

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research替米沙坦基于 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号
通路通过 *miR* - 320 对病毒性心肌炎小鼠
作用的研究Research of the effects of telmisartan on mice with viral myocarditis by *miR* - 320
based on PKNOX1/BCL10/MALT1 signaling pathway骆小梅, 胡雁飞, 海 荣,
王 伟, 薄 涛(新疆医科大学 第五附属医院 急诊科, 新疆维吾尔
自治区 乌鲁木齐 830000)LUO Xiao - mei, HU Yan - fei,
HAI Rong, WANG Wei,
BO Tao(Department of Emergency, the Fifth
Affiliated Hospital of Xinjiang Medical
University, Urumqi 830000, Xinjiang
Uygur Autonomous Region, China)作者简介: 骆小梅(1978 -), 女, 副主任医师, 主
要从事心血管内科专业和急诊内科
专业方面的临床工作和研究

通信作者: 骆小梅

MP: 13565802085

E - mail: 13565802085@163.com

摘要:目的 探讨替米沙坦片(Tel)通过微小RNA-320(*miR*-320)对病毒性心肌炎(VM)小鼠的作用及其机制。方法 将60只BALB/c小鼠分为对照组、模型组、实验组、Tel+rAAV-NC组和Tel+rAAV-*miR*-320组,每组12只。除对照组外均通过腹腔注射含100 TCID₅₀的柯萨奇B3病毒0.1 mL建构VM小鼠模型。实验组灌胃给予10 mg·kg⁻¹Tel,连续7 d;Tel+rAAV-NC组在实验组的基础上,尾静脉注射rAAV-NC(1×10¹¹病毒拷贝数,溶于磷酸盐缓冲液100 μL);Tel+rAAV-*miR*-320组在实验组的基础上,尾静脉注射rAAV-*miR*-320(1×10¹¹病毒拷贝数,溶于磷酸盐缓冲液100 μL)。用实时定量反转录聚合酶链式反应法检测*miR*-320相对表达水平;用酶联免疫吸附试验法检测肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白和肌红蛋白水平;用原位末端标记染色法检测细胞凋亡情况;用蛋白质印迹法检测过氧化物还原酶样蛋白NOX1(PKNOX1)/B-细胞淋巴瘤因子10(BCL10)/黏膜相关淋巴瘤转运蛋白1(MALT1)信号通路相关蛋白相对表达水平。结果 对照组、模型组、实验组、Tel+rAAV-NC组和Tel+rAAV-*miR*-320组的*miR*-320相对表达水平分别为1.00±0.18、4.06±0.73、1.82±0.34、1.95±0.36和3.47±0.61;肌酸激酶同工酶分别为(36.09±4.82)、(125.18±19.67)、(49.73±8.04)、(55.62±8.25)和(103.56±17.49)U·mL⁻¹;肌红蛋白分别为(72.35±11.46)、(368.29±61.83)、(93.62±15.27)、(90.74±16.18)和(316.51±57.92)μg·L⁻¹;肌钙蛋白分别为(17.42±2.53)、(64.74±10.90)、(28.59±4.16)、(32.45±5.98)和(53.91±9.64)μg·L⁻¹;细胞凋亡率分别为(3.17±0.52)%、(28.46±5.39)%、(6.97±1.24)%、(8.01±1.53)%和(24.89±4.16)%;PKNOX1蛋白的相对表达水平分别为1.00±0.15、2.07±0.36、1.43±0.19、1.39±0.20和1.91±0.32;BCL10蛋白的相对表达水平分别为1.00±0.18、1.95±0.34、1.48±0.22、1.41±0.21和1.84±0.35;MALT1蛋白的相对表达水平分别为1.00±0.13、1.90±0.32、1.26±0.15、1.37±0.18和1.69±0.27。模型组的上述指标与对照组比较,实验组的上述指标与模型组比较,Tel+rAAV-*miR*-320组的上述指标与Tel+rAAV-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 Tel通过抑制*miR*-320表达,减轻VM小鼠心肌损伤,抑制细胞凋亡,这可能是通过抑制PKNOX1/BCL10/MALT1信号通路实现的。

关键词:替米沙坦片;病毒性心肌炎;微小RNA-320;心肌损伤;过氧化物还原酶样蛋白NOX1/B-细胞淋巴瘤因子10/黏膜相关淋巴瘤转运蛋白1

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.01.014

中图分类号:R542.2

文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)01-0086-07

Abstract: Objective To investigate the effects of telmisartan tablets

(Tel) on viral myocardialitis (VM) mice through microRNA - 320 (*miR* - 320) and its mechanism. **Methods** A total of 60 BALB/c mice were divided into control group, model group, experimental group, Tel + rAAV - NC group and Tel + rAAV - *miR* - 320 group, with 12 mice in each group. Except for control group, VM mouse models were established by intraperitoneal injection of coxsackievirus B3 0.1 mL containing 100 TCID₅₀. Experimental group was given 10 mg · kg⁻¹ Tel intragastrically for 7 days. Based on experimental group, rAAV - NC was injected into the tail vein (1 × 10¹¹ viral copy number, dissolved in PBS 100 μL) in Tel + rAAV - NC group; based on experimental group, rAAV - *miR* - 320 was injected into the tail vein (1 × 10¹¹ viral copy number, dissolved in PBS 100 μL) in Tel + rAAV - *miR* - 320 group. The relative expression levels of *miR* - 320 were detected by quantitative real time polymerase chain reaction. Creatine kinase isoenzyme, myoglobin and troponin were detected by enzyme - linked immunosorbent assay. TdT - mediated dUTP nick end labeling was used to detect apoptosis. The relative expression levels of peroxiredoxin - like protein NOX1 (PKNOX1)/B - cell lymphoma 10 (BCL10)/mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 (MALT1) signaling pathway were detected by Western blot. **Results** The relative expression levels of *miR* - 320 in control group, model group, experimental group, Tel + rAAV - NC group and Tel + rAAV - *miR* - 320 group were 1.00 ± 0.18, 4.06 ± 0.73, 1.82 ± 0.34, 1.95 ± 0.36 and 3.47 ± 0.61, respectively; creatine kinase isoenzyme were (36.09 ± 4.82), (125.18 ± 19.67), (49.73 ± 8.04), (55.62 ± 8.25) and (103.56 ± 17.49) U · mL⁻¹, respectively; myoglobin were (72.35 ± 11.46), (368.29 ± 61.83), (93.62 ± 15.27), (90.74 ± 16.18) and (316.51 ± 57.92) μg · L⁻¹, respectively; troponin were (17.42 ± 2.53), (64.74 ± 10.90), (28.59 ± 4.16), (32.45 ± 5.98) and (53.91 ± 9.64) μg · L⁻¹, respectively; the apoptosis rates were (3.17 ± 0.52)%, (28.46 ± 5.39)%, (6.97 ± 1.24)%, (8.01 ± 1.53)% and (24.89 ± 4.16)%, respectively; the relative expression levels of PKNOX1 protein were 1.00 ± 0.15, 2.07 ± 0.36, 1.43 ± 0.19, 1.39 ± 0.20 and 1.91 ± 0.32, respectively; the relative expression levels of BCL10 protein were 1.00 ± 0.18, 1.95 ± 0.34, 1.48 ± 0.22, 1.41 ± 0.21 and 1.84 ± 0.35, respectively; the relative expression levels of MALT1 protein were 1.00 ± 0.13, 1.90 ± 0.32, 1.26 ± 0.15, 1.37 ± 0.18 and 1.69 ± 0.27, respectively. Statistical comparisons revealed significant differences between model group and control group, as well as between experimental group and model group, and between Tel + rAAV - *miR* - 320 group and Tel + rAAV - NC group (all *P* < 0.05). **Conclusion** By inhibiting the expression of *miR* - 320, Tel alleviates myocardial injury and inhibits apoptosis in VM mice, which may be achieved by inhibiting PKNOX1/BCL10/MALT1 signaling pathway.

Key words: telmisartan tablet; viral myocardialitis; microRNA - 320; myocardial injury; peroxiredoxin - like protein NOX1/B - cell lymphoma 10/mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1

病毒性心肌炎(viral myocardialitis, VM)是由病毒感染引发的心肌炎症性疾病。部分患者病情可能迁延并继发多种心律失常,导致心力衰竭,甚至猝死^[1]。柯萨奇 B3 病毒(coxsackievirus B3, CVB3)是主要致病病原体。目前,临床治疗以对症支持为主,缺乏特异性靶向药物。替米沙坦(telmisartan, Tel)作为血管紧张素 II 受体拮抗剂,除降压作用外,还具有抗炎、抗氧化等多效性^[2]。微小 RNA(microRNA, *miR*)可以通过调控蛋白质的合成进而影响细胞的增殖、凋亡及其他生理过程,如 *miR* - 217 - 5p 参与 VM 发生发展^[3]。过氧化物还原酶样蛋白 NOX1 (peroxiredoxin - like protein NOX1, PKNOX1)/B - 细胞淋巴瘤因子 10 (B - cell lymphoma 10, BCL10)/黏膜相关淋巴瘤转运蛋白 1 (mucosa associated lymphoid tissue lymphoma

translocation gene 1, MALT1) 信号通路作为调控核因子 κB (nuclear factor kappa - B, NF - κB) 活化的关键轴,在介导免疫炎症反应中发挥重要作用^[4]。本研究旨在基于 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号通路探讨 Tel 通过 *miR* - 320 对 VM 小鼠的保护作用,以期对 VM 的靶向治疗提供理论支持。

材料与方法

1 材料

动物 60 只 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,鼠龄 6~8 周,体质量 20~22 g,杭州纽瓊佑曙生命科技有限公司提供。动物生产许可证号:SCXK(浙)2023 - 0012,动物使用许可证号:SYXK(浙)2023 - 0045。本实验经

浙江省实验动物中心动物伦理委员会批准(伦理批号:ZJCLA-IACUC-20040178)。

药品与试剂 替米沙坦片,规格:每片40 mg,生产批号:20240624,批准文号:国药准字H20050715,江苏复星万邦医药集团有限公司生产;CVB3悬液,批号:SL30171,中国科学院武汉病毒研究所提供;干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)试剂盒,均由上海科澄维生物科技有限公司生产;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒,湖北武汉麟盛科技有限公司生产;肌红蛋白、肌钙蛋白和肌酸激酶同工酶试剂盒,天津越腾生物技术有限公司生产;丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒,均由上海靳创生物科技有限公司生产;兔抗鼠BCL10、MALT1、活化半胱氨酸蛋白酶-3和 β -肌动蛋白抗体,均由英国Abcam公司生产;兔抗鼠PKNOX1抗体,武汉菲恩生物科技有限公司生产;兔抗鼠活化半胱氨酸蛋白酶-9抗体,美国Biogradetech公司生产;原位末端标记染色(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒,北京Solarbio公司生产。

仪器 Multiskan FC酶标仪,美国赛默飞(广东)公司产品;MZX200荧光显微镜,广东广州市明美光电技术公司产品;7500实时定量反转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪,美国ABI公司产品。

2 实验方法

2.1 VM模型建立^[5]

通过向小鼠腹腔注射含有100半数组织培养物感染量(50% tissue culture infectious dose, TCID₅₀)的CVB3病毒0.1 mL构建VM小鼠模型,每日1次,持续注射21 d。

2.2 分组与给药方法

将BALB/c小鼠分为对照组、模型组、实验组、Tel+rAAV-NC组和Tel+rAAV-miR-320组,每组12只。除对照组外均用“2.1”中的方法构建VM模型。对照组小鼠正常饲养,造模给药期间,腹腔注射或灌胃等量生理盐水。模型组小鼠构建VM模型;实验组在VM组基础上,造模成功后灌胃给予10 mg·kg⁻¹ Tel,每日1次,连续7 d;Tel+rAAV-miR-320组在实验组基础上,于造模后第1、3 d,将携带1×10¹¹病毒拷贝数的rAAV-miR-320腺相关病毒(5'-TCGC-CCTCTCAACCCAGCTTTTTTCAAGAGAAAAAGCTGGGTTGAGAGGGCGA-3')溶于磷酸盐缓冲液(phosphate

buffered saline, PBS)100 μ L中,通过尾静脉注射到小鼠体内;Tel+rAAV-NC组在实验组基础上,于造模后第1、3 d,尾静脉注射与Tel+rAAV-miR-320组等剂量rAAV-miR-320腺相关病毒的阴性对照。

2.3 HE染色法检测各组小鼠心肌组织病理损伤情况^[6]

给药结束后,用颈椎脱臼法处死小鼠,并取出心脏组织,用4%多聚甲醛固定、梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片,70℃烘箱烤片2.5 h。按试剂盒要求进行HE染色,观察心肌组织的损伤程度。

2.4 酶联免疫吸附试验法检测氧化应激、炎症、心肌损伤标志物水平^[7]

给药结束后对每组小鼠进行摘眼球取血,以1 500 r·min⁻¹离心10 min,收集血清。另外,收集各组小鼠心肌组织横切面左心室游离壁(横切面剩余组织用于“2.3”),剪碎后匀浆,以3 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液。依据试剂盒提供的操作指南逐步进行。用酶标仪于450 nm波长处对各孔的光密度值进行测量,计算小鼠血清中的心肌损伤标志物(肌酸激酶同工酶、肌钙蛋白、肌红蛋白)水平,小鼠心肌组织中氧化应激指标和炎症因子的水平(MDA、SOD、IFN- γ 和IL-1 β)。

2.5 qRT-PCR法检测miR-320表达情况^[8]

取各组小鼠心肌组织,裂解并提取总RNA。取2 μ g,使用逆转录试剂盒将总RNA转化为cDNA,并以cDNA作为模板进行PCR扩增。扩增条件为95℃ 60 s, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 72℃ 45 s, 40个循环。以U6作为内参,用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算miR-320相对表达水平。miR-320上游引物序列为5'-CATA-CAAAAGCTGGGTTGAGAGG-3',下游引物序列为5'-AATGCATGACAGATCCCTACCG-3';U6上游引物序列为5'-AGACATGGACGTGGTGAATCA-3',下游引物序列为5'-ACTCTCCGTCTTGTGGCAC-3'。

2.6 荧光原位杂交技术法检测miR-320水平^[9]

取小鼠心肌组织切片,脱蜡复水,蛋白酶K消化20 min,滴加含荧光探针的杂交液,37℃杂交过夜。洗涤后4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI)复染细胞核,避光孵育15 min,荧光显微镜下观察。miR-320探针序列5'-DIG-AGAAGGCGGAGGGCGGCGAGGC-DIG-3'。

2.7 TUNEL法检测细胞凋亡情况^[10]

取小鼠心肌组织切片,脱蜡复水,用蛋白酶K进行30 min消化。随后经3%过氧化氢溶液孵育10 min

以消除内源性过氧化物酶活性。将处理后的切片与TUNEL反应液于避光条件下37℃共孵育60 min后,PBS充分漂洗3次(每次5 min),继而用DAPI染液避光染色5 min对细胞核进行标记。最终通过激光共聚焦显微镜观察并采集荧光图像并计算细胞凋亡率。

2.8 蛋白质印迹法检测凋亡及 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号通路相关蛋白表达水平^[11]

取小鼠心肌组织,裂解,以 $1.0 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min,收集上清液,定量后上样、电泳分离,转膜。用5%脱脂牛奶进行封闭处理2 h。随后加入一抗,在4℃条件下孵育过夜。洗膜后加入二抗,在室温条件下孵育1 h。经洗涤后,用化学发光剂曝光显影,以 β -肌动蛋白为内参,计算各蛋白相对表达水平。

3 统计学处理

用SPSS 24.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 各组小鼠心肌组织病理学形态的比较

对照组小鼠心肌组织纤维分布规则,细胞形态

正常,仅有少量炎性细胞浸润;与对照组相比,模型组小鼠心肌组织纤维出现断裂且大部分分布紊乱,细胞形态发生变形,有明显炎性细胞浸润;与模型组相比,实验组小鼠心肌组织病理损伤程度出现明显好转,心肌纤维大部分排列规则且断裂程度明显降低,炎性细胞浸润减少;与实验组相比,Tel + rAAV - NC组小鼠心肌组织病理损伤无显著变化;与Tel + rAAV - NC组相比,Tel + rAAV - miR - 320组小鼠心肌组织上述病理损伤加重,见图1。

2 各组小鼠心肌组织氧化应激指标及炎症因子水平的比较

相较于对照组,模型组小鼠心肌组织IFN- γ 、IL-1 β 和MDA水平均显著上升(均 $P < 0.001$),SOD水平显著下降($P < 0.001$);与模型组比较,实验组小鼠心肌组织IFN- γ 、IL-1 β 和MDA水平均显著降低(均 $P < 0.001$),SOD水平显著升高($P < 0.001$);与实验组相比,Tel + rAAV - NC组小鼠心肌组织中MDA、IFN- γ 、IL-1 β 和SOD水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与Tel + rAAV - NC组相比,Tel + rAAV - miR - 320组小鼠心肌组织中MDA、IFN- γ 和IL-1 β 水平均显著升高(均 $P < 0.001$),SOD水平显著下降($P < 0.001$),见表1。

表1 各组小鼠心肌组织中氧化应激指标及炎症因子水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of levels of oxidative stress indexes and inflammatory factors in myocardial tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	MDA (nmol · mg ⁻¹)	SOD (U · mg ⁻¹)	IFN- γ (pg · g ⁻¹)	IL-1 β (pg · mg ⁻¹)
Control	12	1.72 ± 0.24	6.38 ± 0.96	165.59 ± 27.83	5.26 ± 0.87
Model	12	5.46 ± 0.93 ***	2.15 ± 0.32 ***	474.03 ± 69.71 ***	8.92 ± 1.58 ***
Experimental	12	2.91 ± 0.38 ###	4.73 ± 0.65 ###	238.52 ± 34.27 ###	6.17 ± 1.09 ###
Tel + rAAV - NC	12	2.87 ± 0.42	4.79 ± 0.74	246.95 ± 36.58	6.08 ± 0.96
Tel + rAAV - miR - 320	12	4.69 ± 0.65 $\Delta\Delta\Delta$	3.46 ± 0.58 $\Delta\Delta\Delta$	412.78 ± 72.94 $\Delta\Delta\Delta$	8.44 ± 1.30 $\Delta\Delta\Delta$

MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase; IFN- γ : Interferon- γ ; IL-1 β : Interleukin-1 β ; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, ### $P < 0.001$; Compared with Tel + rAAV - NC group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

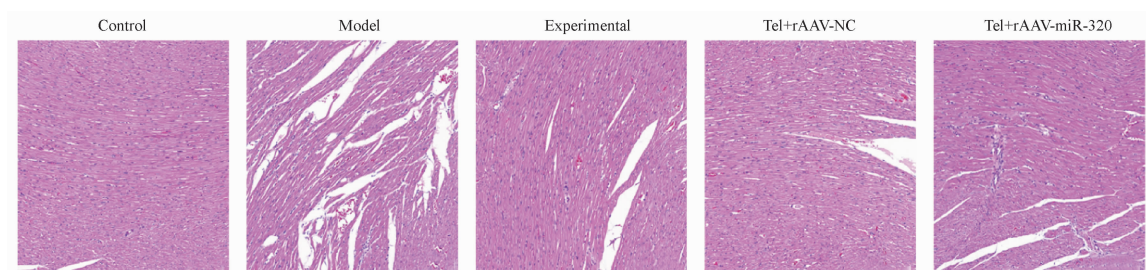


图1 苏木精-伊红染色法(HE)检测各组小鼠心肌组织病理学形态($\times 50$)

Figure 1 Myocardial histopathology of mice in each group detected by hematoxylin-eosin (HE) ($\times 50$)

Control group: Mice were cultured normally and injected intraperitoneally or intragastric with the same amount of normal saline; Model group: Intraperitoneal injection of 0.1 mL of CVB3 virus containing 100 TCID₅₀; Experimental group: Based on VM group, 10 mg · kg⁻¹ Tel was administered intragastrically for 7 days; Tel + rAAV - NC group: Based on Tel group, rAAV - NC was injected into the tail vein; Tel + rAAV - miR - 320 group: Based on the Tel group, rAAV - miR - 320 was injected into the tail vein.

3 各组小鼠心肌组织中 *miR-320* 相对表达水平的比较

对照组、模型组、实验组、Tel + rAAV - NC 组和 Tel + rAAV - miR - 320 组 *miR-320* 的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 4.06 ± 0.73 、 1.82 ± 0.34 、 1.95 ± 0.36 和 3.47 ± 0.61 ；*miR-320* 相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.15 、 2.78 ± 0.46 、 1.31 ± 0.18 、 1.44 ± 0.20 和 1.96 ± 0.27 。与对照组相比，模型组小鼠心肌组织中 *miR-320* 相对表达水平和荧光强度均显著升高(均 $P < 0.001$)；与模型组相比，实验组小鼠上述指标均显著降低(均 $P < 0.001$)；与实验组相比，Tel + rAAV - NC 组小鼠上述指标在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)；与 Tel + rAAV - NC 组相比，Tel + rAAV - miR - 320 组小鼠上述指标均显著升高(均 $P < 0.001$)。

4 各组小鼠血清内心肌损伤标志物水平的比较

模型组与对照组相比，小鼠血清心肌损伤标志物水平均显著升高(均 $P < 0.001$)；实验组与模型组相比，上述标志物水平均显著降低(均 $P < 0.001$)；Tel + rAAV - NC 组与实验组相比，上述标志物水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)；Tel + rAAV - miR - 320 组与 Tel + rAAV - NC 组相比，小鼠血清中上述标志物水平均显著上升(均 $P < 0.001$)，见表 2。

5 各组小鼠心肌组织细胞凋亡情况的比较

对照组、模型组、实验组、Tel + rAAV - NC 组和 Tel + rAAV - miR - 320 组心肌组织细胞凋亡率分别为 $(3.17 \pm 0.52)\%$ 、 $(28.46 \pm 5.39)\%$ 、 $(6.97 \pm 1.24)\%$ 、 $(8.01 \pm 1.53)\%$ 和 $(24.89 \pm 4.16)\%$ 。模型组小鼠与对照组相比，心肌组织细胞的凋亡率显著升高($P < 0.001$)；实验组小鼠与模型组相比，心肌组织细胞的凋亡率显著降低($P < 0.001$)；Tel + rAAV - NC 组小鼠与实验组相比，心肌组织细胞的凋亡率在统计学上差异无统计学意义($P > 0.05$)；Tel + rAAV - miR - 320 组小鼠与 Tel + rAAV - NC 组相比，心肌组织细胞的凋

亡率显著升高($P < 0.001$)。

对照组、模型组、实验组、Tel + rAAV - NC 组和 Tel + rAAV - miR - 320 组活化半胱氨酸蛋白酶 - 9 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.17 、 2.51 ± 0.48 、 1.32 ± 0.21 、 1.35 ± 0.19 和 2.09 ± 0.34 ；活化半胱氨酸蛋白酶 - 3 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 2.12 ± 0.36 、 1.38 ± 0.19 、 1.41 ± 0.23 和 1.97 ± 0.33 。模型组小鼠与对照组相比，心肌组织中活化半胱氨酸蛋白酶 - 9 和活化半胱氨酸蛋白酶 - 3 蛋白的相对表达水平均显著上升(均 $P < 0.001$)；实验组小鼠与模型组相比，上述指标均显著下降(均 $P < 0.001$)；Tel + rAAV - NC 组小鼠与 Tel 组相比，上述指标在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)；Tel + rAAV - miR - 320 组小鼠与 Tel + rAAV - NC 组相比，上述指标均显著上升(均 $P < 0.001$)，见图 2。

6 各组小鼠心肌组织中 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号通路表达的比较

对照组、模型组、实验组、Tel + rAAV - NC 组和 Tel + rAAV - miR - 320 组 PKNOX1 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 2.07 ± 0.36 、 1.43 ± 0.19 、 1.39 ± 0.20 和 1.91 ± 0.32 ；BCL10 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、 1.95 ± 0.34 、 1.48 ± 0.22 、

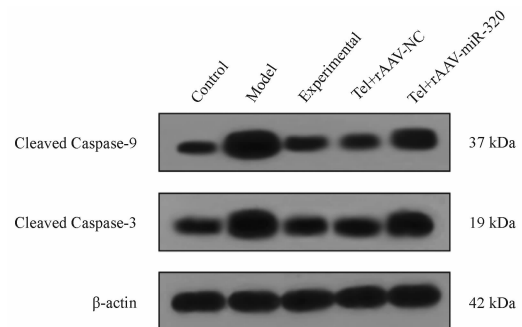


图 2 蛋白质印迹法检查各组小鼠凋亡相关蛋白相对表达水平

Figure 2 Relative expression levels of apoptosis - related proteins in mice of each group detected by Western blot

表 2 各组小鼠血清内心肌损伤标志物的表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of relative expression levels of myocardial injury markers in serum of mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	Creatine kinase isoenzyme ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Myoglobin ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Troponin ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
Control	36.09 ± 4.82	72.35 ± 11.46	17.42 ± 2.53
Model	$125.18 \pm 19.67^{***}$	$368.29 \pm 61.83^{***}$	$64.74 \pm 10.90^{***}$
Experimental	$49.73 \pm 8.04^{###}$	$93.62 \pm 15.27^{###}$	$28.59 \pm 4.16^{###}$
Tel + rAAV - NC	55.62 ± 8.25	90.74 ± 16.18	32.45 ± 5.98
Tel + rAAV - miR - 320	$103.56 \pm 17.49^{\Delta\Delta\Delta}$	$316.51 \pm 57.92^{\Delta\Delta\Delta}$	$53.91 \pm 9.64^{\Delta\Delta\Delta}$

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $###P < 0.001$; Compared with Tel + rAAV - NC group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

1.41 ± 0.21 和 1.84 ± 0.35; MALT1 蛋白的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.13、1.90 ± 0.32、1.26 ± 0.15、1.37 ± 0.18 和 1.69 ± 0.27。模型组小鼠与对照组相比,心肌组织中 PKNOX1、BCL10 和 MALT1 蛋白相对表达水平均显著上升(均 $P < 0.001$);实验组小鼠与模型组相比,上述指标均显著下降(均 $P < 0.001$);Tel + rAAV - NC 组小鼠与实验组相比,上述指标在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);Tel + rAAV - miR - 320 组小鼠与 Tel + rAAV - NC 组相比,上述指标均显著上升($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$),见图 3。

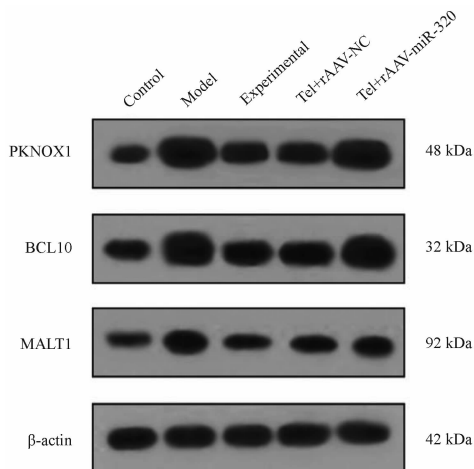


图 3 小鼠心肌组织中过氧化物还原酶样蛋白 NOX1 (PKNOX1)/B - 细胞淋巴瘤因子 10 (BCL10)/黏膜相关淋巴瘤转位蛋白 1 (MALT1) 信号通路相关蛋白的表达水平

Figure 3 Expression levels of peroxiredoxin - like protein NOX1 (PKNOX1)/B - cell lymphoma 10 (BCL10)/mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 (MALT1) signaling pathway - related proteins in mouse myocardial tissue

讨 论

VM 作为典型炎性疾病,在临床上常表现为心肌细胞变性、坏死、炎症浸润以及纤维化等症状^[12-13]。针对 VM 的小鼠模型,早期使用 Tel 后可以通过参与氧化应激以及炎症反应过程来达到减轻心肌受损的目的,其主要作用机制为对过氧化物酶体增殖物激活受体 - γ 的激活,此蛋白参与调节能量代谢、细胞凋亡、炎症反应等^[14]。活化半胱氨酸蛋白酶 - 9 和活化半胱氨酸蛋白酶 - 3 介导细胞炎症死亡。细胞焦亡执行蛋白可以作用于线粒体,通透线粒体外膜并激活其相关通路诱导凋亡的发生^[15]。张欣等^[16]发现,

miR - 320 高表达导致 VM 心肌细胞高凋亡率。本研究显示,miR - 320 在 VM 中过表达,且过表达的 miR - 320 可以抑制 Tel 对心肌组织病理损伤及凋亡率的改善作用,推测 Tel 通过下调 miR - 320 的表达,对 VM 小鼠产生保护作用。

病毒感染不仅直接侵害心肌细胞,还削弱了心脏抵抗氧化应激和炎症反应的能力,导致心脏结构与功能的持续恶化。VM 的炎症反应贯穿于病毒感染心脏后的急性期、亚急性期和慢性期,心肌细胞大量表达促炎细胞因子,诱导细胞凋亡,从而造成心肌损伤^[17]。在 VM 的发病过程中,内质网应激是一个重要的病理机制。它能够加重心肌损伤,促进心肌损伤标志物如肌钙蛋白、肌酸激酶同工酶的表达,进而放大炎症反应,诱导心功能损伤^[18]。近年来,关于 miR 在心血管疾病中的调控作用逐渐成为研究热点。其中,miR - 320a 作为心肌损伤的重要调控因子,在心肌氧糖剥夺模型中表现出对炎症和凋亡的调控作用^[19]。本研究发现,Tel 可以抑制氧化应激损伤及炎症因子释放,改善病毒性心肌炎小鼠的心肌病理损伤,说明 Tel 对 VM 小鼠具有显著的心肌保护作用。而上调 miR - 320 表达后,心肌损伤标志物含量再次显著上升,提示 Tel 对 VM 小鼠的心肌保护作用可能是通过抑制 miR - 320 表达从而减轻氧化应激及炎症反应、降低心肌损伤标志物水平来实现的。

在正常情况下,NF - κ B 处于抑制状态,但在 CVB3 感染等炎症刺激下,NF - κ B 会被激活,启动强效炎症反应,并导致靶细胞凋亡^[13]。研究发现,miR - 223 通过靶向 PKNOX1 影响巨噬细胞的极化状态,减轻 VM 小鼠心肌的炎症损伤^[20]。本研究发现,VM 小鼠心肌组织中 PKNOX1、BCL10 和 MALT1 蛋白的相对表达水平均显著上升,提示 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号通路可能与病毒性心肌炎的发病机制有关。Tel 处理后,Tel 组小鼠心肌组织中 PKNOX1、BCL10 和 MALT1 蛋白的相对表达水平均显著下降;而上调 miR - 320 表达则逆转了 Tel 对该信号通路的抑制作用。结合既往研究发现,Tel 通过抑制 miR - 320 表达,抑制 NF - κ B 介导的炎症反应,抑制细胞凋亡,而这一作用可能是通过抑制 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号通路实现的。

本研究提示:Tel 对 VM 小鼠心肌保护作用的机制可能是通过抑制 miR - 320 表达,Tel 能够抑制氧化应激反应及炎症因子的释放,减轻 VM 小鼠心肌损伤,并抑制心肌细胞凋亡,这可能是通过抑制 PKNOX1/BCL10/MALT1 信号通路实现的。

参考文献:

- [1] 陈品良,陈汉裕,陈梓欣,等. 基于网络药理学探讨黄芪治疗病毒性心肌炎的作用机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(23): 3491—3495.
- [2] 孙成,张燕,房红霞,等. 替米沙坦片在中国健康受试者的生物等效性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(2): 249—253.
- [3] 沙蕾,袁果,蒋珂. *miR-217-5p* 在病毒性心肌炎患者血清中的表达变化及其对 CVB3 诱导的心肌细胞损伤影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2024, 19(9): 1036—1041.
- [4] 岳文君,刘勇军,陈京涛. NF- κ B 信号通路在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的作用及其靶向治疗中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(1): 68—75.
- [5] 卢杏,杨军政,张学平,等. 西红花提取物对病毒性心肌炎小鼠的保护作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(10): 1441—1445.
- [6] 胡君,戴丽,陈霞,等. 神经肽 Y/Y1 受体激活 β -catenin 信号通路介导心肌细胞损伤[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2024, 44(3): 313—321.
- [7] 陈家显,陈磊,张远生,等. 芍药苷通过抑制 NLRP3 炎症小体活化减轻病毒性心肌炎小鼠心肌损伤[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(20): 2485—2489.
- [8] 江振涛,魏读辉,马小峰,等. 重楼皂苷 I 对柯萨奇病毒 B3 诱导的病毒性心肌炎小鼠心肌的保护作用及其机制[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(11): 1986—1991.
- [9] 董海芸,韩芳,齐一舟,等. circ_WBSCR17 通过调节 *miR-30a-5p*/JAK1 轴减轻高糖诱导的人肾小球系膜细胞纤维化和炎症反应[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(10): 1756—1762, 1768.
- [10] 王南峰,沈胜梅,张佩生,等. 负载肝细胞生长因子水凝胶对心肌梗死组织区域的作用[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(30): 4802—4808.
- [11] 罗向红,李丽娟,赵婷,等. 石斛碱对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(13): 1466—1470, 1475.
- [12] 郑恒,张聪子,徐金军,等. 黄芪皂苷对病毒性心肌炎大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路和心肌细胞凋亡的影响[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(23): 3521—3526.
- [13] 曹磊,徐昊,赵培勇,等. 黄芪总黄酮对柯萨奇 B3 病毒诱导的病毒性心肌炎小鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路和细胞凋亡的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(15): 2746—2750.
- [14] 袁玲,甘继宏,职宁,等. 替米沙坦对 CVB3 诱导的病毒性心肌炎小鼠的保护作用[J]. 中国细胞生物学报, 2021, 43(5): 956—962.
- [15] 王德琼,周喆,张黎,等. GSDMD 通过激活 caspase-9-caspase-3 凋亡信号通路参与脓毒症相关获得性衰弱[J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(4): 694—704.
- [16] 张欣,李雪琴,朱良宇,等. 病毒性心肌炎血清外泌体来源的 *miR-320* 通过靶向 *Pik3r1* 抑制 AKT/mTOR 通路促进小鼠心肌细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2023, 39(6): 516—525.
- [17] 郭胜,曾显峰,朱玉果. 白术内酯 I 对病毒性心肌炎小鼠 Toll 样受体 4 的调控作用[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(5): 939—944.
- [18] 杨捍卫,郝谦,伍琼. 二氢石蒜碱减轻柯萨奇病毒 B3 诱导的病毒性心肌炎大鼠心肌损伤[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(14): 1653—1658.
- [19] 刘欢,马小峰,王广能,等. *miR-320a* 通过靶向调控 NLRP3 对氧糖剥夺诱导的大鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2023, 39(2): 102—110.
- [20] GOU W, ZHANG Z, YANG C, et al. *miR-223*/Pknol1 axis protects mice from CVB3-induced viral myocarditis by modulating macrophage polarization[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 366(1): 41—48.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2025-05-08)