

论著·实验研究

干扰素- λ_2 对急性病毒性心肌炎小鼠凋亡相关蛋白的研究

聂钰君, 黄星原, 王世红

(武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060)

[摘要] 目的 干扰素- λ (IFN- λ)广泛存在于人体各组织中,目前研究发现其具有抗病毒、抗肿瘤等作用。但其是否能用于治疗病毒性心肌炎尚缺乏相关报道。探讨 IFN- λ_2 在病毒性心肌炎(VMC)早期的作用,为 IFN- λ_2 是否能应用于临床治疗或预防 VMC 提供实验室依据。**方法** 采用腹腔注射柯萨奇 B3(CVB3)病毒的方法制造病毒性心肌炎小鼠模型。实验分3组:空白对照组、病毒组、IFN- λ_2 治疗组。空白对照组给予腹腔注射等量的 PBS 培养液,记为第0天;IFN- λ_2 治疗组从第1天开始,连续5d每天经背部皮肤不同点给予小鼠IFN- λ_2 400 ng (0.1 mL),空白对照组和病毒组则每天以同样方法给予等量生理盐水。死亡小鼠从组中剔除。9d后处死所有存活小鼠。检测各组小鼠心脏的病理改变。采用免疫组织化学技术检测各组小鼠心脏组织中凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 的表达。**结果** ①病毒组心肌病理评分要高于空白对照组及 IFN- λ_2 治疗组。②免疫组化结果显示正常心肌组织有少量 Bcl-2 及 Bax 的表达,病毒组较空白对照组 Bcl-2 表达减少、Bax 表达明显增加($P < 0.01$);IFN- λ_2 治疗组较病毒组 Bcl-2 表达增加、Bax 表达减少($P < 0.01$)。**结论** IFN- λ_2 能减轻柯萨奇病毒所致心肌炎小鼠的心脏病理改变,能抑制小鼠心肌细胞凋亡,对 VMC 小鼠的心肌细胞具有保护作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(4):296-300]

[关键词] 干扰素- λ_2 ;病毒性心肌炎;凋亡相关蛋白;小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)04-0296-05

Effect of IFN- λ_2 on apoptotic protein in the myocardium in mice with viral myocarditis

NIE Yu-Jun, HUANG Xing-Yuan, WANG Shi-Hong. Department of Pediatrics, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China (Huang X-Y, Email: hxy0470@163.com)

Abstract: Objective IFN- λ has anti-viral and anti-tumor activities. Its application in viral myocarditis (VMC) has not been reported. This study investigated the role of IFN- λ in acute VMC in mice. **Methods** Forty mice were randomly divided into three groups: VMC ($n = 15$), IFN- λ_2 -treated VMC ($n = 15$) and control ($n = 10$). VMC was induced by an intraperitoneal injection of Coxsackievirus B3 (CVB3). The control group was intraperitoneally injected with 2% PBS. The IFN- λ_2 -treated VMC group was administered with 400 ng IFN- λ_2 (0.1 mL) by subcutaneous injections daily, for 5 days. The control and the VMC groups were given equal amount of normal saline. The surviving mice were sacrificed 9 days after IFN- λ_2 treatment. The pathological changes of heart tissues were examined under a light microscope. Bcl-2 and Bax expression in heart tissues was determined by immunohistochemistry. **Results** The control group presented normal heart tissues. The IFN- λ_2 -treated VMC group showed significantly a lower pathological score (1.5 ± 0.5) than the untreated VMC group (2.8 ± 0.8) ($P < 0.01$). Bcl-2 expression decreased ($P < 0.01$), in contrast, Bax expression increased ($P < 0.01$) in the untreated VMC group compared with that in the control group. IFN- λ_2 treatment resulted in an increased Bcl-2 expression ($P < 0.01$) and a decreased Bax expression ($P < 0.01$) compared to the untreated VMC group. **Conclusions** IFN- λ_2 may alleviate myocardial injuries and inhibit cardiomyocytic apoptosis, thus providing protective effects on myocardial cells in mice with acute VMC. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (4):296-300]

Key words: IFN- λ_2 ; Viral myocarditis; Apoptotic protein; Mice

病毒性心肌炎(VMC)是儿科常见的心血管疾病,严重威胁小儿健康。急性期可致心律失常(包括III度房室传导阻滞、室性心动过速、心室纤维颤

动等)、心力衰竭及心源性休克,慢性期也可能发展为扩张性心肌病^[1]。国内外研究多年,其确切的发病机制尚不清楚。因此,治疗缺乏特异性,主要为抗

[收稿日期]2008-08-25;[修回日期]2008-10-29

[作者简介]聂钰君,女,硕士研究生,主治医师。主攻方向:小儿心血管病的防治。

[通讯作者]黄星原,男,教授,武汉大学人民医院儿科,邮编:430060。

病毒(利巴韦林、阿昔洛韦)、免疫调节(干扰素、免疫球蛋白)、促进心肌代谢(三磷酸腺苷、辅酶A、肌苷等)、中药、对症治疗等。已有大量报道证实,干扰素对病毒性心肌炎有降低死亡率、减轻心肌病理变化等作用^[2],并已应用于临床。

干扰素- λ (IFN- λ)是2002年新发现的一类干扰素,IFN- λ_1 、IFN- λ_2 、IFN- λ_3 分别又称为IL-29、IL-28A、IL-28B,2003年在*Nature Immunology*杂志上正式发表。它们不同于IFN- α 、 β 、 γ 等,被称为第III类干扰素^[3]。IFN- λ 在人体的各种组织中广泛存在,近年来发现其具有抗HBV、HCV以及抗肝肿瘤和肺肿瘤等生物学功能^[4]。其抗病毒的作用有一定的种属特异性,对柯萨奇病毒引起的VMC是否有效尚缺乏相关的报道。

本研究是采用小鼠VMC动物模型,观察IFN- λ_2 的抗病毒效应,以期为临床上防治VMC提供新的理论依据。

1 材料与动物

1.1 药品及试剂

小鼠IFN- λ_2 细胞因子,购于美国PEPROTECH公司;BAX和BCL-2免疫组织化学试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物

健康雄性3~4周龄近交系纯种Bal B/C小鼠40只,体重9~12g,由武汉大学动物实验室提供。

1.3 主要仪器

离心机、水平振荡器、全自动图像分析仪(显微摄影系统Olympus BX50,数码相机Polaroid DMC,联想奔月2000型计算机)等。

2 模型制备及分组、指标检测

2.1 分组

将40只小鼠随机分为3组:病毒感染组15只,干扰素治疗组15只,空白对照组10只。适应性饲养1周后,病毒感染组、干扰素治疗组分别腹腔注射柯萨奇B3(CVB3)病毒0.2mL,空白对照组给予腹腔注射PBS缓冲液0.2mL,记为第0天^[5,6]。

2.2 IFN- λ 处理

IFN- λ (购于美国PEPROTECH公司,货号1003306)(20 μ g/支)每支加入0.2mL生理盐水,3000r/min离心5min后,振荡器振荡3min,分装于10支1.5mL洁净消毒EP管中(20 μ L/支,内含

IFN- λ_2 20 μ g),每管分别加入生理盐水至0.5mL。保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱。每日使用前37 $^{\circ}$ C水浴箱温浴3min,3000r/min离心3min。

2.3 药物干预

IFN- λ 治疗组从第1天开始,连续5d每天经背部皮肤不同点给予小鼠IFN- λ 细胞因子400ng(0.1mL),空白对照组和病毒感染组则每天以同样方法给予等量生理盐水(购于武汉滨湖双鹤制药厂)。每天记录小鼠活动、进食、皮毛状况及体重变化。死亡小鼠从该组中剔除。第9天分别称重后,眼球放血并断椎处死所有存活小鼠。无菌留取心脏以备检测。

2.4 指标检测

2.4.1 心脏形态学观察 小鼠常规消毒后,取心脏放于40g/L的甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋、脱水、染色,在光学显微镜下观察心肌组织病理变化。心脏坏死范围和细胞浸润范围用对照双盲法评分。心肌病理评分标准:0分为无心肌损害;1分为心肌有1个或2个小病灶;2分为心肌有数个小病灶;3分为心肌组织有多个小病灶或严重大病灶;4分为多个大病灶,弥漫性浸润或坏死。

2.4.2 免疫组织化学 S2P法检测心肌组织中Bcl-2、Bax表达:石蜡标本脱蜡,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5min,采用微波修复,3% H_2O_2 去离子水孵育10min,滴加正常山羊血清,室温孵育15min,倾去。滴加一抗分别为Bcl-2和Bax生物素标记羊多克隆抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C过夜。PBS冲洗后滴加二抗(生物素标记山羊抗小鼠)37 $^{\circ}$ C孵育15min,PBS冲洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C孵育15min,PBS冲洗后,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。阳性结果判断:Bcl-2和Bax均位于胞浆中,均呈棕黄色颗粒。在HPIAS2000型图像(武汉同济千屏影像工程公司)分析软件上,每个切片随机取5个高倍视野,测定一定面积内阳性信号面积和阳性信号平均灰度值乘积,阳性信号指数=阳性信号面积 \times 阳性信号平均灰度/测定面积 \times 100。严格按试剂盒说明书操作。

2.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件包进行处理,计量资料采用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, $P < 0.01$ 则差异有非常显著性意义。所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组与组之间采用 t 检验。

3 结果

3.1 一般情况

空白对照组活动力强,毛色均匀光泽,食欲旺盛,体重逐日增加,且无一例死亡。病毒感染组和IFN- λ_2 治疗组在接种病毒2~3 d后,均出现不同程度的精神萎靡、活动减少、食欲减退、毛皮光泽度减低,出现倒毛现象,伴有腹泻。体重增长较空白对照组缓慢,甚至倒退。IFN- λ_2 治疗组则症状相对较轻。病毒感染组死亡小鼠3只,治疗组死亡1只。

3.2 形态学观察结果

空白对照组:肉眼下小鼠心脏色泽鲜红,富有光泽。光镜下心肌组织未见病理改变:心肌细胞呈短圆柱状,胞浆丰富而红染,胞核卵圆形,位于细胞中央;无充血、坏死,心肌纤维走行正常。

病毒感染组:肉眼下小鼠心脏色泽黯红、肿大,光镜下可见明显充血、灶性坏死,崩解,以心尖部和室间隔最为明显,心肌纤维部分断裂,大量炎症细胞浸润。主要是淋巴细胞和单核细胞,偶有中性粒细胞。

IFN- λ_2 治疗组:肉眼肿大较病毒感染组明显减轻,光镜下充血、坏死灶较病毒感染组明显减少,部分炎症细胞浸润,有少量心肌纤维断裂。各组心肌染色图片见图1。心肌组织病理评分见表1。

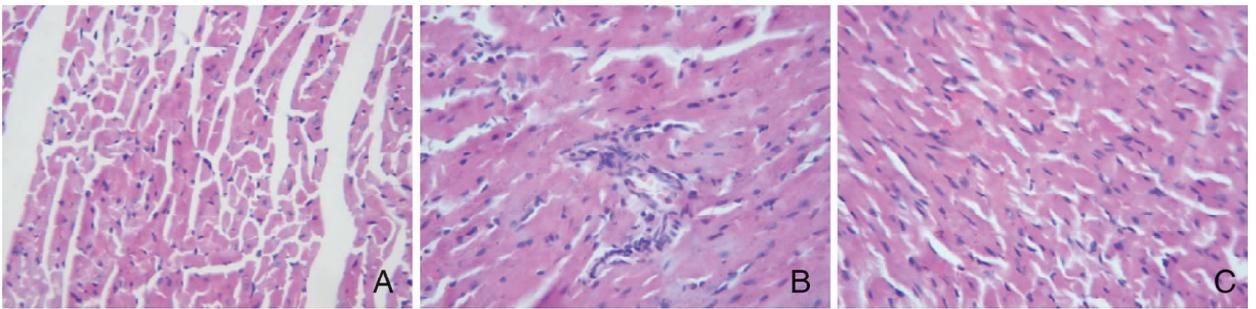


图1 心肌染色图片(苏木精-伊红, $\times 400$) A:空白对照组心肌组织未见病理改变,无充血、坏死,心肌纤维走行正常; B:病毒感染组可见组织充血,间有小坏死灶,心肌纤维少量断裂并有大量炎性细胞浸润,主要是淋巴细胞和单核细胞; C:IFN- λ_2 治疗组可见组织充血、肿胀,坏死灶较病毒感染组明显减少,部分炎症细胞浸润。

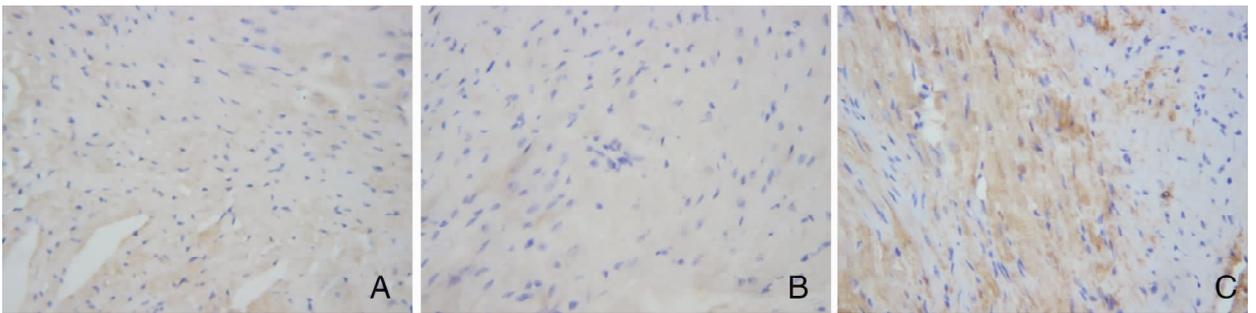


图2 免疫组化 Bcl-2 表达(DAB染色, $\times 400$) A:空白对照组可见少量棕黄色颗粒; B:病毒感染组中几乎见不到棕黄色颗粒; C:IFN- λ_2 治疗组 Bcl-2 表达于细胞胞浆中,可见大量棕黄色颗粒。

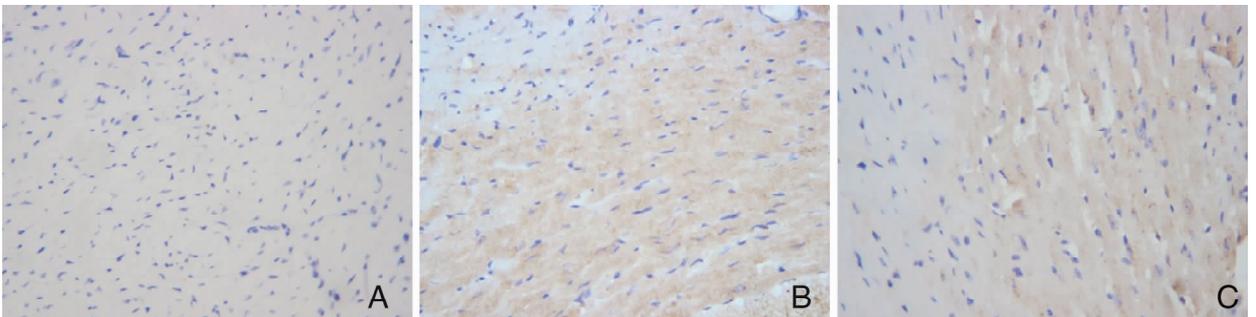


图3 免疫组化 Bax 表达(DAB染色, $\times 400$) A:空白对照组几乎为阴性,见不到表达的棕黄色颗粒; B:病毒感染组 BAX 表达于细胞胞浆中,可见大量棕黄色颗粒; C:IFN- λ_2 治疗组有少量棕黄色颗粒。

表1 心肌组织病理评分 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数(只) | 死亡(只) | 心肌病理评分 |
|------------------------|-------|-------|------------------------|
| 空白对照组 | 10 | 0 | 0 |
| 病毒感染组 | 12 | 3 | 2.8 ± 0.8 ^a |
| IFN-λ ₂ 治疗组 | 14 | 1 | 1.5 ± 0.5 ^b |

a:与空白对照组比较, $t=22.29, P<0.01$; b:与病毒感染组比较, $t=5.23, P<0.01$ 。

3.3 心肌组织中 Bcl-2 和 Bax 的表达

Bcl-2 和 Bax 的阳性细胞主要为病灶中浸润的炎症细胞和周围心肌细胞。Bcl-2 和 Bax 均表达于细胞胞浆中,呈棕黄色颗粒(图 2,3)。

病毒感染组、IFN-λ₂ 治疗组分别与对照组比较,Bcl-2 阳性信号数指数差异有显著性($t=28.12, 18.81, P<0.01$);Bax 阳性信号指数差异亦有显著性($t=52.47, 16.55, P<0.01$)。见表 2。

表2 小鼠 Bcl-2 和 Bax 抗原表达水平及比率 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数(只) | Bcl-2 阳性信号指数 | Bax 阳性信号指数 |
|------------------------|-------|--------------------------|--------------------------|
| 空白对照组 | 10 | 4.18 ± 0.23 | 2.23 ± 0.33 |
| 病毒感染组 | 12 | 1.74 ± 0.15 ^a | 9.70 ± 1.16 |
| IFN-λ ₂ 治疗组 | 14 | 8.48 ± 0.40 ^b | 4.27 ± 0.21 ^b |

a:与空白对照组比较, $P<0.01$; b:与病毒感染组比较, $P<0.01$ 。

4 讨论

VMC 是由嗜心肌病毒引起的心肌炎症浸润、坏死等病理变化。传统观念认为心肌炎主要诱发了心肌细胞坏死,但自 1994 年 Kawano 等^[7]首次报告 VMC 患儿存在心肌细胞凋亡现象后,陆续有学者通过对 VMC 患儿的心肌活检和动物实验证实此观点^[8]。目前发现,在 VMC 中,对细胞凋亡具有调控作用的基因有 Bcl-2、Bax、p53、fas 等原癌基因^[9]。其中 Bcl-2 家族在调节凋亡中起着最重要的作用。Bcl-2 家族主要包括两大类:一类是抗凋亡基因,包括 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 等;另一类是促凋亡基因,包括 Bax、Bad、Bak 等。Bcl-2 能干扰促凋亡蛋白 Bax,阻止细胞色素 C 从线粒体释放入细胞质以激活 caspases,因此抑制了凋亡^[10]。随着凋亡的刺激,Bcl-2 与 Bax 的比率决定着细胞的命运,比率升高促进细胞存活,而降低则促进细胞的死亡^[11]。因此本实验通过检测空白对照组、病毒感染组和干扰素治疗组小鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 的表达水平,观察心肌细胞凋亡情况,以判断 IFN-λ 是否有抑制心肌细胞凋亡的作用。

目前 IFN-λ 用于乙型肝炎等其他病毒性感染性疾病效果肯定,并有浓度依赖性和明显的种属特异性^[12],其结构与 I 型 IFN 具有明显的不同。在正常状态下,IFN-λ 的 mRNA 在血、脑、肺、卵巢、胰腺、垂体、胎盘、前列腺和睾丸等多种组织中有微量表达,在 poly(I)-poly(C) 双链 RNA 的刺激下,或者在病毒感染的情况下,hIFN-λ 的 mRNA 含量在多种细胞中均明显升高^[12]。IFN-λs 的信号转导机制类似于 IFN-α,两者都是通过诱导受体异二聚体化,活化 Jak-STAT 信号通路,进而发挥抗病毒、抗细胞增殖等生物学作用。所不同的是 IFN-λs 是通过诱导其独特的 II 型细胞因子受体 CRF2-12/IFNL R1/IL-28Rα 和 CRF2-4/IL-10Rβ 异二聚体化^[11]。

IFN 是第一个应用于临床的基因工程产品,IFN-α/β 在治疗肿瘤和病毒性感染等方面都取得了显著的疗效^[13]。但会产生发热、疲乏、食欲减退、情绪低落和骨髓抑制等副作用^[14]。IFN-λ 也被证明在体内外对多种病毒具有直接的抗病毒效应^[13,15],因其有望降低副反应而成为目前干扰素的替代治疗^[16]。已有大量资料证明免疫调节治疗对 VMC 小鼠心肌具有保护作用^[2,17]。但 IFN-λ 对柯萨奇病毒等具无包膜的单链 RNA 病毒是否有效,目前尚缺乏相关报道。因此本研究使用 IFN-λ₂ 对 VMC 小鼠进行干预,观察心肌苏木精-伊红染色切片并用免疫组织化学方法检测心肌 Bcl-2 和 Bax 的表达水平,为临床 VMC 尤其是重症 VMC 的治疗探寻新的方法。

本研究结果表明,IFN-λ₂ 治疗组小鼠心肌病理改变明显轻于病毒感染组,且差异具有显著性($P<0.01$);空白对照组心肌 Bcl-2 和 Bax 均有少量表达,Bcl-2/Bax 约为 1.9;感染组心肌 Bcl-2 表达明显减少,Bax 表达显著增加,Bcl-2/Bax 比值极低(<0.2),该组小鼠心肌细胞凋亡大量增加,并与心肌病理变化程度相符;而 IFN-λ₂ 治疗组 Bcl-2 表达明显增加,Bax 表达明显低于感染组但高于对照组,Bcl-2/Bax 比值接近 2.0,因此凋亡细胞数明显少于感染组,其病理变化程度也明显轻于感染组。Bcl-2 和 Bax 主要表达于炎症反应灶中浸润的炎性细胞及周围心肌细胞的胞浆。提示 IFN-λ₂ 通过上调 Bcl-2 和下调 Bax,改变 Bcl-2/Bax 比率来抑制凋亡,从而减轻心肌病理改变程度,因此其对 VMC 心肌有保护作用。

随着对干扰素-λ 研究的进一步深入,应用 IFN-λ 治疗 VMC 成为一种可能。本研究通过对 CVB3 小鼠早期使用 IFN-λ₂,显著改变心肌 Bcl-2 和

Bax 水平,也减轻了心肌细胞的损害程度,并减少死亡率。本实验未能对各组小鼠血浆、心肌等部位 IFN- λ 的 mRNA 进行动态监测,实属不足,且针对 IFN- λ 作用机制的说明,均是立足于前人之上的,并未对 caspases 等进行专门研究。综上所述,IFN- λ 对 VMC 心肌细胞有保护作用,本实验为 IFN- λ 在治疗 VMC 的临床应用提供了一定的理论依据,也为进一步研究提供新的平台。

参 考 文 献

[1] Martino TA, Liu P, Sole MJ. Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 1994, 74(2):182-188.

[2] 王凯,夏伟. α -2b 干扰素与丙种球蛋白联合治疗小儿初发病毒性心肌炎[J]. *山东医药*, 2006, 42(9):13-14.

[3] 马丽丽,王建红,盛伟华,谢宇锋,缪竞诚,杨吉成. 人 lamda3 干扰素-hIFN- λ 3 基因克隆及表达[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2005, 25(1):23-26.

[4] Osterlund P, Veckman V, Siren J, Klucher KM, Hiscott J, Matikainen S, et al. Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells[J]. *J Virol*, 2005, 79(15):9608-9617.

[5] 王雪峰,王永梅,刘芳,郑菲,魏克伦. 克隆测序鉴定柯萨奇病毒 B3m 诱导 BAL B/c 小鼠急性心肌炎模型[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(12):753-754.

[6] 崔小岱,马连华,许峥,呼守生, Ricardo Gomez, 张霆. 制造病毒性心肌炎模型毒株的比较[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(2):83-85.

[7] Kawano H, Okada R, Kawano Y, Sueyoshi N, Shirai T. Apoptosis in acute and chronic myocarditis[J]. *Jpn Heart J*, 1994, 35

(6):745-750.

[8] Huber SA. Coxsackievirus induced myocarditis is dependent on distinct immunopathogenic responses in different strains of mice [J]. *Lab Invest*, 1997, 76(10):691-701.

[9] 陈志玫,张莉,包进. 病毒性心肌炎患儿血清白介素-10 (IL-10) 的表达水平及意义[J]. *中国妇幼保健*, 2007, 22(3):388-389.

[10] Rosse T, Olivier R, Monney L, Raqer M, Conus S, Fellay I, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after bax-induced release of cytochrome C[J]. *Nature*, 1998, 391(6666):496-499.

[11] 王作军,顾坚,黄星原. 不同时期应用胰岛素样生长因子-1 对小鼠病毒性心肌炎心肌细胞凋亡蛋白表达的影响[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(18):1407-1408.

[12] 王刚,李武平,张成海. 新型重组人 IFN-X₂ 的高效表达、纯化与抗病毒活性研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2005, 19(3):232-235.

[13] 凌云,张申英,张欣欣. 干扰素不同亚型的产生和抗病毒作用研究进展[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2006, 33(5):321-323.

[14] 王建红,马丽丽,谢宇锋,盛伟华,缪竞诚,吴康,等. hIFN- λ 1 (hIL-29) 基因及在 COS-7 细胞中瞬时表达和抗病毒效应[J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(10):744-746.

[15] Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, Paludan SR. Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo[J]. *J Virol*, 2006, 80(9):4501-4509.

[16] 李珊,李秋艳,陈素华,李云龙. 干扰素的新家族——IFN- λ s 研究现状[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(10):5-8.

[17] 吕军艳,吕军颖,周华. 干扰素 α -2b 和黄芪注射液联合治疗小儿病毒性心肌炎疗效观察[J]. *中国社区医师*, 2006, (22):46.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

本刊荣获第四届湖南省“双十佳期刊”称号

中共湖南省委宣传部和湖南省新闻出版局联合组织评选出了第四届湖南省“双十佳期刊”。中国当代儿科杂志荣膺湖南省“双十佳期刊”称号。获此奖项,本刊感到十分荣幸,这是对我刊工作的充分肯定。我们将保持和发扬已有的优势和特色,发挥“双十佳期刊”的示范作用,争取新的更大的发展。借此机会向一贯支持我刊的读者、作者及对杂志付出辛勤工作的学术委员、编委致以诚挚的谢意!

《中国当代儿科杂志》编辑部

2009年2月