

УДК 612.127

ВИРУС КОКСАКИ ТИПА В3 ПРОВОЦИРУЕТ МИОКАРДИТ У МЫШЕЙ ПУТЕМ СТИМУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ Toll-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4

© 2015 Жао Жао¹, Тянь-Жи Кей², Ян Ли¹, Вен-Джун Лиу¹,
Мен-Ли Ченг¹, Ю-Кьянг Джи^{1*}

¹ First hospital of Xi'an, Department of Cardiovascular Medicine, China,
710002 Xi'an; fax: +86(29)876-30855, E-mail: jiyuqiangdr@yeah.net

² Affiliated Hospital of Xi'an Medical University,
Department of Cardiovascular Medicine, China, 710077 Xi'an

Поступила в редакцию 29.01.14

После исправления 16.01.14

Изучены развитие миокардита, провоцируемого вирусом Коксаки типа 3 (CVB3), и механизм защитного действия малых интерферирующих РНК (siРНК) на пораженный вирусом организм. Работа была выполнена на 120 мышах, 30-ти из которых был внутрибрюшинно введен CVB3 (их затем использовали в качестве модельных животных с вирусным миокардитом). Фиксировали выживаемость зараженных вирусом мышей (мышь «MOD») и отслеживали нанесенные вирусом повреждения с помощью гистопатологического исследования срезов миокарда, окрашенных гематоксилином и эозином (HE). Транскрипционную и трансляционную экспрессию гена *TLR4* в тканях миокарда изучали методом ПЦР в режиме реального времени и методом иммуноблоттинга соответственно. Также было проведено специфическое блокирование гена *TLR4* у мышей «MOD» путем обработки животных малой интерферирующей РНК и изучены последствия этого блокирования. Полученные результаты свидетельствовали о том, что при прогрессии вирусного миокардита у мышей «MOD» уровни *TLR4* мРНК и белка *TLR4* в миокарде значительно увеличивались и оставались высокими в дальнейшем. Помимо этого, установлено, что активность некоторых ферментов миокарда (СК, СК-МВ, LDH и АСТ) также была увеличена в тканях сердца зараженных вирусом мышей. Отмечено, что при подавлении экспрессии гена *TLR4* продукция белка *TLR4* у мышей «MOD» существенно снижалась и степень тяжести миокардита уменьшалась. Таким образом, CVB3 может провоцировать вирусный миокардит путем стимуляции экспрессии Toll-подобного рецептора 4. Степень тяжести миокардита может быть снижена путем подавления экспрессии гена *TLR4*; это является подходящей основой для разработки метода лечения этого вирусного заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирусный миокардит, вирус Коксаки типа В3, Toll-подобный рецептор 4, ферменты миокарда.

С клинической точки зрения вирусный миокардит является главной причиной повреждения миокарда у животных в раннем возрасте и часто приводит к развитию хронического миокардита, провоцирует кардиомиопатию и застойную сердечную недостаточность [1, 2]. Известно, что вирус Коксаки типа В3 (CVB3) выступает и в качестве наиболее распространенного агента, вызывающего миокардит у человека [3]. Проведенные недавно исследования показали,

что еще очень мало известно об особенностях патогенеза вирусного миокардита, поэтому пока нет эффективных лекарств и методов лечения этого заболевания.

Вирус CVB3 может вызывать серьезные воспаления, приводящие к повреждению клеток сердечной мышцы [4, 5]. Предполагается, что воспаление может быть связано с активацией сигнального пути, регулируемого Toll-подобным рецептором 4/ядерным фактором κВ (TLR4/NF-κВ-зависимый сигнальный путь) [6, 7]. Ключевые факторы этого регуляторного пути, и в особенности, *TLR4*, малоизучены и представлены, в основном, в работах Фрисанчо-Кисс и соавт. [8, 9]. Описаны также некоторые методы терапевтического лечения, связанные с воздействием на этот сигнальный путь [10]. Зоу и соавт. [11] сообщили, что *TLR4/NF-κВ*-зависи-

Принятые сокращения: CVB3 – коксаки-вирус В3; siРНК – малые интерферирующие РНК; *TLR4* – Toll-подобный рецептор 4; *TLR4/NF-κВ* – Toll-подобный рецептор 4/ядерный фактор κВ-зависимый сигнальный путь; АСТ – аспартаттрансаминаза; СК – креатинкиназа; СК-МВ – изозим креатинкиназы, присутствующий в миокарде; LDH – лактатдегидрогеназа.

* Адресат для корреспонденции.

мый путь принимает участие в регуляции врожденного иммунного ответа при миокардите. Однако специфический механизм развития TLR4/NF-κB-зависимого вирусного миокардита по-прежнему не известен. Таким образом, поиск препаратов, специфически воздействующих на TLR4/NF-κB-зависимый сигнальный путь, является ключом к разработке способов лечения миокардита.

В представленной работе CVB3 был использован в модельных условиях для индукции миокардита у мышей (мыши «MOD»). Для выяснения механизма развития вирусного миокардита мы изучали экспрессию фактора TLR4 с использованием модели CVB3-инфицированных мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные и вирусы. Мыши линии BALB/C 6-недельного возраста весом 20 г были приобретены в питомнике Джаотонг университета в Сиане. Все животные были свободны от патогенов. Вирус Коксаки линии Nancy, поддерживаемый пассированием на клетках HeLa, был получен из Медицинского колледжа этого же университета. Значение TCID₅₀ вируса (доза 50%-ного инфицирования клеточной культуры) было предварительно определено стандартным методом на монослой клеток HeLa. Работу с животными осуществляли согласно правилам о работе с лабораторными животными, утвержденными Министерством здравоохранения Китая от 1998 г. Исследования были одобрены комитетом по этике первой клиники Сианя.

Подразделение животных на группы и их обработка. Предназначенные для исследования животные (120 шт.) были подразделены на 4 группы (по 30 шт.): 1) контрольная группа («CN»); 2) группа животных, обработанных средой Дульбекко («DMEM»); 3) мыши, инфицированные CVB3 («MOD»); 4) мыши MOD, обработанные TLR4-специфичной siРНК («TLR4 silence»), или обработанные контрольной плазмидой («RNA silence control»). Мышам «MOD» в день «0» вводили внутривенно CVB3 в количестве 1×10^2 TCID₅₀. Группе «DMEM» вводили аналогичный объем среды Дульбекко. Контрольную группу «CN» ничем не обрабатывали. Животным четвертой группы в день «0» вводили внутривенно 1×10^2 TCID₅₀ вируса CVB3 и затем также внутривенно 0,2 мкг вектора экспрессии pRNAT-U6.1/Neo siRNA («TLR4 silence»), либо — 0,2 мкг контрольной плазмиды («RNA silence control»). Эти введения (трансфекция) также осуществляли в день «0» при одновременной инъ-

екции 0,2 мкл реагента для трансфекции (Lipofectamine 2000, «Invitrogen», США). (Введение плазмид проводили не в те же места, в которые был введен вирус.)

Гистопатологические исследования и оценка степени тяжести миокардита. На 7-й, 14-й и 21-й день после инфицирования вирусом сердца животных извлекали, делали срезы ткани и окрашивали гематоксилином и эозином (HE). Окрашенные срезы анализировали «слепым» методом двумя независимыми экспертами и степень тяжести миокардита определяли как описано ранее [12]. Тяжесть миокардита оценивали по шкале от 0 до 4 — отсутствие воспаления или повреждения; 1 — от одного до пяти различных одноядерных очагов воспаления, поразившего ≤5% области поперечного среза сердечной ткани; 2 — более пяти различных одноядерных очагов воспаления, затронувшего от 5 до 20% рассматриваемой области поперечного среза; 3 — диффузное одноядерное воспаление (или повреждение) ткани, затрагивающее более 20% области среза; 4 — диффузное воспаление с некрозом или повреждением миокарда.

Полуколичественный анализ методом ПЦР в режиме реального времени. Для анализа транскрипционной экспрессии *TLR4* были использованы следующие праймеры: прямой 5'-GAATCACTTGGCACGACACTT-3' и обратный 5'-GCTCGCCACGTCACATACTCT-3'. В качестве внутреннего контроля был использован ген глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназа (GADPH) и следующие праймеры: прямой 5'-AAGCCCATCACCATCTTCCAG-3', обратный 5'-TGAGCCCTTCCACAATGCC-3'. Синтез TLR4 кДНК проводили с использованием набора RNAsimple Total RNA Kit («TiangenI», Китай) и SuperScript™ III First-Strand Synthesis System («Invitrogen», США). Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1,5%-ном геле, каждое изображение захватывали и переводили в цифровую форму с помощью CCD-камеры и анализировали с использованием программы NIH Imager beta version 2. Каждое значение представляли как отношение сигнала специфического продукта к сигналу от GADPH кДНК. Все процедуры и статистический анализ выполняли, как было описано в работе [13].

Определение ферментативной активности аспартаттрансаминазы (AST), креатинкиназы (СК), изоэстаза креатинкиназы (СК-МВ) и лактатдегидрогеназы (LDH) в бесклеточных супернатантах гомогенатов сердечной ткани проводили с использованием полностью автоматизированного биохимического анализатора в соответствии с инструкциями производителя («Thermo», США).

Вестерн-блоттинг. Миокард мышей гомогенизировали, получали тканевые экстракты, разделяли путем Ds-Na-электрофореза в 15%-ном ПААГ и переносили белки на нитроцеллюлозные мембраны. Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в буфере PBST (фосфатная буферная смесь с pH 7,6, содержащая 0,05%-ный Tween-20) в течение ночи при 4°. Затем мембраны инкубировали с моноклональными анти-TLR4 антителами в разведении 1 : 500, с моноклональными антителами к GAPDH в разведении 1 : 2000 (все – «Santa Cruz», США) в течение 1 ч при 37° и, наконец, с конъюгатом пероксидазы хрена и вторичных антител против IgG мыши («Santa Cruz») в разведении 1 : 3000. Все процедуры выполняли в соответствии с методикой, описанной Ксу и соавт. [14].

Проектирование TLR4-специфичной siРНК и трансфекция. Три TLR4-специфичные олигонуклеотидные последовательности (5'-GCATAGAGGTAGTTCCTAATA-3', 5'-CACCTCTTGATTGCGAGTTTCAA-3' и 5'-GTTCCATTGCTTGGCGAA-3') были синтезированы и подвергнуты отжигу. Пара двуцепочечных ДНК-олигонуклеотидов была вставлена в вектор экспрессии pRNAT-U6.1/Neo siRNA, который расщепляется рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III («GenScript», США). Вектор pRNAT-U6.1/Neo siRNA (0,2 мкг) вводили внутривентриально мышам (трансфекция) сразу же после инокуляции CVB3, но не в то же место, что и вирус.

Статистический анализ. Изображения, полученные при иммуноблоттинге, сканировали с использованием программы Turphoon («Pharmacia», США) и сохраняли в TIF-формате. Все данные представляли как средние значения \pm s.d. Статистический анализ выполняли с использованием программы SPSS 19.0 и t-теста Стьюдента. Значения показателя выживаемости рассчитывали с учетом критерия Чесона. Различия с $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инфицирование животных вирусом Коксаки приводит к существенному повреждению миокарда. Мышам, служащим в качестве модели острого вирусного миокардита (мыши «MOD»), вводили внутривентриально 2×10^2 TCID₅₀ CVB3 в день «0» и наблюдали за их выживаемостью в течение 21 дня. Мы сравнивали показатели выживаемости мышшей этой группы с контрольными животными групп «CN» и «DMEM» (см. раздел «Методы исследования»). Из рис. 1, а следует, что к 21-му дню наблюдений погибли только две мыши в группе «CN» и три – в группе «DMEM». В то же

время в группе «MOD» показатель выживаемости существенно уменьшался: шесть мышшей погибли к 7-му дню, девять – к 14-му, и показатель выживаемости снижался до 70% на 21-й день. В каждой группе животных был определен титр вируса (рис. 1, б). Оказалось, что максимальный титр CVB3 в мышцах группы «MOD» наблюдался на 14 день и затем постепенно снижался к 21-му дню. В группах «CN» и «DMEM» вирус не был обнаружен, что свидетельствовало об отсутствии вирусного заражения этих животных.

Для оценки степени вирусного поражения тканей сердца при миокардите были проведены гистопатологические исследования. Из результатов, представленных на рис. 1, в и г следует, что вирусное поражение миокарда мышшей «MOD» появлялось уже на 7-й день после заражения и переходило в тяжелую форму на 14-й и 21-й дни ($p < 0,05$).

Экспрессия гена TLR4 повышается при вирусной инфекции. Для выяснения молекулярного механизма патологического воздействия CVB3 при миокардите были изучены транскрипционная и трансляционная экспрессия TLR4 во времени методом ПЦР в режиме реального времени и иммуноблоттинга соответственно. Полученные результаты свидетельствовали о том, что уровень TLR4 мРНК у мышшей «MOD» существенно возрастал по сравнению с контрольными животными группы «CN» к 21-му дню после заражения вирусом (рис. 2, а, $p < 0,01$). Результаты иммуноблоттинга свидетельствовали о значительном увеличении уровня экспрессии белка TLR4 у мышшей «MOD» (рис. 2, б).

Вирусная инфекция приводит к увеличению уровня миокардиальных ферментов. Уровни ферментов миокарда в гомогенатах сердечной ткани в некоторой степени отражают состояние сердечной мышцы. Изменение во времени активностей AST, LDH, СК и СК-МВ в гомогенатах сердца CVB3-инфицированных мышшей группы «MOD» представлено на рис. 3. Видно, что у мышшей «MOD» по сравнению с группой «CN» активности всех четырех миокардиальных ферментов возрастали, причем, максимумы всех активностей приходились на 14-й день.

Подавление экспрессии гена TLR4 снижает степень поражения миокарда. Для изучения роли TLR4 в патогенезе вирусного миокардита было проведено подавление экспрессии гена TLR4 у CVB3-инфицированных мышшей «MOD» с помощью специфических siРНК (предварительно было установлено, что трансфекция siРНК не оказывала влияние на передачу вируса и его инфицирующую способность). Полученные результаты показывают, что уровень экспрессии TLR4 мРНК (рис. 4, а) и продукция белка TLR4

(рис. 4, б) значительно снижались у мышей четвертой группы («TLR4» silence) по сравнению с группой «MOD» ($p < 0,05$).

Гистопатологические исследования миокарда животных группы «TLR4 silence» показали, что степень повреждения тканей сердца с 7-го по 21-й дни после CVB3-инфицирования была ниже, чем у животных группы «MOD» ($p < 0,05$, рис. 4, в). Особенно это было заметно на 21-й день, когда воспалительные явления в миокарде животных «TLR4 silence» почти не выявлялись.

Подавление экспрессии гена *TLR4* способствовало снижению уровня миокардиальных ферментов у CVB3-инфицированных мышей. Определение активностей AST, LDH, СК и СК-МВ у мышей группы «TLR4 silence» показало, что у всех четырех ферментов они были ниже, чем у животных группы «MOD» (рис. 5). Таким обра-

зом, подавление экспрессии гена *TLR4* блокировало возрастание уровней ферментов миокарда, вызванное вирусной инфекцией.

Неспецифичная (контрольная) siРНК не подавляла экспрессию гена *TLR4* и не влияла на воспалительную реакцию в миокарде CVB3-инфицированных мышей. Для подтверждения положительного действия *TLR4*-интерферирующей siРНК на миокард CVB3-инфицированных животных и демонстрации ее специфического воздействия на ген *TLR4*, мы трансфицировали зараженным мышам контрольную siРНК (мыши «РНК silence control»). Полученные результаты свидетельствовали о том, что контрольная siРНК не влияла ни на уровень экспрессии *TLR4* мРНК (рис. 6, а), ни на продукцию белка *TLR4* (рис. 6, б), ни на степень тяжести воспаления миокарда CVB3-инфицированных мышей (рис. 6, в). Помимо

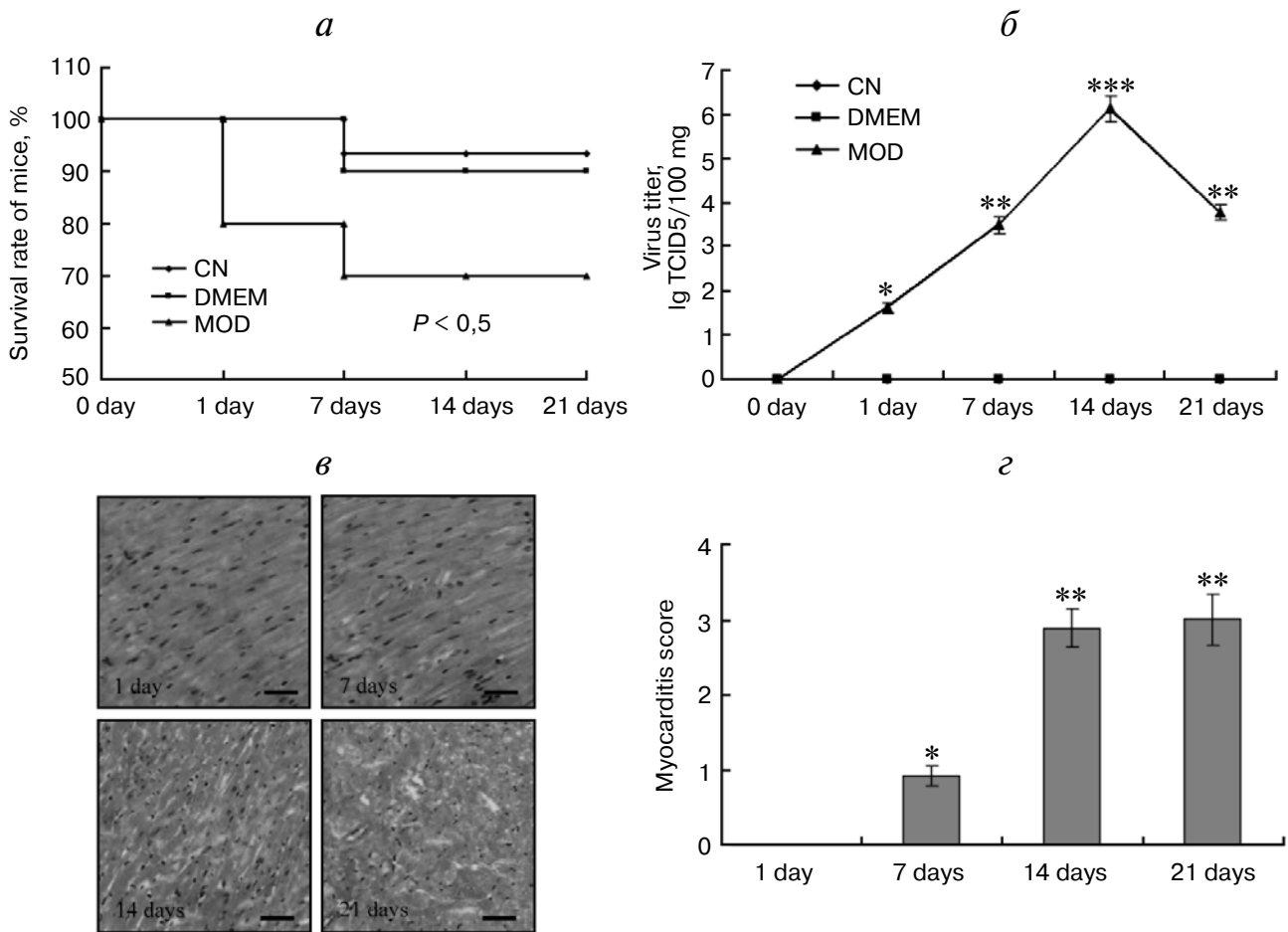


Рис. 1. Показатели выживаемости (а), титры вируса в миокарде (б) и оценки степени тяжести миокардита (в, г) у неинфицированных и CVB3-инфицированных мышей на 1-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после введения вируса. Гистопатологические исследования проводили после окраски срезов с помощью HE (увеличение $\times 200$). Степень тяжести миокардита определяли путем анализа окрашенных срезов и оценивали по шкале от 0 до 4. Значения * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ отражают, соответственно, различия в оценках степени воспаления миокарда на 7-й, 14-й и 21-й дни после инфицирования по сравнению с 1-м днем

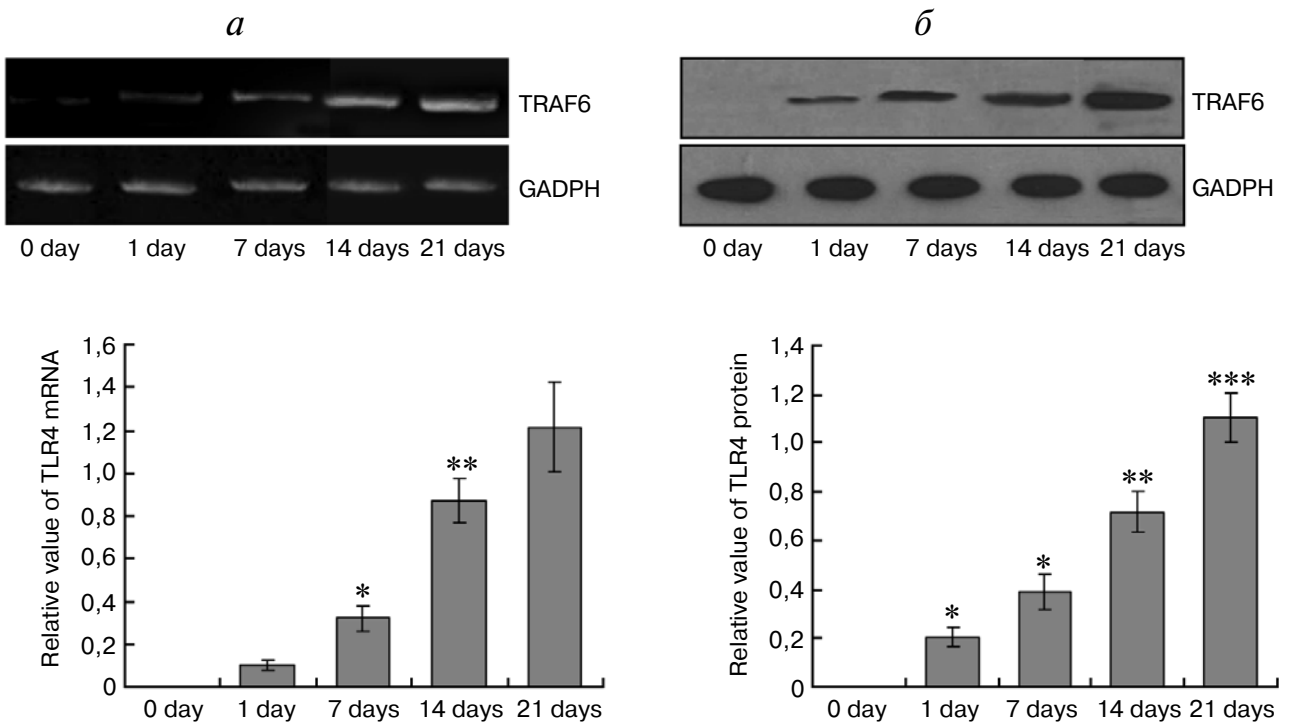


Рис. 2. Продукция TLR4 мРНК и белка TLR4 в тканях миокарда мышей «MOD» в разные дни после CVB3-инфицирования. *a* – Анализ экспрессии TLR4 мРНК методом ПЦР в режиме реального времени; *б* – анализ продукции белка TLR4 методом Вестерн-блоттинга. GADPH была использована в качестве внутреннего контроля при оценке уровней транскрипционной и трансляционной экспрессии *TLR4*. Значения * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$ отражают, соответственно, различия в уровнях экспрессии TLR4 мРНК и белка TLR4 на 7-й, 14-й и 21-й дни после инфицирования по сравнению с 1-м днем

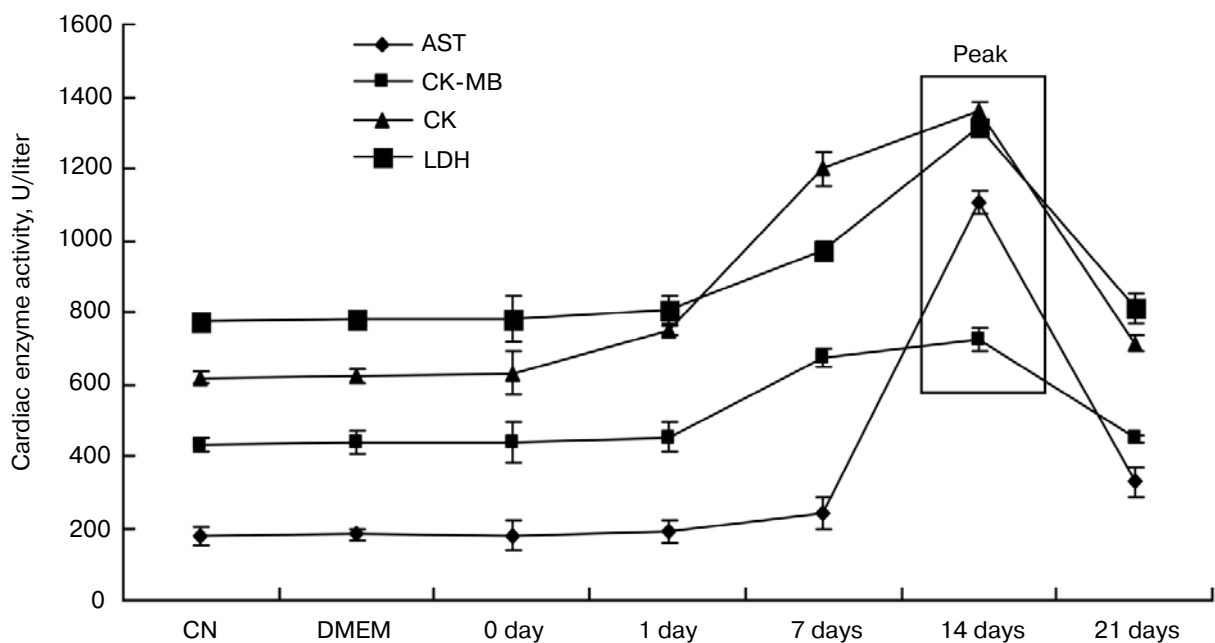


Рис. 3. Уровни миокардиальных ферментов CK, CK-MB, LDH и AST в тканях сердца не инфицированных и CVB3-инфицированных мышей. Активность ферментов в гомогенатах сердечной мышцы определяли на 1-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после введения вируса

этого, было установлено, что контрольная siРНК не изменяла уровни ферментов миокарда AST, LDH, СК и СК-МВ, которые оставались такими же, как и у мышей «MOD» (рис. 6, з). Это подтверждает, что облегчение миокардита путем подавления экспрессии гена *TLR4* использованной нами интерферирующей siРНК было специфичным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Главным признаком вирусного миокардита является высокая степень воспаления миокарда. Ранее было установлено, что в развитии вирус-

ного миокардита важную роль играют цитокины, факторы воспаления и хемокины [15]. Многие методы лечения миокардита у людей связаны с воздействием на экспрессию цитокинов. В представленной работе был исследован TLR4/NF-κB-зависимый путь передачи воспалительного сигнала. Полученные данные показали, что CVB3 инициирует воспаление миокарда у мышей BALB/C уже на первый день после внутрибрюшного инфицирования. Максимальный титр вируса в тканях сердца наблюдался на 14-й день после инфицирования, а затем постепенно снижался к 21-му дню. В то же время наиболее серьезные повреждения миокарда наблюдались именно к 21-му дню после заражения, что могло

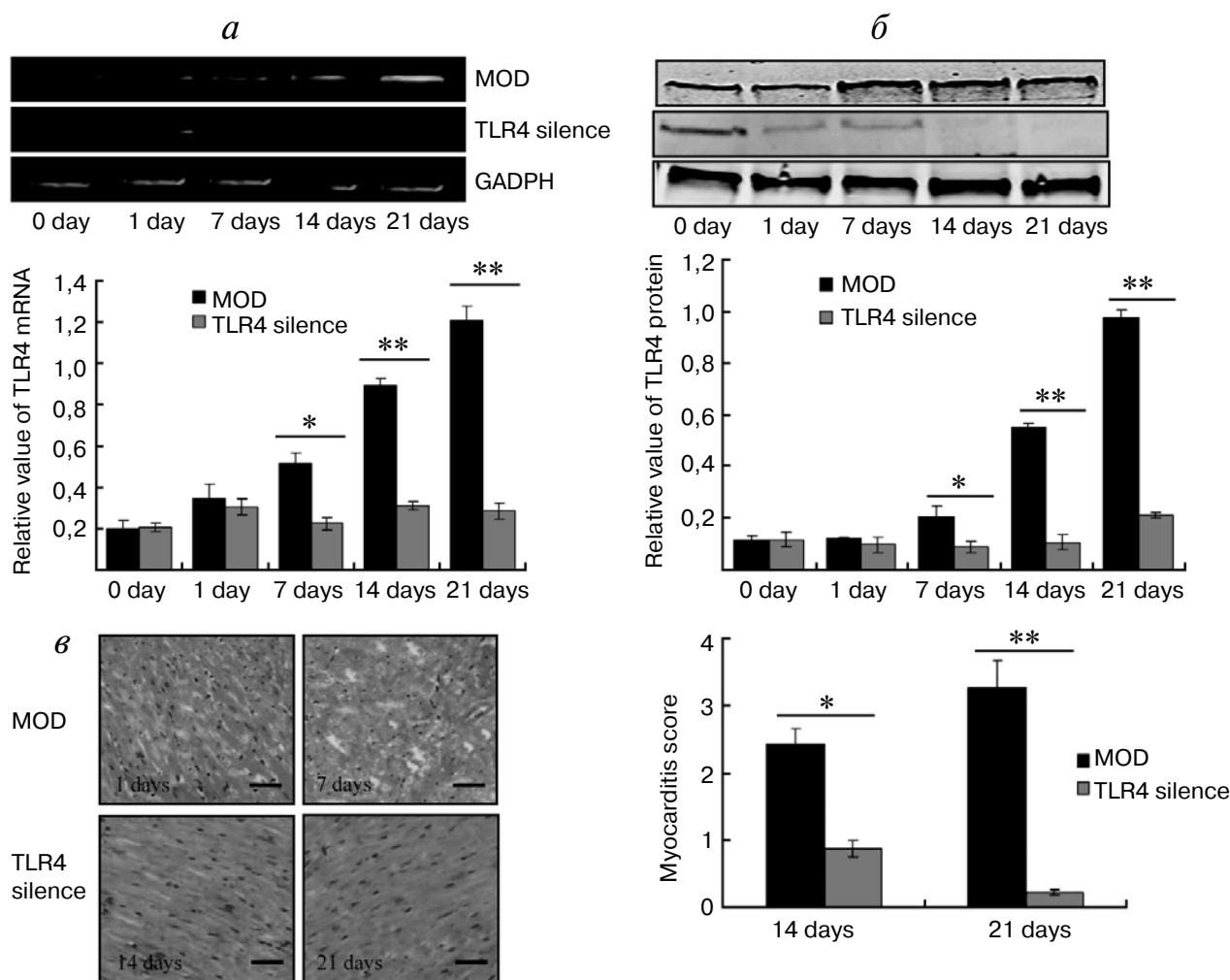


Рис. 4. Продукция TLR4 мРНК (а) и белка TLR4 (б) в тканях миокарда, а также степень воспаления миокарда (в) у CVB3-инфицированных мышей при подавлении экспрессии гена *TLR4*. а и б – Определение проводили методом ПЦР в режиме реального времени и методом Вестерн-блоттинга соответственно; в – использовали гистопатологический анализ HE-окрашенных срезов (увеличение ×200) и оценивали степень воспаления миокарда по шкале от 0 до 4 на 14-й и 21-й дни после введения CVB3. Значения **p* < 0,05 и ***p* < 0,01 отражают, соответственно, различия в уровнях экспрессии TLR4 мРНК и белка TLR4 на 7-й, 14-й и 21-й дни после инфицирования по сравнению с 1-м днем

свидетельствовать о кумуляции вирусного воздействия. Кроме того, самый низкий показатель выживаемости инфицированных мышей группы «MOD» наблюдался именно на 14-й день и не изменялся к 21-му дню после заражения.

Полученные нами результаты свидетельствовали о том, что CVB3 может индуцировать гиперпродукцию белка TLR4, одного из ключевых факторов TLR4/NF-κB-зависимого сигнального пути, в тканях сердца инфицированных мышей на 1-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после заражения. Эти данные подтверждали полученные ранее [16, 17] и свидетельствовали о стимулирующем регуляторном воздействии CVB3 на экспрессию гена *TLR4*. Однако согласно Робертсу [18], подобная прямая корреляция между развитием миокардита и TLR-зависимым сигнальным путем наблюдалась лишь у лиц мужского пола и отсутствовала у женского. Такое заключение не согласовывалось с нашими данными, поэтому потребуются дополнительные исследования для выяснения этих половых различий в проявлении TLR4-зависимого вирусного мио-

кардита. Мы показали, что активность СК, СК-МВ, LDH и AST в гомогенатах сердца начинала увеличиваться с первого дня и достигала максимума к 14 дню после введения вируса. Недавно Чен и соавт. [19] обнаружили, что уровни миокардиальных ферментов СК, СК-МВ, LDH и AST в сердечной ткани CVB3-инфицированных животных повышались, но достигали максимума не к 4-му, а к 10-му дню после заражения. Это различие могло быть связано либо с особенностью использованного штамма вируса, либо с разницей в его титрах.

Для дальнейшего изучения функционирования белка TLR4 во время вызванного CVB3 воспалительного процесса в миокарде были использованы малые интерферирующие РНК (siРНК), специфически подавляющие экспрессию гена *TLR4*. Из полученных результатов следовало, что при трансфекции siРНК продукция TLR4 мРНК и белка TLR4 в миокарде мышей значительно снижалась, по сравнению с мышами «MOD», в каждой временной точке (с 1-й по 21-й день). Это означало, что блокирование

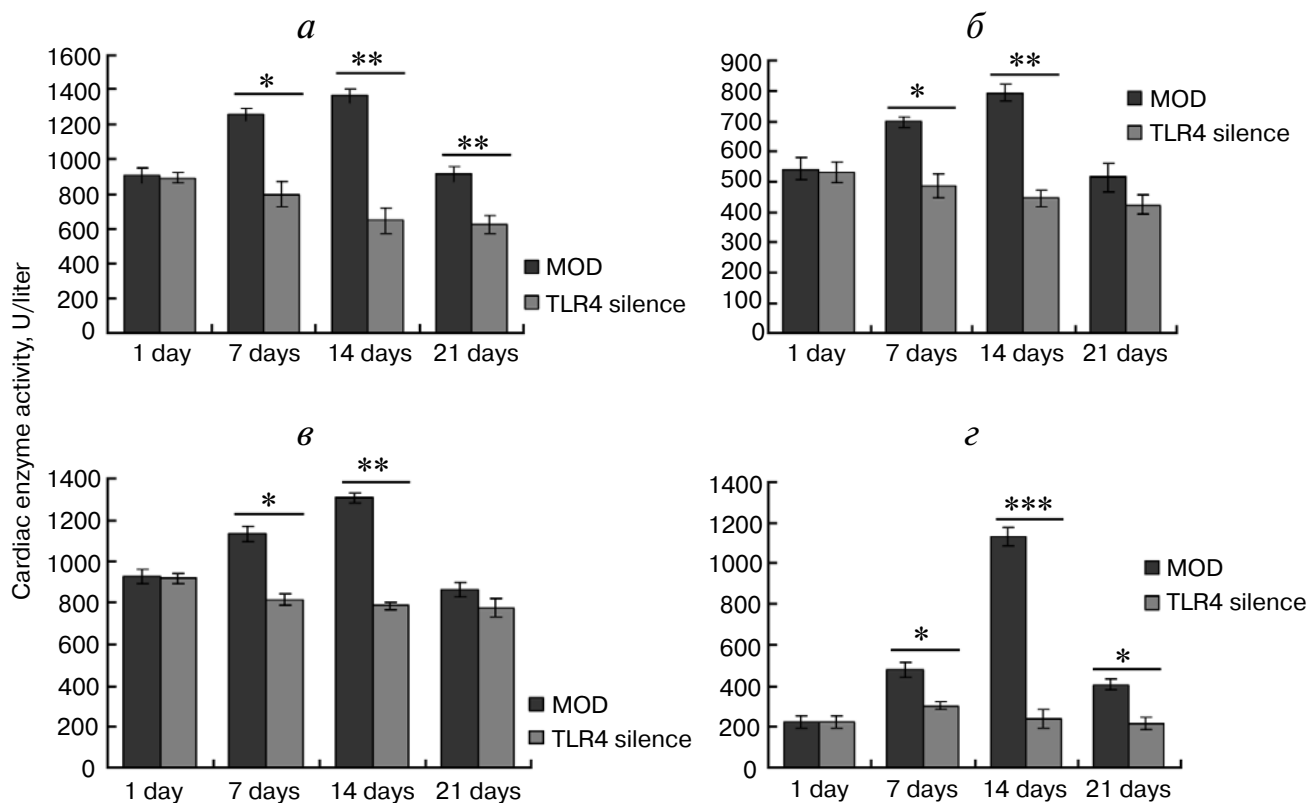


Рис. 5. Активность СК (а), СК-МВ (б), LDH (в) и AST (г) в миокарде мышей в разное время после введения CVB3 при блокировании гена *TLR4* под действием геноспецифичной siРНК (группа «TLR4 silence») по сравнению с животными группы «MOD». Значения * $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ отражают, соответственно, различия в уровнях миокардиальных ферментов на 7-й, 14-й и 21-й дни после инфицирования по сравнению с 1-м днем

транскрипционной и трансляционной экспрессии гена *TLR4* под действием интерферирующей siРНК было эффективным и стабильным.

Не вызывает сомнений, что вирусная инфекция запускала воспалительную реакцию в миокарде. Одним из прототипов сигнальных путей, приводящих к воспалению, является TLR4/NF-κB-зависимый путь. Этот сигнальный механизм опосредует действие некоторых генов, ответственных за воспаление, включая гены цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и Toll-подобного рецептора 4 (*TLR4*) [16]. В данной работе мы наблюдали за экспрессией TLR4 и блокированием этой экспрессии под действием геноспецифичной siРНК. Рецептор TLR4 выполняет ключевую роль в системе врожденного иммуни-

тета и системе пищеварения [17, 18]. Через этот рецептор происходит активация TLR4/NF-κB-зависимого сигнального пути, играющего решающую роль в осуществлении воспалительной реакции, регулируемой цитокинами [19]. Однако мало что известно о роли TLR4 в развитии вирусного миокардита. Полученные нами результаты позволяют предположить, что TLR4/NF-κB-зависимый путь в миокарде CVB3-инфицированных мышей значительно ингибировался интерферирующей геноспецифичной siРНК; ингибирование касалось степени повреждения миокарда (она уменьшалась) и уровней миокардиальных ферментов (они не возрастали). Полученные нами предварительные данные позволяют предположить, что блокирование экспрес-

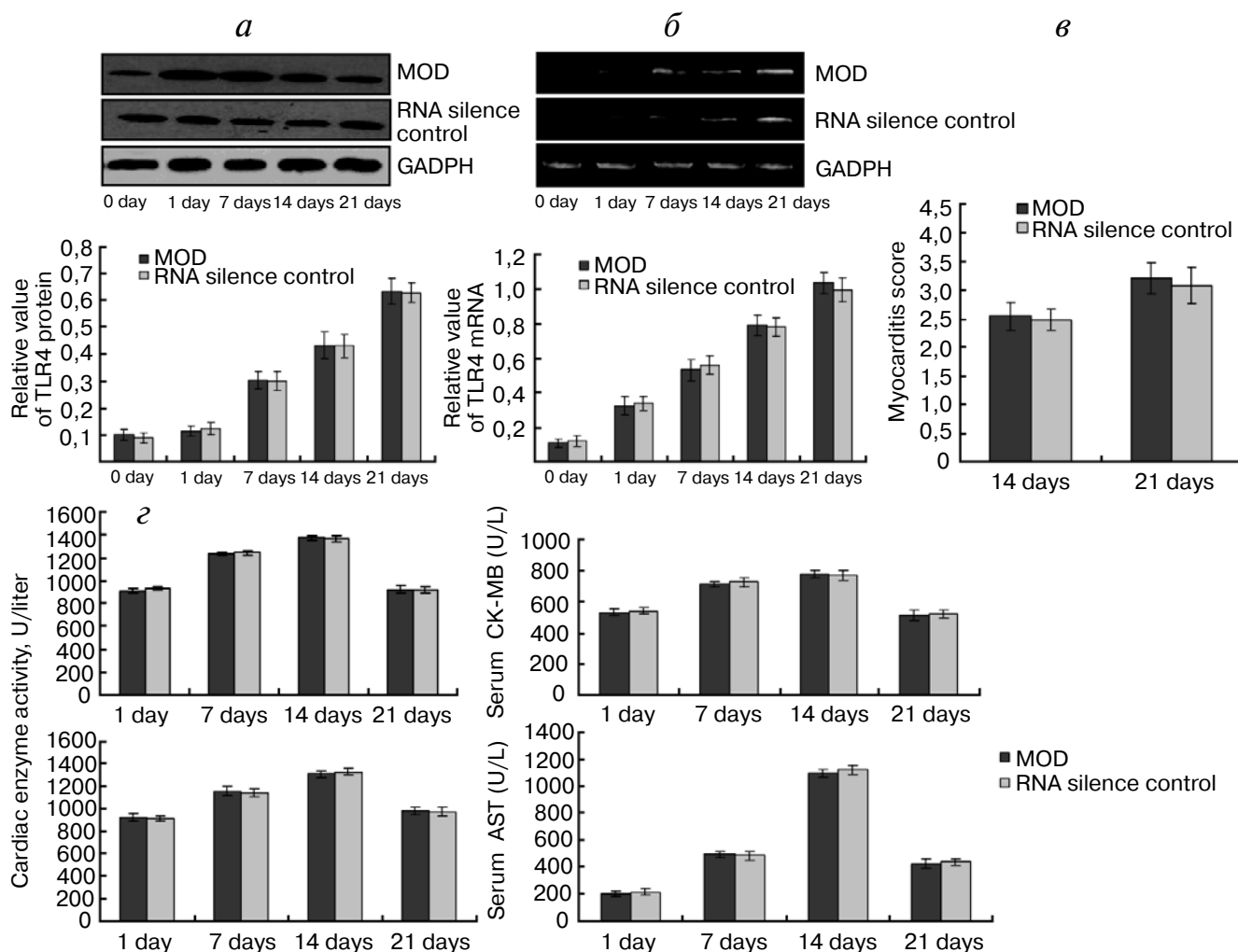


Рис. 6. Влияние контрольной (неспецифической) siРНК на экспрессию гена *TLR4* и уровни активности CK, CK-MB, LDH и AST у CVB3-инфицированных мышей (группа «RNA silence control») по сравнению с животными группы «MOD» на 1-й, 7-й, 14-й и 21-й дни после заражения вирусом. *а* и *б* – Транскрипционная и трансляционная экспрессия *TLR4* соответственно; *в* – оценка степени воспаления миокарда после окрашивания с использованием HE; *г* – уровни активности ферментов CK, CK-MB, LDH и AST во времени вплоть до 21-го дня после инфицирования мышей

сии гена *TLR4* могло приводить к снижению продукции цитокинов воспаления. Ричер и соавт. установили [17], что *TLR4* может индуцировать продукцию цитокинов воспаления у CVB3-инфицированных мышей. Таким образом, *TLR4*/NF-κB-зависимый сигнальный путь мог бы являться еще одной новой мишенью для терапевтического воздействия при лечении вирусного миокардита.

Функциональные и молекулярные механизмы, ответственные за ингибирование *TLR4*/NF-κB-зависимого пути под действием интерферирующей siРНК ранее были непонятны [20–23]. Малая интерферирующая РНК, специфичная к гену *TLR4*, была впервые использована нами в этой работе для обработки мышей с вирусным миокардитом, индуцированным CVB3. Мы предполагаем, что в CVB3-инфицированных кардиомиоцитах белок *TLR4* находится в связи с белком убиквитином. При этом малая РНК, блокирующая ген *TLR4*, может вызывать деубиквитинирование *TLR4* и тормозить CVB3-индуцируемую активацию *TLR4*/NF-κB-зависимого пути. Впервые продемонстрировано, что подавление транскрипционной экспрессии гена *TLR4*, сопровождающееся снижением продукции эндогенного белка *TLR4*, необходимо для блокирования CVB3-активируемого *TLR4*/NF-κB пути. Известны разные реагенты, обладающие подобным блокирующим воздействием. Так, Динг и соавт. [24] обнаружили, что коричный альдегид мог напрямую ингибировать воспалительную реакцию и уменьшать вызванные ей

поражения миокарда у мышей с вирусным миокардитом путем деактивации *TLR4*/NF-κB-зависимого сигнального пути. Чен и соавт. [19] сообщили, что инъекция Шенки–Фуженг может снижать индуцируемую CVB3 гиперпродукцию белка TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором к фактору некроза опухоли). Этот белок также является одним из компонентов *TLR4*/NF-κB-зависимого пути, поэтому мы считаем, что он также мог бы явиться мишенью для терапевтического воздействия при лечении вирусного миокардита. Конечно, в качестве таких мишеней могли бы выступить и другие факторы и молекулы, вовлеченные в этот регуляторный сигнальный путь.

Таким образом, в данном исследовании впервые показано, что *TLR4* принимает участие в развитии патологического процесса, индуцированного вирусом Коксаки, путем активации *TLR4*/NF-κB-зависимого сигнального пути. Подавление экспрессии гена *TLR4* с помощью геноспецифичной siРНК может уменьшать вызванное вирусом воспаление в ткани сердца и снижать степень тяжести миокардита. Таким образом, блокируя функционирование *TLR4* можно держать под контролем CVB3-индуцируемый вирусный миокардит, что может быть с успехом применено для лечения этого заболевания.

Работа была поддержана Программой развития научно-технических исследований провинции Шэньси Китая (грант 2011K14-08-04) и научно-техническим проектом Сианя (грант SF1301(3)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Reddy, J., Massilamany, C., Buskiewicz, I., and Huber, S.A. (2013) Autoimmunity in viral myocarditis, *Curr. Opin. Rheumatol.*, **25**, 502–508.
- Hendry, R.G., Bilawchuk, L.M., and Marchant, D.J. (2014) Targeting matrix metalloproteinase activity and expression for the treatment of viral myocarditis, *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, **7**, 212–225.
- Esfandiari, M., and McManus, B.M. (2008) Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis, *Ann. Rev. Pathol.*, **3**, 127–155.
- Fuse, K., Chan, G., Liu, Y., Gudgeon, P., Husain, M., Chen, M., Yeh, W.C., Akira, S., and Liu, P.P. (2005) Myeloid differentiation factor-88 plays a crucial role in the pathogenesis of Coxsackievirus B3-induced myocarditis and influences the type I interferon production, *Circulation*, **112**, 2276–2285.
- Calabrese, F., and Thiene, G. (2003) Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects, *Cardiovasc. Res.*, **60**, 11–25.
- Fiorotto, R., Scirpo, R., Trauner, M., Fabris, L., Hoque, R., and Spirli, C. (2011) Loss of CFTR affects biliary epithelium innate immunity and causes *TLR4*-NF-κB mediated inflammatory response in mice, *Gastroenterology*, **141**, 1498–1508.
- Suganami, T., Tanimoto-Koyama, K., Nishida, J., Itoh, M., Yuan, X., and Mizuzrai, S. (2007) Role of the Toll-like receptor 4/NF-κB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**, 84–91.
- Frisancho-Kiss, S., Nyland, J.F., Davis, S.E., Frisancho, J.A., Barrett, M.A., Rose, N.R., and Fairweather, D. (2006) Sex differences in coxsackievirus B3-induced myocarditis: IL-12R-beta 1 signaling and IFN-gamma increase inflammatory in males independent from STAT4, *Brain Res.*, **1126**, 139–147.
- Frisancho-Kiss, S., Davis, S.E., Nyland, J.F., Frisancho, J.A., Cihakova, D., Barrett, M.A., and Fairweather, D. (2007) Cutting edge: cross-regulation by *TLR4* and T-cell Ig mucin-3 determines sex differences in inflammatory heart disease, *J. Immunol.*, **178**, 6710–6714.
- Ding, Y., Qiu, L., Zhao, G., Xu, J., and Wang, S. (2010) Influence of cinnamaldehyde on viral myocarditis in mice, *Am. J. Med. Sci.*, **340**, 114–120.
- Zou, N., Ao, L., Cleveland, J.C., Yang, X., Su, X., and Cai, G.Y. (2008) Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory

- response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, 2805–2813.
12. Kishimoto, C., Kawamata, H., Sakai, S., Shinohara, H., and Ochiai, H. (2001) Enhanced production of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) by *in vitro* and *in vivo* infections with encephalomyocarditis virus and modulation of myocarditis with an antibody against MIP-2, *J. Virol.*, **75**, 1294–1300.
 13. Wang, X., Shi, Q., Xu, K., Gao, C., Chen, C., Li, X.L., Wang G.R., Tian, C., Han, J., and Dong, X.P. (2011) Familial CJD associated PrP mutants within transmembrane region induced Ctm-PrP retention in ER and triggered apoptosis by ER stress in SH-SY5Y cells, *PLoS One*, **6**, e14602.
 14. Xu, K., Wang, X., Shi, Q., Chen, C., Tian, C., Li, X.L., Zhou, R.M., Chu, Y.L., and Dong, X.P. (2011) Human prion protein mutants with deleted and inserted octarepeats undergo different pathways to trigger cell apoptosis, *J. Mol. Neurosci.*, **43**, 225–234.
 15. Li-Sha, G., Yi-He, C., Na-Dan, Z., Teng, Z., and Yue-Chun, L. (2013) Effects of carvedilol treatment on cardiac cAMP response element binding protein expression and phosphorylation in acute coxsackievirus B3-induced myocarditis, *BMC Cardiovasc. Disord.*, **13**, 100.
 16. Li, H., Huang, L.F., Wen, C., Yang, Z.C., and Chen, C.Y. (2013) Roles of cardiac mast cells and Toll-like receptor 4 in viral myocarditis among mice, *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, **15**, 896–902.
 17. Richer, M.J., Fang, D., Shanina, I., and Horwitz, M.S. (2006) Regulatory T-cells protect from type 1 diabetes after induction by coxsackievirus infection in the context of transforming growth factor-beta, *Clin. Immunol.*, **121**, 339–349.
 18. Roberts, B.J., Moussawi, M., and Huber, S.A. (2013) Sex differences in TLR2 and TLR4 expression and their effect on coxsackievirus-induced autoimmune myocarditis, *Exp. Mol. Pathol.*, **94**, 58–64.
 19. Chen, J., Wang, Z., and Wu, T. (2013) Shenqi Fuzheng injection improves CVB3-induced myocarditis via inhibiting TRAF6 expression, *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)*, **59**, 1826–1834.
 20. Lawrence, T. (2009) The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammatory, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, 1–13.
 21. Kabanov, D.S., and Prokhorenko, I.R. (2013) Involvement of Toll-like receptor 4 and Fc receptors gamma in human neutrophil priming by endotoxins from *Escherichia coli*, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 185–193.
 22. Rlls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R., and Schwartz, M. (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis, *Nature Cell Biol.*, **9**, 1081–1088.
 23. Tikhvatulin, A.I., Logunov, D.Y., Shcherbinin, D.N., Shmarov, M.M., Naroditsky, B.S., Gudkov, A.V., and Gintsburg, A.L. (2010) Toll-like receptors and their adapter molecules, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1098–1114.
 24. Ding, Y., Qiu, L., Zhao, G., Xu, J., and Wang, S. (2010) Influence of cinnamaldehyde on viral myocarditis in mice, *Am. J. Med. Sci.*, **340**, 114–120.

COXSACKIEVIRUS B3 INDUCES VIRAL MYOCARDITIS BY UPREGULATING TOLL-LIKE RECEPTOR 4 EXPRESSION

**Zhao Zhao¹, Tian-Zhi Cai², Yan Lu¹, Wen-Jun Liu¹,
Man-Li Cheng¹, and Yu-Qiang Ji^{1*}**

¹ *First hospital of Xi'an, Department of Cardiovascular Medicine, Xi'an 710002, China; fax: +86(29)876-30855, E-mail: jiyuqiandr@yeah.net*

² *Affiliated Hospital of Xi'an, Department of Cardiovascular Medicine, Medical University, Xi'an 710077, China*

Received January 29, 2014

Revision received January 16, 2014

In this study, we investigated the potential pathogenesis of coxsackievirus B3 (CVB3)-induced viral myocarditis and the promising protective effect of silencing RNA (small interfering RNA, siRNA). One hundred and twenty mice were included in the study, and 30 mice were intraperitoneally inoculated with CVB3 to establish an acute viral myocarditis model. The survival rate was observed for the CVB3-infected mouse model (MOD), and myocardial injury was examined by HE staining assay. Real-time PCR (RT-PCR) and western blot assay were used to detect toll-like receptor 4 (TLR4) expression in myocardial tissues. The TLR4 gene was silenced for the MOD mice, and the effects of this treatment were observed. The results indicate that the expression of TLR4 mRNA and protein are significantly and persistently increased during the progression of CVB3-induced myocarditis. The activities of cardiac enzymes, including CK, LDH, AST, and CK-MB, were also enhanced in CVB3-induced myocardial tissues. Interestingly, when the TLR4 gene was silenced, the CVB3-induced TLR4 production was significantly decreased and the severity of myocarditis was significantly lessened. In conclusion, CVB3 can induce viral myocarditis by upregulating toll-like receptor 4 expression. The viral myocarditis can be lessened by silencing the TLR4 gene in the CVB3 viral myocarditis mode, which may be a feasible therapeutic method for viral myocarditis.

Key words: viral myocarditis, coxsackievirus B3, toll-like receptor 4, cardiac enzyme