

# 基于 AMPK/mTOR 自噬通路研究甘草酸二铵对柯萨奇病毒 B3 病毒性心肌炎小鼠的保护作用

岳丽晓<sup>1</sup>, 李登云<sup>2</sup>, 张晶晶<sup>1</sup>, 仝雷<sup>1\*</sup>

1. 郑州工业应用技术学院 微生物与免疫学教研室, 河南 新郑 450064

2. 郑州工业应用技术学院 药理学教研室, 河南 新郑 450064

**摘要:** 目的 基于单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 自噬通路探究甘草酸二铵 (diammonium glycyrrhizinate, DG) 对病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 小鼠心肌的保护作用及机制。方法 50 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、DG (19.5 mg/kg) 组、DG (19.5 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) 组和 DG (19.5 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) + 雷帕霉素 (2.0 mg/kg) 组, 每组 10 只。采用试剂盒检测血清中肌酸激酶同工酶 (creatinase-MB, CK-MB) 活性、心肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 水平及心肌组织中白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 和 TUNEL 染色分别检测心肌组织病理形态和细胞凋亡; 采用 qRT-PCR 检测心肌组织柯萨奇病毒 3 (coxsackievirus B3, CVB3) mRNA 表达; 采用 Western blotting 检测心肌组织自噬、凋亡及 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组心肌纤维部分断裂, 有明显的细胞变形、出血和炎性细胞浸润, 心肌细胞凋亡率、血清中 CK-MB 活性、cTnI 水平及心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 心肌组织 CVB3 mRNA 表达及活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cleaved cysteine-aspartate protease-9, cleaved Caspase-9)、cleaved Caspase-3、p62、p-mTOR/mTOR 蛋白表达均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 心肌组织微管相关蛋白轻链 3-II/I (microtubule-associated protein light chain 3-II/I, LC3-II/I)、Beclin-1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, DG 明显改善心肌形态, 降低心肌细胞凋亡率、血清中 CK-MB 活性、cTnI 水平及心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.05$ ), 下调心肌组织 CVB3 mRNA 表达及 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3、p62、p-mTOR/mTOR 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 上调心肌组织 LC3-II/I、Beclin-1、p-AMPK/AMPK 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。AMPK 抑制剂 Compound C 能减弱 DG 的上述保护作用, 且自噬激活剂雷帕霉素能抑制这种减弱作用。结论 DG 可能通过激活 AMPK/mTOR 通路诱导自噬, 减轻 VMC 小鼠心肌损伤。

**关键词:** 甘草酸二铵; 病毒性心肌炎; AMPK/mTOR 通路; 自噬; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)12-3895-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.016

## Protective effect of diammonium glycyrrhizinate on mice with coxsackievirus B3 myocarditis by regulating AMPK/mTOR autophagy pathway

YUE Li-xiao<sup>1</sup>, LI Deng-yun<sup>2</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>1</sup>, TONG Lei<sup>1</sup>

1. Department of Microbiology and Immunology, Zhengzhou Institute of Industrial Applied Technology, Xinzhen 450064, China

2. Department of Pharmacology, Zhengzhou Institute of Industrial Applied Technology, Xinzhen 450064, China

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect and mechanism of diammonium glycyrrhizinate (DG) on myocardium of mice with viral myocarditis (VMC) based on adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) autophagy pathway. **Methods** Fifty BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, DG (19.5 mg/kg) group, DG (19.5 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) group and DG (19.5 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) + rapamycin (2.0 mg/kg) group, with 10 mice in each group. Kits were used to detect creatine kinase-MB (CK-MB) activity, cardiac troponin I (cTn I) level in serum and levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in myocardial tissue; The pathological

收稿日期: 2022-12-26

基金项目: 2019 年河南省科技发展计划 (192102310416)

作者简介: 岳丽晓 (1990—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为病原微生物学与免疫学。E-mail: ylx0725@163.com

\*通信作者: 仝雷 (1982—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为微生物与免疫学、药理学。E-mail: duoduo0005@163.com

morphology and cell apoptosis of myocardial tissue were detected by hematoxylin eosin (HE) and TUNEL staining; qRT-PCR was used to detect coxsackievirus B3 (CVB3) mRNA expression in myocardial tissue; Western blotting was used to detect autophagy, apoptosis, and AMPK/mTOR pathway related protein expressions in myocardial tissue. **Results** Compared with control group, mice in model group showed partial myocardial fiber breakage, significant cell deformation, bleeding and inflammatory cell infiltration, and the myocardial cell apoptosis rate, CK-MB activity, cTnI level in serum and levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  in myocardial tissue were significantly increased ( $P < 0.05$ ), CVB3 mRNA and cleaved cystein-aspartate protease-9 (cleaved Caspase-9), cleaved Caspase-3, p62, p-mTOR/mTOR protein expressions in myocardial tissue were significantly increased ( $P < 0.05$ ), microtubule associated protein light chain 3-II/I (LC3-II/I), Beclin-1 and p-AMPK/AMPK protein expressions in myocardial tissue were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, DG significantly improved myocardial morphology, reduced myocardial cell apoptosis rate, CK-MB activity, cTnI level in serum and IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  levels in myocardial tissue ( $P < 0.05$ ), downregulated CVB3 mRNA and cleaved Caspase-9, cleaved Caspase-3, p62, p-mTOR/mTOR protein expressions in myocardial tissue ( $P < 0.05$ ), upregulated LC3-II/I, Beclin-1, p-AMPK/AMPK protein expressions in myocardial tissue ( $P < 0.05$ ). The AMPK inhibitor Compound C could weaken the aforementioned protective effect of DG, and the autophagy activator rapamycin could inhibit this weakening effect. **Conclusion** DG may induce autophagy by activating AMPK/mTOR pathway and alleviate myocardial damage in VMC mice.

**Key words:** diammonium glycyrrhizinate; viral myocarditis; AMPK/mTOR pathway; autophagy; apoptosis

病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 是由病毒感染导致的局部或弥漫性心肌急性慢性炎症病变, 可导致严重的急性心脏损伤或持续性慢性心脏损伤, 威胁患者生命<sup>[1]</sup>。VMC 发生率近年呈上升趋势, 却缺乏有效的特异药物<sup>[2]</sup>, 因此, 有必要针对 VMC 的发病机制寻找新型药物。柯萨奇病毒 3 (coxsackievirus B3, CVB3) 是引起 VMC 的常见病原, 可直接损伤心肌细胞, 还可引起自身免疫损伤, 诱导心肌炎症、纤维化和病理重构等损伤<sup>[3]</sup>。自噬为细胞内降解代谢过程, 可通过调节病毒复制和释放, 影响机体免疫反应和心肌细胞损伤来影响 VMC 进展<sup>[4]</sup>。既往研究显示, 感染的病毒可诱导并劫持 VMC 小鼠心肌细胞自噬, 同时阻断自噬通量 (即阻断自噬体与溶酶体的结合和降解), 抑制受损细胞器的清除, 导致心脏损伤<sup>[4-6]</sup>。而单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 自噬通路的激活可改善自噬通量, 减轻 VMC 小鼠心肌细胞凋亡和炎症损伤<sup>[7]</sup>。

甘草酸二铵 (diammonium glycyrrhizinate, DG) 为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的主要活性成分, 临床已被报道可用于 VMC<sup>[8-9]</sup>、病毒性肝炎<sup>[10]</sup>、病毒性肺炎<sup>[11]</sup>等的治疗。研究表明, DG 具有抗多种病毒的作用<sup>[12-13]</sup>, 但其对 CVB3 相关 VMC 的治疗效果及其作用机制是否与 AMPK/mTOR 通路有关鲜见报道。本研究拟构建 CVB3 诱导的 VMC 小鼠模型, 观察 DG 对 VMC 小鼠的治疗作用, 并探讨 DG 对 AMPK/mTOR 自噬通路的调

控作用, 为 DG 用于 VMC 的治疗提供实验参考。

## 1 材料

### 1.1 动物和病毒株

SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 50 只, 体质量 19~23 g, 4~5 周龄, 购自北京维通利华实验动物公司 [SCXK (京)-2019-0009]。动物饲养于河南省中医药研究院 [SYXK (豫) 2019-0001], 在温度 (23.0 $\pm$ 0.5)  $^{\circ}\text{C}$ 、昼/夜周期 12 h/12 h、相对湿度 (46 $\pm$ 3) % 的动物房中分笼饲养, 自由进水摄食。动物实验均符合郑州工业应用技术学院动物伦理委员会相关要求 [2021 (DWLL)-012], 并遵循 3R 原则。

CBV3 病毒株购自 ATCC。

### 1.2 药品与试剂

DG 注射液 (批号 20210405, 国药准字 H20073786) 购自中孚药业股份有限公司; AMPK 抑制剂 Compound C (批号 HY-13418A)、自噬激活剂雷帕霉素 (批号 HY-10219) 购自美国 MCE 公司; 兔源抗 p-AMPK 抗体、AMPK 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、p-mTOR 抗体、mTOR 抗体购自美国 CST 公司, 批号分别为 2019012、20209817、20190918、20200521、20210116; 微管相关蛋白轻链 3-II/I (microtubule-associated protein light chain 3-II/I, LC3-II/I) 抗体、Beclin-1 抗体、p62 抗体、活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 (cleaved cystein-aspartate protease-9, cleaved Caspase-9) 抗体、cleaved Caspase-3 抗体、羊抗兔 IgG 抗体购自英国 Abcam 公司, 批号分别为 20190718、20200812、20190608、

20190716、20191108、20201207; 苏木素-伊红 (HE) 试剂盒、小鼠心肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) ELISA 试剂盒、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒、肌酸激酶同工酶 (creatine kinase-MB, CK-MB) ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 试剂盒、TUNEL (FITC 荧光) 凋亡试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 批号分别为 20210907、20211225、20211105、20211218、20211123、20210712; qRT-PCR 试剂盒 (批号 Q222-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.3 仪器

DM750 型光学显微镜 (德国 Leica 公司); iMark680 型多功能酶标仪、PowerPac Universal 电泳仪、Trans-Blot SD 转膜仪、CFX96 型 qRT-PCR 仪购自 (美国 Bio-Rad 公司); TG16G 型台式高速离心机 (湖南凯达科学仪器有限公司); MS105DU 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

## 2 方法

### 2.1 VMC 小鼠模型建立、分组与给药

按随机数字表法将 BALB/c 小鼠分为对照组、模型组、DG (19.5 mg/kg, 相当于临床等效剂量) 组、DG (19.5 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) 组和 DG (19.5 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) + 雷帕霉素 (2.0 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余小鼠 ip 0.2 mL CVB3 稀释液 ( $1 \times 10^6$  滴度) 建立 VMC 小鼠模型<sup>[14]</sup>。CVB3 注射后 2 h, DG 组小鼠每日 ip DG; DG + Compound C 组小鼠在 DG 组基础上, ip Compound C<sup>[15]</sup>; DG + Compound C + 雷帕霉素组小鼠在 DG + Compound C 组基础上, 每隔 1 d ip 雷帕霉素<sup>[16]</sup>; 对照组和模型组 ip 等体积生理盐水, 连续 7 d。

### 2.2 样本采集

给药结束 12 h, 以异氟醚麻醉小鼠, 自颈动脉抽取 1.5 mL 血液, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 12 min, 获取血清, 分装、标记后置于 -80  $^{\circ}\text{C}$ ; 处死小鼠, 分离心脏, 剪下 2 mm  $\times$  2 mm  $\times$  2 mm 心尖附近心肌组织, 逐步进行石蜡包埋, 上轮转切片机切片 (5  $\mu\text{m}$ ) 备用。剩余心肌组织用 RIPA 裂解液提取蛋白, 定量、分装、标记后置于 -80  $^{\circ}\text{C}$ 。

### 2.3 血清 CK-MB 活性、cTnI 水平及心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平测定

取血清和心肌组织蛋白样品, 冰上解冻, 采用

小鼠 CK-MB、cTnI、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒, 按照说明书测定小鼠血清中 CK-MB 活性、cTnI 水平和心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平。

### 2.4 心肌组织 HE 染色

取心肌组织切片, 脱蜡至水后, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察小鼠心肌病理形态。采用 Image J 软件随机统计 5 个视野内炎性细胞浸润、坏死面积的百分比, 并进行评分: 无为 0 分;  $0 < 1 \text{ 分} \leq 25\%$ ;  $25\% < 2 \text{ 分} \leq 50\%$ ;  $50\% < 3 \text{ 分} \leq 75\%$ ;  $75\% < 4 \text{ 分} \leq 100\%$ 。

### 2.5 qRT-PCR 检测心肌组织 CVB3 mRNA 表达

按照试剂盒说明书提取心肌组织中总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: CVB3 上游引物 5'-GGGTACCTTTGTGCGCCTGT-3', 下游引物 5'-CAGGCCGCCAACGCAGCC-3'; GAPDH 上游引物 5'-GGCAAATCCATGGCACCCT-3', 下游引物 5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3'。

### 2.6 心肌组织 TUNEL 染色

心肌组织切片经脱蜡、蛋白酶 K 作用后, 按照 TUNEL 试剂盒说明书逐步滴加相应试剂, 滴加 DAPI 复染、水洗后封片, 在荧光显微镜下观察。核内有黄绿色荧光的为 TUNEL 阳性细胞, 即凋亡心肌细胞, 采用 Image J 软件随机统计 5 个视野内细胞凋亡率。

凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数量 / DAPI 阳性细胞数量

### 2.7 Western blotting 检测心肌组织 p-AMPK、AMPK、LC3-II/I、Beclin-1、p62、p-mTOR、mTOR、cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达

将心肌蛋白样品在冰上解冻, 取 20  $\mu\text{g}$  蛋白上样, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中摇晃封闭 2 h, 分别加入 p-AMPK、AMPK、LC3-II/I、Beclin-1、p62、p-mTOR、mTOR、cleaved Caspase-9、GAPDH、cleaved Caspase-3 抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 1.5 h, 加入化学发光液显色, 采用普通 X 光胶片曝光后调整为灰度模式, 计算相对灰度 (以 GAPDH 为内参)。

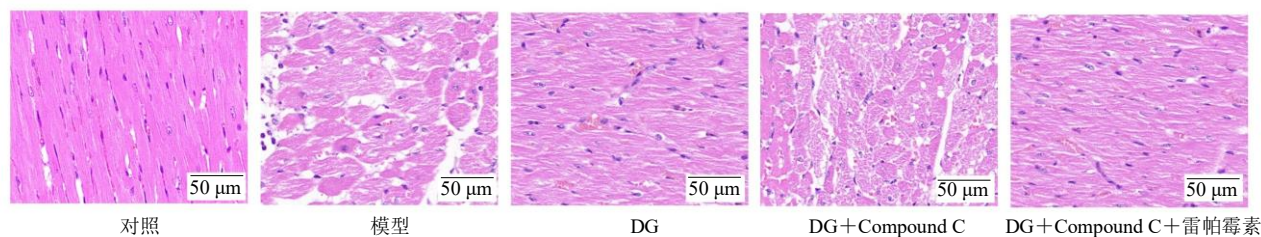
### 2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析, 用  $\bar{x} \pm s$  描述研究数据, 用单因素方差分析行多组间比较, 再用 SNK- $q$  检验行两两比较。

## 3 结果

### 3.1 DG 减轻 VMC 小鼠心肌组织损伤

如图 1 所示, 对照组小鼠心肌纤维分布规则,

图 1 DG 对 VMC 小鼠心肌组织病理的影响 (HE,  $\times 400$ )Fig. 1 Effect of DG on myocardial histopathology in VMC mice (HE,  $\times 400$ )

心肌细胞膜、核等形态正常, 间质无坏死或炎性细胞浸润; 模型组心肌纤维部分断裂且分布紊乱, 有明显的细胞变形、出血和炎性细胞浸润; DG 组损伤程度明显下降; DG+Compound C 组心肌形态介于模型组和 DG 组之间; DG+Compound C+雷帕霉素组心肌形态与 DG 组接近。如表 1 所示, 与模型组比较, DG 组心肌组织病理评分显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与 DG 组比较, DG+Compound C 组心肌组

织病理评分显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 DG+Compound C 组比较, DG+Compound C+雷帕霉素组心肌组织病理评分显著下降 ( $P < 0.05$ )。

### 3.2 DG 降低 VMC 小鼠心肌损伤标志物水平

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 CK-MB 活性及 cTnI 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, DG 组血清 CK-MB 活性及 cTnI 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 DG 组比较, DG+Compound C 组血清 CK-MB 活性及 cTnI 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 DG+Compound C 组比较, DG+Compound C+雷帕霉素组血清 CK-MB 活性及 cTnI 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.3 DG 降低 VMC 小鼠心肌组织炎性因子水平

如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, DG 组心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 DG 组比较, DG+Compound C 组心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 DG+Compound C 组比较, DG+Compound C+雷帕霉素组心肌组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组小鼠心肌组织病理评分 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )Table 1 Myocardial histopathological score of mice in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别                 | 剂量/<br>( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | 病理评分                   |
|--------------------|---------------------------------------------|------------------------|
| 对照                 | —                                           | 0.00                   |
| 模型                 | —                                           | $3.62 \pm 0.54^*$      |
| DG                 | 19.5                                        | $1.53 \pm 0.21^{**}$   |
| DG+Compound C      | 19.5+20                                     | $3.37 \pm 0.39^\Delta$ |
| DG+Compound C+雷帕霉素 | 19.5+20+2.0                                 | $1.61 \pm 0.28^\#$     |

与对照组比较:  $^*P < 0.05$ ; 与模型组比较:  $^{**}P < 0.05$ ; 与 DG 组比较:  $^\Delta P < 0.05$ ; 与 DG+Compound C 组比较:  $^\#P < 0.05$ , 下表同  
 $^*P < 0.05$  vs control group;  $^{**}P < 0.05$  vs model group;  $^\Delta P < 0.05$  vs DG group;  $^\#P < 0.05$  vs DG + Compound C group, same as below tables

表 2 DG 对 VMC 小鼠血清 CK-MB 活性及 cTnI 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )Table 2 Effect of DG on CK-MB activity and cTnI level in serum of VMC mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别                 | 剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | CK-MB/ ( $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | cTnI/ ( $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|--------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 对照                 | —                                        | $183.07 \pm 21.35$                        | $1\ 408.61 \pm 215.31$                    |
| 模型                 | —                                        | $335.26 \pm 25.61^*$                      | $3\ 628.26 \pm 228.07^*$                  |
| DG                 | 19.5                                     | $224.61 \pm 18.73^{**}$                   | $1\ 769.38 \pm 194.76^{**}$               |
| DG+Compound C      | 19.5+20                                  | $309.18 \pm 25.24^\Delta$                 | $2\ 935.42 \pm 212.98^\Delta$             |
| DG+Compound C+雷帕霉素 | 19.5+20+2.0                              | $243.15 \pm 20.53^\#$                     | $1\ 850.46 \pm 207.13^\#$                 |

表 3 DG 对 VMC 小鼠心肌组织 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )Table 3 Effect of DG on IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in myocardial tissue of VMC mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别                 | 剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) | IL-1 $\beta$ / ( $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) | TNF- $\alpha$ / ( $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) |
|--------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 对照                 | —                                        | $30.85 \pm 4.25$                                    | $27.45 \pm 4.76$                                     |
| 模型                 | —                                        | $116.07 \pm 9.38^*$                                 | $82.57 \pm 9.08^*$                                   |
| DG                 | 19.5                                     | $47.18 \pm 5.32^{**}$                               | $35.15 \pm 5.46^{**}$                                |
| DG+Compound C      | 19.5+20                                  | $109.74 \pm 8.29^\Delta$                            | $91.29 \pm 8.35^\Delta$                              |
| DG+Compound C+雷帕霉素 | 19.5+20+2.0                              | $51.14 \pm 5.03^\#$                                 | $43.86 \pm 5.67^\#$                                  |

### 3.4 DG 降低 VMC 小鼠心肌组织 *CVB3* mRNA 表达

如表 4 所示,与模型组比较,DG 组心肌组织 *CVB3* mRNA 表达水平显著降低 ( $P<0.05$ );与 DG 组比较,DG+Compound C 组心肌组织 *CVB3* mRNA 表达水平显著升高 ( $P<0.05$ );与 DG+Compound C 组比较,DG+Compound C+雷帕霉素组心肌组织 *CVB3* mRNA 表达水平显著降低 ( $P<0.05$ )。

表 4 DG 对 VMC 小鼠心肌组织 *CVB3* mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of DG on *CVB3* mRNA expression in myocardial tissue of VMC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | <i>CVB3</i> mRNA                |
|--------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 对照                 | —                         | 0                               |
| 模型                 | —                         | 29 500.17 ± 805.12*             |
| DG                 | 19.5                      | 3 260.49 ± 240.36*              |
| DG+Compound C      | 19.5+20                   | 20 810.36 ± 691.74 <sup>▲</sup> |
| DG+Compound C+雷帕霉素 | 19.5+20+2.0               | 4 790.86 ± 272.41 <sup>#</sup>  |

### 3.5 DG 抑制 VMC 小鼠心肌细胞凋亡

如图 2、3 和表 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠心肌组织 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平和凋亡率均显著升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,DG 组心肌组织 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平和凋亡率均显著降低 ( $P<0.05$ );与 DG 组比较,DG+Compound C 组心肌组织 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平和凋亡率均显著升高 ( $P<0.05$ );与 DG+Compound C 组比较,DG+Compound C+雷帕霉素组心肌组织 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平和凋亡率均显著降低 ( $P<0.05$ )。

### 3.6 DG 激活 VMC 小鼠心肌组织 AMPK/mTOR 通路诱导自噬

如图 4 和表 6 所示,与对照组比较,模型组小

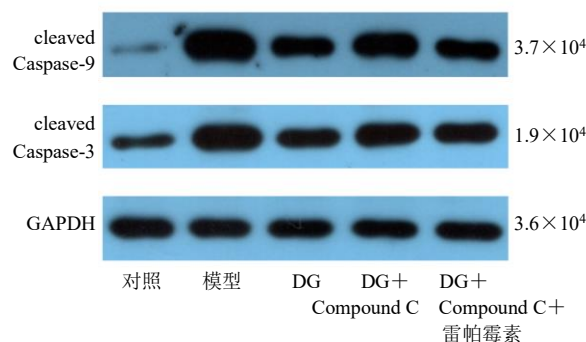


图 2 DG 对 VMC 小鼠心肌组织 cleaved Caspase-9 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of DG on cleaved Caspase-9 and cleaved Caspase-3 protein expressions in myocardial tissue of VMC mice

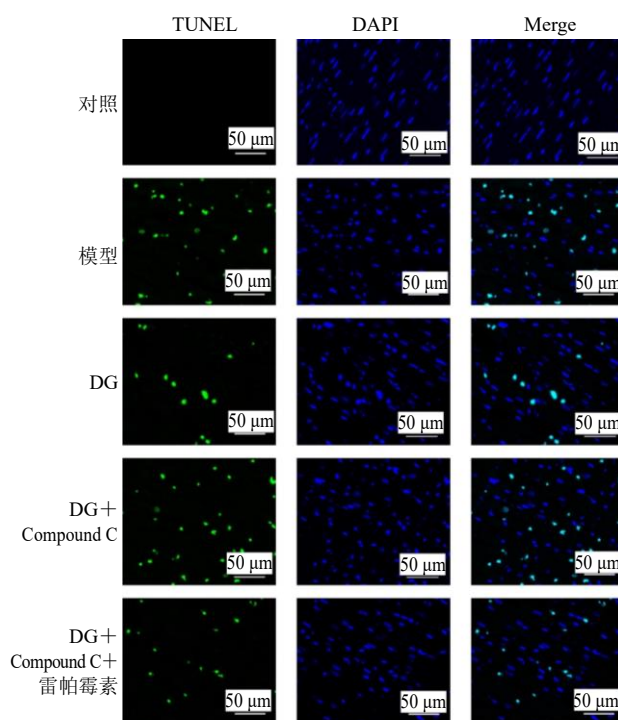


图 3 DG 对 VMC 小鼠心肌细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of DG on apoptosis of cardiomyocytes in VMC mice

表 5 DG 对 VMC 小鼠心肌组织 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3 蛋白表达及心肌细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of DG on cleaved Caspase-9 and cleaved Caspase-3 protein expressions in myocardial tissue and apoptosis of cardiomyocytes in VMC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                 | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | cleaved Caspase-9/<br>GAPDH | cleaved Caspase-3/<br>GAPDH | 细胞凋亡率/%                   |
|--------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 对照                 | —                         | 0.08 ± 0.02                 | 0.12 ± 0.03                 | 0.68 ± 0.14               |
| 模型                 | —                         | 0.53 ± 0.11*                | 0.48 ± 0.09*                | 19.25 ± 3.72*             |
| DG                 | 19.5                      | 0.27 ± 0.05*                | 0.19 ± 0.06*                | 9.73 ± 3.07*              |
| DG+Compound C      | 19.5+20                   | 0.46 ± 0.07 <sup>▲</sup>    | 0.39 ± 0.07 <sup>▲</sup>    | 16.49 ± 3.26 <sup>▲</sup> |
| DG+Compound C+雷帕霉素 | 19.5+20+2.0               | 0.31 ± 0.04 <sup>#</sup>    | 0.22 ± 0.05 <sup>#</sup>    | 10.15 ± 2.36 <sup>#</sup> |



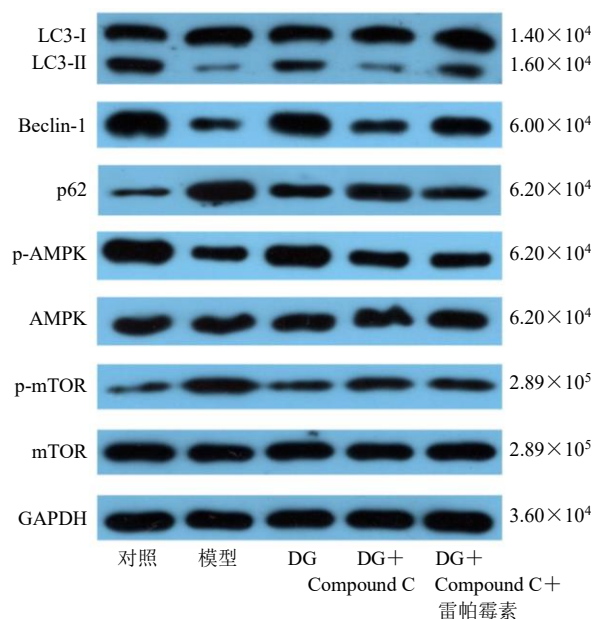


图 4 DG 对 VMC 小鼠心肌组织 AMPK/mTOR 自噬通路相关蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of DG on expressions of AMPK/mTOR autophagy pathway related proteins in myocardial tissue of VMC mice

表 6 DG 对 VMC 小鼠心肌组织 AMPK/mTOR 自噬通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 6 Effect of DG on expressions of AMPK/mTOR autophagy pathway related proteins in myocardial tissue of VMC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                 | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | LC3-II/I/<br>GAPDH | Beclin-1/<br>GAPDH | p62/<br>GAPDH | p-AMPK/<br>AMPK | p-mTOR/<br>mTOR |
|--------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 对照                 | —                             | 0.96 ± 0.13        | 1.17 ± 0.10        | 0.20 ± 0.03   | 0.65 ± 0.12     | 0.17 ± 0.03     |
| 模型                 | —                             | 0.42 ± 0.09*       | 0.58 ± 0.07*       | 1.03 ± 0.06*  | 0.31 ± 0.04*    | 0.46 ± 0.07*    |
| DG                 | 19.5                          | 0.85 ± 0.11※       | 0.96 ± 0.08※       | 0.45 ± 0.04※  | 0.57 ± 0.08※    | 0.23 ± 0.05※    |
| DG+Compound C      | 19.5+20                       | 0.53 ± 0.07▲       | 0.64 ± 0.05▲       | 0.78 ± 0.05▲  | 0.38 ± 0.07▲    | 0.40 ± 0.05▲    |
| DG+Compound C+雷帕霉素 | 19.5+20+2.0                   | 0.81 ± 0.10#       | 0.90 ± 0.08#       | 0.34 ± 0.04#  | 0.39 ± 0.05     | 0.37 ± 0.06     |

伤后二者在血液中的含量迅速升高<sup>[17]</sup>。病毒感染还可激活宿主免疫反应，炎性细胞向损伤细胞周围趋聚，造成心肌弥散性、炎症性损伤<sup>[18]</sup>。本研究中，VMC 小鼠心肌组织呈炎性浸润、出血等损伤，同时血清 CK-MB 活性、cTnI 水平和心肌炎性因子水平升高，与石哲玮等<sup>[14]</sup>研究一致，说明 VMC 模型构建成功。

目前临床常用的抗病毒、免疫等疗法对 VMC 的治疗效果欠佳。中医认为，此病属于“心痹”范畴，其病机为心气阴虚、气滞血瘀，应以益气温阳、活血化瘀为主要治则。甘草是一种补益中草药，具有补中益气、清热解毒的功效，是临床治疗 VMC 方剂中的常用中药。DG 为甘草的第 3 代活性成分，可通过减轻病毒引起的炎症反应，改善宿主的免疫

鼠心肌组织 p-AMPK/AMPK、LC3-II/I、Beclin-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，p62、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )；与模型组比较，DG 组心肌组织 p-AMPK/AMPK、LC3-II/I、Beclin-1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )，p62、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )；与 DG 组比较，DG+Compound C 组心肌组织 p-AMPK/AMPK、LC3-II/I、Beclin-1 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，p62、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )；与 DG+Compound C 组比较，DG+Compound C+雷帕霉素组心肌组织 LC3-II/I、Beclin-1 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )，p62 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )，p-AMPK/AMPK、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平无明显变化。

#### 4 讨论

VMC 过程中，病毒的入侵可破坏心肌细胞膜等结构，使得其包含的酶、蛋白质等进入血液循环，CK-MB 和 cTnI 是心肌损伤的预警标志物，心肌受

能力等实现抗病毒作用<sup>[13]</sup>。研究发现，DG 能降低小儿重症暴发性 VMC 患者 CK-MB、cTn 及炎性因子水平，改善临床症状<sup>[8-9]</sup>。本研究中，DG 可显著减少 VMC 小鼠心肌组织内 CVB3 病毒含量，降低心肌炎性细胞浸润等病理损伤，改善心功能，这与以往的研究结果一致<sup>[8-9]</sup>，表明 DG 对 VMC 小鼠心肌损伤有治疗作用，但其对 VMC 的治疗机制尚待探讨。

自噬参与病毒、受损细胞器的清除等重要生理病理过程，可在保护生物体免受包括感染、代谢紊乱、心脏病等多种疾病中发挥适应性作用<sup>[19]</sup>。研究显示，自噬水平的变化能影响 VMC 发展<sup>[6,20]</sup>。自噬体中的 LC3 由胞质型 LC3-I 转变为膜型 LC3-II，对于自噬体的形成至关重要<sup>[20]</sup>；Beclin-1 负责介导其

他自噬蛋白的定位,参与自噬的启动<sup>[21]</sup>。因此,LC3-II/I和 Beclin-1 水平升高表明自噬激活。p62 为自噬的底物,通过与 LC3-II/I和泛素化的蛋白结合,选择性地进入自噬体并被降解,其水平与自噬活性呈负相关<sup>[7,20]</sup>。另外,细胞凋亡也是 VMC 的重要环节,而 Caspase 家族蛋白启动并介导了细胞凋亡的全过程<sup>[22]</sup>。研究显示,适应性自噬可作为应激适应,通过抑制细胞凋亡改善细胞损伤和死亡<sup>[7,19]</sup>。在本研究中, CVB3 诱导的自噬趋势与 Gu 等<sup>[7]</sup>研究相同,且引起心肌细胞凋亡增加。而 DG 治疗进一步升高 LC3-II/I和 Beclin-1 蛋白表达水平,并降低 cleaved Caspase-9、cleaved Caspase-3、p62 蛋白表达水平和心肌细胞凋亡率,提示 DG 对 VMC 小鼠心肌的保护作用可能与增强 VMC 小鼠心肌自噬活性,抑制细胞凋亡有关。

在 VMC 中, CVB3 感染的心脏细胞中自噬体形成增加,但自噬通量被阻断,即自噬体不能与溶酶体有效融合,导致自噬体中积累的受损细胞器、病毒等无法被降解,进而损害心肌细胞<sup>[23]</sup>。AMPK/mTOR 自噬通路病毒与病毒感染过程密切相关,激活 AMPK/mTOR 自噬通路,可改善自噬通量,恢复自噬体与溶酶体的融合,促进自噬体内容物的降解,恢复自噬通路的完整,抑制病毒的复制<sup>[24-25]</sup>。且 AMPK/mTOR 自噬通路已被证实参与 VMC 进程, AMPK/mTOR 自噬通路的激活具有促进自噬体形成、诱导自噬通量恢复、减弱心肌细胞凋亡的功能<sup>[7]</sup>。本研究中, DG 可显著增加 VMC 心肌组织中 p-AMPK/AMPK 水平,降低 p-mTOR/mTOR 水平,结合 DG 可增加 LC3-II/I和 Beclin-1 蛋白表达,并降低 p62 蛋白表达,表明 DG 可促进 AMPK/mTOR 自噬通路活化。为探究 DG 的作用机制,采用 AMPK/mTOR 通路抑制剂 Compound C 和自噬激活剂雷帕霉素进行研究,结果显示, Compound C 可减弱 DG 对 VMC 小鼠的心肌保护作用及促进自噬作用,且在 CC 干预的基础上,给予雷帕霉素可以恢复 DG 对自噬的改善作用和对 VMC 小鼠的保护作用,提示 DG 对 VMC 小鼠心肌的保护作用可能是通过激活 AMPK/mTOR 通路,增强自噬活性实现的。综上, DG 可能通过激活 AMPK/mTOR 通路诱导自噬,减轻 VMC 小鼠心肌损伤。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Tschöpe C, Ammirati E, Bozkurt B, et al. Myocarditis and

inflammatory cardiomyopathy: Current evidence and future directions [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(3): 169-193.

[2] Rezkalla S H, Kloner R A. Viral myocarditis: 1917-2020: From the influenza A to the COVID-19 pandemics [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2021, 31(3): 163-169.

[3] Lasrado N, Reddy J. An overview of the immune mechanisms of viral myocarditis [J]. *Rev Med Virol*, 2020, 30(6): 1-14.

[4] Ho H T, Peischard S, Strutz-Seeböhm N, et al. Virus-host interactions of enteroviruses and parvovirus B19 in myocarditis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55(6): 679-703.

[5] Koenig A, Sateriale A, Budd R C, et al. The role of sex differences in autophagy in the heart during coxsackievirus B3-induced myocarditis [J]. *J Cardiovasc Trans Res*, 2014, 7(2): 182-191.

[6] Mohamud Y, Tang H, Xue Y C, et al. Coxsackievirus B3 targets TFEB to disrupt lysosomal function [J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 3924-3938.

[7] Gu X H, Li Y C, Chen K X, et al. Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate viral myocarditis through activating AMPK/mTOR-mediated autophagy flux pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13): 7515-7530.

[8] 冷芳. 小儿重症暴发性病毒性心肌炎采用甘草酸二铵注射液治疗的疗效及对检验指标的影响研究 [J]. *当代医学*, 2019, 25(2): 54-55.

[9] 文丹宁, 胡继川. 甘草酸二铵注射液治疗小儿重症暴发性病毒性心肌炎的疗效及对炎症因子、CK-MB 和肌钙蛋白的影响 [J]. *中国临床研究*, 2017, 30(2): 162-164.

[10] 王雪艳, 张旭东, 潘海洋. 甘草酸二铵联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(7): 1416-1420.

[11] 张明发, 沈雅琴. 甘草及甘草酸类成分抗病毒性肺炎的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(7): 1452-1468.

[12] 周外民, 赵富明, 李榜龙, 等. 甘草酸二铵在普通型新型冠状病毒肺炎患者治疗中的临床价值 [J]. *病毒学报*, 2020, 36(2): 160-164.

[13] 付新亮, 范迪, 刘乙兴, 等. 甘草酸二铵抗流感病毒的作用机制 [J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(2): 330-335.

[14] 石哲玮, 秦铖璠, 钱彩珍, 等. NF- $\kappa$ B 蛋白在柯萨奇病毒 B3 诱导的病毒性心肌炎小鼠心肌细胞焦亡过程中的调控作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(2): 240-245.

[15] 张晓蕾, 张凯, 秦永亨, 等. 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 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(5): 514-519.

- [16] Xiong R, Li N, Chen L, *et al.* STING protects against cardiac dysfunction and remodelling by blocking autophagy [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 109.
- [17] Liu T, Yang F, Liu J, *et al.* Astragaloside IV reduces cardiomyocyte apoptosis in a murine model of coxsackievirus B3-induced viral myocarditis [J]. *Exp Anim*, 2019, 68(4): 549-558.
- [18] Sinagra G, Porcari A, Gentile P, *et al.* Viral presence-guided immunomodulation in lymphocytic myocarditis: An update [J]. *Eur J Heart Fail*, 2021, 23(2): 211-216.
- [19] Li W, He P C, Huang Y G, *et al.* Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances [J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 222-256.
- [20] Meng Y W, Sun T L, Wu C J, *et al.* Calpain regulates CVB3 induced viral myocarditis by promoting autophagic flux upon infection [J]. *Microbes Infect*, 2020, 22(1): 46-54.
- [21] Hill S M, Wrobel L, Ashkenazi A, *et al.* VCP/p97 regulates Beclin-1-dependent autophagy initiation [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(4): 448-455.
- [22] Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease [J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352-1364.
- [23] Tian L, Yang Y Y, Li C Y, *et al.* The cytotoxicity of coxsackievirus B3 is associated with a blockage of autophagic flux mediated by reduced syntaxin 17 expression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 242.
- [24] Bhutta M S, Gallo E S, Borenstein R. Multifaceted role of AMPK in viral infections [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1118.
- [25] Wang X Y, Lin Y, Kemper T, *et al.* AMPK and Akt/mTOR signalling pathways participate in glucose-mediated regulation of hepatitis B virus replication and cellular autophagy [J]. *Cell Microbiol*, 2020, 22(2): e13131.

[责任编辑 李亚楠]