

单纯疱疹Ⅱ型病毒感染对血管平滑肌 细胞形态及合成胶原的影响

但青宏 赵莉莉 孙坚 朱朝晖 黄元伟

(浙江医科大学附属第一医院心血管研究室, 杭州 310003)

Effect of Herpes Simplex Virus Type II Infection on Morphology and Collagen Synthesis of Vascular Smooth Muscle Cells

DAN Qing-Hong, ZHAO Li-Li, SUN Jian, ZHU Zhao-Hui and HUANG Yuan-Wei

(Cardiovascular Institute, First Affiliated Hospital, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the possible role of HSV-Ⅱ in the etiology of atherosclerosis, the effects of herpes simplex virus type Ⅱ (HSV-Ⅱ) infection on morphology and collagen synthesis of smooth muscle cells (SMC) were observed.

Methods Bovine aortic SMCs in culture were infected with HSV-Ⅱ, using ^3H -proline incorporating into ^3H -hydroxyproline by SMC as a criterion of collagen synthesis in SMC.

Results The significant cytopathic effect (CPE) such as cell rounding, swallowing, focal necrosis and detachment was observed 24 h after infection; there was a significant decrease in the synthesis of collagen in bovine SMC at 24 h, 36 h and 48 h after infection compared to controls.

Conclusion The results suggested that HSV-Ⅱ may be one of the injurious agents of inciting atherosclerosis by inhibiting collagen synthesis in SMC as well as injury factor for SMC.

KEY WORDS Herpes simplex virus type Ⅱ;

Smooth muscle cell; Collagen; Atherosclerosis

摘要 为观察人单纯疱疹Ⅱ型病毒感染对培养的牛主动脉平滑肌细胞形态及合成胶原的影响,用50%组织培养感染量的病毒悬液于37℃感染培养的牛主动脉平滑肌细胞,于倒置显微镜和电镜下观察平滑肌细胞形态改变,以 ^3H -脯氨酸掺入平滑肌细胞合成的 ^3H -羟脯氨酸的量作为测定胶原的指标。结果发现,感染24 h后,平滑肌细胞逐渐出现细胞变圆、肿胀和局部坏死脱落等形态改变;感染24、36和48 h后平滑肌细胞胶原的含量与对照组相比明显降低。提示人单纯疱疹Ⅱ型病毒可能作为一种局部损害因子,抑制血管平滑肌细胞胶原合成,损害平滑肌细胞,可参与动脉粥样硬化的发病过程。

关键词 单纯疱疹Ⅱ型病毒; 血管平滑肌细胞; 胶原; 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是由于血管内皮细胞和平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)受各种因素损伤而发生的过度炎症性—纤维增生性反应^[1]。病毒感染就是其中一种损伤因素,在As患者的动脉粥样斑块细胞内已发现疱疹病毒的抗原及核酸^[2,3]。为探讨病毒感染与As发病的关系,本文观察了人单纯疱疹Ⅱ型病毒(herpes simplex virus type Ⅱ, HSV-Ⅱ)感染对体外培养的牛主动脉SMC形态改变及合成胶原的影响。

1 材料与方法

1.1 牛主动脉平滑肌细胞的分离培养

取无菌新鲜牛胸主动脉,用磷酸缓冲液洗去残血,沿纵轴剪开,刮去内膜,按胶原酶消化法^[4]分离、培养平滑肌细胞。本实验用第5~10代细胞。

1.2 病毒的扩增及感染效价的测定

非洲绿猴肾细胞(vero 细胞)在 100 mL 培养瓶中长成单层融合后,弃去原培养液,加入 HSV-Ⅰ 标准毒株(购自中国医学科学院病毒研究所)50 μ L,37℃ 吸附 1 h 后,弃去残留病毒液,再加入培养液继续培养 2~3 d,待细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)达Ⅲ时,将培养物于-70℃ 反复冻融四次,分装后于-70℃ 冰箱保存。病毒测定采用微量单层细胞病变法,在 96 孔培养板中进行,以 50% 组织培养感染量(TCID₅₀/mL)表示感染效价。按 Reed 与 Muench 方法计算 TCID₅₀/mL 为 $10^{-4.5}$,即 1:316228。

1.3 单纯疱疹Ⅰ型病毒感染平滑肌细胞

平滑肌细胞以 5×10^5 接种于 25 mL 细胞培养瓶,3 d 后长成融合单层,用 50 TCID₅₀/mL 的病毒悬液于 37℃ 感染吸附 1 h,然后弃去病毒悬液及培养液,继续常规培养,对照组只加培养液。

1.4 单纯疱疹Ⅰ型病毒感染对平滑肌细胞形态和超微结构的影响

取上述已感染 HSV-Ⅰ 的平滑肌细胞,常规培养 12 h、24 h、36 h 和 48 h 后于倒置显微镜下观察细胞病变效应;并于感染 24 h 时,分别行 HE 染色,制成电镜标本观察并摄片。

1.5 单纯疱疹Ⅰ型病毒感染对平滑肌细胞合成胶原的影响

取已感染 HSV-Ⅰ 的平滑肌细胞,弃病毒悬液,加入 0.2% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)-1640 培养液轻洗细胞层 3 次,并用该培养液继续培养,对照组不加病毒悬液。两组同时加入 10 kCi/L ³H-脯氨酸(中国科学院原子能研究所产品,放射比活性为 0.33 Ci/mol),分别在培养 12 h、24 h、36 h 和 48 h 移出培养液后测定胶原的含量^[4]。

2 结果

2.1 单纯疱疹Ⅰ型病毒感染后平滑肌细胞形态的改变

正常 SMC 多为长梭形,融合单层时呈“峰谷结构”。HSV-Ⅰ 感染 12 h 后,细胞形态与对照组相比无明显改变,但培养 24 h 后,细胞逐渐变圆、肿胀,局部出现灶性坏死及脱落等病变效应,HE 染色显示细胞体积增大和空泡样变(图 1, Figure 1);电镜下可见细胞内存在病毒样颗粒(图 2, Figure 2)。培养 36 h 和 48 h 后,

上述变化更为明显。

2.2 单纯疱疹Ⅰ型病毒感染后平滑肌细胞合成胶原的改变

如图 3(Figure 3)所示,单纯疱疹Ⅰ型病毒感染 12 h 后,SMC 胶原的合成减少,但与对照组相比没有显著性差异。培养 24 h、36 h 和 48 h SMC 胶原的含量与对照组相比明显降低($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。



Figure 1. HE staining of smooth muscle cells after HSV-Ⅰ infection(400 \times).



Figure 2. The electron microscopic figure of bovine aortic SMCs at 24 h after infection HSV-Ⅰ (25000 \times).

3 讨论

大量流行病学及临床资料表明,单纯疱疹病毒感染与 As 之间存在一定的联系。Benditt 等^[5]从接受冠状动脉搭桥手术病人的动脉斑块细胞中检测出单纯疱疹病毒 DNA,阳性率为 10%,

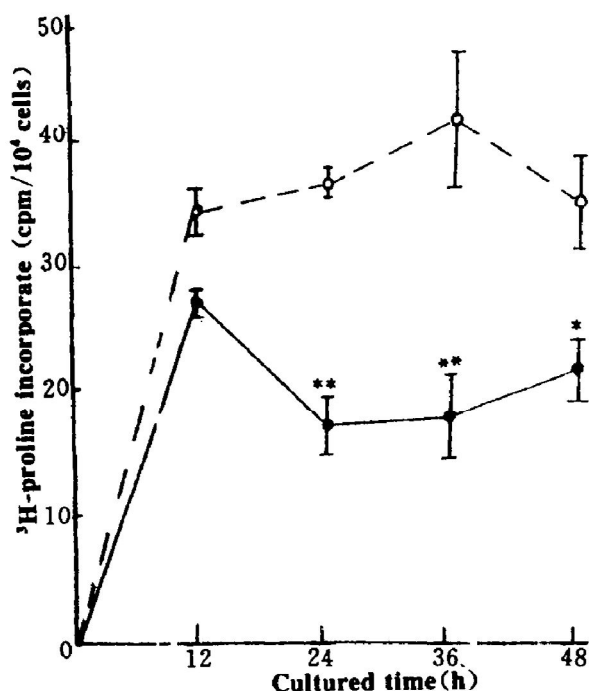


Figure 3. Effect of HSV-1 infection on collagen synthesis in bovine aortic smooth muscle cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$). ---: HSV-1 infection group, o—o: control group. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with control group.

而 HSV-1 的检出率为 50%。Hendrix 等^[6]采用多聚酶链反应技术发现疱疹病毒的即刻早期基因和晚期基因序列同时存在于 As 患者血管壁斑块细胞中,且严重 As(Ⅲ度)患者 DNA 阳性率为 90%,高于轻度 As 患者(阳性率 53%),这表明疱疹病毒可能作为一种局部损害因子长期潜伏在动脉壁细胞中。

本结果表明,50 TCID₅₀/mL 浓度的 HSV-1 能在体外感染培养的牛主动脉 SMC,并且在感染 24 h 后,SMC 出现肿胀、变圆,局部灶性坏死脱落等形态改变,进一步支持上述观点。

HSV-1 感染体外培养的动物细胞后,可抑制宿主细胞蛋白质、DNA 以及 RNA 的合成^[7],该抑制作用可分为两期,即早期和晚期,前者不需要病毒合成新的蛋白质,此期宿主细胞 mRNA 非功能性减少的机制尚不清楚;后者需要

病毒蛋白质的合成,并导致宿主细胞 mRNA 的降解。Macarak 等^[8]发现 HSV-1 能感染体外培养的血管内皮细胞,且内皮细胞胶原的合成量明显降低,而胶原的降解并未增加。

本实验结果表明,感染 HSV-1 的牛主动脉 SMC 胶原的含量在感染 24 h、36 h 和 48 h 后与对照组相比明显降低,与 Macarak 等^[8]的结果一致。提示 HSV-1 感染血管 SMC,可能作为一种局部损害因子,通过抑制蛋白质、DNA 和 RNA 的合成来抑制血管 SMC 胶原合成,从而损害 SMC,在 As 的发病过程中起一定作用。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801.
- 2 Visser MR, Vercellotti GM. Herpes simplex virus and atherosclerosis. *Eur Heart J*, 1993, **14**(Suppl k): 39.
- 3 Hendrix MGR, Dormans PH, Kitslaar P, et al. The presence of cytomegalovirus nucleic acids in arterial walls of atherosclerotic and nonatherosclerotic patients. *Am J Pathol*, 1989, **134**: 1151.
- 4 但青宏, 黄元伟, 楼定安, 等. 内皮细胞条件培养液对平滑肌细胞合成胶原的影响. *中国病理生理杂志*, 1993, **9**(4): 498.
- 5 Benditt EP, Barrett T, McDougall JK. Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, **80**: 6386.
- 6 Hendrix MGR, Dormans PH, Kitslaar P, et al. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol*, 1990, **136**: 23.
- 7 Fenwick ML, Clark J. Early and delayed shut-off of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex virus. *J Gen Virol*, 1982, **61**: 121.
- 8 Macarak EJ, Friedman HM, Kefalides NA. Herpes simplex virus type 1 infection of endothelium reduces collagen and fibronectin synthesis. *Lab Invest*, 1985, **53**(3): 280.

(1997-12-08 收到, 1998-04-28 修回)