

[文章编号] 1007-3949(2011)19-08-0641-04

• 实验研究 •

# 流感病毒感染与血管内皮细胞功能变化的体外实验研究

关秀茹, 王优良, 张 萱, 林春艳, 韩 丽, 杜柏岩

(哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 流感病毒; 内皮细胞; 细胞间黏附分子 1; 血管细胞黏附分子 1

[摘要] 目的 探讨流感病毒感染人脐静脉内皮细胞后, 细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 表达的变化, 以期从细胞和分子水平探讨流感病毒感染在动脉粥样硬化形成中的作用。方法 分别运用染料结合实时荧光定量聚合酶链反应方法、流式细胞术和酶联免疫吸附实验, 检测流感病毒感染的不同时段 (0、24、48、72 h) 人脐静脉内皮细胞分泌的细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 的表达情况。结果 流感病毒感染人脐静脉内皮细胞后, 通过以上 3 种方法检测细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 的变化, 0 h 有基础水平的表达, 随感染时间延长, 表达量逐渐增高, 感染 24 h 时达高峰, 48 h 开始回落, 72 h 表达量仍维持在较高的水平, 显著高于未加病毒的对照组, 各时段与对照组比较, 均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 流感病毒感染人脐静脉内皮细胞后, 细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 表达增加, 因此推测流感病毒感染导致血管内皮细胞功能障碍, 流感病毒感染可能参与动脉粥样硬化的炎症反应。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Study of Relationship between Influenza Virus Infection and the Dysfunction of Vascular Endothelial Cells in Vitro

GUAN Xiu-Ru, WANG You-Liang, ZHANG Xuan, LIN Chun-Yan, HAN Li, and DU Bai-Yan

(Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Influenza Virus; Endothelial Cell; Inter cellular Adhesion Molecule-1; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanisms of influenza virus infection in the formation of atherosclerosis from the cellular and molecular levels through investigating amount of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 after human umbilical vein endothelial cell was infected by influenza virus. **Methods** SYBR Green reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay were used to detect the timing expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 of human umbilical vein endothelial cells infected by influenza virus at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h. **Results** Inter cellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 were measured by these three methods after human umbilical vein endothelial cell was infected by influenza virus. The base level of the two inflammatory factors was expressed at a low level at 0 h, and began to increase after influenza virus infection, reached the peak at 24 h. After 48 h, it declined obviously and remained a relatively high level at 72 h. The amount of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the infected groups was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This study showed that influenza virus infection could increase the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1, and then influenza virus infection might lead to dysfunction of vascular endothelial cells and involve in the inflammatory response of atherosclerosis.

动脉粥样硬化 ( atherosclerosis, As) 是心血管系统疾病的病理基础。As 是由多种因素引发的疾病,

[收稿日期] 2010-12-17

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D200968)

[作者简介] 关秀茹, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为感染与动脉粥样硬化, Email 为 guanxiuru0451@sohu.com。王优良, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化机制研究。张萱, 教授, 研究方向为临床免疫。

包括高血压、高血糖、高血脂、吸烟和感染等在内的各种危险因素导致内皮细胞损伤,使脂质迁移到大动脉内膜下,诱导细胞表面黏附分子表达增加,从而加速 As 斑块的炎症反应。在临床工作中发现,在流感流行季节患心脑血管疾病住院率明显增加<sup>[1]</sup>,但机制尚不清楚,细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)可能在心脑血管的发生中起重要作用<sup>[2]</sup>。本研究探讨流感病毒(H1N1型)感染人脐静脉内皮细胞,检测感染后 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的变化,以期从细胞和分子水平探讨流感病毒感染在血管动脉粥样硬化形成中的作用及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

H1N1 流感病毒株(哈尔滨医科大学流行病实验室)、人脐静脉内皮细胞株(哈尔滨医科大学附属第一医院中心实验室)。TRIzol 试剂(美国 HYCLONE 公司)。SYBR Green 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂(北京奥科生物技术有限公司)。ICAM-1 和 VCAM-1 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(大连泛邦生物制品有限公司)。FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)、Bocell 2010 酶标仪(郑州安图公司)、PE5700PCR 扩增仪(美国 PE 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 病毒液的处理** 按常规接种 9~11 日龄鸡胚的尿囊腔,收集尿囊液,测定红细胞凝集活性,血凝素滴度  $\geq 320$  细菌培养阴性,分装,置 -70℃ 备用。

**1.2.2 人脐静脉内皮细胞的培养和传代** 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell HUVEC)按照常规方法复苏、传代。将生长良好的细胞接种于直径 3.5 cm 的培养板。一般传代第 2 天细胞长满后用于试验。实验组加入病毒液 500  $\mu$ L 半数感染量(TC ID<sub>50</sub>)接种 H1N1 病毒株于培养的 HUVEC 细胞,37℃ 吸附 1 h 加入含 2% 小牛血清的 DMEM 维持液。于感染后 0、24、48、72 h 分别收集细胞,用冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗 2 次,待提取总 RNA 和进行流式细胞检测,上清液用于 ELISA 检测。以 0 h 作为对照,每

个时段收集 4 孔,约  $2 \times 10^6$  个细胞,实验重复 3 次。

**1.2.3 细胞间黏附分子 1 mRNA 和血管细胞黏附分子 1 mRNA 表达水平的检测** SYBR Green RT-PCR 方法,采用美国 PE 公司 PE5700 PCR 仪扩增。以 ICAM-1 和 VCAM-1 总 RNA 逆转录合成的 cDNA 第一链为模板,进行目的基因的 PCR 扩增。根据基因引物设计原则,目的基因片段人 ICAM-1 mRNA 序列与 VCAM-1 mRNA 序列和内参照基因人  $\beta$ -actin (BC004251) mRNA 基因片段均自基因文库(Gene Bank)中查找,基因引物由北京奥科生物技术有限公司合成,其引物序列见表 1。

表 1. ICAM-1、VCAM-1 和  $\beta$ -actin 引物核苷酸序列及扩增产物长度

Table 1. The primer ribonucleotide sequence and augmentation product length of ICAM-1, VCAM-1 and  $\beta$ -actin

引物名称	引物序列 (5'-3')	产物大小
ICAM-1	上游 GAACAACCGGAAGGTGTATG	458 bp
	下游 GCAGCGTAGGGTAAGGTCTT	
VCAM-1	上游 GACCACATCTACGCTGACAAT	458 bp
	下游 TTGACTGTGATCGGCTTC	
$\beta$ -actin	上游 GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	539 bp
	下游 CTCCTTAATGTACGACGATTTTC	

**1.2.4 细胞培养上清液细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 含量检测** 应用 ELISA 方法,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.2.5 人脐静脉内皮细胞表面细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 的表达** 应用美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪检测。

### 1.3 统计学分析

将所得数据输入计算机,用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,正态分布数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行各组间的方差分析,  $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SYBR Green 逆转录-聚合酶链反应结果

产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,与 DNA Marker 相比,扩增产物的 ICAM-1 大小约为 409 bp VCAM-1 大小约为 567 bp 符合在 Gene Bank 中的 ICAM-1 mRNA 和 VCAM-1 mRNA 序列大小,表明 ICAM-1 和 VCAM-1 PCR 扩增成功(表 2、图 1)。

表 2. H1N1感染 HUVEC后 ICAM-1和 VCAM-1的表达 (copies/μL,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. The expression of ICAM-1 and VCAM-1 after H1N1 infection of HUVEC (copies/μL,  $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	ICAM-1	VCAM-1
实验组 1(24 h)	3	$7.68 \times 10^8 \pm 1.83 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$3.09 \times 10^8 \pm 5.27 \times 10^7$ <sup>a</sup>
实验组 2(48 h)	3	$3.28 \times 10^8 \pm 1.43 \times 10^7$ <sup>a</sup>	$1.84 \times 10^7 \pm 6.50 \times 10^5$ <sup>a</sup>
实验组 3(72 h)	3	$3.36 \times 10^7 \pm 1.05 \times 10^6$ <sup>a</sup>	$1.60 \times 10^6 \pm 3.21 \times 10^5$ <sup>a</sup>
对照组 (0 h)	3	$2.25 \times 10^5 \pm 4.56 \times 10^4$	$1.44 \times 10^5 \pm 1.09 \times 10^4$

a为  $P < 0.05$  与对照组比较。

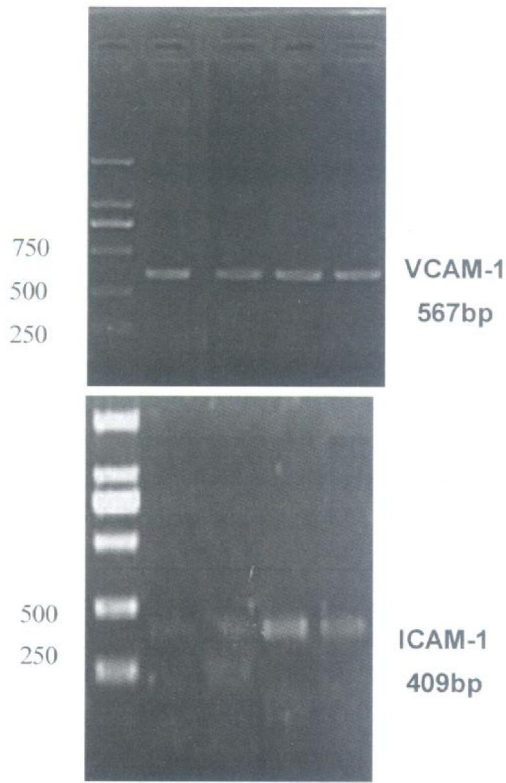


图 1. ICAM-1和 VCAM-1电泳图谱      Marker规格为 2 000 bp

Figure 1. PCR amplification graph of VCAM-1 and ICAM-1 after H1N1 infection of HUVEC

2.2 流式细胞仪检测结果

0 h时 ICAM-1有基础水平的表达,在 H1N1感染 24 h时 ICAM-1表达量达高峰,48 h时开始下降,但幅度不大,72 h时 ICAM-1表达量仍维持在较高水平。各时段 ICAM-1的表达与 0 h比较,均明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示 H1N1感染能够促进人脐静脉内皮细胞 ICAM-1的表达,并有时依赖性(图 2)。而 VCAM-1均无明显表达。

2.3 酶联免疫吸附测定法检测可溶性细胞间黏附分子 1和血管细胞黏附分子 1的结果

H1N1感染 HUVEC后 24 h、48 h和 72 h 细胞培养上清液 ICAM-1和 VCAM-1水平均明显高于对照组,其中 24 h最高,48 h和 72 h逐渐下降,实验组与对照组间比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ,表 3)。

表 3. H1N1感染 HUVEC前后 ICAM-1和 VCAM-1的表达 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. The expression of ICAM-1 and VCAM-1 after HUVEC of H1N1 infection(ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	ICAM-1	VCAM-1
实验组 1(24 h)	3	$88.60 \pm 1.15$ <sup>a</sup>	$173.50 \pm 1.45$ <sup>a</sup>
实验组 2(48 h)	3	$75.66 \pm 0.71$ <sup>a</sup>	$169.43 \pm 0.95$ <sup>a</sup>
实验组 3(72 h)	3	$70.56 \pm 1.05$ <sup>a</sup>	$154.40 \pm 2.51$ <sup>a</sup>
对照组 (0 h)	3	$66.46 \pm 1.15$	$138.53 \pm 2.02$

a为  $P < 0.05$  与对照组比较。

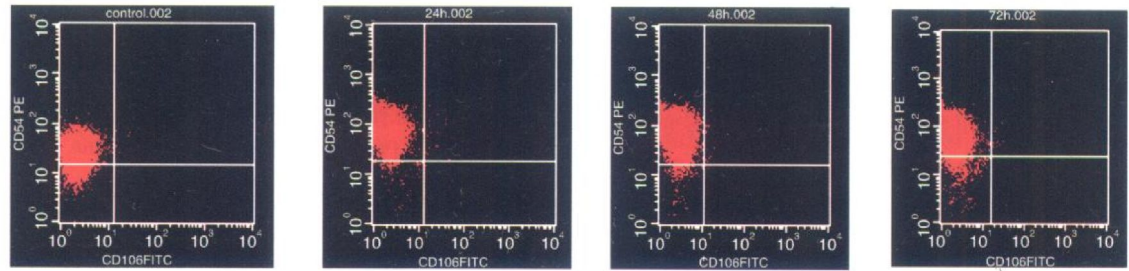


图 2. ICAM-1的流式检测散点图 (0 h 24 h 48 h 72 h)

Figure 1. Scatter picture of ICAM-1 on flow cytometry after H1N1 infection of HUVEC

### 3 讨 论

目前认为动脉粥样硬化是一种慢性炎症反应,这在心血管疾病的研究中正逐渐引起人们的关注。As是一种以血管内皮细胞功能障碍为特征的慢性炎症反应性疾病<sup>[3]</sup>。内皮细胞损伤被认为是动脉粥样硬化形成的始动环节,其中感染是导致内皮细胞损伤的重要因素。大量的临床研究表明,HIV病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒和肺炎衣原体感染均可导致血管内皮细胞损伤,内皮细胞分泌大量的炎症细胞因子及粘附分子,促使内皮细胞黏附特性的改变,这是炎性病变的早期反应过程,在心脑血管的发生中起重要作用<sup>[4-6]</sup>。但未见流感病毒感染与血管内皮细胞损伤的相关报道。

传统的研究表明,高血脂患者血中的可溶性的ICAM-1、VCAM-1均升高,合并有其它冠心病者有更高的表达,表明动脉粥样硬化可能是一个长期的炎症过程,并认为血中可溶性ICAM-1、VCAM-1是反应动脉粥样硬化的早期变化指标<sup>[7]</sup>。尽管传统的危险因素如高血压、高血脂、高血糖、吸烟是导致As的原因,但去除这些影响因素之后,仍然存在着As发生。因此推测感染可能是As发生发展的另一重要因素。

本实验研究结果显示,H1N1型流感病毒感染人脐静脉内皮细胞后,0 h时ICAM-1和VCAM-1有基础水平的表达,说明本身脐静脉内皮细胞表面含有ICAM-1和VCAM-1,24 h时达高峰,48 h开始回落,72 h表达量仍维持在较高的水平,显著高于0 h的对照组。说明H1N1型流感病毒感染脐静脉内皮细胞后,出现了内皮细胞功能受损,导致黏附分子异常表达。黏附分子表达增加介导了淋巴细胞进入内皮下组织聚集沉积,诱导淋巴细胞浸润,并且通过结构蛋白改变细胞的形态导致血管病变,引发心脑血管疾病的早期事件<sup>[8-9]</sup>。

但在VCAM-1检测结果中出现了基因和蛋白表达不一致的现象,也就是基因水平和细胞培养液中VCAM-1表达增加,而脐静脉内皮细胞膜上VCAM-1的表达没有明显变化,可能因为VCAM-1在病变很早的时候出现变化,估计在流感病毒感染的24 h内,细胞膜上表达一定水平的VCAM-1,随即很快分泌到培养液中,进而导致结果不一致的现象。有研究表明,在动脉硬化的各个阶段,ICAM-1均高于正常,提示慢性炎症的持续存在;而VCAM-1只有在病变形成伊始,或是出现血管痉挛、斑块不稳定等炎症急剧变化时迅速而明显增加,而且其上升的幅度与

局部炎症的严重情况及转归明显相关,在局部病变消退至相对比较平稳的时候,血中检测不到sV-CAM-1的升高<sup>[10]</sup>。

综上所述,As是一种慢性炎症状态,炎症细胞因子在As的发生发展中起核心作用,是As研究中的一个重要领域。本研究证明H1N1型流感病毒是导致动脉粥样硬化的病原微生物之一,流感病毒感染导致黏附分子表达异常增加,从而导致As的形成与发展。我们可以通过预防流感病毒的感染,降低As乃至急性心肌梗死的发生。

#### [参考文献]

- [1] Guan XR, Li X, Xin XM, et al. Influenza virus infection and risk of acute myocardial infarction [J]. *Inflammation* 2008; 31(4): 266-272
- [2] Marchesi S, Lupattelli G, Lombardini R, et al. Acute inflammatory state during influenza infection and endothelial function [J]. *Atherosclerosis* 2005; 178(2): 345-350
- [3] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature* 1993; 362(6423): 801-809
- [4] Ross AC, O'Riordan MA, Storer N, et al. Heightened inflammation is linked to carotid intima-media thickness and endothelial activation in HIV-infected children [J]. *Atherosclerosis* 2010; 211(2): 492-498
- [5] Kraml P, Roubalov K, Bulvas M, et al. Markers of chlamydia pneumoniae and human cytomegalovirus infection in patients with chronic peripheral vascular disease and their relation to inflammation, endothelial dysfunction and changes in lipid metabolism [J]. *Folia Microbiol (Praha)* 2008; 53(6): 551-557
- [6] Scheglovitova ON, Romanov YA, Maksimova EV, et al. Herpes simplex type I virus infected human vascular endothelial cells induce the production of antiviral and proinflammatory factors by periphera blood leukocytes in vitro [J]. *Russ J Immunol* 2002; 7(2): 115-122
- [7] Mansoor MA, Seljeflot I, Aimes N, et al. Endothelial cell adhesion molecules in healthy adults during acute hyperhomocysteinemia and mild hypertriglyceridemia [J]. *Clin Biochem* 2004; 37(5): 408-414
- [8] 方臻飞, 周胜华, 胡信群, 等. 急性冠状动脉综合征患者冠状动脉循环粘附分子的变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; 13(2): 215-217
- [9] 成士清, 刘成玉, 徐守伟, 等. 冠心病患者血清C反应蛋白和可溶性细胞间粘附分子-1与肺炎衣原体感染的相关性 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; 13(2): 448-450
- [10] 朱彦琪, 孙宝贵. 可溶性细胞间粘附分子和可溶性血管细胞粘附分子与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; 12(5): 618-620

(此文编辑 曾学清)