

NLRP3 炎症小体参与 HSV-1 诱导病毒性心肌炎的实验研究

宋 宁,陈相健,王子盾,王秀芝,徐东杰*

(南京医科大学第一附属医院心血管内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体是否参与单纯疱疹病毒 1 型(herpes simplex virus-1, HSV-1)诱导的病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)的病理过程。方法:培养乳鼠心室肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVM),分别以 0.01 PFU 和 0.1 PFU HSV-1 感染 NRVM,24 h 后通过光学显微镜观察细胞形态学改变,实时定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)测定 NLRP3 炎症小体及其下游通路的 mRNA 表达水平,免疫荧光(immunofluorescence, IF)显示半胱天冬酶(cysteinyI aspartate-specific proteases, Caspase)-1 的表达,全自动生化仪测定细胞上清肌酸激酶同工酶 MB (creatin kinase-MB, CK-MB) 的含量以及酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定细胞上清白细胞介素(interleukin, IL)-18 的浓度。结果:HSV-1 感染心肌细胞模型组出现细胞病变现象 (cytopathic effect, CPE), 培养细胞上清细胞损伤标志物 CK-MB 明显增高 ($P < 0.05$), qRT-PCR 测定模型组 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 相对表达量较对照组高 5 倍以上, IF 显示 Caspase-1 在 HSV-1 干预后的 NRVM 胞质内表达明显增高,培养细胞上清 IL-18 浓度较对照组增高($P < 0.05$)。结论:NLRP3 炎症小体及下游通路在 HSV-1 诱导的 VMC 细胞模型中被激活,参与其病理过程,为治疗病毒性心肌炎提供可能的新靶点。

[关键词] NLRP3 炎症小体;单纯疱疹病毒 1 型;病毒性心肌炎;乳鼠心室肌细胞

[中图分类号] R542.2*1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)06-699-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140602

NLRP3-inflammasome participated in HSV-1 induced viral myocarditis

Song Ning, Chen Xiangjian, Wang Zidun, Wang Xiuzhi, Xu Dongjie*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe whether the Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3)-inflammasome participates in the pathologic process of herpes simplex virus-1 (HSV-1) induced viral myocarditis (VMC). **Methods:** Cultured neonatal rat ventricular cardiomyocytes (NRVM) of neonatal rats were infected with 0.01 and 0.1 PFU HSV-1 for 24 hours, respectively. Morphologic changes of NRVM were observed under light microscope. The gene expression of NLRP3-inflammasome and its downstream pathways were measured by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The expression and location of cysteinyI aspartate-specific proteases-1 (Caspase-1) were evaluated by immunofluorescent (IF) method. Moreover, creatine kinase-MB (CK-MB) content was detected by automatic biochemical analyzer and supernatant concentration of interleukin-18 (IL-18) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Cytopathic effect (CPE) was observed in NRVM infected with HSV-1. The supernatant concentration of CK-MB, one of the myocardial injury biomarkers, was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the mRNA levels of NLRP3, Caspase-1, IL-1 β and IL-18 were up-regulated over 5 times in HSV-1 infected NRVM. IF showed that the expression of Caspase-1 was significantly increased. The concentration of supernatant IL-18 was increased compared with that of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** NLRP3-inflammasome and its downstream pathways were activated in cell model of HSV-1 infected VMC. NLRP3-inflammasome may participate in pathologic process of VMC, and became a potential target for VMC therapy.

[Key words] NLRP3-inflammasome; HSV-1; viral myocarditis; neonatal rat ventricular cardiomyocytes

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(06): 699-704]

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI11B00)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: djxu@njmu.edu.cn

炎症小体是由胞浆内模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)参与组装形成的多蛋白复合物,作为固有免疫的重要组成部分,广泛存在于经典免疫细胞及非免疫细胞。PRRs主要包括位于细胞膜和内体膜上的Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs)和C型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLR),位于胞浆内的NOD样受体(Nod-like receptors, NLRs)、视黄酸诱导基因I解旋酶(RIG-I)样受体(RIG-I-like receptors, RLRs)。NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3)炎症小体作为NLRs家族的成员,是目前研究最为深入的一种炎症小体,它通过识别病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)和危险信号相关分子模式(danger associated molecular patterns, DAMPs),继而与凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)结合,并招募半胱天冬酶(cysteiny aspartate-specific proteases, Caspase)-1前体形成NLRP3炎症小体。Caspase-1在炎症小体中活化,促使促炎细胞因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 和IL-18的加工和释放,并诱导细胞焦亡(pyroptosis),释放具有促炎作用的胞内内容物^[1-6]。

本研究利用单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus-1, HSV-1)感染离体培养乳鼠心室肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVM)^[7],构建病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)细胞模型,拟观察NLRP3炎症小体—Caspase-1—IL-18通路的表达在HSV-1病毒感染心肌细胞损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

非洲绿猴肾成纤维细胞(Vero细胞)获自美国模式培养物集存库(ATCC, 美国)。新生Sprague Dawley(SD)大鼠(1~3日龄)购自南京医科大学实验动物中心。Vero细胞和NRVM皆以含10%胎牛血清(Gibco公司, 美国)、100 U/L青霉素和100 mg/ml链霉素(Hyclone公司, 美国)的DMEM高糖培养基(Gibco公司, 美国), 37℃, 5% CO₂培养箱培养, 隔日换液。

野生型HSV-1(McKrae株, 由南京医科大学微生物与免疫实验室卢春教授惠赠)在Vero细胞中扩增, 通过空斑实验测定病毒滴度为 1×10^6 PFU/ml^[8-9]。

1.2 方法

1.2.1 原代乳鼠心室肌细胞分离及培养

原代NRVM分离自出生1~3 d的SD乳鼠, 以0.1%胰酶和0.1%胶原酶反复消化获得, 差速贴壁1.5 h以去除成纤维细胞, 接种于6孔板和35 mm激光共聚焦皿。观察细胞融合成片且90%以上同步搏动, 进行实验干预。以下实验均独立重复3~4次, 每组3个复孔。

1.2.2 实验分组及病毒感染方法

HSV-1经Vero细胞扩增后, 以0.01 PFU和0.1 PFU的滴度感染NRVM^[8], 分别设定为模型1组和模型2组, 同时设定不加病毒感染的正常对照组, 病毒感染后24 h光学显微镜下观察细胞病变现象(cytopathic effect, CPE)现象, 收集培养上清用于心肌损伤标志物肌酸激酶同工酶MB(creatine kinase-MB, CK-MB)、促炎细胞因子IL-18检测; 收集细胞, 提取总RNA, 用于实时定量PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测; 激光共聚焦皿培养细胞用于免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测。

1.2.3 qRT-PCR检测

培养细胞NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18的mRNA表达水平通过qRT-PCR进行检测(引物见表1, 由日本TaKaRa公司合成)。利用TRIzol试剂(Invitrogen公司, 美国)进行细胞总RNA的提取。测得RNA纯度 $D(260 \text{ nm})/D(280 \text{ nm})$ 比值1.8~2.0之间, 用无RNA酶水调整RNA浓度至100~400 nmol/ μl 。利用逆转录试剂盒(Bio-Rad公司, 美国)在42℃50 min, 95℃5 min, 5℃5 min条件下进行cDNA合成。ABI7900荧光定量PCR仪进行cDNA扩增。反应采用10 μl 体系: 5 μl 引物, 5 μl iQ SYBR[®] Green预混液(Bio-Rad公司, 美国)与cDNA(按照40:1比例)在95℃15 s, 60℃30 s, 72℃30 s条件下进行40个循环。每个样本为3复孔。以GAPDH为内参基因, mRNA的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行比较。 $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{模型组目的基因 Ct}-\text{模型组内参基因 Ct})-(\text{对照组目的基因 Ct}-\text{对照组内参基因 Ct})$ 。

1.2.4 IF检测培养细胞Caspase-1表达

将培养在激光共聚焦皿内的细胞用PBS清洗3遍。4% PFA(Amresco公司, 美国)固定20 min后PBS清洗, 含0.5% TritonX-100(Amresco公司, 美国)透化20 min后清洗3遍, 2.5%正常马血清室温下封闭30 min。小心吸出封闭液, 用1% BSA的PBS稀释一抗(ab17820, Abcam公司, 美国)为10 $\mu\text{g/ml}$, 4℃孵育过夜。PBS清洗3遍, 用生物素标记的二抗

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名	引物序列(5'→3')
NLRP3	F: CCAGGGCTCTGTTCATTG R: CCTTGGCTTTCACTTCG
ASC	F: CCCATAGACCTCACTGATAAAC R: AGAGCATCCAGCAAACCA
Caspase-1	F: AGGAGGGAATATGTGGG R: AACCTTGGGCTTGTCTT
IL-1 β	F: CCTTGTGCGAGAATGGGCAGT R: TTCTGTGCGACAATGCTGCCT
IL-18	F: ACAGCCAACGAATCCCAGAC R: ATAGGGTCACAGCCAGTCCT
GAPDH	F: CTCAGTTGCTGAGGAGTCCC R: ATTCGAGAGAAGGGAGGGCT

常温孵育 30 min。荧光 Avidin DCS(Vector 公司, 美国)孵育 10 min。DAPI(Vector 公司, 美国)染核后, 在 LSM 5 Live DuoScan Laser Scanning Microscope (Zeiss 公司, 德国)下观察。

1.2.5 培养上清 CK-MB 及 IL-18 检测

IL-18 ELISA 检测试剂盒购自美国 Life Technology 公司, 根据操作说明, 定量检测培养细胞上清 IL-18 的含量。培养上清 CK-MB 采用日本 Olympus AU5400 全自动生化仪进行分析。

1.3 统计学方法

实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)或均数 \pm

标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示, 应用 SPSS13.0 统计软件, 3 组定量资料之间的比较采用单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HSV-1 感染心肌细胞致 CPE 现象观察

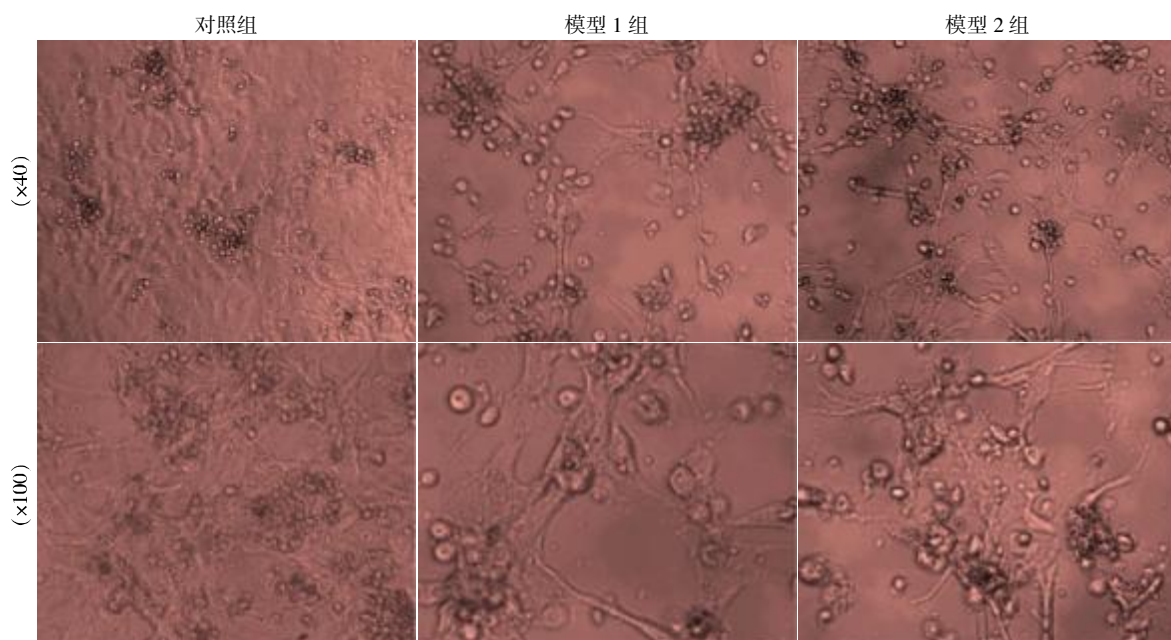
HSV-1 感染 NRVM 24 h 后, 光镜下观察(图 1), 可见 CPE 现象, 心肌细胞肿胀, 伪足缩短变粗, 细胞密度明显减低。而对照组细胞表现正常, 90% 以上同步搏动且搏动有力。

2.2 HSV-1 感染心肌细胞致心肌损伤标志物 CK-MB 水平增高

CK-MB 是诊断急性心肌损伤特异性及敏感性较高的标志物。HSV-1 感染 NRVM 后致细胞损伤, 细胞膜通透性增高, 细胞内 CK-MB 可释放入培养上清, 其浓度可间接反映细胞损伤程度。HSV-1 感染心肌细胞后, 模型 1 组和模型 2 组 CK-MB 值[(10.17 \pm 3.99) U/L, (9.93 \pm 3.21) U/L], 较正常对照组 CK-MB 值(6.62 \pm 1.62) U/L 明显增高($P < 0.05$, 图 2)。结合光镜下观察 CPE 及心肌损伤标志物 CK-MB 结果, 证实 HSV-1 感染 NRVM 损伤模型构建成功。

2.3 HSV-1 感染心肌细胞致 NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 水平增高

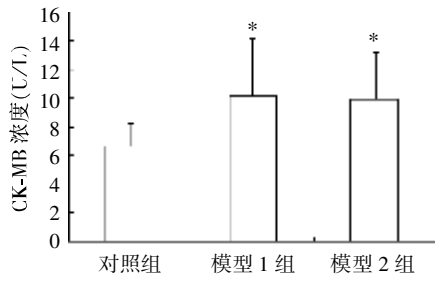
通过 qRT-PCR 试验, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 相



HSV-1 感染后 24 h, 光学显微镜下观察 NRVM 形态学改变。模型 1 组和模型 2 组出现 CPE 现象: 胞体肿胀, 伪足粗短。对照组 NRVM 形态正常。

图 1 HSV-1 感染后 NRVM 形态学表现

Figure 1 The morphologic manifestation of NRVM infected with HSV-1



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 4$ 。

图 2 HSV-1 干预后 24 h NRVM 上清 CK-MB 浓度

Figure 2 Determination of CK-MB concentrations in NRVM supernatants at 24 h post HSV-1 infection

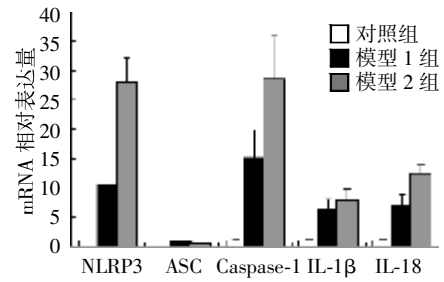


图 3 NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1β、IL-18 mRNA 相对表达量

Figure 3 The mRNA relative expressions of NLRP3, ASC, Caspase-1, IL-1β and IL-18

对表达量(以正常组靶基因表达为 1 计算)。与对照组相比,模型 1 组 NLRP3、Caspase-1、IL-1β 和 IL-18 mRNA 表达分别增高 10 倍、14 倍、5 倍和 6 倍,模型 2 组各基因 mRNA 表达亦显著增高,分别增长 27 倍、28 倍、7 倍和 12 倍。但是,在模型组并未检测到 ASC mRNA 表达增高,其表达量分别下降至正常组的 73%和 52%(图 3)。

2.4 HSV-1 感染心肌细胞致 Caspase-1 含量增高

本研究 IF 中所使用检测 Caspase-1 的抗体为兔

源多克隆抗体,可同时检测 45 000 的 pro-Caspase-1 和 20 000 的 Caspase-1。HSV-1 感染心肌细胞 24 h 后,与对照组相比,感染细胞胞质中 pro-Caspase-1 和 Caspase-1 表达明显增加,在胞质中呈点状聚集,而正常对照组未见明显荧光染色(图 4)。

2.5 HSV-1 感染心肌细胞致 IL-18 释放增加

HSV-1 感染心肌细胞模型组与正常对照组相比,释放至培养上清的 IL-18 含量均呈增加趋势,其中模型 1 组细胞上清 IL-18 含量(62.65 ± 6.69)pg/ml

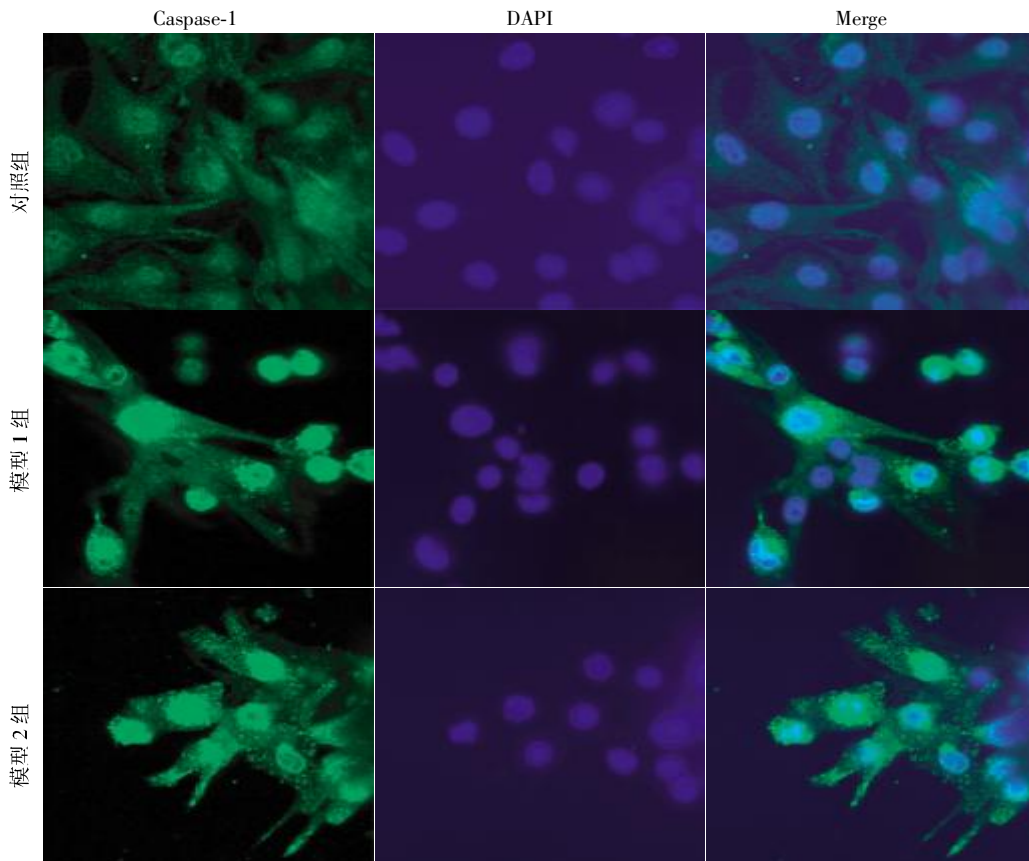


图 4 免疫荧光检测 Caspase-1 在 NRVM 中的表达

Figure 4 Expression of caspase-1 in NRVM was detected by immunofluorescent method

与正常对照组(26.99 ± 11.43)pg/ml相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),模型2组细胞上清中IL-18含量(32.83 ± 9.25)pg/ml与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,图5)。

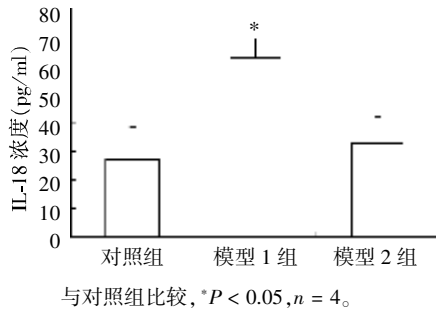


图5 HSV-1干预后24h NRVM培养上清IL-18浓度

Figure 5 Determination of IL-18 concentrations in NRVM supernatants at 24 h post HSV-1 infection

3 讨论

心肌炎是指心肌局限性或弥漫性的急性或慢性炎症病变,病毒感染是最常见的原因^[10-11]。引起心肌炎最常见的病毒包括柯萨奇B19病毒和腺病毒等^[12]。HSV-1除可引起角膜炎、脑炎外,亦可引起心肌炎症^[13-14]。因此,本研究中首先利用HSV-1在离体培养的NRVM中构建VMC离体细胞模型,在模型组中,观察到CPE现象并检测到细胞上清中CK-MB增高,结合王子盾等^[8]反映HSV-1在细胞内复制的糖蛋白D(glycoprotein D, gD)表达的结果,说明HSV-1成功侵入NRVM并表达,引起心肌炎症,表明模型构建成功。

NLRP3炎症小体作为多蛋白复合体,是由NLRP3、ASC和pro-Caspase-1组成的。本研究利用qRT-PCR探索NLRP3炎症小体各组成部分mRNA表达变化情况,结果显示HSV-1能够明显上调模型组NLRP3、Caspase-1、IL-1 β 和IL-18 mRNA的表达。IF显示pro-Caspase-1和Caspase-1在模型组胞质内高度表达,且模型组细胞上清IL-18浓度明显增高,都提示NLRP3炎症小体—Caspase-1—IL-18通路在HSV-1诱导的VMC病理生理过程中被激活。Caspase-1作为炎症的主要介导者,一方面活化后可加工分泌促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18,从而募集、激活其他免疫细胞,诱导其他细胞因子、趋化因子和黏附分子的合成,放大局部炎症;另一方面, Caspase-1的活化使质膜完整性破坏形成微小孔径,致胞体肿胀,最终细胞发生渗透性崩解,引起细胞焦亡,焦亡的细胞释放胞内内容物,诱发炎症反应^[15]。据

报道,NLRP3炎症小体在急慢性呼吸系统炎症性反应、疟疾、肾脏疾病、肿瘤等多种疾病中发挥重要作用^[16]。

目前,在心肌炎症性病变中尚未有NLRP3炎症小体的报道,本研究通过细胞实验提示NLRP3炎症小体可能参与VMC的发生发展中,进一步可在动物模型中加以验证,研究其作为治疗心肌炎症新靶点的可能性。

[参考文献]

- [1] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2): 417-426
- [2] 雷国伟,毛立明,李华,等. 炎症小体在对抗微生物感染中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(12): 1301-1315
- [3] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832
- [4] Liu D, Rhebergen AM, Eisenbarth SC. Licensing adaptive immunity by NOD-like receptors [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 486
- [5] Tang D, Kang R, Coyne CB, et al. PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity [J]. *Immunol Rev*, 2012, 249(1): 158-175
- [6] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death [J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3): 113-114
- [7] Chlopciková S, Psotová J, Miketová P. Neonatal rat cardiomyocytes—a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2001, 145(2): 49-55
- [8] Wang ZD, Hou XF, Qiu LB, et al. Rapamycin reverses connexin 43 impairment in human herpes simplex virus-1 viral myocarditis [J]. *J Biomed Res*, 2013, 27(1): e1-9
- [9] 程伟,郝婷婷,王子盾,等. HSV-1作用于KSHV ORF50启动子区中特异性应答位点序列的初寻[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2011, 31(5): 595-600
- [10] 朱咏贵,陈志衡,杨作成. 病毒性心肌炎模型研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2013, 33(1): 67-71
- [11] Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, et al. Hfsa 2010 comprehensive heart failure practice guideline [J]. *J Card Fail*, 2010, 16(6): e1-194
- [12] Shauer A, Gotsman I, Keren A, et al. Acute viral myocarditis: current concepts in diagnosis and treatment [J]. *Isr Med Assoc J*, 2013, 15(3): 180-185
- [13] Thomas P, Bhatia T, Gauba D, et al. Exposure to herpes simplex virus, type 1 and reduced cognitive function [J].

J Psychiatr Res, 2013, 47(11): 1680-1685

[14] Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction. Evidence of adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 42(3): 466-472

[15] Yazdi AS, Guarda G, D'Ombrain MC, et al. Inflammatory caspases in innate immunity and inflammation[J]. J Innate Immun, 2010, 2(3): 228-237

[16] 秦 淼, 房静远. 炎症小体与肿瘤发生的研究进展[J]. 肿瘤, 2013, 33(6): 556-560

[收稿日期] 2014-01-27

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 如 Zhou Ping, Shi Honglei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病学与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”, 并在论文首页下补充基金的名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)