Δ}	184.24±27.22 ^{#Δ}	47.64±6.56 ^{#Δ}
齐墩果酸+3-TYP组	10	135.58±12.07 ^Δ	2.70±0.33 ^Δ	132.82±16.85 ^Δ	35.25±4.08 ^Δ

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与齐墩果酸组比较，^Δ $P<0.05$ 。

3.4 齐墩果酸对VMC小鼠免疫功能的影响 正常组小鼠外周血Th17/Treg比例为0.42±0.05。与正常组比较，模型组小鼠外周血Th17/Treg比例升高($P<0.05$)，为1.03±0.16。与模型组比较，齐墩果酸组小鼠外周血Th17/Treg比例降低($P<0.05$)，为0.48±0.15；3-TYP组小鼠外周血Th17/Treg比例升高($P<0.05$)，为1.38±0.20。与齐墩果酸组比较，齐墩果酸+3-TYP组小鼠外周血Th17/Treg比例

升高($P<0.05$)，为1.05±0.14。见图1~2。

3.5 齐墩果酸对VMC小鼠心肌组织炎症、纤维化、凋亡的影响 HE染色可见，模型组小鼠心肌细胞胞浆疏松淡染，心肌横纹排列紊乱，钙化灶及空泡化形成较多，炎性浸润明显；Masson染色可见，模型组小鼠心肌组织胶原纤维蓝染较深；TUNEL染色可见，模型组小鼠凋亡细胞被染成棕黄色。正常组小鼠心肌组织结构正常，染色均匀，胶

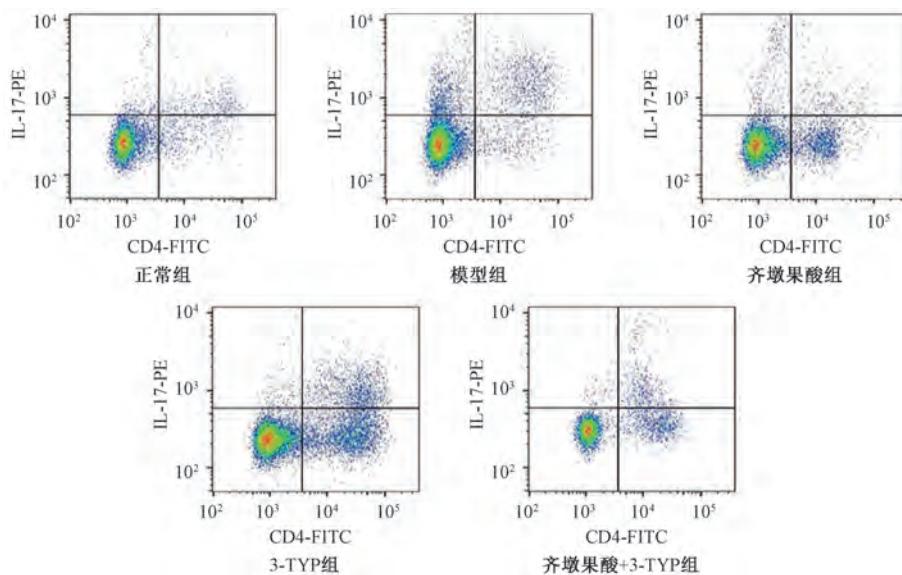


图1 Th17 细胞流式检测图

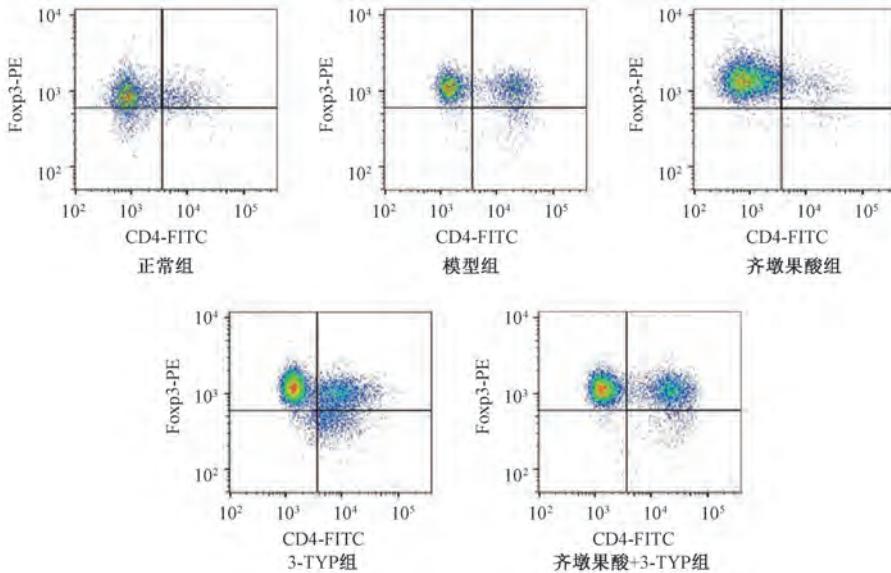


图2 Treg 细胞流式检测图

原纤维蓝染及凋亡细胞棕黄色染色较淡。与正常组比较，模型组小鼠心肌细胞坏死、空泡化及钙化灶形成较多，炎性细胞浸润明显，胶原纤维蓝染及凋亡细胞棕黄色染色加重，心肌胶原容积分数、心肌细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，齐墩果酸组小鼠心肌组织炎性浸润减少，几乎未见空泡化及钙化灶形成，胶原纤维蓝染及凋亡细胞棕黄色染色变浅，心肌胶原容积分数、心肌细胞凋亡率降低 ($P<0.05$)；3-TYP组小鼠心肌组织空泡化及钙化灶呈片状或条索状形成，胶原纤维蓝染及凋亡细胞棕黄色染色加重，心肌胶原容积分数、心肌细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。与齐墩果酸组比较，齐墩果酸+3-TYP组小鼠心肌组织空泡化及钙化灶形成较多，胶原纤维蓝染及凋亡细胞棕黄色染色加重，心肌胶原容积分数、心肌细胞凋亡率升高 ($P<0.05$)。见表3、图3。

表3 各组小鼠心肌胶原容积分数、细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	心肌胶原容积分数/%	凋亡率/%
正常组	15	1.90±0.12	6.00±0.66
模型组	10	5.09±0.55 [*]	29.78±2.36 [*]
齐墩果酸组	15	2.52±0.22 [#]	10.07±1.29 [#]
3-TYP组	7	6.95±0.67 ^{#Δ}	38.18±3.04 ^{#Δ}
齐墩果酸+3-TYP组	10	4.99±0.46 ^Δ	28.24±2.72 ^Δ

注：与正常组比较，^{*} $P<0.05$ ；与模型组比较，[#] $P<0.05$ ；与齐墩果酸组比较，^Δ $P<0.05$ 。

3.6 齐墩果酸对 VMC 小鼠心肌组织 SIRT3、TGF-β 阳性表达的影响 免疫荧光染色结果显示，SIRT3 阳性表达于心肌细胞胞核中；免疫组化染色结果显示，TGF-β 阳性表达于心肌细胞胞浆及间质细胞内。与正常组比较，模型组小鼠心肌组织 SIRT3 阳性表达降低 ($P<0.05$)，TGF-β 阳性

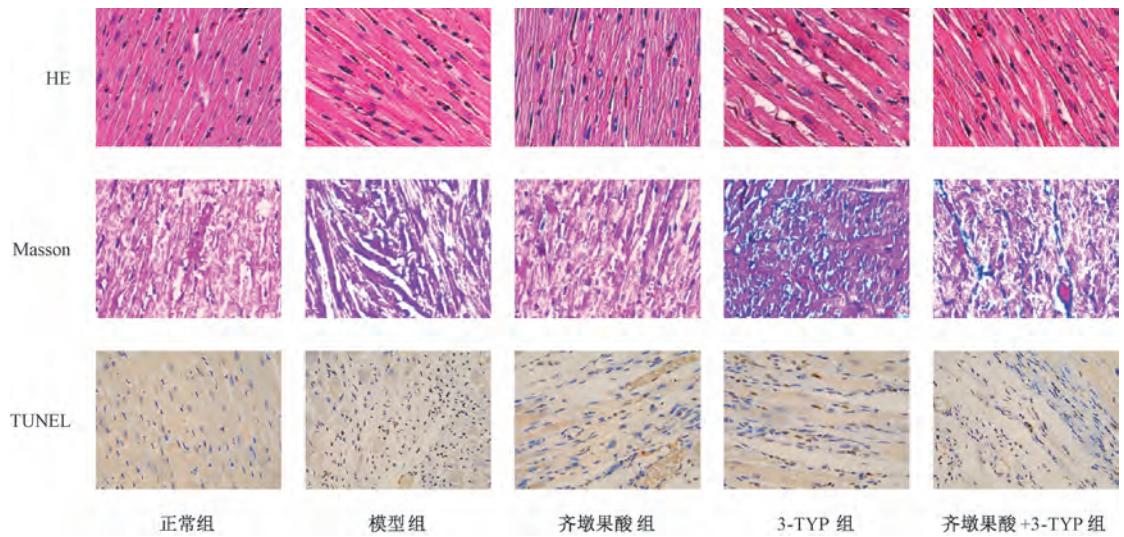


图3 各组小鼠心肌HE、Masson、TUNEL染色图(×200)

表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,齐墩果酸组小鼠心肌组织SIRT3阳性表达升高($P<0.05$),TGF- β 阳性表达降低($P<0.05$);3-TYP组小鼠SIRT3阳性表达降低($P<0.05$),TGF- β 阳性表达升高($P<0.05$)。与齐墩果酸组比较,齐墩果酸+3-TYP组小鼠心肌组织SIRT3阳性表达降低($P<0.05$),TGF- β 阳性表达升高($P<0.05$)。见图4~5、表4。

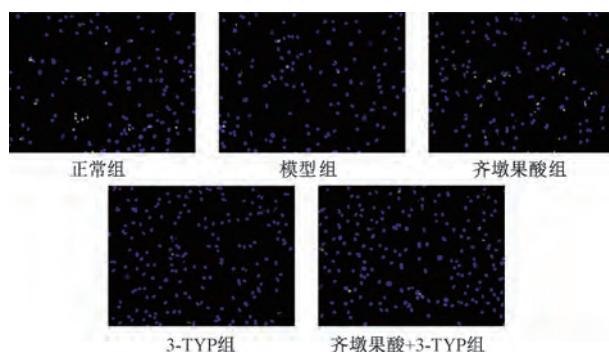


图4 各组小鼠心肌组织SIRT3免疫荧光染色图(×200)

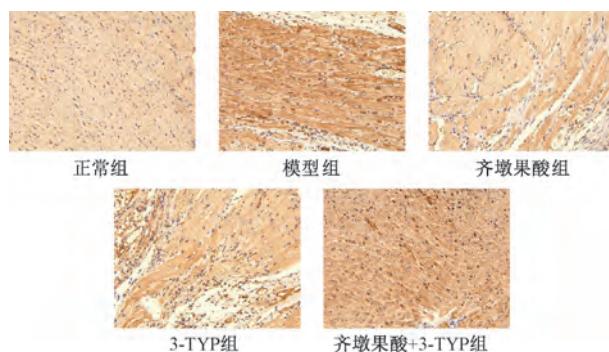


图5 各组小鼠心肌组织TGF-β免疫组化染色图(×200)

3.7 齐墩果酸对VMC小鼠心肌组织SIRT3/AMPK通路及下游炎症、凋亡蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠心肌组织SIRT3、p-AMPK/AMPK蛋白表达降低($P<$

表4 各组小鼠心肌组织SIRT3、TGF- β 阳性表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	SIRT3	TGF- β
正常组	15	1.26±0.10	0.36±0.03
模型组	10	0.33±0.04*	1.12±0.12*
齐墩果酸组	15	0.92±0.08#	0.61±0.05#
3-TYP组	7	0.11±0.01 [△]	1.59±0.17 [△]
齐墩果酸+3-TYP组	10	0.34±0.02 [△]	1.15±0.13 [△]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与齐墩果酸组比较,[△] $P<0.05$ 。

0.05),p-NF- κ B/NF- κ B、Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,齐墩果酸组小鼠SIRT3、p-AMPK/AMPK蛋白表达升高($P<0.05$),p-NF- κ B/NF- κ B、Bax蛋白表达降低($P<0.05$);3-TYP组小鼠心肌组织SIRT3、p-AMPK/AMPK蛋白表达降低($P<0.05$),p-NF- κ B/NF- κ B、Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。与齐墩果酸组比较,齐墩果酸+3-TYP组小鼠心肌组织SIRT3、p-AMPK/AMPK蛋白表达降低($P<0.05$),p-NF- κ B/NF- κ B、Bax蛋白表达升高($P<0.05$)。见表5、图6。

3.8 齐墩果酸对VMC小鼠心肌组织SIRT3/AMPK通路下游纤维化相关蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠心肌组织TGF- β 、p-Smad3/Smad3、 α -SMA、FN蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,齐墩果酸组小鼠心肌组织TGF- β 、p-Smad3/Smad3、 α -SMA、FN蛋白表达降低($P<0.05$);3-TYP组小鼠心肌组织TGF- β 、p-Smad3/Smad3、 α -SMA、FN蛋白表达升高($P<0.05$)。与齐墩果酸组比较,齐墩果酸+3-TYP组小鼠心肌组织TGF- β 、p-Smad3/Smad3、 α -SMA、FN蛋白表达升高($P<0.05$)。见图7、表6。

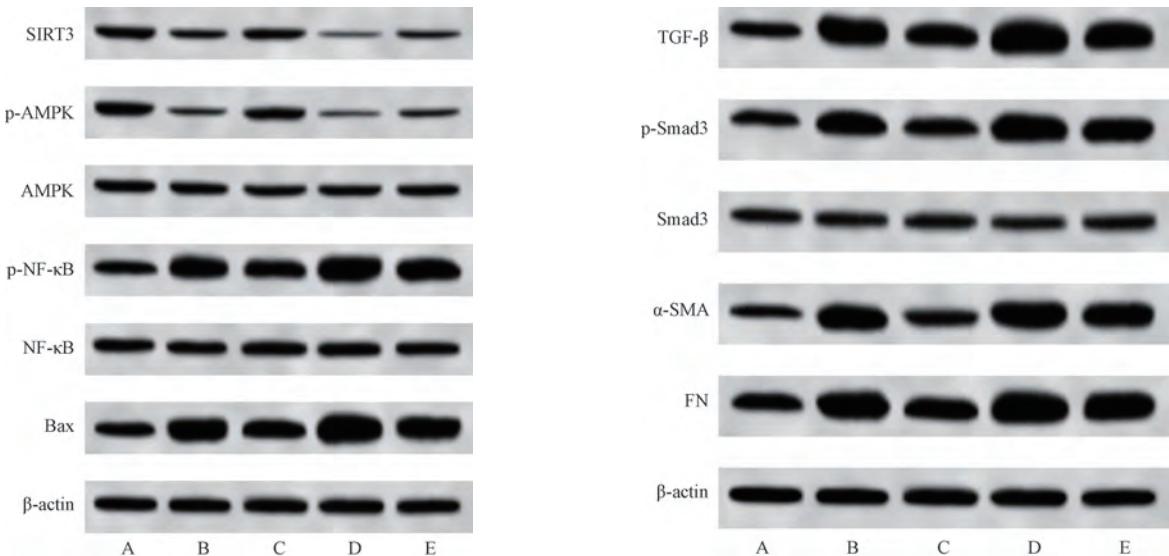
4 讨论

CVB3感染可直接攻击心肌细胞,导致心肌细胞损伤、心室壁僵硬、心功能受损,甚至心力衰竭而死亡^[1]。Pinkert等^[12]发现,VMC的主要病理表现是心肌细胞进行性

表5 各组小鼠心肌组织SIRT3、p-AMPK/AMPK、p-NF-κB/NF-κB、Bax蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	SIRT3/β-actin	p-AMPK/AMPK	p-NF-κB/NF-κB	Bax/β-actin
正常组	15	1.05±0.09	1.19±0.12	1.02±0.09	1.07±0.09
模型组	10	0.54±0.05*	0.44±0.04*	1.89±0.18*	1.73±0.16*
齐墩果酸组	15	0.91±0.09#	1.02±0.10#	1.37±0.13#	1.29±0.11#
3-TYP组	7	0.13±0.01 ^{#Δ}	0.16±0.03 ^{#Δ}	2.29±0.22 ^{#Δ}	2.38±0.22 ^{#Δ}
齐墩果酸+3-TYP组	10	0.58±0.05 ^Δ	0.47±0.04 ^Δ	1.85±0.19 ^Δ	1.70±0.16 ^Δ

注：与正常组比较，*P<0.05；与模型组比较，#P<0.05；与齐墩果酸组比较，^ΔP<0.05。



注：A为正常组，B为模型组，C为齐墩果酸组，D为3-TYP组，E为齐墩果酸+3-TYP组。

图6 各组小鼠心肌组织SIRT3、p-AMPK、AMPK、p-NF-κB、NF-κB、Bax蛋白印迹图

表6 各组小鼠心肌组织TGF-β、p-Smad3/Smad3、α-SMA、FN蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	TGF-β/β-actin	p-Smad3/Smad3	α-SMA/β-actin	FN/β-actin
正常组	15	1.04±0.10	1.07±0.08	0.99±0.09	1.05±0.11
模型组	10	1.84±0.18*	1.69±0.16*	1.57±0.15*	1.73±0.16*
齐墩果酸组	15	1.30±0.10#	1.27±0.11#	1.14±0.12#	1.31±0.10#
3-TYP组	7	2.39±0.21 ^{#Δ}	2.06±0.20 ^{#Δ}	1.97±0.18 ^{#Δ}	2.17±0.21 ^{#Δ}
齐墩果酸+3-TYP组	10	1.80±0.17 ^Δ	1.65±0.15 ^Δ	1.55±0.15 ^Δ	1.79±0.17 ^Δ

注：与正常组比较，*P<0.05；与模型组比较，#P<0.05；与齐墩果酸组比较，^ΔP<0.05。

坏死、心脏收缩、舒张功能改变等。本研究建立 CVB3 感染性 VMC 小鼠模型，发现小鼠出现死亡、心肌细胞坏死及凋亡等症状，心率、左心室射血分数降低，左心室收缩及舒张末期内径升高，等心功能损伤病理症状，提示造模成功。另外，CVB3 感染也可激活机体免疫效应细胞如反应性 T 细胞活化，释放免疫炎性因子，诱导炎症细胞如巨噬、中性粒细胞等向心脏浸润，导致心肌炎性反应的产生。本研究也发现，CVB3 感染的 VMC 小鼠外周血 Th17 细胞/Treg 细胞比例升高，炎性因子 IL-1 β 、IL-6 释放增加，炎性细胞浸润明显，进一步表明造模成功。齐墩果酸有抗炎、抗病毒、免疫调节、抗心肌损伤及凋亡作用^[13]，姜辉等^[14]体外实验发现，齐墩果酸对心肌细胞缺氧性损伤及凋亡有缓解作用；本研究发现，齐墩果酸干预后小鼠未死亡，心功能损伤病理症状缓解，心肌组织细胞损伤、凋亡、炎性浸润等病理损伤改善，外周血 Th17/Treg 比例趋于正常，炎性因子 IL-

注：A为正常组，B为模型组，C为齐墩果酸组，D为3-TYP组，E为齐墩果酸+3-TYP组。

图7 各组小鼠心肌组织TGF-β、p-Smad3、Smad3、α-SMA、FN蛋白印迹图

心肌纤维化也是 VMC 的主要病理表现。Sun 等^[15]发现，CVB3 感染后会刺激心脏成纤维细胞活化，分泌致纤维化因子 TGF-β 来加剧心脏纤维化。Liu 等^[16]发现，VMC 患者中 TGF-β 大量表达，是引起心肌细胞胶原蛋白沉积、纤维化因子 α-SMA 及 FN 表达升高、心脏纤维瘢痕形成的关键原因之一。本研究发现，模型组小鼠心肌组织胶原容积分数增加，TGF-β 致纤维化因子、纤维化因子 α-SMA 及 FN 表达均升高，提示 VMC 小鼠心肌组织出现纤维化损伤；齐墩果酸干预后小鼠致纤维化因子 TGF-β、纤维化因子 α-SMA、FN 表达均降低，心肌组织中胶原容积分数减少，提示齐墩果酸也可抗 VMC 小鼠心肌组织纤维化损伤。

SIRT3 是机体抗感染、抗炎、抗凋亡、抗纤维化的关键因子之一，其缺乏可影响免疫细胞发育和抗微生物宿主防

御系统^[17-18]，活化诱导 AMPK 磷酸化活化，直接或间接抑制 TGF-β/Smad3 纤维化活化通路激活，抑制脏器组织纤维化沉积及发展^[19-20]。本研究在 VMC 小鼠心肌组织中也检测到 SIRT3 表达的升高，以及炎症因子 NF-κB、凋亡因子 Bax、纤维化相关 AMPK-TGF-β/Smad3 等通路蛋白表达的异常升高，推测 CVB3 感染在引起心肌组织凋亡、炎症、纤维化激活的同时，也可能刺激 SIRT3 活化来发挥机体保护作用，可能 SIRT3 活化不足以对抗 CVB3 感染引起心肌组织凋亡、炎症、纤维化损伤。SIRT3 特异性抑制剂 3-TYP 抑制 SIRT3 表达后，VMC 小鼠心肌组织 NF-κB、Bax、TGF-β/Smad3 等通路蛋白表达进一步升高，小鼠死亡情况及心肌组织损伤进一步加重，证实了上述猜测。本研究发现，齐墩果酸组小鼠心肌组织 NF-κB、Bax、TGF-β/Smad3 反应减弱的同时，SIRT3 及 AMPK 通路进一步活化，提示齐墩果酸抗 VMC 小鼠心肌炎症、凋亡、纤维化损伤作用，可能与促进 SIRT3 及 AMPK 通路活化有关，而 3-TYP 可逆转齐墩果酸的上述作用。

综上所述，齐墩果酸可能通过激活 SIRT3/AMPK 通路，抑制 CVB3 感染引起的心肌组织炎症、凋亡及纤维化反应，从而改善 VMC 小鼠死亡情况。但病毒感染引起的心肌组织损伤及纤维化反应复杂，且靶点较多，SIRT3 干预病毒感染宿主的机制还不明确，齐墩果酸抗 CVB3 感染、治疗 VMC 的其他机制还有待深入研究。

参考文献：

- [1] Xue Y, Ke J, Zhou X, et al. Knockdown of LncRNA MALAT1 alleviates Coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis in mice via inhibiting Th17 cells differentiation [J]. *Inflammation*, 2022, 45(3): 1186-1198.
- [2] 万娇娇. 病毒性心肌炎免疫机制研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, 2020, 47(1): 26-29.
- [3] Thangaraj A, Chivero E T, Tripathi A, et al. HIV TAT-mediated microglial senescence: Role of SIRT3-dependent mitochondrial oxidative stress [J]. *Redox Biol*, 2021, 40(1): 1018-1043.
- [4] Jafari-Azad A, Hosseini L, Rajabi M, et al. Nicotinamide mononucleotide and melatonin counteract myocardial ischemia-reperfusion injury by activating SIRT3/FOXO1 and reducing apoptosis in aged male rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(4): 3089-3096.
- [5] Jiang Y X, Li W, Wang J, et al. Cardiac dysfunction is attenuated by ginkgolide B via reducing oxidative stress and fibrosis in diabetic rats [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(8): 1078-1084.
- [6] 柳岳超, 李洪亮, 曾小华, 等. 三叶木通藤茎的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(3): 99-106.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 熊果酸和齐墩果酸对心脏保护作用的研究进展 [J]. 抗感染药学, 2016, 13(3): 489-493.
- [8] 李美唯, 卢 婷, 赵建云, 等. 齐墩果酸和熊果酸的测定方法与药理作用研究进展 [J]. 青海草业, 2020, 29(4): 58-63.
- [9] 王芳娟, 龙雪蛟, 胡巨龙. 鸢尾素 irisin 对病毒性心肌炎小鼠的免疫调节作用 [J]. 免疫学杂志, 2021, 37(8): 652-658.
- [10] 王 宇, 冯世兵, 宋素贞, 等. 齐墩果酸在小鼠酒精性肝纤维化中的作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(18): 4485-4488.
- [11] 任以行, 冷玉芳, 郭名君, 等. SIRT3 在右美托咪定减轻小鼠肠缺血再灌注损伤中的作用及机制 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, 27(3): 253-259.
- [12] Pinkert S, Dieringer B, Klopflleisch R, et al. Early treatment of Coxsackievirus B3-infected animals with soluble Coxsackievirus-Adenovirus receptor inhibits development of chronic Coxsackievirus B3 cardiomyopathy [J]. *Circ Heart Fail*, 2019, 12(11): 5250-5260.
- [13] 张传涛, 廖婷婷, 黄 群, 等. 清热利湿活血方对 HBV 转基因小鼠的抗病毒作用及对 TKB1-IRF3 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(3): 490-495.
- [14] 姜 辉, 刘 涛, 杨忠路, 等. 齐墩果酸对大鼠心肌细胞缺氧后生物学功能的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2020, 49(3): 230-233; 268.
- [15] Sun C, Zhang X, Yu Y, et al. CARD9 mediates T cell inflammatory response in Coxsackievirus B3-induced acute myocarditis [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2020, 49(1): 1072-1081.
- [16] Liu K, Wang J, Gao X, et al. C1q/TNF-related protein 9 inhibits Coxsackievirus B3-induced injury in cardiomyocytes through NF-κB and TGF-β1/Smad2/3 by modulating THBS1 [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 19(1): 2540-2568.
- [17] Smulan L J, Martinez N, Kiritsy M C, et al. Sirtuin 3 downregulation in mycobacterium tuberculosis-infected macrophages reprograms mitochondrial metabolism and promotes cell death [J]. *mBio*, 2021, 12(1): 3140-3160.
- [18] Lv D, Luo M, Yan J, et al. Protective effect of sirtuin 3 on CLP-induced endothelial dysfunction of early sepsis by inhibiting NF-κB and NLRP3 signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2021, 26(1): 1053-1057.
- [19] Zou J, Li C, Jiang S, et al. AMPK inhibits Smad3-mediated autoinduction of TGF-β1 in gastric cancer cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(6): 2806-2815.
- [20] Ren H, Shao Y, Wu C, et al. VASH-1 regulates oxidative stress and fibrosis in diabetic kidney disease via SIRT1/HIF1α and TGFβ1/Smad3 signaling pathways [J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7(1): 137-148.