

抗心律失常肽对抗柯萨奇 B3 病毒的体外研究*

伍琼, 盛蕾[△], 洪李锋(湖北省武汉市第五医院心血管内科/武汉大学广慈医院心血管内科/江汉大学心血管研究所 430050)

【摘要】目的 观察抗心律失常肽(AAP10)对柯萨奇 B3 病毒(CVB3)感染的原代小鼠心肌细胞的保护作用。**方法** 将 BALB/C 小鼠原代心肌细胞分为 7 组, 每组 12 孔, 分别为细胞对照组, 病毒对照组, 药物干预组(A 组、B 组、C 组、D 组、E 组)。用不同浓度的 AAP10 培养液干预 100 TCID₅₀ CVB3 感染的心肌细胞, 对比每组的细胞活性。**结果** 药物干预组细胞活性高于病毒对照组($F=7.489, P<0.05$)。其细胞活性与药物浓度($r=0.942, P=0.005$)及作用时间($r=0.993, P<0.05$)均呈正相关。**结论** AAP10 具有明显的抗病毒活性, 呈剂量时间相关性, 对 CVB3 感染的心肌细胞有保护作用。

【关键词】 抗心律失常肽; 柯萨奇 B3 病毒; 原代心肌细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)08-1056-03

The vitro study of anti-arrhythmic peptide against coxsackie B3 virus* WU Qiong, SHENG Lei[△], HONG Li-feng (Department of Cardiology, the Fifth Hospital of Wuhan City/Department of Cardiology, Mercy Hospital of Wuhan University/Institute of Cardiovascular Sciences of Jiangnan University, Wuhan 430050, China)

【Abstract】Objective To observe the anti-arrhythmic peptide 10(AAP10) against coxsackie virus B3 (CVB3) damage to the generation of myocardial cells in mice. **Methods** BALB/C mice primary myocardial cells can be divided into 7 groups, each group of 12 holes; the cell control group, the virus control group, and drug intervention group (five different concentrations). Myocardial cells of 100 TCID₅₀ CVB3 were intervened with different concentrations of AAP10. Cell damage degree among each group were contrasted. **Results** Myocardial activity has a positive correlation with the drug concentration ($r=0.942, P=0.005, r^2=0.888$) and action time ($r=0.993, P<0.05$). Myocardial activity in intervention group is significantly higher than virus control group ($F=7.489, P<0.05$). **Conclusion** AAP10 has obvious antiviral activity in vitro, which has a correlation with drug and action time. AAP10 can protect myocardial cell infected by CVB3 in vitro.

【Key words】 anti-arrhythmic peptide; coxsackie virus B3; primary cardiac myocyte

抗心律失常肽(AAP10)是人们最早从牛心房肌中分离提取的由 6 个氨基酸组成的物质, 经人工合成为具有生物活性的小分子内分泌激素即 AAP10, 它可以通过调节细胞间的缝隙连接通道, 介导第二信使物质, 影响心肌组织的分化、心肌细胞的生长和凋亡, 同时具有抗心律失常、抗栓, 改善心肌缺血, 预防心肌病及心力衰竭的作用^[1]。临床上病毒性心肌炎是以柯萨奇病毒(A 组和 B 组)、腺病毒、巨细胞病毒、脊髓灰质炎病毒和流感病毒较常见。临床观察到 SARS 冠状病毒和最近流行的甲型 H1N1 新型病毒也可致病毒性心肌炎, 心肌炎呈现急性或慢性过程。轻可无症状, 重至弥漫性心肌炎引起爆发性、致命性、充血性心力衰竭及严重的恶性心律失常^[2]。本研究通过建立柯萨奇 B3 病毒(CVB3)感染所致的心肌细胞损伤体外模型, 观察 AAP10 抗病毒活性, 为临床治疗病毒性心肌炎提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 二氧化碳细胞培养箱(MODEL2300 SHELAB, 美国); 倒置显微镜(NikonT300, 日本); 台式高速离心机(TGL-16C, 上海安亭科学仪器厂); 酶联免疫检测仪(北京元业伯乐科技发展有限公司); 电热恒温水浴锅(北京市医疗设

备厂); 生物安全柜(Costar 公司, 美国); 电子天平(上海精密科学仪器公司天平仪器厂)等。胰蛋白酶(HyClone 公司); MEM 营养液, 含 10% 的胎牛血清、谷氨酰胺 2 mmol/L、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL (HyClone 公司); 台盼蓝(Sigma 公司); AAP10(产品号: 809838, 杭州中肽生化有限公司)。

1.2 实验病毒 CVB3(武汉大学病毒研究所)经人宫颈癌细胞(Hela 细胞, CTCC 提供)培养扩增后, 用 Read-Much 公式计算 TCID₅₀ 为: $10^{-3.8}/0.1$ mL, 小量分装在一 80 °C 低温冰箱保存备用。

1.3 实验细胞 原代小鼠心肌细胞(江阴齐氏生物科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 AAP10 对 CVB3 的抑制作用 单层培养好的原代小鼠心肌细胞分为 3 组, 细胞对照组、病毒对照组、药物干预组, 每组 12 孔。其中药物干预组根据浓度梯度分为: A 组、B 组、C 组、D 组、E 组。96 孔板中每孔加入 5×10^4 的小鼠原代心肌细胞, 培养 48 h, 细胞长成单层后, 除细胞对照组外, 其余各组均给予 0.1 mL/孔含 100 TCID₅₀ 的 CVB3 病毒维持液, 干预组分别再给予 0.1 mL/孔的含 5、10、15、20、25 μg/mL 浓度的

* 基金项目: 湖北省武汉市汉阳区科学技术局计划项目[阳科(2011)11 号]。

作者简介: 伍琼, 女, 主治医师, 硕士, 主要从事心脏病毒学及分子生物学方面的研究。

[△] 通讯作者, E-mail: 309325285@qq.com。

AAP10 维持液,置 5%CO₂ 37 ℃ 培养箱继续培养。

1.4.2 心肌细胞搏动频率、存活率及病毒抑制率的测定 在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状态。用四氮唑盐(MTT)法测各孔在 570 nm 波长下第 6、12、18、24、30、36、42、48 小时的吸光度,即 A 值,观察细胞活性与时间的相关性。按下述公式计算第 24 小时的细胞存活率及病毒抑制率,随机计数自发搏动频率。细胞存活率(%)=(药物组 A 值/对照组 A 值)×100%,病毒抑制率(%)=(药物处理组平均 A 值-病毒对照组平均 A 值)/(正常对照组平均 A 值-病毒对照组平均 A 值)×100%^[3]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布采用方差分析及两两比较,两变量相关关系采用一元线性相关回归分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 AAP10 干预后心肌细胞形态观察 干预后观察到第 24 小时,病毒对照组细胞损伤坏死明显,圆缩脱落,大部分漂浮在培养液中,药物干预组细胞可保持部分贴壁生长,药物浓度较高组,细胞形态相对完整,搏动相对有力,频率较快,随时间推移,到第 36~48 小时,细胞生长状态逐渐稳定,无进一步损伤坏死。

2.2 心肌细胞活性、搏动频率、存活率及病毒抑制率的测定 药物干预 24 h 后 B、C、D、E 组心肌细胞活性、搏动频率、D 及 E 组心肌细胞存活率以及病毒抑制率均与病毒对照组比较,差异有统计学意义,见表 1。

表 1 干预后第 24 小时各组心肌细胞情况比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	MTT A 值	搏动频率(次/min)	细胞存活(%)	病毒抑制(%)
细胞对照组	0.650±0.072	112.250±10.607	100	100
病毒对照组	0.390±0.106	59.630±5.012	59.600±0.126	0
药物干预组				
A 组(5 μg/mL)	0.510±0.109	67.250±7.382	79.000±0.176	46.000±0.460
B 组(10 μg/mL)	0.566±0.129*	71.750±4.803*	87.900±0.218	70.000±0.530
C 组(15 μg/mL)	0.572±0.100*	75.380±5.125*	89.400±0.208	71.100±0.514
D 组(20 μg/mL)	0.632±0.065*	79.250±5.036*	97.600±0.082*	93.100±0.273*
E 组(25 μg/mL)	0.647±0.074*	84.750±2.053*	99.700±0.077*	98.100±0.246*
F	7.489	8.054	7.814	8.054
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与病毒对照组相比,* $P < 0.05$ 。

表 2 药物干预组心肌细胞活性与药物作用时间 线性相关回归分析			
组别	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i> ²
A 组	0.513	=0.193	—
B 组	0.913	=0.002	0.833
C 组	0.934	=0.001	0.871
D 组	0.993	<0.05	0.966
E 组	0.990	<0.05	0.980

注:—表示无数据。

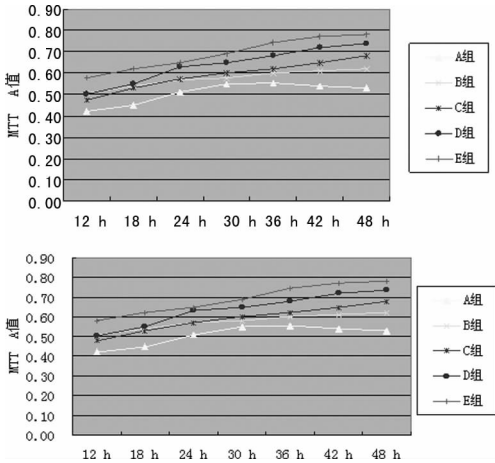


图 1 AAP10 作用时间细胞活性曲线

2.3 心肌细胞活性时间曲线、药物浓度曲线及相关关系 A 组细胞活性与时间无相关性($r = 0.513, P = 0.193$),当 AAP10

干预浓度较高(B、C、D、E 组)时,心肌细胞活性与药物作用时间呈线性正相关,见表 2、图 1;选取干预 24 h 观察心肌细胞活性与药物浓度的关系,发现两者呈正相关($r = 0.942, P = 0.005, r^2 = 0.888$),见图 2。

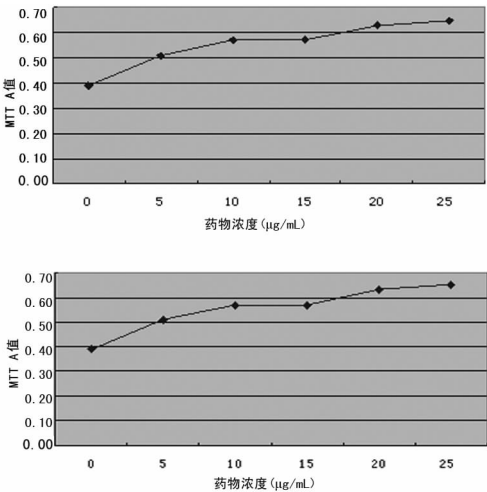


图 2 AAP10 作用 24 h 药物浓度细胞活性曲线

3 讨 论

CVB3 是最常见的引起病毒性心肌炎的微生物,病毒感染心肌细胞后,在心肌组织内复制引起的损伤以及同时介导自身免疫反应引起的免疫损伤是其主要发病机制^[3-4]。国外基础研究发现,40 岁以下有接近 20% 的患者死于 CVB3 感染所致的病毒性心肌炎。在这个过程中,TLR3-IFN β 介导的免

疫反应是主要的发病机制之一,蛋白酶激活受体则可通过增加及抑制效应来调节该受体的表达。临床上对该病较难确诊,心肌活检是目前惟一有效的方法,大多数患者难以接受,Omura 等^[5]通过生物信息研究分析病毒性心肌炎小鼠模型可能的检测指标来为临床提供信息。Schumm 等^[6]则首次将 1 例通过心肌活检确诊的急性病毒性心肌炎患者绘制 T1 图像,作为一种新的检测手段指导临床应用。在治疗方面,国外有研究通过开发诱导多功能干细胞移植术来治疗传染性的病毒性心肌炎,也有通过激活基质金属蛋白酶的表达来治疗该病^[7-8]。国内最新研究报道,通过注射特定的 DNA 疫苗来增强靶细胞免疫系统以及对抗病毒的保护能力进行治疗^[9]。

AAP10 作为一种人工合成的多肽,具有调节心肌细胞代谢,减轻坏死程度及延缓凋亡的作用,对于急性缺氧的乳鼠心肌细胞的体外研究中具有显著的心肌细胞保护作用。2009 年,有学者发现 AAP10 具有增强细胞间传导,抑制细胞间的解耦联,其作用部位是心肌细胞间浆膜下的缝隙连接蛋白 Cx43、Cx45,而非 Cx40。另有研究发现,AAP10 可通过增加缝隙连接蛋白的耦联作用来抵抗并预防抗心律失常药物引发的尖端流转型室速的发生^[10]。同时,Johnstone 等^[11]报道,AAP10 能用于治疗心律失常的机制主要是通过促使缝隙连接蛋白 Cx43 的表达来延长细胞有丝分裂及细胞周期,而并非是调节心肌细胞间闰盘的连接通道功能来完成这一过程。还有研究报道,在缺血再灌注的小鼠模型中 AAP10 缺血后处理可大大减少细胞间解耦联以及抑制室性心律失常的发生。而 2008 年发表在我国临床心血管病杂志上的 1 篇报道是基于兔肥厚型心肌病模型的建立上,发现 AAP10 可通过显著改善缝隙连接蛋白的分布来达到改善心肌细胞的重构,防止 Cx43 排列紊乱,从而降低心律失常的发生率。因此,大多数研究认为 AAP10 作为一种新型的抗心律失常药物可逐渐替代目前市场上已有的抗心律失常药物,避免其严重不良反应的发生,而且对于缺血性心肌病、慢性房颤所致的独特性的心肌损害有较为肯定的保护作用^[12]。少数研究也发现,Cx43 表达水平是冠状动脉闭塞后心肌梗死面积大小的一个关键因素,通过增强细胞间传导来降低心律失常发生的药物(如 AAP10)可能会增大心肌梗死的面积;而有报道,缝隙连接阻滞剂可以减少心肌梗死面积和心肌局部缺血性室性心律失常的发生,故在 AAP10 的研究及使用上值得进一步探讨。

病毒性心肌炎患者由于病毒感染或病毒感染后免疫反应引起的弥漫性或灶性心肌间质的炎性细胞浸润和邻近的心肌纤维坏死或退行性变,导致不同程度的心功能障碍^[13]。整个过程很有可能直接影响心肌细胞间的缝隙连接通道,并影响缝隙连接蛋白的正常表达及分布。从而推测 AAP10 作为一种心肌保护剂及缝隙连接蛋白激动剂,给予一定的干预后可明显保护心肌,减少损伤,促使细胞膜上缝隙连接蛋白的正常表达及分布,从而对抗病毒感染所致的心肌损害。本文通过建立 CVB3 感染小鼠原代心肌细胞的模型,来观察给予 AAP10 药物之后心肌细胞的改变,发现 AAP10 药物干预组的心肌细胞受 CVB3 的损害明显减少,其减轻程度与药物浓度及作用时间呈正相关。体外研究中达到 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上的 AAP10 作用 24 h 后开始体现出抗病毒活性,而 20 $\mu\text{g/mL}$ 的 AAP10 作用 24 h 后就可明显增加细胞存活率及病毒抑制率。因此,AAP10 有明确的抵抗 CVB3 对心肌细胞造成的损害过程,这对于 AAP10 的药理学及毒理学的研究具有参考价值,并对将来应

用于临床上病毒性心肌炎的治疗提供理论基础。

参考文献

- [1] 陈孝丽. 病毒性心肌炎诊治新进展[J]. 中外健康文摘, 2013,10(28):7-9.
- [2] 许茸茸,李应东,刘凯,等. 当归红芪超滤膜提取物对阿霉素致心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013,19(15):232-236.
- [3] Zhang YY, Li JN, Xia HH, et al. Protective effects of losartan in mice with chronic viral myocarditis induced by coxsackievirus B3[J]. Life Sci, 2013, 92(24/26): 1186-1194.
- [4] Kong Q, Wu W, Yang F, et al. Increased expressions of IL-22 and Th22 cells in the coxsackievirus B3-Induced mice acute viral myocarditis[J]. Virol J, 2012, 9(10):232-235.
- [5] Omura S, Kawai E, Sato F, et al. Bioinformatics multivariate analysis determined a set of phase-specific biomarker candidates in a novel mouse model for viral myocarditis[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2014, 7(4):444-454.
- [6] Schumm J, Greulich S, Sechtem U, et al. T1 mapping as new diagnostic technique in a case of acute onset of biopsy-proven viral myocarditis[J]. Clin Res Cardiol, 2014, 103(5):405-408.
- [7] Sinnecker D, Laugwitz KL, Moretti A. Extending human induced pluripotent stem cell technology to infectious diseases: new model for viral myocarditis[J]. Circ Res, 2014, 115(6):537-539.
- [8] Hendry RG, Bilawchuk LM, Marchant DJ. Targeting matrix metalloproteinase activity and expression for the treatment of viral myocarditis[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2014, 7(2):212-215.
- [9] Ye T, Yue Y, Fan X, et al. M cell-targeting strategy facilitates mucosal immune response and enhances protection against CVB3-induced viral myocarditis elicited by chitosan-DNA vaccine[J]. Vaccine, 2014, 32(35): 4457-4465.
- [10] Ruan L, Quan X, Li L, et al. Increasing gap junction coupling suppresses ibutilide-induced torsades de pointes[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(5): 1279-1284.
- [11] Johnstone SR, Best AK, Wright CS, et al. Enhanced connexin 43 expression delays intra-mitotic duration and cell cycle traverse independently of gap junction channel function[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(3):772-782.
- [12] Dhein S, Hagen A, Jozwiak J, et al. Improving cardiac gap junction communication as a new antiarrhythmic mechanism: the action of antiarrhythmic peptides[J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2010, 381(3):221-234.
- [13] 陈元元,范晓晨. 自身免疫机制在病毒性心肌炎中的作用[J]. 安徽医学, 2014, 35(5):704-706.