基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0995-04

STAT3 在小鼠急性病毒性心肌炎发病中的作用研究

吴巾红,钟家蓉,谢盛慧
(重庆医科大学附属儿童医院心内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:观察 STAT3 在小鼠急性病毒性心肌炎(Viral myocartditis,VMC)发病中的作用及其可能作用机制。方法:建立急性 VMC 小鼠模型,将 45 只小鼠随机分为 3 组:正常对照组 10 只、急性 VMC 组 15 只,急性 VMC+RPM 干预鼠 20 只,分别采用 DMEM 和 STAT3 特异性抑剂 RPM 0.4 mg/kg 每日腹腔注射,12 d 后观察小鼠的一般情况及存活率,心肌组织病理变化,心肌组织病毒滴度,ELISA 法检测血清 IFN-γ 和 TNF-α 含量。结果:与急性 VMC 鼠相比,急性 VMC+RPM 干预鼠一般情况明显加重,心肌组织变性坏死及炎性细胞浸润明显加重,并且血清中 IFN-γ 和 TNF-α 含量均增加,但心肌组织病毒滴度两组间无明显差异。结论:STAT3 活化在病毒性心肌炎小鼠发病中对心肌组织有一定的保护作用,抑制其活化,小鼠对 CVB3 的易感性明显增加;STAT3 活化虽不能干扰心肌组织中病毒复制,但却可通过抑制 IFN-γ、TNF-α 的过度表达而对心肌组织有一定保护作用。

【关键词】病毒性心肌炎;信号转导和转导激活子 3;雷帕霉素;柯萨奇病毒 B3
【中国图书分类法分类号】R542.211 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-21

Role of STAT3 in the pathogenesis of acute viral myocarditis in mice

WU Jin-hong, et al
(*Department of Cardiology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of STAT3 in the pathogenesis of acute viral myocarditis (VCM) in mice and its possible mechanism. *Methods*: Acute VCM mice models were established forty-five mice were randomly divided into blind control group (n=10), virus-infection control group (n=15), RPM intervention group(n=20).In RPM intervention group, RPM was given to mice

作者介绍:吴巾红(1979-),女,硕士,
研究方向:儿童心血管疾病。
通讯作者:钟家蓉,女,教授,E-mail:zhongjiarongcq@163.com。
基金项目:重庆市卫生局资助(编号:渝卫科教[07-2-141])。

h,p75NTR mRNA 水平明显增高;谷氨酸刺激后 18 h,p75NTR 蛋白质水平明显上调。NMDAR 的特异性拮抗剂 MK-801 可明显阻断兴奋毒性过程中 p75NTR 的表达变化。MK-801 是一种经典的 NMDAR 拮抗剂,能不可逆地与 NMDAR 离子通道内的 PDZ 位点结合,堵塞离子通道,从而使细胞外的钙离子无法内流,具有非常好的抗兴奋毒性损伤效果,然而由于其严重的毒副作用,无法用于动物实验和临床,目前仅局限于体外实验中使用[9]。以上结果表明,p75NTR 在 CNS 疾病中的活化与兴奋毒性神经损伤过程密切相关,很可能是谷氨酸的 NMDAR 激活后进而活化的下游分子,参与了兴奋毒性损伤中的促凋亡过程。因此,对 p75NTR 进行调控可望为兴奋毒性神经损伤的干预提供新的策略和手段。

参 考 文 献

[1] Blöchl A, Blöchl R. A cell-biological model of p75NTR signaling [J]. J Neurochem, 2007, 102 (2):289-305.

[2] Greenwood S M, Connolly C N.Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity[J].Neuropharmacology, 2007, 53 (8):891-898.

[3] Yamada K A, Rothman S M.Diazoxide blocks glutamate desensitization and prolongs excitatory postsynaptic currunts in rat hippocampal neurons [J]. J Physiol, 1992, 458 (1): 409-423.

[4] Michaels R L, Rothman S M.Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations[J].J Neurosci, 1990, 10 (1):283-292.

[5] Albensi B C. The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity[J].Curr Pharm Des, 2007, 13 (31): 3185-3194.

[6] Longo F M, Massa S M.Small molecule modulation of p75 neurotrophin receptor functions[J].CNS Neurol Disord Drug Targets, 2008, 7 (1):63-70.

[7] Underwood C K, Coulson E J. The p75 neurotrophin receptor[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40 (9):1664-1668.

[8] Hota S K, Barhwal K, Singh S B, et al. Chronic hypobaric hypoxia induced apoptosis in CA1 region of hippocampus: a possible role of NMDAR mediated p75NTR upregulation [J].Exp Neurol, 2008, 212(1):5-13.

[9] Sripada S, Gaytan O, Swann A, et al. The role of MK-801 in sensitization to stimulants [J].Brain Res Brain Res Rev, 2001, 35 (2): 97-114.

(责任编辑:冉明会)

intraperitoneally once a day with general dosage of 0.4 mg/(kg·d) at 24 hours before infected with coxsackie virus B3, mice of virus-infection control group were given the same volume of Dulbcco's Modifed Eagle Medium and virus. Blind control group was only given the same volume of Dulbcco's Modifed Eagle Medium, but not infected coxsackie virus B3. Twelve days later, the general condition and survival rate of mice were observed and then all experimental mice were sacrificed patholog and detecting CVB3 virus titer in myocardium. And double-sandwich ELISA was used to detect the levels of IFN-γ, and TNF-α in the serum. *Results*: The pathological changes of myocardium of the mice in RPM intervention displayed more seriously than the mice with acute VMC and both the cytokines expressions in the serum of RPM intervention group were higher than those of the acute VMC group, but there was no significant difference in the virus titer between the two groups. *Conclusions*: The activation of STAT3 can somehow protect myocardial tissues during the incidence of viral myocarditis in mice to inhibit its activation and improve the sensibility of mice to CVB3, although the activation of STAT3 cannot affect CVB3 virus replication, it can inhibit the over-expression of IFN-γ and TNF-α to weaken myocardial damage.

【Key words】Viral myocarditis; STAT3; Rapamycin; Coxsackie virus B3

病毒性心肌炎(Viral myocartditis, VMC)是由病毒感染引起心肌疾病,是引起儿童猝死的重要原因之一。常导致局限性或弥漫性的心肌细胞变性、坏死、间质炎症、炎性细胞浸润及纤维素渗出。目前对心肌炎的治疗尚缺乏特异性的药物。我们的前期研究已发现小鼠 VMC 时信号转导和转导激活子 3(Signal transducers and activators of transcription, STAT3)活化明显增加[1]。我们对小鼠急性柯萨奇 B3 病毒性心肌炎模型给予 STAT3 特异性抑制剂雷帕霉素(Rapamycin, RPM)进行干预,观察其心肌组织病理变化,检测血清中 IFN-γ、TNF-α 含量及心肌组织中病毒滴度来探讨 STAT3 在小鼠急性 VMC 发病中的作用及其可能的作用机制,为进一步寻求新的有效的治疗 VMC 途径提供理论和实验依据。

1 方法与材料

1.1 实验材料

1.1.1 病毒 柯萨奇病毒 B3((Nancy 株,病毒的半数致死量(TCID50)为 10^{-9}),华西医科大学微生物教研室提供,本实验室 -70℃低温冰箱保存。

1.1.2 动物 雄性 BALB/c 小鼠 45 只,4~6 周龄,体重 12~16g,购自大坪医院实验动物中心。

1.1.3 主要试剂和材料 RPM 购自 Bio Source 公司,临用前先用少量 DMSO 溶解,再用 0.5% 羧甲基纤维素稀释至所需的浓度,腹腔注射给药(ip);IFN-γ 和 TNF-α ELISA 试剂盒购自深圳晶美公司。

1.2 实验方法

1.2.1 分组、动物模型的建立和处理 将 45 只小鼠随机平均分为 3 组,正常对照组 10 只、急性 VMC 组 15 只、急性 VMC+RPM 干预组 20 只。45 只小鼠中随机抽取 10 只,作为正常对照组,腹腔无菌注射不含病毒的 DMEM 培养液(Dulbcco modifed eagle medium, DMEM);急性 VMC 组经腹腔注射含 5×10^5 半数组织感染量(TCID50) CVB3 (Nancy 株)的病毒液 0.1 ml 制作 VMC 模型;急性 VMC+RPM 干预鼠注射病毒液的同时开始每天腹腔注射 RPM 0.4 mg/(kg·d),正常对照鼠和急性 VMC 鼠同法注射等容积的 DMEM,统计小鼠死亡数,于 12 d 后处死所有存活小鼠。

1.2.2 标本的采集

1.2.2.1 血清标本的制备 在各组动物到达实验终点时,称体重、摘眼球取血,置于 Eppendorf 管,37℃水浴 2 h 后,3 000 r/min 离心 15 min,离心后取血清 -20℃冰箱冻存备用。

1.2.2.2 心肌标本的制备 颈椎脱臼法处死小鼠,速取心脏,用冰浴的 PBS 清洗心脏,取 1/3 心肌组织后以 4%多聚甲醛固定待做 HE 染色,用光镜行病理组织学检测。剩余置于 DMEM 液中研磨,离心后取上清保存于 -70℃超低温冰箱,供病毒滴度的检测。

1.2.3 观察项目

1.2.3.1 一般情况 腹腔注射期间,每日称体重并予记录,作体重变化曲线。

1.2.3.2 组织病理学检测 4%多聚甲醛固定的标本经脱水后以石蜡包埋,其后制成 4μm 厚切片,常规苏木精—伊红染色后光镜下观察心肌组织的病理改变,并根据 Rezkaua 等的方法计算心肌病变积分,每张切片在 10×20 倍镜下随机取 5 个高倍视野,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的面积之比。无病变者记 0 分,<25%记 1 分,25%~50% 记 2 分,51%~75% 记 3 分,>75%记 4 分。

1.2.3.3 小鼠血清细胞因子 IFN-γ、TNF-α 的检测 方法均为改良双抗体夹心 ELISA 法,按说明书操作进行,在 450 nm 波长下读取吸光度(A)值,每个标本测 3 复孔,测定值为 3 个复孔的平均值。

1.2.3.4 心肌匀浆上清液病毒滴度的测定 按 Reed 法[2]在传代 VERO 细胞上用 96 孔板测定各组的病毒滴度。具体方法如下:(1)心肌匀浆液以 DMEM 液作 10 倍系列稀释。(2)取形态正常、生长于 96 孔细胞培养板的细胞,滴加经系列稀释的心肌匀浆上清液 100μl/孔,37℃ 作用 30 min,弃心肌匀浆上清,DMEM 液洗涤 1 次后加 100μl/孔病毒维持液(含 3%胎牛血清的 DMEM 液),置 37℃培养。每一稀释度分别接种6孔,每次测定均设空白对照和 CVB3 阳性对照。(3)病毒 TCID50 滴定:经 37℃培养 72 h,分别读取每孔细胞病变,确定细胞

病变程度，以 ++（约 50%）细胞病变为判断标准，分别计算出每一标本的 TCID50。

1.3 统计方法

实验数据均以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS13.0 统计软件进行检验，表 1 采用 χ^2 检验、表 2 采用方差分析，表 4、5 采用 t 检验，$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 RPM 对 VMC 小鼠的体重及死亡率的影响

对照组的小鼠体重逐日递增，无任何症状、无死亡。急性 VMC 鼠和急性 VMC+RPM 干预鼠在接种 CVB3 后第 3 d 出现背毛松散，活动及摄食减少；第 5 d 症状加重，出现死亡，死亡高峰时间在接种病毒后第 7～10 d。与急性 VMC+RPM 干预鼠比较，急性 VMC 症状轻，12 d 存活率显著增加（见表 1），各组体重增加有显著性差异（$P<0.05$）。

2.2 小鼠心脏组织病理检查结果（见图）

正常对照鼠心脏形态观察及光镜下检查正常。接种病毒后第 12 d，急性 VMC 鼠心脏外膜有少许白色点状病变及出血点样改变，光镜下以炎性细胞浸润为主，坏死轻微；急性 VMC+RPM 干预心鼠心脏外膜见大片白色点状样改变，光镜下炎细胞弥漫性浸润，心肌细胞肿胀，气球样变性，并有散在局灶性坏死区，有的融合成片。心肌病理评分结果见表 3，急性 VMC+RPM 干预鼠明显高于急性 VMC 鼠和对照鼠（$P<0.05$）。

2.3 小鼠血清 IFN-γ 和 TNF-α 检测

正常对照鼠血清 IFN-γ、TNF-α 含量极低，用 ELISA 方法很难检查其含量，均低于 31.25 pg/ml，急性 VMC 鼠血清 IFN-γ、TNF-α 含量均显著增加，急性 VMC+RPM 干预鼠血清的 IFN-γ、TNF-α 均较急性 VMC 鼠明显增加，3 组之间有显著性差异（$P<0.05$）。

2.4 各组心肌组织病毒滴度检测结果

从表 5 可以看出，对照组心肌组织中检测不出病毒，模型鼠与干预鼠均可检测出病毒，2 组间病毒滴度无明显差异（$P>0.05$）。

表 1 各组小鼠死亡情况

组别	只数	死亡数	死亡率(‰)
正常对照组	10	0	0
急性 VMC 组	15	4	27
RPM 干预组	20	9	45

表 2 各组小鼠体重增长情况（$\bar{x} \pm s$）

组别	只数	体重增长值(g)
正常对照组	10	4.650 ± 1.123
急性 VMC 组	10	1.888 ± 2.387*
急性 VMC+RPM 干预组	10	−1.774 ± 2.148*#

注：* 表示与正常对照组比较 $P<0.05$，# 表示与急性 VMC 组比较 $P<0.05$

表 3 各组小鼠心肌组织病理评分

组别	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
正常对照组	10	0	0	0	0
急性 VMC 组	0	5	4	1	0
急性 VMC 组+RPM 干预组	0	0	3	5	2

表 4 各组小鼠血清 IFN-γ 和 TNF-α 含量(pg/ml)（$\bar{x} \pm s$）

组别	只数	血清 IFN-γ	血清 TNF-α
正常对照组	10	<31.25	<31.25
急性 VMC 组	10	146.25 ± 42.61*	103.75 ± 38.41*
RPM 干预组	10	219.8 ± 48.22*#	160.375 ± 58.45*#

注：* 表示与正常对照组比较 $P<0.05$，# 表示与急性 VMC 组比较 $P<0.05$

表 5 各组小鼠心肌组织病毒滴度（$\bar{x} \pm s$，$TCID50 \cdot ml^{-1}$）

组别	只数	病毒滴度
急性 VMC 组	10	2.330 ± 0.960
急性 VMC+RPM 干预组	10	2.492 ± 1.260*

注：* 表示与急性 VMC 组比较 $P>0.05$

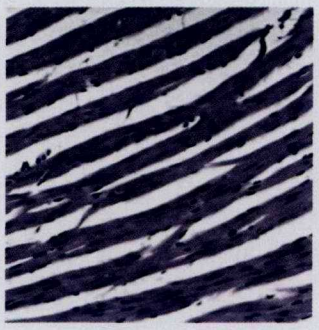


图 1 正常小鼠心肌组织病理切片（HE×400）

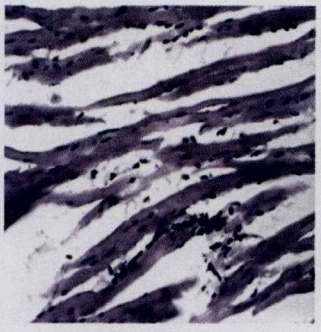


图 2 急性 VMC 小鼠心肌组织病理切片（HE×400）

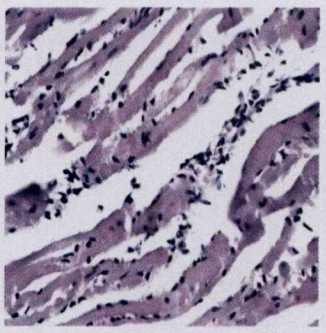


图 3 RPM 干预小鼠心肌组织病理切片（HE×400）

3 讨 论

病毒性心肌炎时病毒引起心脏病变的确切机制至今尚未阐明，病毒通过直接作用和免疫机制引起心肌细胞损伤是目前普遍认可的致病途径，多种细胞因子、中和抗体、微血管损伤发挥着重要作用[3]。在急性期病毒直接损伤心肌细胞并以细胞免疫介导为主的免疫损伤，主要表现为 Th1/Th2 之间失衡，Th1 反应过强、由 Th1 细胞分泌的细胞因子 IFN-γ、TNF-α 含量均显著增高。Seko[4]等发现急性感染的早期 VMC

小鼠心肌组织中 IFN-γ、TNF-α mRNA 明显增高，而 Th2相关细胞因子如 IL-4 和 IL-10 的 mRNA 仅在感染病毒 1 周后开始增加。IFN-γ、TNF 含量增加有利于清除病毒，但在清除病毒的同时也损伤正常的心肌细胞导致 VMC 的发生。IFN-γ具有抑制病毒复制功能，IFN-γ 水平降低则不利于清除病毒[5]。TNF-α 基因敲除鼠感染病毒后生存率显著低于正常小鼠，心肌组织中病毒滴度显著增高，心肌组织炎性改变不如正常小鼠明显，而给予重组 TNF-α 能够显著提高 TNF-α 基因敲除鼠生存率[6]。VMC 患儿急性期存在血清 IFN-γ、TNF-α 浓度显著增高，IFN-γ、TNF-α 参与 VMC 发病，并且检测其水平能协助诊断及反映病情轻重和预后[7]。

STAT3 是一组具有数个相同结构域构成的脱氧核糖核酸结合蛋白家族成员之一，作为 JAK（Janus kinase）-STAT 途径中重要的 JAKs 的底物，STAT3 在细胞因子信号转导中起关键性的作用[8]，STAT3 与炎症因子 IFN-γ、IL-1、IL-6、IL-10、IL-4 关系密切[9-11]。RPM 是一种大环内酯类抗生素和免疫抑制剂，能特异性的抑制 STAT3 活性，直接抑制 STAT3 的磷酸化，从而抑制 STAT3 活化和核转位，进一步下调细胞因子的诱生及病理生理效应[12,13]。

本实验发现特异性抑制 STAT3 活化，小鼠对 CVB3 的易感性增加，症状明显加重，而心肌中病毒滴度与未干预鼠无明显差异，说明 STAT3 在小鼠 VMC 的发病中对心肌组织有保护作用，与国外的研究结果相一致[14]。我们推测急性 VMC 时 STAT3 活化虽不能干扰 CVB3 复制但可通过抑制 IFN-γ 和 TNF-α 的过度表达而保护心肌组织免受病毒感染后诱导 Th1 反应过强所致损伤。本实验初步阐述了 STAT3 在病毒性心肌炎发病中的保护作用及其可能机制，为深入研究病毒性心肌炎的发病机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 吴巾红，钟家蓉.信号转导和转录激活子 3 与病毒性心肌炎的关系[J].临床心血管病杂志，2008，24(01):45-47.

[2] Reed L J, Muench L H. A simple method of estimating fifty percent and paint [J]. AmJ Hygiene, 1938, 27:493.

[3] Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy:Mechanisms of inflammation and cell death:Learning from the past for the future[J].Circulation, 1999, 99:1091.

[4] Seko Y, Takahashi N, Yagita H, et al. Expression of cytokine mRNAs in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackie virus B3[J]. Pathol, 1997, 183: 105 -108.

[5] Heim A, Canu A, Kirschner P, et al. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackie virus B3-infected carrier cultures of human myoca- rdial fibroblasts[J].Infect Dis, 1992, 166(5): 958-965.

[6] Wada H, Saito K, Kanda T, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) plays a protective role in acute viral myocarditis in mice: A study using mice lacking TNF-α [J].Circulation.2001, 103(5):743-749.

[7] 黄 磊，马沛然，汪 翼，等.病毒性心肌炎患儿血清干扰素-γ、肿瘤坏死因子-α 的变化及与心肌酶异常的关系[J].实用儿科临床杂志，2004，19，(3):191-192.

[8] Schindlern C, Darnell J E J. Transcriptional responses to polypeptide ligands:the JAK-STAT pathway[J]. Annu Rev Biochem, 1995, 64:621-651.

[9] Hebenstreit D, Horejs-Hoeck J, Duschl A, et al. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines[J].Drug News Perspect, 2005, 18(4): 243-249.

[10] Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, et al. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges[J].Gene, 2002, 285(1-2):1-24.

[11] Cooney R N. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway[J]. Shock, 2002, 17(2):83-90.

[12] Fingar D C, Blenis J. The Target of Rapamycin (TOR):An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progre- ssion [J].Oncogene, 2004, 23(18):3151.

[13] Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, et al. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR[J]. Curr Biol, 2000, 10(1): 47-50.

[14] Yajima T, Yasukawa H, Jeon E S, et al. Innate defense mechanism against virus infection within the cardiac myocyte requiring gp130-STAT3 sign- aling [J].Circulation, 2006, 114(22):2364-2373.

（责任编辑：冉明会）