

磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过 miR-133b/ELAVL1 分子轴缓解小儿病毒性心肌炎的机制研究[△]

蔡昌君*, 黄惠敏, 桂冬梅, 尹杨艳(海南医学院第一附属医院儿科, 海口 570100)

中图分类号 R972 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)03-0313-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.03.014

摘要 目的:探讨磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠缓解小儿病毒性心肌炎的作用机制。方法:以2018年1月至2020年1月就诊于该院的2~6岁病毒性心肌炎患儿120例为研究对象,根据给药情况,分为磷酸肌酸钠组、果糖二磷酸钠组和磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组,每组40例。检测治疗前后三组患儿的心肌损伤标志物[心肌肌钙蛋白T(cTnT)和肌酸激酶同工酶(CK-MB)]、炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素6(IL-6)]及miRNA表达水平。使用柯萨奇病毒B组3型Nancy株(CVB₃)病毒感染人心肌细胞(HCM)构建模型细胞(CVB₃-HCM),采用CCK-8检测细胞活性,以实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白质印迹法检测基因表达,以酶联免疫吸附试验检测细胞因子,以免疫荧光染色确定蛋白表达水平和细胞定位,以双荧光素酶报告基因实验验证基因靶向关系。结果:与治疗前相比,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组患儿体内cTnT、CK-MB、TNF- α 及IL-6水平在治疗后均显著降低,miR-133b表达水平在治疗后显著上调。细胞水平实验发现,将miR-133b mimics转染至CVB₃-HCM,ELAVL1蛋白水平明显降低。在心肌损伤标志物、炎症因子水平及细胞焦亡水平方面,经磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理的CVB₃-HCM细胞上述指标水平明显降低;而经磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理的转染miR-133b inhibitor的CVB₃-HCM细胞和转染pcDNA-ELAVL1的CVB₃-HCM细胞中上述指标水平更低,低于仅经磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理的CVB₃-HCM细胞。结论:磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠可有效缓解小儿病毒性心肌炎,其作用机制可能是通过调控miR-133b/ELAVL1分子轴,抑制病毒导致的心肌细胞损伤、炎症反应及细胞焦亡。

关键词 磷酸肌酸钠; 果糖二磷酸钠; 小儿; 病毒性心肌炎; miR-133b; ELAVL1

Mechanism of Creatine Phosphate Sodium Combined with Fructose Diphosphate in Alleviating Pediatric Viral Myocarditis Through miR-133b/ELAVL1 Molecular Axis[△]

CAI Changjun, HUANG Huimin, GUI Dongmei, YIN Yangyan (Dept. of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the mechanism of creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate in alleviating pediatric viral myocarditis. **METHODS:** Totally 120 children from 2 to 6 years old with viral myocarditis admitted into this hospital from Jan. 2018 to Jan. 2020 were divided into the creatine phosphate sodium group, fructose diphosphate group and creatine phosphate sodium+fructose diphosphate group according to different dosage regimens, with 40 cases in each group. The markers of myocardial injury [cardiac troponin T (cTnT) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB)], inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6)] and miRNA expression of three groups were detected before and after treatment. Human cardiac myocytes (HCM) were disposed with coxsackie B₃ Nancy strain (CVB₃) virus to construct model cells (CVB₃-HCM), CCK-8 was used to detect cellular viability, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blotting were performed to determine the gene expressions, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect cytokines secretion, immunofluorescent staining was used to determine protein expression and cellular localization, and dual-luciferase reporter gene assay was performed to validate gene targeting relationship. **RESULTS:** Compared with before treatment, the cTnT, CK-MB, TNF- α and IL-6 levels of children in the creatine phosphate sodium+fructose diphosphate group decreased significantly after treatment, while the miR-133b levels increased significantly. Cell level experiment revealed that transfection of miR-133b mimics into CVB₃-HCM can significantly decrease ELAVL1 protein levels. In terms of myocardial injury markers, inflammatory factors and pyroptosis, the

[△] 基金项目:海南省卫生计生委科研基金项目(No. 18A200064)

* 主治医师。研究方向:儿科(呼吸循环)。E-mail:demeterpow@163.com

levels of the above indicators were significantly lower in CVB₃-HCM cells treated with creatine phosphate sodium+fructose diphosphate, while the levels of the above indicators were even lower in CVB₃-HCM cells transfected with miR-133b inhibitor and CVB₃-HCM cells transfected with pcDNA-ELAVL1 treated with creatine phosphate sodium+fructose diphosphate, which were lower than those of CVB₃-HCM cells treated with creatine phosphate sodium+fructose diphosphate. CONCLUSIONS: Creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate can effectively alleviate pediatric viral myocarditis, and its mechanism of action may be through the regulation of miR-133b/ELAVL1 molecular axis to inhibit virus-induced cardiomyocyte injury, inflammatory response and scorching.

KEYWORDS Creatine phosphate sodium; Fructose diphosphate; Children; Viral myocarditis; miR-133b; ELAVL1

病毒性心肌炎是一种弥漫性或局限性的心肌病变,通常由嗜心肌病毒感染所致^[1]。由于小儿免疫系统尚在发育,抵抗能力较差,因此极易被病毒感染,罹患病毒性心肌炎^[2]。经过长期临床实践发现,磷酸肌酸钠和果糖二磷酸钠用于小儿病毒性心肌炎的治疗,可发挥良好的疗效^[3-4]。也有临床研究结果证实,磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠对小儿病毒性心肌炎的疗效更佳^[5]。但鲜有研究探讨上述联合用药的分子机制。微RNA(miRNA)为广泛存在于机体中的非编码RNA,与人类的多种疾病密切相关^[6]。作为疾病标志物,异常上调或下调的特定miRNA可能参与调控疾病的发生及发展过程,其中也不乏针对病毒性心肌炎的相关报道^[7]。也有研究结果发现,调控机体中的miRNA是药物发挥作用的方式之一^[8]。基于上述研究基础,柯萨奇病毒B组(CVB)作为引发病毒性心肌炎的病毒之一,已被广泛用于构建病毒性心肌炎模型^[9]。心肌肌钙蛋白T(cTnT)为心肌肌肉收缩的调节蛋白,其浓度会在心肌受到损伤后显著升高;肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平明显升高时,提示心肌损伤;此外,心肌炎是以炎症性病变为主要表现的疾病,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)为涉及系统性炎症的细胞因子,白细胞介素6(IL-6)为机体抗感染免疫反应中起重要作用的淋巴因子,两者的水平也与心肌炎的病程密切相关。因此,本研究探讨了磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠对小儿病毒性心肌炎心肌损伤标志物(cTnT和CK-MB)、炎症因子(TNF- α 和IL-6)水平的影响,同时筛选出受磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠影响显著的miRNA,并进一步通过柯萨奇病毒B组3型Nancy株(CVB₃)感染心肌细胞,构建病毒性心肌炎细胞模型,从细胞水平探讨磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠发挥治疗效果的分子机制,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料来源

依据《病毒性心肌炎诊断标准》,将2018年1月至2020年1月就诊于我院的符合诊断标准的2~6周岁病毒性心肌炎患儿120例作为研究对象,主要临床表现为腹泻、发热、心悸和气促。诊断标准为血清柯萨奇病毒阳性,并符合以下辅助改变之一:(1)心功能不全;(2)心脏扩大,室壁运动弥漫性降低;(3)心电图检查显示,以R波为主的2个以上主要导联ST-T段改变,低电压(新生儿除外)出现异常Q波。纳入标准:年龄2~6周岁;无先天性心脏病或心脏畸形。排除标准:伴有严重器官功能障碍者;合并免疫系统疾病、代谢系统疾病者;其他类型心肌炎者。本研究获得我院伦理委员会审批通过(审批号:20171215076)。根据给药情况,将患儿分为磷酸

肌酸钠组、果糖二磷酸钠组和磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组,每组40例。磷酸肌酸钠组患儿平均年龄(11.23±2.73)岁;男性22例,女性18例。果糖二磷酸钠组患儿平均年龄(11.43±3.32)岁;男性27例,女性13例。磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组患儿平均年龄(10.82±4.23)岁;男性16例,女性24例。三组患儿年龄、性别等资料相似,具备可比性。

1.2 治疗方法

(1)磷酸肌酸钠组患儿使用注射用磷酸肌酸钠[规格:0.5g(以C₄H₈N₃O₅PNa₂计)],1日1g,静脉注射,分2次给药。(2)果糖二磷酸钠组患儿口服果糖二磷酸钠片[规格:0.25g(以C₆H₁₁Na₃O₁₂P₂计)],1日200mg/kg,分2次给药。(3)磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组患儿使用注射用磷酸肌酸钠静脉注射,并口服果糖二磷酸钠片,用法与用量同磷酸肌酸钠组、果糖二磷酸钠组。三组患儿均连续治疗3周。

1.3 观察指标

分别取治疗前后患儿清晨空腹状态静脉血,已酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书为指导处理患者血液样本,检测cTnT、CK-MB、TNF- α 和IL-6水平,以及miRNA表达水平。

1.4 细胞实验方法

1.4.1 材料:(1)细胞。人心肌细胞(HCM,上海中乔新舟生物科技有限公司,货号为6200,品牌为Sciencell);CVB₃病毒由中国医科院生物技术研究所提供。(2)仪器。ABI 7500型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(北京安泰格贸易有限公司);GIS-500型凝胶成像分析仪(杭州谷峰科学仪器有限公司);HBS-1096A型酶标分析仪(上海研卉生物科技有限公司)。(3)药品与试剂。注射用磷酸肌酸钠(北京朋来制药有限公司,批准文号为国药准字H20068079);果糖二磷酸钠片(上海信谊天平药业有限公司,批准文号为国药准字H19991128)。miR-133b inhibitor、miR-133b mimics及pcDNA-ELAVL1由广州市锐博生物科技有限公司设计并合成。Invitrogen™ Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent(货号:11668-019)购自上海伟进生物科技有限公司。TRIzol法总RNA提取试剂盒(货号:CD-13433-ML),逆转录试剂盒(货号:CD-102539GM),总蛋白提取试剂盒(货号:CD-13559-ML),BCA蛋白法含量测试盒(货号:CDY-2798X-SJH),人cTnT ELISA试剂盒(货号:CD-101420-ELISA),人CK-MB ELISA试剂盒(货号:CD-101354-ELISA),人TNF- α ELISA试剂盒(货号:CD-102490-ELA),人IL-6 ELISA试剂盒(货号:CD-102483-ELA),CCK-8细胞活力检测试剂盒(货号:CDJ-1626C-SJH),均购自武汉纯度生物科技有限公司。anti-ELAVL1(货号:XGK97147),anti-GAPDH

(货号: XGK104170), 二抗(货号: XG-X10933), ECL 化学发光试剂盒(货号: XG-X10548), 均购自上海西格生物科技有限公司。双荧光素酶活性检测试剂盒(货号: C-8304) 购自上海彩佑实业有限公司。

1.4.2 细胞培养、模型构建及转染: 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中培养 HCM, 即为 HCM 组。待 HCM 出现搏动后以 100 Tcd₅₀ 作为实验接种浓度将 CVB₃ 作用于 HCM, 构建病毒性心肌炎模型细胞 (CVB₃-HCM), 为 CVB₃ 组。待模型构建成功后, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂将 miR-133b inhibitor, miR-133b mimics 和 pcDNA-ELAVL1 按实验分组需求分别转染至 CVB₃-HCM, 即为 miR-133b inhibitor 组、miR-133b mimics 组和 OE-ELAVL1 组, 另设置阴性对照组 (NC 组); 48 h 后验证转染效率, 转染成功即可用于后续实验。另外, 采用磷酸肌酸钠和果糖二磷酸钠联合处理上述各组细胞, 根据各组转染的载体不同, 分为磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理无载体转染 CVB₃-HCM 细胞 (磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组), 磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理 OE-ELAVL1 组 (磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1 组)、磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理 miR-133b inhibitor 组 (磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+miR-133b inhibitor 组), 磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠处理同时转染 miR-133b mimic 和 pcDNA-ELAVL1 的 CVB₃-HCM 细胞 (磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+miR-133b mimic+OE-ELAVL1 组)。

1.4.3 CCK-8 检测细胞毒性: 用不同浓度磷酸肌酸钠或果糖二磷酸钠处理 CVB₃-HCM, 通过细胞存活率确定磷酸肌酸钠和果糖二磷酸钠的细胞毒性。采用 CCK-8 检测细胞毒性, 将浓度为 5×10³ 个/mL 的 CVB₃-HCM 接种于 96 孔板, 于 37 ℃、5%CO₂ 下稳定 24 h 后, 加入不同浓度磷酸肌酸钠 (1、5、10、20 和 30 mmol/L) 或果糖二磷酸钠 (1、3、5、10 和 20 mg/mL) 处理细胞 24 h, 再加入 CCK-8 孵育后于 450 nm 处测吸光度。

1.4.4 实时荧光定量反转录 PCR (RT-qPCR) 检测 miR-133b 水平: 细胞中总 RNA 用 Trizol 法 RNA 提取试剂盒提取后, 再用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA, 而后进行扩增, 条件为 95 ℃、10 min, 95 ℃、30 s, 60 ℃、30 s, 45 个循环。引物序列如下, 内参 U6 上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACAC-3', 下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; miR-133b 上游引物为 5'-AAGAAAGATGCCCCCTGCTC-3', 下游引物为 5'-GTAGCTGGTGAAGGGGACC-3'。采用 2^{-ΔΔCt} 法以 U6 为内参对 miR-133b 的相对表达量进行计算。

1.4.5 蛋白质印迹法检测 ELAVL1 的表达: 细胞中的总蛋白

用蛋白提取试剂盒提取后经 BCA 蛋白法含量测试盒检测浓度, 然后将等量提取出的蛋白上样后用 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 结束后转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后加入 1:1 000 一抗 anti-ELAVL1 后在 4 ℃ 下孵育过夜。次日, 去除一抗, 加入 1:1 000 二抗孵育 1 h。孵育结束后, 洗膜, 加 ECL 发光试剂显影。

1.4.6 ELISA 检测心肌损伤标志物及炎症因子水平: 根据 ELISA, 处理人 CVB₃-HCM 细胞, 检测细胞心肌损伤标志物 (cTnT 和 CK-MB)、炎症因子 (TNF-α 和 IL-6) 水平。

1.4.7 免疫荧光检测细胞焦亡: 在室温 (25 ℃) 下用 4% 多聚甲醛缓冲液处理各实验组细胞 20 min 后加入 1% 的 BSA 和 0.1% 的 Triton-X 反应 1 h, 然后在 4 ℃ 下用 NLRP3 及 caspase-1 抗体孵育过夜。次日洗脱一抗后加二抗处理 1 h, 并用 DAPI 对细胞核进行染色。染色结束后于荧光显微镜下拍照。

1.4.8 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-133b 和 ELAVL1 的靶向关系: 根据双荧光素酶活性检测试剂盒说明书, 将 miR-133b 和 ELAVL1 结合片段的序列扩增后插入荧光素酶载体中构建野生型 ELAVL1 载体 (ELAVL1-WT)、结合位点序列突变后插入荧光素酶载体中构建突变型 ELAVL1 载体 (ELAVL1-MUT), 而后将 ELAVL1-WT 或 ELAVL1-MUT 与 miR-133b mimics 分别转染至 293T 细胞中在 37 ℃、5%CO₂ 下培养 48 h 后检测荧光素酶活性。

1.5 统计学方法

本研究数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗小儿心肌炎的临床研究

与治疗前相比, 治疗后磷酸肌酸钠组、果糖二磷酸钠组和磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组患儿体内心肌损伤标志物 (cTnT、CK-MB) 和炎症因子 (TNF-α、IL-6) 水平显著降低, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05), 见表 1。治疗前后患儿静脉血样本中异常表达的 miRNA 见图 1, 结果显示, miR-133b 表达水平在每组治疗后均显著上调。

2.2 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过 miR-133b 对 CVB3-HCM 的影响

采用 RT-qPCR 检测心肌细胞中 miR-133b 水平发现, 与 HCM 组 miR-133b 水平 (1.00±0.07) 相比, CVB₃ 组 miR-133b

表 1 三组患儿治疗前后心肌损伤标志物变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of changes of markers of myocardial injury among three groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s$)								
组别	cTnT/(ng/mL)				CK-MB/(U/L)			
	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
磷酸肌酸钠组 (<i>n</i> =40)	0.56±0.08	0.33±0.04	4.33	0.012 312	32.08±3.93	19.85±2.32	4.64	0.009 704
果糖二磷酸钠组 (<i>n</i> =40)	0.57±0.09	0.37±0.06	3.18	0.033 535	32.94±2.75	19.74±2.14	6.56	0.002 788
磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 (<i>n</i> =40)	0.55±0.08	0.09±0.04	8.88	0.000 888	32.34±1.77	10.42±1.79	15.07	0.000 113
组别	TNF-α/(pg/mL)				IL-6/(pg/mL)			
	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>	治疗前	治疗后	<i>t</i>	<i>P</i>
磷酸肌酸钠组 (<i>n</i> =40)	240.00±5.00	105.44±11.74	18.26	0.000 053	330.24±4.55	142.86±18.62	16.93	0.000 071
果糖二磷酸钠组 (<i>n</i> =40)	223.44±17.46	96.71±9.09	11.15	0.000 368	335.42±16.48	129.17±4.28	20.98	0.000 031
磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 (<i>n</i> =40)	216.91±13.14	15.73±3.17	25.77	0.000 013	325.10±31.57	74.04±8.67	13.28	0.000 186

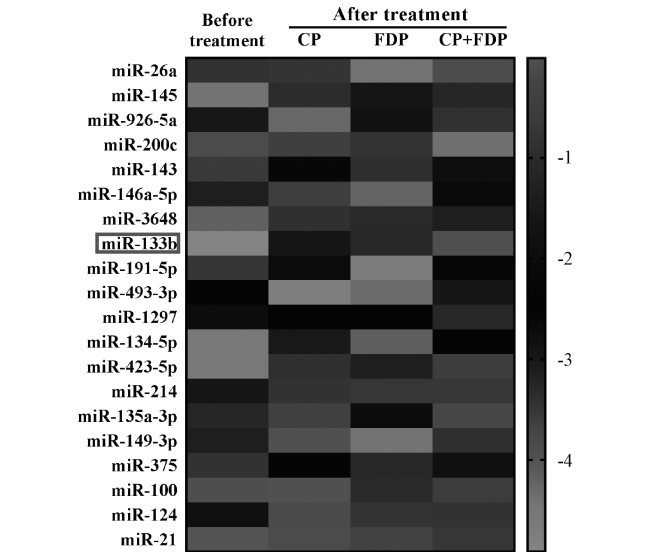
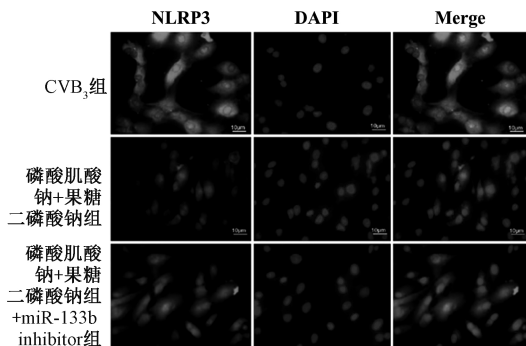


图1 病毒性心肌炎患儿经磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗前后 miRNA 表达谱

Fig 1 Expression profile of miRNA in children with viral myocarditis before and after the treatment of creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate

水平(0.50 ± 0.09)显著降低,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 CVB₃-HCM 中 miR-133b 水平(0.94 ± 0.05)显著上调,三组的差异有统计学意义($F = 41.66, P = 0.0003$)。miR-133b inhibitor



转染至 CVB₃-HCM 后的 RT-qPCR 检测结果显示,与 NC 组 miR-133b 水平(1.02 ± 0.04)相比,miR-133b inhibitor 组 miR-133b 水平(0.03 ± 0.06)显著降低,差异有统计学意义($t = 17.53, P = 0.000062$)。检测 cTnT、CK-MB、TNF- α 及 IL-6 水平发现,与 CVB₃ 组相比,心肌损伤标志物及炎症因子在磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 CVB₃-HCM 中显著降低,但磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+miR-133b inhibitor 组 CVB₃-HCM 中与 CVB₃ 组相近,见表 2。免疫荧光染色结果显示,与 CVB₃ 组相比,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 CVB₃-HCM 中 NLRP3 及 caspase-1 显著被抑制,miR-133b inhibitor 组的 CVB₃-HCM 细胞焦亡标志物水平无显著变化,见图 2。

表 2 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠处理对心肌细胞损伤标志物及炎症因子水平的影响

Tab 2 Effect of creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate on markers of myocardial injury and inflammatory factors

项目	CVB ₃ 组	磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组	磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+miR-133b inhibitor 组	F	P
cTnT/(ng/mL)	16.06 $\pm$ 0.70	1.97 $\pm$ 0.40	13.80 $\pm$ 1.44	188.90	0.000032
CK-MB/(U/L)	51.32 $\pm$ 2.00	7.04 $\pm$ 2.28	45.54 $\pm$ 1.29	479.70	0.000045
TNF- α /(pg/mL)	57.82 $\pm$ 1.60	8.16 $\pm$ 2.52	56.08 $\pm$ 0.89	737.50	0.000071
IL-6/(pg/mL)	165.96 $\pm$ 7.70	46.91 $\pm$ 11.67	150.59 $\pm$ 20.84	59.90	0.000100

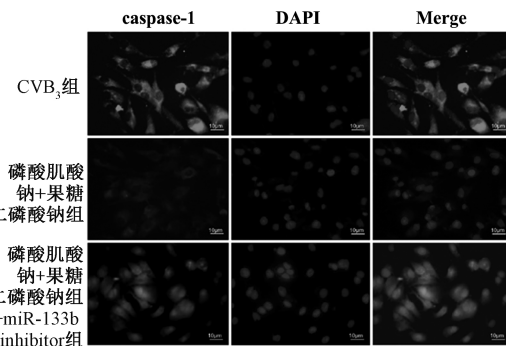


图2 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过 miR-133b 对 CVB3-HCM 焦亡的影响

Fig 2 Effect of creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate on pyroptosis of CVB3-HCM through miR-133b

2.3 miR-133b 与 ELAVL1 的靶向关系

ELAVL1 (ELAV-like protein 1) 与 miR-133b 的靶向结合位点见图 3(A)。双荧光素酶报告基因实验结果显示,与 NC 组相比,miR-133b mimics 组 ELAVL1 野生型载体(ELAVL1-WT)的荧光素酶活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);但两组 ELAVL1 突变型载体(ELAVL1-MUT)的荧光素酶活性比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。在 CVB₃-HCM 中转染 miR-133b mimics 后的 RT-qPCR 检测结果显示,与 NC 组 miR-133b 水平(1.01 ± 0.04)相比,miR-133b mimics 组 CVB₃-HCM 中 miR-133b 水平(2.28 ± 0.22)显著升高,差异有统计学意义($t = 9.86, P = 0.00006$)。蛋白质印迹法检测结果发现,miR-133b mimics 组 ELAVL1 蛋白水平显著低于 NC 组,见图 3(B)。

2.4 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过 miR-133b/ELAVL1 分子轴对 CVB₃-HCM 细胞损伤、炎症反应及细胞焦亡的影响

蛋白质印迹法检测 ELAVL1 蛋白水平结果显示,与 CVB₃

表 3 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-133b 与 ELAVL1 的靶向关系

Tab 3 Dual-luciferase reporter gene assay validates the targeting relationship between miR-133b and ELAVL1

项目	NC 组	miR-133b mimics 组	t	P
ELAVL1-WT	1.04 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.06	12.70	0.006132
ELAVL1-MUT	1.01 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.06	0.61	0.603504

组相比,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 CVB₃-HCM 中 ELAVL1 蛋白水平显著降低,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1 组中 ELAVL1 蛋白水平显著高于磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1+miR-133b mimics 组 ELAVL1 蛋白水平显著低于磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1 组,上述差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 4(A)。各组心肌损伤标志物、炎症因子及细胞焦亡结果显示,磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组 CVB₃-HCM 心肌细胞中 cTnT、

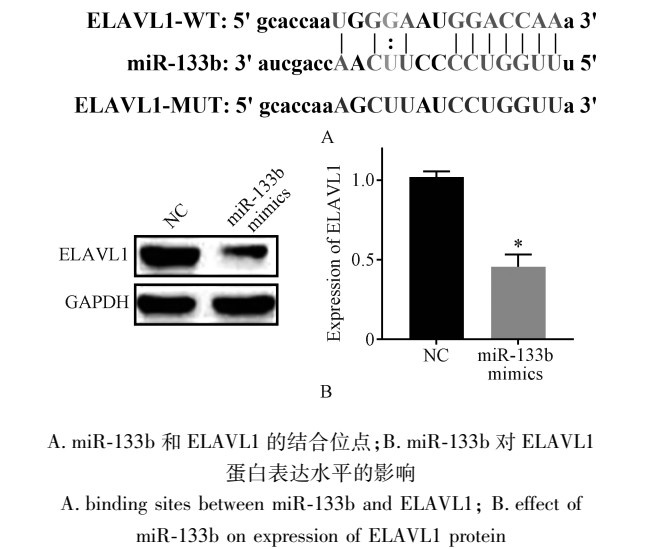


图 3 miR-133b 与 ELAVL1 的靶向关系

Fig 3 Targeting relationship between miR-133b and ELAVL1

表 4 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过 miR-133b/ELAVL1 分子轴对 CVB₃-HCM 细胞损伤及炎症反应的影响

Tab 4 Effect of creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate on cell injury and inflammatory response of CVB₃-HCM through miR-133b/ELAV

项目	CVB ₃ 组	磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组	磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1 组	磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1+miR-133b mimics 组	F	P
cTnT (ng/mL)	14.20±1.23	3.51±1.59	14.61±0.12	3.46±0.63	0.98	0.000 072
CK-MB (U/L)	49.47±2.52	7.72±2.27	48.81±2.07	8.35±1.03	401.60	0.000 023
TNF-α (pg/mL)	57.40±1.71	6.47±1.43	55.19±1.01	7.29±1.83	0.17	0.000 094
IL-6 (pg/mL)	170.54±6.58	47.09±3.66	152.55±16.93	52.87±2.79	143.90	0.000 051

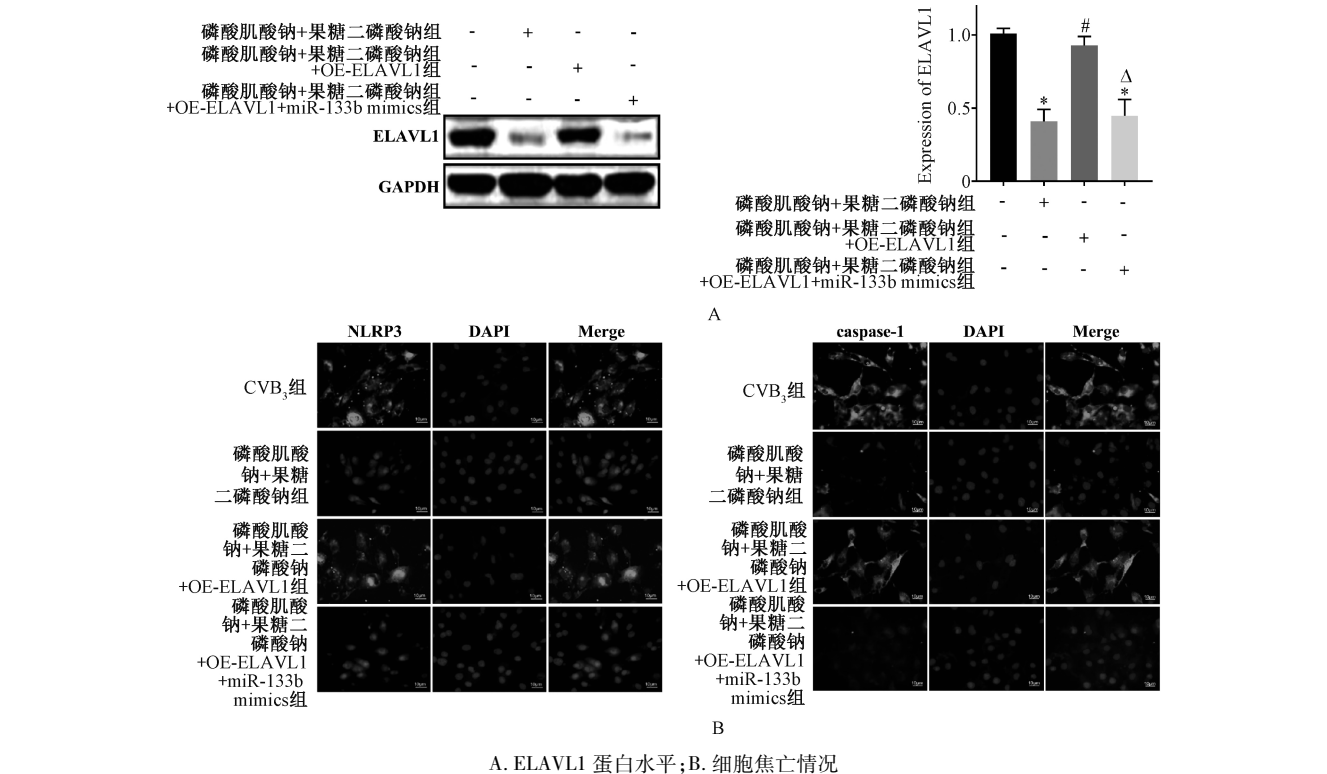


图 4 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过 miR-133b/ELAVL1 分子轴对 CVB₃-HCM 焦亡的影响

Fig 4 Effect of creatine phosphate sodium combined with fructose diphosphate on pyroptosis of CVB₃-HCM through miR-133b/ELAVL1 molecular axis

CK-MB、TNF-α 和 IL-6 水平, NLRP3、caspase-1 表达水平显著低于 CVB₃ 组; 磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1 组 cTnT、CK-MB、TNF-α 和 IL-6 水平, NLRP3、caspase-1 表达水平显著高于磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠组; 而磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1+miR-133b mimics 组 CVB₃-HCM 细胞损伤、炎症因子及细胞焦亡标志物水平均显著低于磷酸肌酸钠+果糖二磷酸钠+OE-ELAVL1 组, 上述差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4、图 4(B)。

3 讨论

病毒性心肌炎为儿科常见的后天性心脏疾病, 具有扩张型心肌病、预后差等多种不良影响^[10]。在小儿病毒性心肌炎的治疗中, 磷酸肌酸钠、果糖二磷酸钠及两者联合应用成为临床上较为常见的有效治疗方法^[11-12]。尤其是磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠的疗效得到了广泛的认可^[13-14]。但对联合用药作用机制的研究缺失成为该治疗方案进一步推广中亟待解决的问题。本研究通过临床治疗肯定了磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠的疗效, 筛选出有可能参与药效发挥的 miRNA, 并在细胞

水平对此机制加以验证。

本研究在临床水平和细胞水平的结果均证实,miR-133b在病毒性心肌炎患儿血液样本及 CVB₃ 感染的心肌细胞中表达显著下调,而经过磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗后 miR-133b 表达水平显著上调;后续细胞水平的实验结果也表明,敲降 CVB₃ 感染的心肌细胞中 miR-133b 后,磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠可逆转 CVB₃ 所致细胞损伤、炎症反应及细胞焦亡的抑制作用。该结果不仅提示异常低表达的 miR-133b 有成为小儿病毒性心肌炎标志物的潜在可能性,也表明磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠对小儿病毒性心肌炎的治疗作用可能是通过上调 miR-133b 表达,进而抑制病毒对心肌细胞的损伤。有研究结果提出,过表达 miR-133b 可减弱病毒对心肌炎患儿心肌细胞的损伤^[15];过表达 miR-133b 能够有效降低细胞中 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平,缓解炎症反应^[16];细胞焦亡关键基因 NLRP3 是 miR-133b 的潜在下游靶基因^[17]。上述研究也从多个角度进一步支撑了本研究结果。

miRNA 通过调节下游靶基因参与细胞的生理过程已得到广泛证实,通过 StarBase 预测发现 ELAVL1 是 miR-133b 的靶基因之一,进一步采用双荧光素酶报告基因实验及蛋白质印迹法检测发现,miR-133b 靶向负调控 CVB₃-HCM 中 ELAVL1 蛋白。本研究中,miR-133b 的靶基因 ELAVL1 被过表达后,磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠对 CVB₃ 感染心肌细胞的治疗作用将被显著削弱,可见,ELAVL1 在磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗小儿病毒性心肌炎中意义重大。ELAVL1 是一种广泛表达的 RNA 结合蛋白,能够作为 RNA 调节因子,通过多种转录后机制介导多种蛋白的表达^[18]。有研究结果表明,人肺上皮细胞中 ELAVL1 表达被抑制后,TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 IL-18 等多种炎症因子的释放也随之减少;此外,与细胞焦亡相关的 NLRP3、Gasdermin D 及 caspase-1 蛋白水平也显著降低^[19]。针对人心室肌细胞的研究结果也表明,敲除 ELAVL1 基因可通过抑制 NLRP3、caspase-1 和 IL-1 β ,缓解高糖诱导的细胞焦亡^[20]。以上结果与本研究一致,即过表达 ELAVL1 能够促进 CVB₃-HCM 细胞焦亡和炎症反应。

综上所述,磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠通过上调病毒性心肌炎心肌细胞中 miR-133b 的表达,抑制 ELAVL1 蛋白,从而缓解 CVB₃ 对心肌细胞的损伤,抑制炎症反应和细胞焦亡。本研究结果可为磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗小儿病毒性心肌炎提供分子机制方面的支持。

参考文献

[1] HÉKIMIAN G, COMBES A. Myocarditis[J]. Rev Med Interne, 2017, 38(8): 531-538.

[2] DI FILIPPO S. Improving outcomes of acute myocarditis in children[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2016, 14(1): 117-125.

[3] NIU L, AN X J, TIAN J, et al. 124 cases of clinical analysis of children with viral myocarditis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(15): 2856-2859.

[4] 王新. 果糖二磷酸钠在病毒性心肌炎患儿治疗中的应用价值分析[J]. 健康忠告, 2020(2): 128.

[5] 陈锋, 李直刚, 景英. 磷酸肌酸与果糖二磷酸钠对小儿心肌炎的应用价值分析[J]. 医学美学美容, 2019, 28(2): 79-80.

[6] CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C L, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(5): 1836-1852.

[7] WANG Y, WEI C X, SHAO L Q, et al. MiRNA signaling in viral myocarditis novel and unique pathological features[J]. Acta Cardiol Sin, 2018, 34(1): 77-86.

[8] LI M P, HU Y D, HU X L, et al. MiRNAs and miRNA polymorphisms modify drug response[J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(11): 1096.

[9] ZHAI X, BAI B, YU B H, et al. Cocksackievirus B3 induces autophagic response in cardiac myocytes *in vivo* [J]. Biochemistry (Mosc), 2015, 80(8): 1001-1009.

[10] ROBINSON J, HARTLING L, VANDERMEER B, et al. Intravenous immunoglobulin for presumed viral myocarditis in children and adults [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2020, 8(8): CD004370.

[11] 马常建, 李雪峰, 曹怀明. 小儿病毒性心肌炎应用果糖二磷酸钠与磷酸肌酸钠治疗对患儿免疫功能及治疗效果的影响[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(3): 89.

[12] 郑祖芬, 刘卫国. 磷酸肌酸与果糖二磷酸钠治疗小儿心肌炎的疗效及对血清心肌肌钙蛋白 I 的影响[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(11): 12-14.

[13] 解云博. 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗病毒性心肌炎的疗效观察[J]. 中国保健营养, 2019, 29(25): 77-78.

[14] 王蕴懋, 姚华均. 磷酸肌酸钠联合果糖二磷酸钠治疗病毒性心肌炎的疗效观察[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(53): 67.

[15] 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.

[16] PEI G Y, XU L G, HUANG W H, et al. The protective role of microRNA-133b in restricting hippocampal neurons apoptosis and inflammatory injury in rats with depression by suppressing CTGF[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 106076.

[17] XIAO L F, JIANG L, HU Q, et al. MicroRNA-133b ameliorates allergic inflammation and symptom in murine model of allergic rhinitis by targeting Nlrp3[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(3): 901-912.

[18] LIU R P, WU K Y, LI Y J, et al. Human antigen R: a potential therapeutic target for liver diseases[J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104684.

[19] 洪蕾, 查颖洁, 乔世刚, 等. 白藜芦醇对脂多糖诱导的人肺上皮细胞焦亡的保护机制研究[J]. 抗感染药学, 2020, 17(2): 160-164.

[20] JEYABAL P, THANDAVARAYAN R A, JOLADARASHI D, et al. MicroRNA-9 inhibits hyperglycemia-induced pyroptosis in human ventricular cardiomyocytes by targeting ELAVL1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 471(4): 423-429.

(收稿日期:2021-08-04 修回日期:2022-01-18)