

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.007

文章编号: 1005-8982(2016)12-0030-05

论著

## 牙本质基质蛋白 1 和肿瘤坏死因子 - $\alpha$ 对汉滩病毒感染的脐静脉内皮细胞的作用\*

史东沙<sup>1</sup>, 董艳迎<sup>1</sup>, 赵丽华<sup>2</sup>, 谢明<sup>1</sup>

(1. 西安交通大学医学部 免疫学与病原生物学系, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学第二附属医院 检验科, 陕西 西安 710061)

**摘要:目的** 探讨肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  和牙本质基质蛋白 1 对汉滩病毒感染的脐静脉内皮细胞通透性的影响, 为阐明肾综合征出血热发病过程中通透性增高的机制提供实验基础。**方法** 首先用免疫细胞化学方法检测牙本质基质蛋白 1 在脐静脉内皮细胞的表达情况, 然后通过 Transwell 单层细胞模型系统检测外源性肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  和牙本质基质蛋白 1 对汉滩病毒感染的血管内皮细胞通透性的影响。**结果** 牙本质基质蛋白 1 可以在血管内皮细胞表达, 汉滩病毒感染对牙本质基质蛋白 1 表达量无显著性影响, 汉滩病毒感染后加入肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  使牙本质基质蛋白 1 表达量显著性增加 ( $P < 0.05$ )。单纯汉滩病毒感染后, 通透性无显著性变化 ( $P > 0.05$ ), 而感染细胞加入外源性肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  或牙本质基质蛋白 1 后, 内皮细胞通透性显著增加 ( $P < 0.05$ ), 两者联合作用能促进通透性进一步增加 ( $P < 0.05$ )。**结论** 牙本质基质蛋白 1 广泛表达在血管内皮细胞, 肿瘤坏死因子 -  $\alpha$  和牙本质基质蛋白 1 均可使汉滩病毒感染的脐静脉内皮细胞通透性显著增高, 且两者存在联合作用。

**关键词:** 肾综合征出血热; transwell 单层细胞模型系统; 通透性

**中图分类号:** R373.32

**文献标识码:** A

## Function of DMP1 and TNF- $\alpha$ in hemorrhagic fever of renal syndrome\*

Dong-sha Shi<sup>1</sup>, Yan-ying Dong<sup>1</sup>, Li-hua Zhao<sup>2</sup>, Ming Xie<sup>1</sup>

(1. Department of Immunology and Pathogenic Biology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of hyper-permeability in hemorrhagic fever of renal syndrome (HFRS). **Methods** Immunocytochemistry was used to detect the production of dentin matrix protein 1 (DMP1). The penetrability changes of human umbilical vein endothelial cells were detected by transwell monolayer system. Uninfected vein endothelial cells were used as the negative control in each experiment. Immunofluorescence was used to guarantee that cells were infected by HTNV before each experiment. **Results** HTNV infection alone did not change the penetrability of vein endothelial cells. but the penetrability elevated remarkably after TNF- $\alpha$  or DMP1 were added, and increased even more when both two were added. **Conclusions** TNF- $\alpha$  and DMP1 can increase the penetrability of HTNV infected endothelial cells, and there were combined effects. They may play a role in the immunopathogenesis of HFRS.

**Keywords:** hemorrhagic fever of renal syndrome; transwell monolayer system; penetrability

收稿日期: 2015-12-02

\* 基金项目: 陕西省科技计划项目基金资助课题 (No: 2012SF2-12)

肾综合征出血热(hemorrhagic fever renal syndrome, HFRS)是一种以发热、出血和急性肾功能损害为主要特征的急性传染病,汉坦病毒(Hantavirus, HV)是 HFRS 的病原体,目前已经确认的汉坦病毒有 23 种,在我国流行的主要为汉滩型(hantaan virus, HTNV)<sup>[1-2]</sup>。HFRS 的具体机制尚未阐明,但是 HFRS 发病过程中存在的免疫病理损伤已被公认,其基本病变是血管内皮细胞损伤和渗透性增加导致的有效血容量下降,研究表明 HFRS 血管内皮损伤的机制可能为病毒感染的免疫细胞释放的细胞因子作用:如病毒感染的单核/巨噬细胞释放的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 在病程中表达异常并与血管内皮细胞损伤相关, TNF- $\alpha$  在 HFRS 患者中水平增高,且与疾病的严重程度密切相关,但 TNF- $\alpha$  发挥作用的具体机制尚不清楚<sup>[3]</sup>。

牙本质基质蛋白 1 (dentin matrix protein 1, DMP1) 属于小整合素结合配体 N 端联接糖蛋白家族(small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein family, SIBLING)<sup>[4]</sup>。最早在牙本质和骨组织中被发现,近期发现 DMP1 表达广泛,在颌下腺组织和肿瘤组织中均有表达<sup>[5-6]</sup>。近期研究发现, DMP1 可以通过激活其伴侣基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 降解基底膜的 IV 型胶原和黏着连接的组成成分血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin, VE-cadherin),该过程可能会导致通透性的增高。而近期有研究显示 TNF- $\alpha$  可以促进 MMP9 的表达<sup>[7]</sup>,因而推测 TNF- $\alpha$  和 DMP1 可能在 HFRS 患者通透性增高过程中发挥联合作用。

本研究的目的是,通过免疫细胞化学技术检测 DMP1 在 HTNV 感染的脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的表达情况,以及 TNF- $\alpha$  对其表达量的影响。并通过 Transwell 单层细胞模型系统检测 DMP1 及 TNF- $\alpha$  对 HTNV 感染的 HUVEC 通透性的影响。为阐明 HFRS 发病过程中通透性增高的机制提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和病毒

原代 HUVEC 购自上海澳赛尔公司,采用该公司的内皮细胞完全培养基培养,内含内皮基础培养液,10%的胎牛血清和 2%的生长因子添加剂(含表皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、环磷酸腺苷、肝素、醋酸氢化可的松、青霉素、链霉素、两性霉

素 B 溶液等)。细胞培养瓶提前用 0.25%的明胶(美国 Sigma 公司)包被以保证细胞能均匀生长。所有实验均保证细胞控制在 p3 到 p5 代内使用。非洲绿猴肾细胞(African green monkey kidney cell, VERO)和汉滩病毒国际标准株 HTNV 76-118 由第四军医大学唐都医院感染科王平忠教授惠赠。采用免疫荧光化学方法鉴定病毒在细胞的复制情况,并采用 Reed-Muench 法测定病毒滴度。

### 1.2 间接免疫荧光检测病毒感染情况

VERO 细胞在 24 孔板培养,待细胞融合至 50%~60%时弃去培养基,加入 HTNV 悬液 37℃培养 2 h 后弃去病毒悬液加入新鲜培养基继续培养,病毒感染 3 d 后采用间接免疫荧光方法进行检测。首先,用 4%的多聚甲醛 4℃固定 20 min,然后采用 0.5%的 TritonX-100 室温通透 10 min,5%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭 30 min,然后加入鼠抗人 HTNV 1A8 抗体(第四军医大学唐都医院感染科王平忠教授惠赠,1:1 000 稀释)4℃过夜。然后加入羊抗鼠异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG)(中国北京中杉金桥生物公司)37℃孵育 1 h。每一步结束后均用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗 3 次,每次 5 min。最后在荧光显微镜(日本奥林巴斯公司)上观察。

### 1.3 免疫细胞化学法检测 DMP1 在 HUVEC 的表达

将 HUVEC 爬片后用 HTNV (感染复数=1)感染,3 d 后加入 TNF- $\alpha$  刺激 30 min, PBS 冲洗后加入 4%的多聚甲醛 4℃固定 20 min,加入 0.5%的 TritonX-100 室温通透 10 min, PBS 冲洗 3×5 min,除去 PBS,每张玻片加 50  $\mu$ l 内源性过氧化物酶阻断剂,室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3×5 min,除去 PBS,每张玻片加入 50  $\mu$ l 二抗动物非免疫血清,室温下孵育 15 min;甩干玻片上的血清,每张盖玻片上滴加鼠抗人 DMP1 一抗(美国 Santa Cruz 公司,1:100 稀释)4℃过夜, PBS 冲洗 3×5 min,除去 PBS,每张玻片加 50  $\mu$ l 生物素标记的羊抗鼠二抗(福州迈新生物技术开发有限公司),37℃放置 1 h, PBS 冲洗 3×5 min;除去 PBS,每张玻片滴加 50  $\mu$ l 链霉素抗生物素过氧化物酶溶液,室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3×5 min;除去 PBS,每张玻片滴加一滴新鲜配制的二氨基联苯胺显色液,室温下显色 2~10 min,在显微镜下控制染色时间;将染色液冲洗干净,干燥后中性树脂封片,将样品置于显微镜下观察。阴性对照组

用 PBS 代替一抗进行反应。图像半定量分析:显微镜观察,每组随机取 15 个视野,Image-Pro Plus 6.0 分析各视野下平均光密度值(average optical density, AOD)。AOD 为阳性目标光密度和阳性面积比 (IOD/area),代表待测抗原的量。

#### 1.4 Transwell 单层细胞模型系统检测 HUVEC 的通透性变化

HUVEC 接种于基质胶(10  $\mu$ g/ml)包被的 Costar Transwell 单层细胞模型系统(孔径 3  $\mu$ m),HUVEC 生长在内皮细胞完全培养基,细胞密度是  $3 \times 10^4$  个;HTNV 感染 transwell 系统中的 HUVEC 3 d 后,细胞密度接近 100%,长成均匀致密单层,HUVEC 在内皮基础培养基中饥饿过夜;FITC 标记的葡聚糖(FITC-dextran, 0.5 mg/ml)加入 Transwell 的上室,在相应组加入 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml),DMP1(100 nmol/L),一式 3 份。反应 30 min 后,从每个 transwell 的下室吸取 100  $\mu$ l 样品,样品中葡聚糖的含量在荧光酶标仪(490 nm 处激发,530 nm 处发射)中检测,以检测样本中的相对荧光强度来反映 TNF- $\alpha$ ,DMP1 与 HTNV 对 HUVEC 通透性的影响。

#### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,免疫组织化学 AOD 值及 transwell 的相对荧光强度分别用单因素方差分析(one way-ANOVA),两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 VERO 细胞及原代脐静脉内皮细胞生长状态良好(见图 1)

### 2.2 HTNV 感染的 VERO 和 HUVEC 鉴定及病毒滴度测定

HTNV 感染 72 h 后几乎所有的 VERO 细胞均被感染,HUVEC 在 HTNV 感染 72 h 后也被感染,阴性对照组均无荧光。Reed-Muench 法测定病毒的 TCID<sub>50</sub> 为  $6.31 \times 10^6$ /ml。

### 2.3 DMP1 在 HUVEC 的表达情况

免疫细胞化学检测显示 DMP1 可以表达在 HUVEC;HTNV 感染可以导致其表达的轻微上升;感染细胞加入 TNF- $\alpha$  后 DMP1 的表达量显著升高( $P=0.009$ );单独 TNF- $\alpha$  刺激对 DMP1 的表达量无显著性影响,见图 2 和表 1。

### 2.4 DMP1、TNF- $\alpha$ 对 HTNV 感染的 HUVEC 的通透性影响

DMP1 和 TNF- $\alpha$  均可显著提高 HTNV 感染的 HUVEC 的通透性(见图 3A,3B),且两者联合作用后,感染 HUVEC 的通透性进一步增加,与单独作用比较差异有统计学意义(见图 3C,3D)。而 DMP1, TNF- $\alpha$  单独作用对于通透性的影响明显低于 HTNV 感染组(见图 3A,3B)。如表 2 所示,HTNV 单独

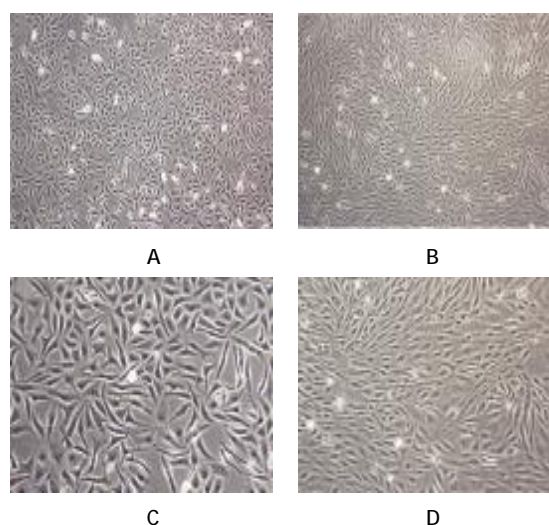


图 1 细胞培养结果  
A:生长良好的 VERO 细胞;B:原代脐静脉内皮细胞;C、D 分别是其放大图

图 1 细胞培养结果

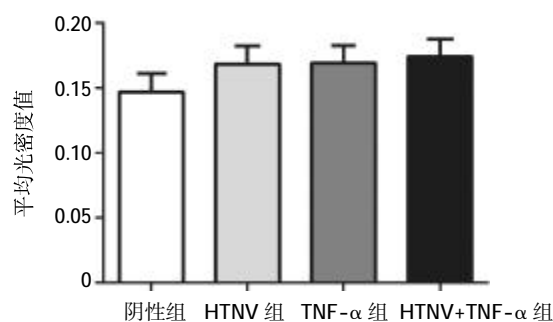


图 2 DMP1 在 HUVEC 的表达变化

表 1 各组 DMP1 表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$ (-)	TNF- $\alpha$ (+)
HTNV(-)	0.147 $\pm$ 0.019	0.169 $\pm$ 0.018
HTNV(+)	0.168 $\pm$ 0.014	0.174 $\pm$ 0.014

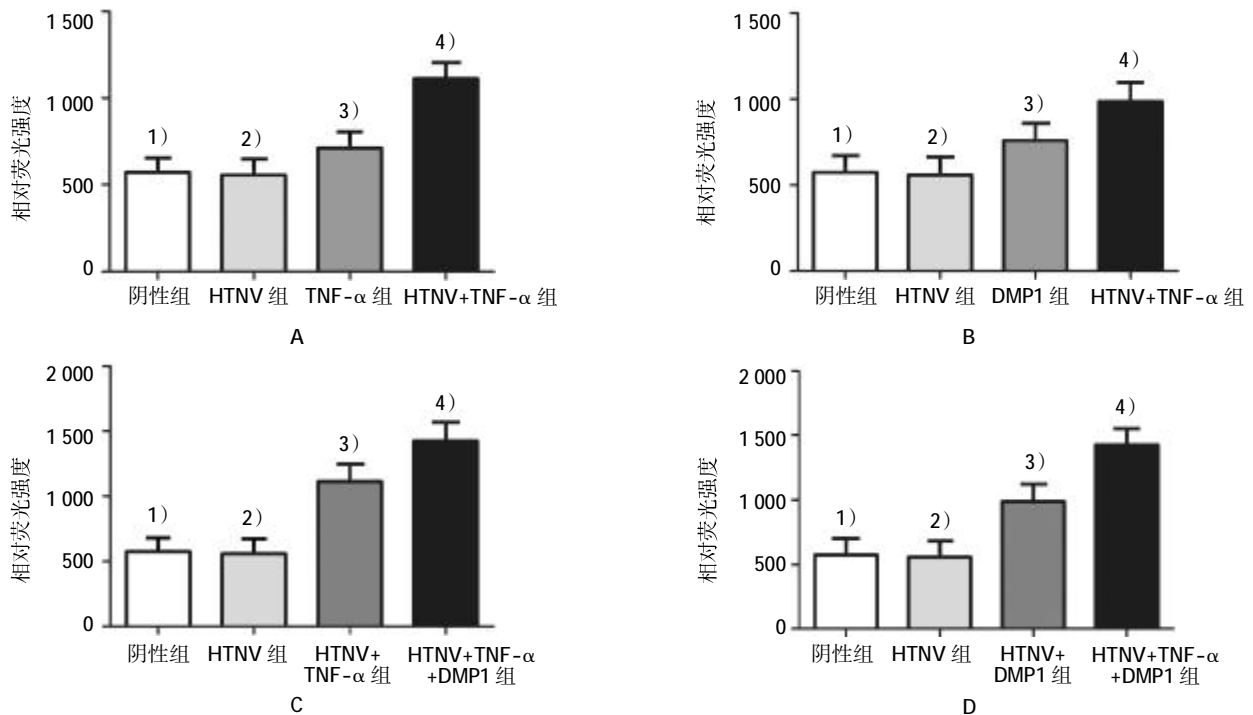
表 2 各组通透性变化情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	空白组	TNF- $\alpha$	DMP1	DMP1+TNF- $\alpha$
HTNV(-)	573 $\pm$ 60	713 $\pm$ 78	759 $\pm$ 162	735 $\pm$ 78
HTNV(+)	557 $\pm$ 76	1113 $\pm$ 254	985 $\pm$ 149	1426 $\pm$ 283

作用并不能提高 HUVEC 的通透性。

确定 DMP1 可以表达在 HTNV 感染的 HUVEC 后,笔者进一步检测 DMP1 和 TNF- $\alpha$  对 HTNV 感染的 HUVEC 通透性的影响。结果显示,DMP1 和 TNF- $\alpha$  均可显著提高 HTNV 感染的 HUVEC 的通透性( $P=0.000$ ),且两者联合作用后感染 HUVEC 的

通透性进一步增加,与单独作用比较差异有统计学意义(与 HTNV+TNF- $\alpha$  组比较, $P=0.002$ ,与 HTNV+DMP1 组比较, $P=0.000$ )。而 DMP1,TNF- $\alpha$  单独作用对于通透性的影响远远低于 HTNV 感染组分别为( $P=0.033$  和  $0.000$ )。HTNV 单独作用并不能提高 HUVEC 的通透性。见图 3 和表 2。



A、B: 1)与 2)比较,差异无统计学意义;1)与 3)比较,通透性显著增加, $P<0.05$ ;1)与 4)比较;2)与 4)比较;3)与 4)比较,通透性显著增加, $P<0.01$ ;C、D: 1)与 2)比较,差异无统计学意义;1)与 3)比较;1)与 4)比较;2)与 3)比较;2)与 4)比较,均为通透性显著增加, $P<0.01$ ;3)与 4)比较,通透性显著增加, $P<0.01$

图 3 Transwell 技术检测 HUVEC 的通透性

### 3 讨论

HTNV 的主要靶细胞是血管内皮细胞和单核巨噬细胞,在病毒侵入人体后不久,机体产生细胞和体液免疫应答,参与 HFVS 的发病过程。TNF- $\alpha$  是由单核巨噬细胞和血管内皮细胞等产生的一种调节机体免疫和代谢过程的多功能细胞因子,是机体免疫防御、炎症损伤和休克等发生的重要介质。TNF- $\alpha$  在体内维持一定浓度对机体发挥生理功能有重要作用,但血中浓度过高,则可能会对机体造成损害,已有研究证实,HFVS 患者中的 TNF- $\alpha$  的水平增高且与疾病进程密切相关<sup>[9]</sup>。HFVS 基本的病理生理改变为全身微血管损伤,通透性增加,而 TNF- $\alpha$  又可进一步增加血管的通透性。然而 TNF- $\alpha$  引起通透性增高的具体机制鲜有报道。

DMP1 是一种非胶原蛋白,近年来发现其表达十分广泛,在肾、脑、肿瘤组织等均有表达<sup>[6]</sup>。有研究证实,DMP1 能通过激活其伴侣 MMP9 降解基底膜的 IV 胶原等成分,基底膜是一种特化的细胞外基质,是细胞间物质转移的物理屏障<sup>[9]</sup>。本文证实,DMP1 可以表达在 HTNV 感染的血管内皮细胞,这说明 DMP1 可能在 HFVS 的发病中扮演一定角色。HTNV 单独作用于 HUVEC 并不能引起通透性增高,病毒感染细胞加入 TNF- $\alpha$  之后,DMP1 的表达量显著增加。DMP1 可以活化重组人基质金属蛋白酶前体 -9 并增强 MMP-9 酶解活性,通过破坏局部组织结构降解基底膜屏障,改建细胞外基质,使通透性增加<sup>[9]</sup>。故笔者推测在 HFVS 的发病过程中,TNF- $\alpha$  通过促进 DMP1 表达增加促使通透性增高。

进一步的实验证实,DMP1 和 TNF- $\alpha$  均可使体

外 HTNV 感染的单层血管内皮细胞的通透性增加,且两者联合作用对通透性的增高作用明显高于各自独立作用,差异有统计学意义。TNF- $\alpha$  可以促进血管内皮钙黏蛋白 VE-cadherin 的磷酸化、内化,并可以促进血管内皮生长因子 VEGF 和 MMP-9 的表达<sup>[10]</sup>。血管内皮钙黏蛋白是内皮细胞间黏着连接的主要成分<sup>[11]</sup>,钙黏蛋白的内化会导致黏着连接的解体,细胞间隙增大,这可能是 TNF- $\alpha$  引起通透性增高的一方面原因。另一方面,TNF- $\alpha$  可以促进 MMP-9 的表达<sup>[10]</sup>,而 DMP1 可以激活 MMP-9,两者可能联合参与了降解基底膜的过程从而使通透性大大增加,实验结果中 DMP1 和 TNF- $\alpha$  的共同作用使 HTNV 感染的 HUVEC 通透性增加明显,显著高于单独作用组,也支持这一推断。

综上所述,本文通过免疫细胞化学技术实验证明 DMP1 可以表达在 HTNV 感染的 HUVEC,且进一步实验证明 TNF- $\alpha$  和 DMP1 可以促进 HTNV 感染的血管内皮细胞通透性增加,且两者存在联合作用,该结果为阐明 TNF- $\alpha$  引起通透性增高的机制提供实验数据支持,MMP-9 在 HFRS 中的直接作用将在接下来的实验中进行研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] 姜东伯,孙元杰,董忱,等. 国际汉坦病毒研究进展 - 第 9 届肾综合征出血热、汉坦病毒肺综合征及汉坦病毒国际会议概况[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, (10): 1-3.
- [2] 于蒙蒙. 汉坦病毒感染 THP-1 细胞激活炎症小体通路及其分子机制的初步研究[D]. 陕西: 第四军医大学, 2013.
- [3] DONG Y, SHI D, LI M, et al. Elevated serum levels of decoy receptor 3 are associated with disease severity in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. Intern Emerg Med, 2015, 10(5): 567-573.
- [4] 杨晓娟, 王文瑞. 我国肾综合征出血热研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2014, 14(7): 50-51.
- [5] LI C, XIE X, WANG X, et al. Differential expression and localization of dentin matrix protein 1 (DMP1) fragments in mouse submandibular glands[J]. J Mol Histol, 2013, 44(2): 231-239.
- [6] 陈慧鲜, 裴路. 牙本质基质蛋白 -1 的研究近况 [J]. 口腔医学, 2014, 34(2): 141-143.
- [7] WANG J H, SU F, WANG S, et al. CXCR6 deficiency attenuates pressure overload-induced monocytes migration and cardiac fibrosis through downregulating TNF-alpha-dependent MMP9 pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6514-6523.
- [8] 占柳, 谢淑娟, 潘卫红. 牙本质基质蛋白 -1 及其特异性表达的研究进展[J]. 现代口腔医学杂志, 2013, 27(1): 55-58.
- [9] AKDENIZ O, AKDUMAN D, HAKSEVER M, et al. Relationships between clinical behavior of laryngeal squamous cell carcinomas and expression of VEGF, MMP-9 and E-Cadherin [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2013, 14 (9): 5301-5310.
- [10] JAYASOORIYA R G, DILSHARA M G, PARK S R, et al. 18 beta-Glycyrrhetic acid suppresses TNF-alpha induced matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor by suppressing the Akt-dependent NF-kappa B pathway[J]. Toxicol In Vitro, 2014, 28(5): 751-758.
- [11] 黄达阳, 赵鹏. 血管内皮钙粘蛋白与血管性疾病的研究进展[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(2): 152-154.

(张蕾 编辑)