

巨细胞病毒感染的载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 动脉粥样硬化发生的可能机制

陈瑞珍¹, 熊思东², 许从峰¹, 杨英珍¹, 邹云增¹, 葛均波¹, 陈灏珠¹

(复旦大学 1. 附属中山医院 上海市心血管病研究所 卫生部病毒性心脏病重点实验室, 2. 免疫学系, 上海市 200032)

[关键词] 病理学与病理生理学; 巨细胞病毒; 动脉粥样硬化; 趋化因子; 基因敲除

[摘要] **目的** 研究巨细胞病毒感染引起的免疫损伤导致动脉粥样硬化发生的可能机制。**方法** 载脂蛋白 E 基因敲除的 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠, 随机分成对照组、高脂饮食组、鼠巨细胞病毒感染组和高脂饮食+鼠巨细胞病毒感染组。在不同时间段分别处死小鼠, 截取主动脉, 利用逆转录聚合酶链反应、免疫组织化学等方法检测主动脉单核细胞趋化因子 1、生长相关癌基因 α 、Fractalkine 和调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子的表达。**结果** 第 8 周时, 巨细胞病毒感染后可显著提高生长相关癌基因 α 在主动脉的表达, 并可诱导 Fractalkine、活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子和单核细胞趋化因子 1 的表达, 而在高脂饮食+巨细胞病毒感染的小鼠主动脉组织中, Fractalkine 的表达较其它组明显升高。第 12 周时, 高脂饮食+巨细胞病毒感染组中 Fractalkine 和活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子和单核细胞趋化因子 1 的表达较其它组更高些。免疫组织化学结果发现, 高脂饮食后, 生长相关癌基因 α 、Fractalkine 和单核细胞趋化因子 1 的表达均有明显升高, 但 Fractalkine 的表达较局限, 单核细胞趋化因子 1 和生长相关癌基因 α 在整个血管壁都存在, 但以内膜较高。单纯巨细胞病毒感染组与高脂饮食组相似, 可诱导单核细胞趋化因子 1、生长相关癌基因 α 和 Fractalkine 的表达, 但不同的是 Fractalkine 的表达广泛存在。而高脂饮食+巨细胞病毒感染组单核细胞趋化因子 1、生长相关癌基因 α 和 Fractalkine 表达的升高更为明显, 尤其是斑块部位。**结论** 巨细胞病毒感染后通过调节趋化因子表达水平的改变, 从而促进炎症细胞的迁移, 促进动脉粥样硬化的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Mechanism of Murine Cytomegalovirus Infection Contributing to Atherogenesis in Apolipoprotein E Knockout Mice

CHEN Rui-Zhen¹, XIONG Si-Dong², XU Cong-Feng¹, YANG Ying-Zhen¹, ZOU Yur-Zeng¹, GE Jun-Bo¹, and CHEN Hao-Zhu¹

(1. Zhongshan Hospital, Fudan University Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases the Key Laboratory of Viral Heart Disease, Ministry of Public Health, Shanghai 200032, China; 2. Department of Immunology of Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Cytomegalovirus; Atherosclerosis; Chemokines; Gene Knockout

[ABSTRACT] **Aim** To study the immunologic injury mechanism of atherogenesis by murine cytomegalovirus (MCMV) infection. **Methods** Animal model of atherosclerosis (C57BL/6) with apolipoprotein E knockout mice were randomized to four groups: control group, hypercholesterol diet group, MCMV infection group, MCMV infection add hypercholesterol diet group, respectively. Mice from each group were sacrificed in different period. Portions of aortas were kept in -80°C . The expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), growth-related oncogene α (GRO- α), fractalkine (FKN) and regulated activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) in aortas were detected by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** In the 8th week, the expression of GRO- α in aorta tissues was significant by CMV infection, and the expression of FKN, RANTES and MCP-1 was induced. The expression of FKN was more significant in MCMV infection add hypercholesterol diet group than other groups. In the 12th week, the expression of FKN and RANTES was marked than others. Immunohistochemistry staining also showed that the expression of MCP-1, GRO- α and FKN was enhanced in atherosclerotic lesion, but expression of FKN was variable, and correlated with the atherosclerotic plaque. **Conclusion** MCMV infection could contribute to atherogenesis by inducing the expression of chemokines and enhance the migration of inflammatory cells.

[收稿日期] 2008-05-05 [修回日期] 2008-07-29

[基金项目] 国家自然科学基金(30571741);教育部新世纪优秀人才计划(NCET-06-0354);国家 973 项目(2007CB512003)

[作者简介] 陈瑞珍, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为病毒性心脏病的基础与临床研究, E-mail 为 chen.ruizhen@zs-hospital.sh.cn。熊思东, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为免疫与疾病。许从峰, 博士, 助理研究员, 研究方向为动脉粥样硬化的机制。

近年来, 越来越多的研究发现, 动脉壁的损伤及与此相关的炎症反应是动脉粥样硬化发生中的关键因素^[1]。有研究显示, 在动脉粥样硬化病变中, 巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染可引起炎症因子表达水平的升高^[2,3], 但是, 炎症细胞是如何迁移至血管内皮下参与动脉粥样硬化的发生, 其机制尚

不完全清楚。具有趋化作用的细胞因子家族—趋化因子可通过驱动、调节粘附分子的表达或/和直接趋化、吸引炎症细胞,导致炎症反应。外周血单核细胞迁入动脉内皮下间隙,分化成为巨噬细胞是动脉粥样硬化的最早事件。动脉粥样硬化中炎症细胞进入内膜均需趋化因子的作用^[4]。因此,本研究拟通过鼠 CMV 感染载脂蛋白 E 基因敲除小鼠来研究动脉粥样硬化发生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

逆转录聚合酶链反应试剂盒(Takara, 大连宝生物工程公司);ABC 免疫组织化学试剂盒(Vector Laboratories);Trizol(Gibco 公司);抗 MCP-1 抗体和抗 Fractalkine 抗体(R&D Systems);抗 GRO- α 抗体和抗 RANTES 抗体(Abcam 公司)。

1.2 细胞与病毒

小鼠来源的成纤维细胞 BALB 3T3 以含 10% 小牛血清、100 ku/L 青霉素、100 ku/L 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养;鼠 CMV-Smith 株在 BALB 3T3 中培养,待细胞单层中细胞病变效应达 70%~80%,反复冻融 3 次,10 kg 低温离心 30 min 以去除细胞碎片,上清即为病毒液,测定病毒滴度后分装, -70℃ 保存。

1.3 病毒滴度的测定

在 6 孔板中以 2×10^5 细胞/孔的密度铺板,培养过夜。同时将病毒原液 1 mL 按 10 倍进行序列稀释,从 10^{-5} ~ 10^{-9} 共 5 个浓度,每个浓度取 1 mL 稀释液加入 6 孔板,留 1 孔只加培养液作为对照。孵育 2 h 后,弃去培养液,加入 3 mL 1.25% 无菌琼脂使其覆盖培养板的底面,继续培养,隔天观察空斑形成情况。

1.4 动物模型的建立

载脂蛋白 E 基因敲除的 8 周龄 C57BL/6 雌性小鼠 60 只,购于北京大学实验动物中心,随机分为对照组、高脂饮食(含 2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、3% 蛋氨酸、8% 蛋黄粉和 8% 猪油)组、腹腔注射鼠 CMV (30×10^7 pfu/L) 组和高脂饮食+腹腔注射鼠 CMV 组。所有实验动物均饲养于复旦大学上海医学院动物实验中心 IVP 系统中,分别在饲养 8 周、12 周每组各处死 5 只小鼠,16 周时处死剩余的所有小鼠(鼠 CMV 组死亡 1 只)。处死前称重、采血,处死后分离主动脉,自主动脉根部至髂动脉分支处,完全除去与之相连的脂肪组织和结缔组织,迅速冻存于液氮中。

1.5 趋化因子的检测

提取主动脉组织总 RNA,具体步骤按试剂盒说明书进行。各趋化因子引物序列:单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 上游引物 5'-GCC ACC ATG CAG GTC CCT GTC AT-3', 下游引物 5'-CTA GTT CACCAC CT-3', 扩增产物 468 bp; Fractalkine (FKN) 上游引物 5'-GCC GCC ATG GCT CCC TCG CC-3', 下游引物 5'-TCA GCA GCT AGA TCC AGA TTG-3', 扩增产物 652 bp; 调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子(regulated on activation normal T cell expression and secreted, RANTES) 上游引物 5'-ACC ATG CAG AGC TCC ACA G-3', 下游引物 5'-GAC CTC AAC ATG ATT TG-3', 扩增产物 317 bp; 生长相关癌基因 α (growth related oncogene- α , GRO- α) 上游引物 5'-GAC CTC AAC ATG AAG ATT TG-3', 下游引物 5'-ACT CTC AGC CTA GAC ATG-3', 扩增产物 328 bp; GAPDH 上游引物 5'-CTG CAC CAC CAA CTG CTT AG-3', 下游引物 5'-GTC TGG GAT GGA AAT TGT GA-3', 扩增产物 660 bp; 干扰素 γ 上游引物 5'-ACA ATG AACGCT ACA CAC TG-3', 下游引物 5'-TCA AAC TTG GCA ATA CTC AT-3', 扩增产物 362 bp; 白细胞介素 4(interleukin-4, IL-4) 上游引物 5'-TCC ACG GAT GCG ACA AAA AT-3', 下游引物 5'-TGA ATC CAG GCA TCG AAA AG-3', 扩增产物 266 bp。PCR 反应条件:94℃ 变性 45 s $\rightarrow$ 55℃ 退火 45 s $\rightarrow$ 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳, Tanon 凝胶分析系统分析。

1.6 细胞因子的检测

为了研究 CMV 感染对机体免疫偏移的影响,对与 Th1 和 Th2 密切相关的干扰素 γ 和 IL-4 进行了 PCR 检测。实验条件同 1.4。

1.7 免疫组织化学检测

截取主动脉行冰冻切片后风干、丙醛固定 10 min, 0.3% H_2O_2 室温处理 10 min 以中和内源性过氧化物酶, 室温下 3% BSA 阻断 60 min, 洗涤后加一抗(1:100 稀释)孵育 60 min, 洗涤后加生物素化二抗孵育 30 min, 洗涤, 加入 ABC 试剂(1:100 稀释)孵育 30 min, 洗涤后苏木素复染, 封片。

1.8 统计学分析

定量资料采用 t 检验分析。

2 结果

2.1 小鼠体重和血清胆固醇的变化

高脂饮食组和 CMV 感染组小鼠体重缓慢增长,

尤以高脂饮食+ CMV 感染对小鼠体重的影响最为显著。随着载脂蛋白 E 基因敲除小鼠年龄的增长, 血清胆固醇水平逐渐升高, 尽管 CMV 感染组和高脂饮食组血清胆固醇均升高, 但前者与对照组相比差异无显著性, 而高脂饮食+ CMV 感染组血清胆固醇水平却显著升高($P < 0.01$)。

2.2 不同趋化因子 mRNA 的时空表达

第 8 周时, 对照组中 GRO- α 和 FKN 没有表达,

RANTES 和 MCP-1 的表达量也不高, CMV 感染后可显著提高 GRO- α 的表达, 并可诱导 FKN、RANTES 和 MCP-1 的表达, 且 FKN 的表达较其它组明显升高($P < 0.05$)。第 12 周时, 各组 GRO- α 、FKN、RANTES 和 MCP-1 均有表达, 高脂饮食+ CMV 感染组 FKN 和 RANTES 的表达较其它组更高($P < 0.05$)。第 16 周后, 各组趋化因子的表达改变与第 12 周时变化不明显(图 1)。

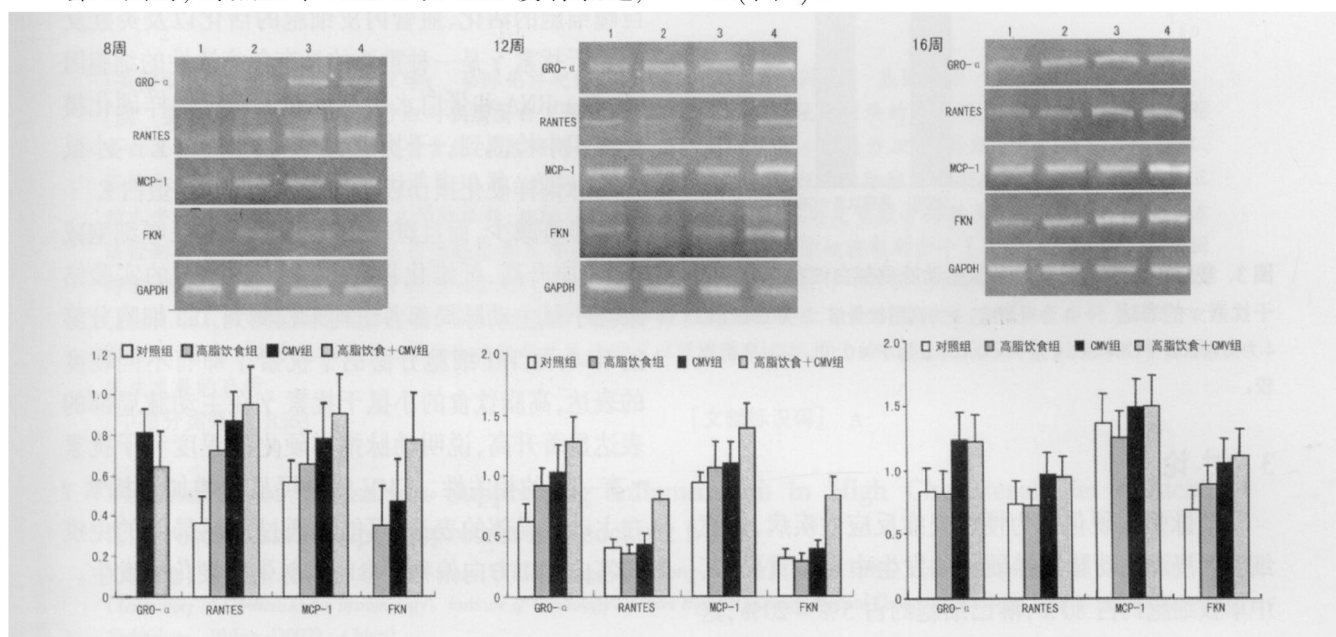


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉趋化因子的表达 1 为对照组, 2 为高脂饮食组, 3 为 CMV 组, 4 为高脂饮食+ CMV 组。

2.3 主动脉局部趋化因子蛋白的表达

对照组小鼠只有少量趋化因子的表达。高脂饮食后, GRO- α 、RANTES、MCP-1 和 FKN 的表达均有明显升高, 但 FKN 的表达较局限, MCP-1 和 GRO- α 在整个血管壁都存在, 但以内膜较高。CMV 感染与高

脂饮食组相似, 可诱导 MCP-1、GRO- α 、RANTES 和 FKN 的表达, 但不同的是 FKN 的表达广泛存在。而高脂饮食+ CMV 感染组 MCP-1、GRO- α 和 FKN 表达更高, 尤其是斑块部位(图 2)。

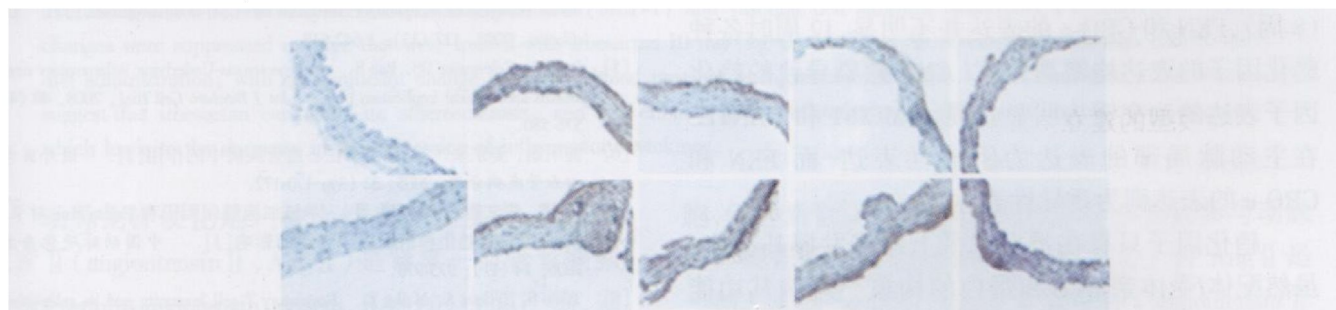


图 2. 免疫组织化学检测趋化因子在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉局部的表达($\times 400$) 上图为高脂饮食组, 下图为高脂饮食+ CMV 感染组。从左至右为对照、GRO- α 、RANTES、MCP-1 和 FKN 的表达。

2.4 主动脉局部白细胞介素 4 和干扰素 γ mRNA 的表达

各组 IL-4 均未见阳性信号, 但干扰素 γ 的表达则非常明显。高脂饮食组干扰素 γ 的表达升高,

CMV 感染后干扰素 γ 进一步升高, 而高脂饮食+ CMV 感染组干扰素 γ 的表达与 CMV 感染组差异无显著性(图 3)。

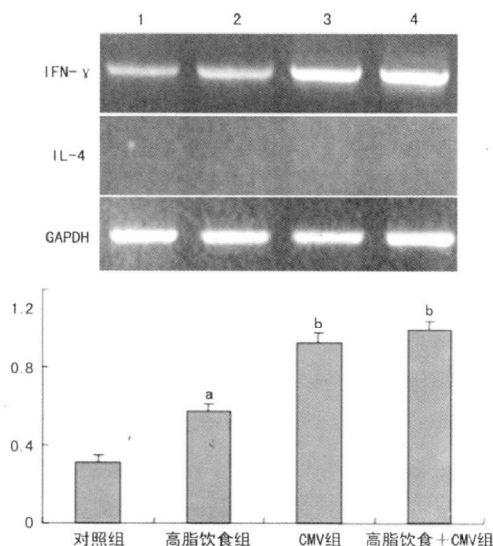


图3. 载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉局部白细胞介素4和干扰素 γ 的表达 1为对照组, 2为高脂饮食组, 3为CMV组, 4为高脂饮食+CMV组。a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化作为慢性炎症反应性疾病, 炎症细胞的浸润在动脉粥样硬化的发生中至关重要, 其中单核细胞约占80%, 淋巴细胞约占5%~20%, 这些细胞进入血管内膜均需要趋化因子的作用^[5,6], MCP-1及其受体在动脉粥样硬化形成过程中对巨噬细胞的聚集起重要作用, FKN参与了炎症细胞的附壁过程, 其对单核/巨噬细胞有强烈的趋化作用^[7]。本研究通过逆转录聚合酶链反应法研究了不同措施处理后不同时间点载脂蛋白E基因敲除小鼠主动脉相关趋化因子的表达变化, 结果表明CMV感染可诱导多种趋化因子表达改变。在动脉粥样硬化早期(8周), FKN和GRO- α 的表达并不明显, 12周时各种趋化因子的表达均增高, 尤以CMV感染导致的趋化因子表达的改变更为明显。提示MCP-1和RANTES在主动脉局部的表达为组成性表达, 而FKN和GRO- α 的表达则为诱导性表达。

趋化因子只有在蛋白水平上才能发挥其功能, 虽然配体/受体亲和力和蛋白的构象会影响其功能的发挥, 但趋化因子蛋白水平的变化常常影响其功能的发挥。本研究中, 12周时各种趋化因子的蛋白表达在不同处理组之间仍然有明显差异, CMV感染后趋化因子的表达比对照组明显升高, 同时动脉粥

样硬化的程度也比对照组严重, 而且趋化因子的蛋白水平和动脉粥样硬化的程度密切相关。高脂饮食可诱导趋化因子的表达升高, CMV感染可和高脂因素协同, 加重高脂饮食引起的动脉粥样硬化。

事实上, 在动脉硬化的早期损伤中, 即使内皮是完整的, 也有大量的T淋巴细胞和巨噬细胞同时出现, 进一步的研究发现, 这些T淋巴细胞大都是Th1细胞, 这些细胞通过分泌干扰素 γ 等细胞因子导致巨噬细胞的活化、血管内皮细胞的活化以及炎症反应。干扰素 γ 是一种重要的具有免疫活性的细胞因子, 在mRNA和蛋白水平都可在人动脉粥样硬化损伤组织中检测到。干扰素 γ $R^{-/-}$ 载脂蛋白E $^{-/-}$ 小鼠的动脉粥样硬化损伤较干扰素 γ $R^{+/+}$ 载脂蛋白E $^{-/-}$ 小鼠显著减少, 而且斑块组成明显不同, 巨噬细胞减少, 胶原升高, 纤维化程度增高^[8,9]。我们的实验结果在小鼠主动脉局部各组均未检测到Th2细胞分泌的IL-4, 而Th1细胞分泌的干扰素 γ 却有不同程度的表达, 高脂饮食的小鼠干扰素 γ 在主动脉局部的表达显著升高, 说明动脉粥样硬化的程度和干扰素 γ 有一定的相关性。CMV感染可显著增加干扰素 γ 在主动脉局部的表达, 可能是通过诱导局部的免疫应答向Th1方向偏移而参与动脉粥样硬化的发生。

[参考文献]

- [1] Corrado E, Novo S. Role of inflammation and infection in vascular disease [J]. *Acta Chir Belg*, 2005, **105** (6): 567-579.
- [2] Bent GL, Yurochko AD. Human CMV infection of endothelial cells induces an angiogenic response through viral binding to EGF receptor and beta 1 and beta 3 integrins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105** (14): 5 531-536.
- [3] Sun Y, Pei W, Welte T, et al. Cytomegalovirus infection is associated with elevated interleukin 10 in coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **179** (1): 133-137.
- [4] Saederup N, Chan L, Lira SA, et al. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2 $^{-/-}$ mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis [J]. *Circulation*, 2008, **117** (13): 1 642-648.
- [5] Patel S, Celemajer DS, Bao S. Atherosclerosis-Underlying inflammatory mechanisms and clinical implication [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40** (4): 576-580.
- [6] 曲明娟, 姜宗来. 趋化因子在心血管疾病中的作用[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2005, **32** (3): 170-172.
- [7] 黎娜, 朱文玲, 陈莲凤, 等. 单核细胞趋化因子和Fractalkine对平滑肌细胞增殖、趋化和组织因子表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, **14** (11): 975-978.
- [8] Taleb S, Tedqui A, Mallat Z. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis [J]. *J Intern Med*, 2008, **263** (5): 489-499.
- [9] Koga M, Kai H, Yasukawa H, et al. Postnatal blocking of interferon gamma function prevented atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Hyperten Res*, 2007, **30** (6): 259-267.

(此文编辑 文玉珊)