

· 实验研究 ·

柯里拉京对病毒性心肌炎小鼠 Toll 样受体 3 通路调控作用研究

朱智德¹, 卢健棋², 杨瑞霞³, 潘朝铤², 王庆高², 韩景波², 庞延², 陈文鹏¹, 蒋志雄¹
 (1 广西中医药大学, 南宁 530001; 2 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023;
 3 广西国际壮医医院, 南宁 530201)

【摘要】 目的: 探讨中药叶下珠有效成分之一柯里拉京对柯萨奇病毒 B3 (CVB3) 感染的心肌炎小鼠 Toll 样受体 3 (TLR3) 通路的影响。方法: 通过 CVB3 感染建立病毒性心肌炎小鼠模型, 不同浓度的柯里拉京和地塞米松给药干预后, 通过 ELISA、qPCR、Western blot、免疫组化等方法观察各组 TLR3 通路蛋白等的影响。结果: CVB3 感染可诱导心肌组织 TLR3 的表达上调, 柯里拉京 (10、20 和 40 mg·kg⁻¹) 剂量依赖性促进 TLR3 表达; 柯里拉京还以剂量依赖性降低 CVB3 处理后的白介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平 ($P < 0.05$), 但显著增高干扰素-β (interferon IFN-β) 水平以及含 TIR 结构域的衔接蛋白 (TRIF)、肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (TRAF3) 和干扰素调节因子 3 (IRF3) 表达 ($P < 0.05$); 地塞米松 (1 mg·kg⁻¹) 有相似的作用, 与柯里拉京 40 mg·kg⁻¹ 作用相当。结论: 柯里拉京可能通过上调 TLR3, 进而促进 IFN-β、TRIF、TRAF3 和 IRF3 表达及抑制 TNF-α 和 IL-6 含量, 发挥抗病毒性心肌炎作用。

【关键词】 柯里拉京; 病毒性心肌炎; 柯萨奇病毒; Toll 样受体 3 通路

【中图分类号】 R965 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1003-3734(2022)12-1209-06

Effect of corilagin on TLR3 pathway in mice with viral myocarditis

ZHU Zhi-de¹, LU Jian-qi², YANG Rui-xia³, PAN Chao-xin², WANG Qing-gao², HAN Jing-bo²,
 PANG Yan², CHEN Wen-peng¹, JIANG Zhi-xiong¹

(1 Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2 The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 3 Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530201, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of corilagin, one of the effective components of Phyllanthus urinaria, on TLR3 pathway in mice with Coxsackie virus B3 (CVB3)-infected myocarditis. **Methods:** The mouse model of viral myocarditis was established by CVB3 infection. After treatment with different concentrations of corilagin and dexamethasone, the effects of TLR3 pathway proteins in each group were observed by ELISA, qPCR, Western blot and immunohistochemistry. **Results:** CVB3 infection could induce the up-regulation of TLR3 expression in myocardial tissue, and corilagin (10, 20 and 40 mg·kg⁻¹) promoted TLR3 expression in a dose-dependent manner. Corilagin also decreased IL-6 and TNF-α after CVB3 treatment in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), but significantly increased IFN-β and the expression of TRIF, TRAF3 and IRF3 ($P < 0.05$). Dexamethasone (1 mg·kg⁻¹) had a similar effect, which was equivalent to that of corilagin 40 mg·kg⁻¹. **Conclusion:** Corilagin may play the role of antiviral myocarditis by up-regulating TLR3, further promoting the expression of IFN-β, TRIF, TRAF3 and IRF3, and decreasing the contents of TNF-α and IL-6.

【Key words】 corilagin; viral myocarditis; Coxsackie virus; toll like receptor 3 pathways

病毒性心肌炎为心肌炎中发病率最高的类型, 杂的疾病谱使其诊断和治疗成为临床上的一大难点^[1]。研究发现, 当病毒进入心肌细胞后, 机体开

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (81673891); 广西自然科学基金资助项目 (2017GXNSFAA198302)

【作者简介】 朱智德, 男, 博士, 主要从事中医药防治心血管疾病的研究。E-mail: 14650901@qq.com。

【通讯作者】 卢健棋, 男, 博士生导师, 教授, 主要从事中医药防治心血管疾病的研究。E-mail: lujianqi666@163.com。

始自行启动体液及细胞免疫,主要局部释放出炎症因子[如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、干扰素- β (IFN- β)等]发挥清除病毒的作用,但这种过度炎症激活同时也会诱导心肌损伤,由于心肌细胞再生能力有限,这种心肌细胞损伤是不可逆的^[2]。肠道病毒中的柯萨奇病毒 B3(CVB3)是引发病毒性心肌炎最常见的病原体,通常以直接损害心肌或过度激活机体自身免疫反应和炎症反应等方式引起局限性或弥漫性心肌病变,研究表明该病毒是病毒性心肌炎致病率最高的危险因素^[3-5]。目前病毒性心肌炎在药物治疗上主要运用以免疫球蛋白和免疫抑制剂为主的免疫调节剂,但免疫球蛋白价格高昂,而免疫抑制剂是否能明显提高患者生存率及改善左心室功能目前尚存在争议。故探索一种经济有效地治疗病毒性心肌炎的药物成为临床亟需解决的问题。

Toll样受体3(TLR3)是TLR家族的一员,在病毒性疾病的防治中发挥着重要作用,可通过调控其下游含TIR结构域的衔接蛋白(TRIF)、肿瘤坏死因子受体相关因子3(TRAF3)和干扰素调节因子3(IRF3)等蛋白控制IFN- β 、TNF- α 和IL-6等炎症因子的释放^[6]。现代药理学研究证明中药叶下珠具有良好的抗菌、抗病毒作用,但目前叶下珠治疗病毒性心肌炎的研究鲜有报道。柯里拉京为叶下珠有效成分之一,具有获取容易、提纯相对简单的特点。既往研究表明,柯里拉京具有抗炎、抗氧化、抗肝纤维化和通过调控TLR3途径抗单纯疱疹病毒性脑炎等作用,但是否具有调控TLR3通路发挥抗病毒性心肌炎的功效目前尚不明确^[7-12]。本研究通过建立CVB3感染小鼠心肌炎模型,分组给予不同浓度的柯里拉京及地塞米松干预后,观察各组TLR3通路蛋白的影响,深入研究柯里拉京干预病毒性心肌炎作用机制,以期为该药的临床应用提供科学的理论支持。

材料与方法

1 试药和试剂

柯里拉京(Sigma公司,货号:G0424);地塞米松(湖北创联康成药物化学有限公司,货号:50-02-2);Penicillin-Streptomycin(美国GIBCO公司,货号:15070-063);ELISA试剂盒(江莱生物公司,货号:JL18211, JL20219, JL10484, JL20268);磷酸盐缓冲液(源科生物公司,货号:G2002);牛血清白蛋白(BSA,上海生工公司,货号:D620272);HE染液(源科生物公司,货号:G2004);组化试剂盒二氨基联苯胺(DAB)显

色剂(DAKO公司,货号:K5007)。

2 仪器

5702R低速离心机(Eppendorf公司);JB-P5包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);KD-P组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);Eclipse E100正置光学显微镜(日本尼康公司);Nikon DS-U3成像系统(日本尼康公司)。

3 实验小鼠和病毒毒株

SPF级雄性小鼠,6~8周龄,体重(18 \pm 2)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0010。CVB3由山东大学临床医学院心内科实验室提供。

4 CVB3感染小鼠心肌炎模型建立及分组干预

36只小鼠适应喂养1周后随机分成6组,小鼠腹腔注射0.1mL的CVB3(100 TCID₅₀·只⁻¹),建立病毒性心肌炎小鼠模型,若小鼠出现烦躁、拱背、觅食减少、对刺激反应减弱则说明建模成功^[13]。对照组腹腔注射不含病毒的培养液。动物分组及干预:对照组、模型组、柯里拉京低剂量组(10 mg·kg⁻¹)、柯里拉京中剂量组(20 mg·kg⁻¹)、柯里拉京高剂量组(40 mg·kg⁻¹)、地塞米松组(阳性对照,1 mg·kg⁻¹)。柯里拉京用药剂量参照课题组前期研究^[14]。病毒感染2h内腹腔注射柯里拉京或地塞米松,给药1周,取心肌组织。

5 ELISA检测

组织取材切割标本后,经过称重、融化、匀浆、离心,收集上清,将样品加入酶标板孔,在经过加酶、温育等操作,以空白孔调零,在450nm波长下依序测量各孔的吸光度(OD值)。根据标准曲线及ELISA检测试剂盒的使用说明检测心肌组织中的IFN- β 、TNF- α 和IL-6含量。

6 荧光定量PCR(qPCR)检测

取各组心肌组织参照Trizol法提取RNA,通过逆转录反应体系后,用microRNA loop primer反转录成的cDNA后进行qPCR检测。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。引物序列:Mouse GAPDH(内参):上游:5'-TCAAGAAGGTGGTGAAG-CAGG-3',下游:5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3',片段长度:115 bp。TLR3:上游:5'-GTGAGATA-CAACGTAGCTGACTG-3',下游:5'-TCCTGCATCCAA-GATAGCAAGT-3',片段长度:162 bp;TRIF:上游:5'-ACAAGTACAACCTCCGTCATACCC-3',下游:5'-GC-

CTCTCAAATACAGACTCCCG-3', 片段长度: 159 bp; TRAF3: 上游: 5'-CAGCCTAACCCACCCCTAAAG-3', 下游: 5'-CGGCACTTCTCGCACTTGT-3', 片段长度: 128 bp; IRF-3: 上游: 5'-GAGAGCCGAACGAGGT-TCAG-3', 下游: 5'-CTTCCAGTTGACACGTCCG-3', 片段长度: 147 bp。数据以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行各基因表达相对定量分析。

7 Western blot 检测

取心肌组织, 在液氮环境中淹为组织液后, 使用 RIPA 裂解液处理组织液, 取部分上清蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 经过灌胶、电泳、调整蛋白浓度、转印蛋白及免疫检测, 使用 Image J 1.52a 对条带进行定量分析, 各指标灰度值通过 β -肌动蛋白 (β -actin) 均一化后, 计算蛋白相对表达量。

8 心肌组织 TLR3 免疫组化检测

心肌组织包埋切片, 抗原修复, 封闭, 一抗孵育, 二抗孵育, DAB 显色, 复染核, 封片, 显微镜观察拍照。

9 心肌组织 HE 染色

取心肌组织切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化,

自来水冲洗后进行 HE 染色, 最后梯度乙醇脱水, 透明、中性树脂封片, 并用显微镜镜检病理学改变, 进行图像采集并分析。

10 统计学方法

实验数据采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间比较用 t 检验, 组间差异用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

结 果

1 ELISA 检测各组小鼠心肌组织 IFN- β , TNF- α 和 IL-6 含量结果

柯里拉京组 (10, 20 和 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及地塞米松组 (1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 显著降低 CVB3 处理后 IL-6 和 TNF- α 水平, 且炎症因子水平与柯里拉京剂量呈负性相关 ($P < 0.05$); 地塞米松组含量除对照组外最低 ($P < 0.05$); 柯里拉京及地塞米松能显著增高 IFN- β 水平 ($P < 0.05$); 柯里拉京 (20 和 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组显著高于地塞米松组 ($P < 0.05$); 地塞米松组 IFN- β 含量高于柯里拉京 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 ($P < 0.05$), 详见表 1。

表 1 各组小鼠心肌组织 IFN- β , TNF- α 和 IL-6 含量结果

$\bar{x} \pm s$ $n = 6$

组别	IL-6 含量/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	TNF- α 含量/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	IFN β 含量/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照组	55.44 \pm 10.22	100.93 \pm 5.61	33.79 \pm 2.82
CVB3 组	152.75 \pm 12.17 ^a	621.88 \pm 35.16 ^a	64.97 \pm 5.93 ^a
柯里拉京低剂量组	134.34 \pm 5.19 ^{ab}	485.22 \pm 33.12 ^{ab}	80.57 \pm 1.50 ^{ab}
柯里拉京中剂量组	103.87 \pm 9.55 ^{abc}	421.75 \pm 35.62 ^{abc}	119.48 \pm 6.48 ^{abc}
柯里拉京高剂量组	79.94 \pm 19.07 ^{abcd}	338.09 \pm 31.08 ^{abcd}	142.95 \pm 14.13 ^{abcd}
地塞米松干预组	58.95 \pm 7.90 ^{abcde}	155.4 \pm 49.52 ^{abcde}	91.09 \pm 12.23 ^{abcde}

与对照组比较 a: $P < 0.05$; 与 CVB3 感染组比较 b: $P < 0.05$; 与柯里拉京低剂量组比较 c: $P < 0.05$; 与柯里拉京中剂量组比较 d: $P < 0.05$; 与柯里拉京高剂量组比较 e: $P < 0.05$ (下同)

2 各组小鼠心肌组织 TLR3, TRIF, TRAF3 和 IRF3 的 mRNA 表达结果

CVB3 感染可诱导小鼠心肌组织 TLR3 的 mRNA 表达上调, 柯里拉京 (10, 20 和 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 以剂量依赖性促进 TLR3 表达; 柯里拉京还以剂量依赖性增

高 TRIF, TRAF3 和 IRF3 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 地塞米松组 TLR3, TRIF 和 TRAF3 的 mRNA 表达与柯里拉京高剂量组比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 IRF3 的 mRNA 表达显著低于柯里拉京高剂量组 ($P < 0.05$), 详见表 2。

表 2 各组小鼠心肌组织 TLR3, TRIF, TRAF3 和 IRF3 mRNA 表达结果 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

$\bar{x} \pm s$ $n = 6$

组别	TLR3 含量	TRIF 含量	IRF3 含量	TRAF3 含量
对照组	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.04
CVB3 组	0.77 \pm 0.05 ^a	1.19 \pm 0.12 ^a	1.22 \pm 0.21 ^a	0.83 \pm 0.16 ^a
柯里拉京低剂量组	1.10 \pm 0.08 ^{ab}	3.56 \pm 0.69 ^{ab}	1.97 \pm 0.22 ^{ab}	0.94 \pm 0.07 ^{ab}
柯里拉京中剂量组	2.88 \pm 0.36 ^{abc}	5.39 \pm 0.47 ^{abc}	3.01 \pm 0.31 ^{abc}	1.27 \pm 0.18 ^{abc}
柯里拉京高剂量组	4.93 \pm 1.05 ^{abcd}	5.97 \pm 0.56 ^{abcd}	11.71 \pm 2.27 ^{abcd}	2.61 \pm 0.37 ^{abcd}
地塞米松干预组	6.51 \pm 0.43 ^{abcd}	5.58 \pm 0.43 ^{abcd}	4.53 \pm 0.39 ^{abcde}	2.75 \pm 0.86 ^{abcd}

3 各组小鼠心肌组织 TLR3 ,TRIF ,TRAF3 和 IRF3 蛋白表达结果

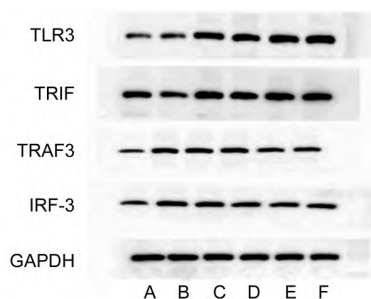
CVB3 感染可诱导小鼠心肌组织 TLR3 的蛋白表达上调 柯里拉京(10 20 和 40 mg·kg⁻¹) 地塞米松以剂量依赖性促进 TLR3 表达 (P < 0.05); 柯里拉京还

以剂量依赖性增高 TRIF ,TRAF3 和 IRF3 的蛋白表达 (P < 0.05); 地塞米松组 TLR3 ,TRIF ,TRAF3 的蛋白表达水平与柯里拉京高剂量组比较无统计学意义 (P > 0.05) ,但地塞米松组 IRF3 的蛋白表达显著低于柯里拉京高剂量组 (P < 0.05) ,见表 3 和图 1。

表 3 各组小鼠心肌组织 TLR3 ,TRIF ,TRAF3 和 IRF3 蛋白表达结果

$\bar{x} \pm s$ n = 6

组别	TLR3 含量	TRIF 含量	IRF3 含量	TRAF3 含量
对照组	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.07
CVB3 组	1.21 ± 0.06 ^a	0.85 ± 0.06 ^a	1.63 ± 0.06 ^a	1.69 ± 0.06 ^a
柯里拉京低剂量组	2.78 ± 0.09 ^{ab}	1.38 ± 0.08 ^{ab}	1.92 ± 0.10 ^{ab}	2.23 ± 0.17 ^{ab}
柯里拉京中剂量组	2.98 ± 0.11 ^{abc}	1.56 ± 0.05 ^{abc}	2.45 ± 0.06 ^{abc}	2.69 ± 0.09 ^{abc}
柯里拉京高剂量组	3.64 ± 0.11 ^{abcd}	1.60 ± 0.06 ^{abcd}	3.72 ± 0.08 ^{abcd}	2.86 ± 0.12 ^{abcd}
地塞米松干预组	4.16 ± 0.12 ^{abcd}	1.66 ± 0.05 ^{abcd}	2.95 ± 0.09 ^{abcde}	2.6 ± 0.08 ^{abcd}



A: 对照组; B: CVB3 组; C: 柯里拉京低剂量组; D: 柯里拉京中剂量组; E: 柯里拉京高剂量组; F: 地塞米松干预组

图 1 各组小鼠心肌细胞 TLR3 ,TRIF ,TRAF3 和 IRF3 蛋白表达结果

4 各组小鼠组织 TLR3 免疫组化结果

免疫染色阳性产物主要为蓝色颗粒 ,多表达在炎症病灶内浸润淋巴细胞、单核细胞及周围的心肌细胞。正常对照组心肌纤维结构清楚 ,偶见弱阳性表达于细胞核; 模型组与柯里拉京低、中剂量组相似 ,心肌纤维结构稍紊乱 ,灶状阳性表达细胞核或细胞质; 地塞米松阳性对照组及柯里拉京高剂量组相似 ,呈弥漫性阳性表达于细胞核和细胞质; CVB3 感染可诱导 TLR3 的表达上调 柯里拉京促进 TLR3 表达呈剂量依赖性 ,高剂量组与地塞米松组能够几乎同等限度地上调 TLR3 表达 ,见图 2。

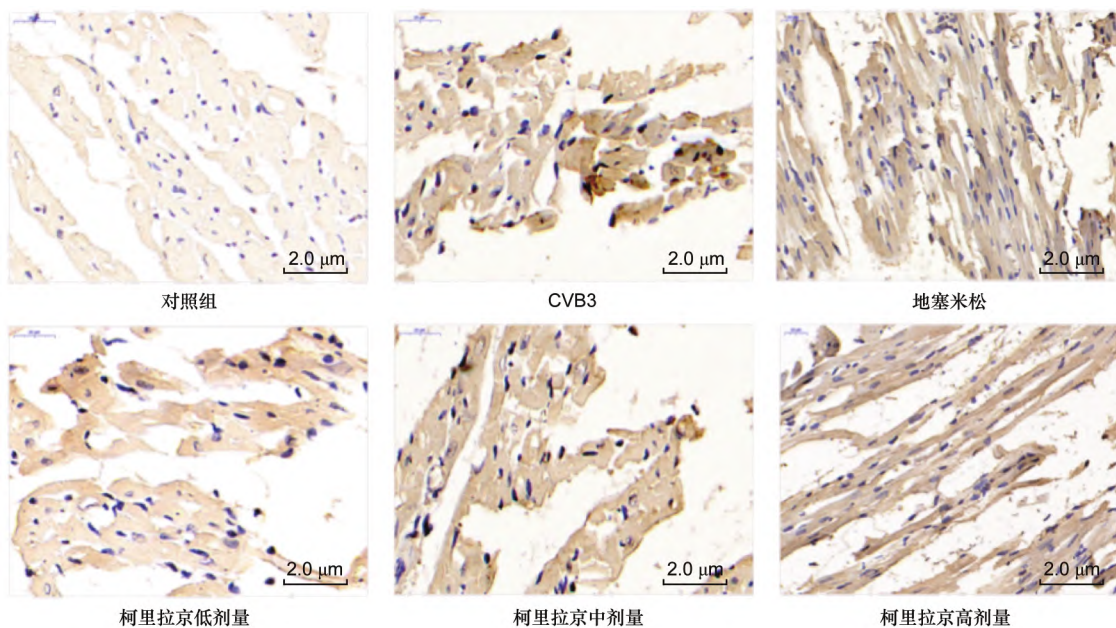


图 2 各组小鼠心肌组织 TLR3 免疫组化结果(× 400)

5 各组小鼠组织 HE 染色结果

与对照组相比,模型组的小鼠心肌组织的细胞核密集堆积,细胞边界不清晰,提示心肌细胞的损伤;与模型相比较,柯里拉京低、中、高剂量组(10、

20 和 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 小鼠心肌细胞损伤的改善效果呈现一定的剂量依赖性,柯里拉京组的高剂量组(40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 与地塞米松组(1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 几乎同等限度地改善心肌细胞损伤程度。HE 染色结果见图 3。

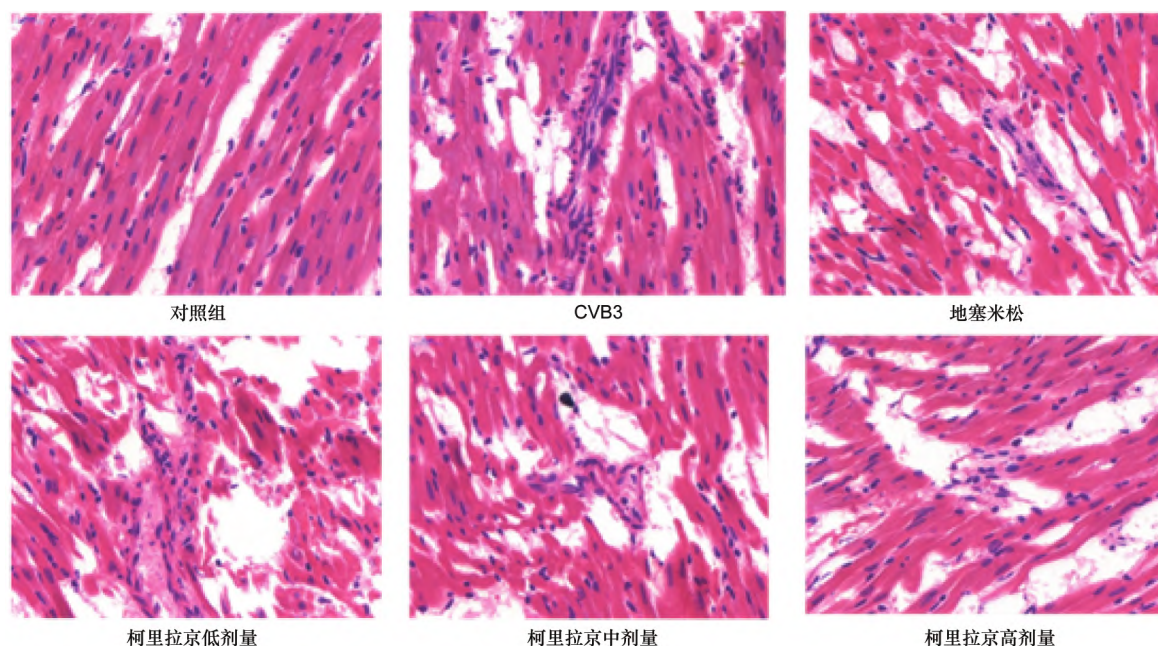


图3 各组小鼠组织 HE 染色结果

讨论

中医学认为病毒性心肌炎属“心痹”范畴,缘由外感温热病邪,或因手术等创伤,温毒之邪乘虚而入,内舍于心,损伤心之肌肉、内膜,以发热、心悸、胸闷为主要表现,病位在心,通常涉及肺脏、脾脏、肾脏,病机为外感风热、湿热邪毒,正气受损,病性为本虚标实^[15]。中医药防治病毒性心肌炎方面有其独特的优势,中药叶下珠性寒,味微苦,有平肝清热、利水解毒之效,具有良好的抗乙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒疗效^[16]。柯里拉京为一种水溶性鞣质,是中药叶下珠的有效成分之一,具有较强的抗炎、抗氧化、保肝和抗肿瘤等药理活性^[16]。本研究通过动物实验深入发掘中药叶下珠在病毒性心肌炎中的治疗潜力,并进一步阐释其有效成分柯里拉京发挥作用的干预机制。

目前普遍认为病毒性心肌炎的发病与病毒直接损害心肌及机体的过度炎症反应关系密切^[1]。有研究报道, CVB3 是一种细胞溶解病毒,可对心脏细胞造成损害,由于心肌细胞再生能力有限,虽然抗病毒免疫反应(T 细胞和抗体)可能清除病毒,但不能

完全修复心肌细胞的损害^[18]。在此过程中,由于病毒损伤而释放的细胞内或表面抗原有可能成为自身免疫靶点,从而诱导致病的自身反应性 T 细胞或自身抗体,且死亡的心脏细胞也有可能被常驻的抗原提呈细胞所吞噬,并通过交叉启动触发自身免疫反应。在上述情况下,随着炎症的发生,由于抗原表位的扩展,新的抗原可能会周期性地释放出来。这种恶性循环的延续可能是 CVB3 感染慢性心肌炎发生的关键机制之一。故在病毒性心肌炎的急性进展过程中,控制过强的炎症反应是减少心肌组织进行性损害、降低急性期死亡率的一种可行性手段。Toll 样受体(TLR)是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,而 TLR3 作为 Toll 样受体家族的一员在抗病毒免疫反应中发挥重要作用。有研究显示, TLR3 基因敲除的小鼠感染 CVB3 后与对照组相比其死亡率、病毒复制及心脏损伤程度均有升高^[19]。TLR3 与能诱导产生 $\text{INF-}\beta$ 的 TRIF 结合可导致核因子- κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) 的激活进而调控炎症因子的表达^[20]。研究发现,敲除 TRIF 的病毒性心肌炎小鼠的疾病程度更加明显,缺乏 TRIF 可导致经典的 TH2 免疫反应从而影响心肌炎的进展^[21]。TLR3 与 TRIF 结合也

可通过 TRAF3 诱导 IRF3 并刺激 IFN- β 的表达,以此在抗感染免疫中发挥作用。TRAF3 是 I 型干扰素产生和天然抗病毒反应的主要调节因子,在 Toll 样受体依赖和非依赖抗病毒应答中具有关键作用^[22]。干扰素具有抗病毒、免疫调节、抗肿瘤等作用,研究表明 IFN- α 和 IFN- β 对治疗人类病毒性心肌炎具有重要意义,而 IRF3 是干扰素调节因子家族成员之一,与病毒感染时干扰素的表达密切相关^[23]。激活 IRF3 信号通路可表现出对 CVB3 感染的抗病毒活性^[24]。

本研究通过 CVB3 感染构建心肌炎小鼠模型,以不同浓度的柯里拉京及地塞米松给药开展实验,免疫组化结果显示, CVB3 感染可诱导心肌组织 TLR3 的表达上调,柯里拉京(10、20 和 40 mg·kg⁻¹)以剂量依赖性促进 TLR3 表达,柯里拉京高剂量组(40 mg·kg⁻¹)与地塞米松组(1 mg·kg⁻¹)能够几乎同等程度上调 TLR3 表达;柯里拉京还以剂量依赖性降低 CVB3 处理后的 IL-6 和 TNF- α 水平($P < 0.05$),但显著增高 IFN- β 水平以及 TRIF、TRAF3 和 IRF3 表达($P < 0.05$),地塞米松(1 mg·kg⁻¹)有相似的作用;病理结果显示柯里拉京低、中、高剂量组(10、20 和 40 mg·kg⁻¹)对小鼠心肌细胞损伤的改善效果呈现一定的剂量依赖性,柯里拉京组的高剂量组(40 mg·kg⁻¹)与地塞米松组(1 mg·kg⁻¹)几乎同等程度地改善心肌细胞损伤程度。由此推测柯里拉京可能通过上调 TLR3,进而促进 IFN- β 、TRIF、TRAF3 和 IRF3 表达以及抑制 TNF- α 和 IL-6 含量,发挥抗病毒性心肌炎作用。此外, CVB3 所致病毒性心肌炎发病机制不单只有 TLR3 信号通路,本研究仅基于动物实验初步研究柯里拉京对病毒性心肌炎 TLR3 信号通路上调表达,然而各个信号通路之间关系较为繁杂,在抑制 TLR3 通路的同时有可能对其他信号通路产生影响,对此课题组仍需深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] 陈瑞珍. 病毒性心肌炎后扩张型心肌病的临床认知[J]. 临床心血管病杂志, 2022, 38(2): 85-87.
- [2] AMMIRATI E, FRIGERIO M, ADLER ED, et al. Management of acute myocarditis and chronic inflammatory cardiomyopathy: an expert consensus document[J]. *Circ Heart Fail*, 2020, 13(11): e007405.
- [3] 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.
- [4] DABA TM, ZHAO Y, PAN ZW. Advancement of mechanisms of

Coxsackie virus B3-induced myocarditis pathogenesis and the potential therapeutic targets[J]. *Curr Drug Targets* 2019 20(14): 1461-1473.

- [5] SHAUER A, GOTSMAN I, KEREN A, et al. Acute viral myocarditis: current concepts in diagnosis and treatment[J]. *Isr Med Assoc J*, 2013, 15(3): 180-185.
- [6] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(5): 373-384.
- [7] LIU FC, YU HP, CHOU AH, et al. Corilagin reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity through MAPK and NF- κ B signaling pathway in a mouse model[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5597-5607.
- [8] LI LJ, ZHANG SJ, LIU P, et al. Corilagin interferes with toll-like receptor 3-mediated immune response in Herpes simplex encephalitis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12: 83.
- [9] LI HR, LIU J, ZHANG SL, et al. Corilagin ameliorates the extreme inflammatory status in Sepsis through TLR4 signaling pathways[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 18.
- [10] TONG F, ZHANG J, LIU L, et al. Corilagin attenuates radiation-induced brain injury in mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 6982-6996.
- [11] GUO YJ, LUO T, WU F, et al. Corilagin protects against HSV1 encephalitis through inhibiting the TLR2 signaling pathways *in vivo* and *in vitro*[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1547-1560.
- [12] HUANG YF, ZHANG SL, JIN F, et al. Activity of corilagin on post-parasiticide liver fibrosis in Schistosomiasis animal model[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013, 26(1): 85-92.
- [13] XIAO YF, LIU TL, LIU XL, et al. Total Astragalus saponins attenuates CVB3-induced viral myocarditis through inhibiting expression of tumor necrosis factor α and Fas ligand[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2019, 9(4): 337-345.
- [14] LI YQ, WANG YJ, CHEN YF, et al. Corilagin ameliorates atherosclerosis in peripheral artery disease via the toll-like receptor-4 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1611.
- [15] Society of Cardiovascular Diseases, China Association of Chinese Medicine. 国际中医临床实践指南·病毒性心肌炎[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 91-97.
- [16] 程艳刚, 裴妙荣, 孔祥鹏, 等. 叶下珠化学成分和药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(4): 238-242.
- [17] 尹可欢, 罗晓敏, 丁翼, 等. 余甘子及其活性成分肝保护作用及机制的研究进展[J]. 中草药, 2022, 53(1): 295-307.
- [18] LASRADO N, REDDY J. An overview of the immune mechanisms of viral myocarditis[J]. *Rev Med Virol*, 2020, 30(6): 1-14.
- [19] HARDARSON HS, BAKER JS, YANG Z, et al. Toll-like receptor 3 is an essential component of the innate stress response in virus-induced cardiac injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(1): H251-H258.
- [20] 刘婧, 刘水平, 古力娜尔·库尔班, 等. Toll 样受体 3 信号通路在人类病毒性心肌炎心肌细胞凋亡及炎症反应中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 404-407.
- [21] ABSTON ED, CORONADO MJ, BUCEK A, et al. Th2 regulation of viral myocarditis in mice: different roles for TLR3 versus TRIF in progression to chronic disease[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012: 129486.
- [22] OGANESYAN G, SAHA SK, GUO BC, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and-independent antiviral response[J]. *Nature*, 2006, 439(7073): 208-211.
- [23] LI L, SHERRY B. IFN- α expression and antiviral effects are subtype and cell type specific in the cardiac response to viral infection[J]. *Virology*, 2010, 396(1): 59-68.
- [24] SONG JH, AHN JH, KIM SR, et al. Manassantin B shows antiviral activity against coxsackievirus B3 infection by activation of the STING/TBK-1/IRF3 signalling pathway[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9413.

编辑: 刘卓越/接受日期: 2021-10-29