

# 白细胞介素-27 在小鼠病毒性心肌炎中的表达\*

黄凯<sup>1</sup> 孔清<sup>1</sup> 潘晓芬<sup>1</sup> 赖文盈<sup>1</sup> 石昌荆<sup>1</sup> 伍伟锋<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究小鼠病毒性心肌炎(VMC)模型中白细胞介素(IL)-27 基因和蛋白的表达,探究其在 VMC 发病中的作用及意义。方法:VMC 组用柯萨奇病毒 B3(CVB3)感染 Balb/c 小鼠建立 VMC 模型,注射 100TCID<sub>50</sub> 病毒液 0.1 ml;对照组注射等量磷酸盐缓冲液(PBS)。在注射后的第 0、1、2、3、4 和 6 周应用逆转录-聚合酶链反应检测两组小鼠心肌组织中 IL-27 亚基 p28 及 EB13 的 mRNA 表达,酶联免疫双夹心抗体法检测血清中 IL-27 蛋白的表达。结果:与对照组比较,VMC 组小鼠心肌组织中 IL-27 p28 mRNA 水平自第 1 周开始升高,第 2 周时达峰值,并至少维持至第 6 周(均  $P < 0.05$ );VMC 组第 1~6 周各时点血清 IL-27 蛋白均明显高于对照组(均  $P < 0.05$ );与对照组同时点比较,VMC 组各时点小鼠心肌组织中 IL-27 EB13 mRNA 差异均无统计学意义。结论:IL-27 在 VMC 小鼠中高表达,提示 IL-27 可能参与 VMC 的发病机制。

**[关键词]** 病毒性心肌炎;白细胞介素-27

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.02.008

**[中图分类号]** R542.2 **[文献标志码]** A

## Expressions of IL-27 in the coxsackievirus B3-induced mice viral myocarditis

HUANG Kai KONG Qing PAN Xiaofen LAI Wenyin SHI Changjing WU Weifeng

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Cardiovascular Institute, Nanning, 530021, China)

Corresponding author: WU Weifeng, E-mail: wucna65@163.com

**Abstract Objective:** To investigate the expression of interleukin-27 (IL-27) in the coxsackievirus B3-induced mice viral myocarditis (VMC). **Method:** BALB/c mice were intraperitoneally infected with CVB 3 for establishing

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81160032)

<sup>1</sup> 广西医科大学第一附属医院心内科 广西心血管病研究所(南宁,530021)

通信作者:伍伟锋, E-mail: wucna65@163.com

一般而言,非诺贝特耐受性良好,大多数不良反应在停药后可逆转,但在其与他汀类药物合用以及在肾脏疾病患者中用药时,应高度重视安全性问题<sup>[12]</sup>。

### 参考文献

- [1] HUANG W Y, SUN M. The mechanism of beta-blockade on treating the congest heart failure[J]. J Clin Cardiol (China), 2002, 18: 137-137.
- [2] LEUSCHNER F, PANIZZI P, CHICO-CALERO I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction[J]. Circ Res, 2010, 107: 1364-1373.
- [3] FINCK B N, CHINETTI G, STAELS B. PPARs/RXRs in cardiovascular physiology and disease[J]. PPAR Res, 2008, 2008: 173780. doi:10.1155/2008/173780.
- [4] 胡大一, 吴彦. 规范心力衰竭治疗加强患者管理[J]. 中华心血管病杂志, 2005, 33(6): 495-497.
- [5] LEUSCHNER F, PANIZZI P, CHICO-CALERO I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction[J]. Circ Res, 2010, 107: 1364-1373.
- [6] HAEMMERLE G, MOUSTAFA T, WOELKART G, et al. ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- $\alpha$  and PGC-1 [J]. Nat Med, 2011, 17: 1076-1085.
- [7] STAELS B, DALLONGEVILLE J, AUWERX J, et al. Mechanism of action of fenofibrate on lipid and lipoprotein metabolism[J]. Circulation, 1998, 98: 2088-2088.
- [8] LANDMESSER U, SPIEKERMANN S, DIKALOV S, et al. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine oxidase and extracellular superoxide dismutase[J]. Circulation, 2002, 106: 3073-3081.
- [9] FEHER M D, HEPBURN A L, HOGARTH M B, et al. Fenofibrate enhances urate reduction in men treated with allopurinol for hyperuricaemia and gout [J]. Rheumatology, 2003, 42: 321-351.
- [10] YUAN J, WU J, HANG Z G, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor A activation in acute myocardial damage induced by isoproterenol in rats[J]. Chin Med J, 2008, 121: 1569-1573.
- [11] YANG Y Y, LB F, WU Q, et al. Effects of fenofibrate on the myocardial energy metabolism during heart failure in the rat model of myocardial infarction [J]. Chin J Hypertens, 2011, 19: 129-133.
- [12] 程凯, 徐珽, 唐尧, 等. 非诺贝特致不良反应分析[J]. 华西医学, 2010, 25(8): 1536-1538.

(收稿日期:2013-09-17 修回日期:2013-11-14)

VCM models. Control mice were treated with phosphate-buffered saline (PBS). On 0, 1, 2, 3, 4, 6 week after injection, expressions of serum IL-27 were analyzed by enzyme linked immosorbent assay (ELISA). Productions of cardiac IL-27 p28 and EB13 mRNA were measured by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Result:** Levels of cardiac IL-27 p28 mRNA obviously increased in VMC mice on week 1 after infection, peaked on week 2, and highly persisted to at least week 6 (all  $P < 0.05$ ). Compared with control group, serum IL-27 protein was higher in VMC group from week 1 to week 6 (all  $P < 0.05$ ). There was no significant difference production of cardiac IL-27 EB13 mRNA was found between VMC and control group throughout the course of the experiment. **Conclusion:** The increased levels of IL-27 may play an important role in the pathogenesis of CVB3-induced mice VMC.

**Key words** viral myocarditis; interleukin-27

病毒性心肌炎(VMC)是由于病毒侵犯心肌,引起心肌细胞变性坏死和间质炎症,从而导致不同程度的心功能障碍和全身症状的病毒感染性疾病。B3型柯萨奇病毒(CVB3)是病毒性心肌炎的主要病原之一<sup>[1]</sup>。病毒的直接攻击和其引发的自身免疫反应在VMC的发病机制中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。大量研究报道证实,众多细胞因子如白细胞介素(IL)-12、10及干扰素(IFN)- $\gamma$ 等在调节VMC免疫及炎症网络方面起重要的作用<sup>[1-2]</sup>。IL-27是新近发现的一种异源二聚体细胞因子,由特异的亚单位IL-27p28和EB13组成,参与众多炎症及自身免疫性疾病的发病机制,是重要的免疫调节因子<sup>[3-5]</sup>。目前国内外尚无关于IL-27在VMC中表达的研究报道。本研究通过建立CVB3诱导的VMC小鼠模型,观察IL-27在VMC小鼠不同时期的表达变化,初步探讨IL-27在VMC发病中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SPF级雄性Balb/c小鼠由国家啮齿类实验动物种子中心湖南分中心(斯莱克景达公司)提供,许可证号0062353-SCXK(X)2009-0004;CVB3 Nancy株由我校微生物教研室提供;Trizol购自美国Invitrogen公司;M-MLV逆转录酶试剂盒和dNTPmix等聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自加拿大Fermentas公司;PCR引物由上海生工生物技术有限公司合成;小鼠IL-27 ELISA试剂盒购自深圳欣盛博公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 VCM小鼠模型的建立与分组** CVB3 Nancy株经人喉癌细胞系细胞活化增殖,细胞病变程度达75%以上(+++~++++)时收获,测50%组织培养感染浓度TCID<sub>50</sub>为 $10^{-7}$  mol/L。雄性BALB/c小鼠,VCM组48只,每只小鼠腹腔注射含100TCID<sub>50</sub> CVB3病毒液的磷酸缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS) 0.1 ml;对照组30只,每只小鼠腹腔注射不含病毒的PBS 0.1 ml。接种病毒当日定为第0天,两组动物均设0、1、2、3、4、6周,共6个时点亚组。VCM组每个时点亚组为8只,对照组每个时点亚组为5只。分别于每个时间点眼眶采血后处死小鼠并留取心脏(分别在第0、7、14、21、28及42天取材)。心脏组织部分用于

苏木素-伊红染色,部分用于提取总RNA。

**1.2.2 心肌组织病理学检查** 取两组各时间点小鼠心肌组织,10%甲醛固定后石蜡包埋,Hematoxylin-Eosin染色,光镜下观察组织病理改变。

**1.2.3 心肌IL-27p28及EB13亚基的mRNA表达** 收集两组小鼠心肌组织,用Trizol试剂提取总RNA。在0.2 ml PCR反应管中加入3  $\mu$ g总RNA,oligo引物1  $\mu$ l,DEPC水补至12  $\mu$ l,70 $^{\circ}$ C变性5 min,冰上骤冷。短暂离心,加5 $\times$ RT缓冲液4  $\mu$ l,10 mmol/L dNTPmix 2  $\mu$ l,RNA酶抑制剂1  $\mu$ l,逆转录酶1  $\mu$ l,短暂离心,42 $^{\circ}$ C温育1 h,70 $^{\circ}$ C 10 min终止反应,合成的cDNA置于-20 $^{\circ}$ C冻存。小鼠IL-27 p28、EB13和 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)基因序列经GenBank获得,上海生工生物技术有限公司合成引物(表1)。PCR反应以 $\beta$ -actin为内参照。利用荧光染料SYBR Green I,样品的目的基因IL-27 p28、EB13以及 $\beta$ -actin进行PCR扩增。20  $\mu$ l PCR反应体系:cDNA 1  $\mu$ l,上下游引物各0.6  $\mu$ l,2.5 $\times$ RealMasterMix/20 $\times$ SYBR solution 10  $\mu$ l,去离子水7.8  $\mu$ l,加于PCR管中,在ABI7500荧光定量PCR检测仪上进行扩增并收集荧光信号。94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,35个循环,最后72 $^{\circ}$ C总延伸10 min。每个循环后采集荧光生成扩增曲线,65~95 $^{\circ}$ C缓慢升温,产生溶解曲线;同步进行 $\beta$ -actin拷贝数的检测。实验重复2次,设置复孔参照。根据Comparative Delta-delta Ct法 $\Delta\Delta Ct = VMC$ 组(Ct目的基因-Ct $\beta$ -actin)-对照组(Ct目的基因-Ct $\beta$ -actin),利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算VCM组IL-27 p28、EB13相对于对照组增加或减少的倍数。

表1 引物序列表

基因	引物序列	T/ $^{\circ}$ C
IL-27 p28	5'TCTGGTACAAGCTTCCTGG3'	60
	5'GGACGTTAGCTTCTCACTTT3'	
IL-27 EB13	5'GAGGGTCCGGCTTGATGAT3'	60
	5'CACGGTGCCCTACATGCTAA3'	
$\beta$ -actin	5'CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT3'	60
	5'TTGGCATAGAGGTCTTTACGG3'	

**1.2.4 血浆IL-27的蛋白含量检测** 按试剂盒说明书,用ELISA法检测VCM组及对照组小鼠血清

中 IL-27 的含量,检测最低限为 5 pg/ml。

### 1.3 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 统计分析,组间比较采用独立样本的 *t* 检验,多个均数之间两两比较用 *q* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠一般情况

VMC 组小鼠于感染 CVB3 第 4 天开始出现耸毛、倦缩驼背、皮毛无光泽、活动减少、对刺激反应不敏感或易激惹等症状,第 1、2、3、4、6 周时间点死亡的小鼠分别为 1、2、3、3、4 只。对照组小鼠无异常表现,各时间点均无死亡。

### 2.2 心肌组织病理学检查

VMC 组小鼠 0 周时光镜下可见心肌组织学无异常改变。接种病毒后 1 周,局灶性心肌细胞坏死伴有炎性细胞浸润;2 周时心肌坏死明显增多并伴有大量炎性细胞浸润;3 周时心肌细胞坏死及间质炎性细胞浸润减少;4 周时心肌细胞坏死进一步减少,心肌有不同程度的纤维增生;6 周时纤维化进一步增多。提示小鼠 VMC 模型成功。对照组各时间点亚组心肌组织学均无异常改变。见图 1。

### 2.3 小鼠心肌组织 IL-27 mRNA 与蛋白表达

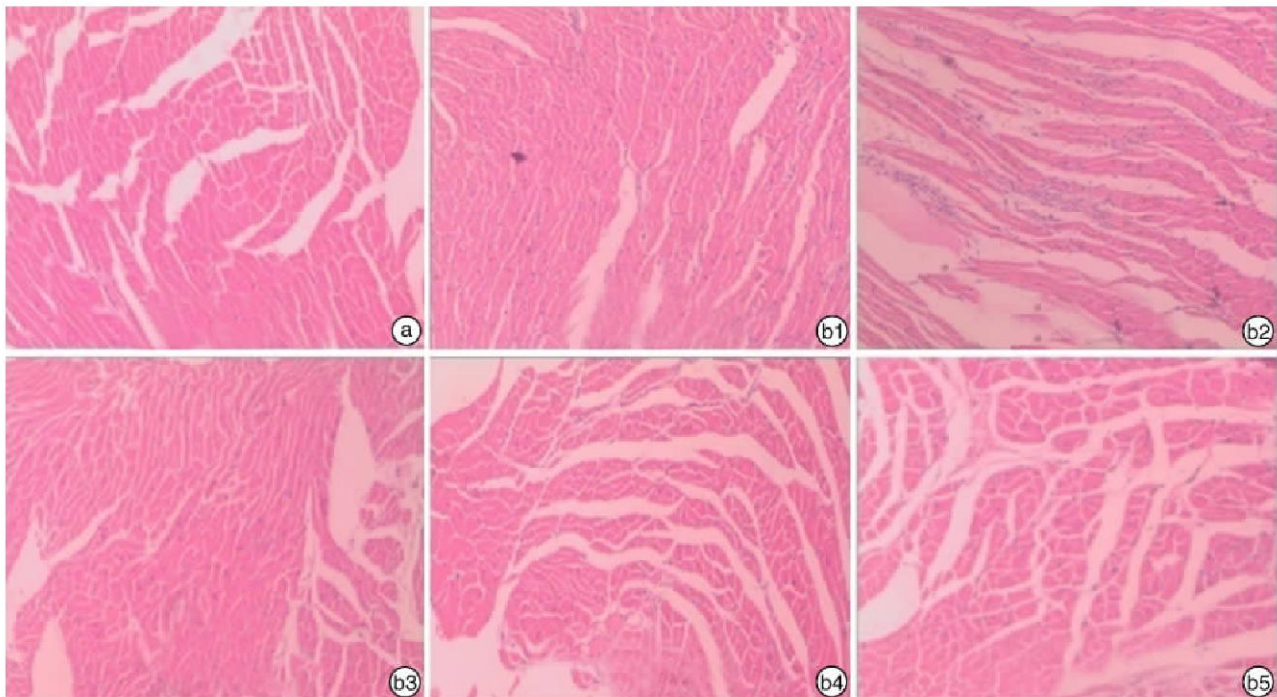
VMC 组与对照组小鼠心肌组织 IL-27 的 mRNA 及蛋白表达水平详见表 2。

## 3 讨论

VMC 是常见的心血管疾病,好发于儿童和青

壮年。除了病毒直接攻击外,炎性因子等介导的免疫反应可导致更广泛的心肌坏死和间质单个核细胞浸润。既往研究认为,IL-6 联合 TGF- $\beta$  促进 Th17 细胞增殖,而 IL-12 在 Th1 细胞分化时起重要的促进作用,并诱导 Th1 细胞应答产生 IFN- $\gamma$ ,被视为参与 VMC 发病机制的重要细胞因子<sup>[6-7]</sup>。IL-27 是一种新型 IL-6/IL-12 家族的细胞因子,由亚基 EBI3 和 p28 组成,主要由抗原呈递细胞产生,如活化的单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等。IL-27 受体 WSX-1/gp130 (IL-27R) 表达于多种免疫细胞和非免疫细胞表面。IL-27 与多种细胞表面的 IL-27R 结合后,可激活不同的 JAK/STAT 信号转导通路,发挥广泛的免疫调节作用<sup>[3-5]</sup>。特别在病毒免疫,如 HIV、HCV 等病毒感染中,IL-27 产生重要的抗病毒免疫作用<sup>[5,8]</sup>。IL-27 是否参与 VMC 发生发展,未见报道。

本研究发现,VMC 小鼠心肌组织中 IL-27 p28 mRNA 和血清 IL-27 蛋白表达均呈阳性,且较对照组明显增高,提示 IL-27 可能在 VMC 的发病中起重要作用。在病毒的作用下,抗原呈递细胞 DC 等活化,IL-27 mRNA 表达增加,翻译成蛋白,分泌到细胞外发挥其生物学作用。IL-27 刺激 CD4<sup>+</sup> T 细胞,引起 JAK2、TYK2 和 STAT1/3/5 磷酸化,以 STAT1 依赖方式促进 Th1 的分化,抑制 Th17 细胞和 Treg 分化,并诱导 T 细胞分泌抗炎因子 IL-10,减轻病毒免疫应答引起的炎症,是调节 Th1 及



a: 对照组; b1~5: VMC 组第 1、2、3、4、6 周。

图 1 小鼠心肌病理改变 (HE×400)

Figure 1 Changes of myocardial pathologic (HE×400)

表 2 VMC 组与对照组各时间点小鼠 IL-27 mRNA 及蛋白表达水平

Table 2 IL-27 mRNA and protein expressions					$\bar{x} \pm s$
组别	只数	IL-27 p28 mRNA	IL-27 EB13 mRNA	IL-27 蛋白/(pg · ml <sup>-1</sup> )	
对照组					
0 周	5	1.33 ± 0.31	1.21 ± 0.12	20.21 ± 6.26	
1 周	5	1.25 ± 0.22	1.31 ± 0.18	14.69 ± 4.26	
2 周	5	1.26 ± 0.12	0.97 ± 0.21	16.23 ± 5.72	
3 周	5	1.24 ± 0.32	1.22 ± 0.18	17.34 ± 4.67	
4 周	5	1.32 ± 0.18	1.24 ± 0.16	19.72 ± 2.55	
6 周	5	0.94 ± 0.22	1.16 ± 0.25	22.18 ± 5.41	
VMC 组					
0 周	8	1.43 ± 0.35 <sup>2)</sup>	1.23 ± 0.12	16.24 ± 5.25	
1 周	7	13.24 ± 4.42 <sup>1)2)</sup>	1.15 ± 0.21	96.35 ± 28.20 <sup>1)</sup>	
2 周	6	119.55 ± 35.24 <sup>1)</sup>	1.35 ± 0.32	109.57 ± 54.76 <sup>1)</sup>	
3 周	5	14.35 ± 3.24 <sup>1)2)</sup>	1.76 ± 0.48	124.24 ± 36.56 <sup>1)</sup>	
4 周	5	13.48 ± 3.45 <sup>1)2)</sup>	1.14 ± 0.23	139.81 ± 67.95 <sup>1)</sup>	
6 周	4	6.18 ± 1.45 <sup>1)2)</sup>	0.98 ± 0.22	130.34 ± 42.46 <sup>1)</sup>	

与对照组同时点比较,<sup>1)</sup>P<0.05;与同组 2 周时比较,<sup>2)</sup>P<0.05。

Th17 细胞分化增殖的重要细胞因子<sup>[3-5,8]</sup>。我们的前期研究表明,T 辅助细胞如 Th1、Th17 细胞及其效应分子 IFN- $\gamma$ 、IL-17 高于未感染病毒的对照组,提示 Th1 及 Th17 细胞参与 VMC 的发病过程<sup>[7,9]</sup>。在 VMC 中高表达的 IL-27 是否通过调节 Th1 及 Th17 细胞分化增殖而参与 VMC 的发病机制,仍需进一步深入研究。但心肌 IL-27 亚基 EB13 的 mRNA 在 VMC 各时点未见显著差异,提示 VMC 中 IL-27 可能主要通过 p28 途径激活下游信号通路发挥作用。除了 VMC,实验性自身免疫性心肌炎(experimental autoimmune myocarditis, EAM)也是心肌炎的重要类型,由自身免疫抗体如心脏肌球蛋白诱导产生。有研究报道,EAM 小鼠被 IL-27 干预后心肌损伤程度减轻,伴随着炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-17 分泌水平降低,抑炎因子 IL-10 分泌水平增加<sup>[10]</sup>。提示在没有病毒直接攻击的背景下,IL-27 能够通过调节致炎/抗炎因子平衡而减轻心肌炎症及自身免疫反应。

本实验证实了 IL-27 在小鼠 VMC 心肌组织中高表达,有助于进一步探索 VMC 的自身免疫机制,但 IL-27 参与 VMC 发病的具体机制,尤其是其对 VMC 中 Th1、Th17 细胞的增殖分化调节及抗病毒免疫等机制尚不明确,需进一步研究证实。

#### 参考文献

[1] COOPER L T Jr. Myocarditis[J]. N Engl J Med,2009,360:1526-1538.  
[2] FAIRWEATHER D, ROSE N R. Coxsackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity [J]. Methods, 2007,41:118-122.

[3] HUNTER C A, KASTELEIN R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity[J]. Immunity, 2012,37:960-969.  
[4] JANKOWSKI M, KOPIŃSKI P, GOC A. Interleukin-27: biological properties and clinical application[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz),2010,58:417-425.  
[5] SUN J, DODD H, MOSER E K, et al. CD4+ T cell help and innate-derived IL-27 induce Blimp-1-dependent IL-10 production by antiviral CTLs[J]. Nat Immunol,2011,12:327-334.  
[6] FAIRWEATHER D, STAFFORD K A, SUNG Y K. Update on coxsackievirus B3 myocarditis [J]. Curr Opin Rheumatol,2012,24:401-407.  
[7] FAN Y, WEIFENG W, YULUAN Y, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of coxsackievirus b3-induced viral myocarditis reduces myocardium inflammation [J]. Virol J, 2011, doi: 10.1186/1743-422X-8-17.  
[8] FRANK A C, ZHANG X, KATSOUNAS A, et al. Interleukin-27, an anti-HIV-1 cytokine, inhibits replication of hepatitis C virus [J]. J Interferon Cytokine Res,2010,30:427-431.  
[9] QING K, WEIFENG W, FAN Y, et al. Distinct different expression of Th17 and Th9 cells in coxsackie virus B3-induced mice viral myocarditis [J]. Virol J, 2011, doi:10.1186/1743-422X-8-267.  
[10] 吴红霞,刘嫣方,胡辰晨,等. IL-27 对实验性自身免疫性心肌炎的干预作用研究 [J]. 新医学,2011,42(12): 833-835.

(收稿日期:2013-08-24 修回日期:2013-10-22)