

· 实验研究 ·

雷帕霉素对柯萨奇病毒 B3 诱导的 心肌成纤维细胞 eIF-4E 表达的影响

陈淳媛, 孙跃女, 杨作成, 龙燕琼

(中南大学湘雅三医院儿科, 湖南 长沙 410013)

[摘 要] 目的 探讨雷帕霉素对柯萨奇病毒 B3 诱导的心肌成纤维细胞 eIF-4E 表达的影响, 寻找病毒性心肌炎的药物治疗靶点。方法 选用 MOI 为 0.5 PFU/cell 的柯萨奇病毒 B3 感染心肌成纤维细胞, 利用细胞形态及 RT-PCR 法检测细胞内柯萨奇病毒 B3 mRNA 表达, 确定柯萨奇病毒 B3 成功感染心肌成纤维细胞。以 10nM 雷帕霉素干预, 采用 RT-PCR 及 Western blot 检测对照组、病毒组 (MOI 为 0.5 PFU/cell)、雷帕霉素组及病毒 + 雷帕霉素组 eIF-4E 表达。结果 MOI 为 0.5 PFU/cell 的柯萨奇病毒 B3 感染心肌成纤维细胞, 透射电镜下可见细胞形态改变, 胞浆内可见病毒颗粒。RT-PCR 结果显示: 感染后第 1 天、第 2 天、第 3 天及传代后第 2 天细胞有病毒 mRNA 表达。RT-PCR 检测上述 4 组的 eIF-4E / β -actin 光密度比值分别为: 0.73 ± 0.07 , 0.87 ± 0.03 , 0.32 ± 0.03 , 0.56 ± 0.04 ; Western blot 灰度值分别为: 0.79 ± 0.09 , 1.35 ± 0.12 , 0.55 ± 0.04 , 0.62 ± 0.07 ; RT-PCR 及 Western blot 结果显示: 病毒组 eIF-4E 表达高于对照组, 雷帕霉素组和病毒 + 雷帕霉素组低于对照组及病毒组 (均 $P < 0.05$)。结论 柯萨奇病毒 B3 可感染心肌成纤维细胞, 并使 eIF-4E 表达增加, 雷帕霉素可抑制其表达, 提示心肌成纤维细胞可能通过 mTOR/eIF-4E 信号通路参与病毒性心肌炎的发病机制, 雷帕霉素对病毒性心肌炎有潜在的治疗作用。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(6): 587-590]

[关键词] 雷帕霉素; 柯萨奇 B3 病毒; 心肌成纤维细胞; eIF-4E

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2007)06-0587-04

Rapamycin affects eIF-4E expression in rat myocardial fibroblasts infected by Cox-sackievirus B3

CHEN Chun-Yuan, SUN Yue-Nu, YANG Zuo-Cheng, LONG Yan-Qiong. Department of Pediatrics, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China (Email: ccyzd@126.com)

Abstract: Objective This study examined the effect of rapamycin, an inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTOR), on eukaryotic initiation factor (eIF-4E) expression in rat myocardial fibroblasts infected by Cocksackievirus B3 (CVB3) in order to identify the drug target for treatment of viral myocarditis. **Methods** Primary cultured rat myocardial fibroblasts were treated with CVB3 with multiplicity of infection (MOI=0.5 PFU/cell). The experiment consisted of four groups in which the cultured rat fibroblasts cells were treated with CVB3, rapamycin (10 nM) and CVB3 + rapamycin or placebo (control). Experimental model of CVB3-infected myocardial fibroblasts was confirmed by detection of CVB3 mRNA expression with RT-PCR and observation of morphological changes of the infected cells with microscopy. eIF-4E expression was determined by both RT-PCR and Western Blot methods. **Results** Morphological changes were found in the fibroblasts treated with MOI 0.5 PFU/cell of CVB3 by transmission electron microscope and the viral particles were found in the cytoplasm. CVB3 mRNA was expressed in CVB3-infected fibroblasts after 1, 2, and 3 days after infection and 2 days after passage. The gray scale values of the eIF-4E / β -actin in the control, the CVB3, the rapamycin and the CVB3 + rapamycin groups were 0.73 ± 0.07 , 0.87 ± 0.03 , 0.32 ± 0.03 and 0.56 ± 0.04 respectively detected by RT-PCR, and were 0.79 ± 0.09 , 1.35 ± 0.12 , 0.55 ± 0.04 , and 0.62 ± 0.07 respectively detected by Western blot. EIF-4E expression in the CVB3 group was higher than that in the control group. Both the rapamycin and the CVB3 + rapamycin groups had lower eIF-4E expression than the control and the CVB3 groups. **Conclusions** CVB3 can infect myocardial fibroblasts and up-regulate the eIF-4E expression in rat myocardial fibroblasts. Rapamycin can inhibit eIF-4E expression and may be a potential medicine for treatment of viral myocarditis. It was suspected that mTOR/eIF-4E signal pathway in rat myocardial fibroblasts might play an important role in the pathogenesis of viral myocarditis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(6): 587-590]

Key words: Rapamycin; Cocksackievirus B3; Myocardial fibroblasts; eIF-4E

[收稿日期] 2007-04-09; [修回日期] 2007-05-15
[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金 (基金号 B2005-072) 及教育部留学回归启动基金 (2006)。
[作者简介] 陈淳媛, 女, 博士, 副教授。主攻方向: 小儿心血管疾病。
[通讯作者] 杨作成, 教授, 博士生导师, 中南大学湘雅三医院儿科, 410013

病毒性心肌炎(viral myocarditis ,VM)是临床上较为常见的小儿心脏疾病,近年来 VM 的发病呈上升趋势^[1]。心肌成纤维细胞是心脏主要的间质细胞,其分泌的Ⅰ型和Ⅲ型胶原构成心肌间质网络的基本结构,心肌成纤维细胞的功能及结构改变在心肌纤维化发展过程中起着十分重要的作用,因而研究 VM 心肌成纤维细胞的结构和功能、防治心肌纤维化已成为目前研究的热点^[2,3]。

某些信号通路活化对 CVB3 感染易感性有决定性作用^[4,5], CVB3 可加强 Hela 细胞中 Akt 的 473 位丝氨酸和 308 位苏氨酸残基磷酸化,导致蛋白激酶活化,触发 Akt 信号活化^[6],同时 PI3K/Akt 又可为病毒复制提供一个支持的介质,利于病毒感染后宿主细胞的存活。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)又位于 Akt 的下游,真核起始因子(eukaryotic initiation factor, eIF)是 mTOR 的下游底物,当生长信号激活 mTOR 后, eIF-4E 脱落,从而启动蛋白质的翻译^[7], eIF-4E 通过调节 mRNA 的输出速度而影响细胞生长和细胞周期进程,促进细胞生长、增殖。用 mTOR 抑制剂雷帕霉素抑制 mTOR/eIF-4E 信号通路,对于探讨病毒性心肌炎的发病机制,寻找药物治疗靶点具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

Hela 细胞由中南大学湘雅医学院肿瘤研究所惠赠。嗜心性柯萨奇病毒 B3 Nancy 株(myocarditic coxsackievirus B3, CVB3)由上海第二医科大学微生物教研室惠赠。

1.2 主要试剂

雷帕霉素(美国 CST 公司); DMSO (美国 Amresco 公司);逆转录试剂盒(美国 MBI Fermentas 公司);Trizol(美国 GibCO 公司);抗 eIF-4E 单克隆抗体(美国 CST 公司);DMEM(美国 GibCO 公司);小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 乳鼠心肌成纤维细胞的培养和传代 参照刘丹等^[8]的方法进行改良。

1.3.2 病毒的扩增 Hela 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养,在对数生长期接种病毒,每天观察,当 90% 的细胞出现细胞病变效应后,收集病毒液,重复 3 次,病毒悬液分装于 -80℃ 保存。用 Reed-Mnetch 法测定病毒滴度。

1.3.3 不同滴度的 CVB3 感染心肌成纤维细胞

取培养第 2 代的心肌成纤维细胞,当 70% ~ 80% 融合时,分别加入含重复感染率(multiplicity of infection, MOI)为 0.2 PFU/cell, 0.5 PFU/cell, 1.0 PFU/cell 的 CVB3,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育,在倒置显微镜下观察细胞形态的改变。

1.3.4 用 MOI 为 0.5 PFU/cell 的 CVB3 感染心肌成纤维细胞 通过细胞形态及 RT-PCR 检测细胞内 CVB3 mRNA 表达,确定 CVB3 可感染心肌成纤维细胞。

1.3.5 实验分组 共分 4 组。对照组:正常心肌成纤维细胞;病毒组:MOI 为 0.5 PFU/cell 的 CVB3 干预心肌成纤维细胞;雷帕霉素组:10 nM 雷帕霉素干预心肌成纤维细胞;病毒 + 雷帕霉素组:MOI 为 0.5 PFU/cell 的 CVB3 和 10 nM 雷帕霉素同时干预心肌成纤维细胞。以上 4 组均在干预后 48 h,观察细胞形态、抽提 RNA 及蛋白。

1.3.6 RT-PCR 引物序列 β -actin 正向引物:5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATGAC-3',反向引物:5'-TGGGTACATGGTGGTCCACCAGAC-3',产物长度 587 bp;eIF-4E 正向引物:5'-TCGCCCTTTGTCTGTACTTC-3',反向引物:5'-AACATCTAGCAGCCATCAGC-3',产物长度 355bp;CVB3 正向引物:5'-TG-GTGGGCTATGGAGTATGG-3',反向引物:5'-CACTG GATGGGGTGTGTCT-3',产物长度 336bp。

1.3.7 Western blot 各组细胞用蛋白裂解液在冰浴下裂解,获取全细胞裂解液,检测蛋白浓度后,取 100 μ g 的蛋白上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,转膜,以 5 % 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加一抗过夜,漂洗后加脱脂牛奶稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温反应 1 h,化学发光底物显色,胶片曝光,扫描。

1.4 统计学分析

资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析 F 检验,多组间两两比较采用 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同滴度 CVB3 感染心肌成纤维细胞

用 MOI 为 0.2 PFU/cell,0.5 PFU/cell 的 CVB3 干预心肌成纤维细胞后,在倒置显微镜下观察,未见明显细胞形态学改变及细胞病变,用 MOI 为 1.0 PFU/cell 的 CVB3 干预,至感染后第 4 天,可见细胞

间隙增宽、死亡脱落。

2.2 用 MOI 为 0.5PFU/cell 的 CVB3 感染心肌成纤维细胞

透射电镜下观察:正常心肌成纤维细胞胞浆内含丰富的粗面内质网、线粒体;核较大,呈圆形、椭圆形或不规则形,核居中或偏心分布,核仁较明显;CVB3 感染后线粒体水肿,核呈不规则形,胞浆内可见病毒颗粒。

心肌成纤维细胞 CVB3 mRNA 表达 用半定量 RT-PCR 检测对照组(未感染 CVB3)、感染后 1 d,2 d,3 d 及传代后 2 d 的 CVB3 /β-actin 光密度比值分别是 0, 0.10 ± 0.01, 0.40 ± 0.02, 0.28 ± 0.02, 0.18 ± 0.02。感染后 1 d 开始即有 CVB3 mRNA 表达,2 d 表达最强,3 d 开始减弱,将干预后的心肌成纤维细胞传代后 2 d 再检测,仍有 CVB3 mRNA 表达(见图 1)。

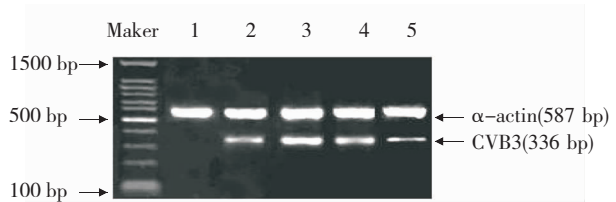


图 1 CVB3 感染心肌成纤维细胞后细胞内 CVB3 mRNA 表达 (RT-PCR)。1:对照组;2:感染后 1 d;3:感染后 2 d;4:感染后 3 d;5:传代后 2 d,CVB3 干预心肌成纤维细胞后第 1 天,即可见 CVB3 mRNA 表达,第 2 天表达最强,第 3 天开始减弱,将干预后的心肌成纤维细胞传代后第 2 天再检测,仍有 CVB3 mRNA 表达。

2.3 雷帕霉素对 CVB3 诱导的心肌成纤维细胞 eIF- 4E 表达的影响

RT-PCR 和 Western blot 测得各组 eIF- 4E/β-actin 光密度(灰度)值显示:病毒组高于对照组,雷帕霉素组及病毒组 + 雷帕霉素组低于对照组及病毒组,均 $P < 0.05$ (见表 1,图 2 和图 3)。

表 1 雷帕霉素抑制 CVB3 诱导的心肌成纤维细胞 eIF- 4E 表达 (eIF- 4E/β-actin, $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	光密度值 (RT-PCR)	灰度值 (Western blot)
对照组	3	0.73 ± 0.07	0.79 ± 0.09
病毒组	3	0.87 ± 0.03 ^a	1.35 ± 0.12 ^a
雷帕霉素组	3	0.32 ± 0.03 ^{a,b}	0.55 ± 0.04 ^{a,b}
病毒 + 雷帕霉素组	3	0.56 ± 0.04 ^{a,b}	0.62 ± 0.07 ^{a,b}
F		90.199	103.295
P		<0.05	<0.05

a 与对照组比较, $P < 0.05$; b 与 CVB3 组比较, $P < 0.05$

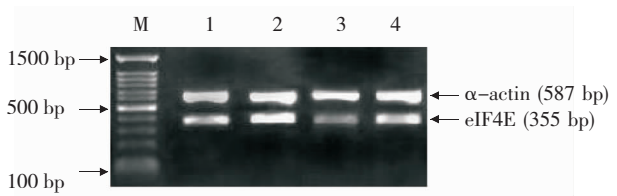


图 2 雷帕霉素抑制 CVB3 诱导的心肌成纤维细胞 eIF-4E mRNA 表达 (RT-PCR)。M: marker;1:对照组;2:病毒组;3:雷帕霉素组;4:病毒 + 雷帕霉素组,CVB3 诱导心肌成纤维细胞 eIF-4E mRNA 表达增加,雷帕霉素可抑制其表达。

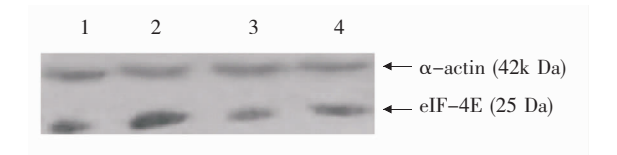


图 3 雷帕霉素抑制 CVB3 诱导的心肌成纤维细胞 eIF-4E 蛋白表达 (WB)。M: marker;1:对照组;2:病毒组;3:雷帕霉素组;4:病毒 + 雷帕霉素组 CVB3 诱导心肌成纤维细胞 eIF-4E 蛋白表达增加,雷帕霉素可抑制其表达。

3 讨论

在病毒性心肌炎 (VM) 和扩张型心肌病患者的 心肌活检标本中有 25 % ~ 50 % 的 CVB 病毒 RNA 呈阳性反应,病毒可长期存在于心脏之中^[9~11],认为可能与病毒感染心肌成纤维细胞有关。以往的研究多用心肌细胞作为 CVB 感染的细胞建立病毒性心肌炎的细胞模型^[12],而柯萨奇病毒-腺病毒受体 (coxsackievirus and adeovovirusre ceptor, CAR) 阴性、非极化细胞如心肌成纤维细胞被认为是不能被 CVB3 感染的细胞。近年研究发现,一些无 CAR 的细胞仍可感染 CVB3,病毒可通过其他粘附分子进入细胞内进行复制^[13,14]。心肌成纤维细胞感染 CVB3 后不会产生明显的细胞病变,且能被 CVB3 有效感染的细胞仅占 13.3% ~ 14.4%^[15],但心肌成纤维细胞一旦感染 CVB3,则可导致病毒滴度增加,感染力增强,并形成病毒持续感染状态,这种持续感染状态,可能是病毒性心肌炎时 CVB3 在心脏持续存在并复制最终导致心力衰竭、心肌重构和心肌纤维化的重要机制^[2]。本实验用重复感染率为 0.2 PFU/cell 及 0.5PFU/cell 的 CVB3 感染心肌成纤维细胞,均未观察到明显细胞病变,重复感染率为 1.0 PFU/cell 的 CVB3 感染心肌成纤维细胞后第 4 天可见成纤维细胞间隙增宽、死亡脱落,说明低滴度的 CVB3 可能使极少量的心肌成纤维细胞被感染,导致细胞形成病毒持续感染状态,不足以产生细胞病

变,而高滴度的 CVB3 可能使感染的心肌成纤维细胞比率增加,并产生大量的细胞因子使细胞发生细胞病变^[16]。透射电镜下观察发现感染后细胞核呈不规则形,线粒体水肿,胞浆内可见病毒颗粒。为证明病毒能进入心肌成纤维细胞内并进行了复制,本实验在 CVB3 感染心肌成纤维细胞后第 1,2,3 天用 RT-PCR 检测 CVB3 mRNA 表达,结果发现 CVB3 mRNA 在第 1 天开始表达,第 2 天表达最强,第 3 天开始减弱,将 CVB3 干预后的心肌成纤维细胞传代后第 2 天再检测,仍见 CVB3 mRNA 表达。说明 CVB3 可感染心肌成纤维细胞,并在心肌成纤维细胞中持久复制,形成病毒持续感染状态。

真核细胞翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E) 是 25 KDa 多肽,它与 eIF4G, eIF4A 共同组成复合体, eIF4E 结合于 mRNA 5'末端的帽结构在帽依赖性翻译起始中起重要作用。mTOR 信号通路的激活能使 eIF-4E 从 4E 连接蛋白 1 脱落并磷酸化,促进蛋白的翻译。有研究发现 CVB3 可加强 Hela 细胞丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B 的 473 位丝氨酸和 308 位苏氨酸残基磷酸化,导致蛋白激酶活化,用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B 阻滞剂可抑制病毒 RNA 的合成、病毒释放和蛋白表达^[6]。本研究发现 CVB3 感染心肌成纤维细胞后使 eIF-4E mRNA 和蛋白表达均增加,提示 CVB3 感染可能与 eIF4E 信号通路活化有关。雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素和免疫抑制剂,与胞浆受体亲免疫素结合后形成亲免疫素-雷帕霉素复合物,此复合物再与 mTOR 结合形成三元复合物,能抑制 mTOR 的生物学功能^[17,18]。mTOR 可控制 4E-连接蛋白 1 的磷酸化,因此用 mTOR 阻滞剂雷帕霉素可影响 4E-连接蛋白 1 磷酸化,从而使 eIF-4E 不能从 4E-连接蛋白 1 脱落,阻止蛋白的合成。本研究用雷帕霉素干预 CVB3 感染的心肌成纤维细胞,能抑制 eIF-4E mRNA 和蛋白的表达,说明 CVB3 可能是通过触发 mTOR/eIF-4E 信号通路活化,使心肌成纤维细胞的功能和结构发生改变,雷帕霉素通过 mTOR 抑制这一通路的激活,提示心肌成纤维细胞可能通过 mTOR 信号通路参与 VM 的发病机制,雷帕霉素对 VM 有潜在的治疗作用。

[参 考 文 献]

[1] 徐小玲,金宏,王炳焕. 浙江省中小学生心血管病流行状况及防治探讨[J]. 中国心血管杂志, 2000, 5(1): 3- 6.

[2] Kuhl U, Pauschinger M, Seeborg B, Lassner D, Noutsias M, Poller W, et al. Viral persistence in the myocardium is associated

with progressive cardiac dysfunction [J]. *Circulation*, 2005, 112 (13): 1965-1970.

[3] Heymans S, Pauschinger M, De Palma A, Kallwellis-Opara A, Rutschow S, Swinnen M, et al. Inhibition of urokinase-type plasminogen activator or matrix metalloproteinases prevents cardiac injury and dysfunction during viral myocarditis [J]. *Circulation*, 2006, 114(6):565-573.

[4] Si X, Luo H, Morgan A, Zhang J, Wong J, Yuan J, et al. Stress-activated protein kinases are involved in coxsackievirus B3 viral progeny release [J]. *J Virol*, 2005, 79(22):13875-13881.

[5] Cunningham KA, Chapman NM, Carson SD. Caspase-3 activation and ERK phosphorylation during CVB3 infection of cells; influence of the coxsackievirus and adenovirus receptor and engineered variants [J]. *Virus Res*, 2003, 92(2):179-186.

[6] Esfandiarei M, Luo H, Yanagawa B. Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent [J]. *J Virol*, 2004, 78(8):4289-4298.

[7] Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease [J]. *Nat Genet*, 2005, 37(1): 19-24.

[8] 刘丹,陈和平,何明. 新生大鼠心肌细胞分离与原代培养[J]. 江西医学院学报, 2005, 45(5):53- 55.

[9] Padalko E, Verbeken E, Matthys P, Aerts JL, De Clercq E, Neyts J. Mycophenolate mofetil inhibits the development of Cox-sackie B3- virus- induced myocarditis in mice[J]. *BMC Microbiol*, 2003, 3: 25.

[10] 蔡小芳,麦根荣,徐之良. 小儿扩张型心肌病与病毒性心肌炎的临床研究[J]. 中国当代儿科杂志,2004,6(4):326-327.

[11] 王述昀,马沛然,牟道玉. 病毒性心肌炎小鼠心脏细胞凋亡和坏死的研究[J]. 中国当代儿科杂志,2002,4(1):5-7.

[12] 陈立敏,刘亚黎,彭华,林雯,胡晓华,蒙冰. FTY720 对柯萨奇 B3 病毒感染大鼠心肌细胞的保护作用及信号转导机制研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(3):220- 222.

[13] Zautner AE, Korner U, Henke A, Badorff C, Schmidtke M. Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor; each one mediates coxsackievirus B3 PD infection [J]. *J Virol*, 2003, 77 (18): 10071-10077.

[14] Zautner AE, Jahn B, Hammerschmidt E, Wutzler P, Schmidtke M. N- and 6-O-sulfated heparan sulfates mediate internalization of coxsackievirus B3 variant PD into CHO-K1 cells [J]. *J Virol*, 2006, 80(13):6629-6636.

[15] Heim A, Canu A, Kirschner P, Simon T, Mall G, Hofschneider PH, et al. Synergistic interaction of interferon-beta and interferon-gamma in coxsackievirus B3-infected carrier cultures of human myocardial fibroblasts[J]. *Infect Dis*, 1992, 166(5): 958-965.

[16] Heim A, Zeuke S, Weiss S, Ruschewski W, Grumbach IM. Transient induction of cytokine production in human myocardial fibroblasts by coxsackievirus B3 [J]. *Circ Res*, 2000, 86(7): 753-759.

[17] Parent R, Kolippakkam D, Booth G, Beretta L. Mammalian target of rapamycin activation impairs hepatocytic differentiation and targets genes moderating lipid homeostasis and hepatocellular growth [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9):4337-4345.

[18] Follo MY, Mongiorgi S, Bosi C, Cappellini A, Finelli C, Chiarini F, et al. The akt/mammalian target of rapamycin signal transduction pathway is activated in high-risk myelodysplastic syndromes and influences cell survival and proliferation [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (9):4287-4294.

(本文编辑:吉耕中)