

[文章编号] 1007-3949(2010)18-09-0701-04

• 实验研究 •

# 人类巨细胞病毒在脐动脉血管平滑肌细胞中的增殖

李玲芳<sup>1</sup>, 陈华<sup>2</sup>, 邬国军<sup>3</sup>

(1. 中南大学湘雅医学院, 湖南省长沙市 410008 2 长沙市第三医院, 3 中南大学基础医学院微生物学系)

[关键词] 人类巨细胞病毒; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 移植物血管病

[摘要] 目的 研究人类巨细胞病毒对血管平滑肌细胞的感染性, 为人类巨细胞病毒致动脉粥样硬化及移植物血管病机制研究建立细胞模型。方法 自脐动脉分离血管平滑肌细胞, 以 1 个感染复数 (MOI) 的人类巨细胞病毒感染该细胞, 观察细胞病变效应, 以 RT-PCR 技术检测人类巨细胞病毒 IE 基因在平滑肌细胞内的表达, 同时以电镜技术检测平滑肌细胞内的病毒颗粒。结果 人类巨细胞病毒感染脐动脉血管平滑肌细胞后第 3 天即可出现细胞病变, 至第 8 天已出现明显的细胞病变效应, 以 RT-PCR 技术可从感染人类巨细胞病毒 AD169 株的平滑肌细胞内扩增出预期的产物, 经测序验证为人类巨细胞病毒 IE 基因, 以电镜技术可从感染人类巨细胞病毒 AD169 株的血管平滑肌细胞中观察到病毒颗粒。结论 人类巨细胞病毒 AD169 株可以感染人血管平滑肌细胞, 并复制出子代病毒颗粒。为人类巨细胞病毒致动脉粥样硬化及移植物血管病的机制研究提供了较好的实验依据及细胞模型。

[中图分类号] R37

[文献标识码] A

## Multiplication of Human Cytomegalovirus in Umbilical Arteries Vascular Smooth Muscle Cells

LI Ling-Fang<sup>1</sup>, CHEN Hua<sup>2</sup>, and WU Guo-Jun<sup>3</sup>

(1. Xiangya Medical School, Central South University, Changsha, Hunan 410008 China; 2. The Third Hospital of Changsha; 3. Department of Microbiology, the School of Basic Medical Sciences, Central South University)

[KEY WORDS] Human Cytomegalovirus; Atherosclerosis; Vascular Smooth Muscle Cells; Transplant Vasculopathy

[ABSTRACT] **Aim** To explore the infectivity of human cytomegalovirus (HCMV) in vascular smooth muscle cells and provide a cellular model to the mechanism research of atherosclerosis and transplant vasculopathy induced by this virus.

**Methods** Vascular smooth muscle cells were isolated from umbilical arteries and HCMV with 1 MOI was cocultured with these cells. The proliferation of virus in these cells was assured by cytopathic effect, the expression of HCMV IE gene, and virus particles observed by electric microscope. **Results** Cytopathic effect was observed three days post-infection, and HCMV immediate early (IE) gene was expressed in these cells post-infection by RT-PCR, the correctness was assured by DNA sequencing. With electronic microscope technique, the virus particles were observed in these cells.

**Conclusion** HCMV can infect vascular smooth muscle cells and establish proliferating infection. The work provides a model for the research of mechanisms of atherosclerosis and transplant vasculopathy induced by human cytomegalovirus.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种常见的心血管疾病, 其心脑血管并发症已成为致死、致残的主要原因。另外, 随着外科手术学及免疫学的发展, 器官移植已成为患者器官功能丧失后挽救患者生命, 提高患者生活质量的有效处理措施, 然而, 器官移植后移植物血管病的形成并导致局部缺血而引起移植物不能存活是器官移植失败以及导致移植患者不能长期存活的主要原因。目前一些新的研究表明, 微生物感染在动脉粥样硬化及移植物血管病的发病中

起非常重要的作用。然而, 人类巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 如何参与该疾病的发生目前仍不清楚, 建立人类巨细胞病毒感染血管平滑肌细胞模型对研究人类巨细胞病毒致动脉粥样硬化及移植物血管病形成的机制研究具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人类巨细胞病毒 AD169 株及人胚肺成纤维细胞为本室保存。DMEM 及 DMEM/F12(1:1) 培养基均为 Hyclone 产品; 羊抗人  $\alpha$  肌动蛋白抗体及免疫组织化学试剂盒为北京博奥森生物技术有限公司产品; 胎牛血清及新生牛血清为杭州四季青生物技术公司产品; 逆转录 (reverse transcription, RT) 试剂

[收稿日期] 2010-08-04 [修回日期] 2010-09-06

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金 (B2008-079)

[作者简介] 李玲芳, 中南大学湘雅医学院 2004 级八年制学生, E-mail 为 lingfang8624@yahoo.com.cn; 陈华, 副主任检验师, 主要从事医学检验临床、管理及研究工作, E-mail 为 chenhuua6808@163.com; 通讯作者邬国军, 博士, 副教授, 主要从事人类巨细胞病毒致病机制研究, E-mail 为 wuguojun@mail.csu.edu.cn

盒为东洋纺(上海)生物科技有限公司产品;人类巨细胞病毒立即早期(immediate early IE)基因 PCR 引物由上海英俊生物技术有限公司合成(序列为上游 5'-GCA GCG GCA GAA GAA GAT-3',下游 5'-TTG GTC ACG GGT GTC TCG-3',扩增产物长度为 414 bp); 2×Taq Plus PCR MasteM ix 为天根生化科技(北京)有限公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒为安比奥生物技术有限公司产品。

### 1.2 脐动脉血管平滑肌细胞的培养与鉴定

按文献[1]方法对脐动脉血管平滑肌细胞进行培养。细胞培养成功后制备爬片,用免疫组织化学技术检测 α 肌动蛋白以验证所获得的细胞确系平滑肌细胞。

### 1.3 病毒培养、毒力测定及感染性病毒数量测定

人胚肺成纤维细胞长成单层后,每瓶细胞(25 cm<sup>2</sup>)接种 0.2 mL 人类巨细胞病毒 AD169 株,逐日观察细胞病变,待细胞病变达“++++”时按常规方法收获病毒并进行毒力测定,并用噬斑实验对感染性病毒颗粒进行计数。

### 1.4 人类巨细胞病毒感染脐动脉血管平滑肌细胞及细胞病变的观察

血管平滑肌细胞长成单层后,常规消化后传代,传代后 12 h 左右接种病毒(细胞约 70% 覆盖),病毒接种量为 1 个感染复数(multiplicity of infection, MOI),37℃ 吸附 2 h(其间每隔半小时轻轻摇动一次)后补加含 2% 胎牛血清的 DMEM /F12 培养基维持液,继续培养,于感染后第 1 至第 8 天逐日观察细胞变化并照相。

### 1.5 RT-PCR 技术检测人类巨细胞病毒 AD169 株感染后血管平滑肌细胞中病毒 IE 基因的表达

按 1.3 的方法以人类巨细胞病毒 AD169 株感染血管平滑肌细胞,于感染后第 3 天去掉培养基,以磷酸盐缓冲液洗涤细胞 1 遍,按每 10 cm<sup>2</sup> 加入 1 mL Trizol 的比例加入 Trizol 将细胞裂解后抽提 RNA,逆转录成 cDNA 后以 PCR 技术检测人类巨细胞病毒 AD169 株 IE 基因的表达。PCR 扩增产物经凝胶回收纯化后送上海英俊生物技术有限公司测序以进行进一步验证。

### 1.6 电镜技术观察人类巨细胞病毒 AD169 株感染后脐动脉血管平滑肌细胞内病毒颗粒

于人类巨细胞病毒 AD169 株感染人脐动脉血管平滑肌细胞后的第 3 天去掉培养基,磷酸盐缓冲液洗涤细胞 1 遍,以细胞刮子轻轻将细胞刮下,将细胞全部收集于 1.5 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 5 min 后去掉上清,向沉淀中加入固定液,送中南大学

基础医学院超微结构教研室进行电镜检测。

## 2 结果

### 2.1 脐动脉血管平滑肌细胞的培养与鉴定

脐动脉组织块在 DMEM /F12 培养基中约 1 周左右有细胞游出,并逐渐长成单层,细胞多为长梭形,呈典型的“峰谷”样生长。经抗 α 肌动蛋白免疫组织化学技术检测可见其细胞胞浆内明显的红棕色颗粒,而对照的人胚肺成纤维细胞亦呈梭形,但细胞较小,经 α 肌动蛋白免疫组织化学技术检测无特异性显色,表明自脐动脉中分离培养成功的细胞是血管平滑肌细胞(图 1)。



图 1 免疫组织化学鉴定分离的脐动脉平滑肌细胞(×50)  
左为培养的人胚肺成纤维细胞,右为脐动脉血管平滑肌细胞。

### 2.2 脐动脉血管平滑肌细胞感染人类巨细胞病毒 AD169 株后的形态学改变

以 1 MOI 的人类巨细胞病毒 AD169 株感染脐动脉血管平滑肌细胞后,逐日观察细胞的变化,发现感染后第 3 天少数细胞出现收缩,失去正常细胞的纤维状,并慢慢变圆,随着培养时间的逐渐延长,病变细胞逐日增多,病变细胞主要表现为肿胀、变圆,但脱落的细胞较少,且细胞病变较同时感染的人胚肺成纤维细胞程度轻,同时感染人类巨细胞病毒 AD169 株的人胚肺成纤维细胞至感染后第 3 天即可见细胞明显病变并脱落,至感染后第 8 天,全部细胞均出现病变并脱落(图 2)。

### 2.3 人类巨细胞病毒 AD169 株感染脐动脉血管平滑肌后病毒 IE 基因的表达情况

人类巨细胞病毒 AD169 株感染血管平滑肌细胞后的第 3 天,收集细胞,Trizol 法抽提细胞总 RNA,逆转录,用人类巨细胞病毒特异性引物对人类巨细胞病毒 IE 基因进行 PCR 扩增,以人类巨细胞病毒 AD169 感染的人胚肺成纤维细胞抽提的 RNA 逆转录产物作阳性对照,未感染人类巨细胞病毒 AD169 株的人胚肺成纤维细胞抽提的 RNA 逆转录产物作阴性对照。结果在阳性对照及人类巨细胞病



毒感染的血管平滑肌细胞中可用 RT-PCR 技术扩增出 414 bp 的产物, 阴性对照及未感染人类巨细胞病毒 AD169 株的脐动脉血管平滑肌细胞中均无扩增

产物出现。经 PCR 产物直接测序, 并与 GenBank 中的序列进行比对, 证实扩增产物为人类巨细胞病毒 IE 基因 (图 3)。

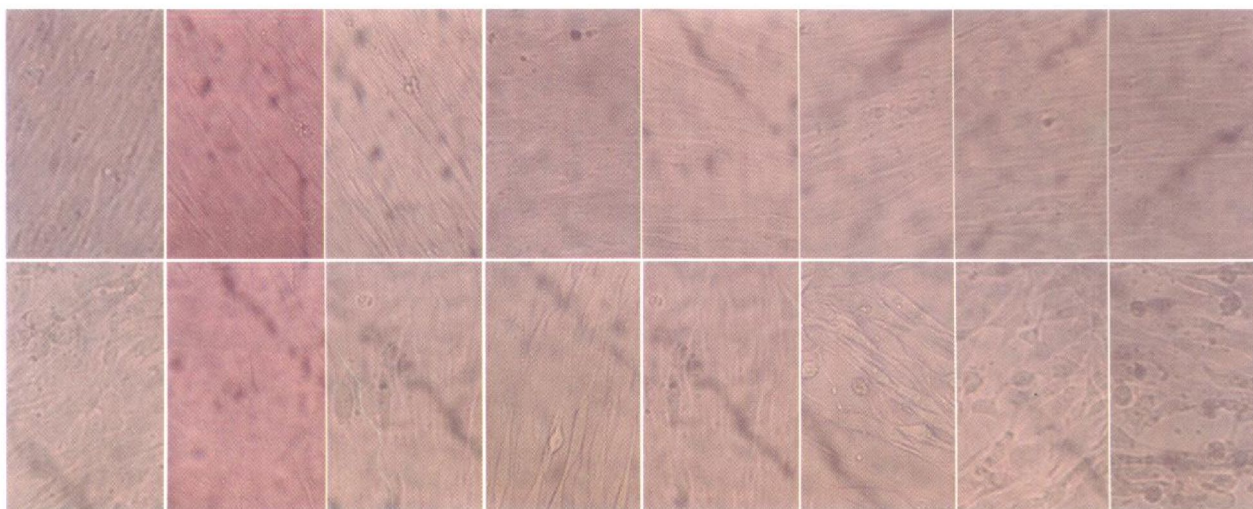


图 2 人类巨细胞病毒 AD169 株感染血管平滑肌细胞后细胞的形态改变 上图 为未感染病毒的细胞, 下图为病毒感染的细胞; 从左到右依次为感染后第 1、2、3、4、5、6、7 和 8 天。

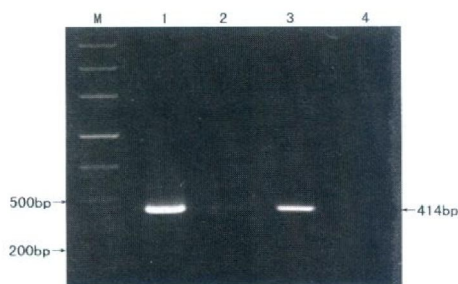


图 3. RT-PCR 技术检测人类巨细胞病毒 AD169 株感染后血管平滑肌细胞中病毒 IE 基因的表达 M 为 DNA Marker III, 1 为阳性对照(感染 HCMV AD169 株的人胚肺成纤维细胞), 2 为阴性对照(未感染 HCMV AD169 株的人胚肺成纤维细胞), 3 为感染 HCMV AD169 株的脐动脉血管平滑肌细胞, 4 为未感染 HCMV AD169 株的脐动脉血管平滑肌细胞。

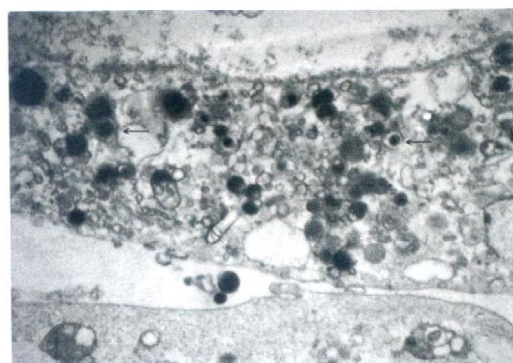


图 4. 电子显微镜观察血管平滑肌细胞内的病毒颗粒 (× 20 000)

#### 2 4 电子显微镜技术检测人类巨细胞病毒 AD169 株感染后平滑肌细胞内病毒颗粒

人类巨细胞病毒 AD169 株感染脐动脉血管平滑肌细胞第 3 天, 电子显微镜下可见细胞内出现形态典型的病毒颗粒, 病毒颗粒呈圆形, 病毒周围有明显的晕 (图 4)。

### 3 讨论

随着我国老年化的不断发展, 动脉粥样硬化及其心、脑并发症是致残、致死的主要原因, 所以对动脉粥样硬化的病因及致病机制进行系统研究, 对于该病的防治具有重要意义。一直以来, 动脉粥样硬

化的发病因素主要集中于高血压、高脂血症等传统的危险因素, 近年来, 虽然对肥胖、血脂异常、糖尿病、高血压、吸烟等动脉粥样硬化的相关危险因素进行了有效的干预, 但以动脉粥样硬化为基础的心血管系统疾病的发病率仍持续升高, 说明除了上述传统的危险因素外, 动脉粥样硬化尚有其他发病原因的存在。早在上个世纪 20 年代, 即有学者提出微生物感染与动脉粥样硬化有一定的关系, 但直到 20 世纪 70 年代 Fabricant 等用禽类疱疹病毒成功诱发出鸡动脉粥样硬化, 动脉粥样硬化的感染病因学才逐渐引起学者们的重视。通过血清流行病学及分子流行病学等的研究, 目前认为人类巨细胞病毒<sup>[2]</sup>、幽

门螺杆菌<sup>[3]</sup>、肺炎衣原体<sup>[4]</sup>等是动脉粥样硬化的重要致病因子之一。最近有学者研究发现人类巨细胞病毒感染可以导致动脉血压的增加<sup>[5]</sup>,这更将动脉粥样硬化发病的病原病因学传统的动脉粥样硬化发病原因联系起来。

另外随着外科手术学、现代免疫学的发展以及新型抗排斥药物的使用,器官移植已成为患者器官功能丧失后挽救患者生命、提高患者生存质量的最有效处理措施。然而,器官移植后移植物血管病的发生是器官移植失败从而导致器官移植患者不能长期存活的主要原因,对移植物在患者体内长期存活是一个严重的挑战<sup>[6]</sup>。病毒感染特别是人类巨细胞病毒感染导致移植物血管病越来越受到关注与重视。已有观察资料、实验模型及治疗试验表明人类巨细胞病毒可以促进移植物血管病的发生<sup>[7,8]</sup>;有学者研究了人类巨细胞病毒感染状态与心脏移植后1年内移植物血管病发病的关系,发现人类巨细胞病毒 IgG/IgM 类抗体是一个不依赖于血管危险因素、炎症标志物及血小板激活等指标的移植物血管病预报因子<sup>[9]</sup>。相关的病理研究表明,移植物血管病的病理改变与动脉粥样硬化相似,都涉及到血管平滑肌细胞的增殖而致的血管狭窄,据此可以推测,动脉粥样硬化与移植物血管病可能具有相似的病因或发病机制,人类巨细胞病毒是其重要的致病因素。所以研究人类巨细胞病毒对血管平滑肌细胞的作用及其机制对于阐明人类巨细胞病毒致动脉粥样硬化及移植物血管病的形成机制具有重要的意义。

对于人类巨细胞病毒感染致 AS 的机制研究,目前存在较多的报道,其中有些研究涉及人类巨细胞病毒感染平滑肌细胞后细胞内脂质改变、基因表达的异常、细胞增殖变化等<sup>[10-12]</sup>,但这些研究均未提供感染细胞内人类巨细胞病毒存在或病毒增殖的直接依据。人类巨细胞病毒究竟能否感染血管平滑肌细胞,目前国内鲜有报道。

本研究发现,人类巨细胞病毒 AD169株可以感染脐动脉血管平滑肌细胞,在感染的第3天左右,部分细胞出现肿胀、变圆,即出现细胞病变效应,但与人类巨细胞病毒敏感细胞人胚肺成纤维细胞比较,

在血管平滑肌细胞中出现的细胞病变效应明显较轻,且与感染人类巨细胞病毒 AD169株的人胚肺成纤维细胞相比较,感染了人类巨细胞病毒 AD169株的血管平滑肌细胞较少出现脱落现象;取感染人类巨细胞病毒 AD169株 3天时的血管平滑肌细胞,用 Trizol 法抽提细胞总 RNA,并用逆转录 PCR 技术可检测出人类巨细胞病毒特异的 IE 基因表达,同时用电子显微镜技术可在感染人类巨细胞病毒 AD169株的血管平滑肌细胞中发现典型的病毒颗粒,表明人类巨细胞病毒可以感染脐动脉血管平滑肌细胞,且在该细胞中可复制出完整的子代病毒颗粒。本实验结果为人类巨细胞病毒致动脉粥样硬化或移植物血管病的机制研究提供了实验依据及细胞模型。

#### [参考文献]

- [1] 徐会圃, 窦晋景, 齐超. 胎儿脐动脉血管平滑肌细胞贴块培养方法的改进 [J]. 滨州医学院学报, 2007, 30 (4): 244-246
- [2] Yi L, Wang DX, Feng ZJ. Detection of human cytomegalovirus in atherosclerotic carotid arteries in humans [J]. *J Formos Med Assoc*, 2008, 107 (10): 774-781
- [3] 黄冰生, 程颖, 解强, 等. 幽门螺杆菌感染对冠心病患者血脂和血浆高敏 C 反应蛋白的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (5): 389-391
- [4] 洪莉, 张丽君. 肺炎衣原体感染在动脉粥样硬化不同阶段作用机制研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (12): 996-998
- [5] Cheng J, Ke Q, Jin Z, et al. Cytomegalovirus infection causes an increase of arterial blood pressure [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5 (5): e1000427
- [6] Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, et al. International society for heart and lung transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010 [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2010, 29 (7): 717-727
- [7] Valentine HA. The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy [J]. *Am J Transplant*, 2003, 4: 169-177
- [8] Hussain T, Burch M, Fenton M J et al. Positive pretransplantation cytomegalovirus serology is a risk factor for cardiac allograft vasculopathy in children [J]. *Circulation*, 2007, 115 (13): 1798-805
- [9] Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Wessely R, et al. Cytomegalovirus infection status predicts progression of heart-transplant vasculopathy [J]. *Transplantation*, 2003, 76 (10): 1470-474
- [10] 姚磊, 何作云, 董解菊. 巨细胞病毒感染对 SMC 脂质代谢的影响及反义寡核苷酸的调节作用 [J]. 重庆医学, 2006, 35 (18): 1643-644
- [11] 王佳伟, 脱厚珍, 王瑞金, 等. 人巨细胞病毒感染对人脑血管平滑肌细胞 A T 受体基因表达的影响 [J]. 中国临床神经科学, 2007, 15 (1): 8-11
- [12] Voisard R, Krügers T, Reinhardt B, et al. HCMV-infection in a human arterial organ culture model: effects on cell proliferation and neointimal hyperplasia [J]. *BMC Microbiol*, 2007, 7: 68

(此文编辑 许雪梅)