

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0537-04

•临床研究•

巨细胞病毒感染参与动脉粥样硬化发生的机制

许从峰^{1,2}, 牛玉宏¹, 罗育坤¹, 熊思东², 杨英珍¹, 陈灏珠¹, 葛均波¹

(1. 复旦大学附属中山医院心血管病研究所; 2. 复旦大学上海医学院免疫学系, 上海市 200032)

[关键词] 内科学; 巨细胞病毒感染与动脉粥样硬化的关系; 聚合酶链式反应; 巨细胞病毒; 动脉粥样硬化; 趋化因子

[摘要] 探讨巨细胞病毒感染与动脉粥样硬化的相关性及其可能机制。酶联免疫吸附试验检测一个大样本病人血清中的抗人巨细胞病毒的 IgG 抗体以及 C-反应蛋白, 同时用聚合酶链式反应检测动脉粥样硬化病变中人巨细胞病毒特异性的即时早期基因, 探讨巨细胞病毒感染和动脉粥样硬化的关系; 采用反转录聚合酶链式反应检测人巨细胞病毒感染对内皮细胞趋化因子表达的影响。结果发现动脉粥样硬化组血清中的人巨细胞病毒的阳性率显著高于非动脉粥样硬化组(分别为 82.2% 和 61.0%, $P=0.02$); 动脉粥样硬化患者血清中的 C-反应蛋白水平显著高于无动脉粥样硬化的对照组病人(5.912 ± 3.795 mg/L 比 2.871 ± 1.761 mg/L, $P=0.000$); 而且动脉粥样硬化斑块中人巨细胞病毒基因出现率显著高于正常血管组织(13/15 比 2/7, $P=0.01$)。人巨细胞病毒感染还可上调内皮细胞 ECV-304 表达单核细胞趋化蛋白 1 和不规则趋化因子。表明人巨细胞病毒感染参与动脉粥样硬化的形成和发生, 可能与入巨细胞病毒上调内皮细胞趋化因子表达有关。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Investigating the Mechanism of Atherogenesis with Cytomegalovirus Infection

XU Cong-Feng^{1,2}, NIU Yu-Hong¹, LUO Yu-Kun¹, XIONG Si-Dong², YANG Ying-Zhen¹, CHEN Hao-Zhu¹, and GE Jun-Bo¹

(1. Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University; 2. Department of Immunology, Center for Gene Immunization and Vaccine Research, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Cytomegalovirus; Atherosclerosis; Chemokines; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between human cytomegalovirus (HCMV) infection and atherogenesis and the putative mechanism. **Methods** The HCMV IgG and C-reactive protein (CRP) of subject serum and the existence of HCMV immediate early (IE) gene in the atherosclerotic plaque were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). The expression of chemokines in endothelial cells after HCMV infection was also studied.

Results The positive ratio of HCMV IgG was significantly higher in atherosclerosis group than that in non-atherosclerosis group (82.2% vs 61.0%, $P=0.02$); the serum CRP level of atherosclerosis group was significantly higher than that of non-atherosclerosis (5.912 ± 3.795 mg/L vs 2.871 ± 1.761 mg/L, $P=0.000$); HCMV-specific gene in atherosclerotic plaque was much more frequently detected than that in normal vascular tissue (13/15 vs 2/7, $P=0.01$). HCMV infection could upregulate the expression of chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and fractalkine in endothelial cell ECV-304.

Conclusions HCMV infection is involved in the pathogenesis of atherosclerosis, which may be mediated by up-regulated expression of chemokines in ECV-304 after HCMV infection.

动脉粥样硬化是一种进行性疾病, 以脂质和纤维成分在大动脉血管壁的聚集为特征。虽然流行病学研究显示动脉粥样硬化有多种危险因素, 但其病因学仍未完全明了^[1-3]。大量的证据表明, 炎症反应在动脉粥样硬化发生的过程中发挥重要作用^[4,5]。已有流行病学研究提示, 病原体如肺炎衣原体、幽门

螺旋菌等均可能参与动脉粥样硬化的发生发展, 但仍需进一步证实。作为一种常见病毒, 人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)虽然在免疫功能正常的个体感染通常为潜伏感染, 但在免疫功能低下的个体如爱滋病病人、器官移植病人其感染通常是致命性的^[6]。在动脉粥样硬化发生的过程中, 单核细胞等向内皮下的浸润是关键因素, 在这个过程中, 趋化因子发挥了重要作用^[7]。HCMV 可感染单核/巨噬细胞、内皮细胞以及平滑肌细胞, 因此我们推测 HCMV 可能通过改变内皮细胞趋化因子的表达参与动脉粥样硬化的发生。我们在本研究中对 HCMV 感染是否参与动脉粥样硬化的发生做进一步的研

[收稿日期] 2003-03-13 [修回日期] 2003-07-09

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(G2000056903)资助

[作者简介] 许从峰, 男, 1974 年出生, 河南省人, 博士研究生, 主要从事心血管疾病的免疫学机制研究; E-mail: cxfush@sina.com。牛玉宏, 女, 1969 年出生, 山东省人, 副研究员, 主要从事心血管疾病的炎症反应。葛均波, 1962 年出生, 教授, 博士研究生导师, 长江学者特聘教授, 课题负责人, 本文通讯作者; Tel: (021) 64041990-2745, E-mail: jlbge@zshospital.net。

究。研究结果显示, HCMV 感染可促进动脉粥样硬化的发生, 这可能是通过改变内皮细胞趋化因子表达起作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人脐静脉内皮细胞 ECV-304, 以含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养; HCMV: AD169 株, 在人成纤维细胞 MRC-5 上培养。HCMV IgG、IgM 以及 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP) 检测试剂盒购自 DSL 公司; 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自 Takara 公司; TRIzol 试剂购自 GIBCO 公司。

1.2 临床研究对象

共有 468 例病人纳入本研究。本研究的病人经过冠状动脉造影可分为冠状动脉粥样硬化组和非冠状动脉粥样硬化的对照组。本研究纳入分析的动脉粥样硬化的危险因素包括年龄、性别、吸烟史、糖尿病、高胆固醇、高血压、家族史以及 CRP 水平。

1.3 人巨细胞病毒特异性抗体 IgG 的检测

所有血清标本均分装冻存于 -70°C , 待测。血清中 HCMV 特异性的抗体 IgG 采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.4 C-反应蛋白的检测

血清中的 CRP 采用 ELISA 法检测, 具体操作按试剂盒说明书进行。

1.5 动脉粥样硬化斑块组织中人巨细胞病毒检测

病人手术中取得的冠状动脉血管组织共 22 例, 其中有动脉粥样硬化病变的有 15 例, 其余 7 例无动脉粥样硬化。从血管组织中提取高分子量的 DNA 用于聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增检测 HCMV 基因。上游引物: $5'-\text{CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC}-3'$; 下游引物: $5'-\text{CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC}-3'$ 。扩增条件为: $95^{\circ}\text{C } 45\text{ s} \rightarrow 70^{\circ}\text{C } 45\text{ s} \rightarrow 72^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$, 共 35 个循环。PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 拍照。

1.6 病毒的感染

待细胞铺满瓶壁后, 以 3 感染复数(multiplication of infection, MOI) 的 HCMV 感染细胞, 1 h 后, 磷酸盐缓冲液洗 3 次, 加新鲜培养液继续培养至实验所需的时间。

1.7 趋化因子表达的检测

ECV-304 经 HCMV 刺激不同时间后提取其总

RNA。按试剂盒说明书检测单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的表达, 管家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 做为对照。第一链合成按试剂盒说明书操作。引物序列如下: GAPDH 上游引物, $5'-\text{CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG}-3'$, 下游引物, $5'-\text{CCA CTG ACA CGT TGG CAG TG}-3'$; MCP-1 上游引物, $5'-\text{CAG CCA GAT GCA ATC AAT GC}-3'$, 下游引物, $5'-\text{GTG GTC CAT GGA ATC CTG AA}-3'$; 不规则趋化因子(fractalkine) 上游引物, $5'-\text{CCG GAG CTG TGG TAG TAA TTC A}-3'$, 下游引物, $5'-\text{GGC GTC AAA GGG AAC CTC}-3'$ 。PCR 条件均按下述条件: $95^{\circ}\text{C } 45\text{ s} \rightarrow 55^{\circ}\text{C } 45\text{ s} \rightarrow 72^{\circ}\text{C } 1\text{ min}$, 共 35 个循环。PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 用 Tanon 凝胶分析系统分析。

1.8 统计学分析

所有的分析均使用 SPSS 软件包。HCMV 特异性抗体以及动脉粥样硬化之间的统计采用偏相关分析, 定量资料采用 t 检验分析。

2 结果

2.1 临床统计分析

468 例病人被纳入本研究。304 例为动脉粥样硬化, 164 例为非动脉粥样硬化。在动脉粥样硬化组中, 253 例(82.2%) HCMV IgG 阳性; 而在非动脉粥样硬化组中, HCMV IgG 阳性率仅为 61.0% (100/164)。利用偏相关分析, 平衡 7 种常见的动脉粥样硬化危险因素(年龄、性别、吸烟、糖尿病、高血脂、家族史以及高血压)后, 动脉粥样硬化和 HCMV IgG 的阳性率显著相关($P=0.02$)。

2.2 动脉粥样硬化斑块组织中人巨细胞病毒基因的检测

共有 15 例冠状动脉粥样硬化的组织标本, 7 例正常的血管组织标本。提取血管组织中的高分子量的 DNA, 采用 PCR 扩增检测 HCMV 特异性基因(图 1, Figure 1)。在 15 例冠状动脉粥样硬化的组织标本中, 有 13 例(83.3%) 标本可检测到 HCMV 特异性基因; 而在 7 例正常的血管组织中, 只有 2 例(28.6%) 可检测到 HCMV 特异性基因。统计学分析二者有显著相关性($P=0.01$)。

2.3 C-反应蛋白的水平与动脉粥样硬化以及人巨细胞病毒感染的关系

高水平的 CRP 是炎症反应的重要指标。我们的研究结果表明, 动脉粥样硬化患者血清中的 CRP

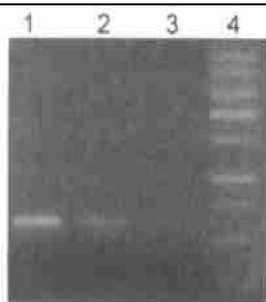


图 1. 人巨细胞病毒特异性基因聚合酶链式反应电泳图谱

1: 阳性对照(扩增自 HCMV DNA); 2, 3: 样本; 4: 标准分子量。

Figure 1. Electrophoresis of PCR products amplified from HCMV-specific gene

水平显著高于无动脉粥样硬化的对照组病人 (59.122 ± 37.945 比 28.708 ± 17.612 , $P = 0.000$)。而且 HCMV 阳性患者的 CRP 水平显著高于 HCMV 阴性患者 (56.482 ± 38.203 比 43.384 ± 33.608 , $P = 0.001$)。

2.4 人巨细胞病毒的刺激对内皮细胞表达趋化因子的影响

ECV-304 可组成性的表达 MCP-1, HCMV 感染 ECV-304 后 4 h, MCP-1 的表达明显升高, 8 h 后达到高峰, 12 h 已有所下降。不规则趋化因子的表达呈大致相同的趋势, 但 4 h 已达到高峰(图 2, Figure 2)。

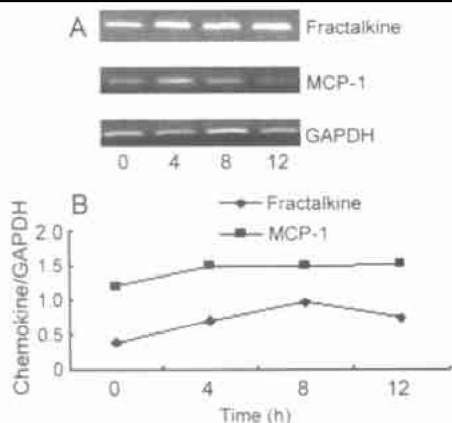


图 2. 人巨细胞病毒感染对内皮细胞 ECV-304 表达趋化因子单核细胞趋化蛋白 1 和不规则趋化因子的影响 A 图示:

0: 无 HCMV 感染; 4: HCMV 感染 4 h; 8: HCMV 感染 8 h; 12: HCMV 感染 12 h。B 图示: MCP-1 和不规则趋化因子表达的定量。

Figure 2. The expression of MCP-1 and fractalkine in ECV-304 after HCMV infection

3 讨论

虽然已有流行病学和病理学提示巨细胞病毒参与动脉粥样硬化的发生, 但 HCMV 和动脉粥样硬化发病的关系却争议颇大。在此, 我们通过一个 468 例的大样本病例从血清流行病学水平和分子生物学

水平研究 HCMV 和动脉粥样硬化的相关性, 并探讨了 HCMV 诱导的炎症反应可能参与的机制。

本研究的结果显示, HCMV 特异性的 IgG 抗体在冠状动脉粥样硬化人群血清中的阳性率明显高于非冠状动脉粥样硬化人群。HCMV 在普通人群感染率即可达 60% 以上, IgG 特异性抗体作为反映 HCMV 感染的重要指标, 具有良好的诊断价值。本研究通过 ELISA 检测不同人群中 HCMV IgG, 发现动脉粥样硬化人群中的 HCMV IgG 阳性率可达 80% 以上。

我们的研究表明, 动脉粥样硬化患者血清中的 CRP 水平显著高于无动脉粥样硬化的对照组病人, 且 HCMV 阳性患者的 CRP 水平显著高于 HCMV 阴性的患者。这说明 HCMV 感染可引起炎症反应(CRP 水平的升高), 而炎症反应(CRP 水平的升高) 又是引起动脉粥样硬化的重要因素^[8,9], 表明 HCMV 的感染可能是参与动脉粥样硬化的重要因素之一。

由于血清流行病学研究不能反映组织特异性, 为了获得更直接的证据, 本研究通过 PCR 检测病变组织中的 HCMV 特异性基因来确定 HCMV 是否为组织特异性的。结果表明 HCMV 基因可在 86.7% 的动脉粥样硬化斑块组织中检测到, 而在正常的血管组织中只有 28.6%, 显著低于动脉粥样硬化斑块中的检出率。

病原体存在于动脉粥样硬化斑块中并不能证明其在发病中起作用, 因为其可能只作为“旁观者”。因此我们有必要进一步探讨其机制。虽然已有研究探索了 HCMV 参与动脉粥样硬化的机制^[10], 但由于动脉粥样硬化疾病本身的复杂性, 往往有多种机制参与。为了深入研究 HCMV 参与动脉粥样硬化发病的机制, 本研究检测了 HCMV 对内皮细胞表达趋化因子的影响。趋化因子是一类小分子的具有趋化作用的细胞因子, 可使白细胞定向迁移, 在炎症反应中发挥重要作用^[11]。趋化因子通过使炎症细胞的定向迁移也参与动脉粥样硬化的发病。动脉粥样硬化斑块组织中可检测到上调表达的 MCP-1^[12], MCP-1 可能通过募集单核细胞至血管内皮下从而加速动脉粥样硬化的发生^[13]。不规则趋化因子在动脉粥样硬化发生中同样非常重要, 如果敲除其受体 CX3CR1, 可使 LDLR 基因敲除小鼠的动脉粥样硬化斑块大大缩小^[14]。我们的研究表明, HCMV 感染内皮细胞可上调 MCP-1 和不规则趋化因子的表达, 从而有利于单核细胞进入内皮下。

综上所述, 本研究进一步证明 HCMV 感染可促进动脉粥样硬化的发生发展, 可能机制是通过改变

内皮细胞趋化因子的表达介导的。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New Engl J Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [2] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*, 2000, **407**: 233-241
- [3] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell*, 2001, **104** (4): 503-516
- [4] Roivainen M, Viik-Kajander M, Palosuo T, Toivanen P, Leinonen M, Saikku P, et al. Infections, inflammation, and the risk of coronary heart disease. *Circulation*, 2000, **101** (3): 252-257
- [5] Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*, 1997, **336** (14): 973-979
- [6] de Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, et al. Summary of the II international symposium on cytomegalovirus. *Antiviral Research*, 1998, **39** (3): 141-162
- [7] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 1998, **2** (2): 275-281
- [8] Yeh ET, Palusinski RP. C-reactive protein: The Pawn has been promoted to Queen. *Curr Rep Atherosclerol*, 2003, **5**: 101-105
- [9] 叶平, 王节, 尚延忠, 李云莲. C-反应蛋白与动脉粥样硬化的形成有关. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 146-148
- [10] Streblov DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 1999, **99** (5): 511-520
- [11] Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol*, 2001, **78**: 57-110
- [12] Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein 1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*, 1991, **88** (4): 1121-1127
- [13] 于光耀. 单核细胞趋化蛋白 1 及其在动脉粥样硬化中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (4): 341-345
- [14] Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*, 2003, **111**: 333-340

(此文编辑 曾学清)