

• 基础实验研究论著 •

人类巨细胞病毒感染对血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的影响*

谢明英¹, 李景苏²

(1. 武汉钢铁公司第二职工医院检验科, 武汉湖北 430085;

2. 南昌市第三人民医院心血管研究中心, 江西南昌 315000)

摘要:目的 探讨血管平滑肌细胞被感染人类巨细胞病毒后,其细胞内胆固醇脂代谢及相关基因表达的变化情况。方法 通过分离原代脐动脉血管平滑肌细胞,以 1 个感染复数的人类巨细胞病毒攻击作为实验组,对照组则采用含 3% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基模拟感染。检测平滑肌细胞内胆固醇含量在病毒攻击后的变化情况,以基因表达谱芯片技术检测基因表达情况。**结果** 血管平滑肌细胞被感染人类巨细胞病毒后,细胞内相关基因表达发生显著变化,其中低密度脂蛋白受体相关蛋白 10、11、12 以及 HMG-CoA 合成酶, HMG-CoA 还原酶, B 型清道夫受体表达上调。载脂蛋白 A1、载脂蛋白 M 表达下调。**结论** 人类巨细胞病毒感染血管平滑肌细胞后可能通过改变脂代谢途径的相关基因表达,增强细胞内胆固醇合成,导致胆固醇代谢失衡,从而参与动脉粥样硬化的发病过程。

关键词:人类巨细胞病毒; 血管平滑肌细胞; 胆固醇; 脐动脉

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1821-03

Research on influence of human cytomegalovirus infection on expression of vascular smooth muscle cell lipid metabolism-related gene*

Xie Mingying¹, Li Jingsu²

(1. Department of Clinical Laboratory, Second Worker's Hospital of Wuhan Iron and Steel Company,

Wuhan, Hubei 430085, China; 2. Cardiovascular Research Center, Nanchang

Municipal Third People's Hospital, Nanchang, Jiangxi 315000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the change of intracellular cholesterol lipid metabolism and related gene expression after vascular smooth muscle cells infection by human cytomegalovirus (HCMV). **Methods** By separating the primary umbilical artery vascular smooth muscle cells with a multiplicity of infection of HCMV attack as the experimental group and the control group adopted the DMEM/F12 medium containing 3% bovine serum for simulating infection. The change of cholesterol content in the smooth muscle cells after virus attack was detected and the gene expression gene was detected by the gene expression profiling chip method. **Results** After vascular smooth muscle cells were infected by HCMV, the intracellular gene expression changed significantly, in which low-density lipoprotein receptor-related protein 10, 11, 12 and HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase and B scavenger receptor were upregulated. Apolipoprotein A1 and apolipoprotein M were downregulated. **Conclusion** HCMV infecting vascular smooth muscle cells may alter the lipid metabolism pathway related gene expression, enhance intracellular cholesterol synthesis, result in the cholesterol metabolism imbalance, thus participate in the pathogenesis process of atherosclerosis.

Key words: human cytomegalovirus; vascular smooth muscle cells; cholesterol; umbilical artery

目前,由动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)所致的心血管系统疾病引起的死亡数居恶性疾病之首。随着社会经济的高速发展和生活水平的不断提升,心脑血管疾病的发病率与病死率亦呈逐年上升趋势。AS 是众多心脑血管疾病、肾脏和肢体等多种外周动脉疾病的病理基础。研究资料显示,某些病原体感染是导致 AS 的重要原因,尤其是人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染与之有密不可分的关系^[1-2],但其作用机制目前仍不明确。因此,探讨 HCMV 感染导致 AS 的机制对 AS 相关疾病的防治十分重要。本文旨在探讨 HCMV 感染血管平滑肌细胞后,细胞内胆固醇脂代谢及相关基因表达的变化情况,以期临床治疗提供参考。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 HCMV AD160 病毒株及人胚肺成纤维细胞由本室保存。DMEM、DMEM/F12(1:1)细胞培养基购自 Gibco 公司(美国);胎牛血清、小牛血清和双抗(青霉素-链霉素)购自 Hyclone 公司(美国);总胆固醇检测试剂盒购自金华市强大生物科技有限公司;Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司(美国);基因表达谱芯片由 Agilent 公司提供(美国)。

1.2 培养病毒、测定毒力及感染性病毒数 常规培养人胚肺成纤维细胞,待长成单层后,消化传代,于 25 cm² 细胞培养瓶中接种 0.2 mL HCMV AD169 株,每日观察细胞生长状态和病变情况,待细胞病变到“++++”级时,收获病毒以测定毒力^[3],同时计数感染性病毒颗粒。

* 基金项目:湖北省医学会科研项目(2011-NO. B047)。 作者简介:谢明英,女,主治医师,主要从事人类巨细胞病毒感染研究。

1.3 培养血管平滑肌细胞及 HCMV 感染 按参考文献[4]培养脐血管平滑肌细胞,待细胞长至培养瓶面积的 80%左右时,以 1 个感染复数(multiplicity of infection,MOI)的 HCMV 感染血管平滑肌细胞,37℃ 吸附 3 h,同时每隔 30 min 摇晃 1 次,使细胞层被病毒液完全覆盖,之后加入含 3%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基继续培养,此为实验组。与此同时,以含 3%小牛血清的 DMEM 培养基进行模拟感染作为对照组。

1.4 测定血管平滑肌细胞内胆固醇水平 分别在病毒感染后的第 24、48、72 小时分别吸去培养基,PBS 液洗涤细胞,之后胰酶消化,待细胞计数后 500×g 离心 5 min。收集细胞,裂解充分后按以胆固醇氧化酶法测定细胞内胆固醇水平[5]。

1.5 检测血管平滑肌细胞被感染 HCMV 后基因表达谱芯片 依上所述,血管平滑肌细胞感染 HCMV 为实验组,血管平滑肌细胞不感染病毒(以含 3%小牛血清的 DMEM 培养基模拟感染)为对照组。血管平滑肌细胞感染病毒后每隔 24 h 收获一次细胞。具体操作如下:先吸去培养液,然后 PBS 液清洗 2 遍,再次吸去 PBS 液后,加入 Trizol 试剂(每 10 cm² 细胞加入 1 mL Trizol),收集细胞裂解液保存于-80℃。按照上述方法依次收集感染细胞至第 72 小时。样品收集完毕后寄送至华大基因公司进行表达谱芯片检测。另外,RNA 抽提、基因表达差异分析、芯片杂交及扫描由上海康成生物工程有限公司完成。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内比较采用 Q 检验,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCMV 感染血管平滑肌细胞后的细胞内胆固醇变化情况 于血管平滑肌细胞被感染 HCMV AD169 病毒株后的 24、48、72 h 内收获裂解细胞,采用胆固醇氧化酶法检测裂解液中胆固醇水平,进而研究 HCMV 感染对血管平滑肌细胞内胆固醇的影响。由表 1 可见,与各个时间点对照组比较,血管平滑肌细胞在感染病毒 72 h 后,胆固醇水平显著升高($P<0.05$),而在 24 h 和 48 h 时,对照组与实验组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。通过单因素方差分析可知,72 h 组的胆固醇水平明显高于 24 h 和 48 h 组($P<0.05$)。由此可见,HCMV 感染后可导致血管平滑肌细胞内胆固醇代谢失衡,进而引起胆固醇堆积。

组别	感染时间(h)		
	24	48	72
对照组	0.23±0.06	0.19±0.13	0.24±0.12
实验组	0.19±0.09	0.28±0.15	0.72±0.05*#

*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与 24 h 和 48 h 比较。

2.2 血管平滑肌细胞被感染 HCMV 后脂代谢相关基因表达的变化 病毒感染 24、48、72 h 后的基因表达谱芯片检测荧光信号强度与对照组比较,变化在荧光强度 2 倍以上则归为目的基因表达存在差异。详见表 2。

由表 2 可见,血管平滑肌细胞被感染 HCMV 后,细胞中与脂质摄取相关的低密度脂蛋白受体相关蛋白 10、11、12 基因的表达显著上调,细胞内与胆固醇合成相关的 HMG-CoA 合成酶基因和 HMG-CoA 还原酶基因的表达亦出现了上调。载脂蛋白 A1 和载脂蛋白 M 基因则发生下调,其与抗 AS 密切相关。由此可见,血管平滑肌细胞感染 HCMV 后可通过影响脂

质摄取、胆固醇代谢等途径参与 AS 的发病过程。

表 2 HCMV 感染血管平滑肌细胞后脂代谢相关基因表达的变化情况

基因名称	24 h	48 h	72 h
低密度脂蛋白受体相关蛋白 10 基因	2.63	4.21	3.23
低密度脂蛋白受体相关蛋白 11 基因	4.89	3.27	3.56
低密度脂蛋白受体相关蛋白 12 基因	4.21	3.87	3.41
HMG-CoA 合成酶基因	<2.00	2.47	4.35
HMG-CoA 还原酶基因	<2.00	2.09	3.61
B 型清道夫受体基因	<2.00	3.16	4.18
载脂蛋白 A1 基因	-5.48	-11.91	-6.39
载脂蛋白 M 基因	-4.11	-4.75	-4.27

3 讨 论

心血管系统疾病是严重威胁人类健康的重大疾病,每年全球由心血管系统疾病所致的患者死亡数高居各种死亡原因之首[6-7],其中,又以 AS 为主要诱因[8]。近年来,AS 相关的传统危险因素,如血脂异常、肥胖、高血压、糖尿病等已得到有效干预,但以 AS 为主要诱因的心血管系统疾病依然保存高发病率,由此表明还存在着除上述传统致病因素之外的其他因素存在。

细胞脂质摄取、细胞脂质合成等异常可导致细胞内脂代谢失衡。细胞摄取脂质通过受体介导内吞而完成,包括极低密度脂蛋白受体(VLDLR)、清道夫受体(scavenger receptor)、低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)等[9]。研究显示,VLDLR 和低密度脂蛋白受体相关蛋白的表达不受细胞内胆固醇含量的影响,如此可导致该受体无限度地摄取脂蛋白,最终引起大量脂质堆积于细胞内。除此之外,细胞内胆固醇合成还是一系列酶促反应的结果,主要包括 HMG-CoA 合成酶和 HMG-CoA 还原酶。载脂蛋白是脂蛋白的主要部分,其通过稳定脂蛋白结构,影响脂蛋白代谢相关酶活性等过程参与脂蛋白代谢,在此过程中发挥重要作用。其中载脂蛋白 A1 和载脂蛋白 M 具有抗 AS 的作用。

本文研究结果显示,血管平滑肌细胞被感染 HCMV 后,细胞中与脂质摄取相关的低密度脂蛋白受体相关蛋白 10、11、12 的表达显著上调,细胞内与胆固醇合成相关的 HMG-CoA 合成酶和 HMG-CoA 还原酶基因的表达亦出现了上调。载脂蛋白 A1 和载脂蛋白 M 基因则发生下调,其与抗 AS 密切相关。

综上所述,HCMV 感染对血管平滑肌细胞可改变细胞内与胆固醇合成相关的基因表达,同时导致抗 AS 蛋白基因的表达异常,因而引起细胞内脂代谢紊乱和脂质沉积,从而导致 AS。

参考文献

[1] Siobedman B, Mocarski ES, Mocarski. Mechanisms modulating immune clearance during human cytomegalovirus latency[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(36): 14291-14292.

[2] Zalckvar, Einat. Nucleosome maps of the human cytomegalovirus genome reveal a temporal switch in chromatin organization linked to a major IE protein[J]. PNAS, 2012, 110(32): 13126-13131.

[3] 郭智, 陈惠仁, 刘晓东, 等. 异基因造血干细胞移植后发生巨细胞病毒感染的临床分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2012, 20(4): 971-974.

[4] 张玲, 钱东萌, 刘海婷, 等. 新生儿高胆红素血症与先天性巨细胞病毒感染的相关性研究[J]. 滨州医学院学报, 2012, 12(16): 3147-3149.

(下转第 1824 页)

分裂原 PHA 刺激下活化增殖,在培养进行至 0、12、24、36、48、60 h 时分别加入 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 ,继续培养至 72 h,并制片分析,考察 H_2O_2 诱导处于不同细胞周期淋巴细胞 DNA 损伤是否对微核形成产生影响。

2 结 果

2.1 静息期淋巴细胞氧化损伤对微核率的影响 H_2O_2 可以诱导静息期淋巴细胞 DNA 氧化损伤,并呈一定的量效关系,但微核率并没有随着 DNA 损伤程度的加大而上升。当 H_2O_2 剂量达到 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时,彗星细胞率高达 77.6%,微核率与未处理组相比差异依旧无统计学意义($P>0.05$),结果见图 1。

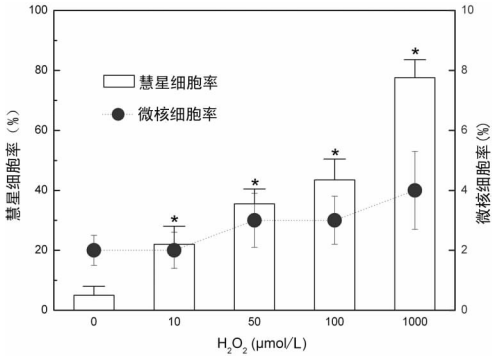


图 1 淋巴细胞经 H_2O_2 处理后 DNA 氧化损伤率及微核率

2.2 不同细胞周期淋巴细胞氧化损伤对微核率的影响 外周血淋巴细胞经 PHA 刺激后进入细胞周期,为考察处于不同细胞周期的淋巴细胞 DNA 氧化损伤对微核形成的影响,实验组分别在培养进行到 0、12、24、36、48、60 h 时加入 1 000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ,和对照组相比,微核率并无显著变化(结果未列出)。此外,本组也考察了在培养过程中每隔 12 h 连续加入 10、50、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 。连续添加高浓度 H_2O_2 (100、1 000 $\mu\text{mol/L}$) 造成淋巴细胞转化率下降,病死率上升,低浓度 H_2O_2 (10、50 $\mu\text{mol/L}$) 的连续添加并未显著影响细胞生长,但微核率也未出现明显变化。

3 讨 论

H_2O_2 是最常用的 DNA 化学诱裂剂,在不考虑酶解的情况下, H_2O_2 可以快速穿过细胞膜直达细胞核,从而造成 DNA 单链断裂及碱基的氧化损伤^[4]。损伤严重的细胞易发生凋亡,而损伤轻微的细胞在修复失败或发生错误修复时可能导致基因突变,氧化应激等造成的 DNA 氧化损伤是肿瘤发生的重要致病机制。

外周血淋巴细胞属于非增殖细胞,PHA 刺激淋巴细胞活化增殖后,细胞代谢活跃,DNA 复制及修复相关蛋白表达增强,DNA 损伤修复能力得到提高^[6]。Andreoli 等^[7]研究表明和 PHA 刺激的淋巴细胞相比,静息期细胞对苯毒性代谢产物造成的 DNA 损伤更敏感。马爱国等^[4]的研究发现静息期淋巴细胞 DNA 修复能力远低于其他高增殖率细胞株,但静息期淋巴细胞对 H_2O_2 诱导的 DNA 损伤敏感性较其他传代细胞株

要明显降低。这可能与不同细胞本身对 H_2O_2 氧化损伤的敏感性 & 胞质内过氧化物酶体系、还原物质的种类和量有关。

目前普遍接受的微核理论是,DNA 损伤导致细胞有丝分裂时染色体发生断裂,在细胞间期,丧失着丝粒的染色体片断滞留在主核外形成微小染色质块。生理因素、化学诱变剂、电离辐射、抗氧化因子缺乏等都与微核的形成有关^[8]。微核率与染色体畸变率在 80% 化合物毒理学实验中证实具有良好的相关性,微核实验经济、快速、简便,已成为广泛使用的遗传毒理学实验之一^[9]。本研究利用 H_2O_2 诱导静息期淋巴细胞 DNA 的氧化损伤,单细胞凝胶电泳可以快速直观地反映 DNA 链断裂情况,但在随后进行的常规微核实验中并未发现微核率的升高。同时本研究也考察了 PHA 刺激淋巴细胞活化进入细胞周期,不同时间点加入 H_2O_2 诱导 DNA 损伤,微核率也未升高。分析可能有两方面的原因:一方面有丝分裂原刺激淋巴细胞活化,DNA 合成及修复能力大大提高,损伤部位得到快速修复;另一方面,不同于电离辐射以造成 DNA 双链断裂这一严重的损伤形式为主,氧化剂主要导致 DNA 单链断裂,损伤正确修复率大大提高。此外,DNA 单链断裂对微核形成的贡献十分有限。

参考文献

[1] 曹佳.微核试验在中国的应用、发展与展望[J].遗传,2003,25(1):73-76.
[2] 杨凤,周建华.苯致 DNA 损伤的研究进展[J].工业卫生与职业病,2009,35(1):54-58.
[3] Hei TK, Liu SX, Waldren C. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: Role of reactive oxygen species [J]. PNAS, 1998, 95(14): 8103-8107.
[4] 马爱国, Collins AR, Susan JD, 等. 不同细胞 DNA 氧化损伤及自身修复能力的分析[J]. 癌变·畸变·突变, 1997, 9(3): 138-142.
[5] 惠长野, 刘征宇, 高朝贤, 等. 外源脱氧核苷酸对淋巴细胞 DNA 辐射损伤修复的影响[J]. 职业与健康, 2012, 28(10): 1211-1212.
[6] 陈鸿书, 彭家和, 李蓉芬, 等. PHA 刺激对淋巴细胞修复 DNA 损伤的影响[J]. 生物化学杂志, 1985, 1(3): 39-47.
[7] Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites[J]. Mutat Res, 1997, 377(1): 95-104.
[8] 杨明杰, 曹佳, 余争平. 微核实验的分子生物学研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2000, 12(4): 237-241.
[9] Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, et al. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test[J]. Mutat Res, 1998, 410(1): 81-116.

(收稿日期:2014-02-06)

(上接第 1822 页)

[5] 陈华, 刘伟, 程洁, 等. 人类巨细胞病毒感染对血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(1): 17-20.
[6] 赵冬, 刘静. 中国心血管病: 负担持续上升, 预防任重道远[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(3): 1-2.
[7] 王瑛, 赵冬. 心血管疾病终生风险的研究现状[J]. 中华心血管病杂志, 2013, 41(6): 524-526.

[8] 李建军. 心血管病进展与 2011 回顾炎症与冠状动脉粥样硬化性疾病研究进展[J]. 心血管病学进展, 2013, 33(1): 10-13.
[9] 李玲芳, 陈华, 郭国军. 人类巨细胞病毒感染对脐动脉血管平滑肌细胞胆固醇代谢的影响[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(2): 150-154.

(收稿日期:2014-02-01)