NF－κB 对病毒性心肌炎小鼠心肌中促炎细胞因子的调控

薛陆静 潘海燕

摘 要 目的 探讨核因子－κB(NF－κB)对 A 型流感病毒(IAV)性心肌炎小鼠心肌中促炎细胞因子的调控作用。**方法** 30 只 8 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分 3 组:①正常对照组(C 组):经鼻吸入 15μl 生理盐水;②感染对照组(I 组):经鼻吸入 40 空斑形成单位(pfu)IAV;③PDTC 组(P 组):经鼻吸入 40pfu IAV,腹腔注射 NF－κB 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸(PDTC)(10mg/kg),每天 1 次。感染后第 9 天处死小鼠,切取心脏组织进行病理及生化检查。**结果** IAV 感染可诱导心肌中促炎细胞因子白介素(IL)－1β、IL－6 及肿瘤坏死因子(TNF)α 显著上调($P<0.01$,$P<0.05$),引发心肌急性炎性反应,部分心肌组织坏死。PDTC 显著抑制促炎细胞因子在心肌中表达($P<0.01$),有效抑制 IAV 病毒复制($P<0.01$),减轻心肌炎性反应。**结论** IAV 感染心肌组织后可能通过 NF－κB 信号通路诱导心肌中促炎细胞因子表达上调,抑制 NF－κB 激活可能为预防和治疗流感病毒性心肌炎提供新的思路。

关键词 A 型流感病毒 病毒性心肌炎 核因子－κB 促炎细胞因子

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.011

Regulation of Proinflammatory Cytokine Expression by NF－κB in Viral Myocarditis. *Xue Lujing, Pan Haiyan. Department of Cardiology, Xixi Hospital of Hangzhou, Zhejiang 310023, China*

Abstract Objective To investigate the regulatory effects of nuclear factor (NF)－κB on the expression of proinflammatory cytokines in influenza A virus (IAV)－induced myocarditis. **Methods** Thirty male BALB/c mice of 8 weeks old were randomly divided into 3 groups:①Normal control group (group C):15μL saline with nasal inhalation;②Infection control group (group I): infected intranasally with 40 plaque formation unit (pfu) IAV;③PDTC group (group P): infected intranasally with 40 pfu IAV and injected intraperitoneally with NF－κB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamic acid (PDTC)(10mg/kg), once daily. The mice were euthanized at 9 days after infection and the heart tissue was taken for pathological and biochemical examination. **Results** IAV infection induced significant up－regulation of proinflammatory cytokines (IL)－1β, IL－6 and tumor necrosis factor(TNF) α in myocardium ($P<0.01$, $P<0.05$), and triggered acute myocarditis, and some myocardial necrosis. PDTC significantly inhibited the expression of proinflammatory cytokines ($P<0.01$), and effectively suppressed the IAV replication($P<0.01$), and myocardial inflammatory response. **Conclusion** IAV infection induces up－regulation of proinflammatory cytokines in myocardium might through the NF－κB signaling pathway inhibiting activation of NF－κB may provide new thinking for the prevention and treatment of influenza induced myocarditis.

Key words Influenza A virus; Viral myocarditis; Nuclear factor－κB; Pro－inflammatory cytokines

病毒性心肌炎是临床常见疾病,可造成心肌组织实质性损害,治疗不及时易导致严重心律失常、心力衰竭甚至休克与猝死等严重后果。A 型流感病毒(influenza A virus,IAV)对心肌的亲嗜性虽不及科萨奇病毒等,由于人群 IAV 感染率高,由其引发的心肌炎并不少见,甚至部分心肌炎患者进展为扩张型心肌病,近些年对 IAV 引发心肌炎的研究越来越多[1,2]。

研究发现,IAV 感染小鼠心肌组织后其心肌中异位胰蛋白酶显著上调,而上调的异位胰蛋白酶可促进流感病毒的感染和复制,诱导炎性细胞因子释放及激活金属蛋白酶－9 从而触发急性炎性反应[3]。在胰蛋白酶基因的启动区,有核因子－κB(NF－κB)的结合位点,NF－κB 是多种信号通路的关键下游,促炎细胞因子 IL－1β、IL－6 及 TNF－α 等均可通过其受体通路激活 NF－κB,诱导各种细胞因素的表达[4]。本研究通过抑制 NF－κB 激活,探讨 NF－κB 对 IAV 诱导性心肌炎组织中促炎细胞因子表达的调控作用。

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81100154)

作者单位:310023 杭州市西溪医院心内科(薛陆静);226001 南通大学附属医院心内科(潘海燕)

通讯作者:潘海燕,电子信箱:dr.phy@qq.com

材料与方法

1. 材料：8 周龄雄性 BALB/c 小鼠 30 只，SPF 级。A 型流感病毒购自于美国 ATCC 公司。吡咯烷二硫代氨基甲酸（PDTC）购自美国 Sigma－Aldrich 公司。TRNzol 总 RNA 提取试剂及 Quant cDNA 第一链合成试剂盒，Taq PCR Master Mix 购自北京天根生化科技有限公司。β－actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成。β－actin、IL－1β、IL－6、TNF－α 一抗及二抗均购自美国 Santa Cruz 公司。

2. 心肌炎模型：30 只 BALB/c 雄性小鼠按每组 10 只随机分为 3 组：正常对照组（C 组）、感染对照组（I 组）、PDTC 组（P 组），10% 水合氯醛（0.3ml/100g）麻醉小鼠后，C 组经鼻吸入 15μl 无菌生理盐水假感染，I 组、P 组分别经鼻吸入 40 空斑形成单位（pfu）IAV（溶于 15μl 无菌生理盐水）感染 IAV。P 组腹腔注射 200μl PDTC（10mg/kg），每日 1 次，C 组、I 组每日腹腔注射 200μl 生理盐水，连续 9 天。所有小鼠常规饲养，感染第 9 天麻醉处死小鼠，切取小鼠心脏进行后续研究。

3. 统计学方法：应用 Sigma stat 3.5 统计学软件进行统计分析，数据符合正态分布为计量资料，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间数据采用单因素方差分析，组间两两多重比较采用 q 检验（*SNK* 法），以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 各组心肌组织炎症程度：小鼠被病毒感染第 9 天麻醉后处死，切取心脏组织，应用 HE 染色方法，显微镜下观察发现，C 组小鼠心肌细胞排列整齐，未见炎性细胞浸润；I 组小鼠心肌细胞排列紊乱，细胞间质可见大量炎性细胞浸润，部分心肌细胞出现坏死；P 组心肌间质炎性细胞浸润程度与 I 组比较明显减轻，细胞排列紊乱改善，未见心肌细胞坏死灶（图 1）。

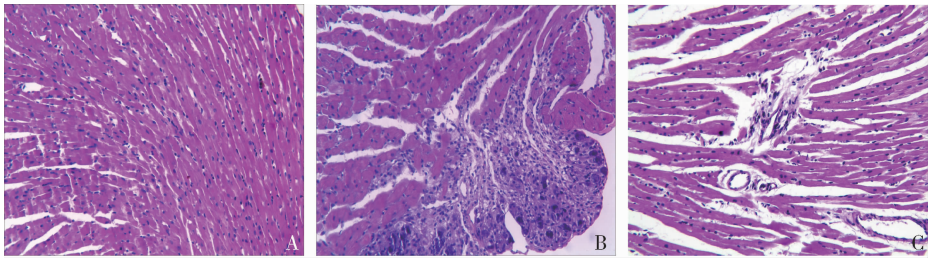

图 1　各组心肌组织炎症情况比较（HE，×200）

A. C 组；B. I 组；C. P 组

2. 各组心肌组织中病毒非结构蛋白（NS）－1 表达：C 组心肌组织中未检测到病毒 NS－1 基因，I 组、P 组均能检测到 NS－1 基因。与 I 组比较，P 组小鼠心肌组织中病毒 NS－1 基因表达被显著抑制（$P<0.01$，图 2）。

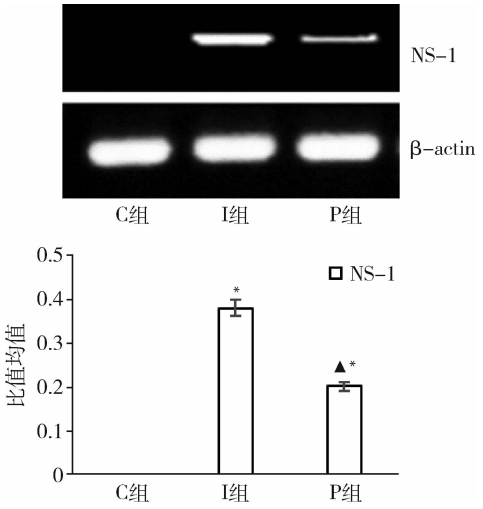

图 2　各组心肌组织中 NS－1 基因表达

与 C 组比较，* $P<0.01$；与 I 组比较，▲ $P<0.01$

3. 各组促炎细胞因子的表达：与 C 组比较，I 组及 P 组小鼠心肌组织中 IL－1β、IL－6、TNF－α 表达显著上调（$P<0.01$，$P<0.05$），与 I 组比较，P 组 IL－1β、IL－6、TNF－α 表达上调被显著抑制（$P<0.01$，图 3）。

讨　　论

核因子－κB（NF－κB）是一种重要的核转录因子，在心肌细胞、血管内皮细胞等细胞内广泛存在，活化的 NF－κB 可以调节多种炎性相关因子如趋化因子、细胞黏附分子、细胞因子等基因的转录[5~7]。NF－κB 在体内炎性反应过程中起核心作用，促进下游炎性连锁反应，引起大量促炎细胞因子释放，引起细胞损伤[8,9]。NF－κB 二聚体常结合其抑制蛋白 I－κB，以无活性形式存在，细胞受刺激后，NF－κB 与其抑制蛋白解离，从而激活 NF－κB [10]。孙景辉等[11]提示，病毒性心肌炎病毒感染 7 天后，NF－κB 活性可继续增强，并且与心肌组织病理积分呈正相关，单纯阻断促炎细胞因子表达，对病毒性心肌炎治疗效果欠佳，可能与激活 NF－κB 促使促炎细胞因子

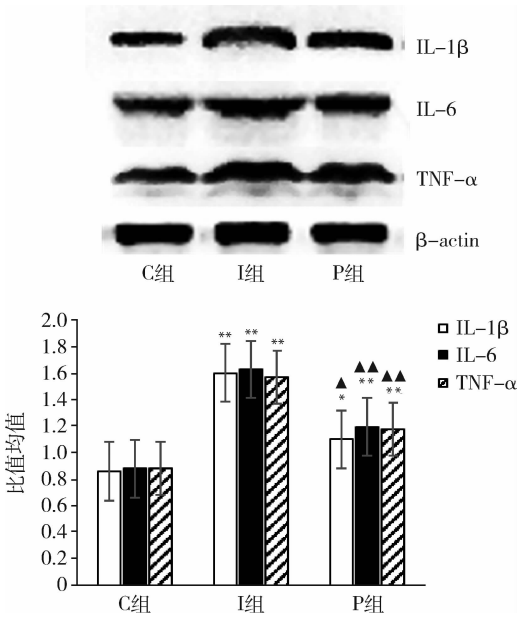

图 3　各组促炎细胞因子的表达

与 C 组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 I 组比较，$^{▲}P<0.05$，$^{▲▲}P<0.01$

(IL－1β、IL－6 及 TNF－α)过表达进一步损伤心肌组织相关。

PDTC 是一种氨基甲酸盐类抗氧化剂，清除活性氧中间产物而发挥抗氧化作用，它通过阻断 I－κB 的从头磷酸化，抑制 I κB 的降解失活，从而阻止 NF－κB 活化入核，抑制 NF－κB 的激活，是实验研究中人们常用的 NF－κB 抑制剂[12~17]。Nimmerjahn 等[18]发现激活 NF－κB 信号通路是感染流感病毒的先决条件，NF－κB 低激活状态对病毒流感病毒有抵御作用，其抑制剂 PDTC 可有效抑制 IAV RNA 的转录复制及细胞组织损伤。有研究显示肉桂醛可通过抑制病毒性心肌炎小鼠体内 TLR4－NF－κB 信号转导通路从而抑制病毒性心肌炎进展[19]。本研究发现，NF－κB 抑制剂 PDTC 能够显著抑制心肌组织中促炎细胞因子 IL－1β、IL－6 及 TNF－α 表达上调，抑制 IAV 在心肌组织中复制，有效减轻心肌炎症浸润程度。

目前临床上对 A 型流感病毒性心肌炎还没有特的效治疗方法。本研究提示，PDTC 特异性抑制 NF－κB 活性能够抑制炎性因子(IL－1β、IL－6 及 TNF－α)表达、减轻心肌炎性反应，为预防和治疗流感病毒性心肌炎提供新的思路。但本研究中还有局限性，转录因子 NF－κB 位于多种信号通路如 Toll 样受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶信号通路等的最下游，IAV 感染后经由哪些通路下传引发 NF－κB 的激活还不清楚，有待于进一步研究[20~22]。

参考文献

1　潘海燕，薛陆静，王逸平，等. NF－κB 和 AP－1 对 A 型流感病毒性心肌炎组织中异位胰蛋白酶及促炎细胞因子表达的调控[J]. 中国病理生理杂志，2015，31(5)：791－796

2　Ari Pollack，Amy R，Kontorovich，*et al*. Viral myocarditis－－diagnosis，treatment options，and current controversies[J]. Nat Rev Cardiol，2015，12(11)：670－680

3　Pan HY，Yamada H，Chida J，*et al*. Up－regulation of ectopic trypsins in the myocardium by influenza A virus infection triggers acute myocarditis[J]. Cardiovasc Res，2011，89(3)：595－603

4　阮妙华，王凯，王丹，等. 病毒性心肌炎小鼠心肌中 MMP－2 和 NF－κB 的表达[J]. 中国病理生理杂志，2016，32(9)：1704－1707，1712

5　郑妩媚，初海平，王燕，等. 力竭运动后不同时相大鼠心肌 p－p38MAPK、NF－κB、COX－2 表达的动态变化[J]. 中国应用生理学杂志，2016，32(1)：88－91

6　周琴，张勤，李光乾，等. PDTC 对惊厥持续状态大鼠海马细胞凋亡及 TLR4、caspase－3 表达的影响[J]. 浙江医学，2016，38(9)：598－602

7　Yu XJ，Zhang DM，Jia LL，*et al*. Inhibition of NF－κB activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress.[J]. Toxicol Appl Pharmacol，2015，284(3)：315－322

8　钟飞，李双杰，王佐，等. 核因子－κB 活化在小鼠 CVB3 病毒性心肌炎的病理作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报，2008，28(4)：13－16

9　雷蕾，郑智，潘友民. CVB3 易感性小鼠病毒性心肌炎炎症反应[J]. 中国分子心脏病学杂志，2014，14(3)：966－969

10　梁英健，李鑫，张晓娟，等. NF－κB 在脓毒症血浆诱导的内皮细胞损伤和凋亡中的作用[J]. 中国病理生理杂志，2013，29(8)：1508－1511

11　孙景辉，翟淑波，刘慧强. 核因子 κB 在病毒性心肌炎小鼠发病中的作用[J]. 临床儿科杂志，2008，26(3)：233－236

12　付利，李业成，苏毅，等. NF－κB 抑制剂 PDTC 对人白血病 Jurkat 细胞凋亡及 MMP－9 表达的影响[J]. 中国生化药物杂志，2014，34(8)：8－11

13　陈章荣，吴新华，罗开良，等. PDTC 对大鼠心肌梗死后 NF－κB 与 MMP－2 表达及心肌胶原重塑的影响[J]. 重庆医学，2013，42(25)：3004－3007

14　S Wang，LT Quang，J Chida，*et al*. Mechanisms of matrix metalloproteinase－9 upregulation and tissue destruction in various organs in influenza A virus infection[J]. J Med Invest，2010，57(12)：26－34

15　牟鑫煜，张寰. PDTC 对高血压大鼠继发左心室肥厚及心力衰竭的作用[J]. 天津医药，2015，43(9)：992－995

16　高姗，贾俊亚，闫铁昆，等. 吡咯烷二硫代甲酸铵对糖尿病肾病大鼠肾小管间质炎症分子表达及自噬的影响[J]. 中华医学杂志，2016，96(44)：3590－3595

17　史冬，赵健玉，李玺，等. NF－κB 调节 TNF－α 表达减轻大鼠缺血性脑血管病脑组织损伤[J]. 中国老年学杂志，2017，37(10)：2403－2405

(下转第 53 页)

RA 可以测定 CRP 水平,作为一个参考指标之一。本研究通过分析三者与干眼指标 OSDI、BUT、SⅠt、FL 的相关性,结果显示,BUT 与类风湿关节炎疾病活动度指标 ESR、CRP、RF 呈负相关($P<0.05$),FL 与类风湿关节炎疾病活动度指标 ESR、CRP、RF 呈正相关性($P<0.05$),说明类风湿关节炎的病情能够影响到患者眼部症状,类风湿关节炎疾病活动度指标 ESR、CRP、RF 越高,干眼症状越严重。虽然 OSDI、SⅠt在研究中未显示出相关性($P>0.05$),但并不一定表明类风湿关节炎疾病活动度不会影响到干眼病情,推测可能正如以上所阐述的原因,类风湿关节炎主要影响泪膜稳定性,笔者将进一步对此研究。

本研究依据 BUT、SⅠt、FL 对干眼的严重程度进行分级,并且根据干眼严重程度分级与类风湿关节炎疾病活动度指标 ESR、CRP、RF 进行相关性研究,得出干眼严重程度与三者之间呈正相关($P<0.05$),还进一步依据 DAS28 对类风湿关节炎的疾病活动强度进行分级,分析类风湿关节炎的疾病活动强度分级与 BUT、FL、OSDI、SⅠt 的相关性,同样得出下列结果:类风湿关节炎疾病活动度分级与 BUT 呈负相关($P<0.05$),与 FL 呈正相关($P<0.05$),说明类风湿关节炎疾病活动度能够影响到干眼的严重程度。而与 OSDI、SⅠt 无相关性($P>0.05$),也可能是由于以上所阐述的原因。因此,类风湿关节炎疾病活动度能够影响到干眼的严重程度,干眼的严重程度可能间接反映出类风湿关节炎的活动强度。

参考文献

1 Lemp MA. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop [J]. Ocular Surface, 2007, 5(2):75 - 92

2 中华医学会眼科学分会角膜病学组. 干眼临床诊疗专家共识(2013 年版)[J]. 中华眼科杂志, 2013, 49(1):73 - 75

3 葛均波,徐永健. 内科学 [M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社, 2013:811 - 812

4 Prevoo ML, Hh V ′ HM, van Leeuwen MA, *et al*. Modified disease activity scores that include twenty - eight - joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthriti Rheum, 1995, 38(1):44 - 48

5 张汗承, 周祖嫌, 陈卓,等. 干燥综合征中干眼病情的分级研究[J]. 中华医学杂志, 1994,74(2):117 - 118

6 Gisela O, Steve E, Anne H, *et al*. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus [J]. Anna Rheum Dis, 2011, 70(3):463 - 468

7 中华医学会风湿病学分会. 反应性关节炎诊断及治疗指南[J]. 中华风湿病学杂志, 2010, 14(4):265 - 270

8 姜楠, 费允云, 赵岩. 白细胞介素 - 6 阻断剂在类风湿关节炎的治疗应用[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6(3):232 - 236

9 Chiu YC, Lin CC. Peptidoglycan enhances IL - 6 production in human synovial fibroblasts via TLR2 receptor, focal adhesion kinase, Akt, and AP - 1 - dependent pathway[J]. J Immunol, 2009, 183(4):2785 - 2792

10 Sun X, Zhao J, Liu R, *et al*. Elevated serum and synovial fluid TNF - like ligand 1A (TL1A) is associated with autoantibody production in patients with rheumatoid arthritis[J]. Scandinavian J Rheumat, 2013, 42(2):97 - 101

11 叶任高,陆再英,谢毅,等. 内科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004:885 - 891

12 Chen Y T, Li S, Nikulina K, *et al*. Immune profile of squamous metaplasia development in autoimmune regulator - deficient dry eye[J]. Mol Vision, 2009, 15(9):563 - 576

13 黄冠南, 王丽聪, 张虹. 结缔组织病患者结膜印迹细胞凋亡研究[J]. 中国循证医学杂志, 2009, 9(9):949 - 952

14 Nichols KK, Lynn GM, Karla Z. The repeatability of clinical measurements of dry eye[J]. Cornea, 2004, 23(3):272 - 285

15 付智勇, 王艳玲, 王薇. 糖尿病患者干眼症的临床研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 17:1285 - 1287

16 叶苑. 甲氨蝶呤与来氟米特治疗类风湿性关节炎的疗效和不良反应[J]. 中外医学研究, 2013,22:21 - 23

17 邓毅, 吴雪峰, 雷鸣,等. 对比检测血清中抗环瓜氨酸肽抗体对类风湿关节炎的诊断价值评估[J]. 中国现代药物应用, 2015,2:8 - 9

18 Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, *et al*. Diagnostic accuracy of the anti - citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis [J]. Clin Chem, 2001, 47(6):1089 - 1093

(收稿日期:2017 - 11 - 04)
(修回日期:2017 - 11 - 14)

(上接第 47 页)

18 Nimmerjahn F, Dudziak D, Dirmeier U, *et al*. Active NF - kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection[J]. J Gen Virol, 2004,85(8):2347 - 2356

19 丁媛媛,赵钢涛,杨凡,等. 肉桂油对病毒性心肌炎小鼠心肌中 TLR4 - NF - κB 信号转导的影响[J]. 中国药学杂志,2010,45(5):348 - 352

20 廖谷清,赵红,邓立普,等. Toll 样受体 4 和 9 基因在肺纤维化大鼠的表达和意义[J]. 北方药学,2017,14(2):137 - 138

21 伍振辉,孟娴,胡佳伟,等. TLR4 - MyD88 - NF - κB 信号通路与肝炎 - 肝纤维化 - 肝癌轴相关性研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2017,44(5):396 - 401

22 张子杰,袁征,闫振宇. 肝细胞癌组织中 TLR4、MyD88、NF - κB 表达量及其与临床病理特征的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志,2017,27(4):55 - 58

(收稿日期:2017 - 10 - 26)
(修回日期:2017 - 11 - 21)