doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.003

孟鲁司特钠对柯萨奇 B3 病毒感染小鼠心肌的保护作用 *

周 洁 黄星原 魏 丽 刘奥杰 陈娇娇

（武汉大学人民医院儿Ⅰ科 湖北 武汉 430060）

摘要 目的：探讨半胱氨酰受体拮抗剂孟鲁司特钠(montelukast)对于柯萨奇 B3(CVB3)感染小鼠心肌损伤模型的保护作用。**方法：**将 65 只 SPF 级 BALB/C 小鼠，雄性，体重为 16-20 g，随机分成四组：A 组为空白对照组(10 只)；B 组为病毒对照组(15 只)；C 组为孟鲁司特钠小剂量组(20 只)；D 组为孟鲁司特钠大剂量组(20 只)。在接种病毒第 14 天处死所有存活小鼠，取心脏，通过各种检测技术观察各组小鼠心肌病变积分、核因子 -κB(NF-κB)的差异。**结果：**孟鲁司特钠治疗组心肌 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平均低于病毒对照组(P <0 .05)，且大剂量组较明显；同时孟鲁司特钠治疗组及病毒对照组心肌 NF-κB mRNA 及蛋白表达水平与心肌病变积分呈正相关(r=0.96，P <0 .05)。**结论：**孟鲁司特钠对心肌损伤小鼠血清中的核因子 -kB(NF-κB)有抑制作用，尤其是大剂量组效果显著，孟鲁司特钠对 CVB3 感染小鼠心肌具有保护作用。

关键词：柯萨奇 B3 病毒；病毒性心肌炎；孟鲁斯特钠；核因子 -κB

中图分类号：R-33; R542.21; R725.4 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2017)12-2209-05

The Protective Effect of Montelukast Sodium on CBV3 Infection in Mice Myocardium*

ZHOU Jie, HUANG Xing-yuan, WEI Li, LIU Ao-jie, CHEN Jiao-jiao

（People's Hospital of Wuhan University, Pediatric, Wuhan, Hubei, 430060 China）

ABSTRACT Objective: To investigate the cysteinyl aminoacyl receptor antagonist agent montelukast sodium (montelukast) for coxsackievirus B3 (CVB3) infection the protective effect of myocardial injury in mice model. **Methods:** 65 SPF BALB / c mice, male, weight is 16 to 20 gram were randomly divided into four groups: group a blank control group (10 rats); group B virus control group (15 rats); group C for montelukast sodium group of small dose (20 rats), group D for montelukast sodium group of large dose (20 rats). The inoculation of the virus on the 14th day were all surviving mice, take heart, differences in each group of mice the myocardial lesion score, nuclear factor kB (NF- κB) was observed through various detection technologies. **Results:** Montelukast sodium treatment group myocardial NF-κB mRNA and protein expression levels were lower than that of the virus control group (P < 0.05), and high dose group significantly; at the same time of montelukast sodium in treatment group and virus control group myocardial NF-κB mRNA and protein expression level and the myocardial lesion score was positively correlated (r = 0.77, P < 0.05). **Conclusion:** Montelukast sodium on myocardial injury in mice serum nuclear factor κB (NF-κB) inhibition, especially significant effect of high dose group and montelukast sodium on CVB3 infection of myocardium in mice has a protective effec.

Key words: Coxsackie B3 virus; Viral myocarditis; Montelukast sodium; Nuclear factor-κB

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.21; R725.4 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2209-05

前言

人类柯萨奇病毒(CVS)属于一类非包被单股正意 RNA 病毒属[1]。其中，柯萨奇 B3 病毒(CVB3)是导致人类病毒性心肌炎最常见的原因[2,3]。急性心肌炎典型结果在儿童和青少年的心脏衰竭并经常进展为慢性心肌炎和扩张型心肌病。有学者[4]认为病毒性心肌炎是由多因子联合调控其炎症通路，白介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)及单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、NF-κB 等炎症因子已经被证实在心肌炎各阶段发挥主要的调控作用。其中，NF-κB 是一个包含了 5 个亚单位的转录因子蛋白家族，而 NF-κBp65 是一类与临床联系较为紧密的亚单位，大量研究表明[5-8]NF-κBp65 参与多系统炎症反应过程，与心血管疾病相关性研究亦有报道[9]。然而，为了探明病毒性心肌炎的各阶段发展进程的分子机制、诊断及治疗，我们需要发现新的炎症因子及其他靶分子就显得十分迫切。近年来，国内外对于半胱氨酰白三烯受体在心血管疾病(Leukotriene)的研究表明[10]：半胱氨酰白三烯受体拮抗剂在动脉粥样硬化、川崎病、肺心病及心肌缺血再灌注损伤中有保护作用。孟鲁司特钠(Montelukast，Mon)是半胱氨酰白三烯受体 1(Cys-LT1)的特异性拮抗剂，可阻断 LTB、C4、D4 与 Cys-LT1 的结合，有研究表明[11]，Mon 对于心血管系统中起着一定的保护作用。本实验拟探讨孟鲁司特钠对 CVB3 感染小鼠心肌损伤是否有保护

* 基金项目：湖北省科技攻关项目(301130801)

作者简介：周洁，硕士研究生，研究方向：儿科心血管，电话：18679237796，E-mail: 158452790@qq.com

（收稿日期：2016-09-20 接受日期：2016-10-10）

作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 **动物** SPF 级 BALB/C 小鼠,雄性,体质量为 16-20g,由武汉生物制品研究所提供,许可证编号为 SCXK(鄂)2003-0003。由武汉大学人民医院动物实验室饲养,环境许可证号为 SYXK(鄂)2004-0027,喂以 SPF 级动物饲养料,自由饮水,室温 20 ℃左右,湿度为 60 %。

1.1.2 **病毒及药品** 柯萨奇 B3 病毒由武汉大学医学院病毒研究所提供 CVB3 病毒株(Nancy 株),在 He-La 细胞上传代冻融 3 次,并测得半数组织感染量 TCID50 为 10^{-4} /L。孟鲁司特钠咀嚼片(10 mg/ 片),Merck Sharp & Dohme Ltd. (U.K.) 生产,杭州默沙东制药有限公司分包装,进口药品注册证号:H20120366,批准文号:国药准字:J20130054。

1.2 方法

1.2.1 **分组及给药** 采用文献报道的方法[12],将小鼠 65 只,随机分成四组:A 组为空白对照组(n=10 只);B 组为病毒对照组(n=15 只);C 组为孟鲁斯特钠小剂量组(n=20 只);D 组为孟鲁司特钠大剂量组 (n=20 只)。给 BALB/c 小鼠腹腔注射 10^{-4}/L TCID50CVB3 悬液 0.20 mL, 感染后 7 天以 HE 染色,心肌切片,观察发现心肌组织坏死、水肿,其间质充斥大量炎性细胞浸润, 符合经典 VMC 小鼠模型特征, 提示 CVB3 感染 BALB/c 小鼠的 VMC 模型复制成功。复制 VMC 模型,第 1 天将 B、C、D 三组中每只小鼠经腹腔注射 CVB3 病毒 0 .20 mL,A 组腹腔注射等量 Eagle' s 液,于接种病毒次日分别予以 C、D 组小鼠灌胃孟鲁司特钠咀嚼片 2.5 mg/kg·d、10 mg/kg·d (磨成粉后加入少量生理盐水喂服),A、B 组灌胃生理盐水。病毒感染后第 14 天将所有存活鼠处死(删除死亡鼠),留取心脏,一半用 10 %的甲醛固定待做 HE 染色和免疫组化, 一半冻存于 -80 ℃冰箱备做荧光定量 PCR 检测。

1.2.2 **病理学检查** 常规进行 HE 染色,光镜下观察心肌病理改变,并按照相关文献报道[13]的计算出各组心肌病变积分,即每张切片随机取 5 个高倍视野(× 400),计算每个视野中炎性细胞浸润及坏死区域面积与整个视野的面积之比,无病变计 0 分, 病变面积小于 25 %计 1 分, 介于 25 %-50 %之间计 2 分, 介于 50 %-75 %之间计 3 分,大于 75 %计 4 分。

1.2.3 RQ-PCR **检测心肌组织** NF-κBp65 mRNA **表达** 采用 Trizol Reagent 试剂(美国 Invitrogen Life Technologies 公司)抽提各组心肌组织的总 RNA, 加入 20 μL 无 RNA 酶的水溶解 RNA,取 2 μg 总 RNA,用 Thermo 公司反转录试剂盒合成 cDNA。由 Invitrogen Biotechnology Co 公司合成引物序列, 其中 NF-kB 引物序列为:上游:5,-AAGCACAGATACCACCAAGACAC-3,, 下游:5,-CGCACTGCATTCAAGTCATAGTC-3,,扩增产物长度为 324 bp,退火温度为 60℃;内参照基因 β-actin 引物序列为: 上游:5,-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA-3,,下游:5,-GTAACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3,, 扩增产物长度为 287 bp, 退火温度为 60℃。取 2.5 μL 反转录产物进行 PCR 循环扩增,PCR 反应条件为:95℃预变性 10 min,95℃变性 15 s,60℃复性及延伸 60 s,共 40 个循环。最后采用△ △ CT 法来检测 NF-κB mRNA 的表达。

1.2.4 Western blot **检测** NF-κBp65 **蛋白表达** 将提取的的蛋白质样品通过十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行分离, 接着把凝胶上的蛋白条带电转印至硝酸纤维素膜上,以特异性抗体作为探针,从而检测 NF-κBp65 蛋白的表达。

1.2.5 **统计学处理** 各组数据用均数± 标准差表示, 应用 SPSS 20.0 软件进行 t 检验、方差分析,同时对心肌组织中病变积分及 NF-κBmRNA 表达进行直线相关性分析,以 P <0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠生存率及心肌病理变化的比较

A 组小鼠无死亡,B、C、D 组小鼠均有死亡,B 组共死亡 8 只,第四天死亡 2 只,第六、七天均死亡 3 只,生存率(7/15);C 组共死亡 6 只,第五天死亡 1 只,第七天死亡 3 只,第九天死亡 2 只,生存率(14/20);D 组共死亡 3 只,第六天死亡 2 只,第七天死亡 1 只,生存率(17/20),从而可知,各组生存率:A 组 >D 组 >C 组 >B 组。同时,采用 SPSS 20.0 中的寿命表法绘制生存曲线,见图 1,经过两两比较(Pairwise Comparisons)见表 1 分析可知,B 组与 C 组、B 组与 D 组、C 组与 D 组之间生存率比较均无统计学差异(P>0.05)。接种病毒的 B、C、D 组心肌组织均可见炎性细胞浸润、心肌纤维断裂和心肌组织坏死,空白对照组(A 组)则未见心肌组织病理改变,孟鲁司特钠治疗组(C、D 组)炎性细胞浸润和心肌组织坏死程度较病毒对照组(B 组)均明显减轻,且大剂量组(D 组)较小剂量组(C 组)减轻。各组心肌病理积分:A 组(0 分)<D 组 <C 组 <B 组(P <0 .05),见图 2、表 2。

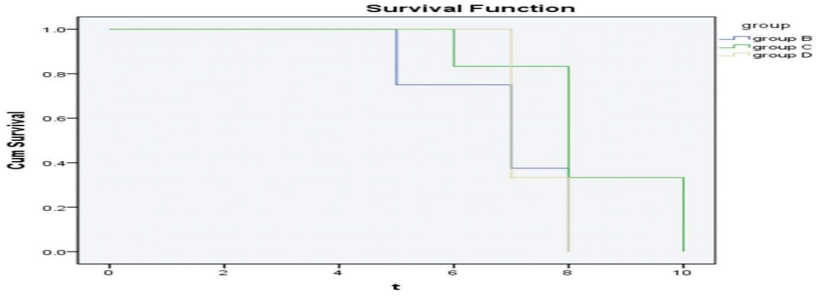

图 1 各组小鼠生存曲线图

Fig. 1The survival curves of mice in each group

Note: For the survival variable t, no statistics are computed for control variable group = 1 because there are no valid cases.

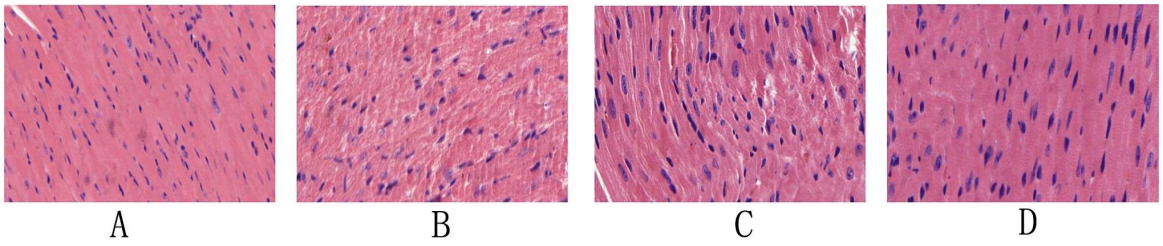

图 2 各组心肌组织病理改变镜下照片(HE× 400)

Fig. 2 Pathological changes of myocardial tissue in each group under the microscope

Note: group A was the control group; group B was the virus control group; group C was the montelukast sodium group of small dose; group D was the montelukast sodium group of large dose

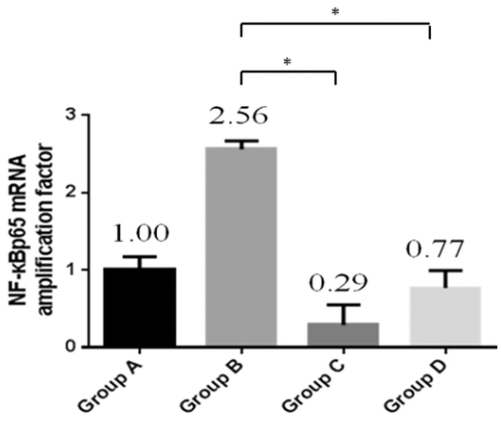

图 3 各组小鼠心肌中 NF-κBp65 mRNA 表达示意图

Fig.3 Schematic diagram of mRNA NF-κBp65 expression in the myocardium of each group of mice

Note: *P<0.05, group A was the control group; group B was the virus control group; group C was the montelukast sodium group of small dose; group D was the montelukast sodium group of large dose

2.2 心肌组织 NF-κBp65 mRNA 表达

接种病毒的各组心肌组织 NF-κBp65 mRNA 含量均高于空白对照组(A 组),其中孟鲁司特钠治疗组低于病毒对照组(B 组),同时高剂量组(D 组)小于低剂量组(C 组),差异有统计学意义(P<0.05),见图 3,表 1。

2.3 心肌组织 NF-κBp65 蛋白表达

通过 Alpha 软件处理系统[14]分析目标带的光密度值结果可知,NF-κBp65 蛋白表达水平:空白对照组(A 组)< 孟鲁司特钠高剂量组(D 组)< 孟鲁司特钠低剂量组(C 组)< 病毒对照组(B 组)(P <0 .05),见图 4,表 1。

2.4 直线相关分析

接种病毒各组心肌组织 NF-κBmRNA 表达水平与心肌病变积分呈正相关(相关系数 r=0.96,P<0.05)。

3 讨论

有学者证实[15]柯萨奇病毒 B3 感染小鼠致病毒性心肌炎以及与之激发的相关性心肌病变的炎症过程大致可分为三个阶段。急性期,病毒大量复制,诱导心肌细胞的直接损伤,进而导致心肌纤维的凋亡与坏死;亚急性期,炎症因子大量释放和免疫过激反应损伤心肌细胞, 诱发心肌炎向扩张性心肌病发展;慢性期,机制未明的炎症持续损伤心肌细胞,导致心肌间质纤维化和钙化、心腔扩大及心脏重朔。由此可见,炎症因子在病毒性心肌炎的发生发展过程中起着重要作用。

白三烯(Leukotriene)是在细胞受到刺激时,细胞膜磷脂在磷脂酶 A2(PLA2)作用下释放出花生四烯酸(AA)和血小板活化因子(PAF),再由所产生的游离花生四烯酸经脂氧酶(lipoxygenase,LOX) 等一系列催化反应途径生成[16]。白三烯(Leukotriene)具有广泛的生物活性,参与了炎症、血栓形成和

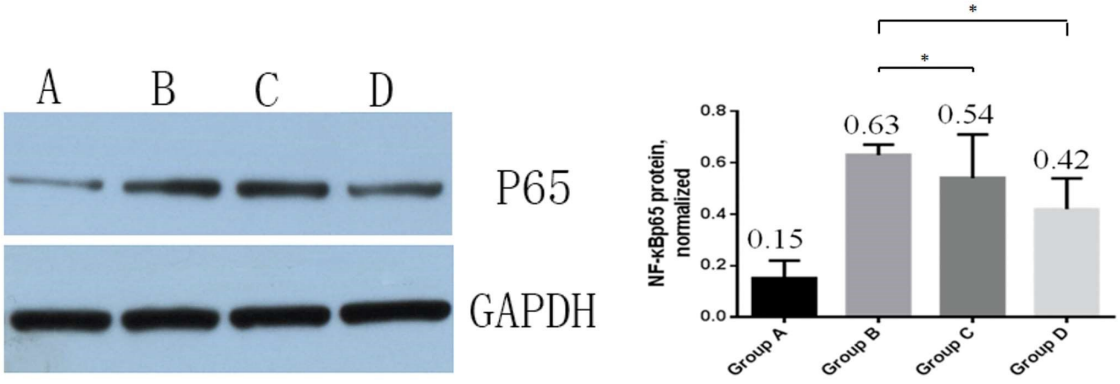

图 4 NF-κBp65 免疫印迹结果(纵轴为相对灰度值)

Fig. 4 NF-kbp65 blotting results(The vertical axis was relative gray value)

Note: *P<0.05, group A was the control group; group B was the virus control group; group C was the montelukast sodium group of small dose; group D was the montelukast sodium group of large dose

表 1 各组生存率的两两比较

Table 1 Pairwise comparisons of survival rate of each group

(I) group	(J) group	Wilcoxon (Gehan) Statistic	df	*Sig.*
2	3	3.338	1	.068
	4	.109	1	.741
3	2	3.338	1	.068
	4	1.500	1	.221
4	2	.109	1	.741
	3	1.500	1	.221

a. Comparisons are exact.

表 2 各组中心肌病变积分及 NF-κB mRNA 表达情况

Table 2 The expression of nuclear factor kappa mRNA and myocardial lesion score of each group

Groups	Cases	Pathologic score	△ CT	△ △ CT	$2^{-\triangle\triangle CT}$
Group A	10	0	12.99± 0.21	1.79± 0.21	0.29
Group B	15	2.85± 0.40	9.84± 0.13	-1.35± 0.13	2.56
Group C	20	1.62± 0.32	11.19± 0.30	0.00± 0.30	1.00
Group D	20	0.99± 0.10	11..57± 0.24	0.37± 0.24	0.77

Note: group A was the control group;group B was the virus control group; group C was the montelukast sodium group of small dose; group D was the montelukast sodium group of large dose.

速发型过敏反应等多种病理过程,与心脑血管疾病、哮喘和休克等的发病有密切关系[17-19]。其中白三烯 C4(LTC4)、白三烯 D4(LTD4)、白三烯 E4(LTE4)在 C-6 上均含有半胱氨酰基所以又被为半胱氨酰白三烯(Cys-LTs)[20]。大量研究表明[21-26],半胱氨酰白三烯(Cys-LTs)在心血管系统有重要影响。

研究已证实[27]半胱氨酰白三烯受体拮抗剂各种因素导致的心肌损伤中有保护作用,尤其是在缺氧环境下导致的心肌损伤,病毒性心肌炎受损的心肌尚处在缺氧环境中,同时伴有各种炎症因子的损伤。所以我们猜测,半胱氨酰白三烯受体拮抗剂不仅通过作用其受体,抑制白三烯直接对心肌的炎性损伤作用,同时可以纠正心肌缺氧情况,从而达到保护心肌的作用。本研究发现,半胱氨酰白三烯受体拮抗剂孟鲁司特钠治疗组小鼠心肌病变积分及 NF-κBp65 mRNA、NF-κB p65 蛋白的表达明显低于病毒对照组,而且高剂量组降低更加显著,同时接种病毒各组心肌病变积分与 NF-κBp65 mRNA 的表达呈正相关,提示孟鲁司特钠可能通过某个途径阻断了病毒性心肌炎的发展进程,具有剂量依赖性,剂量越大,其干预治疗效果越佳。推测机制可能是, 孟鲁司特钠通过 NF-κB 通路干预病毒性心肌炎在炎急性期释放各种炎症因子及炎症介质,从而达到保护心肌细胞的作用。

综上所述,孟鲁司特钠对病毒性心肌炎小鼠心肌损伤具有保护作用, 有望在临床实践中成为病毒性心肌炎预防用药之一,为患有病毒性心肌炎的儿童带来福音。

参 考 文 献(References)

[1] Yuan J, Stein D A, Lim T, et al. Inhibition of coxsackievirus B3 in cell cultures and in mice by peptide-conjugated morpholino oligomers targeting the internal ribosome entry site [J]. Journal of Virology, 2007, 80(23): 11510-11519

[2] Chang H, Wang Y, Wu W, et al. Hydrodynamics-based delivery of an interleukin-1 receptor II fusion gene ameliorates rat autoimmune myocarditis by inhibiting IL-1 and Th17 cell polarization [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2013, 31(4): 833-840

[3] Khoo N S, Smallhorn J F, Atallah J, et al. Altered Left Ventricular Tissue Velocities, Deformation and Twist in Children and Young Adults with Acute Myocarditis and Normal Ejection Frac tion [J]. Journal of the American Society of Echocardiography Official Publication of the American Society of Echocardiography, 2012, 25 (3): 294-303

[4] 吴利伟, 王凤鸣. 多因子联合调控致病毒性心肌炎炎症通路研究进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(1): 168-169
Wu Li-wei, Wang Feng-ming. Progress in the study of the inflammatory pathway of viral myocarditis induced by multiple factors [J]. Chinese Journal of Clinical Physicians: electronic edition, 2013, 7(1): 168-169

[5] Wang H W, Liu R B, Liu Y, et al. The expression and significance of FAK and NF-kBp65 in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization [J]. Journal of Interventional Radiology, 2011, 20(8): 621-624

[6] Zhao Y, Ning K, Zhang Z, et al. Expression Change of NF-kBp65 in Rat Hippocampus after Long-term Stop Trained[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2012, 21(2): 16-19

[7] Bai Y, Na L I, Zhao S L. Effect of Azithromycin on NF-kBp65 and IL-8 in nasal mucosa of chronic sinusitis after endoscopic sinus surgery[J]. Journal of Otolaryngology & Ophthalmology of Shandong University, 2012, 26(3): 40-44

[8] Shu X L, Liu X L, Zhong J X, et al. L-arginine enhances arginine

deiminase induced human lymphoma cell growth inhibition through NF-kBp65 and p53 expression in vitro [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2014, 18(15): 2124-2131

[9] Hosokawa S, Haraguchi G, Sasaki A, et al. Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF-kB) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF-kB inhibitor IMD-0354 [J]. Cardiovascular Research, 2013, 99(1): 35-43

[10] Hughes R L, Mcintyre C M. Leukotriene Modifiers [J]. Journal of Asthma & Allergy Educators, 2012, 3(1): 37-38

[11] 严能兵, 罗鸿. 白三烯的研究进展与临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014, (6): 721-723
Yan Neng-bing, Luo Hong. Research progress and clinical significance of leukotriene [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2014, (6): 721-723

[12] Miyamoto T, Matsumori A, Hwang M, et al. Therapeutic effects of FTY720, a new immunosuppressive agent, in a murine model of acute viral myocarditis [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2001, 37(6): 1713-1718

[13] Yu X H, Li S J, Chen R Z, et al. Pathogenesis of coxsackievirus B3-induced myocarditis: role of macrophage migration inhibitory factor[J]. Chin Med, J(Engl), 2012, 125(1): 1-3

[14] Weisstein E. Computable Data, Mathematics, and Digital Libraries in Mathematica and Wolfram|Alpha [M]// Intelligent Computer Mathematics. Springer International Publishing, 2014: 26-29

[15] 汪朝晖, 廖玉华. 病毒性心肌炎 [J]. 中国实用内科杂志, 2012, (7): 511-513
Wang Zhao-hui, Liao Yu-hua. Viral myocarditis [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2012, (7): 511-513

[16] Kanaoka Y, Boyce J A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors; emerging concepts [J]. Allergy Asthma & Immunology Research, 2014, 6(4): 288-295

[17] Diamant Z, Mantzouranis E, Bjermer L. Montelukast in the treatment of asthma and beyond [J]. Expert Review of Clinical Immunology, 2014, 5(6): 639-658

[18] Ketelhuth D F J, Hermansson A, Hlawaty H, et al. The leukotriene B 4, receptor (BLT) antagonist BIIL284 decreases atherosclerosis in ApoE-/-, mice[J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2015, 121 (Pt A): 105-109

[19] Spanbroek R, Grabner R, Lotzer K, et al. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(3): 1238-1243

[20] Singh RK, Gupta S, Dastidar S, et al. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics[J]. Pharmacology. 2010, 85(6): 336-349

[21] 袁玉梅, 方三华, 卢韵碧, 等. 半胱氨酰白三烯受体 1 对血管内皮细胞的增殖和迁移的调节[J]. 中国药理通讯, 2008, (3): 13-14
Yuan Yu-mei, Fang San-hua, Lu Yun-bi, et al. Regulation of cysteinyl leukotriene receptor 1 on vascular endothelial cell proliferation and migration [J]. Chinese pharmacological communication, 2008 (3): 13-14

[22] Capra V, Carnini C, Accomazzo M R, et al. Autocrine activity of cysteinyl leukotrienes in human vascular endothelial cells: Signaling through the CysLT 2, receptor [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2015, 120: 115-125

[23] Prost N D, El-Karak C, Avila M, et al. Changes in cysteinyl leukotrienes during and after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in patients with and without chronic obstructive pulmonary disease [J]. Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery, 2011, 141 (6): 1496-1502(e3)

[24] Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors[J]. Pharmacological Research, 2004, 50(1): 1-11

[25] De C R. n-3 Fatty acids in cardiovascular disease [J]. New England Journal of Medicine, 2011, 365(12): 2439-2450

[26] Rafnsson A, B?ck M. Urinary leukotriene E4 is associated with renal function but not with endothelial function in type 2 diabetes [J]. Disease Markers, 2013, 35(5): 475-480

[27] 陈珊, 单江, 金戈. 孟鲁司特钠对大鼠异丙肾上腺素心肌坏死的保护作用[J]. 中国药学杂志, 2003, 38(3): 187-189
Chen Shan, Shan Jiang, Jing Ge. Protective effect of montelukast sodium on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2003, 38 (3): 187-189