

人类巨细胞病毒感染对血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的影响

陈 华¹, 刘 伟¹, 程 洁¹, 徐玉芬¹, 李玲芳², 邓桢翰³, 陈利玉⁴, 刘水平⁴, 邬国军⁴

(1. 中南大学湘雅医学院长沙三临床学院 长沙市第三医院检验科, 湖南 长沙 410015;

2. 中南大学湘雅医学院 2004 级八年制临床医学; 3. 中南大学湘雅医学院 2007 级临床医学系;

4. 中南大学基础医学院微生物学系)

摘要: **目的** 研究人类巨细胞病毒感染对体外培养血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的影响, 探讨该病毒致动脉粥样硬化(As)的机制。 **方法** 以 1 MOI 人类巨细胞病毒感染体外培养的血管平滑肌细胞, 利用基因表达谱芯片技术检测细胞脂代谢相关基因的表达变化。 **结果** 人类巨细胞病毒感染血管平滑肌细胞后, 细胞内与脂代谢有关的基因表达出现明显的异常, 其中表达上调的基因主要有低密度脂蛋白受体相关蛋白 10、11、12、极低密度脂蛋白受体、B 型清道夫受体、HMG-CoA 合成酶、HMG-CoA 还原酶、酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶及脂肪酶合成酶等基因; 表达下调的主要有载脂蛋白 A1、载脂蛋白 M 和载脂蛋白 H 等基因。 **结论** 人类巨细胞病毒感染可能通过改变血管平滑肌细胞脂代谢相关基因的表达而参与 As 的发病过程。

关键词: 动脉粥样硬化; 人类巨细胞病毒; 脂代谢; 基因表达谱芯片; 血管平滑肌细胞

中图分类号: R37 文献标识码: A

The Influence of HCMV Infection on Expression of Genes Associated With Lipid Metabolism in Vascular Smooth Muscle Cells

CHEN Hua, LIU Wei, CHENG Jie, et al

(Department of Clinical Laboratory, the Third Hospital of Changsha, the Third Clinical College of Changsha, Xiangya Medical School, Central South University, Changsha, Hunan 410015, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of human cytomegalovirus infection on expression of genes associated with lipid metabolism in vascular smooth muscle cells cultured in vitro, and to clarify the possible mechanisms of atherosclerosis induced by this virus. **Methods** The expression change of genes associated with lipid metabolism in vascular smooth muscle cells cultivated in vitro after human cytomegalovirus infection were scanned by gene expression profiling chip. **Results** There was an obvious abnormal expression profile of genes associated with lipid metabolism in vascular smooth muscle cells after challenged with human cytomegalovirus, the main up-regulated genes were low density lipoprotein receptor-related protein, very low density lipoprotein receptor, scavenger receptor class B, HMG-CoA synthetase, HMG-CoA reductases, acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase, fatty acid synthase, and so on, while the main down-regulated genes were apolipoprotein A-I (APOA1), apolipoprotein M (APOM) and apolipoprotein H (APOH). **Conclusion** The involvement of human cytomegalovirus in the pathogenesis of atherosclerosis may be by changing the expression level of lipid metabolism genes.

Key words: atherosclerosis; human cytomegalovirus; lipid metabolism; gene expression profiling chip; vascular smooth muscle cells

收稿日期: 2012-09-05

基金项目: 湖南省卫生厅科研基金(B2008-079); 湖南省自然科学基金重点项目(10JJ2012)。

作者简介: 陈华, 本科, 主任技师, 研究方向: 检验医学, E-mail: chenhua6808@163.com. 通讯作者 邬国军, 硕士, 副教授, 研究方向: 病毒致病机制, E-mail: wuguojun@mail.csu.edu.cn.

由动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)引起的心血管系统疾病是发达国家第一位的死亡原因^[1],在国内,随着经济社会的发展和人口的老齡化,心脑血管病发病率与死亡率近年也显著增加。同时 As 也是多数心血管病、脑血管病和肾脏、肢体等外周动脉疾病的共同病因和病理基础^[2]。近年研究表明某些微生物的感染特别是人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染是该病的重要致病因素之一^[3],然而其机制目前并不十分明确。探明 HCMV 感染致 As 的机制对于动脉粥样硬化及相关疾病的防治具有重要的意义。由于 As 均有脂代谢的异常,那么作为 As 的重要致病因素之一的 HCMV 感染是否会对细胞脂代谢造成影响并最终促进 As 的形成呢?本文以 HCMV 感染体外培养的血管平滑肌细胞,利用基因表达谱芯片技术检测被感染的细胞与脂代谢有关基因的表达变化,探讨该病毒致 As 形成的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HCMV AD169 株及人胚肺成纤维细胞均为中南大学基础医学院微生物学系病毒研究室保存。DMEM、DMEM/F12(1:1)培养基及胎牛血清均为 Hyclone 产品。新生牛血清为杭州四季青生物技术公司产品;基因表达谱芯片为美国 Agilent 公司产品。

1.2 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^2)接种 0.2 mL HCMV AD169 株,逐日观察细胞病变,待几乎全部细胞均出现细胞病变(即细胞病变达“++++”,一般在病毒感染后第 8 天左右)时按常规方法收获病毒,按文献[4]方法进行病毒毒力测定及感染性病毒颗粒计数。

1.3 血管平滑肌细胞培养及 HCMV 感染

按文献[5]方法培养脐血管平滑肌细胞,取第 3~8 代细胞进行研究。细胞长成单层后传代,待细胞长至覆盖培养瓶面积 80% 左右(控制在传代后 12 h 左右)时,以 1 个感染复数(multiplicity of infection, MOI)的 HCMV 感染血管平滑肌细胞,37℃ 吸附 3 h,每 30 min 左右轻摇 1 次,以使病毒液完全覆过细胞层,吸附完毕补加含 3% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基维持液继续培养。同时用含 3% 小牛血清的 DMEM 维持液进行模拟感染用作对照。

1.4 HCMV 感染血管平滑肌细胞后基因表达谱芯片检测

按 1.2.2 的方法培养血管平滑肌细胞并感染 HCMV,并设一不感染病毒(以含 3% 小牛血清的 DMEM 维持液模拟感染)的细胞对照组。病毒感染后每隔 24 h 收获细胞。细胞收获时,先倒去维持培养液,再以 PBS 洗涤细胞 2 遍,吸尽 PBS 后,按每 10 cm^2 细胞面积加 1 mL Trizol 的比例加入 Trizol 试剂,待细胞完全裂解后收集裂解液于 -80°C 保存,如此收集病毒感染后细胞至感染后第 72 h。待全部样品收集完毕,将样品寄送上海康成生物工程有限公司进行基因表达谱芯片检测。RNA 抽提、逆转录及荧光标记、芯片杂交及扫描、基因表达差异分析均由上海康成生物工程有限公司完成。

2 结果

2.1 RNA 抽提结果

以 Rnizol 法抽提各实验组总 RNA,1% 琼脂糖电泳证实所抽提的 RNA 质量符合要求,见图 1。

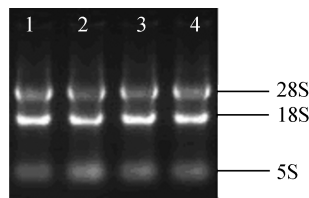


图 1 从人血管平滑肌细胞抽提的总 RNA 电泳图 1:模拟感染组;2~4 分别为 HCMV AD169 感染后第 24、48、72 h 组

2.2 HCMV 感染的血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的变化

将病毒感染后 24、48、72 h 基因表达谱芯片检测荧光信号强度与模拟感染后 24 h 对照组相应基因荧光信号强度进行比较,得出病毒感染后各时间点荧光信号强度相对于模拟感染后 24 h 的变化倍数,荧光信号强度有 2 倍以上的变化则认为目的基因表达有差异。结果见表 1。

实验结果表明, HCMV 感染血管平滑肌细胞后细胞与脂质摄取有关的低密度脂蛋白受体相关蛋白 10、11、12、极低密度脂蛋白受体及 B 型清道夫受体的表达出现明显上调,细胞内与胆固醇合成有关的 HMG-CoA 合成酶及 HMG-CoA 还原酶、与胆固醇酯合成有关的酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶及与脂

表 1 HCMV 感染诱导血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的变化

基因英文名称	基因中文名称	24 h	48 h	72 h
low density lipoprotein receptor-related protein 10	低密度脂蛋白受体相关蛋白 10	2. 71	4. 49	3. 70
low density lipoprotein receptor-related protein 11	低密度脂蛋白受体相关蛋白 11	5. 13	3. 85	3. 83
low density lipoprotein receptor-related protein 12	低密度脂蛋白受体相关蛋白 12	4. 33	3. 95	3. 76
very low density lipoprotein receptor	极低密度脂蛋白受体	<2. 0	2. 72	5. 25
scavenger receptor class B	B 型清道夫受体	<2. 0	3. 27	4. 38
HMG-CoA synthetase	HMG 辅酶 A 合成酶	< 2. 0	2. 59	4. 64
HMG-CoA reductases	HMG 辅酶 A 还原酶	< 2. 0	2. 37	3. 79
acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase	酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶	<2. 0	2. 84	2. 05
fatty acid synthase	脂肪酸合成酶	< 2. 0	4. 78	5. 21
apolipoprotein A-I (APOA1)	载脂蛋白 A1	- 5. 62	- 11. 57	- 6. 76
apolipoprotein M (APOM)	载脂蛋白 M	- 4. 35	- 4. 15	- 4. 62
apolipoprotein H (APOH)	载脂蛋白 H	<2. 0	- 2. 41	- 2. 44

注:均与模拟感染 24 h 组荧光强度比较,数字前带“ - ”表示该基因表达下调

肪酶合成有关的脂肪酶合成酶的表达亦出现了明显的上调,与具有抗动脉硬化或动脉粥样硬化有关的载脂蛋白(ApoA1、ApoM、ApoH)则出现了明显的下调。表明 HCMV 感染可以通过影响细胞脂质摄取、胆固醇、胆固醇酯及脂肪酸合成等途径影响细胞脂质代谢而参与动脉硬化或动脉粥样硬化的发病过程。

3 讨 论

近年研究表明,除了肥胖、血脂异常、糖尿病、高血压等传统危险因素外,某些病原微生物如人类巨细胞病毒感染在动脉粥样硬化的形成中亦具有重要的作用^[3],但其致病机制至今不明确。多年的基础研究及临床病例均表明大部分动脉粥样硬化患者伴随脂类代谢的异常,那么 HCMV 感染对宿主细胞脂类代谢是否存在影响,其机制又是什么,这些问题的阐明将对 HCMV 致动脉粥样硬化形成机制及其防控具有重要的意义。

细胞内脂类代谢异常主要是细胞摄取、细胞脂质合成等异常所致。细胞对脂质的摄取是受体介导的内吞过程,参与细胞对脂质摄取的受体主要有极低密度脂蛋白受体(VLDLR)^[6]、低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)^[7]、清道夫受体^[8-9]等。其中 LRP 及 VLDLR 的表达不受细胞内胆固醇含量的下调,这样细胞可通过这些受体或蛋白质无限制地摄取脂蛋白,最终导致细胞内大量脂质堆积。另外,细胞内脂类代谢异常还包括细胞内胆固醇及胆固醇酯的生物合成增加。细胞内胆固醇生物合成是一系列酶促反应的结果,其中最重要的酶是 HMG-CoA 合成酶及 HMG-CoA 还原酶。已有报道表明某些病毒感染后

可增强细胞内胆固醇合成^[10-11]。本课题前期研究结果也显示 HCMV 感染血管平滑肌细胞后细胞内胆固醇含量亦出现明显升高^[12]。病毒感染诱导的胆固醇合成增加可造成细胞内胆固醇的堆积,参与或加速 As 的形成。细胞内酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶(ACAT)是催化细胞内以胆固醇和脂肪酰辅酶 A 为原料合成胆固醇酯的唯一的酶类,已有报道表明某些病原体如肺炎衣原体感染可以上调该酶的表达^[13],从而导致细胞内胆固醇酯的合成增加和聚积而诱导泡沫细胞形成,加速 As 的发生和发展。本研究用 HCMV 感染人血管平滑肌细胞,通过基因表达谱芯片检测显示病毒感染后 24、48 及 72 h,LRP 10、LRP 11 及 LRP 12 表达均较模拟感染组明显上调,而 VLDLR、B 型清道夫受体、HMG-CoA 合成酶、HMG-CoA 还原酶及酰基辅酶 A: 胆固醇酰基转移酶(ACAT)基因在病毒感染后 48 及 72 h 的表达亦均明显高于模拟感染组,表明 HCMV 对血管平滑肌细胞的感染可以使细胞膜表面与脂蛋白摄取有关的受体基因及细胞内与胆固醇及胆固醇酯合成有关的基因的表达上调,表明该病毒感染与血管平滑肌细胞内脂质代谢异常关系十分密切。

动脉粥样硬化发病过程中常伴有血管内膜脂质的沉积。机体脂肪沉积所需要的脂肪酸大多来自于脂肪酸的从头合成途径,即由脂肪酸合成酶催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成脂肪酸,进而合成甘油三酯^[14]。本研究结果显示,HCMV 感染血管平滑肌细胞后 48 及 72 h 细胞脂肪酸合成酶表达水平明显升高,表明该病毒感染可以促进血管平滑肌细胞内脂肪酸合成,从而导致细胞内脂类堆积,形成粥样斑块。当然目前一般认为脂肪酸合成酶主要与体脂的

合成和沉积有关, As 发病过程中的血管内膜脂质沉积是否是该酶表达上调的结果尚需进一步的研究。

载脂蛋白是脂蛋白的重要组成部分, 载脂蛋白通过构成并稳定脂蛋白的结构、修饰并影响脂蛋白代谢有关的酶活性、作为脂蛋白受体的配体、参与脂蛋白与细胞表面脂蛋白受体的结合代谢过程等在脂蛋白代谢中具有重要的生理作用。有些载脂蛋白如 ApoB 具有促进动脉粥样硬化形成的作用^[15], 而另一些载脂蛋白如 ApoA1^[16]、ApoM^[17]、ApoH^[18] 则具有抗动脉粥样硬化的作用。本文研究结果显示 HCMV 感染血管平滑肌细胞后 ApoA1、ApoM、ApoH 等表达均出现下调, 表明 HCMV 的感染可导致血管平滑肌细胞中抗动脉粥样硬化载脂蛋白表达异常, 而引起细胞内脂代谢紊乱, 有利于细胞内脂质沉着, 促进动脉粥样硬化的形成。

本课题后续工作将验证基因表达谱芯片的结果, 同时研究 HCMV 诱导这些基因异常表达的分子机制, 为 HCMV 致 As 机制研究及 As 治疗新靶点的搜寻提供实验依据。

参考文献:

- [1] Bassi N, Zampieri S, Ghirardello A, et al. Pentraxins, anti-pentaxin antibodies, and atherosclerosis[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2009, 37(1): 36-43.
- [2] 顾洪, 唐雅玲, 杨永宗. 慢性心理应激 apoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型的建立与评价[J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(1): 2-6.
- [3] Al-Ghamdi A. Role of herpes virus-1, cytomegalovirus and Epstein-barr virus in atherosclerosis[J]. Pak J Pharm Sci, 2012, 25(1): 89-97.
- [4] 戴橄. 病毒数量及感染性测定// 郭国军、戴橄、谭宇蓉. 实验医学微生物学[M]. 长沙: 中南大学出版社, 2006: 137-139.
- [5] 徐会圆, 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.
- [6] Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, et al. Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor; interferon-gamma inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages[J]. Circulation, 2001, 103(8): 1142-1147.
- [7] 郑荣, 曾德繁. 低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因

A1330V 遗传多态性与高胆固醇血症的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(8): 942-947.

- [8] Hoekstra M, Van Berkel TJ, Van Eck M. Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(47): 5916-5924.
- [9] Korpmaal SJ, Meurs I, Hauer AD, et al. Deletion of the high-density lipoprotein receptor scavenger receptor BI in mice modulates thrombosis susceptibility and indirectly affects platelet function by elevation of plasma free cholesterol[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1): 34-42.
- [10] Itzhaki RF, Wozniak MA. Herpes simplex virus type 1, apolipoprotein E, and cholesterol: A dangerous liaison in Alzheimer's disease and other disorders[J]. Prog Lipid Res, 2006, 45(1): 73-90.
- [11] Nakamuta M, Yada R, Fujino T, et al. Changes in the expression of cholesterol metabolism-associated genes in HCV-infected liver: a novel target for therapy[J]. Int J Mol Med, 2009, 24(6): 825-828.
- [12] 李玲芳, 陈华, 郭国军. HCMV 感染对脐动脉血管平滑肌细胞胆固醇代谢的影响[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(2): 150-154.
- [13] He P, Mei CL, Cheng B, et al. Chlamydia pneumoniae induces macrophage-derived foam cell formation by up-regulating acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase[J]. Microbes Infect, 2009, 11(1): 157-163.
- [14] Stuart S, Andrzej W, Anil KJ. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase[J]. Prog Lipid Res, 2003, 40: 289-317.
- [15] Bovenberg SA, Klop B, Alipour A, et al. Erythrocyte-associated apolipoprotein B and its relationship with clinical and subclinical atherosclerosis[J]. Eur J Clin Invest, 2012, 42(4): 365-370.
- [16] Getz GS, Reardon CA. Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis[J]. J Inflamm Res, 2011, 4: 83-92.
- [17] Dahlbeck B, Nielsen LB. Apolipoprotein M-a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 2006, 17(3): 291-295.
- [18] Lin KY, Pan JP, Yang DL, et al. Evidence for inhibition of low density lipoprotein oxidation and cholesterol accumulation by apolipoprotein H (beta2-glycoprotein I). Life Sci, 2001, 69(6): 707-719.

(此文编辑: 朱雯霞)