

癌胚抗原相关黏附分子 1 对 CVB3 感染后 CAR 表达及心肌损伤的影响

张在勇¹, 李新忠², 伍巍兰¹, 宋明才¹, 李健豪¹, 解强¹, 张稳柱¹

(1. 广州市番禺中心医院心血管内科 广州市番禺区心血管病研究所, 广东省广州市 511400;

2. 南方医科大学南方医院心血管内科, 广东省广州市 510515)

[关键词] 癌胚抗原相关黏附分子 1; 柯萨奇病毒-腺病毒受体; 扩张型心肌病; 柯萨奇病毒

[摘要] 目的 探讨癌胚抗原相关黏附分子 1(CEACAM1 或 CC1)对柯萨奇病毒(CVB3)感染后柯萨奇病毒-腺病毒受体(CAR)表达和继发心肌损伤的影响。方法 构建过表达小鼠 CC1 重组病毒,包装重组慢病毒 pLVX-CEACAM 1-ZsGreen-Puro(rLV-CEACAM 1)并测定慢病毒生物学滴度。分为 CC1 正常组、CC1 过表达组、CC1 正常+CVB3 组和 CC1 过表达+CVB3 组;各组使用 AnnexinV-PE/7-AAD 双染法检测心肌细胞凋亡率,CCK8 检测细胞活性;qPCR 检测 CAR 基因表达;Western blot 检测 CAR 蛋白表达,ELISA 检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素 1 β (IL-1 β)水平。结果 (1)CEACAM1 重组载体测序提示目的基因序列连接,证明小鼠 CEACAM1 重组病毒载体构建成功,测定重组慢病毒滴度为 1.5×10^{11} TU/L。(2)CC1 过表达+CVB3 组较其他组心肌细胞凋亡率明显升高,心肌细胞增殖最低($P < 0.05$)。(3)CAR 基因相对表达量在 CC1 过表达+CVB3 组最高,而在 CC1 正常组最低,CAR 蛋白表达也有类似结果;CC1 过表达组较 CC1 正常组胞内 CVB3 相对表达量显著升高($P < 0.05$)。(4)CC1 过表达组 TNF- α 、IL-1 β 水平较高,CVB3 感染后较前明显升高。结论 CC1 可能可以促进 CVB3 感染心肌细胞后心肌组织或细胞上 CAR 的表达,CAR 可能是 CC1 调控 CVB3 感染心肌致心肌损伤过程的潜在作用靶点。

[中图分类号] R541.9

[文献标识码] A

Effect of CC1 on expression of CAR and myocardial injury after infection of CVB3

ZHANG Zaiyong¹, LI Xinzong², WU Weilan¹, SONG Mingcai¹, LI Jianhao¹, XIE Qiang¹, ZHANG Wenzhu¹

(1. Department of Cardiology, Guangzhou Panyu Central Hospital, Guangzhou, Guangdong 511400, China; 2. Department of Cardiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1; coxsackie and adenovirus receptor; dilated cardiomyopathy; coxsackievirus B3

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CC1) on the expression of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) and secondary myocardial injury after coxsackievirus B3 (CVB3) infection. **Methods** The overexpressed mouse CC1 recombinant virus was constructed, and the recombinant lentivirus pLVX-CEACAM 1-ZsGreen-Puro (rLV-CEACAM 1) was packaged and the biological titer of lentivirus was determined. It was divided into CC1 normal cell group, CC1 overexpression group, CC1 normal +CVB3 group and CC1 overexpression+CVB3 group. The apoptosis rate of cardiomyocytes was detected by AnnexinV-PE/ 7-AAD double staining in each group, and cell activity was detected by CCK8. The expression of CAR gene was detected by qPCR. The expression of CAR protein was detected by Western blot, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β) were measured by ELISA. **Results** (1) Recombinant vector sequencing CEACAM1 showed a gene sequence connection, which proved mice CEACAM1 recombinant virus vector was built, determination of recombinant lentivirus was 1.5×10^{11} TU/L. (2) Apoptosis rate of cardiac myocytes in CC1 overexpression+CVB3 group was significantly higher than that in other groups, and the proliferation rate of cardiac myocytes was the lowest ($P < 0.05$). (3) Relative expression of CAR gene was the highest in CC1 overexpression+CVB3 group, and the lowest in CC1 normal group. Relative expression of

[收稿日期] 2018-09-16

[修回日期] 2018-11-13

[基金项目] 广州市医药科技卫生项目(20171A011352);广州市番禺中心医院青年基金项目(2016-10)

[作者简介] 张在勇,博士,主治医师,研究方向为冠心病介入治疗及心肌保护研究,E-mail 为 Dr_zaiyong@163.com。通信作者解强,主任医师,研究方向为冠心病介入治疗,E-mail 为 xieqiang2013@yeah.net。

CVB3 was significantly higher in CC1 overexpression group than in CC1 normal group ($P < 0.05$). (4) Level of TNF- α , IL-1 β were higher in CC1 overexpression group, which increased significantly after CVB3 infection. **Conclusion** CC1 may promote the expression of CAR in cardiac tissue or cell after CVB3 infected cardiac myocytes. CAR might be a potential target for CC1 to regulate the process of cardiac injury caused by CVB3 infection.

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)严重威胁着人类的健康^[1-2]。柯萨奇病毒-腺病毒受体(coxsackie and adenovirus receptor, CAR)介导的柯萨奇病毒(coxsackievirus B3, CVB3)感染心肌细胞引起心肌继发性损伤是导致DCM的主要发病机制之一^[3-4]。完全阻断CAR能有效减少CVB3感染,减轻对心肌的继发损害,但存在影响心脏发育和传导功能的不良反应。近来研究热点逐渐转向对CAR的调控方面,调控CAR是有效控制CVB3感染并减轻对心肌继发性损害的理想思路和途径。癌胚抗原相关黏附分子1(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1, CEACAM1或CC1)被认为是小鼠和人体内病毒特异细胞功能的重要调节因子^[5],可能参与CVB3感染心肌细胞的过程,并能调控心肌组织或细胞上CAR的表达。我们的研究尝试探讨CC1对CVB3感染后CAR表达和继发性心肌损伤的影响,为临床减轻CVB3感染所致心肌继发性损伤寻找新靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂

出生24 h内BALB/c新生乳鼠购自南方医科大学实验动物中心。DMEM(dulbecco's modified eagle medium)低糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰酶(含0.02% EDTA)、青霉素/链霉素溶液(penicillin/streptomycin, Pen/Strep)均购自Gibco(美国);EcoR I、Not I限制性内切酶及T4 DNA连接酶购自NEB(北京,中国);TRIzol Reagent购自天根(北京,中国);质粒提取试剂盒、DNA Marker购自全式金生物(北京,中国);Annexin V-PE/7-AAD双染细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物(南京,中国);抗CEACAM1抗体及抗CAR抗体购自Abcam(美国);CCK8试剂盒购自东仁化学(上海,中国);Qiagen质粒大提试剂盒购自Qiagen(德国);其他生物化学试剂均为进口分装或国产分拆。

1.2 乳鼠心肌细胞分离

超净台中,SPF级新生乳鼠,75%乙醇消毒,由剑突下向上从胸骨左缘开胸,微挤压后可取出完整

心脏;去除心底结缔组织、心房及心底血管,剪开心室,用D-Hank's清洗血污;用眼科剪将心室组织剪成1 mm³的小碎块,并加入5倍心室体积的0.125%胰酶,37℃孵育5 min;加入D-Hank's清洗3次后再加入5倍组织碎块体积的0.05% I型胶原蛋白酶,37℃消化4 h。收集消化上清,300 g室温离心5 min,加入含10% FBS的DMEM低糖培养基重悬细胞沉淀,并将细胞悬用300目滤网过滤,将泪液接种至培养皿,置于37℃、5% CO₂培养箱内,差速贴壁60 min,将心肌细胞和心肌纤维细胞分离。吸取未贴壁的心肌细胞重新接种于培养皿,并加入终浓度为0.1 mmol/L 5-溴脱氧尿嘧啶(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)以抑制成纤维细胞生长。每2~3天换液一次。

1.3 心肌细胞纯度鉴定

0.25%胰酶消化贴壁的心肌细胞,300 g离心5 min, PBS重悬细胞沉淀,细胞固定及破膜后加入抗 α -actin抗体,再加入FITC标记的二抗,于流式细胞仪上进行阳性细胞计数。

1.4 CEACAM1过表达载体的构建

设计并合成扩增小鼠CEACAM1基因的引物,并在引物两端分别引入EcoR I和Not I的酶切位点,引物序列为:CEACAM1-EcoR I-F: 5'-CGGAAT-TCCGATGGAGCTGGCCTCAGCACATC-3', CEACAM1-Not I-R: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTCAGA AGGAGCCAGATCCGCCAGAC-3'。以cDNA为模板,扩增小鼠CEACAM1基因全长,PCR扩增反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸2 min,共计35个循环。1%琼脂糖凝胶电泳后回收目的基因。经EcoR I和Not I双酶切后,与质粒pLVX-mCMV-ZsGreen-IRES-Puro在T4 DNA连接酶作用下连接。连接产物转化DH5 α 。挑选阳性克隆种于LB培养基中,抽提质粒后测序鉴定,测序引物为CMV-F 5'-CGCAAATGGGCGGTAG-GCGTG-3'。

1.5 pLVX-CEACAM1-ZsGreen-Puro(rLV-CEACAM1)重组慢病毒包装

293T细胞复苏后,在转染的前1天,传代准备细胞。用0.25%胰蛋白酶消化293T细胞,以含10%血清的DMEM培养基调整细胞密度后,按照每

10 cm 细胞培养皿接种 $(6 \sim 8) \times 10^6$ 细胞到 10 cm 细胞培养皿中,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养,16 ~ 24 h 后待细胞密度生长到 $80\% \sim 90\%$ 时即可用于转染。第 2 天,在转染前 2 h,用 5 mL 不含 P/S 的完全培养基换液(DMEM+10% FBS)。按照以下实验步骤来进行转染:①加入 500 μL HET Buffer A 到一支洁净的 1.5 mL EP 管中(可标记为 A 管)。在另一支洁净的 1.5 mL EP 管中(可标记为 B 管),加入 Vector(含目的基因的质粒) 10 μL (1.0 g/L)、Lentiviral packaging Vector 15 μL (1.0 g/L)、HET Buffer B 50 μL 、ddH₂O 425 μL ,终体系为 500 μL 。②将 B 管中的 DNA 混合液缓缓逐滴加入到 A 管中,用移液器轻轻混匀 10 min。③将混匀后的混合物室温静置 30 min,然后将混合物逐滴均匀加入到 10 cm 细胞培养皿中,轻微混匀。置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养。第 3 天,即培养 12 ~ 16 h 后弃去培养基,用 10 mL 新鲜的完全培养基换液(DMEM+10% FBS+P/S)。第 4 天,即换液后 24 h,收集上清液,置于 4°C 冰箱保存,然后加入 10 mL 新鲜的完全培养基(DMEM+10% FBS+P/S)至 10 cm 细胞培养皿中,置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱继续培养。第 5 天,再一次收集上清,与第一次收集的上清液混合,1000 r/min 离心 5 min,弃去细胞碎片,上清液以 0.45 μm PVDF 滤器过滤至 50 mL 圆底离心管中。 4°C 、50 000 g 高速离心 2 h,离心后可用记号笔对病毒沉淀做好标记。小心弃去上清,晾干,按 200 $\mu\text{L}/10 \text{ cm}$ 培养皿的量加入 PBS 重悬病毒沉淀,室温静置 2 h,然后用移液器轻轻地吹匀(避免产生气泡),继续室温放置 30 min,按每次使用的病毒量分装到洁净的 1.5 mL EP 管中, -80°C 冰箱保存。进行慢病毒生物学滴度测定。

1.6 CVB3 感染乳鼠心肌细胞

感染前 1 天,乳鼠心肌细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱内培养过夜。待细胞完全贴壁后,以 1/2 小体积感染法感染乳鼠心肌细胞。重组慢病毒 rLV-CEACAM1 及 CVB3 病毒所用的感染复数(MOI)分别为 50 和 10。感染重组病毒 48 h 后,吸去孔内旧培养基,并用 0.01 mol/L PBS (pH=7.4) 清洗细胞 3 次。CVB3 病毒原液适当稀释后,按 MOI=10 感染乳鼠心肌细胞。CVB3 感染 1 h 后,PBS 清洗细胞 3 次,加入新鲜的含 10% FBS 的 DEME 高糖培养基,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱培养。

1.7 细胞处理及分组

重组病毒感染乳鼠心肌细胞后加入终浓度为 1

$\mu\text{mol/L}$ BAY 试剂[酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SyK)抑制剂]预处理乳鼠心肌细胞 2 h 后, CVB3 感染心肌细胞,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱内培养 48 h。根据不同的处理方法分为 CC1 正常心肌细胞组(CC1 正常组)、CC1 过表达心肌细胞组(CC1 过表达组)、CC1 正常+CVB3 组(CVB3 感染正常心肌细胞组)及 CC1 过表达+CVB3 组(CVB3 感染 CC1 过表达心肌细胞组)。

1.8 Annexin V-PE/7-AAD 双染法检测心肌细胞凋亡率^[6-7]

收集培养孔内旧培养基,并用 0.01 mol/L PBS (pH=7.4) 洗涤孔内细胞 3 次,加入不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,与收集的旧培养基合并一起。300 g 离心 5 min,收集 $(1 \sim 5) \times 10^5$ 个细胞,用 0.01 mol/L PBS (pH=7.4) 洗涤细胞 2 次。在 50 μL 的 Binding Buffer 中加入 5 μL 7-AAD 染液,细胞沉淀中加入 50 μL 7-AAD 染液并重悬细胞,室温避光反应 15 min 后加入 450 μL 的 Binding Buffer,并加入 1 μL Annexin V-PE,用流式细胞仪检测。

1.9 CCK8 检测细胞活性^[8]

CVB3 感染 48 h 后,弃孔内旧培养基,加入 100 μL 含有 10% CCK8 溶液的培养基,于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下继续培养 2 ~ 4 h。于酶标仪上测定 OD₄₅₀,计算细胞增殖活性。

1.10 qPCR 检测 CAR 基因表达

乳鼠心肌细胞感染 CVB3 48 h 后,加入 TRIzol 提取总 RNA。测定 RNA 质量及浓度后,取 2 μg RNA 的溶液,反转录反应合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,定量 PCR(quantitative PCR, qPCR) 反应检测 CAR 及 CVB3,结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析。检测 CAR 基因所用引物为 F: 5'-GGAGTGTGTG-TAGCGTGTATTG-3', R: 5'-GCACAGCACCTGAAGA GATTAG-3';检测 CVB3 所用引物为 F: 5'-CGGTAC-CTTTGTGCGCCTGT-3', R: 5'-CAGGCCGCCAACG-CAGCC-3';内参基因 β -actin 引物为 F: 5'-GAGG-TATCCTGACCCTGAAGTA-3', R: 5'-CACACGCAGCT CATTGTAGA-3'。

1.11 Western blot 检测 CAR 蛋白表达

乳鼠心肌细胞感染 CVB3 48 h 后,提取总蛋白。BCA 法^[9]测定蛋白浓度后,取 30 μg 蛋白溶液与适当体积的 5×Loading Buffer 混合,沸水浴 5 min 后进行上样电泳;电流完成后进行转膜,封闭及孵育一抗、二抗。最后进行化学发光显色。显色结果用 Image J 软件处理目标带的光密度值。

1.12 ELISA 检测细胞培养上清中肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1β 水平

按试剂盒说明书检测细胞培养上清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素 1β (interleukin 1 beta, IL- 1β) 水平,用 ELISA Calc 软件制作标准曲线后数据分析。

1.13 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD 法), $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 乳鼠心肌细胞分离培养形态及纯度鉴定

倒置显微镜下,可见消化后的心肌细胞为圆形,发亮。24 h 后已见部分心肌细胞贴壁,贴壁细胞伸展为梭形、棒状、星状及分叉状等,可见部分贴壁细胞已出现搏动,频率为 20~60 次/分不等,亦可见其周围细胞碎片增多。48 h 后可见大部分心肌细胞已贴壁并出现搏动,但未见到一致性搏动。经流式细胞术鉴定,分离的乳鼠心肌细胞纯度为 $(93.6\pm 2.7)\%$ ($n=5$;图 1)。

2.2 成功构建 CEACAM1 过表达载体

CEACAM1 重组载体部分测序结果见图 2。鉴定后测得重组慢病毒滴度为 1.5×10^{11} TU/L (图 3)。

2.3 AnnxinV-PE/7-ADD 双染检测 CC1 过表达及 CVB3 感染增加心肌细胞凋亡率

CC1 过表达组和 CC1 正常+CVB3 组较 CC1 正常组心肌细胞凋亡率升高;CC1 过表达+CVB3 组较其他三组心肌细胞凋亡率明显升高 (图 4)。提示 CC1

可能参与 CVB3 感染心肌细胞引起心肌继发性损伤。

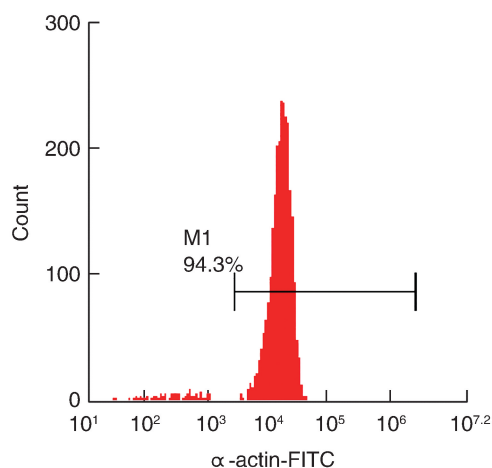


图 1. 流式细胞术鉴定心肌细胞纯度

Figure 1. Flow cytometry was used to identify the purity of cardiomyocytes

2.4 CCK8 检测 CC1 过表达及 CVB3 感染心肌细胞增殖

与 CC1 正常组相比,CC1 过表达组 OD_{450} 降低;CC1 正常+CVB3 组 OD_{450} 较 CC1 过表达组降低,CC1 过表达+CVB3 组在四组中最低;各组间的差异均有统计学意义 ($P<0.05$, $n=6$)。进一步提示 CC1 可能参与 CVB3 感染心肌细胞过程 (图 5)。

2.5 qPCR 检测 CC1 过表达及 CVB3 感染升高 CAR 基因及胞内相对 CVB3 mRNA 水平

RNA 扩增结果提示,CC1 过表达组 CAR mRNA 表达较 CC1 正常组显著升高,感染 CVB3 后两组 CAR mRNA 表达较前明显升高,CC1 过表达组相对 CVB3 mRNA 水平较 CC1 正常组明显增多,差异均有显著性 ($P<0.05$;图 6 和图 7)。

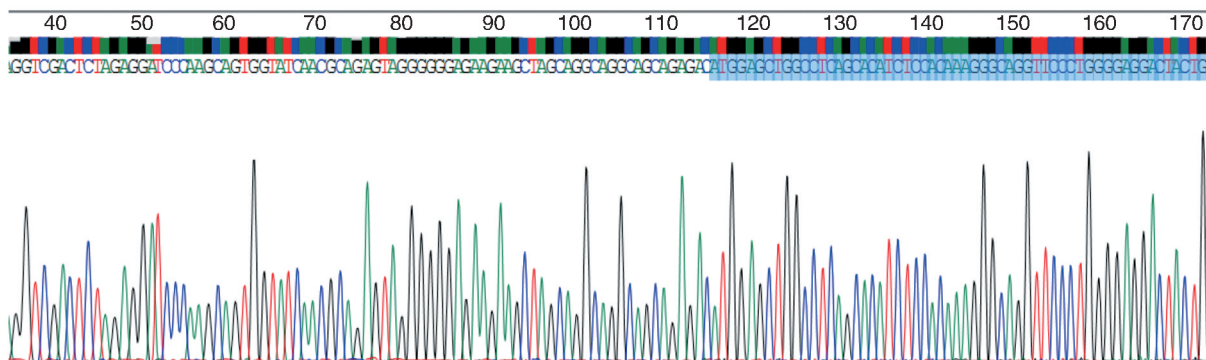


图 2. CEACAM1 重组载体部分测序结果 提示 CEACAM1 过表达载体构建成功。

Figure 2. Sequencing results of CEACAM1 recombinant vector

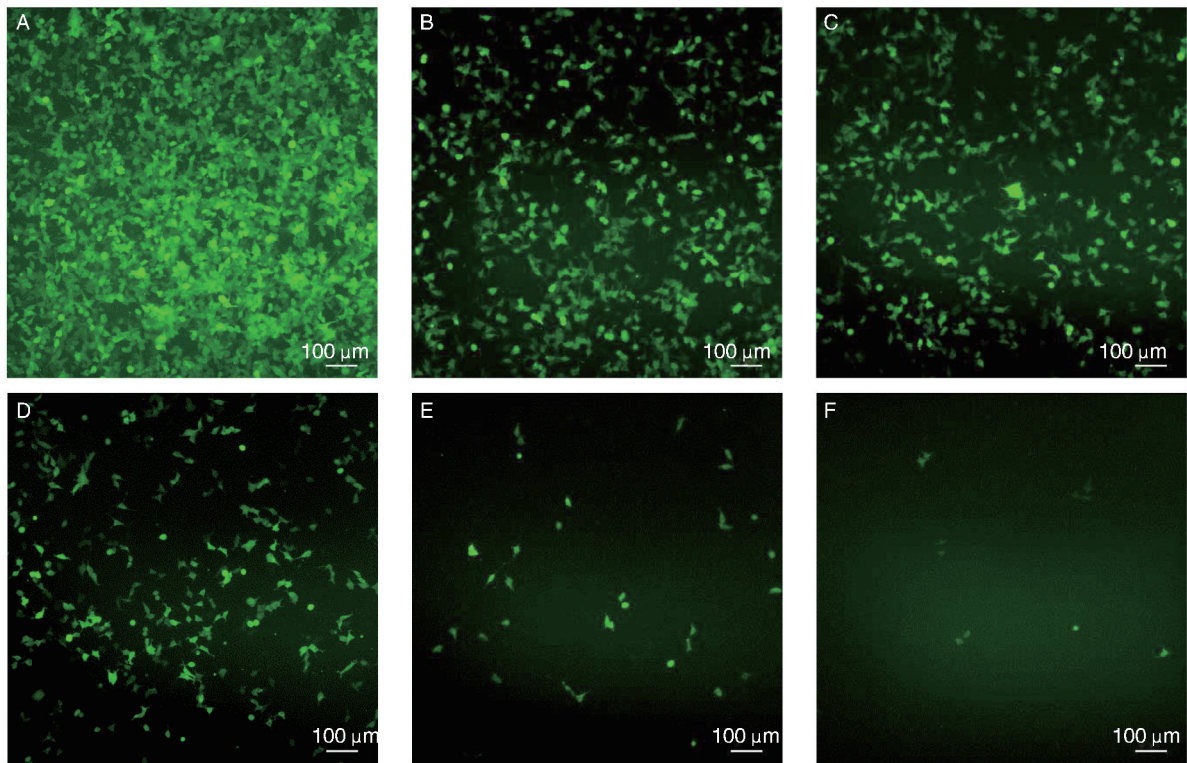


图 3. 重组病毒滴度测定 A、B、C、D、E、F 分别为病毒原液稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 。

Figure 3. Determination of recombinant virus titer

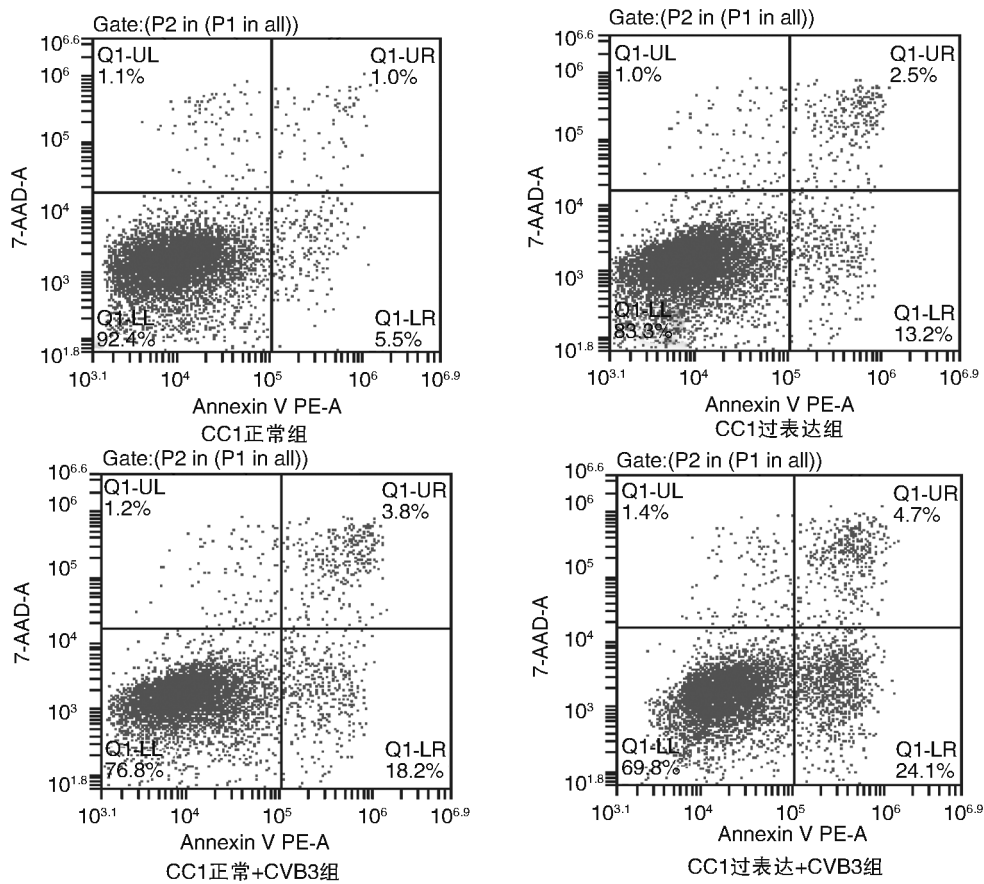


图 4. AnnxinV-PE/7-ADD 双染检测心肌细胞凋亡率 Q1-UL 代表坏死细胞, Q1-LL 代表正常细胞, Q1-UR 代表凋亡晚期细胞, Q1-LR 代表凋亡早期细胞。

Figure 4. Apoptosis rate of cardiomyocytes measured by AnnxinV-PE/7-ADD double-staining

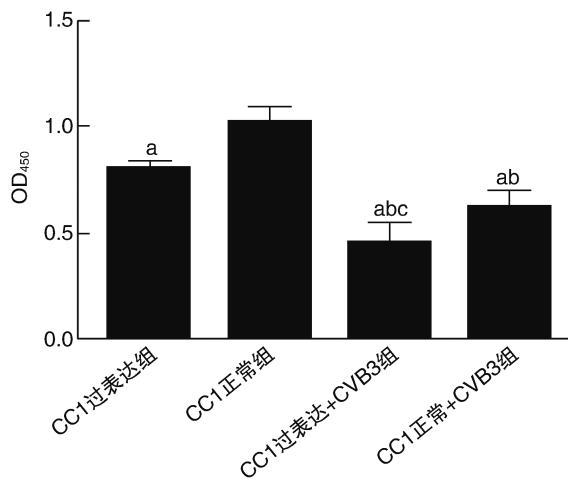


图 5. CCK8 检测心肌细胞增殖 ($\bar{x} \pm s, n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CC1 过表达组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常 + CVB3 组比较。

Figure 5. Cardiomyocyte proliferation measured by CCK8 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

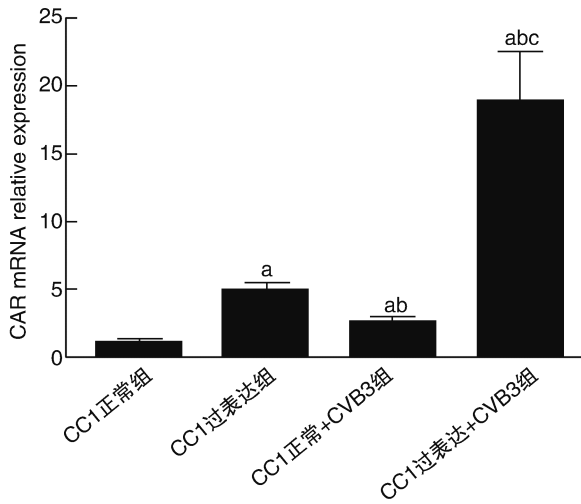


图 6. qPCR 检测 CAR mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CC1 过表达组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常 + CVB3 组比较。

Figure 6. CAR mRNA relative expression by qPCR ($\bar{x} \pm s, n=6$)

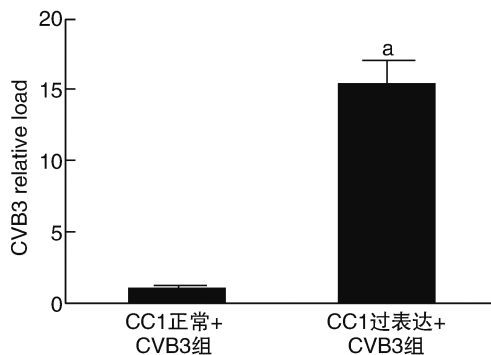


图 7. qPCR 检测不同 CC1 组相对 CVB3 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$) a 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常 + CVB3 组比较。

Figure 7. CVB3 relative mRNA level by qPCR ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.6 CC1 过表达及 CVB3 感染增高 CAR 蛋白表达

四组均表达 CAR 蛋白, CC1 过表达组 CAR 蛋白较 CC1 正常组显著升高, 感染 CVB3 后 CAR 蛋白表达较前明显增高, 四组间差异均有显著性(图 8)。

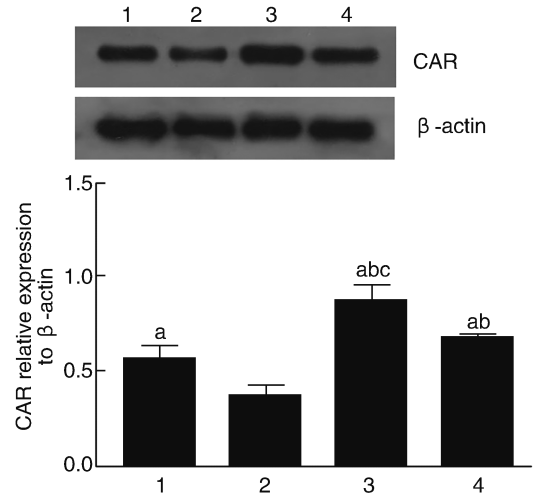


图 8. Western blot 检测 CAR 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$) 1 为 CC1 过表达组, 2 为 CC1 正常组, 3 为 CC1 过表达 + CVB3 组, 4 为 CC1 正常 + CVB3 组。a 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 CC1 过表达组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 CC1 正常 + CVB3 组比较。

Figure 8. The expression of CAR protein by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 CC1 过表达及 CVB3 感染升高细胞上清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平

CC1 过表达组 TNF- α 、IL-1 β 水平在感染 CVB3 前较 CC1 正常组升高, 感染 CVB3 后两组 TNF- α 和 IL-1 β 水平较感染前明显升高, 四组间差异均有统计学意义, 四组中最高的是 CC1 过表达 + CVB3 组 ($P < 0.05$; 图 9)。

3 讨论

CVB3 感染后引起的病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 及 DCM 对人类健康造成严重危害^[10]。既往对于干预 CVB3 感染从而减少心肌细胞损伤的研究一直未停歇^[11-15]。有研究^[16]发现, 病毒性心肌炎小鼠心肌组织中 TNF- α 、转录因子蛋白 p65 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B p65) 和基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 表达显著上调。CVB3 通过与 CAR 结合, 转入细胞内扩增, 病毒蛋白酶可以直接引起心肌细胞骨架的破坏, 而且持续存

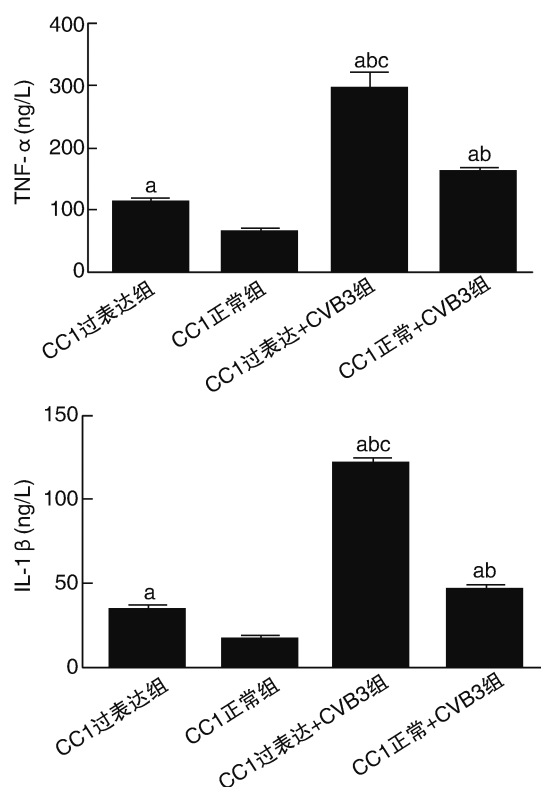


图9. ELISA 检测 TNF- α 和 IL-1 β 水平($\bar{x}\pm s$, $n=6$) a 为 $P<0.05$,与 CC1 正常组比较;b 为 $P<0.05$,与 CC1 过表达组比较;c 为 $P<0.05$,与 CC1 正常+CVB3 组比较。

Figure 9. The levels of TNF- α and IL-1 β measured by ELISA($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

在的病毒基因产物可以诱发机体免疫炎症反应,在清除病毒的同时也杀伤了心肌细胞,后期不可再生的心肌细胞死亡过多可致心脏结构重塑,导致心功能下降甚至衰退^[17]。我们的实验结果显示, CVB3 感染后两组相对感染前心肌细胞凋亡率明显升高, OD₄₅₀ 降低,提示 CVB3 感染心肌细胞引起心肌继发性损伤。因此,有效控制 CVB3 感染仍然是减轻或消除继发心肌损伤的关键。

由于 CVB3 本身的易突变性使得控制病毒感染时间难以把握,因而采用 RNA 干扰病毒复制的方法限制病毒感染效果有限^[18]。基于此,调控 CAR 或许是一种理想干预其与病毒结合的方法和途径。已有研究提示,与 CAR 同属免疫受体蛋白超家族的心肌细胞表面黏附分子 CC1,与 CAR 的胞外结构域存在相似的可变构象,它们之间相互作用可影响相关的信号分子活性 CC1^[19]。此外,CC1 作为受体已在多项研究中证实,如:CC1 可作为黏膜炎莫拉菌和淋病奈瑟菌的受体介导细菌感染^[20];肝细胞表面的 CC1 可介导小鼠肝炎病毒感染肝细胞^[21]。本研究通过调整 CC1 表达及 CVB3 感染处理分组后发现,

CC1 过表达较 CC1 正常心肌细胞凋亡率升高,而 CVB3 感染使得心肌细胞凋亡率进一步上升。本研究 CCK8 检测结果发现,与 CC1 正常组相比,CC1 过表达组 OD₄₅₀ 低,而 CVB3 感染后 CC1 过表达组在四组中最低,表明 CC1 可能参与 CVB3 感染心肌细胞这一过程。

本研究通过 qPCR 检测 CAR mRNA 发现,CC1 过表达组较 CC1 正常组升高, CVB3 感染后较未感染时升高;检测 CVB3 相对表达量发现 CC1 过表达组较 CC1 正常组增多;Western blot 检测 CAR 蛋白表达与 CAR mRNA 一致。这些结果均提示 CC1 可直接作用 CAR 或通过激活细胞信号通路间接调控 CAR 表达,促进 CVB3 感染心肌细胞并引起心肌受损。既往研究表明,中性粒细胞中 CC1 可使 SYK 去磷酸化,抑制炎症因子 TNF- α 分泌^[22];CC1 可抑制淋病奈瑟菌感染肺泡上皮细胞所致炎症反应,抑制 T 淋巴细胞活化和炎症因子释放,并成为炎症性肠病的干预靶点^[23],炎症因子水平与 CAR 表达之间密切相关,炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 刺激脐静脉内皮细胞可下调其 CAR 表达^[24]。我们的研究也有类似结果, TNF- α 、IL-1 β 水平在 CVB3 感染前在 CC1 过表达组较高,而感染 CVB3 后 CC1 过表达组和 CC1 正常组水平较感染前明显增高。因此,我们推断 CC1 或许也可通过激活 CC1-SYK-TNF- α 信号轴间接调控 CAR 的表达。这也是我们下一步研究的方向。

综上所述,本研究构建 CEACAM1 过表达载体,并使用 CVB3 感染及细胞分组后分析,结果提示 CC1 可能可以促进 CVB3 感染心肌细胞心肌组织或细胞上 CAR 的表达, CAR 可能是 CC1 调控 CVB3 感染心肌致心肌损伤过程的潜在作用靶点。

[参考文献]

- [1] 杨立波,张辉,贾绍斌,等. 动态优化 AV/VV 间期心脏再同步化治疗慢性心力衰竭的中远期疗效[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(11): 1147-1151.
- [2] 王丽丽,梁斌,边云飞,等. 心肌纤维化和肥厚型心脏病研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(6): 624-628.
- [3] Yu M, Long Q, Li HH, et al. IL-9 inhibits viral replication in coxsackievirus B3-induced myocarditis[J]. Front Immunol, 2016, 7: 409.
- [4] Pinkert S, Roger C, Kurreck J, et al. The coxsackievirus and adenovirus receptor: glycosylation and the extracellular D2 domain are not required for coxsackievirus B3 infection [J]. J Virol, 2016, 90(12): 5601-5610.

- [5] Khairnar V, Duhan V, Patil AM, et al. CEACAM1 promotes CD8(+) T cell responses and improves control of a chronic viral infection [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2561.
- [6] Wechalekar H, Setchell BP, Peirce EJ, et al. Whole-body heat exposure induces membrane changes in spermatozoa from the cauda epididymidis of laboratory mice[J]. *Asian J Androl*, 2010, 12(4): 591-598.
- [7] Ma L, Liu H, Xie Z, et al. Ginsenoside Rb3 protects cardiomyocytes against ischemia-reperfusion injury via the inhibition of JNK-mediated NF-kappaB pathway: a mouse cardiomyocyte model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103628.
- [8] Migaud M, Roques BP, Durieux C. Evidence for a high-affinity uptake system for cholecystokinin octapeptide (CCK8) in rat cortical synaptosomes[J]. *Eur J Neurosci*, 1995, 7(5): 1074-1079.
- [9] Sapan CV, Lundblad RL, Price NC. Colorimetric protein assay techniques[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 29(Pt 2): 99-108.
- [10] 史晓娟, 王品品, 谭鑫. 小儿病毒性心肌炎诊断中血清高敏C反应蛋白、肌酸激酶同工酶以及心肌肌钙蛋白I联合检测的价值[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(3): 218-220, 224.
- [11] 陈小龙, 王立峰, 王璐, 等. 大蒜素对病毒性心肌炎小鼠的治疗作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(6): 1027-1030.
- [12] Zhang Y, Sun L, Sun H, et al. Overexpression of microRNA-133b reduces myocardial injuries in children with viral myocarditis by targeting Rab27B gene[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2017, 63(10): 80-86.
- [13] Flynn CT, Kimura T, Frimpong-Boateng K, et al. Immunological and pathological consequences of coxsackievirus RNA persistence in the heart[J]. *Virology*, 2017, 512: 104-112.
- [14] 李忠, 张培华. 小檗碱通过Toll样受体4/核因子κB信号通路对小鼠病毒性心肌炎发挥保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(3): 250-253.
- [15] 方珊娟, 吴学思, 王春梅, 等. 神经调节蛋白-1对大鼠心肌缺血/再灌注损伤保护作用的研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2016, 35(5): 396-400.
- [16] 阮妙华, 王凯, 王丹, 等. 病毒性心肌炎小鼠心肌中MMP-2和NF-κB的表达[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9): 1704-1707, 1712.
- [17] Massilamany C, Gangaplara A, Reddy J. Intricacies of cardiac damage in coxsackievirus B3 infection: implications for therapy[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 177(2): 330-339.
- [18] He X, Gao B, Zhou L, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate-alleviated coxsackievirus B3-induced myocarditis through inhibiting viral replication but not through inhibiting inflammatory responses[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 69(1): 41-47.
- [19] Weber DA, Sumagin R, McCall IC, et al. Neutrophil-derived JAML inhibits repair of intestinal epithelial injury during acute inflammation[J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7(5): 1221-1232.
- [20] Klaile E, Klassert TE, Scheffrahn I, et al. Carcinoembryonic antigen (CEA)-related cell adhesion molecules are co-expressed in the human lung and their expression can be modulated in bronchial epithelial cells by non-typable *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, TLR3, and type I and II interferons [J]. *Respir Res*, 2013, 14: 85.
- [21] Mao CS, Yin H, Ning HB, et al. Levels of HBx, VEGF, and CEACAM1 in HBV-related hepatocellular carcinoma and their correlation with cancer prognosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(17): 3827-3833.
- [22] Khairnar V, Duhan V, Maney SK, et al. CEACAM1 induces B-cell survival and is essential for protective antiviral antibody production[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6217.
- [23] Hosomi S, Grootjans J, Huang YH, et al. New insights into the regulation of natural-killer group 2 member D (NKG2D) and NKG2D-ligands: endoplasmic reticulum stress and CEA-related cell adhesion molecule 1 [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1324.
- [24] Yuen S, Smith J, Caruso L, et al. The coxsackie-adenovirus receptor induces an inflammatory cardiomyopathy independent of viral infection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(5): 826-840.
- (此文编辑 许雪梅)