

• 文献综述 •

巨细胞病毒感染与动脉粥样硬化的关系

陈瑞珍 综述 杨英珍 审校

(上海医科大学附属中山医院 上海市心血管病研究所 上海 200032)

摘要 动脉粥样硬化的病因学研究已成为心血管疾病研究的焦点。本文综述了动脉粥样硬化病因学的最新研究进展,分别从人巨细胞病毒分子生物学特性、血清流行病学、分子生物学研究以及心脏移植后人巨细胞病毒感染可加速冠状动脉粥样硬化等方面阐述了人巨细胞病毒感染与动脉粥样硬化的关系,为临床诊断及防治奠定了基础。

关键词 巨细胞病毒; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是心血管系统的常见疾病,临床分析及流行病学研究表明:吸烟、高血压、糖尿病、高胆固醇及其脂等可促发或加剧动脉粥样硬化,控制这些“促危因子”(enhancing risk factors)可抑制动脉粥样硬化原发病灶的发展。然而迄今为止,对动脉粥样硬化的原发因素及其可能的机制尚不清楚。Ross^[1]曾认为粥样硬化可能与血管组织损伤有关。Penn^[2]发现粥样硬化病灶组织内DNA可使正常小鼠细胞转化,表明粥样硬化斑块中存在有转化基因。Fabricant^[3]用鸟类淋巴瘤病毒(Marek's disease virus, MDV)在鸡体内诱生出动脉粥样硬化。七十年代, Benditt^[4]在感染鸡动脉壁中亦发现有MDV核苷酸序列,且其病灶中出现类似于人动脉粥样硬化中平滑肌细胞的广泛增殖。1983年, Shih^[5]用日本鹌鹑建立了动脉粥样硬化的另一动物模型。发现在这些相对近交系(extensively inbred)鹌鹑中,有的对胆固醇敏感,而有的却耐受。斑点杂交显示:在这些用胆固醇诱发动脉粥样硬化的鹌鹑中,其动脉或胚胎组织中均含有禽类疱疹病毒相关病毒,表明疱疹病毒科病毒感染是诱发动脉粥样硬化的重要因素。在人类,人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)与MDV同属疱疹病毒科(Herpesviridae),且具有一定的转化能力,因此有学者假设, HCMV感染可能为人动脉粥样硬化的启动因子^[6]。最近的研究进一步证实及阐明了HCMV在动脉粥样硬化病理变化中的重要作用。

1 HCMV 的分子生物学特性

HCMV为一含双股线性DNA的疱疹病毒科病毒, DNA大小约240 kb, 分子量为 1.5×10^8 Dalton, 基因组可分为长(L)、短(S)两大片段, 其两侧均含末端重复序列(TRs), 中间序列为单一序列(U_L及U_S)。由于HCMV可以静止持续及增殖状态存在于细胞内, 推测在HCMV基因组中存在有一些转录调控基因, 在增殖的病毒感染中病毒基因组转录及翻译具有时相性, 分为即刻早期(IE、 α)、早期(E、 β)及晚期(L、 γ), 其相应的基因组称为即刻早期、早期及晚期基因^[7]。

HCMV感染宿主细胞后首先进行转录的是IE基因, 其转录单位主要位于基因图谱单位(map unit, MU) 0.66~0.77之间, 在MU 0.732~0.751中含有两个顺序相连的转录单位—IE₁及IE₂, 其上游区有一约800 bp大小的启动/调节基因, 该基因同时具有增强子功能, 它们在保护病毒DNA免受DNase I降解, 调控病毒基因组的转录中起重要作用。IE₁是主要的IE基因, 位于MU 0.739~0.751之间, 约2.8 kb, 转录一1.95 kb大小的mRNA, 其中含一491 kb大小的ORF, 编码的68~72 KD磷酸化蛋白为膜相关蛋白^[8]。IE₂位于MU 0.728~0.738之间, 通过交替剪接机制与IE₁部分基因连接, 分别转录22.5 kb及1.70 kb大小的mRNA, 编码病毒蛋白PP82及PP54。此外, 有报道IE₂亦转录一1.4 kb大小的mRNA, 编码一28 kb蛋白。这些蛋白的合成可调节病毒基因的转录, 并刺激随后发生的病毒基因和宿主细胞基因的表达。

E基因的转录在感染后约2小时即已开始, 并贯穿整个病毒感染期。在MU 0.011~0.032、0.035~0.040之间均有E基因转录的mRNA, 但无相应的转译产物^[9]。在MU 0.682~0.709之间, 转录的E基因mRNA编码四种磷酸化蛋白质, 其功能可能与病毒复制调节有关。最新发现在HCMV E基因中存在有一些与其它疱疹病毒(HSV、EBV等)基因同

源的序列。因此,临床上以检测 E 基因来判断特异性 HCMV 感染的意义不大。

HCMV L 基因的转录及翻译较为活跃,编码蛋白较多,其中基质一被覆蛋白(matrix-tegment protein)较为重要,其主要编码基因位于 MU 0.63~0.65、0.50~0.51、0.402~0.423、0.160~0.186 之间,分别编码磷酸化蛋白 PP28、PP65、PP71、PP64、PP150、PP64、PP65 与蛋白酶的活性有关,它们在转录调控病毒 DNA 合成以及病毒包装中起重要作用,同时也对宿主细胞蛋白质有一定的修饰作用^[10]。PP28、PP150 具有很高的亲水性及免疫原性^[11],它们虽无中和病毒的能力,但却在细胞介导的免疫反应中起重要作用。

HCMV 包膜是由三个包膜糖蛋白复合物 GC I、GC II、GC III 组成的脂质双层膜。GC I 由位于 MU 0.344~0.40 之间的 L 基因编码,而 GC II 的编码基因则位于 U_s 区,其产物可以二硫键连接,形成分子量大小不等的糖蛋白复合物,与 HCMV 免疫应答有关。GC III 是由 GP₈₈、GP₁₁₆ 组成,GP₁₁₆ 基因位置尚不清楚,可能与编码 MHC I 类抗原 α 链的基因同源。GP₈₈ 由位于 MU 0.45~0.47 之间的基因编码,实验显示,抗 GP₈₈ 的单克隆抗体 IG6 即使无补体存在亦可中和 HCMV 的感染,表明 GP₈₈ 可能为 HCMV 包膜蛋白中十分重要的抗原决定簇,与抗病毒免疫有关^[12]。

2 HCMV 与动脉粥样硬化关系的研究进展

自 Fabricant^[3]用 MDV 在鸡体内成功诱发动脉粥样硬化以来,人们就 HCMV 与人类动脉粥样硬化的关系用血清流行病学方法及最新分子生物学技术进行了研究,取得了重要进展。

2.1 血清流行病学研究

早在1965年,Melnick^[13]就曾试图在人类动脉粥样硬化活检组织中寻找可能的相关病毒,结果未能如愿。15年后,他们利用体外细胞培养技术将病灶及未感染组织分别进行培养,然后用免疫学方法检测 HCMV 抗原,结果病灶周边组织中有52%检出 HCMV 抗原而动脉粥样硬化病灶组织中仅有29% HCMV 抗原阳性。在鸡中,Fabricant^[3]亦得到相同的结论。1987年,Adam 选择了340例动脉粥样硬化前临床期(Preclinical)改变者(无临床症状但动脉管壁二倍增厚)进行病例一对照研究,测定 HCMV 抗体。结果发现病例组抗 CMV AD₁₆₉株总抗原、抗体阳性率显著高于对照组,且 HCMV 抗体水平并不因胆固醇脂类等因素而改变,表明 HCMV 感染在动

脉粥样硬化中起关键作用。

2.2 分子生物学研究

尽管日益增多的血清学及免疫组织化学研究证据表明 HCMV 与动脉粥样硬化密切相关,然而两者间更为直接的病因学联系的证据则来自近年来对其所进行的分子生物学研究。早在1983年,Benditt 就已建立了检测动脉组织中疱疹病毒科 HSV、CMV 及 EBV 核苷酸序列的原位杂交技术。应用这一技术,Petrie 在动脉粥样硬化组织培养的细胞中检测出 HCMV DNA 序列。Yamashiroya^[14]则在20例意外损伤者早期动脉粥样硬化中检测出8例冠状动脉及7例胸主动脉 HCMV 阳性。Hendrix^[15]检测了44例 III 级动脉粥样硬化患者,结果19例(43.2%) HCMV DNA 阳性,这些研究均表明 HCMV 可存在于动脉管壁细胞中,在动脉粥样硬化中起重要作用。

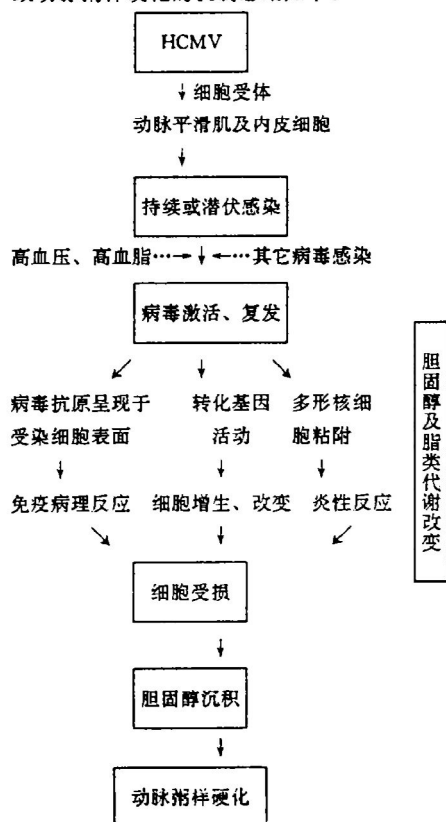
DNA 原位杂交技术不仅可反应出病毒感染频率,同时也可显示病毒易感部位及细胞,但其操作相对繁琐。Petrie^[15]、Yamashiroya^[14]和 Hendrix^[16]均曾试图用 DNA 斑点杂交技术检测 HCMV,结果阳性率却显著低于原位杂交(18%~32%),其原因可能是因为原位杂交中组织切片未经 RNase 处理,结果导致不仅 DNA-DNA 杂交,同时亦有 mRNA-DNA 杂交,经 RNase 处理后,阳性率降低。

最近,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)已逐渐应用于动脉粥样硬化中 HCMV 的研究。根据所用引物的不同,PCR 技术可分别检测 HCMV 即刻早期(IE)及晚期(L)基因。Hendrix 应用这两对引物分别检测了轻型动脉粥样硬化(最重达 I 级)及 III 级动脉粥样硬化患者动脉组织 DNA 中 HCMV DNA 同源序列,结果34例轻型患者中18例(53%)含有 IE 基因序列;30例 III 级患者中27例 IE 基因阳性,阳性率达90%。L 基因检出率与 IE 完全一致。Melnick 检测了135例动脉粥样硬化患者,结果也有76%阳性。Tanaka 报道用 PCR 技术检测8例血管炎及心包炎病人,有7例 HCMV DNA 阳性;33例动脉硬化性血管瘤有20例阳性。对照组16例中仅5例阳性。表明 PCR 技术更为灵敏及特异。并且 Tanaka 所检出的 HCMV DNA 仅见于动脉血管组织,外周血白细胞中无 HCMV DNA,这意味着 HCMV 可能潜伏感染于动脉管壁而非白细胞中。由于 HCMV 存在着潜伏感染,上述 PCR 法很难区别潜伏与周期性激活之 HCMV。1992年 Gozlan^[17]建立了一种反转录(reverse transcription, RT)PCR(RTPCR)来检测 HCMV L 基因转录物。其基本原

理是根据 HCMV DNA 转录的时间连续性, 即顺序转录 IE 基因、E 基因及 L 基因。因此 L 转录物 mRNA 的检出标志着病毒潜伏期的活动, 这就为研究 HCMV 与动脉粥样硬化的作用机制提供了有效的手段。

2.3 HCMV 可能导致动脉粥样硬化的机制

HCMV 的重要生物学特性是导致病毒持续性或潜伏感染, 并且具有转化能力。新近许多报道已在人动脉粥样硬化中检出 HCMV 抗原及病毒 DNA, 并证实这些抗原及 DNA 多见于病灶周边组织或轻度病灶中。Tumibowicz 发现人动脉平滑肌细胞中有 HCMV 潜伏及复制。Etingin^[18]的研究显示血管内皮细胞上存在有 HCMV 受体, 表明动脉壁中可能有 HCMV 的潜伏位点。Jahan^[19]最近用 PCR 技术检测出动脉粥样硬化患者中的 HCMV 转化基因 mtr I, 提示动脉组织细胞形态学的改变可能与 HCMV mtr I 转化细胞有关。动脉壁细胞感染 HCMV 后, Hajjar 发现胆固醇代谢可发生改变并在病毒感染局部积累。并且 HCMV 感染可吸附多形核白细胞诱生炎性反应致内皮细胞受损^[20]。据此, 对 HCMV 可能导致动脉粥样硬化的机制总结如下:



3 心脏移植后 HCMV 感染可加速冠状动脉粥样硬化

早在70年代初, 骨髓移植后 HCMV 感染致死率约达90%就已成为临床治疗的棘手问题^[21]。近年来, 大量研究表明, 许多经免疫抑制治疗后进行心脏移植的病人, 移植后第一个月内就出现 HCMV 感染性胃肠炎、肺炎等并发症。尤为严重的是移植后数年, HCMV 感染引起冠状动脉炎症反应, 终至心肌梗塞、猝死^[22]。Grattan^[23]曾报道387例经免疫抑制治疗后接受心脏移植患者的 HCMV 感染情况, 结果移植后即可发生 HCMV 感染, 7周达高峰, 比对照组更早更易发生动脉粥样硬化。随访10年, HCMV 感染后导致心肌梗塞死亡率达30%, 而未感染 HCMV 者死亡率仅为10%, 表明 HCMV 感染可能加速心脏移植后冠状动脉粥样硬化。目前, 控制移植后 HCMV 感染的主要手段是应用 HCMV 特异性免疫球蛋白及抗病毒药物—ganciclovir。该药是一种开链式核苷, 对病毒的复制有潜在抑制作用, 是针对疱疹病毒科 HSV、HCMV、EBV、VZV 的特异性抑制剂^[24]。临床上曾应用 ganciclovir 治疗骨髓移植后 HCMV 感染的间质性肺炎, 疗效显著^[25]。受此启发, 1992年, Merigan^[25]对149例常规经免疫抑制治疗后行心脏移植的病人进行双盲实验, 76例用安慰剂, 73例用 ganciclovir 治疗, 结果在 HCMV 阳性血清病人中, 56例用安慰剂者26例(46%)于心脏移植后120天内发生冠状动脉粥样硬化, 而 ganciclovir 组仅9%(5/56)发病, 表明 ganciclovir 可减少心脏移植病人 HCMV 感染性疾病的发生率。

小结

本文分别从动脉粥样硬化动物模型、HCMV 分子生物学特性、免疫学、分子生物学研究以及心脏移植后可能加速冠状动脉粥样硬化等诸方面综述了近年来国外 HCMV 与动脉粥样硬化关系研究的最新进展。该研究旨在为进一步探讨病毒在动脉粥样硬化中的作用以及为应用疫苗或化疗根本控制动脉粥样硬化提供了基础, 同时也为心脏移植后 HCMV 感染的防治开辟了广阔的前景。

参考文献

- 1 Ross R, et al. The pathogenesis of atherosclerosis, an update. *New Engl. J Med*, 1986, 314: 488-500
- 2 Penn A, et al. Transforming gene in atherosclerotic plaque DNA. *PNAS USA*, 1986, 83: 7951~7955.
- 3 Fabricant CG, et al. Virus induced atherosclerosis.

- J Exp Med*, 1978, 148: 335~340.
- 4 Benditt EP, et al. Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaque. *PNAS USA*, 1973, 70: 1753~1756.
 - 5 Shih JCH, et al. Genetic selection general characterization and history of atherosclerosis-susceptible and-resistant Japanese quail. *Atherosclerosis*, 1983, 49: 41~53.
 - 6 Melnick JL, et al. Possible role of cytomegalovirus in atherogenesis. *JAMA*, 1990, 263: 2204~2207.
 - 7 Stinski MF, et al. Molecular biology of cytomegalovirus. In: Roizman B, ed. *The herpesviruses*. New York: Plenum Press, 1983, 67~113.
 - 8 Otto SM, et al. Subcellular localization of the major immediate early protein (IE₁) of human cytomegalovirus at early times after infection. *Virology*, 1988, 162: 478~482.
 - 9 Hutchinson NI, et al. Characterization of a major early gene from the human cytomegalovirus long inverted repeat predicted amino acid sequence of a 30 kDa protein encoded by the 1.2 kb mRNA. *Virology*, 1986, 55: 172~182.
 - 10 Britt WJ, et al. Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J Virol*, 1986, 59: 185~188.
 - 11 Meyer H, et al. Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus. *J Virol*, 1988, 62: 2243~2250.
 - 12 Rasmussen L, et al. Characterization of two different human cytomegalovirus glycoproteins which are targets for virus neutralizing antibody. *Virology*, 1988, 163: 308~318.
 - 13 Behbehani AM, Melnick JL, et al. Continuous cell strains derived from human atheromatous lesions and their viral susceptibility. *Proc Soc Exp. Biol Med*, 1965, 118: 759~763.
 - 14 Yamashiroya HM, et al. Herpesviridial in the coronary arteries and aorta of young trauma victims. *Am J pathol*, 1988, 130: 71~79.
 - 15 Hendrix MGR, et al. The presence of cytomegalovirus nucleic acid in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *Am J pathol*, 1989, 134: 1151~1157.
 - 16 Hendrix MGR, et al. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade II atherosclerosis. *Am J pathol*, 1990, 136 (1): 23~28.
 - 17 Gozlan J, et al. A reverse PCR method for detection of human cytomegalovirus late transcripts in cells infected *in vitro*. *J Viral Method*, 1992, 40: 1~10.
 - 18 Etingin OR, et al. Identification of a monocyte receptor on herpesvirus-infected endothelial cells. *PNAS USA*, 1991, 88: 7200~7203.
 - 19 Jahan N, et al. The human cytomegalovirus mtr I coliner region in strain Tanaka is transformation defective. *J Virol*, 1989, 63: 2866~2869.
 - 20 Span AHM, et al. The effect of cytomegalovirus infection on the adherence of polymorphonuclear leukocytes to endothelial cells. *Eur J Clin Invest*, 1989, 19: 542~548.
 - 21 Williams and Wilkins co. Ganciclovir/Immunoglobulin combination therapy for the treatment of human cytomegalovirus-associated interstitial pneumonia in bone marrow allograft recipients. *Transplantation*, 1988, 46: 905~907.
 - 22 Grattan MT, et al. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *J Am Med Assn*, 1989, 261: 3561~3566.
 - 23 Grattan MT, et al. Accelerated graft atherosclerosis following cardiac transplantation; clinical perspectives. *Clin Cardiology*, 1991, 14 (suppl I): 16~20.
 - 24 Thomas Matthews, et al. Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir. *Rev Inf Dis*, 1988, 10 (Suppl): 3.
 - 25 Merigan TC, et al. A controlled trial of ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after heart transplantation. *New Engl J Med*, 1992, 326: 1182~1186.