

· 论 著 ·

细胞外信号调节激酶信号转导通路在病毒性心肌炎心肌细胞中的调控作用

彭华,刘亚黎,胡晓华,林雯,蒙冰,陈立敏

(华中科技大学同济医学院附属协和医院儿科,湖北 武汉 430022)

[摘 要] **目的** 细胞外信号调节激酶(ERK)与细胞生长,分化,增殖等生理病理过程有密切关系。该研究通过比较 ERK1/2 在病毒性心肌炎心肌细胞中表达变化及 ERK 特异性阻断剂 PD98059 干预后细胞活性的改变,探讨 ERK 信号传导通路在病毒性心肌炎早期病毒攻击心肌细胞过程中的作用。**方法** 取新生 SD 大鼠,采用酶消化法分离得到心肌细胞。将培养细胞分为对照组,柯萨奇 B3(CVB3)感染组,20 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 干预组,后 3 组用柯萨奇 B_{3M} 株感染。采用 Western blot 分别测定 ERK1/2, ERK 激活后产物(P-ERK1/2)表达变化,采用 MTT 法检测细胞活性,采用细胞病变法计算细胞病变。**结果** 4 组 ERK1/2 表达总量差异无显著性; CVB3 感染组 P-ERK1/2 表达为 135.57 ± 0.71 高于对照组的 119.41 ± 1.97 , 差异有显著性($P < 0.01$)。经 20 $\mu\text{mol/L}$ 或 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 干预后心肌细胞 P-ERK 1/2 表达为 113.75 ± 1.03 , 42.56 ± 2.17 比感染组细胞低, 差异有显著性(均 $P < 0.01$); 其中 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 干预组 P-ERK1/2 表达较 20 $\mu\text{mol/L}$ 组低($P < 0.01$)。PD98059 干预组心肌细胞活性 0.53 ± 0.13 , 0.41 ± 0.04 明显高于感染组 0.17 ± 0.04 , 差异有显著性($P < 0.01$); 不同浓度 PD98059 干预组间心肌细胞活性差异无显著性($P > 0.05$)。PD98059 干预组细胞出现细胞病变的时间较感染组晚, 程度较感染组轻, 感染面积较感染组小。**结论** 病毒在攻击心肌细胞时启动了 ERK 信号通路; PD98059 能干预病毒对心肌细胞的感染。

[中国当代儿科杂志,2004, 6(4): 294—296]

[关 键 词] 细胞外信号调节激酶;信号转导;病毒性心肌炎
[中图分类号] R542.2⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008—8830(2004)04—0294—03

Role of extracellular signal-regulated kinase signal transduction pathway in viral myocarditis

Hua PENG, Ya-Li LIU, Xiao-Hua HU, Wen LIN, Bing MENG, Li-Min CHEN. Department of Pediatrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China (Email:yaliliu@sina.com.cn)

Abstract: Objective Extracellular signal-regulated kinase (ERK) is closely related to cellular growth, differentiation and proliferation. This paper aims at (1) detecting ERK1/2 levels in the myocardial cell of viral myocarditis; (2) assessing the effect of ERK specific inhibitor PD98059 on cell viabilities and (3) studying the role of ERK in early viral myocarditis. **Methods** Myocardial cells from neonatal SD rats were incubated in vitro and were randomly assigned into four groups: a Cocksackievirus B3 (CVB3) group, a 20 $\mu\text{mol/L}$ and a 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 groups and a Control group. CVB3 group was inoculated with CVB3 solutions. The PD98059 groups were initially inoculated with PD98059 for 30 min and then was inoculated with CVB3 solutions. The Control group was treated with DMEM plus 10% FBS. Western Blot was used to detect the ERK 1/2 levels and ERK activation product (P-ERK1/2) levels. Cell viabilities were measured with MTT assay. Cell cytopathic effect (CPE) was used to evaluate myocardial cell lesions. **Results** The ERK1/2 levels were not significantly different among the four groups. P-ERK1/2 levels in the CVB3 group were higher than those of the Control group (135.57 ± 0.71 vs 119.41 ± 1.97 ; $P < 0.01$) and also higher than those of the 20 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 groups (113.75 ± 1.03 and 42.56 ± 2.17 respectively; both $P < 0.01$). P-ERK1/2 levels in the 20 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 group were

[收稿日期] 2003—08—12; [修回日期] 2003—11—25
[作者简介] 彭华(1977—),女,博士研究生在读。主攻方向:儿科心血管。
[通讯作者] 刘亚黎,湖北省武汉市华中科技大学同济医学院附属协和医院儿科,邮编:430022。

significantly higher those in the 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 group ($P < 0.01$). Myocardial cell viabilities of the PD98059 groups (0.53 ± 0.13 and 0.41 ± 0.04) were higher than the CVB3 group (0.17 ± 0.04) ($P < 0.01$). There were no differences in myocardial cell viabilities between the two PD98059 groups. Compared with the CVB3 group, myocardial cell lesions in the PD98059 groups occurred later and were less. **Conclusions** CVB3 infection seems to trigger ERK signal transduction pathway. PD98059 may protect myocardial cells from injuries.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(4): 294—296]

Key words: Extracellular signal-regulated kinase; Signal transduction; Viral myocarditis

在病毒性心肌炎(viral myocarditis, VM)发病机制的研究中,病毒的直接损伤先于免疫损伤已经得到公认。因此病毒与宿主细胞间信号的传递在感染早期有决定性的作用。有丝分裂原蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是重要的细胞分裂调节系统,包括细胞外信号转导通路(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-jun N 端激酶(c-jun N terminal kinase, JNK)和 P38 三条通路,ERK 通路是迄今为止研究最多的通路。ERK 包括 44 KD 和 42 KD 两个亚型,此类激酶经 Raf-MEK-ERK 级联信号激活后以磷酸化方式表达后才能发挥其活性,促进细胞增殖^[1]。已有实验发现在 VM 小鼠心肌中 ERK 通路被明显激活^[2]。PD98059 是 MAPK 传导通路的阻断剂,能特异性抑制 ERK 激酶的磷酸化,阻断 ERK 通路^[3]。该研究通过观察 ERK1/2 及其激活后产物 P-ERK1/2 在病毒性心肌炎细胞及 PD98059 干预后的变化,探讨 ERK 信号转导通路在病毒性心肌炎早期病毒攻击心肌过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

DMEM 培养基购于 GIBCO 公司,按说明配制培养液为 DMEM 培养基中加入 20% 的胎牛血清;维持液为 DMEM 培养基中加入 10% 的胎牛血清;PD98059 购于 Calbiochem 公司,用二甲亚砜溶解,并调制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度,−20℃ 下避光保存。按需要浓度稀释于 37℃ 温箱中孵育待用。细胞裂解液试剂盒购于 Calbiochem 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 心肌细胞的分离培养 出生 3~5 d 的 SD 大鼠(由同济医学院实验动物中心提供)按参考文献^[4]分离得到心肌细胞。将成活的心肌细胞放入培养箱于 37℃,5% CO_2 培养。24 h 后心肌细胞贴壁并开始搏动,72 h 后细胞伪足展开。

1.2.2 实验分组 将刚分离出的细胞调整细胞数为 $5 \times 10^5/\text{ml}$,每瓶 5 ml 接种于培养瓶中。共制作 5 瓶。

1 瓶用于行 MTT 检测,另外 4 瓶随机分为对照组;CVB3 感染组(柯萨奇 B_{3M} 株由中国医科院生物技术研究所提供);PD98059 干预组(2 瓶)。在心肌细胞上测 50% 组织感染率(TCID₅₀),选择 100 TCID₅₀ 作为实验接种浓度^[4]。PD98059 干预组(2 瓶)在培养第 3 天,先经 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ PD98059 干预 30 min 后弃液,加 100 TCID₅₀ CVB3 病毒液 100 μl 孵育 1 h,然后换维持液 CO_2 条件继续培养 7 d,用细胞炎性效果法(cell cytopathic effect, CPE)观察细胞病变^[5];感染组给同样量的二甲亚砜替代 PD98059;对照组则以维持液代之,其它条件各组均相同。

1.2.3 心肌蛋白制备 将细胞用 0.02% EDTA 悬起,离心弃上清。在细胞沉淀中加入细胞裂解液,冰上孵育 15 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清得到蛋白。用 BioRad 试剂盒测定蛋白浓度。

1.2.4 免疫印迹(Westen blot)法测定 ERK1/2 和 P-ERK1/2 蛋白含量 取等量的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后,将其转移到硝酸纤维素膜上。封闭(4℃,12 h)。PBST 洗膜 3 次后加入一抗(ERK1/2 抗体或 P-ERK1/2 抗体,均由 Calbiochem 公司提供),37℃ 孵育 2 h。PBST 冲洗。加入二抗,室温下孵育 40 min,PBST 冲洗。ECL 显色曝光,胶片显影。结果判断:根据目的条带的光密度值来判定目的蛋白的含量。

1.2.5 MTT 法检测细胞活性 将已再培养瓶中培养了 3 d 的心肌细胞用 0.02% 的 EDTA 悬起,按每孔 10^6 接种于 96 孔板,共接种 8 排。每排 4 孔,每 2 排为一组,分为对照组,CVB3 感染组,PD98059 干预组(4 排 2 个浓度)同上述方法对每一组行不同处理,继续培养 3 d。随后,每孔加 MTT (5 mg/dl)20 μl ,孵育 4 h,弃培养液。每孔加入 150 μl 二甲亚砜,振荡 10 min,结晶溶解。在 $\lambda = 490 \text{ nm}$ 时测 OD 值。反复测 3 次取均值。

1.3 统计学处理

测定值用 SPSS 处理,两两比较,选用 t 检验。

2 结果

2.1 心肌细胞病变

心肌细胞病变指心肌细胞搏动减弱,继之出现细胞变圆,堆积,部分细胞停止搏动。根据病变发生范围分为±~++++。病变范围<25%为±;25%~50%为+;51%~75%为++;76%~99%为+++;100%为++++。

观察组细胞第2天细胞搏动减弱,细胞形态未见明显改变。第3天出现细胞变圆,堆积,部分细胞停止搏动,第4天,大部分细胞停止搏动,第7天病变范围为++++。PD98059干预组细胞于第5天出现细胞变圆堆积,第7天部分细胞停止搏动,病变范围为+,而对照组心肌细胞未发生病变。

2.2 ERK1/2蛋白在心肌细胞中表达变化

对照组, CVB3感染组, PD98059干预组中ERK1/2蛋白表达差异无显著性($P>0.05$); CVB3感染组P-ERK1/2明显高于对照组,差异有显著性($P<0.01$)。不同浓度PD98059干预组P-ERK1/2比感染组细胞明显减弱(均 $P<0.01$)。且20 μmol/L已完全抑制EPK1/2蛋白的激活与对照组相似,50 μmol/L PD98059组P-ERK1/2水平较20 μmol/L组下降更明显,其差异有显著性($P<0.01$)。见表1。

2.3 ERK信号通路对心肌细胞活性的影响

不同浓度PD98059干预组心肌细胞活性均明显高于感染组($P<0.01$)。20 μmol/L与50 μmol/L PD98095干预组间细胞活性差异无显著性($P>0.05$)。见表1。

表1 各组 ERK1/2,P-ERK 蛋白含量和心肌细胞活性比较
Table 1 The expression of protein ERK1/2, P-ERK and the cell viability in various groups (OD, $\bar{x}\pm s$)

	ERK1/2	P-ERK1/2	心肌活性
对照组	114.26±3.44	119.41±1.97	4.49±0.26
感染组	128.70±3.97	135.57±0.71 ^a	0.17±0.04 ^a
20 μmol/L干预组	123.02±2.30	113.75±1.03 ^{a,b}	0.53±0.13 ^{a,b}
50 μmol/L干预组	106.88±4.98	42.56±2.17 ^{a,b,c}	0.41±0.04 ^{a,b}
F	2.682	264.992	693.974
P	0.452	0.000	0.000

注: a 与对照组比较 $P<0.01$; b 与感染组比较 $P<0.01$;
c 与20 μmol/L干预组比较 $P<0.01$

3 讨论

在病毒性心肌炎发病早期,病毒攻击心肌细胞时,借助宿主自身复制系统进行增殖,从而导致心肌细胞损伤^[6]。而其中的信号转导机制一直不清楚。本研究应用 Westen blot 的方法检测了正常心肌细胞, CVB3感染心肌细胞, PD98059干预后再用 CVB3感染的心肌细胞中 ERK 活性的变化,结果发现这三组心肌细胞中 ERK1/2 蛋白总量没有差异,而感染组心肌细胞 P-ERK 的表达高于正常组。提示病毒感染离体的心肌细胞后,启动了 ERK 信号转导通路。PD98059 为 ERK 特异性抑制剂,在其干预下 ERK 激活减弱,P-ERK 生成减少。细胞病变观察结果显示 PD98059 干预组细胞变性较感染组明显减少,且干预组心肌细胞的成活率明显高于感染组,提示 PD98095 对心肌细胞有明显的保护作用。国外实验研究发现 PD98059 的最适浓度为10~50 μmol/L,最佳作用时间为10~30 min,因此本实验选用 PD98059 的浓度为20 μmol/L和50 μmol/L,作用时间均为30 min。结果显示50 μmol/L PD98059 对 ERK1/2 激活的抑制作用更强,但对心肌细胞活性的保护作用不如20 μmol/L组,考虑这可能与高浓度PD98059影响正常心肌细胞的增殖分化相关。

总之,根据本实验,我们认为病毒在攻击心肌细胞时启动了 ERK 信号转导通路,同时 ERK 通路又被病毒利用去感染心肌细胞。PD98059 能干预病毒对心肌细胞的感染,但是只有合适浓度的 PD98059 才能使心肌细胞免遭进一步受损。该研究为探讨病毒性心肌炎发病早期机制和开发新的治疗药物提供了客观依据。

[参 考 文 献]

[1] Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades [J]. Curr Opin Cell Biol, 1996, 8(2): 205-215.
[2] Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, et al. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway [J]. J Virol, 2002, 76(7): 3365-3373.
[3] Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart [J]. Cir Res, 2000, 86(6): 692-699.
[4] 杨英珍. 病毒性心肌炎[M]. 上海:上海科技出版社,2001, 349-353.

[5] 陈曙霞,彭旭. 心肌细胞的培养与病毒性心肌炎感染模型的建立 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志,1999, 13(2): 185.

ditis [J]. Circulation, 2001, 104(9): 1076—1082.

[6] Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocar-

(本文编辑:吉耕中)