

## 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3在病毒性心肌炎中的作用研究

张 飞, 王 娟\*

华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院 急诊科, 湖北 武汉 430000

**摘要:** 目的 探讨核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3 (NLRP3) 在柯萨奇B组3型病毒 (CVB3) 诱导的病毒性心肌炎中的作用。方法 40只6~8周龄BALB/c雄性小鼠使用随机数字表法随机分为对照组和病毒性心肌炎模型组, 每组20只。对照组ip 0.1 mL生理盐水, 模型组ip 0.1 mL含有CVB3病毒 ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) 的病毒液进行造模。造模第7天, 处死所有小鼠。酶联免疫吸附法 (Elisa) 检测血清NLRP3、白介素 (IL) -1 $\beta$  和IL-18炎症因子。结果 模型组NLRP3、IL-1 $\beta$  和IL-18表达水平分别为 (26.43 $\pm$ 4.14)、(31.25 $\pm$ 5.63)、(38.57 $\pm$ 6.45)  $\mu$ g/L, 显著高于对照组的 (4.53 $\pm$ 1.06)、(6.35 $\pm$ 1.24)、(7.83 $\pm$ 1.36)  $\mu$ g/L ( $P < 0.01$ )。模型组心肌炎评分为 (2.36 $\pm$ 0.27) 分, 显著高于对照组的 (0.18 $\pm$ 0.04) 分 ( $P < 0.01$ )。模型组心肌细胞NLRP3表达评分为 (1.82 $\pm$ 0.24) 分, 显著高于对照组的 (0.16 $\pm$ 0.03) 分 ( $P < 0.01$ )。相关性分析显示模型鼠NLRP3与体质量呈显著负相关 ( $r = -0.517$ ,  $P < 0.05$ ), 和心肌炎评分呈显著正相关 ( $r = 0.624$ ,  $P < 0.05$ )。结论 NLRP3炎症小体可能参与了柯萨奇B组3型病毒致小鼠病毒性心肌炎的发生过程。

**关键词:** 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3; 柯萨奇B组3型病毒; 病毒性心肌炎; 白介素-1 $\beta$ ; 白介素-18

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 12-2360-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.12.013

## Role of NLRP3 in viral myocarditis

ZHANG Fei, WANG Juan

Department of Emergency, Wuhan Central Hospital of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430000, China

**Abstract: Objective** To detect the role of NLRP3 in coxsackievirus induced viral myocarditis. **Methods** Forty BALB/c male mice aged 6—8 weeks were randomly divided into control and viral myocarditis model groups, each group had 20 mice. The control group were ip 0.1 mL normal saline, and the model group were ip containing CVB3 virus ( $1 \times 10^6$  PFU/mL) virus solution for modeling. On the 7th day, all mice were killed. Elisa was used to detect serum NLRP3, IL-1 $\beta$ , and IL-18 inflammatory factors. **Results** The expression levels of NLRP3, IL-1 $\beta$  and IL-18 in model group were (26.43  $\pm$  4.14), (31.25  $\pm$  5.63) and (38.57  $\pm$  6.45)  $\mu$ g/L, which was significantly higher than that of (4.53  $\pm$  1.06), (6.35  $\pm$  1.24) and (7.83  $\pm$  1.36)  $\mu$ g/L in control group ( $P < 0.01$ ). The myocarditis score of model group was (2.36  $\pm$  0.27), which was significantly higher than that of (0.18  $\pm$  0.04) in control group ( $P < 0.01$ ). The NLRP3 score of model group was (1.82  $\pm$  0.24), which was significantly higher than that of (0.16  $\pm$  0.03) in control group ( $P < 0.01$ ). NLRP3 was negatively correlated with body weight ( $r = -0.517$ ,  $P < 0.05$ ) and positively correlated with myocarditis score ( $r = 0.624$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** NLRP3 inflammatory bodies may be involved in the pathogenesis and development of viral myocarditis in mice induced by Coxsackie B virus type 3.

**Key words:** NLRP3; CVB3; viral myocarditis; IL-1 $\beta$ ; IL-18

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)是由病毒感染引起的心肌局限或弥漫性炎症病变的一种感染性心肌疾病,发病以青少年为主<sup>[1]</sup>,柯萨奇B组3型(Coxsackie virus B3, CVB3)病毒是VMC的主要病源<sup>[2]</sup>。病毒激发的心肌组织炎症反应是心肌组

织损伤的重要原因,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors protein 3, NLRP3)是NLRP3炎症小体的重要组成部分<sup>[3]</sup>,是机体内炎症激活的一个主要的分子信号平台<sup>[4]</sup>,NLRP3炎症小体的激活在心血

收稿日期: 2019-06-03

第一作者: 张 飞(1987—),男,主治医师,大学本科,研究方向为急诊。E-mail:kui69784@163.com

\*通信作者: 王 娟(1982—),女,主治医师,大学本科,研究方向为急诊。

管疾病中的致病作用越来越受到学者们的关注<sup>[5]</sup>,本研究使用CVB3病毒,构建病毒性心肌炎小鼠模型,借此探讨NLRP3在CVB3病毒诱导的病毒性心肌炎中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

6~8周龄BALB/c雄性小鼠40只购于四川大学实验动物中心(生产许可证号:SCXK(川)2018-026),体质量18.0~21.0 g,平均(19.62±1.14)g,适应性喂养1周后用于后续实验。

### 1.2 材料

NLRP3抗体购自美国cell signal公司(批号20180223),生物素辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗和免疫组化检测试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司(批号:20180314、20180222),CVB3病毒株购于武汉大学典藏中心,通过HeLa细胞维持,建立病毒滴度为 $1 \times 10^6$  IFU/mL的病毒库。参照赵小建等<sup>[6]</sup>的方法:HeLa细胞采用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素(美国Sigma公司,批号20180206)和100 mg/mL链霉素(美国Sigma公司,批号20180103)的RMPI-1640培养液(美国Gibco公司,批号201800424),置于5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱,温度设定为37 °C,细胞达到50%融合时加入CVB3病毒悬液,继续温箱中培养48~96 h,显微镜下观察到80%细胞病变后,将细胞冻于-20 °C冰箱,自然解冻后收获病毒液,用于滴度测定。6孔板中种植HeLa细胞( $1 \times 10^5$ 个),分别加入0、5、10、15、20、30 μL病毒液,培养72 h后加适量抗生素,待0 μL病毒组细胞死亡后,则对其余板进行活细胞计数。滴度(IFU/mL)=(活细胞数×起始细胞数)/(对照细胞数×毫升病毒体积)。最后求平均值,得到最终滴度。

### 1.3 小鼠病毒性心肌炎模型的建立

40只BALB/c雄性小鼠根据体质量使用数字表法随机分为对照组和病毒性心肌炎模型组,每组20只,对照组ip 0.1 mL生理盐水,模型组ip 0.1 mL含有CVB3病毒( $1 \times 10^6$  PFU/mL)的病毒液。模型鼠造模成功的鉴定:小鼠出现皮毛无光泽、蜷缩驼背、活动减少、对刺激反应不敏感、体质量减轻,心电图显示ST段下移,T波低平或倒置,类似心梗的改变出现以及病理性Q波、心律失常等异常改变;处死模型鼠后,心肌HE染色,显微镜下见心肌间质炎症细胞浸润。

### 1.4 Elisa法检测血清NLRP3、IL-1β和IL-18

造模第7天,处死所有小鼠,断尾取血,离心后

取上层血清待检。Elisa检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技技术公司,血清样品交由检验科,按照试剂盒说明书操作,使用日本OlympusAU5400全自动生化仪进行分析完成各样品的检测,对照标准品,计算各样品NLRP3、IL-1β和IL-18的表达量。

### 1.5 模型鼠心肌炎评分

造模第7天,处死模型鼠后分离心脏,4%福尔马林溶液固定,交由病理科制作HE染色切片,显微镜下根据炎症浸润面积计算病毒性心肌炎病理评分,无炎症浸润记为0分;炎症浸润面积<25%记为1分;25%≤炎症浸润面积<50%记为2分;50%≤炎症浸润面积<75%记为3分,炎症浸润面积≥75%记为4分。

### 1.6 心肌细胞NLRP3表达的免疫组化染色检测

小鼠处死后分离心脏,4%福尔马林溶液固定,送病理科石蜡包埋制作4 μm组织样本切片,严格按照抗体说明书操作NLRP3抗体(1:100稀释),湿盒孵育过夜,加入生物素辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,显示剂反应显示后苏木精复染。整个操作使用全自动IHC平台Leica Bond-Max完成,棕色为阳性染色。染色评分=面积分数(阳性染色细胞比例)×染色强度(1=低强度,2=中强度,3=高强度染色)。

### 1.7 统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行统计学分析,计量资料比采用 $\bar{x} \pm s$ ,两组间各指标比较采用独立样本 $t$ 检验,Pearson法分析两指标间的相关性, $P < 0.05$ 为统计学有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 两组小鼠体质量的比较

模型组小鼠第3天开始出现皮毛无光泽、蜷缩驼背、活动减少、对刺激反应不敏感、体质量减轻。造模成功率为100%。从表1可见,对照组小鼠在饲养1、3、5、7 d体质量呈逐渐上升的趋势,而模型组小鼠体质量出现下降趋势,在第3、5、7天时模型组小鼠体质量显著低于对照组( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 2.2 两组NLRP3、IL-1β和IL-18表达的比较

模型组NLRP3、IL-1β和IL-18表达水平分别为(26.43±4.14)、(31.25±5.63)、(38.57±6.45) μg/L,显著高于对照组的(4.53±1.06)、(6.35±1.24)、(7.83±1.36) μg/L( $P < 0.01$ ),见表2。

### 2.3 两组心肌炎评分的比较

模型组心肌炎评分为(2.36±0.27)分,显著高于对照组的(0.18±0.04)分( $P < 0.01$ )。见图1。

表1 两组小鼠体质量的比较

Table 1 Comparison on body mass between two groups of mice

组别	n/例	体质量/g			
		1 d	3 d	5 d	7 d
对照	20	22.43±2.24	23.07±2.32	23.72±2.36	24.38±2.44
模型	20	22.16±2.13	21.08±1.93*	19.14±1.62*	17.14±1.35**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

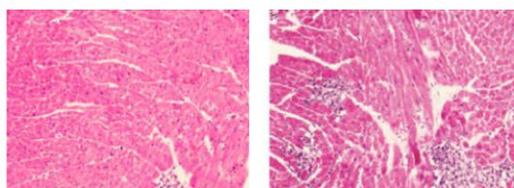
表2 两组NLRP3、IL-1 $\beta$ 和IL-18表达的比较

Table 2 Comparison on expression of NLRP3, IL-1 $\beta$  and IL-18 between two groups

组别	n/例	NLRP3/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ /( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	IL-18/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
对照	20	4.53±1.06	6.35±1.24	7.83±1.36
模型	20	26.43±4.14**	31.25±5.63**	38.57±6.45**

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group



对照

模型

图1 两组心肌HE染色结果( $\times 200$ )

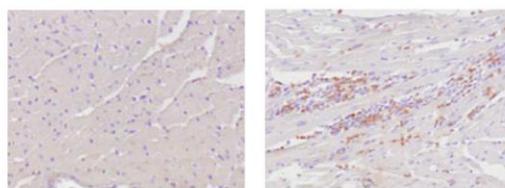
Fig. 1 Results of HE staining of myocardium between two groups ( $\times 200$ )

### 2.4 两组心肌NLRP3表达的比较

模型组心肌细胞NLRP3表达评分为(1.82±0.24)分,显著高于对照组的(0.16±0.03)分( $P < 0.01$ ),见图2。

### 2.5 NLRP3与模型鼠体质量和心肌炎评分的相关性分析

相关性分析显示模型鼠NLRP3与体质量呈显著负相关( $r = -0.517, P < 0.05$ ),和心肌炎评分呈显著正相关( $r = 0.624, P < 0.05$ ),见图3、4。



对照

模型

图2 心肌细胞NLRP3表达的免疫组化染色结果(200 $\times$ )

Fig. 2 Immunohistochemical staining of NLRP3 expression in cardiomyocytes(200 $\times$ )

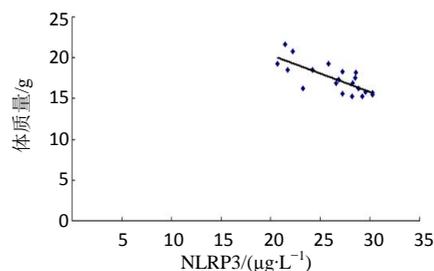


图3 模型鼠NLRP3表达与体质量的相关性分析

Fig. 3 Analysis of correlation between NLRP3 expression and body weight in model mice

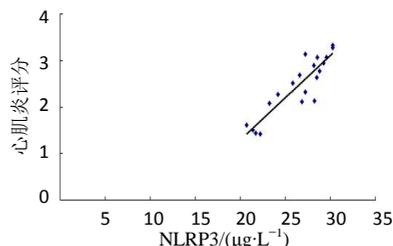


图4 模型鼠NLRP3表达与心肌炎评分的相关性分析

Fig. 4 Analysis of the correlation between NLRP3 expression and myocarditis score in model rats

## 3 讨论

CVB3是最常见的引起VMC的主要病因,雄性BALB/c小鼠对柯萨奇病毒相对易感,因此使用CVB3病毒感染6~8周龄雄性BALB/c小鼠是常见的研究VMC的动物模型<sup>[6]</sup>,本研究也采用了这一模型。NLRP3炎性小体是机体固有免疫的重要组成部分<sup>[7]</sup>,NLRP3是炎性小体的最核心组成部分,另外还有凋亡相关微粒蛋白(ASC)和半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)组成一个蛋白质复合体,ASC连接NLRP3和caspase-1,NLRP3的致炎作用通过caspase-1来实现,NLRP3通过ASC激活caspase-1后,裂解强有力的促炎因子IL-1 $\beta$ 和IL-18前体,释放出IL-1 $\beta$ 和IL-18的活性形式,参与到炎症过程中<sup>[8-9]</sup>。本研究观察到模型组NLRP3、IL-1 $\beta$ 和IL-18表达水平均显著高于对照组,说明了CVB3致VMC

模型中NLRP3可能参与了致病过程。

模型组小鼠第3天开始出现皮毛无光泽、蜷缩驼背、活动减少、对刺激反应不敏感、体质量减轻,小鼠心肌间质大量炎性细胞浸润,心肌炎评分模型组也显著高于对照组。本研究显示,模型鼠体质量随着NLRP3表达升高而显著减低,而心肌炎评分随着NLRP3表达升高而显著升高,提示了NLRP3可能参与了CVB3致小鼠VMC的致病过程。炎性通路的激活在VMC的致病作用已被大多数实验所证实<sup>[10]</sup>,CVB3致小鼠VMC过程中NLRP3炎性小体的参与可能是一个新的炎性致病通路,本研究为VMC提供了一新的可能潜在靶点。

综上所述,本研究通过细胞实验提示NLRP3炎症小体可能参与了CVB3致小鼠VMC的发生过程中,靶向NLRP3炎症小体的治疗有可能缓解患者的心肌炎症,改善患者的临床症状并提高临床疗效。

#### 参考文献

- [1] Van Linthout S, Tschope C. Viral myocarditis: a prime example for endomyocardial biopsy-guided diagnosis and therapy [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2018, 33(3): 325-333.
- [2] Han J, Jeong H I, Park C, et al. Cholic acid attenuates ER stress-induced cell death in coxsackievirus-B3 infection [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2018, 28(1): 109-114.
- [3] 吴晓升, 项静, 刘靖华. 线粒体在NLRP3炎性小体激活过程中的双向调节作用 [J]. *现代免疫学*, 2018, 38(4): 333-336.
- [4] Gros Lambert M, Py B. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11(3): 359-374.
- [5] 胡龙江, 周音频, 曹运兰, 等. NLRP3炎性小体对冠心病患者血浆IL-1 $\beta$ 、IL-18、TGF- $\beta$ 水平的影响 [J]. *重庆医学*, 2018, 47(26): 3394-3397.
- [6] 赵小建, 张洁钰, 杨帆, 等. 柯萨奇病毒B3诱导的病毒性心肌炎C57BL/6J小鼠模型的建立 [J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2016, 51(2): 212-217.
- [7] 刘旦旦, 周静, 高峰. NLRP3炎症小体及其与心血管疾病的关系 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(72): 88-89, 91.
- [8] Boza P, Ayala P, Vivar R, et al. Expression and function of toll-like receptor 4 and inflammasomes in cardiac fibroblasts and myofibroblasts: IL-1 $\beta$  synthesis, secretion, and degradation [J]. *Mol Immunol*, 2016, 74: 96-105.
- [9] 蔡悦, 康永波, 张宏. 柯萨奇B3病毒性心肌炎的免疫抗炎研究 [J]. *生命科学研究*, 2017, 21(2): 174-178, 188.
- [10] Zhou D P, Ge L S, Chen G Y, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates acute viral myocarditis in mice by regulating CD4<sup>+</sup> T cell differentiation [J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 1364-1376.