论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0720-04

登革病毒诱导血管内皮细胞凝血和纤溶系统相关分子变化

唐小龙[1],蔡淑玉[2],江振友[3],江丽芳[4] ([1]广州复大肿瘤医院生物治疗中心,广州 510300; [2]安徽理工大学医学院检验医学教研室,淮南 232001; [3]暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室,广州 510632; [4]中山大学医学院微生物学教研室,广州 510080)

提 要: 目的 为研究登革病毒感染血管内皮细胞所引起的凝血和纤溶分子表达变化。**方法** 应用 D_2V 感染生长良好的第2、3代脐静脉内皮细胞以观察内皮细胞在表达组织纤溶酶原激活物(tPA)、纤溶酶原激活物抑制物1(PAI-1)、凝血酶调节蛋白(TM)等分子变化。**结果** D_2V 可以显著上调内皮细胞的 t-PA 的表达并显著提高血浆可溶性凝血酶调节蛋白(sTM)和 IL-6 水平,而不影响 PAI-1。抗 IL-6 抗体抑制 D_2V 感染对内皮细胞表达 t-PA 和 sTM 的增强效应。**结论** 血管内皮细胞是 D_2V 的靶细胞之一,D_2V 可以诱导内皮细胞表达 t-PA 和 IL-6 并提高血浆中 sTM 水平,IL-6 能有效地增强 D_2V 诱导的纤溶和抗凝分子表达,高水平的 t-PA 和 sTM 可诱导纤溶亢进和抗凝效应增强,在 IL-6 诱导血管内皮细胞渗透性升高的前提下,有助于 DHF/DSS 患者出现血浆渗漏、血容量丢失甚至出血。

关键词: 登革病毒;组织纤溶酶原激活物;纤溶酶原激活物抑制物;凝血酶调节蛋白;白介素6

中图法分类号: R322.12; R373.33; R392.11 **文献标识码:** A

Dengue 2 virus induces molecular alteration in the coagulant and fibrinolytic pathways of human umbilical vein endothelial cells

TANG Xiao-long[1], CAI Shu-yu[2], JIANG Zhen-you[3], JIANG Li-fang[4] ([1]Center of Biotherapy, Guangzhou Fuda Cancer Hospital, Guangzhou 510300; [2]Department of Medical Laboratory, College of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001; [3]Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632; [4]Department of Microbiology, College of Medicine, Zhongshan University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To study the changes of tissue plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), and soluble thrombomodulin (sTM) induced by dengue 2 virus (D_2V) infection of vascular endothelial cells. **Methods** The effects of D_2V infection on the production of t-PA, PAI-1, and sTM of human umbilical cord vein cells were studied. **Results** D_2V infection significantly induced the secretion of sTM and t-PA but showed no such effects on PAI-1 of human endothelial cells. Antibody against IL-6 inhibited D_2V-induced t-PA production of endothelial cells. A close correlation between serum levels of IL-6 and t-PA was found in dengue hemorrhagic fever (DHF) but not in dengue fever (DF) patients. **Conclusion** IL-6 can regulate D_2V-induced t-PA production of endothelial cells, suggesting that endothelial cells can be the target for D_2V infection and that D_2V-induced t-PA, TM, and IL-6 production of endothelial cells may contribute to the pathogenic development of dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS).

Key words: dengue virus; tissue plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor 1; thrombomodulin; interleukin 6

登革病毒(dengue virus, DV)感染常构成登革热等病的流行或暴发,所引起登革热(dengue fever, DF)、登革出热(dengue hemorrhagic fever, DHF)/登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS),是热带与亚热带疾病发病率和病死率高的主要原因之一。自1978年以来,在我国海南、广东、广西曾先后发生7次较大的流行。近年来登革热发病率又呈上升趋势,仅2003-2004年3月在印度、印度尼西亚等国家就有数万人感染,先后夺去了数百人的生命。在DHF/DSS的患者中常伴有凝血异常[1]、血浆渗漏和出血,然而DHF/DSS的发病

作者简介:唐小龙(1972-),男,安徽省宿松县人,硕士研究生,讲师,主要从事分子病毒学方面的研究。电话:(020)85220257, E-mail: Txl9121@tom.com

收稿日期:2004-04-20;修回日期:2004-07-21

机制仍然没有完全阐明。鉴于 DHF/DSS 的病理改变与血管内皮细胞关系密切，而血管内皮细胞又能分泌和表达凝血酶调节蛋白（thrombomodulin，TM）、组织纤溶酶原激活物（tissue plasminogen activator，t-PA）、纤溶酶原激活物抑制物-1（plasminogen activator inhibitor-1，PAI-1）等分子，这些分子可以直接参与抗凝血和纤溶系统的活化，引起凝血和纤溶系统失常，进一步可导致血浆渗漏、甚至出血，因此本研究通过 D_2V 感染人脐静脉血管内皮细胞（human umbilical veins endothelial cells，HUVECs），以观察 D_2V 诱导内皮细胞产生 t-PA、PAI-1、可溶性凝血酶调节蛋白（soluble TM，sTM）及前炎症因子 IL-6 等分子动态变化，以综合评价 HUVECs 在 DV 感染严重并发症血浆渗漏和出血发病机制中的作用，同时为诊断、治疗和预防 DHF/DSS 提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　新生儿脐带（暨南大学第一附属医院妇产科提供）。D_2V 标准株：Dengue 2 virus New Guines C 株（中国药品生物制品鉴定所惠赠）。C6/36 细胞株（白纹伊蚊细胞株，广东省卫生防疫站赠）。20% FCS 1640 培养液：20% FCS（杭州四季青）、RPMI1640 培养液（Gibco 产品）、Hepes 5 mg/ml、L-谷胺酰胺 30 μg/ml、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml。2% FCS Eagle's 维持液。甲基纤维素（Sigma 产品）。0.125% 胰酶消化液：0.25% 胰酶：0.02% E. DTA = 1∶1。IL-6 ELISA 测试盒（美国 Genzyme 产品）。小鼠抗人 IL-6 单克隆抗体（深圳晶美公司）。兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗体（北京中山生物技术有限公司）。凝血酶调节蛋白（TM）（美国 ADI 公司，太阳生物技术公司代理）；组织纤溶酶原激活物（t-PA）、纤溶酶原抑制物-1（PAI-1）等（太阳生物技术公司）均采用 ELISA 法。

1.1.2　主要仪器　　二氧化碳培养箱（USA）、相差倒置显微镜（Japan）、全自动酶标仪（美国宝特 800 型）。

1.2　方法

1.2.1　HUVECs 的培养和鉴定　　用 0.125% 胰酶消化液灌注冲洗法，从人脐静脉中分离出血管内皮细胞。观察细胞生长形态，ABC 酶标法检测胞浆中第Ⅷ因子相关抗原。

1.2.2　甲基纤维素微量空斑滴定法测定 D_2V 滴度　　取传代 24 h 的 C6/36 细胞配成 1×10^6/ml，加入 24 孔培养板，每孔 1 ml，细胞贴壁后加入不同稀释度的待测上清，每孔 0.2 ml，37 ℃吸附 2 h，用毛细管吸出，用 PBS 轻洗 2 遍，加入 1.2% 甲基纤维素 Eagle's 维持液 0.8 ml/孔，37 ℃培养。2～3 d 待空斑直径为 1～2 mm 大小时，轻吸出甲基纤维素，加入 0.8% 结晶紫染色 10 min，显微镜下空斑计数；待测样品病毒滴度（PFU/ml）=（样品每孔空斑均数 × 稀释度）/0.2 ml（plague forming units，PFU）。

1.2.3　实验分组与处理　　根据实验组处理方式不同，将实验分为 D_2V 病毒处理组、保护组（即加 1 ng/ml 抗 IL-6 抗体同 D_2V 病毒共孵育感染细胞）和正常对照组。用生长良好的第 2、3 代细胞进行实验，将细胞传到 24 孔板，待细胞生长至 80% 以上融合度时弃去培养液，加入 D_2V 病毒液，使其剂量为 10 PFU/细胞，或用无血清培养液孵育 2 h 后，处理组和对照组换以含 5% FCS 的培养液孵育，保护组换以 5% FCS 和含有 1 ng/ml 抗 IL-6 抗体的培养液孵育，分别至 4、12、24、48、72 h。收集标本上清液按试剂盒说明书分别检测 t-PA、PAI-1、TM、IL-6 等，实验重复 3 次，每次做复管。

1.3　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 进行统计分析，多组间比较用方差分析，与对照组比较用独立样本 t 检验。

2　结果

所分离的 HUVECs 在相差倒置显微镜下细胞为单层鹅卵石状镶嵌排列（图 1）。ABC 酶标法显示细胞胞浆中第Ⅷ因子相关抗原阳性，棕黄色的颗粒均匀地分布在整个细胞质，苏木精复染，细胞核呈蓝色，证明所分离的细胞为血管内皮细胞。D_2V 感染 C6/36 细胞后在倒置显微镜下可以观察到典型的空斑（图 2）。

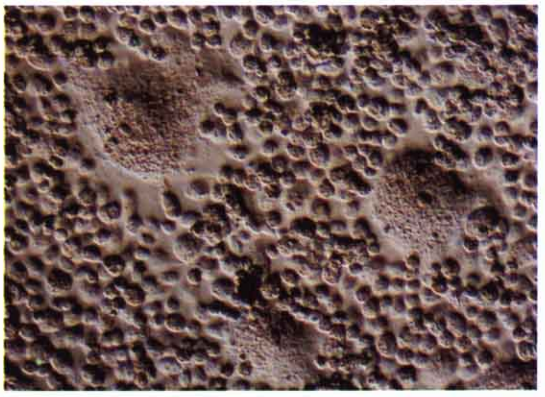


Fig 1　Shape of HUVECs during culture　（TEM × 400）

图 1　分离培养的脐静脉血管内皮细胞的形态　（TEM × 400）



图 2　C6/36 感染 D_2V 后形成的细胞蚀斑　（TEM × 400）

Fig 2　PFU produced by D_2V infected C6/36　（TEM × 400）

HUVECs感染 D_2V 后 6 h 即开始产生 IL-6，24 h 达高峰，以后逐渐下降。D_2V 感染后 12、24 h 内皮细胞分泌 IL-6 水平与正常对照组有明显差别（$P<0.05$）（表 1）。

表 1 D_2V 诱导 HUVECs 产生 IL-6 的动态观察（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of D_2V infection on IL-6 antigen level of HUVECs (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time (h)				
	4	12	24	48	72
Control	45.70±8.57	62.45±10.54	71.50±11.70	30.33±11.20	26.00±7.59
DV infection	64.65±11.01	109.59±12.36*	152.12±10.45*	55.48±10.46	43.10±6.67

*：$P<0.05$，*vs* control

D_2V 诱导 HUVECs 产生 t-PA、PAI-1 和 sTM 的动态变化。D_2V 感染或应用 D_2V 感染同时加抗 IL-6 抗体（1 ng/ml）共同作用 HUVECs 后，用 ELISA 试剂盒检测不同时刻培养液中 t-PA、PAI-1 和 sTM 的含量变化。从表 2 中可以看出，正常对照组上清液中 t-PA 含量增加缓慢，培养 24 h 后含量基本稳定在 9.5 ng/ml 左右；而在 D_2V 处理组上清液中 t-PA 含量迅速增加，在 24，48，72 h 时刻分别约为对照组的 2 倍、4 倍和 4 倍；加抗 IL-6 抗体的保护组相对于对照组，t-PA 没有统计差别，而与 D_2V 处理组相比，在 24 h 后至 72 h 均存在差异性（表 2）。但在不同组别中，HUVECs 上清液中 PAI-1 含量在不同时间组间无差异性（$P>0.05$）（表 3）。

表 2 D_2V 感染对 HUVECs 表达 t-PA 的影响（ng/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effects of D_2V infection on t-PA antigen levels of HUVECs (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time (h)				
	4	12	24	48	72
Control	3.03±0.72	5.03±1.17	9.27±2.15	9.90±3.06	10.07±4.27
Protection	3.30±1.25	5.33±1.14	13.67±3.41	13.90±3.21	14.80±3.68**
DV infection	3.27±0.70	7.17±2.25	19.30±3.26*##	36.97±9.25**##	40.37±9.29**##

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control；##：$P<0.01$，*vs* protection

表 3 D_2V 感染对 HUVECs 表达 PAI-1 的影响（ng/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Effects of D_2V infection on PAI-1 antigen levels of HUVECs (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time (h)				
	4	12	24	48	72
Control	24.67±2.21	24.43±3.98	28.37±7.53	26.60±7.99	29.87±9.85
Protection	26.93±2.40	29.60±4.52	30.70±7.99	34.47±10.50	34.90±9.84
DV infection	27.20±3.39	29.03±3.81	32.77±3.21	35.43±5.64	35.97±10.11

对于 sTM，不同组之间也存在差异，加抗 IL-6 抗体的保护组相对于对照组升高无统计学差别，但 D_2V 处理组在培养 36 h 之后相对于对照组开始上升，在 36、48、72 h 时大约高出对照组 1 倍左右（表 4）。

表 4 D_2V 感染对 HUVECs 表达 sTM 的影响（ng/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Effects of D_2V infection on sTM antigen levels of HUVECs (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time (h)				
	4	12	24	48	72
Control	6.20±1.55	6.17±1.39	6.27±1.67	6.70±2.79	7.07±2.17
Protection	6.73±1.76	7.10±1.59	9.33±3.45	10.20±2.86	10.23±3.54
DV infection	6.73±1.30	9.50±1.95	12.70±2.26	16.67±3.31*	16.77±3.54*

*：$P<0.05$，*vs* control

3 讨论

血管内皮细胞（vascular endothelial cells，VECs）对凝血和纤溶系统发挥重要作用。VECs 表面有肝素类物质，胞浆中含有多种细胞器，其中棒状小体（Weibel-Palade 小体）是 VWF 和 t-PA 等蛋白贮藏场所。生理状态下，t-PA 只由 VECs 表达，VECs 还可合成多种分子如 TM、PAI-1、PC 等，参与凝血和纤溶的调控。其中 TM 在抗凝途径中起关键作用。纤溶系统主要是由 VECs 合成的 t-PA 激活纤溶酶原转化为纤溶酶而活化，PAI-1 可有效抑制 t-PA，整个纤溶系统状态主要由 t-PA 和 PAI-1 水平决定。因此 VECs 一旦活化或受损，合成这些蛋白失调可导致凝血和纤溶系统生理平衡失常，引起止血异常。

文献[2]报道 DHF/DSS 患者急性期血液处于纤溶亢进状态，血浆中 t-PA 明显升高，但其机制不清。我们用 HUVECs 来研究 D_2V 感染对 t-PA 和 PAI-1 表达影响，结果显示（表 2，3）HUVECs 在无 D_2V 感染状态下，培养上清中 t-PA 和 PAI-1 呈缓慢增加并维持在较低水平，这提示 HUVECs 在无 D_2V 感染时处于纤溶生理性平衡。然而当 D_2V 感染 HUVECs 时，t-PA 快速增加而 PAI-1 维持不变（表 2，3）。结果提示 D_2V 可以特异地诱导内皮细胞产生 t-PA 而不影响 PAI-1。

许多因素均可诱导内皮细胞 t-PA 表达上调。IL-6 可以提高内皮细胞 t-PA 表达水平[3]，我们结果表明 D_2V 感染上调内皮细胞表达 IL-6（表 1），而 IL-6 又可增加 D_2V 对内皮细胞的感染率[4]。进一步我们应用高浓度抗 IL-6 抗体以消除 IL-6 的影响，观察在无 IL-6 因素的情况下，D_2V 诱导内皮细胞这些蛋白的变化。结果显示（表 2，3）t-PA 表达明显下调，PAI-1 没有变化。IL-6 作为一个多功能的细胞因子，除可影响 B 细胞和 T 细胞的增殖和分化外，还具有其它重要的生物学功能[5~7]，它可以直接增加血管的通透性，同时 IL-6

又可增强炎性细胞的聚集，在局部炎症反应中起关键作用；IL-6 还与 t-PA 和 PAI-1 的分泌调节密切相关[3]，IL-6 诱导内皮细胞分泌 t-PA 正相关并呈时间-剂量依赖关系[8]。我们的结果证明 D_2V 感染同样可以诱导内皮细胞产生 IL-6，在感染后 24 h 内皮细胞分泌 IL-6 达到高峰；当用 D_2V 直接感染时，t-PA 显著升高，而用抗 IL-6 抗体消除 IL-6 的作用时，D_2V 所诱导的 t-PA 明显降低，进一步说明在诱导内皮细胞 t-PA 过程中，IL-6 对 D_2V 诱导内皮细胞表达 t-PA 起协同作用。IL-6 增强 D_2V 感染的内皮细胞表达 t-PA，这一方面加重内皮细胞因 D_2V 感染而导致的损伤，另一方面因上调内皮细胞表达 t-PA 而活化纤溶系统，引起纤溶亢进。因此 IL-6 对 D_2V 感染、患者病情恶化、血浆渗漏、甚至出血等有重要作用。

TM 是内皮细胞膜表面的一种抗凝蛋白，主要通过与凝血酶结合后活化 PC 为活化蛋白 C（activated protein C，APC）发挥抗凝活性[9]。多种蛋白酶可水解膜型 TM 成为血浆中可溶性 TM（soluble TM，sTM），sTM 在许多伴有内皮细胞损伤的疾病中都可升高；当 TM 表达上调时，亦可因膜型 TM 增加导致代谢加强、水解脱落而致 sTM 升高，因此 sTM 的升高可能预示内皮细胞的 TM 基因表达上调和或内皮细胞损伤[10]。文献[11]报道从人体尿液中提纯的 sTM 与重组的 TM 也可结合凝血酶而存在抗凝功能。本研究中我们用 D_2V 与抗 IL-6 抗体共同作用，以及用 D_2V 单独作用于内皮细胞结果表明（表 4）D_2V 感染可以显著提高 sTM 的含量，而当 D_2V 感染的同时应用抗 IL-6 抗体消除 IL-6 的作用时，所产生的 sTM 与对照组无统计学差别，这说明 D_2V 感染内皮细胞在 IL-6 的协同作用下使内皮细胞损伤或活化，亦或是上调 TM 表达，进一步增强抗凝功能。至于 sTM 升高是否是因为 TM 表达上调还是内皮细胞损伤或活化，尚有待进一步研究证实。

总的看来，我们的结果证实了 D_2V 可以感染血管内皮细胞，进一步促进内皮细胞表达 t-PA 和 IL-6，甚至可能上调 TM 的表达而不影响 PAI-1。IL-6 可以显著增强 D_2V 对内皮细胞的感染，协同 D_2V 上调内皮细胞 t-PA 和或 TM 表达水平，诱发 t-PA 和 sTM 水平升高，高水平的 t-PA 和 sTM 引起血浆中纤溶和或凝血途径失衡。同时 D_2V 诱导内皮细胞表达的前炎症因子 IL-6 诱发局部炎症反应，诱导血管内皮细胞渗透性升高；在内皮细胞生理性屏障损伤的情况下，纤溶和抗凝途径活化可部分解释 DHF/DSS 患者血浆渗漏、血容量下降和出血。

参考文献：

[1] Wills B A, Oragui E E, Stephens A C, *et al*. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic Fever: serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35 (3): 277 - 285.

[2] Huang Y H, Liu C C, Wang S T, *et al*. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection[J]. J Med Virol. 2001, 63(3): 247 - 251.

[3] Hosoya S, Ohbayashi E, Matsushima K, *et al*. Stimulatory effect of interleukin-6 on plasminogen activator activity from human dental pulp cells[J]. J Endod, 1998, 24(5): 331 - 334.

[4] 江振友，江丽芳，郭辉玉. 白细胞介素 6 在登革热病毒感染人脐静脉内皮细胞中的作用[J]. 中国人兽共患病杂志，1997, 13(1): 3 - 6.

[5] Suharti C, van Gorp E C, Setiati T E, *et al*. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome[J]. Thromb Haemost, 2002, 87(1): 42 - 46.

[6] Sanchez Burgos G, Hemandez Pando R, Campbell I L, *et al*. Cytokine production in brain of mice experimentally infected with dengue virus[J]. Neuroreport, 2004, 15(1): 37 - 42.

[7] Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking T M, *et al*. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 35(1): 33 - 42.

[8] Huang Y H, Lei H Y, Liu H S, *et al*. Tissue plasminogen activator induced by Dengue virus infection of human endothelial cells[J]. J Med Virol, 2003, 70(4): 610 - 616.

[9] Rijneveld A W, Weijer S, Florquin S, *et al*. Thrombomodulin mutant mice with a strongly reduced capacity to generate activated protein C have an unaltered pulmonary immune response to respiratory pathogens and lipopolysaccharide[J]. Blood, 2004, 103(5): 1702 - 1709.

[10] Szegedi N, May Z, Ovary C, *et al*. Molecular markers of endothelial dysfunction in acute ischemic stroke[J]. Ideggyogy Sz, 2002, 55 (3-4): 102 - 108.

[11] Dhainaut J F, Yan S B, Cariou A, *et al*. Soluble thrombomodulin, plasma-derived unactivated protein C, and recombinant human activated protein C in sepsis[J]. Crit Care Med, 2002, 30 (5 Suppl): S318 - S324.

（编辑　薛国文）