

Hydrogen Sulfide Confers Cardioprotection through Anti-Apoptotic Effect in Acute Viral Myocarditis

Cuiping Yang*, Fei Zhong, Shuangjie Li, Zuo Wang

College of Medical, Jishou University, Jishou Hunan
Email: *1045107754@qq.com

Received: May 10th, 2016; accepted: May 27th, 2016; published: May 30th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To explore the cardiomyocytes anti-apoptosis effect of Hydrogen Sulfide (H₂S) on CVB3-induced Acute Viral Myocarditis (AVMC) Balb/c mice. **Methods:** 50 male 4 - 5-week-old Balb/c mice were randomly divided into three groups, including group N (control group, n = 10), group C (CVB3 virus control group, n = 20), and group H (NaHS treatment group, n = 20). Mice in groups C and H were repeatedly inoculated with 0.2 mL 1640 medium containing Coxsackie Virus B3 (CVB3) to build VMC model; at the same time, mice in group H were intraperitoneally injected with 50 mol/kg NaHS; and mice in group H were received intraperitoneal injection of the same amount of normal saline, 1 time/d, for 7 consecutive days. We observed and recorded the symptoms and the survival situation of mice in each group within 7 days, counted the number of live mice at different time points and did analysis about survival rate of each group. We removed dead mice's hearts after 7 days, weighed them, calculated the HM/BM, observed the pathology change of myocardial cells, calculated myocardial histopathologic score through HE staining, and detected the myocardial apoptosis by TUNEL, and the expression of p53, Bax, Bcl-2, caspase-3 related to apoptotic by Western Blot. **Results:** Compared with group N, the expression of p53 protein, and Bax protein in group C significantly increased; the expression of caspase-3 protein activity significantly increased; the expression of Bcl-2 protein reduced (p < 0.05). After injecting NaHS to group H, compared with group C, the expression of p53 protein reduced; the expression of Bax protein reduced; the expression of Bcl-2 protein was significantly higher than group C; the expression of caspase-3 protein activity significantly reduced (p < 0.05). **Conclusion:** These observations suggest that NaHS confers cardioprotection through increasing the survival rate of mice, reducing myocardial pathological scores and myocardial cell apoptosis, and regulating the apoptosis-related proteins p53, Bax, Bcl-2, caspase-3, and inhibition of cardiomyocyte apoptosis effect in acute viral myocarditis.

*通讯作者。

Keywords

Hydrogen Sulfide, Acute Viral Myocarditis, Apoptosis

硫化氢对急性病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡的保护作用

杨翠平*, 钟 飞, 李双杰, 王 佐

吉首大学医学院, 湖南 吉首

Email: *1045107754@qq.com

收稿日期: 2016年5月10日; 录用日期: 2016年5月27日; 发布日期: 2016年5月30日

摘 要

目的: 探讨硫化氢(H_2S)对CVB₃诱导的急性病毒性心肌炎(Acute Viral Myocarditis, AVMC) Balb/c小鼠心肌细胞抗凋亡的保护作用。方法: 将50只4周龄雄性Balb/c小鼠随机分为正常对照组(N组)、病毒感染组(C组)、硫化氢治疗组(H组), C、H组小鼠腹腔反复接种0.2 mL内含柯萨奇病毒B3(CVB₃)的1640培养液建立VMC模型, H组病毒感染同时腹腔注射50 $\mu\text{mol/kg}$ NaHS, N组腹腔无菌注射等量生理盐水, 1次/d, 连续7天。动态观察记录实验期间各组小鼠一般情况, 各组小鼠死亡数, 绘制生存曲线进行生存分析; 各组小鼠于第7天全部处死称重(BM), 取心脏称重(HM), 计算HM/BM; 心肌HE染色后光镜下观察心肌病理改变并计算心肌病理积分; TUNEL法检测心肌细胞凋亡情况并计算心肌凋亡指数; Western Blot法检测心肌细胞凋亡相关蛋白p53、Bax、Bcl-2、caspase-3的表达情况。结果: 与N组相比, C组HM/BM比值增大、心肌病理积分较对照组明显增加, 促凋亡蛋白p53、Bax表达水平增加, 抑凋亡蛋白Bcl-2表达水平下降, caspase-3表达活性显著增加($p < 0.05$)。在NaHS治疗后, H组与C组相比, H组的心肌病理积分明显降低, 促凋亡蛋白p53、Bax表达水平明显下调, 抑凋亡蛋白Bcl-2表达水平上调, caspase-3活性明显降低($p < 0.05$)。结论: NaHS可提高VMC小鼠的存活率、降低心肌病理积分、减少心肌细胞凋亡数, 并通过调节凋亡相关蛋白p53、Bax、Bcl-2、caspase-3表达抑制心肌细胞凋亡, 从而起到保护VMC小鼠心肌的作用。

关键词

硫化氢, 急性病毒性心肌炎, 细胞凋亡

1. 引言

病毒性心肌炎(VMC)是由病毒直接感染心肌后, 导致心肌实质或间质的局限性或弥漫性炎症损伤的一种常见的心血管疾病。诱发 VMC 发生的病毒已知有流感病毒、风疹病毒、肠道病毒等二十余种, 其中主要以肠道病毒柯萨奇 B 组病毒(CVB₃)致病力最强[1]。近年来据国内外统计其发病率均有日益增多的趋势, 且目前各种原因引起的心肌炎中, 因病毒 CVB₃感染引起的发病率最高, 60%的心肌炎患者通过心内膜穿刺细胞病毒检测为阳性[2], 且因 CVB₃ 与小儿心肌有特异的亲和力, 也成为婴幼儿及小儿时期常

见的心脏病之一，临床上治疗效果不佳或容易复发或预后欠佳，并能进一步发展为扩张型心肌病(DMC)和充血性心脏衰竭(CHF) [3]-[5]，严重危害到小儿的生命健康。目前研究大多数认为 VMC 发病机制与病毒直接侵犯心脏以及病毒感染引起机体的自身免疫反应有关之外，但有研究发现在 CVB₃ 病毒感染 balb/c 小鼠心肌炎的急性期，直接入侵心肌细胞，在心肌病灶周围有心肌细胞凋亡现象，在亚急性期逐渐增多，到扩张型心肌病期，心肌细胞凋亡呈散在分布，这表明心肌细胞凋亡在 VMC 发生发展过程中发挥着十分重要作用[6] [7]。近年来，无色、具有臭鸡蛋气味的有毒气体硫化氢(H₂S)的生理作用逐渐被人关注，其被认为是一种新型的神经调节因子和传递因子，在生物体内，硫化氢可通过一系列酶促反应或非酶促反应途径产生，广泛参与了心血管、神经等多种组织和器官的病理和生理过程[8]。其抗氧化、抗炎症、抗凋亡等生物学效应在许多神经、心血管、肝肾等疾病模型研究中得到证实，特别是其在心肌细胞中的抗炎症损伤及凋亡的细胞保护作用受到越来越多的关注[9]。有研究发现，心肌组织能由 CSE 酶催化后生成硫化氢，CVB₃ 感染后可诱导心肌 CSE/H₂S 通路上调，H₂S 对病毒性心肌炎的发生发展过程中多个环节有着十分重要的影响[10]。另有研究表明在急性缺血性心肌病中，外源性硫化氢可通过上调 Bcl-2 表达，下调 Bax 表达，抑制心肌细胞凋亡，发挥其保护心肌细胞的作用[11]。但是关于硫化氢对 CVB₃ 感染所致的 VMC 心肌细胞凋亡的保护作用研究甚少，因此，本实验利用 CVB₃ 感染 Balb/c 小鼠复制 VMC 动物模型，以 H₂S 供体硫氢化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)对急性病毒性心肌炎小鼠进行干预治疗，通过观察 NaHS 对 VMC 小鼠一般情况、生存率以及心肌细胞凋亡等相关指标的影响，以探讨 H₂S 对 VMC 小鼠心肌细胞凋亡的保护作用。

2. 材料

2.1. 实验动物

50 只 4~5 周龄近交系纯种雄性 Balb/C 小鼠，体重 13~15 g。二级实验动物，购于湖南长沙斯莱克实验动物有限公司，南华大学动物实验室，SPF 级，许可证号为 SCXK(湘)2011-0003，鼠粮:为清洁级小鼠生长繁殖颗粒饲料，动物的饲养符合中国动物保护法"所有实验动物均受到人道对待，符合美国国立卫生研究院颁布的“实验动物管理和使用指南”。柯萨奇 B₃ Nancy 株病毒由上海复旦大学附属中山医院病毒性心脏病重点实验室陈瑞珍教授惠赠，-80℃冰箱保存备用。

2.2. 实验药物与试剂

柯萨奇 B₃ Nancy 株病毒由上海复旦大学附属中山医院病毒性心脏病重点实验室杨英珍教授惠赠，-80℃冰箱保存备用。NaHS 购自 Sigma 公司，生理盐水稀释，剂量 50 μmol/(kg·d) [12]，根据小鼠体重确定最后所需溶液的体积。抗体购于 proterntech 公司，SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒/BCA 蛋白浓度测定试剂盒等购于碧云天试剂有限公司。

2.3. 实验动物分组、模型复制及药物干预

根据预实验结果，将 50 只 Balb/c 小鼠，随机分为 N 组(正常对照组，n = 10)、C 组(CVB₃ 病毒组，n = 20)、H 组(NaHS 治疗组，n = 20)，N 组正常对照组腹腔注射 0.3 ml 不含 CVB₃ 的 1640 培养液，C、H 组均腹腔注射 0.3 ml 内含 CVB₃ 的 1640 培养液复制 VMC 小鼠模型，H 组病毒感染同时给予 NaHS 50 μmol/(kg·d)腹腔注射，每日 1 次，疗程 7 天；

3. 方法

3.1. 一般情况及标本处理

实验期间，每天观察动物的进食进水量及体重情况，观察动物活动力，粪便情况，观察毛发，神经

系统, 循环系统, 呼吸系统等情况, 每个观察的终末记录小鼠死亡情况, 死亡鼠解剖检查心脏病变。7 天后处死全部小鼠, 无菌摘取心脏称重(Heart Mass, HM), 计算 HM/BM, 将心脏按左室中线切为两半, 一半用 10% 中性福尔马林溶液固定, 石蜡包埋、切片, 用于 HE 染色; 另一半迅速放入液氮, 然后保存于 -80°C 冰箱, 用于蛋白提取。

3.2. HE 染色评估心肌病理变化

小鼠心脏 10% 中性福尔马林固定后, 心肌组织进行常规脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色后镜检。在光镜下观察组织切片心肌细胞损伤、炎性细胞浸润、心肌纤维化等炎症病变程度, 并参照 Rezkalla 方法 [13] 计算心肌病理组织学积分计算心肌病变积分, 即每张切片取 5 个视野, 计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野面积之比, 无病变计 0 分, $<25\%$ 计 1 分, $25\% \sim 50\%$ 计 2 分, $50\% \sim 75\%$ 计 3 分, $>75\%$ 计 4 分。

3.3. 原位末端标记(TdT-Mediated dUTP Nick End Labeling, TUNEL)法测定凋亡

取出心脏, 心肌组织放入 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 按 ROCHE 公司 TUNEL 检测试剂盒说明书操作。每个石蜡块取 6 个切片, 每张切片随机选取 6 个视野摄片, 计数凋亡细胞数和细胞总数, 图像用 Image Pro Plus 6.0 软件分析。凋亡细胞定量计数单位以凋亡指数表示, 公式为: 凋亡指数 = 凋亡细胞数/总观察细胞数 $\times 100\%$ 。

3.4. Western Blot 法测定凋亡相关蛋白 p53、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达

取病毒性心肌炎小鼠心肌组织标本液氮研碎, 加入裂解液, 经匀浆离心后, 取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度, 变性后 -20°C 保存。取各组样品 $50\ \mu\text{g}$, 进行 12% SDS-PAGE 并电转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h 后, 加入一抗稀释液稀释的抗体(不同抗体不同稀释比例), 4°C 冰箱中孵育过夜, 用 TBST 洗涤 $5\ \text{min} \times 3$ 次。然后加入二抗(1:1000 稀释), 室温下摇床孵育 2 h 后, 用 TBST 洗涤 $5\ \text{min} \times 5$ 次。ECL 发光液显色, 胶片扫描后用 Image J 软件进行图像分析, 以 β -actin (1:1000 稀释) 作为内参照对比, 比值结果表示其蛋白的相对含量。

3.5. 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 在正态分布且方差齐的情况下对其行单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 法, $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

4. 结果

4.1. 硫化氢对 VMC 小鼠体重、HM/BM、生存率的影响

实验期间 N 组小鼠均活动自如, 体重逐渐加重, 无 1 例自然死亡, 生存率为 100%; 接种 CVB₃ 病毒感染后, C 组小鼠体重急剧下降, 感染后第 3 天出现饮食减少, 懒动, 耸毛, 随后症状加重, 第 4 天开始出现死亡, 体重骤减, 到第 7 天共死亡 16 只, 存活率 4/20 (20%); NaHS 干预治疗后, 与 C 组比较, H 组体重有所增加, 小鼠一般情况良好, 部分小鼠感染后第 3 天出现食欲不佳, 体重减轻, 少动倦怠, 到第 7 天死亡 7 只, 存活率为 13/20 (65%), H 组生存率明显高于 C 治疗组($p < 0.05$)。另外, C 组 HM/BM 比值明显增大, 与 C 组比较, H 组 HM/BM 比值减小, 差异有统计学意义($p < 0.05$) (见图 1~3)。

4.2. 硫化氢对小鼠心肌病理改变的影响

接种病毒后, 心脏表观观察, N 组小鼠为正常心肌, 未见病理改变; C 组小鼠在病毒接种后第 3 天

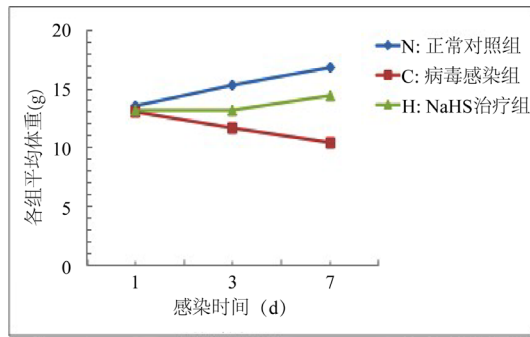


Figure 1. Changes in body weight of mice in each group

图 1. 各组小鼠体重变化

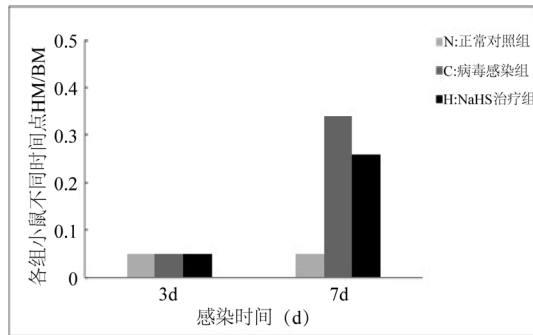


Figure 2. Comparing HM/BM of mice in each group

图 2. 各组小鼠 HM/BM 比较

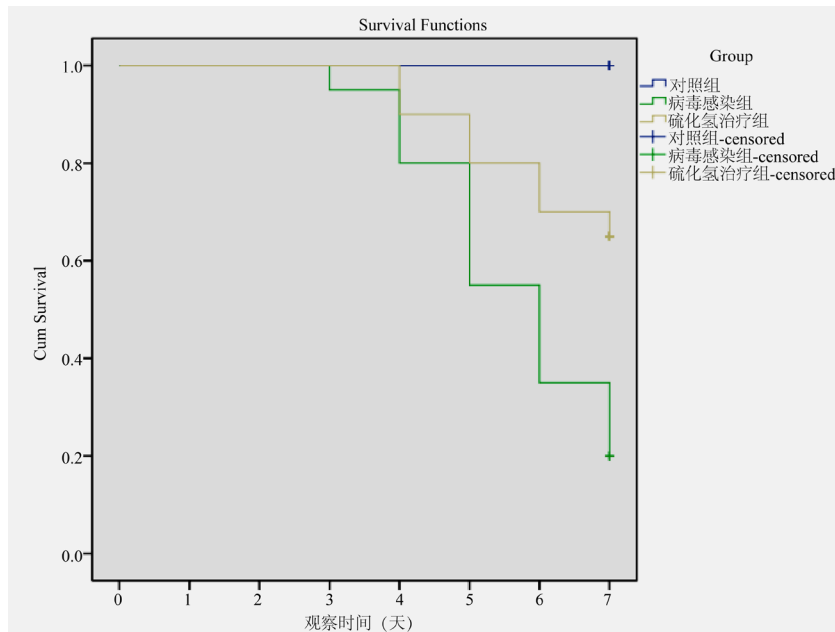


Figure 3. The cumulative survival rate of mice in each group. The blue line represents the normal control group (N, n = 10); the green line represents the viral infection group (C, n = 20); yellow line represents hydrogen sulfide treatment group (H, n = 20); group C mice survival rate was significantly lower in N group ($p < 0.05$); H mice survival rate compared with group C, the survival rate significantly increased ($p < 0.05$)

图 3. 各组小鼠生存情况。蓝色线代表正常对照组(N, n = 10); 绿色线代表病毒感染组(C, n = 20); 黄色线代表硫化氢治疗组(H, n = 20); C 组小鼠生存率明显低于 N 组($p < 0.05$);H 组小鼠生存率与 C 组比较, 生存率明显提高($p < 0.05$)

可见部分小鼠心肌外膜可见部分点状白色渗出点, 感染后第 5~7 天病变加重, 可见心肌外膜出现广泛黄白色絮状斑块、斑点状渗出, 心外膜下淤血; 与 C 组相比, H 组小鼠心脏表观病变轻, 心外膜未见黄白色渗出物。光镜下观察, 感染 CVB3 后第 3 天, 各组小鼠心肌均未见明显病理改变, 感染后第 5~7 天 C 组小鼠心脏可见心肌纤维排列紊乱, 心肌细胞出现浑浊肿胀, 间质内有炎性细胞浸润, 第 7 天可见心肌纤维断裂, 排列紊乱, 间隙增宽, 可见广泛的炎性细胞浸润, 甚至出现心肌坏死病灶, 心肌病理积分比正常对照组明显增高($p < 0.05$)。H 治疗组小鼠病毒感染后第 5~7 天出现轻微病理改变, 心肌纤维排列尚可, 结构清晰, 间质细胞轻度水肿, 可见少量炎性细胞浸润, 部分小鼠心肌纤维排列增宽紊乱, 间质可见淋巴细胞浸润, 少量心肌细胞坏死, 心肌病理积分较同期 C 组明显降低($p < 0.05$) (见图 4 和表 1)。

4.3. 硫化氢对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡的影响

经原位末端标记后, 显微镜下观察, N 组切片中检测到阴性细胞核染色呈蓝色, C 组切片中阳性细胞核染色呈棕褐色, 细胞核体积缩小或明显皱缩, 形态多呈圆形。C 组切片心肌组织中可见大量阳性细胞核, H 组切片中仅见少量阳性细胞核。通过计算凋亡指数发现, N 组小鼠心肌细胞凋亡数量很少, 凋亡率约为 $(0.4 \pm 0.2)\%$; C 组切片心肌组织中可见大量阳性细胞核, 凋亡指数明显增加达 $(58.9 \pm 12.1)\%$, H 组切片中阳性细胞核较少, 凋亡指数约为 $(32.9 \pm 6.5)\%$, 两两比较, C 组较 N 组心肌细胞凋亡指数明显升高, 差异具有统计学差异($p < 0.05$), H 组心肌细胞凋亡指数明显低于 C 组, 差异显著有统计学意义($p < 0.05$)。见图 5 及表 2。

4.4. 硫化氢对 VMC 小鼠心肌组织凋亡相关蛋白 p53、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响

根据 Western blot 结果显示, N 组小鼠心肌细胞中未见 p53 蛋白表达, 有少量 Bcl-2、Bax 蛋白表达; CVB₃ 感染后, 与 N 组比较, C 组 p53 蛋白的表达水平显著高于 N 组($p < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达下降($p < 0.05$) Bax 的表达显著增加, Bcl-2/Bax 比值减小, caspase-3 蛋白活性增强, 差异有显著统计学意义($p < 0.01$); 硫化氢干预治疗后, 与 C 组相比, H 组 p53 蛋白的表达水平显著降低, 心肌组织中抑凋亡 Bcl-2 蛋白表达明显增加, Bax 蛋白表达明显降低, Bcl-2/Bax 比值增大, caspase-3 蛋白活性降低, 两组比较差异有显著统计学意义($p < 0.05$) (见图 6)。

5. 讨论

硫化氢(Hydrogen Sulfide, H₂S)是近年来引人瞩目的新型气体信号分子, 其生物学功能类似于一氧化碳和二氧化碳, 现作为第三种气体信号分子广泛用于各种神经系统、消化系统、心血管系统疾病研究中, 特别是其对心肌的保护作用近年来备受关注[14]。NaSH 是一种硫化氢供体, 其性能较稳定, 具有抗炎症、抗凋亡、抗氧化等多种生物学效应[15]-[17]。同时硫化氢作为一种新的拮抗心脏损伤的保护气体信号分子, 当心肌缺血、再灌注、病毒刺激时, 可通过抗炎症、抗凋亡、抗氧化等机制发挥重要的心肌保护作用[18]。在急性心肌缺血模型中, NaHS 通过抑制炎症反应以及抗心肌细胞凋亡作用, 调控心肌细胞凋亡信号通路, 发挥其保护心肌的作用[19]。同时在 CVB₃ 感染所致 VMC 的心肌细胞模型研究中发现, 心肌组织内源性硫化氢在体内能抑制柯萨奇病毒 CVB₃ 在心肌细胞内复制[20], 在体外实验研究中证实 NaHS 可通过减少自由基损伤及抑制炎症因子释放, 起到对 VMC 小鼠心肌细胞损伤的心肌保护作用[21]。

近年来大量研究表明, 细胞凋亡在病毒性心肌炎发生发展过程中起着十分关键的作用, 被认为是继病毒直接损伤、自身免疫间接损伤发病机制之后的第三种发病机制[22]。细胞凋亡作为机体内细胞的一种主动程序性死亡方式, 受许多因素的影响, 而细胞凋亡主要受机体内一些凋亡相关基因调控, 细胞凋亡的发生是细胞内促凋亡蛋白与抑凋亡蛋白之间的动态平衡丧失的结果, 其中 Bcl-2 家族及 p53 蛋白等在

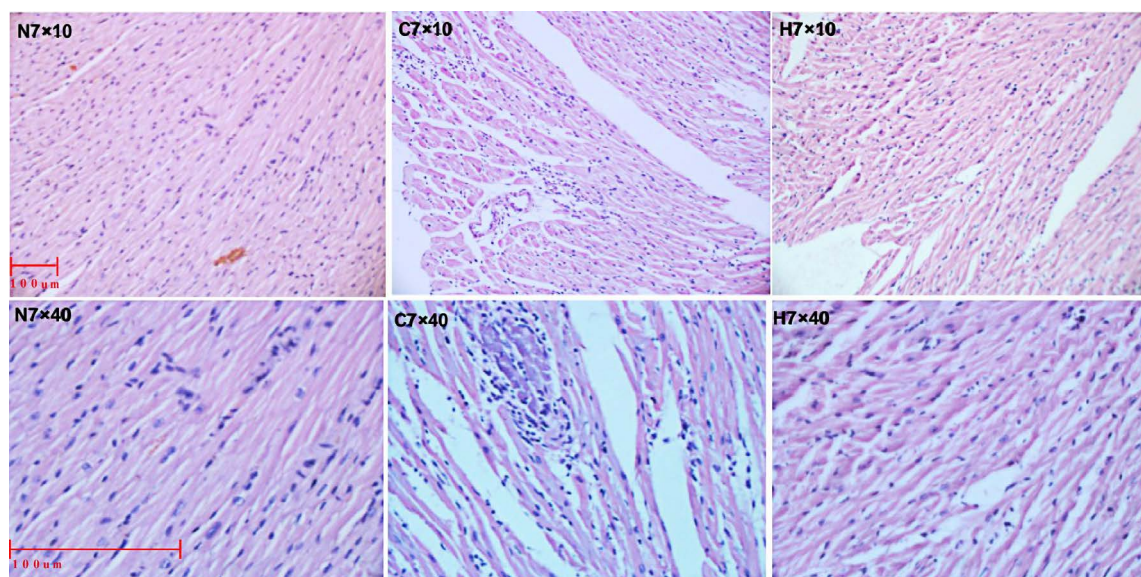


Figure 4. Myocardial pathological changes in each group of mice. N represents the normal control group; C on behalf of the virus infection group; H on behalf of hydrogen sulfide treatment group; compared with N, group C disordered myocardial fibers, inflammatory cell infiltration, apoptosis and necrosis appear; H compared with group C, H myocardial fibers arranged in neat rows, only a small amount of inflammatory cell infiltration, no myocardial necrosis lesions
图 4. 各组小鼠心肌病理改变。N 代表正常对照组；C 代表病毒感染组；H 代表硫化氢治疗组；与 N 组比较，C 组心肌纤维排列紊乱，大量炎性细胞浸润，出现细胞凋亡坏死；H 与 C 组相比较，H 心肌纤维排列整齐，仅少量炎性细胞浸润，心肌未见坏死病灶

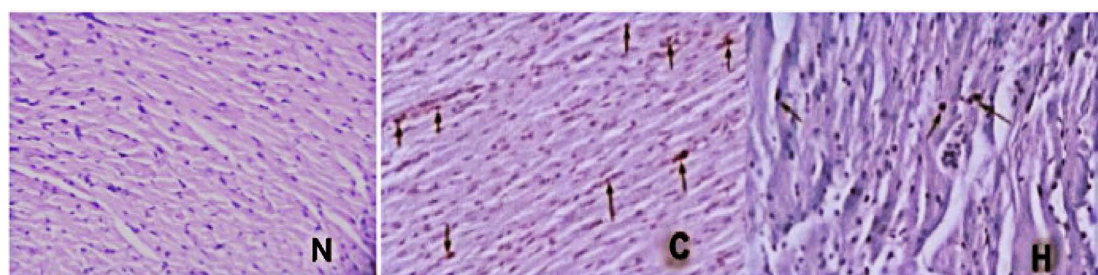


Figure 5. Comparing myocardial apoptosis in each group of mice (TUNEL*200). N represents the normal control group; C on behalf of the virus infection group; H on behalf of hydrogen sulfide treatment group; compared with N, the number of apoptotic cells in mice significantly increased in group C ($p < 0.05$); compared with C, H group therapy significantly reduced cardiac myocyte apoptosis ($p < 0.05$)

图 5. 各组小鼠心肌细胞凋亡比较(TUNEL*200)。N 代表正常对照组；C 代表病毒感染组；H 代表硫化氢治疗组，C 组小鼠细胞凋亡数明显增多($p < 0.05$)；与 C 相比，H 治疗组心肌细胞凋亡数明显减少($p < 0.05$)

Table 1. Myocardial pathological scores at different time points in each group of mice

表 1. 各组小鼠不同时间点心肌病理积分

Group	n	d3	n	d7
N 组	5	0.00	5	0.00
C 组	10	0.8 ± 0.45	10	2.7 ± 0.67
H 组	10	0.4 ± 0.55	10	1.7 ± 0.45
F		10.29		13.77
p		<0.01		<0.01

N 代表正常对照组；C 代表病毒感染组；H 代表硫化氢治疗组，与 H 组相比较，C 组病理积分明显高于 H 组($p < 0.01$)

Table 2. Comparing myocardial apoptosis index of mice in each group (% , $x \pm s$)
表 2. 各组小鼠心肌凋亡指数比较(% , $x \pm s$)

组别	n	凋亡指数
正常对照组	10	—
病毒组	20	(58.9 ± 12.1)%
硫化氢治疗组	20	(32.9 ± 6.5)%

C 组较 N 组心肌细胞凋亡指数明显升高, 差异具有统计学差异($p < 0.05$), H 组心肌细胞凋亡指数明显低于 C 组, 差异显著有统计学意义($p < 0.05$)

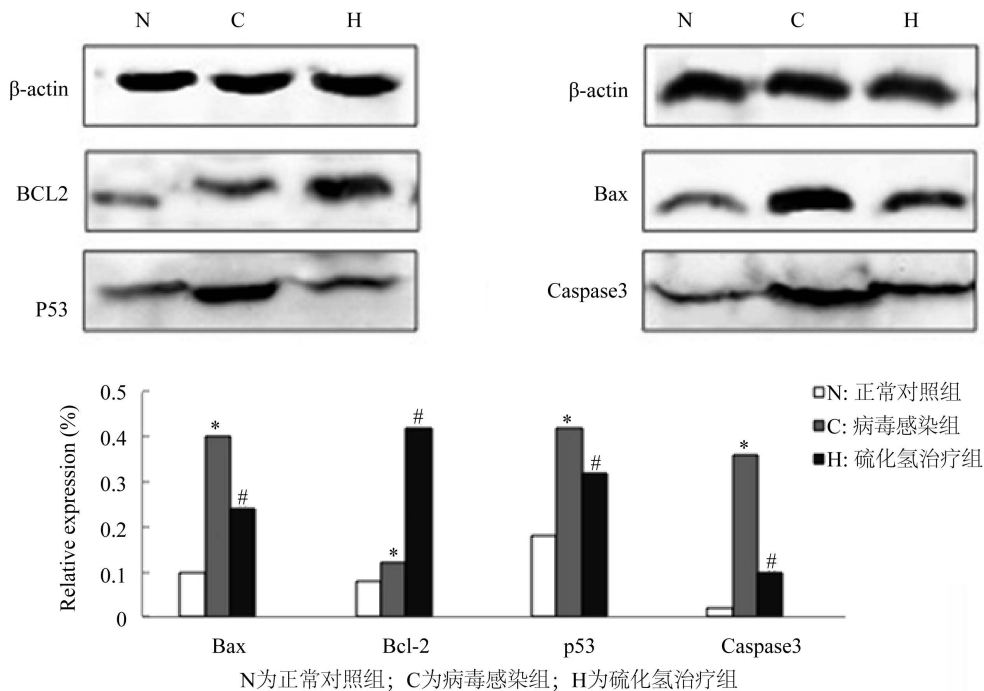


Figure 6. Comparing myocardial the expression of apoptosis-related protein. N represents the normal control group; C on behalf of the virus infection group; H on behalf of hydrogen sulfide treatment group; compared with N, H group compared with group C, the expression of Bcl-2 protein was significantly increased, the expression of Bax protein was significantly reduced, Bcl-2/Bax ratio was significantly increased, the expression of caspase-3 protein were significantly lower, the difference was statistically significant ($p < 0.01$)

图 6. 各组小鼠心肌凋亡相关蛋白表达比较。N 代表正常对照组, C 代表病毒感染组, H 代表硫化氢治疗组。H 组与 C 组比较, Bcl-2 蛋白表达明显升高, Bax 蛋白表达明显降低, Bcl-2/Bax 比值明显增大, caspase-3 蛋白表达均明显降低, 两组比较差异有显著统计学意义($p < 0.01$)

凋亡中起着十分重要的作用。病毒感染心肌细胞, 同时引起机体激活凋亡程序即通过清除感染细胞、保护心肌正常细胞达到清除病毒的防御作用, 同时机体通过激活凋亡相关基因或增加抗凋亡基因表达, 调控心肌细胞的凋亡来实现保护正常心肌的存活和繁殖[23]。Bcl-2 家族中具有促凋亡作用的 Bax 和抑制凋亡蛋白 Bcl-2 参与对细胞凋亡过程的调控。已有研究表明 Bax、Bcl-2 参与 CVB3 诱导的心肌炎小鼠心肌细胞浸润和细胞凋亡过程[24]。同时作为凋亡组织者的 p53 蛋白, 作为一种特殊的转录因子参与对凋亡相关蛋白活性的转录调控。对细胞凋亡的调控可通过调控其下游凋亡相关蛋白的表达来实现, 在细胞凋亡过程中发挥着至关重要的作用。有研究发现 p53 在 CVB3 反复感染诱导的病毒性扩张型心肌病动物模型急性期表达显著上升, 这表明 p53 参与病毒性心肌炎的发生发展过程[25]。这是否表明 p53、Bcl-2/Bax

等凋亡相关蛋白的表达及相互作用决定了细胞的存活与死亡。另外 caspase-3 是一种与细胞凋亡密切相关的蛋白酶类, 作为细胞程序性死亡的感受器和效应器, 是 caspase 家族级联“下游”基因, 是对细胞的凋亡起着最关键作用的启动子和执行蛋白酶, 在各种细胞程序性死亡中发挥着最终枢纽作用[26] [27]。

在本实验研究通过采用 NaHS 干预治疗急性病毒性心肌炎, 结果显示: 通过生存曲线分析可知 H 组小鼠存活率为 13/20 (65%) 明显高于 C 组存活率 4/20 (20%); 各组小鼠心肌经 HE 染色, 光镜下观察, 与 C 组相比较, 硫化氢能明显改善病毒性心肌炎的心肌炎性浸润坏死, H 组心肌病理积分显著低于 C 组 ($p < 0.01$); TUNEL 检测结果表明: C 组心肌细胞凋亡数量较 N 组相比明显增加, 而 H 组心肌组织细胞凋亡指数明显下降。当 CVB₃ 感染心肌, 机体自身激活细胞凋亡程序, 同时病毒也通过调控凋亡相关蛋白的表达来调控心肌细胞的凋亡。通过进一步分子生物学研究发现, C 组小鼠心肌组织 Bcl-2 表达受抑制, Bax、p53、caspase-3 蛋白的表达增加; H 组 Bcl-2 比值与 C 组相比较明显升高, 而 Bax、p53、caspase-3 蛋白的表达明显降低, Bcl-2/Bax 比值增大。综上所述, 本实验研究结果表明外源性硫化氢可通过改善急性病毒性心肌炎心肌病理改变, 下调心肌细胞凋亡蛋白 p53、caspase-3 表达, 增大 Bcl-2/Bax 比值, 减少心肌细胞的凋亡, 从而起到对 CVB₃ 诱导的急性病毒性心肌炎小鼠起到一定的心肌保护作用。

总之, 外源性硫化氢可能通过提高 CVB₃ 诱导的急性病毒性心肌炎小鼠的生存率, 改善心肌病理改变及减少心肌细胞凋亡数, 下调心肌细胞促凋亡蛋白 Bax、p53 表达, 上调抑凋亡蛋白 Bcl-2, 增大 Bcl-2/Bax 比值, 降低 caspase-3 的活性, 减少心肌细胞的凋亡, 从而起到保护急性病毒性心肌炎小鼠心肌的作用; p53 及 Bcl-2/Bax 在急性病毒性心肌炎的发生发展过程中发挥着重要作用。因此, 硫化氢作为一种新的气体信号分子有望在病毒性心肌病中开拓一条新的治疗途径。但本实验研究还存在一些问题, 如对心肌细胞凋亡检测上还有一定缺陷, 没有采用定量 PCR 技术对凋亡相关因子进行 mRNA 水平的检测, 更快更准确检测硫化氢对急性病毒性心肌炎心肌组织凋亡水平的影响。另外对 VMC 小鼠心肌细胞凋亡其他相关蛋白是否有影响以及具体作用机制尚不十分清楚, 有待进一步研究。

基金项目

国家自然科学基金课题(2013年)项目编号 81341095, 氢盐水治疗病毒性心肌病对 P53 泛素化通路调控细胞凋亡的研究。

参考文献 (References)

- [1] Tischner, D., Woess, C., Ottina, E., *et al.* (2010) Bcl-2-Regulated Cell Death Signaling in the Prevention of Autoimmunity. *Cell Death D*, **1**, e48. <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2010.27>
- [2] Reddy, J., Massilamany, C., Buskiewicz, I., *et al.* (2013) Autoimmunity in Viral Myocarditis. *Current Opinion in Rheumatology*, **25**, 502-508. <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283620036>
- [3] Mason, J.W. (2003) Myocarditis and Dilated Cardiomyopathy: An Inflammatory Link. *Cardiovascular Research*, **60**, 5-10. [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00437-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00437-1)
- [4] Air, P., Kontorovich, A.R., Valentin, F. and William, D.G. (2015) Viral Myocarditis-Diagnosis Treatment Options, and Current Controversies. *Nature Reviews Cardiology*, **12**, 670-680. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2015.108>
- [5] Sachin, G., Markham, D.W., Drazner, M.H., *et al.* (2000) Fulminant Myocarditis. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, **343**, 693-706.
- [6] Abbate, A., Sinagra, G., Bussani, R., *et al.* (2009) Apoptosis in Patients with Acute Myocarditis. *American Journal of Cardiology*, **32**, 388-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.05.041>
- [7] 张召才, 李双杰, 杨英珍, 等. 病毒性心脏病小鼠心肌细胞凋亡的动态变化[J]. 复旦学报(医学版), 2005, 32(4): 388-390.
- [8] 陈雯, 谢晓华. 新型气体信号分子硫化氢的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(24): 3704-3709.
- [9] 李钢, 杨双强. 气体信号分子硫化氢与心肌保护的研究进展[J]. 西部医学, 2011, 23(3): 591-594.

- [10] Saraste, A., Arola, A., Vuorinen, T., *et al.* (2003) Cardiomyopathy Apoptosis Experimental Coxsackie—Virus B3 Myocarditis. *Cardiovascular Pathology*, **12**, 255-262.
- [11] 张建新, 丁艳艳, 李兰芳, 刘芳, 张勤增, 解丽君, 郝娜. 硫化氢对急性缺血所致心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(11): 1602-1606.
- [12] Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., *et al.* (2003) Puma Is an Essential Mediator of p53-Dependent and -Independent Apoptotic Pathways. *Cancer Cell*, **4**, 321-328. [http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00244-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00244-7)
- [13] Rezkalla, S., Kloner, R.A., Khatib, G., *et al.* (1988) Effect of Metoprolol in Acute Coxsackievirus B3 Murine Myocarditis. *Journal of the American College of Cardiology*, **12**, 412-414. [http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097\(88\)90414-7](http://dx.doi.org/10.1016/0735-1097(88)90414-7)
- [14] Lavu, M., Bhushan, S. and Lefer, D.J. (2011) Hydrogen Sulfide-Mediated Cardioprotection: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Clinical Science (London)*, **120**, 219-229. <http://dx.doi.org/10.1042/CS20100462>
- [15] Fan, H., Guo, Y., Liang, X., *et al.* (2013) Hydrogen Sulfide Protects against Amyloid Beta-Peptide Induced Neuronal Injury via Attenuating Inflammatory Responses in a Rat Model. *Biomedical Research*, **27**, 296-304. <http://dx.doi.org/10.7555/JBR.27.20120100>
- [16] Chattopadhyay, M., Kodela, R., Nath, N., *et al.* (2012) Hydrogen Sulfide-Releasing Aspirin Suppresses NF-KappaB Signaling in Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Biochemical Pharmacology*, **83**, 723-732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.019>
- [17] Benetti, L.R., Campos, D., Gurgueira, S.A., *et al.* (2013) Hydrogen Sulfide Inhibits Oxidative Stress in Lungs from Allergic Mice *in Vivo*. *European Journal of Pharmacology*, **698**, 463-469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.11.025>
- [18] 廖峰, 郑扬, 耿彬. 硫化氢——新的心脏保护因子[J]. 生理科学进展, 2012, 43(2): 111-114.
- [19] 张友恩, 葛均波. 硫化氢抑制炎症反应和凋亡在心肌缺血损伤中的作用与机制研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 复旦大学中山医院, 2014.
- [20] 花旺, 姜剑斌, 荣星, 等. 胱硫醚- γ -裂解酶/硫化氢通路在小鼠病毒性心肌炎中的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(9): 744-748.
- [21] 钱红, 刘理静. 硫化氢对试验性病毒性心肌炎小鼠的保护作用及其机制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 7(30): 708-712.
- [22] 白景玉, 张烁, 卢少玲. 病毒性心肌炎的发病机制[J]. 心血管康复医学杂志, 2015, 24(5): 585-587.
- [23] 刘旭杰, 柳德学. 参松养心胶囊对病毒性心肌炎小鼠模型心肌细胞凋亡及其调控基因的影响[J]. 中医研究, 2010, 23(9): 21-24.
- [24] 韩波, 马沛然, 韩秀珍, 等. Bcl-2 和 Bax 基因产物在小鼠柯萨奇病毒性心肌炎心肌组织中的表达[J]. 实用儿科临床杂志, 2003, 18(7): 513-515.
- [25] 李双杰, 钟飞, 张召才, 等. 病毒性心肌疾病的基因时空表达特征[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2008, 29(6): 107-111.
- [26] 孟楠, 刘芳. 心炎宁颗粒剂对病毒性心肌炎小鼠心肌细胞凋亡相关基因表达的影响[D]: [硕士学位论文]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2013.
- [27] 张芸娟, 董湘玉. 半胱天冬氨酸蛋白酶-3 与病毒性心肌炎心肌细胞凋亡[J]. 儿科药学杂志, 2016, 22(1): 55-57.